

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**E2F1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ'NÜN
AKTİVASYONUNDA PROTEİN KİNAZ-A'NIN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mustafa Gökhan ERTOSUN

Doktora Tezi

Antalya, 2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

E2F1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ’NÜN AKTİVASYONUNDA PROTEİN KİNAZ-A’NIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mustafa Gökhan ERTOSUN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
(Proje no:2013.03.0122.009) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 12/04/2016 tarih ve 02/05 sayılı enstitü kurul kararı gereğince "Doktora öğrencilerinin doktora tez savunma sınavına girebilmeleri için, eğitimini aldığı doktora bilim alanında uluslararası atıf indekslerine (SCI, SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, Sport Discus, Spolit, CINAHL vb) kayıtlı dergilerin birinde en az bir yurtdışı yayın yapması gerekmektedir." ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

- 1. Ertosun, M. G.,** F. Z. Hapil and O. Osman Nidai (2016). "*E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling.*" Cytokine Growth Factor Rev.
- 2. Kahraman, S.,** E. Dirice, F. Z. Hapil, **M. G. Ertosun,** S. Ozturk, T. S. Griffith, S. Sanlioglu and A. D. Sanlioglu (2011). "*Tracing of islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging.*" Diabetes Metab Res Rev 27(6): 575-583.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 25 /07/2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman Nidai ZEş
Akdeniz niversitesi

ye : Prof. Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM
Akdeniz niversitesi

ye : Prof. Dr. Ahter şANLIOğLU
Akdeniz niversitesi

ye : Prof. Dr. Hakan AKÇA
Pamukkale niversitesi

ye : Prof. Dr. Burçak VURAL
İstanbul Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../2016 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Dr. Mustafa Gökhan ERTOSUN

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca emek veren, yol gösteren ve her zaman destek olarak verimli bir doktora eğitimi tamamlamamı sağlayan, bilimsel ve ahlaki olarak örnek aldığım, asistanı olmaktan gurur duyduğum, ayrıca tez çalışmamda müdürlüğünü yürüttüğü Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi' nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ' e,

Doktora eğitimim boyunca ilgi ve hoşgörüsünü eksik etmeyerek, bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr.Sibel BERKER KARAÜZÜM' e,

Doktora eğitimim boyunca ilgi ve hoşgörüsünü eksik etmeyen, bilimsel ve ahlaki olarak örnek aldığım Prof. Dr. Ömer ÖZKAN ve Doç. Dr. Özlenen ÖZKAN'a,

Doktora eğitimim süresinde her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan ve bilimsel araştırmaya teşvik eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri hocalarıma,

Doktora eğitimim boyunca manevi ve bilimsel destekleri için çalışma arkadaşım Araş. Gör. Fatma Zehra HAPİL'e ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Asistanlarından Araş. Gör. Ece ÇOPUROĞLU, Araş. Gör. Ufuk MERT, Araş. Gör. Özlem YILMAZ'a ve değerli arkadaşım Araş.Gör. Nazlı Ece ORDUERİ'ne

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, sekreterliğine, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ndeki ve Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki hocalarıma, uzmanlarına, teknisyen arkadaşlarıma ve sekreterliğine

Doktora eğitimim boyunca ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında verdikleri desteği, emeği, güveni, anlayışları ve her zaman yanımda hissettiğim sevgileri için başta sevgili aileme, BUZ'uma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ÖZET

Adenoviral E1 ve E2 genlerinin, transkripsiyondan sorumlu olduğunun gösterilmesi ile keşfedilen *E2F1* geni, 20. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. Translasyon ürünü ise 437 aminoasitlik bir proteindir. Dimerizasyon partneri ile dimer oluşturduktan sonra E2F1 hücre siklusunun G1 aşamasında aktif hale geçmekte ve hücre bölünmesi ile ilgili DNA Polimeraz gibi birçok sayıda genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Transkripsiyonel olarak kontrol edilebilen E2F1 aktivitesinin post-translasyonel modifikasyonlar ile de kontrol edildiği görülmektedir. Translasyon sonrası E2F1, P/CAF aracılığıyla asetilasyona, Set 9 ile metilasyona ve CHK2 aracılığıyla da fosforilasyona uğrayabilmektedir. Set 9-aracılı metilasyonu E2F1'in parçalanmasına yol açarken, CHK2 ve P/CAF modifikasyonları ise metilasyonu engelleyerek proteinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. DNA Hasarı, UV maruziyeti gibi patolojik koşullarda post-translasyonel modifikasyonlara uğrayan E2F1'in, fizyolojik koşullarda da çeşitli moleküller tarafından post-translasyonel modifikasyonlara uğratılması mümkündür. Epinefrin, adrenalin, endotelin-1 ve çok sayıda kemokin hücre fizyolojisinde hayati fonksiyonlar görürler ve etkinliklerini GPCR (G-protein coupled receptors) olarak isimlendirilen reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu reseptörlerin bahsedilen ligantları tarafından aktive edilmeleri durumunda pek çok yolak aktive edilir ve bu yollardan biri de Adenilat Siklaz dır. Aktive edilen Adenilat siklaz ATP'den cAMP oluşturur. Bunun yanı sıra cAMP seviyesi hücre içi glukoz miktarının azaldığı durumlarda da yükselir. cAMP ilk keşfedilen ikincil mesajcı olup hücrede biyolojik etkinliğini PKA enzimini aktive ederek gösterir. Aktive olan PKA biyolojik aktivitesini hedef proteinlerinde RxxS/T konsensus dizisinde yer alan Serin (S) veya Treonin (T) amino asitlerini fosforile ederek gösterir. Genel olarak hücre içi cAMP seviyesinin artmasına bağlı PKA aktivasyonu hücre proliferasyonunu negatif olarak etkiler. Bu gerçekler ışığında, aktive edilen PKA enziminin hücre döngüsünün başlamasını kontrol eden E2F1 aktivitesini negatif etkileyeceğini düşündük. Bu bilgiler doğrultusunda, E2F1'in PKA substratı olup olmayacağını görmek için E2F1'in aminoasit dizisini incelediğimizde E2F1 proteininde üç adet muhtemel PKA konsensus fosforilasyon bölgesi saptadık. Bu fosforilasyon noktaları, 127-130, 232-235 ve 361-364 pozisyonlarında lokalize olan RYET, RLLS ve RMGS amino asit dizileridir. Bu bölgelerdeki Treonin ve Serin amino asitlerinin PKA tarafından fosforile edilebileceğini ve bu fosforilasyonların E2F1 aktivitesini etkileyeceğini düşünerek ilgili amino asitlerin kodonlarını yarattığımız ökaryotik E2F1 ekspresyon vektöründe fosforile edilemeyen Alanin ve fosforilasyonu taklit eden negatif yüklü Glutamik Asit kodonlarına çevirdik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PKA-aracılı E2F1 fosforilasyonunun hücre proliferasyonu, apoptozis indüksiyonu, glukoz alımı ve Sisplatin-aracılı hücre ölümüne etki ettiğini gösterdik.

Anahtar Kelimeler: E2F1, PKA, Hücre Döngüsü, Hücre Metabolizması, Kanser

ABSTRACT

E2F1 gene, which was discovered by the demonstration that adenoviral E1 and E2 genes were responsible for transcription of viral genome, resides on the long arm of 20th chromosome. Its product is a protein comprising 437 aminoacids. After dimerizing with its partner, E2F1 becomes active during G1 phase of cell cycle and induces the transcription of numerous cell cycle-associated genes such as that of DNA Polymerase. As well as being transcriptionally controlled, E2F1 activity is modulated by means of post-translational modifications. Post-translationally, E2F1 is acetylated by P/CAF, methylated by Set 9 and phosphorylated by CHK2. While Set 9-mediated methylation leads to degradation of E2F1, CHK2 and P/CAF-mediated modifications prevent Set9-mediated methylation and prevents its degradation. In addition to post-translational modifications occurring in response to pathological situations like UV exposure and DNA damage, E2F1 can also undergo post-translational modifications by various molecules under physiological conditions. Epinefrin, adrenalin, endotellin-1 and numerous chemokines play pivotal role in cell physiology, and these transmit their signals by binding to GPCR (G-protein coupled receptors). Activation of these receptors by above mentioned ligands induces activation of several pathways one of which is Adenylate cyclase. Activated adenylate cyclase produces cAMP from ATP. In addition to these, cellular cAMP levels is also increased when glucose level goes down. cAMP is the first second messenger discovered and elicits its biological effect by activating PKA enzyme. Activated PKA elicits its biological effect by phosphorylating target proteins which contain Serin or Treonin amino acids in consensus RxxS/T motif. In general, increase of cellular cAMP level and resulting PKA activation negatively regulate cell proliferation. Under the light of these we thought that activated PKA would negatively affect the activity of E2F1 which controls initiation of cell cycle. In this regard, to see whether E2F1 can be a substrate for PKA we looked at the amino acid sequence of E2F1 and found three hypothetical consensus PKA phosphorylation sites. These phosphorylation sites are RYET, RLLS ve RMGS amino acid sequences and these are localized at 127-130, 232-235 ve 361-364 positions. By assuming the fact that Serin and Treonin at these sites will be phosphorylated by PKA, and these phosphorylations would affect the activity of E2F1, we converted codons of Serine and Treonin to non-phosphorylatable Alanin and phosphorylation mimicking Glutamic acid codon on eukaryotic E2F1 expression vector we created. According to our results, PKA-mediated phosphorylation of E2F1 seems to have an effect on cell proliferation, induction of apoptosis, glucose uptake and cisplatin-induced cell death.

Key words: E2F1, PKA, Cell Cycle, Cell Metabolism, Cancer

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xxi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hücre Döngüsü (Hücre Siklusu)	2
2.2. Hücre Döngüsü Kontrolünde Görev Alan Bileşenler	4
2.2.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar	4
2.2.2. Retinoblastoma Protein Ailesi	6
2.2.3. E2F Protein Ailesi	7
2.2.3.1.E2F1 Proteinini	9
2.3. pRb/E2F1 yolağının biyolojik ve patolojik fonksiyonları	13
2.3.1. Embriyolojik Gelişim Sürecindeki Etkileri	13
2.3.2. Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkileri	15
2.3.3. Anjiyogenez Sürecindeki Etkileri	16
2.3.4. Kanser ve Metastaz Sürecindeki Etkileri	17
2.4. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Post-Translasyonel Modifikasyonları	20
2.4.1. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Fosforilasyonu	20
2.4.2. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Asetilasyonu ve Metilasyonu	22
2.4.3. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün NEDDilasyonu	24
2.4.4. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Poli(ADP-Ribozil)asyonu	24
2.4.5. E2F1'in Post-translasyonel Modifikasyonlarının Etkileşimleri	25
2.4.6. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Ubikuitinasyonu	25
2.5. cAMP Aracılı Sinyal İletimi	26
2.5.1. Protein Kinaz A	26

2.5.1.1. Protein Kinaz A'nın Hücre Siklusundaki Etkileri	27
2.6. Hipotez	28
MATERYAL VE YÖNTEMLER	29
3.1. Hücre Kültürü	29
3.2. Hücrelerden TRİZOL ile RNA İzolasyonu	29
3.3. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	30
3.4. İzole Edilen RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi Reaksiyonu	30
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi	30
3.5.1. PZR Reaksiyonu, İçeriği ve Koşulları	30
3.5.2. İnsan E2F1 cDNA'sının Amplifiye Edilmesi İçin Kullanılan Klonlama Primerleri	31
3.6. Amplifiye Edilen İnsan E2F1 cDNA'sının pcDNA 3.1 (B) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	31
3.6.1. İnsan E2F1 cDNA'sının ve pcDNA3.1 (B) Vektörünün BamHI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	31
3.6.2. Agaroz Jel Elektforezi ve Görüntüleme Sistemi	31
3.6.2.1 Yüzde 1,5 Agaroz Jelin Hazırlanması	31
3.6.3. pcDNA3.1(B) Vektörünün ve E2F1 cDNA'sının Fenolle Çöktürme Yöntemiyle Temizlenmesi	32
3.6.4. pcDNA3.1(B) Vektörünün Dana İntestin Alkalen Fosfataz (CIAP) ile Muamelesi	33
3.6.5. İnsan E2F1 cDNA'sının pcDNA3.1(B) Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzim Reaksiyonuyla Klonlanması	33
3.6.6. İnframe Klonlama İşleminin Oryantasyon Yönünün Belirlenmesi için XhoI Enzim Kesiminin Gerçekleştirilmesi	33
3.7. Doğru Oryantasyon Klonlama Yönüne Sahip pcDNA3.1(B) Vektörün Çoğaltılması Amacıyla E.Coli DH5α Suşuna Transformasyonu	33
3.7.1. CaCl ₂ Yöntemiyle Kompetan DH5α Hazırlanması	34
3.7.2. Agar Hazırlanması	34
3.7.3. E. Coli DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu	35
3.8. Bakteriden Plazmid İzolasyonu:	35

3.9.	Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu	37
3.10.	Transfekte Olan HEK Hücrelerinin Seçilmesi ve Tek Koloni Seçimi	38
3.10.1.	Transfekte Olan HEK Hücrelerinin Seçilmesi	38
3.10.2.	Tek koloni Seçimi	38
3.10.3.	Seçilen Kolonilerdeki E2F1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	38
3.11.	Hücelere Forskolin, Laktasistein ve Kaspaz-3 İnhibitörü Muamelesi	38
3.12.	Hücre Lizatı Hazırlanması	39
3.13.	Protein Miktar Tayini	39
3.14.	İmmünopresipitasyon Yöntemi	40
3.15.	Western Blot Yöntemi	41
3.15.1	Western Blot Yönteminde Kullanılan Jelin Hazırlanması	42
3.15.2	Örneklerin Jelde Yürütülmesi	42
3.15.3	Jelde Yürümüş olan Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	42
3.15.4.	PVDF Membranın İşaretlenmesi	43
3.15.5.	Strip-Off İşlemi	43
3.16.	Monoklonal Antikor Yapımı	44
3.16.1.	İmmünizasyon	44
3.16.1.1	İmmünizasyonun Kontrolü	44
3.16.2.	Hücre Kültürü ve Hibridoma Oluşturma	44
3.16.2.1	Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması	45
3.16.2.2	Besleyici Hücrelerin Hazırlanması	45
3.16.2.3.	Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi	45
3.16.2.4.	Hibridoma Oluşturma	45
3.16.3.	Hibridomaların Antikor Üretiminin Kontrolü	46
3.16.3.1	ELISA Yöntemi ile Antikor Üretiminin Kontrolü	46
3.16.3.2	Western Blot Yöntemi ile Antikor Üretiminin Kontrolü	47
3.17.	In Vitro Kinaz Reaksiyonu	47
3.18.	Site-Directed Mutagenesis Yöntemi (Bölge-Spesifik Mutasyon)	48
3.19.	Plazmidlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi	50
3.20.	Dpn-I Kesimi Ürünlerinden Mutant Plazmidlerin Seçimi	50
3.21.	E2F1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgelerine Yönelik PZR Reaksiyonu	50

3.22.	PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	51
3.23.	DNA Dizi Analizi	51
3.23.1.	Dizileme Reaksiyonu	51
3.23.2.	Dizileme PZR Programı	51
3.24.	Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi	52
3.25.	MTT Canlılık/Proliferasyon Testi	53
3.25.1	Hücrelerin Ekimi ve FBS İle Muamelesi	53
3.25.2	Hücrelerin MTT ile Muamelesi, Ölçümü ve İstatistiksel Analizi	53
3.26.	İmmünfloresan Sitokimya Yöntemi	53
3.27.	Gerçek Zamanlı PZR Hazırlığı ve PZR Yöntemi	55
3.27.1.	Total RNA İzolasyonu	55
3.27.2.	cDNA Kütüphanesi Oluşturulması	56
3.27.3.	Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi	56
3.28.	Sisplatin Sitotoksikite Testi	58
3.28.1.	Ters Transfeksiyon Yöntemi	58
3.28.2.	Hücrelere Sisplatin Muamelesi	59
3.28.3.	Canlılık Testi	59
3.29.	Glukoz Alınım Testi	59
3.30.	Kaspaz 3 Aracılı Apoptoz İndüksiyonunun Analizi	60
3.31.	Grafikler ve İstatistiksel Analizler	60
BULGULAR		61
4.1.	Çeşitli İnsan Kanseri Hücre Hatlarında Endojen E2F1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	62
4.2.	İnsan E2F1 Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	62
4.2.1.	MDA-MB 231 Hücrelerinden RNA Eldesi	63
4.2.2.	MDA-MB 231 Hücrelerinden cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	63
4.2.3.	cDNA Kütüphanesi Kullanılarak E2F1 cDNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Amplifiye Edilmesi	64
4.2.4.	PZR ile Amplifiye Edilen E2F1 Geninin DNA Dizi Analizi İle Doğrulanması	65
4.2.5.	pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörü ve Çoklu Klonlama Bölgesi	67
4.2.5.1.	Stok pcDNA3.1(B) plazmidinin kontrol edilmesi	67

4.2.5.2.pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörünün Kesim Bölgesinin Haritası	68
4.2.6. pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörünün Klonlama İşlemi	69
4.2.7. Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektörlerinin Bakteriye Aktarımı ve Çoğaltılması	69
4.2.8. Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektörlerinin Belirlenmesi	70
4.2.9. E2F1 cDNA'sı Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektöründe İnsert Yönünün Belirlenmesi	71
4.3. E2F1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi	72
4.4. İnsan E2F1 Yüksek Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hatlarının Oluşturulması ve Seçilmesi	73
4.5. Yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 (K6) Hücrelerde Forskolin Muamelesi ile Zamana Bağlı E2F1 Protein Düzeyinin Belirlenmesi	74
4.6. PKA İnhibitörü'nün Forskolin Aracılı E2F1 Degredasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	75
4.7. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Yapan HEK293 Hücrelerinde E2F1 ve PKA'nın Birbirine Bağlanması'nın İmmünpresipitasyon ile Gösterilmesi	76
4.8. E2F1'in PKA Tarafından Fosforile Edilmesinin Gösterilmesi	77
4.9. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hattında Laktasistin (Proteozom İnhibitörü) Varlığında Forskolin Muamelesinin E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi	78
4.10. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hattında Laktasistin (Proteazom İnhibitörü) ve Kaspaz-3 İnhibitörü Varlığında Forskolin Muamelesinin E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	79
4.11. Monoklonal E2F1 Primer Antikor Yapılması	80
4.11.1 İmmünizasyon Sonrası Oluşan Anti-E2F1 IgG Yapılarının Belirlenmesi	81
4.11.2 Hibridoma Sonrası Anti-E2F1 IgG Üreten Kolonilerin Belirlenmesi	82
4.11.3 Elde Edilen Anti-E2F1 IgG Yapısının Hücre Lizatlarında Denenmesi	83
4.12. İnsan E2F1 Proteininin Site-Directed Mutagenesis (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Yapılması	84

4.13.	İnsan E2F1 Proteininin Site-Directed Mutagenез (SDM) Yöntemi ile Oluşturulan Mutantların HEK293 Hücrelerinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi	89
4.14.	Yabancı Tip ve Mutant İnsan E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin Proliferasyon Oranlarının Belirlenmesi	92
4.14.1.	Yabancı Tip ve Mutant E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin 24. Saatte Proliferasyon Oranlarının MTT Yöntemiyle Belirlenmesi	92
4.14.2.	Yabancı Tip ve Mutant İnsan E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin 24. Saatte Proliferasyon Oranlarının Ki67 Floresan İmmünohistokimya Yöntemiyle Belirlenmesi	95
4.15.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının E2F1 Hedefi Genlerin Protein Seviyelerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	98
4.16.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının E2F1 Hedef Genlerinin mRNA Ekspresyonuna Olan Etkilerinin Belirlenmesi	102
4.17.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının CREB Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	107
4.18.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Kaspaz 3 Aracılı Apoptosis İndüksiyonuna Olan Etkilerinin Belirlenmesi	112
4.19.	E2F1'in PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Glikoz Metabolizması Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	113
4.19.1.	E2F1'in Farklı Glikoz Konsantrasyonlarında Hücre Proliferasyonu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	114
4.19.2.	Farklı Glikoz Konsantrasyonlarının E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	115
4.19.3.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Fosforilasyon Mutantlarının Glukoz Alınım Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	116
4.20.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Kemoterapi Duyarlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	120
4.20.1.	Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Sisplatin Duyarlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	121

TARTIşMA	128
SONUÇ ve ÖNERİLER	139
KAYNAKLAR	141
ÖZGEÇMİş	159



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hücre Döngüsünde Görev Alan Bileşenler	3
Şekil 2.2.	Rb/E2F yolağı	5
Şekil 2.3.	E2F protein aile üyeleri	8
Şekil 2.4.	Canlılar arasında E2F1 protein dizisinin karşılaştırılması	11
Şekil 2.5.	E2F1 proteininin apoptotik ve proliferatif süreçteki hedef moleküller	13
Şekil 2.6.	E2F1 proteininin enerji metabolizma üzerindeki etkileri.	16
Şekil 2.7.	E2F1 proteininin doku ve kanser türlerindeki ekspresyon oranları.	18
Şekil 2.8.	E2F1 proteininin hücre invazyonu ve metastatik süreç üzerine etkileri	19
Şekil 2.9.	E2F1 proteininin post-translasyonel modifikasyonları.	20
Şekil 4.1.	E2F1 aminoasit dizisinde bulunan PKA fosforilasyon bölgeleri	61
Şekil 4.2.	Western Blot yöntemi ile hücre hatlarında E2F1 ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi.	62
Şekil 4.3.	RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'ların görüntülenmesi	63
Şekil 4.4.	MDA-MB 231 hücrelerinden elde edilen cDNA kütüphanesinin %1 agaroz jelde gösterilmesi	64
Şekil 4.5.	PZR yöntemi ile E2F1 cDNA amplifikasyonunun %1 agaroz jelde gösterilmesi	65
Şekil 4.6.	E2F1 cDNA'sının DNA dizi analizi ile doğrulanması	66
Şekil 4.7.	Mevcut stok pcDNA3.1(B) plazmidlerin %1 agaroz jelde gösterilmesi	67
Şekil 4.8.	Ekspresyon vektörünün ve içerdiği çoklu kesim bölgesinin haritası	68
Şekil 4.9.	E.coli DHα5 suşunda çoğaltılıp izole edilen pcDNA3.1(B) plazmidinin EcoRI ile kesilmiş formunun agaroz jelde gösterilmesi	69
Şekil 4.10.	Ligasyon sonrası E2F1 cDNA insertünü içeren vektörlerin % 1 agaroz jelde görüntülenmesi	70
Şekil 4.11.	Ligasyon sonrası EcoRI enzim kesimi ile kontrolü	71
Şekil 4.12.	pcDNA3.1(B) vektörüne klonlanan insan E2F1 cDNA'sının doğru oryantasyonunun belirlenmesi	72
Şekil 4.13.	HEK293 hücrelerinde insan E2F1 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	73

Şekil 4.14. Tek koloniden oluşan HEK293-E2F1 hücre hatlarındaki E2F1 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	74
Şekil 4.15. HEK293+E2F1 (K6) hücrelerinde zamana bağlı forskolin muamelesinde E2F1 düzeylerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	75
Şekil 4.16. HEK293+E2F1 (K6) hücrelerinde zamana bağlı PKA İnhibitörü varlığındaki forskolin muamelesinin E2F1 düzeyleri üzerine etkisinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	76
Şekil 4.17. E2F1 ve PKA'nın fiziki olarak bağlanmasının immünopresipitasyon ve Western Blot yöntemleri aracılığıyla gösterilmesi	77
Şekil 4.18. E2F1'in PKA tarafından fosforile edilmesinin <i>in vitro</i> kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi	78
Şekil 4.19. Laktasistin ve Forskolin varlığında E2F1 protein seviyesindeki değişimin western blot yöntemiyle gösterilmesi	79
Şekil 4.20. Laktasistin, Forskolin ve Kaspaz 3 İnhibitörü varlığında E2F1 protein seviyesindeki değişimin western blot yöntemiyle gösterilmesi	80
Şekil 4.21. İmmünizasyon işleminin başında, ortasında ve sonunda alınan serum ile western blot yöntemi ile peptidin işaretlenmesi	82
Şekil 4.22. Hibridoma sonrası elde edilen kolonilerin salgıladıkları Anti-E2F1 seviyesinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi.	83
Şekil 4.23. Hibridoma sonrası elde edilen Anti-E2F1 IgG'nin Western Blot yöntemi ile test edilmesi	84
Şekil 4.24. İnsan E2F1 T130. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri	86
Şekil 4.25 İnsan E2F1 S235. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri	87
Şekil 4.26 İnsan E2F1 S364. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri	88
Şekil 4.27. İnsan E2F1 A (Alanin) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin HEK293 hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi	90
Şekil 4.28. İnsan E2F1 E (Glutamik Asit) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi	91

Şekil 4.29. HEK293, yabancı tip E2F1 ve E2F1 A mutantlarını eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması	93
Şekil 4.30. HEK293, yabancı tip E2F1 ve E2F1 E mutantlarını eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması	94
Şekil 4.31. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının Ki67 boyaması ile doğrulanması	96
Şekil 4.32. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 E mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının Ki67 boyaması ile doğrulanması	97
Şekil 4.33. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerde p53 seviyesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	99
Şekil 4.34. Yabancı tip ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerde Pro-kaspaz 3 seviyesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	100
Şekil 4.35. Yabancı tip ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde CREB ve Total CREB seviyelerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	101
Şekil 4.36. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin GAPDH mRNA seviyeleri	103
Şekil 4.37. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyeleri	104
Şekil 4.38. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA oranları.	105
Şekil 4.39. E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin CREB mRNA seviyeleri	106
Şekil 4.40. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK hücrelerinin CREB mRNA oranları	107

Şekil 4.41. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde p-CREB ve Total p-CREB seviyelerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	109
Şekil 4.42. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde p-CREB/CREB seviyelerinin grafiği	111
Şekil 4.43. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinde Kaspaz 3 aracılı apoptoz indüksiyon seviyeleri	113
Şekil 4.44. Yabanıl tip ve yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücrelerinde farklı glikoz konsantrasyonlarındaki hücre proliferasyonlarının karşılaştırılması	114
Şekil 4.45. E2F1 transfekte HEK293 hücrelerinde farklı glikoz konsantrasyonlarındaki E2F1 protein seviyelerinin western blot tekniği ile gösterilmesi	115
Şekil 4.46. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin normal koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi	117
Şekil 4.47. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını eksprese eden LNCaP hücrelerinin normal koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi	118
Şekil 4.48. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını eksprese eden LNCaP hücrelerinin normal koşullarda insülin muamelesinde glukoz alım miktarlarının belirlenmesi	119
Şekil 4.49. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını eksprese eden LNCaP hücrelerinin insülin aracılı glukoz alımının değerlendirilmesi	120
Şekil 4.50. E2F1 mutantlarının PC3 hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi	122
Şekil 4.51. E2F1 mutantlarının LNCaP hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi	124

Şekil 4.52. E2F1 mutantlarının H1299 hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi

125

Şekil 4.53. E2F1 mutantlarının 293T hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi

127



SİMGELER ve KISALTMALAR

AIF	: Apoptosis Inducing Factor
AKAP	: PKA Anchoring Proteins
APS	: Ammonium Persulfate
ARF	: ADP-ribosylation Factor
ASC-2	: Protein-Activating Signal Cointegrator 2
ASPP1&2	: Apoptosis Stimulating Protein of p53-1&2
ATM	: Ataxia Telangiectaisa Mutated
bp	: Baz çifti
BSA	: Bovine Serum Albumin
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
CDK	: Cyclin-dependent Kinase 2
CHK2	: Checkpoint Kinase 2
CIAP	: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
DHFR	: Dihydrofolate Reductase
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DP	: Dimerization Partner
DTT	: Ditriyotretiol
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
EDTA	: 2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diildinitril) tetraacetic acid
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPAC	: Exchange Protein Directly Activated by cAMP
ERCC1	: Enzyme Excision Repair Cross-Complementing Group 1
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor
GPCR	:G-protein coupled receptors
GSK3β	: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
HAT	: Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine

HRP	: Horseradish Peroxidase
IP	: Immünoprecipitation
LB	: Luria-Bertani broth
LSD1	: Lysine-Specific Histone Demethylase 1
MA	: Moleküler Ağırlık
MDM-2	: Mouse Double Minute 2 Homolog
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMP	: Matrix MetalloProteinase
MT1G	: Metallothionein -1G
NEDD	: Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated
NF-kB	: Nuclear Factor kB
ng	: Nanogram
NLS	: Nuclear Localization Sequence
P/CAF	: p300/CBP-associated Factor
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGFR	: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDK-4	: Pyruvate Dehydrogenase Lipoamide Kinase Isoyme 4
PEG	: Polyethylene Glycol
PKA	: Protein Kinaz A
PRMT5	: Protein Arginine Methyltransferase 5
PSA	: Penisilin Streptomisin Amfoterisin
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
RNA	: Ribonucleic Acid
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDM	: Side Directed Mutagenesis
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SENp8	: Sentrin-Cysteine Protease 8
SIRT1	: NAD- dependent Deacetylase Sirtuin-1

sn	: Saniye
SREBP	: Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TBE	: Tris/Borat/EDTA
TE	: Tris EDTA
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletilendiamin
TFIIH	: Transcription Factor II H
TS	: Thymidylate Synthase
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre



GİRİŞ VE AMAÇ

XX. Yüzyılın sonlarında adenoviral E2 geninin tanımlanması ile E2F ailesini tanımlama çalışmaları başlamıştır. E2F transkripsiyon faktör ailesi hücre döngüsü ve apoptozda görev alan bir protein ailesidir. Çalışmalarda klonlanan ilk E2F aile üyesi E2F1 adını almıştır. Ardından, bu gruba yedi üye daha eklenmiş olup; 10 adet isoform saptanmıştır. Üzerinde en çok çalışma yapılan E2F1 proteininin retinoblastoma tümörlerinde pRB (Retinoblastoma proteini) adı verilen bir proteine bağlandığı gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, sadece kanser hücrelerinde değil her hücre de E2F1'in pRB ile bağlandığı gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan E2F1, pRB ile heterodimer oluşturduğunda, DNA'daki hedef bölgesine bağlanamaz ve hedef genlerin transkripsiyonu indüklenemez. Hücre döngüsünün başlangıcında pRB'nın fosforile edilmesiyle serbest kalan ve DP (Dimerizasyon Partneri) ailesi proteinlerle heterodimer oluşturan E2F1, hücrenin döngüye girmesini sağlayacak hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu indükler. Hücre döngüsünde DNA Polimeraz I gibi önemli görevleri olan birçok proteinin transkripsiyonunu indükleyen E2F1, hücre fizyolojisinde meydana gelen patolojik durumlarda Apaf1 ve p53 indüksiyonu da yaparak apoptozis sürecinin başlatılmasına da katkı yapar. Bir proteinin hücre yaşamında bu kadar önemli rol alması bu proteinin hücre fizyolojisinde meydana gelecek değişimler durumunda aktivitesinin de düzenlenmesi gereğini düşündürmektedir. Nitekim DNA hasarı gibi patolojik durumlarda E2F1'in ondan fazla modifikasyona uğradığı gösterilmiştir. DNA hasarı gibi patolojik durumlar haricinde E2F1 proteininin post-translasyonel modifikasyona uğradığına dair bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Bu yüzden, insan E2F1 proteininin aminoasit dizisini incelediğimizde besin sensörü olarak görev yapan ve cAMP tarafından aktive edilen Protein Kinaz A'nın (PKA) substratı olabileceğini saptadık. Bu bağlamda, PKA'nın E2F1'i RYET₁₃₀, RLLS₂₃₅ ve RMGS₃₆₄ dizilerinde T130, S235 ve S364 amino asitlerinden fosforile ederek E2F1'in aktivitesini negatif olarak etkilediğini bulduk. Söz konusu bölgelerin fosforilasyonu daha önce gösterilmediğinden çalışmamız ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu nedenle, PKA-aracılı E2F1 fosforilasyonunun E2F1'in hücre proliferasyonu ve apoptozis sürecindeki farklı davranışlarının açıklanmasına katkı yapacağını temenni ediyoruz.

GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Döngüsü (Hücre Siklusu)

Hücre döngüsü, çoğalmak yani prolifer olmak üzere uyarılan bir hücrede gerçekleşen, bir dizi biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bu süreç koordine, ardışık ve senkronize olaylar serisinin tümüdür. Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpatıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar (Shankland ve Wolf 2000).

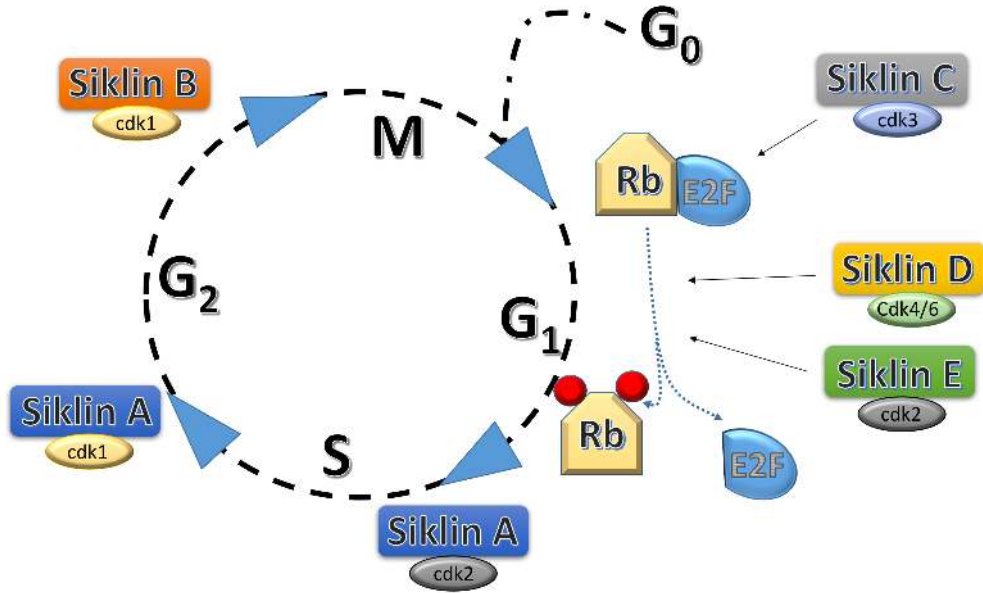
Hücre döngüsü, G_1 -S- G_2 evrelerinden oluşan interfaz yani bölünmeye hazırlık sürecini, çekirdek bölünmesini sağlayan mitoz bölünmeyi ve sitoplazmanın bölünmesi olarak bilinen sitokinezi içerir (Morgan DO. The cell cycle: principles of control. USA , Shankland ve Wolf 2000) (Şekil 2.1). G_0 fazı, dinlenme evresi olarak da bilinen ve G_1 fazına girmeden hemen önce yer alan terminal olarak farklılaşmaya uğramış ve/veya yeniden hücre döngüsüne girme yeteneği ortadan kalkan hücrelerin bulunduğu evredir. Hücreler G_0 fazında günlerce, aylarca hatta yıllarca bölünmeden kalabilirler. Hücre dışından uygun bir sinyal gelmedikçe de bölünme yeteneklerini geri kazanamazlar (Sherr 1996).

G_1 fazında spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve geç G_1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Bu proteinler arasında hücre döngüsünü kontrol eden proteinler ve mitozdan sonra yarıya düşen hücre hacmini normal büyüklüğüne ulaştırmak için gerekli proteinler de vardır. Ayrıca, bu fazda DNA sentezi için gerekli DNA polimeraz gibi birçok enzim de sentezlenir. Yaklaşık olarak 12 saat sürdüğü için siklusun en uzun fazı olarak kabul edilir. G_1 'in sonuna doğru bir kontrol noktası S fazına girişi kontrol eder. Bu kontrol noktasında (G_1 kontrol noktası) S fazında çoğaltılacak olan DNA sarmalında bir hasarın olup olmadığı kontrol edilir. Eğer herhangi bir hasar saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptoza giderek ölürler (Yang ve Kornbluth 1999).

Sentez (S) fazında yaklaşık olarak 7-8 saat süren DNA replikasyonu ile hücre içindeki DNA'nın miktarı iki katına çıkarılır. Böylece mitoz fazına girmeden önce, ikiye bölünecek olan hücrede iki kat DNA miktarı elde edilmiş olur (Yang ve

Kornbluth 1999, Shankland ve Wolf 2000). S fazının bitişiyle DNA sentezi durur ve G_2 evresine geçilir. G_2 faz sürecinde, protein ve RNA sentezi devam eder. Mitotik iğ iplikçiklerinin mikrotübüler öncülleri ve mitoz bölünme sırasında kullanılacak diğer proteinler sentezlenir. Bunlarla birlikte mitoz bölünme için gerekli olan enerji biriktirilir. Bu fazın sonunda yani mitoz fazına girmeden hemen önce hatalı sentezlenmiş DNA sarmallarının düzeltilmesini sağlayan bir kontrol noktası bulunur (G_2 kontrol noktası) (Morgan DO. The cell cycle: principles of control. USA , Yang ve Kornbluth 1999).

Mitoz bölünme yaklaşık 1-2 saat sürmekte olup hücre döngüsünün en kısa fazıdır. Mitoz, S fazında duplike olan kromozomların iki yavru hücreye eşit olarak paylaştırıldığı kompleks bir olaydır. Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofaz evrelerinden oluşmaktadır ve hücre bölünmesi sitokinez ile sonlanmaktadır. Sonrasında döngü, tekrar G_1 fazı ile devam eder (Morgan DO. The cell cycle: principles of control. USA).



Şekil 2.1. Hücre Döngüsünde Görev Alan Bileşenler. Hücre döngüsü kontrolünün sağlanması için kontrol noktalarında görev alan komponentler ve çalışma partnerleri

2.2. Hücre Döngüsü Kontrolünde Görev Alan Bileşenler

2.2.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar

Hücre döngüsünün iki önemli temel taşı siklinler ve siklin bağımlı kinazlardır. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar hücre döngüsü boyunca çeşitli varyasyonlarda kompleks oluştururlar (Şekil 2.1). Siklin/Siklin Bağımlı Kinaz (cdk) kompleksinin çeşitliliği, hücre döngüsündeki önemini gözler önüne sermektedir. Siklin/Siklin Bağımlı Kinaz kompleksleri hücre döngüsünün belirli evrelerinde gerçekleşmektedir ve süreç boyunca Siklin/Siklin Bağımlı Kinaz kompleksleri farklı hedef proteinlerin fosforilasyonundan sorumludur (Giacinti ve Giordano 2006). Günümüze kadar onaltı adet siklin tanımlanmıştır. Buna ek olarak tanımlanamayan ve bağlanma partnerleri tanımlanmamış olan daha fazla siklin olduğu düşünülmektedir (Giacinti ve Giordano 2006).

Siklin/Siklin Bağımlı Kinazlar hücre döngüsünün belli fazlarını yönetmektedir. Memeli hücrelerinde G₁ fazı siklinleri olan Siklin-D ve Siklin-E, G₁/S fazı geçişini kontrol etmektedir. Üç farklı tip Siklin-D bulunmaktadır. Bunlar Siklin-D1, D2 ve D3'dür. Farklı hücrelerde farklı Siklin-D alt tipi ekspresyon gösterir. Çoğu hücrede ekspresyon gösteren alt tip ise Siklin-D3'dür (Giacinti ve Giordano 2006). Siklin-E iki farklı alt tipe sahip olup bunlar Siklin-E1 ve Siklin-E2'dir. Bu iki alt tip insan tümör dokularında ve fare dokularında beraber ekspresyon göstermektedir (Geng *ve ark.* 2001).

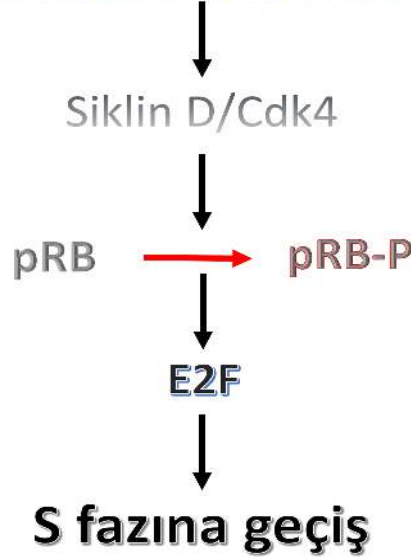
Mitotik siklinler olarak adlandırılan Siklin-A ve Siklin-B, hücre döngüsünde S/G₂/M fazlarının geçişlerinden sorumludur. Siklin A'nın alt tipi olan Siklin A1 mayoz sürecinde ve erken embriyogenez sürecinde eksprese edilirken, diğer bir alt tipi olan Siklin-A2 somatik hücrelerin proliferasyonu esnasında eksprese edilmektedir. Siklin-B2 mitoz bölünme sürecinde Golgi'nin yeniden şekillendirilmesinde görev alırken; Siklin B1 ise hücre döngüsünün G₂/M geçişinde aktif rol almaktadır (Jackman *ve ark.* 1995).

D-tipi siklinler kısa süreli sentezlenen proteinlerdir ve mitojenik sinyalin türüne göre G₁ fazında Cdk4 veya Cdk6 ile kompleks oluştururlar (Hitomi ve Stacey

1999). Siklin D/Cdk aktivitesi mitojenik bölünmede ilk olarak görülmektedir. Siklin E protein seviyesi ise G₁/S fazı geçişinde artış göstermektedir. Bu değişimi S fazında artışı ile Siklin A izlemektedir. Bu fazda Cdk1 sadece Siklin-A ile kompleks oluşturabilirken; Cdk2 hem Siklin-A hem de Siklin-E ile kompleks oluşturabilir (Hochegger ve ark. 2008, Lim ve Kaldis 2013). G₂'den M fazına geçişte ise Siklin-B protein seviyesi de artar ve Cdk1 Siklin-A'dan ayrılıp Siklin-B'ye bağlanır. Siklin proteinlerinin ve siklin bağımlı kinazların seviyelerindeki bu dalgalanma hücre döngüsünün devamlılığını sağlamaktadır.

Erken-orta dönem G₁ fazında oluşan Siklin-D1/cdk4 veya Siklin-D1/cdk6 kompleksinin ve G₁ fazının geç döneminde oluşan Siklin-E/cdk2 kompleksleri tarafından hücre döngüsünün düzenlenmesinin en önemli mekanizmalarından biri Retinoblastoma proteininin fosforilasyonudur (Şekil 2.2).

Büyüme Faktörleri



Şekil 2.2. Rb/E2F yolağı. Hücre döngüsünde görev alan Cdk4-pRb-E2F yolağının şematik gösterilmesi

2.2.2. Retinoblastoma Protein Ailesi

Retinoblastoma Protein (pRb) ailesi Rb/p105, Rb2/p130 ve p107 olmak üzere üç proteinden oluşmaktadır. Rb/p105 insan kromozomunda 13q14 lokalizasyonunda bulunurken, Rb2/p130 alt tipi 16p12.2 ve p107 alt tipi ise 20q11.2 lokalizasyonunda bulunmaktadır (Baldi *ve ark.* 1996). İnsan neoplazmlarında, Rb/p105, Rb2/p130 mutasyonlarına sıklıkla rastlanmakla beraber p107 mutasyonlarına çok nadir olarak rastlanır (Ichimura *ve ark.* 2000). Retinoblastoma aile üyeleri büyük oranda homoloji gösteren bölgelere sahiptir. Rb2/p130 ve p107 alt tipleri %50 benzerlik gösterirken; Rb/p105 ile %30-35 oranında benzerlik gösterirler.

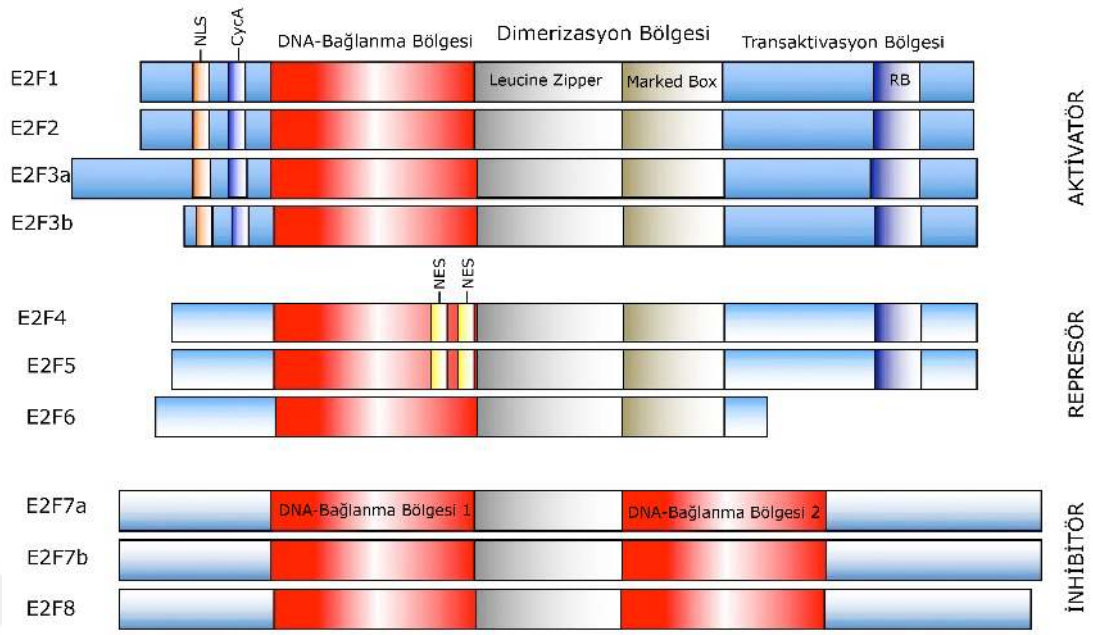
Retinoblastoma aile üyeleri hücre döngüsü boyunca protein-protein etkileşimleri sonucu “pocket domain” isimli bölgesinden spesifik konformasyonel değişimlere uğramaktadır (Paggi *ve ark.* 1996). “Pocket domain” bölgesi yapısal olarak fonksiyonel iki bölgeden ve bu iki bölge arasındaki bir ayırıcı bölgeden oluşmaktadır. Fonksiyonel olan bu iki bölge, “X” herhangi bir aminoasit olmak üzere, yapısında LXCXE aminoasit motifi içeren proteinlere bağlanmaktadır. LXCXE motifi içeren proteinlerin başında D-tipi siklinler, histon deasetilazlar (HDAC) ve bazı DNA tümör virüslerinin sentezlediği onkoproteinler bulunmaktadır (Weinberg 1995, Lee *ve ark.* 1998).

Retinoblastoma aile üyeleri içinde hücre döngüsünün kontrolünde en önemli rolü pRB (p105) oynar. pRB hücre döngüsünün G1 fazından başlayarak kademeli olarak fosforilasyona uğrar ve bu fosforilasyonlar döngü boyunca devam eder. Bu fosforilasyonlar, pRB’nin fonksiyonel olarak inaktivasyonuna neden olur. Hücre döngüsü sırasında gözlenen pRB fosforilasyonlarından primer olarak siklinler tarafından aktive edilen “siklin-bağımlı kinazlar” sorumludur. G₁ fazının erken döneminde D-tipi siklinler, pRB’nin iki aktif bölgesine LXCXE motifleri aracılığı ile bağlanırlar ve bu sayede kendilerine bağlı cdk4 veya cdk6’yı da pRB proteinine taşırlar ve böylece cdk4 ve cdk6 Rb/p105 ve Rb2/p130 fosforilasyonu yapar (Dowdy *ve ark.* 1993). Siklin-D/ckd4/6 kompleksi ile karboksil terminal ucundan fosforilasyona uğrayan pRb, konformasyonel değişime uğramakta ve bunun sonucu olarak da LXCXE motifi ile kendine bağlanan HDAC enzimleri pRB’den

ayrılmaktadır. G₁ fazının orta-geç döneminde ise Siklin-E ve Siklin-A, cdk2 ile kompleks oluştururlar (De Luca ve ark. 1997). HDAC enzimlerinin pRB'den ayrılması pRB'deki fonksiyonel iki bölgesinin Siklin-E/cdk2 veya Siklin-A/cdk2 aracılığıyla fosforilasyonunun önünü açmaktadır. Siklin-E/cdk2 ve Siklin-A/cdk2-aracılı fosforilasyonun ardından E2F üyeleri pRB proteininden ayrılır.

2.2.3. E2F Protein Ailesi

E2F transkripsiyon faktör ailesi hücre döngüsü ve apoptozisde görev alan bir protein ailesidir. 1980'li yılların başında adenoviral E2 geni promotorunun tanımlanması ile E2F ailesi üzerindeki tanımlama çalışmaları başlamıştır (Kovesdi ve ark. 1986). Bu tanımlanan faktör daha sonra klonlanıp E2F1 adını almıştır (Hazar-Rethinam ve ark. 2011). Ardından, E2F grubuna üye olan ve üzerinde en çok çalışılan E2F1'in kanser hücrelerinde pRB ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Bandara ve La Thangue 1991, Kaelin ve ark. 1992). Sonraki yıllarda E2F1'in nükleotit dizisinin prob olarak kullanımı ile bu aileye ait yedi üye daha klonlanmış ve tüm E2F üyelerinden türetilen 10 adet protein isoformu saptanmıştır (Polager ve Ginsberg 2008). Bu aile üyeleri içerdikleri yapısal farklılıklar nedeniyle tipik/atipik olarak ayrılrsa da; E2F aile üyelerinin en mantıklı gruplandırılması transkripsiyon sürecinde gösterdikleri aktiviteye göre yapılmıştır. Buna göre, E2F ailesi üç ana grupta incelenmektedir: Aktivatör E2F aile üyeleri (E2F1, E2F2, E2F3a), Repressör E2F aile üyeleri (E2F3b, E2F4, E2F5) ve İnhibitör E2F aile üyeleri (E2F6, E2F7a, E2F7b, E2F8, (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. E2F protein aile üyeleri. Aile üyeleri transkripsiyonel etkilerine göre gruplandırılmaktadırlar. Aktivatör E2F üyeleri, E2F hedef genlerin aktivasyonunu arttırırken; Represör E2F üyeleri hedef genlerin ekspresyonunu baskılamaktadırlar. İnhibitör özellikteki E2F üyeleri ise aktivatör ve represör E2F üyeleri ile yarışarak DNA bağlanırlar ve diğer üyelerin görev yapmalarını engellemektedirler (Ertosun ve ark. 2016).

E2F aile üyeleri arasında hem yapısal hem de fonksiyonel açıdan farklılıklar vardır. E2F1, E2F2 ve E2F3a transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapıp pRB/p105 tarafından inhibe edilirken, E2F3b, E2F4 ve E2F5 transkripsiyonel repressör görevi görüp Rb2/p130 ve p107 tarafından inhibe edilirler (Gaubatz ve ark. 2000). E2F6, *Polycomb* proteinleri ile etkileşime girip bağlandıkları promotorlarda DNA metilasyonuna sebep olarak transkripsiyonu baskırlar (Morkel ve ark. 1997, Di Stefano ve ark. 2003). E2F7 ve E2F8 ise spesifik olarak bazı promotor bölgelere bağlanarak transkripsiyonu baskılamaktadır (Di Stefano ve ark. 2003).

E2F1, E2F2, E2F3a transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu hücre döngüsünün G₁/S geç fazında maksimum seviyeye ulaşır ve hücrenin süklusa girmesini ve DNA sentezi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücrenin siklusa girmesini sağlar (Cam ve Dynlacht 2003, DeGregori ve Johnson

2006). E2F3b, E2F4 ve E2F5 hücre döngüsünün her evresinde bazal düzeyde sentezlenirler. Bunlar, hücre döngüsünün G₀ ve erken G₁ fazında p107, Rb2/p130 ve HDAC enzimleri ile nukleusta kompleks oluşturup hücre döngüsünün S fazında gerekli olan genlerin transkripsiyonlarını baskırlar. (Takahashi *ve ark.* 2000, Attwooll *ve ark.* 2004, Dimova ve Dyson 2005). E2F6, E2F7a, E2F7b, E2F8 transkripsiyon faktörleri ise rekabetçi bir şekilde diğer E2F üyeleri ile yarışarak onların hedeflerine bağlanmalarını engellerler. Böylece, hem aktivatör hem de represör E2F'lerin işlevlerini durdururlar (Iaquinta ve Lees 2007).

E2F üyeleri transkripsiyonunu indükledikleri hedef genlerin promotoruna bağlanabilmek için Dimerizasyon Partneri (DP) isimli proteinler ile kompleks oluşturmak zorundadır.(Helin *ve ark.* 1993). E2F7 hariç bu aile üyeleri genel olarak DP1 veya DP2 ile dimer oluştururlar. E2F7a ve E2F7b alt tipleri ise DP-bağımsız olarak da hedef DNA'ya bağlanabilmektedir (Ormondroyd *ve ark.* 1995).

2.2.3.1.E2F1 Proteini

E2F1 proteini 437 amino asitten meydana gelir. 20. kromozomun uzun kolunun 11.2 bölgesinde yer alan yedi ekzona sahip E2F1 geni tarafından kodlanan E2F1 proteini omurgalı canlılar arasında ortalama %90 oranında homoloji göstermektedir (Şekil 2.4.). Diğer E2F ailesi üyeleri gibi maksimum protein seviyesine G₁/S geç fazında erişen E2F1, hücrenin DNA sentezleyebilmesi için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır. (Chen *ve ark.* 2009). Bu nedenle hücre döngüsünün sentez fazına girmesindeki en önemli proteinlerden biri olarak kabul edilir.

E2F1'in fonksiyonu Retinoblastoma proteini ile ilişkilidir (Dyson 1998). E2F1, pRB ile heterodimer oluşturduğunda hedef genlerinin promotoruna bağlanamayacağından söz konusu genlerin transkripsiyonunu indükleyemez (Helin *ve ark.* 1993). Hücre döngüsünün G₁ fazında E2F1, Siklin-bağımlı kinazlar tarafından pRB'nin fosforillenmesi sonucu serbest kalır ve ardından DP1/2 ile heterodimer oluşturup hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanıp bu genlerin transkripsiyonunu indükler (La Thangue 1994). E2F1 hedefi olan genlerin

promotorunda bulunan ve E2F1'in bağlandığı konsensus dizi TTTSSCGCS dir. “S” harfi burada sitozin veya guanin nükleotidinden herhangi birisini temsil eder (van der Watt *ve ark.* 2011). E2F1-aracılı transkripsiyonel induksiyona uğrayan genlerin en bilinenleri, hücre döngüsünde görev alan CDC2, CDC25A, Siklin D1 ve Siklin E ile DNA replikasyonu ve/veya DNA tamirinde görevleri olan Dihidrofolat Redüktaz (DHFR), DNA polimeraz alfa, Replikasyon Faktör 3 (RFC3) ve RAD52 dir.(Slansky *ve ark.* 1993, DeGregori *ve ark.* 1995, Ohtani *ve ark.* 1995, Inoshita *ve ark.* 1999, Stanelle *ve ark.* 2002, Bracken *ve ark.* 2004).

H.sapiens	1	--MALAGAPAGGFCAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	48
P.troglodytes	1	--MALAGAPAGGFCAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	48
M.mulatta	1	--MALAGAPAGGFCAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	48
C.lupus	1	--MAVAGAPAGGFCAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	48
B.taurus	1	--MAVAGAPAGGFCAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	48
M.musculus	1	--MAVA--PAGGQHAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	45
R.norvegicus	1	--MAVA--PAGGQHAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIIISAAQDASAPPAP	46
G.gallus	1	--MATAGGAAG-----LAALLGGA-----SPHLLIVSASEE-----P	30
D.erio	1	MSEGFISGQTSDDLADFESLLNNGSIDLSEDHQIVIIIST-----	40
X.tropicalis	1	--MSQEFVSVSYSCSEGFALWEAGTFQVAE--QQIVIIIST-----P	38

H.sapiens	49	TGPAAPAAGF--CDPDLLLFATPQAPRPT----PSAPRPALGRPPVKRRL	92
P.troglodytes	49	TGPAAPAAGF--CDPDLLLFATPQAPRPT----PSAPRPALGRPPVKRRL	92
M.mulatta	49	TGPAAPAAGF--CDPDLLLFATPQAPRPT----PSAPRPALGRPPVKRRL	92
C.lupus	49	AGPAAPAAGF--RDPDLLLFATPQAPRPT----PSAPRPALGRPPVKRRL	92
B.taurus	49	AGPAAPAAGF--RDPDLLLFATPQAPRPT----PSAPRPALGRPPVKRRL	92
M.musculus	46	--PAAPPTGP--RDSVLLFATPQAPRPA----PSAPRPALGRPPVKRRL	87
R.norvegicus	47	TGPAAPAAGF--RDPDLLLFATPQAPRPA----PSAPRPALGRPPVKRRL	90
G.gallus	31	AGGCRP-----DADLLLFATPQAPRPG----PAPRRPALGRPPVKRRL	69
D.erio	41	--PGTATTST--ATGDILLFATPHHTSTGTTSPLDHRPILGRPPVKRRL	86
X.tropicalis	39	DVPAEAAGNPGLSEAEMLFETPQGPSTS----YTAQRPDGRPPVKRRL	84

H.sapiens	93	DLETDHQYLA----ESSGPARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	138
P.troglodytes	93	DLETDHQYLA----ESSGPARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	138
M.mulatta	93	DLETDHQYLA----ESSGPARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	138
C.lupus	93	DLETDHQYLA----ESSGPARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	138
B.taurus	93	NLETDHQYLA----ESSGPARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	138
M.musculus	88	DLETDHQYLA----GSSGPFARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	133
R.norvegicus	91	DLETDHQYLA----GSSGPFARGRGRHPGKGVKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	136
G.gallus	70	NLETDHQYLA----ESLPAAARGRARI PGRGAKSPGEKSRYSYETSLNLTTR	115
D.erio	87	DLDSHQYICTSRTASNGPTPPATPAPPRVPKLAVEKSRYSYETSLNLTTR	136
X.tropicalis	85	DLETVSRYNQ----EALQTPRGKGRPLKAVKSPGERSRYDTSLSHLTTR	130

H.sapiens	139	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	188
P.troglodytes	139	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	188
M.mulatta	139	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	188
C.lupus	139	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	188
B.taurus	139	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	188
M.musculus	134	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	183
R.norvegicus	137	FLELLSHSADGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHI	186
G.gallus	116	FLELLSQSPDGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLITKKSNNI	165
D.erio	137	FLELLSQSPDGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLITKKSNNI	186
X.tropicalis	131	FLELLSQSSDGVVDLNWAAEVLKVQKRIYDITNVLEGIQLITKKSNNI	180

H.sapiens	189	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	238
P.troglodytes	189	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	238
M.mulatta	189	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	238
C.lupus	189	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	238
B.taurus	189	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	238
M.musculus	184	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	233
R.norvegicus	187	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	236
G.gallus	166	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	215
D.erio	187	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	236
X.tropicalis	181	QWLGSHTTVGVGRLEGLTQDLRLQLESEQQLDHLNMNICTTQLRLLS EDT	229

H.sapiens	239	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	288
P.troglodytes	239	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	288
M.mulatta	239	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	288
C.lupus	239	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	288
B.taurus	239	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	288
M.musculus	234	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	283
R.norvegicus	237	DSQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	286
G.gallus	216	SNQHAAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	265
D.erio	237	SNQHAAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	286
X.tropicalis	230	SNQHAAYVTCQDLRSIADPAEQMVMVIKAPPETQLQAVDSSENFQISLKS	279

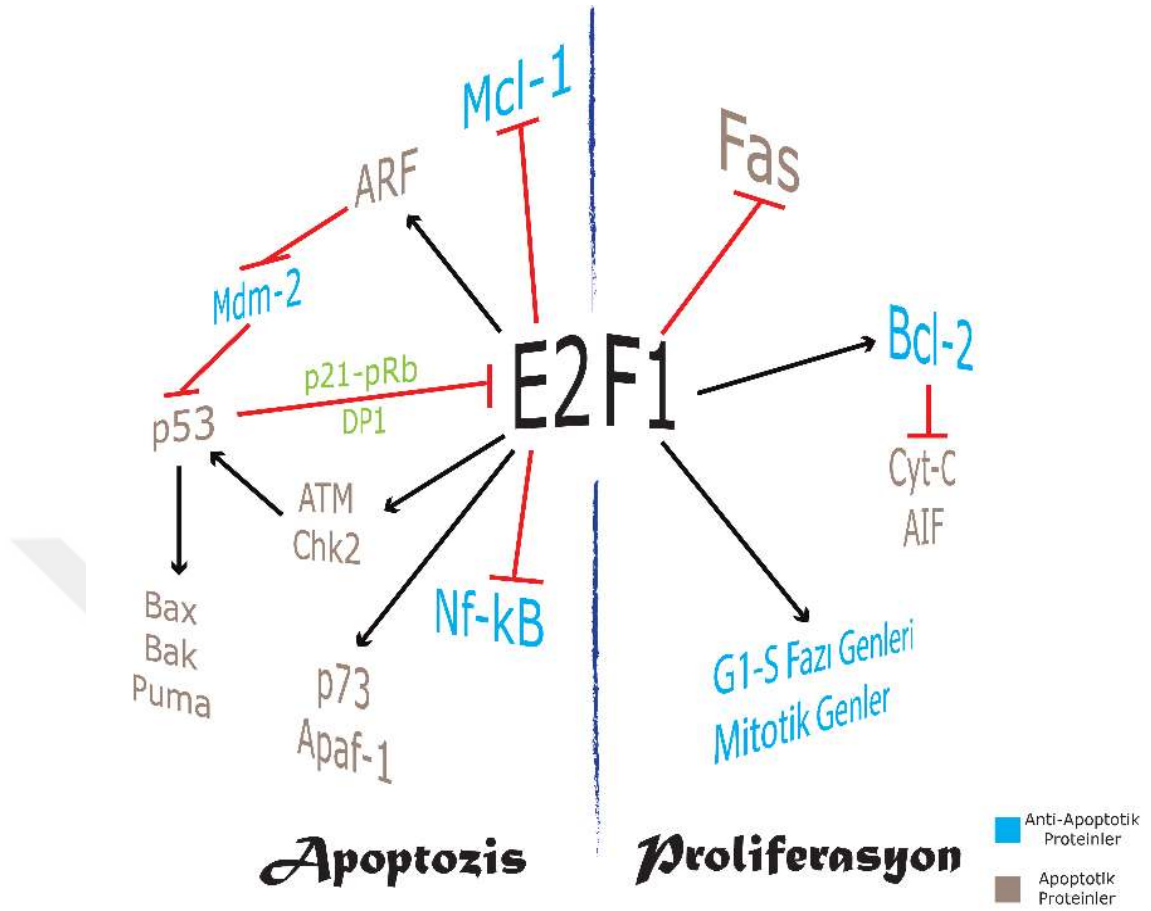
H.sapiens	289	KQGPIDVFLCPEETVGGISPGKTPSQEVTSEEN-RATDSATIVSPPSS	337
P.troglodytes	289	KQGPIDVFLCPEETVGGISPGKTPSQEATSEEN-RATDSATIVSPPSS	337
M.mulatta	289	KQGPIDVFLCPEETVGGISPGKTPSQEATSEEN-RATDSATIVSPPSS	337
C.lupus	289	KQGPIDVFLCPEESAGGISPGKTPSQGTASGEED-RPVDPAITV-PPSS	336
B.taurus	289	KQGPIDVFLCPEESVGGTSPGKTPSQGAASGEED-RTADLATAVPPSS	337
M.musculus	284	KQGPIDVFLCPEESADGISPGKTPSQETSSG-ED-RTADSGPAG-PPSP	330
R.norvegicus	287	KQGPIDVFLCPEESAEGISPGRTSYQET-SG-ED-RNADSGTAG-PPSP	332
G.gallus	266	TQGPIDVFLCPEDSSGVCSFVKSPFKAPAE-----LSPGSSQ	303
D.rerio	287	SKGPIDVFLCPEDSSGVCSFVTDSPAKSSNQSP-AKSD-----PASQE	329
X.tropicalis	280	TQAPIDVFLCPDDSSGVCSFVTSPTKTSQAEPSSINQAEPSPVQPKES	329
H.sapiens	338	PPSSLTTDPSQSLLSL--EQEPLLSRMG-SLRAPVDE-DRLSPLVAADSL	383
P.troglodytes	338	LPSSLTTDPSQSLLSL--EQEPLLSRMG-SLRAPVDE-DRLSPLVAADSL	383
M.mulatta	338	PPSSLTTDPSQSLLSL--EQEPLLSRMG-SLRAPVDE-DRLSPLVAADSL	383
C.lupus	337	PPSSPADPSQSLLSL--EQEPLLSRMG-GLRAPVDE-DRLSPLVAADSL	382
B.taurus	338	PRSSPATDPSQSLLSL--EQEPLLSRMG-GLRAPVDE-DRLSPLVAADSL	383
M.musculus	331	PSTSPALDPSQSLLGL--EQEAVLPRMG-HLRVPMEE-DQLSPLVAADSL	376
R.norvegicus	333	PSTSPALDPSQSLLGL--EQEAVLPRIG-NLRAPMEE-DRLSPLVAADSL	378
G.gallus	304	QRASPLLHSAQDVNML--LPEALLPGTALPTKCPTED-VSLSPASMDTL	350
D.rerio	330	VTSTPTTLPPSSPLPLHTDSEFLSDPFSGICAMPD-FDLSPL-DSDFL	377
X.tropicalis	330	PASIPMLDIGLLSD--MQEPFLPFEN---EIPLDSTLNCLPLSPSNLL	374
H.sapiens	384	LEH-VREDFSGLLPEEFISLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	430
P.troglodytes	384	LEH-VREDFSGLLPEEFISLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	430
M.mulatta	384	LEH-VREDFSGLLPEEFISLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	430
C.lupus	383	LEH-AREDFSGLLPEEFISLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	429
B.taurus	384	LEH-VKEDFSGLLPPEEFITLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	430
M.musculus	377	LEH-VKEDFSGLLPGEFISLSPHEALDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	423
R.norvegicus	379	LEH-VKEDFSGLLPGEFISLSPHEAVDYHFGLEEGEGIRDL--FDCDFG	425
G.gallus	351	LEH-GKDDFPGLADEFIALSP-QPDYHFGLEEGEGISEL--FDCDFG	396
D.rerio	378	LERSGAADGLGLPLDSFICLSPH-SQDYHFGLEDHEGVSEL--FDCDFS	424
X.tropicalis	375	LDY--RDAMPDFLPNDFISLSPAS-SQEYSFGLQTCEGAELFNDFDFS	421
H.sapiens	431	DLTPLDF	437
P.troglodytes	431	DLTPLDF	437
M.mulatta	431	DLTPLDF	437
C.lupus	430	DLTPLDF	436
B.taurus	431	DLTPLDF	437
M.musculus	424	DLTPLDF	430
R.norvegicus	426	DLTPLDF	432
G.gallus	397	DFTHLDF	403
D.rerio	425	DLVPLEF	431
X.tropicalis	422	GLTALDL	428

Şekil 2.4. Canlılar arasında E2F1 protein dizisinin karşılaştırılması

Hücre döngüsünde G₁/S fazında görevli olduğu gibi E2F1, hücre döngüsünün duraksamasında da önemli bir role sahiptir. Büyüme faktörlerinin olmadığı ve E2F1 ekspresyonunun yüksek olduğu durumlarda E2F1, döngünün durmasına sebep olabilmektedir (Qin ve ark. 1994, Shan ve Lee 1994). Buna ek olarak, büyüme faktörlerinin ortamdaki uzaklaşması durumunda Ras yolağı da aktive olabilmekte ve aktifleşen Ras da bilinmeyen bir mekanizma ile E2F1 aktivasyonu yaparak hücre döngüsü duraksamasına yol açmaktadır (Muller ve ark. 2001). Bunun yanı sıra E2F1 apoptozis sürecinde de önemli görevler üstlenir (Şekil 2.5). E2F1-aracılı apoptozis

indüksiyonu E2F1'in p53 miktarını arttırması ile açıklanmıştır (Wu ve Levine 1994). Bunun en büyük ispatı ise p53 yokluğunda veya hücreye mutant p53 verildiğinde E2F1- aracılı gelişen apoptozisin kısıtlanmış olmasıdır (Qin *ve ark.* 1994, Shan ve Lee 1994). Bugün kabul gören teoriye göre E2F1, ARF proteininin ekspresyonunu indükleyerek MDM-2 baskılanmasına neden olur (Sherr 1998). ARF ile bağlanan MDM-2, p53 ile bağlanamadığından p53'ün übikütinasyon sonucu parçalanması engellenir. E2F1, ARF'in olmadığı durumlarda başka bir yol üzerinden de p53 aktivasyonuna neden olmaktadır (Lindstrom ve Wiman 2003). ARF-bağımlı veya bağımsız aktive olan p53, pro-apoptotik proteinler olan Bax, Puma ve Noxa indüksiyonu yaparak apoptozisin gerçekleşmesine neden olur (Schuler ve Green 2001). Buna ek olarak E2F1, p53'ün fosforilasyonunu gerçekleştirip aktive olmasını sağlayan ATM (ataxia telangiectaisa mutated) ve Chk2 (checkpoint kinase 2) genlerinin ekspresyonunu da indükler (Berkovich ve Ginsberg 2003, Rogoff *ve ark.* 2004) E2F1, p53 stabilizasyonuna ek olarak p53'ün pro-apoptotik kofaktörleri olan ASPP1/2 (Apoptosis Stimulating Protein of p53) genlerinin de ekspresyonunu indükleyerek p53-bağımlı apoptozis'e sebep olabilmektedir (Chen *ve ark.* 2005, Fogal *ve ark.* 2005).

E2F1'in p53 üzerine olan etkisinin yanında p53 de E2F1'in fonksiyonunu kontrol eder. Bu kontrol; p21-Cdk4-Rb yolağı üzerinden E2F1 proteininin DP-1 proteiniyle oluşturduğu heterodimer yapılarının engellenmesi sonucu gerçekleşmektedir. Bu geri besleme, p53 seviyesinin kontrolü için kullanılan yollardan biridir (Wikonkal *ve ark.* 2003). E2F1, p53'den bağımsız olarak da apoptozise neden olabilmektedir. Bu yollardan biri E2F1-aracılı gerçekleşen pro-apoptotik p73 ve Apaf-1 genlerinin ekspresyonunun indüklenmesidir (Irwin *ve ark.* 2000, Moroni *ve ark.* 2001). Ayrıca, E2F1, anti-apoptotik Mcl-1'in transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin ekspresyonunu baskılayarak apoptozis indüksiyonuna katkı yapmaktadır (Ma *ve ark.* 2002, Stanelle ve Putzer 2006). Tüm bunların yanında E2F1 pro-apoptotik Sitokrom-c ve Apoptosis-Inducing Factor (AIF) ekspresyonunu baskılayıp Bcl-2 ekspresyonunu indükleyerek hücrede apoptosin inhibe edilmesine de sebep olabilmektedir. (Susin *ve ark.* 1999, Ma *ve ark.* 2002, Carthy *ve ark.* 2003).



Şekil 2.5. E2F1 proteininin apoptotik ve proliferatif süreçteki hedef moleküller. E2F1 transkripsiyon faktörünün hücre döngüsündeki, proliferasyondaki ve apoptotik süreçteki hedef proteinlerin şematik gösterimi (Ertosun ve ark. 2016).

2.3. pRb/E2F1 yolağının biyolojik ve patolojik fonksiyonları

2.3.1. Embriyolojik Gelişim Sürecindeki Etkileri

Çok hücreli bir organizmanın embriyo döneminden yetişkin döneme kadar başarılı bir şekilde gelişimi için hücre proliferasyonunun, dönüşümünün ve apoptozisin belirli bir düzende ilerlemesi gerekmektedir. E2F1, hem hücre döngüsünün başlamasında hem de gerektiğinde apoptozisin indüklenmesinde görev yaptığı için embriyonik gelişim sürecinde de gözlenen bu iki farklı sürecin kontrol edilmesinde önemli rol oynar (Tsai ve ark. 2008). E2F1, embriyonik gelişim sürecinde de döngünün S fazının gerçekleşmesi için şart olduğundan E2F1 geninde meydana gelen ve E2F1'in fonksiyonunu engelleyen mutasyonlar embriyonun

midblastula evresine geçişinde duraksamaya neden olmakta ve embriyonik gelişim bozuklukları meydana gelmektedir (Duronio *ve ark.* 1995, Tsai *ve ark.* 1998). (Tanaka *ve ark.* 2003, Sun *ve ark.* 2006). Daha da önemlisi, E2F1 fonksiyonunun bozulması embriyo asimetrisine de neden olmaktadır (Page *ve ark.* 2001). Yani, E2F1 erken embriyonik süreçte ventral ve posterior hücrelerin kaderini belirleyerek embriyonik sürecin simetrik ilerlemesi konusunda da etki yapmaktadır (Suzuki ve Hemmati-Brivanlou 2000).

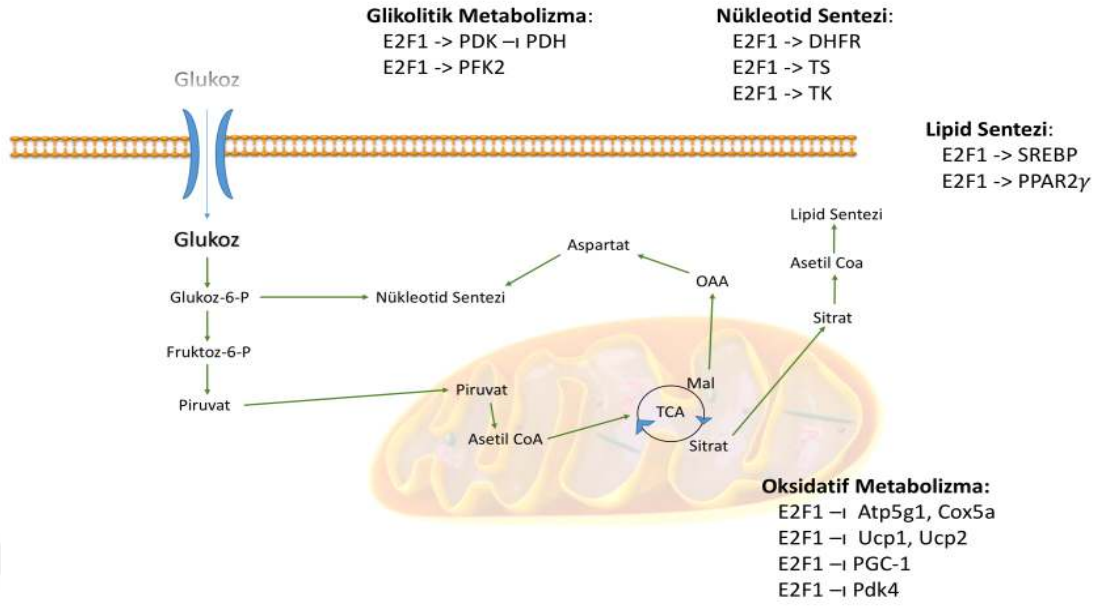
E2F1 proteini, embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde etkin olduğu gibi organogenez sürecinde özellikle nöral öncül hücrelerin proliferasyonunda, bunların olgun nöron hücrelerine farklılaşmasında (Campbell *ve ark.* 2011, Mohan *ve ark.* 2012, Rovani *ve ark.* 2012, Kusek *ve ark.* 2001), nöron hücrelerinin migrasyonunda ve neokorteks'in gelişiminde de önemli rol oynar (Li ve DiCicco-Bloom 2004, Verheyde *ve ark.* 2006, Andrusiak *ve ark.* 2011, Minamide *ve ark.* 2014). Sinir hücrelerinin gelişimi ve migrasyonunun yanı sıra E2F1 sinir sistemi ile doğrudan ilişkisi bulunan duyu sistemlerinin gelişiminde de önemli görevler üstlenmektedir; çünkü, E2F1 fonksiyonundaki bozukluk gözün retina bölgesinde patolojilere neden olmaktadır (Mongan *ve ark.* 2011). Buna ek olarak, E2F1 sinir uçları içeren kulağın iç kısmındaki siliyer (tüysü) yapıların gelişiminde, (Rocha-Sanchez *ve Beisel* 2007), dermiste epidermal yapıların formasyonu ve tabakalaşmasında (Chang *ve ark.* 2004, Ivanova *ve ark.* 2005), damağın simetrik gelişiminde (Amasaki *ve ark.* 2003), diş ve diş epitelinin farklılaşmasında önemli görevler üstlenerek duyu ve sindirim sistemi organogenezinde görev almaktadır (Andreeva *ve ark.* 2012, Zhang *ve ark.* 2012). E2F1, diğer sistemlerde olduğu gibi gerek intra-uterin dönemde gerekse ondan sonraki süreçte organizma bütünlüğünü oluşturarak koruyan kas ve iskelet sisteminin embriyolojik gelişiminde de önemli görevlere sahiptir. FGF mutasyonları sonucu E2F1 ekspresyonunun değişmesi ile kıkırdak ve kemik yapısında patolojik değişimler meydana gelmektedir (Dailey *ve ark.* 2003). E2F1, aynı zamanda kemik ve kıkırdak yapılarının bütünlüğünü sağlayan kas dokusunun myogenez sürecinde pRB ve p21 ile birlikte etkilidir (Jiang *ve ark.* 2000).

2.3.2. Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkileri

Embriyonik süreçten itibaren hücreler için gerekli olan enerjinin sağlanması amacıyla devamlılık gösteren hücre içi enerji metabolizmasında pRb/E2F1 yolağı aktif rol oynamaktadır. Hücre içi enerji kaynağı olarak kullanılan lipidlerin metabolizmasında E2F1 düzenleyici bir rol üstlenmektedir (Fajas *ve ark.* 2002, Dali-Youcef *ve ark.* 2007). E2F1, kendisi de bir transkripsiyon faktörü olan PPAR γ aracılığıyla adipogenezi düzenlemektedir (Şekil 2.6). E2F1-aracılı PPAR γ indüksiyonu, klonal adiposit oluşum süresi boyunca gerçekleşmektedir (Fajas *ve ark.* 2002). Diğer yandan, E2F1 yağ dokusunda bulunan mitokondriyel aktiviteyi, dolayısıyla enerji üretimini de artırmaktadır (Dali-Youcef *ve ark.* 2007). Bunlara ek olarak E2F1, lipid metabolizmasının baş aktörü olan SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) geninin indüksiyonunu da sağlamaktadır (Takahashi *ve ark.* 2012).

E2F1 geninin ekspresyonunun engellenmesiyle, diyet aracılığıyla gelişen obezite önlenmekte; bununla birlikte pankreas β -hücrelerinin fonksiyonunun bozulması sonucu yetersiz insülin salınımı meydana gelmektedir (Fajas *ve ark.* 2004). İnsülin salınımında önemli görevi olan Kir6.2 geninin ekspresyonunun E2F1 bağımlı olması pankreas β -hücrelerinde insülin sentezi ve salınımı sürecinde E2F1'in gerekli olduğunu göstermektedir (Blanchet *ve ark.* 2009). Buna ek olarak E2F1, F-tipi PFK2 indüksiyonunu sağlayarak glikoliz sürecinde de rol almaktadır (Darville *ve ark.* 1995). Glukoz metabolizmasının E2F1 tarafından düzenlenmesinin yollarından biri de, aynı zamanda besin sensörü olarak görevli dehidrojenaz kinaz 4 (PDK4) proteininin aktivasyonu ile glukoz metabolizmasını baskılanmasıdır (Hsieh *ve ark.* 2008).

E2F1 proteini Atp5g1, Cox5a, Nudflc gibi mitokondriyal solunum zincirinde görev alan proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak bazal şartlarda mitokondriyal oksidatif fonksiyonu baskılamaktadır (Blanchet *ve ark.* 2011). Bütün bu bilgiler ışığında E2F1, lipid metabolizmasını, oksidatif fosforilasyonu ve glikolitik yolağı düzenleyerek enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli görevler almaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. E2F1 proteininin enerji metabolizması üzerindeki etkileri. Enerji eldesi sürecinde kullanılan yollarda bulunan E2F1 transkripsiyon faktörünün hedef molekülleri. (PDK: Piruvat Dehidrogenaz Kinaz; PFK2: Fosfofruktokinaz 2; DHFR: Dihidrofolat Redüktaz; TS: Timidilat Sentetaz; TK: Timidilat Kinaz; SREBP: Sterol Regülatuar Element-Bağlayıcı Protein; PPAR: Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör; Cox5a: Sitokrom C Oksidaz 5a Altünitesi; Ucp: Mitokondriyal Uncoupling Protein; PGC-1: Peroksizom Gamma Ko-aktivör; Pdk4: Piruvat Dehidrogenaz Kinaz İzom 4)

2.3.3. Anjiogenez Sürecindeki Etkileri

Anjiogenez, yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelir. Embriyonik süreçte fizyolojik olarak görülen anjiogenez, kanser ve kanser metastazı gibi patolojik durumlarda da karşımıza çıkmaktadır.

E2F1, anjiogenez sürecinde oldukça önemli görevlere sahiptir. E2F1 aktivitesinin baskılandığı durumlarda endotel hücre proliferasyonu dolayısıyla anjiogenez artmaktadır (Qin ve ark. 2006). E2F1, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) salınımını hipoksik şartlarda baskılar ve bunu p53 aracılığıyla yapar. E2F1/p53 ortaklığı VEGF protein seviyesinde azalmaya neden olsa da diğer anjiogenik faktörlerin baskılanmasına ve de protein seviyelerinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır (Teodoro ve ark. 2007, Berger ve ark. 2010). Bunun yanı sıra E2F1, p53'den bağımsız olarak da VEGF sentezini baskılayabilmektedir. Bunu yaparken, E2F1 bir splicing proteini (Serin/Arjinin-zengin splicing proteini-SR protein) kodlayan SC35 transkripsiyonunu indüklemektedir. SC35, pro-VEGF

proteininden anti-anjiogenik özellik gösteren VEGF165b formunun oluşumunu arttırken anjiogenik VEGF165a formunun miktarını azaltmaktadır (Merdzhanova ve ark. 2010). VEGF'in yanı sıra, VEGF reseptörleri olan FLT1 (VEGFR1) ve KDR (VEGFR2) da E2F1 hedefi genlerdir ve E2F1 her iki genin de transkripsiyonunu indükler (Pillai ve ark. 2010). Sonuç olarak E2F1, anjiogenik VEGF165a oluşumunu baskılarken bu liganın reseptörlerinin ekspresyonunu indükleyerek anjiogenez sürecini doğrudan etkilemektedir.

2.3.4. Kanser ve Metastaz Sürecindeki Etkileri

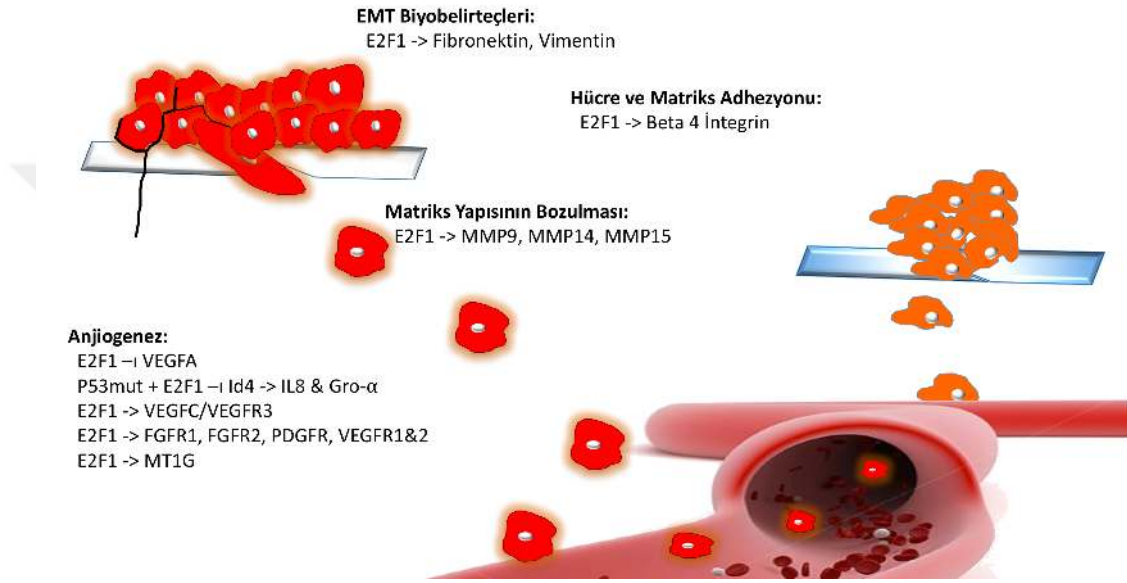
Kanser ve kanser sürecinde karşılaştığımız metastazlar insanlığın son yıllarda başa çıkmaya çalıştığı en önemli sağlık sorunlarından biridir. Bu nedenle, kanserleşme sürecinde rol alan hedef genlerin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, E2F1'in kanser gelişiminde rol oynadığına yönelik bir izlenim oluşmuştur (Şekil 2.7). Örneğin kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserinde E2F1 transkripsiyon faktörünün ekspresyon artışı meydana gelmektedir ve bu artış meme kanserinin metastaz sürecinde de rol oynamaktadır (Thomassen ve ark. 2008). Meme kanserinin yanı sıra, kolorektal kanserler ve melanoma metastazlarında da, E2F1 genini de barındıran 20q11 bölgesinin amplifikasyonu gözlenmektedir (Iwamoto ve ark. 2004, Nelson ve ark. 2006).

Doku	Kanserli Dokuda Boyanma Paterni	Normal Dokudaki Protein Ekspresyonu	Doku	Kanserli Dokuda Boyanma Paterni	Normal Dokudaki Protein Ekspresyonu
Meme Kanseri			Melanoma		
Karsinoid			Over Kanseri		
Servikal Kanseri			Pankreas Kanseri		
Kolorektal Kanseri			Prostat Kanseri		
Endometriyal Kanseri			Böbrek Kanseri		
Glioma			Deri Kanseri		
Baş, Boyun Kanseri			Mide Kanseri		
Karaciğer Kanseri			Testis Kanseri		
Akciğer Kanseri			Tiroid Kanseri		
Lenfoma			Ürotelyal Kanseri		

Şekil 2.7. E2F1 proteininin doku ve kanser türlerindeki ekspresyon oranları. E2F1 transkripsiyon faktörünün değişik dokularda ve bu dokulardan köken alan kanserlerdeki protein ekspresyon düzeyi (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000101412-E2F1/cancer>).

E2F1'in metastaz sürecinde rol oynadığına dair göstergelerden bir diğeri ise, kolorektal kanserlerde metastatik dokuda primer tümör bölgesine oranla daha yüksek E2F1 ekspresyonu olduğunun belirlenmesi olmuştur (Banerjee *ve ark.* 2000, Enders 2004, Blanchet *ve ark.* 2009). Metastatik odaklarda artış gösteren E2F1 ekspresyonu, metastatik bölgede Timidilat Sentaz ekspresyonundaki artışı da beraberinde getirmektedir (Banerjee *ve ark.* 1998, Banerjee *ve ark.* 2000) (Şekil 2.8). Timidilat Sentaz nükleotid sentezinde görev alan enzimdir. Bu enzimin artışı, nükleotid sentezini arttırmak suretiyle hücrenin proliferasyon kapasitesini arttırmaktadır. Proliferasyon kapasitesi artan tümör dokusu, daha agresif bir şekilde büyür. Bu bilgileri doğrular biçimde; metastazın oluşumuna neden olduğu bilinen E2F1 ve hedef geni olan Skp2, karsinomalarda ve gastrik yerleşimli tümörlerde nodül metastazı göstergesi olarak da karşımıza çıkmaktadır ve klinik olarak ileri evre göstergesidir (Yasui *ve ark.* 1999, Salon *ve ark.* 2007).

E2F1, invazyona ve metastatik kapasite artışına olan katkısını transkripsiyonunu kontrol ettiği matriks metalloproteazlar aracılığıyla da sağlamaktadır (Zhang *ve ark.* 2000, Stanelle *ve ark.* 2002). Özellikle MMP9, MMP14 ve MMP15 ekspresyon artışına neden olduğu bilinmekle beraber, ayrıca 23 adet matriks metalloproteazın promoter bölgesinde E2F1 bağlanma bölgesi gösterilmiştir (Johnson *ve ark.* 2012) (Şekil 2.8).



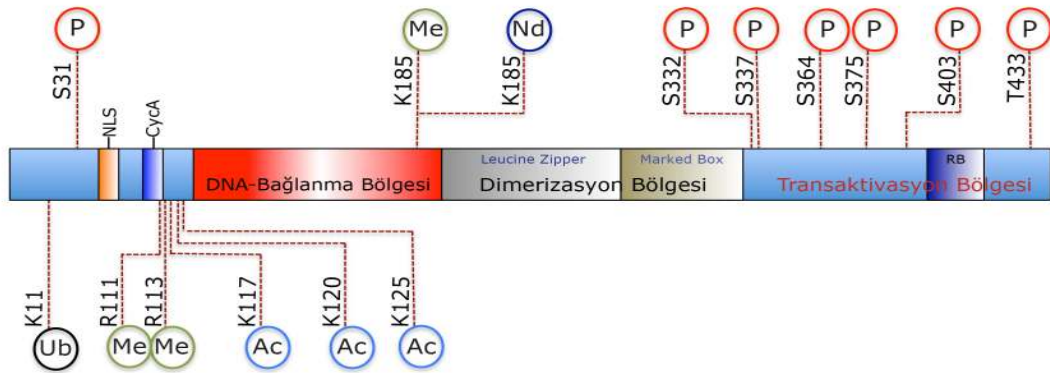
Şekil 2.8. E2F1 proteininin hücre invazyonu ve metastatik süreç üzerine etkileri. E2F1 transkripsiyon faktörünün hücre invazyonu ve kanser metastazı sürecinde etkilediği hedef moleküller. (MMP: Matriks MetalloProteinaz; VEGF: Vasküler Endothelyal Büyüme Faktörü; FGFR: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü; PDGFR: Platelet ilişkili Büyüme Faktör Reseptörü; MT1G: Metallothionein-1G)

Kanserin oluşumu ve metastatik süreçte görev alan E2F1 aynı zamanda kanser tedavisinde kullanılan anti-kanser ilaçların klinik etkisinde de rol oynamaktadır. Cdk2/E2F1 yolağı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda Sisplatin sitotoksitesini etkilemektedir (Yu *ve ark.* 2007). Mide kanserlerinde ve glioma gibi sinir sistemi solid tümörlerinde E2F1 proteininin ekspresyon artışı sisplatin tedavisine direnç oluşturmaktadır (Chen *ve ark.* 2014, Yan *ve ark.* 2014).

Bu bilgiler pRB/E2F1 yolağının kanser oluşumunda ve metastatik süreçte oldukça önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Chen ve ark. 2009).

2.4. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Post-Translasyonel Modifikasyonları

E2F1 proteininin post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabileceği, 1989 yılında E2F1 fosforilasyonunun gösterilmesi ile fark edilmiştir (Bagchi ve ark. 1989). Bu çalışmada gösterilen fosforilasyon E2F1 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma aktivitesini doğrudan etkilediği için, E2F1'in aktivitesinin kontrolünün sadece Rb sistemi tarafından değil post-translasyonel modifikasyonlarla da kontrol edilebileceğini düşündürmüştür ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. E2F1 post-translasyonel modifikasyonları, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, NEDDilasyon ve Poli(ADP-Ribozil)asyonu olarak gruplandırılabilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. E2F1 proteininin post-translasyonel modifikasyonları. E2F1 transkripsiyon faktörü bulundurduğu motifler aracılığıyla fosforillenebilmekte, asetillenebilmekte ve metilasyona uğrayabilmektedir. (NLS: Nükleer Lokalizasyon Sinyali, CyA: Siklin A Bağlama Bölgesi, Rb: pRb Bağlama Bölgesi) (Ertosun ve ark. 2016)

2.4.1. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Fosforilasyonu

E2F1'in post-translasyonel modifikasyonlarından biri siklin-A/cdk2 kompleksi tarafından fosforile edilmesidir. Bu fosforilasyon, E2F1'in DNA'ya bağlanma kapasitesini azaltmaktadır (Krek ve ark. 1995), zira cdk2 kinazın

yokluğunda veya aktivitesinin engellenmesi durumunda, E2F1 fosforilasyonunun azalmasının sonucu, E2F1'in DNA bağlanma aktivitesinde artış meydana gelmektedir (Li ve ark. 1997). Bu meydana gelen değişiklik nedeniyle hücre döngüsünün normal işleyiş düzeni bozulduğundan hücre döngüsü duraksama aşamasına geçmektedir.

DNA hasarı sırasında aktive edilen ATM ve CHK2, sırası ile, E2F1'i 31. ve 364. pozisyonundaki Serin amino asitlerinden fosforile ederler. Her iki fosforilasyona uğrayan E2F1, 14-3-3 τ ile bağlanarak ubikutinizasyon-bağımlı parçalanmadan kurtulur ve böylece E2F1 proteininin stabilizasyonu sağlanmış olur (Lin ve ark. 2001, Stevens ve ark. 2003, Wang ve ark. 2004). Stabilizasyonu sağlanmış olan E2F1, pro-apoptotik genlerin ekspresyon artışına neden olmak suretiyle hücreyi apoptozise yönlendirir (Stevens ve ark. 2003). Bu bilgilere ek olarak ATM ve Chk2 transkripsiyonel olarak E2F1 tarafından indüklenirler, dolayısıyla sistem pozitif kontrol mekanizması ile kontrol edilmektedir (Berkovich ve Ginsberg 2003, Powers ve ark. 2004).

E2F1'in CHK2 tarafından fosforile edilen Ser364 rezidüsü aynı zamanda MAPKAP-kinase2 (MK2) tarafından da fosforile edilir (de Olano ve ark. 2012). Bu fosforilasyon, epirubicine gibi kemoterapötik ajanların kullanıldığı durumlarda gözlenmektedir. MK2'nin kendisi p38 tarafından fosforile edilerek aktive edildiğinden p38-MK2-E2F1 yolağı bazı kemoterapiklere karşı direnç geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir.

Post-translasyonel modifikasyonlar E2F1'in sadece stabilizasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda diğer proteinlerle olan etkileşimini de kontrol eder. Adenoviral enfeksiyon durumunda aktive olan p34cdc2 enziminin E2F1'i S332 ve S337 pozisyonlarından fosforile ettiği gösterilmiştir. Bu fosforilasyonlar E2F1'in pRB ile bağlanmasını engellerken adenoviral E4 proteini ile bağlanmasını indüklemektedir. E4 ile bağlanan E2F1 de adenovirüs replikasyonu için gerekli olan E2A transkripsiyonunu indüklemektedir (Fagan ve ark. 1994).

E2F1'in bazı bölgeleri spesifik kinazlar tarafından fosforile edilse de, bazı aminoasitler birden fazla kinaz tarafından fosforile edilebilir. Örneğin, HeLa hücrelerinde E2F1'in Ser403 ve Thr433 rezidülerinde *in vitro* ortamda hücre döngüsünün S fazında RNA polimeraz II transkripsiyon faktörü TFIID tarafından fosforile edildiği gösterilmiştir (Vandel ve Kouzarides 1999). Aynı fosforilasyon bölgelerinin HEK293T hücrelerinde *in vitro* ortamda Glikojen Sentaz Kinaz-3β (GSK3β) tarafından da fosforile edildiği gösterilmiştir (Garcia-Alvarez ve ark. 2007). Bahsedilen *in vitro* fosforilasyona neden olan iki kinaza ek olarak, *in vivo* şartlarda da aynı amino asitlerin p38 tarafından da fosforile edildiği gösterilmiştir (Ivanova ve ark. 2009). Bu fosforilasyon, E2F1'in nükleer transportunu ve degradasyonunu etkilemektedir. Buna ek olarak p38-aracılı fosforilasyonun keratinosit dönüşümüne de neden olduğu bilinmektedir. E2F1, p38 gibi, stres şartlarında aktive edilen JNK1 tarafından da fosforile edilebilmektedir (Wang ve ark. 1999). Bu fosforilasyon, E2F1 DNA bağlanma etkinliğini düşürürken, aslında JNK aktivitesinin kontrolünü de sağlar (Bashari ve ark. 2011). Benzer durum Ser375 rezidüsü için de geçerlidir. *In vitro* ortamda E2F1 Siklin-A ile kompleks halindeyken, CDK1 tarafından Ser375 rezidüsünden fosforile edilir (Peeper ve ark. 1995). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda aynı bölgenin başka bir Siklin-bağımlı kinaz olan CDK8 tarafından da fosforile edildiği belirtilmiştir (Zhao ve ark. 2013). CDK8 tarafından gerçekleştirilen bu fosforilasyon E2F1'in transkripsiyonel aktivitesini etkilemektedir.

2.4.2. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Asetilasyonu ve Metilasyonu

E2F1 proteini translasyon sonrası fosforilasyona uğradığı gibi başka modifikasyonlara da uğramaktadır. Bu modifikasyonlardan biri de asetilasyondur. E2F1 proteini Lys117, Lys120 ve Lys125 rezidülerinden asetilasyona uğramaktadır (Marzio ve ark. 2000). Bu asetilasyon p300/CREB-bağlayan Protein (CBP) veya p300/CBP-ilişkili Faktör (P/CAF) tarafından gerçekleştirilmektedir (Martinez-Balbas ve ark. 2000, Marzio ve ark. 2000). P/CAF içeriğinde bulunan Adenozin Deaminaz 2 (ADA2) bağlama domaini aracılığıyla E2F1 proteinine bağlanır (Martinez-Balbas ve ark. 2000). E2F1'in *in vitro* veya *in vivo* asetilasyona uğraması; konsensus E2F DNA bağlama bölgesine olan bağlanma affinitesini artırır (Marzio

ve ark. 2000). Buna ek olarak E2F1'in asetilasyonu, Activating Signal Cointegrator-2 (ASC-2) ile direkt etkileşime girmesini sağlamaktadır. Bir mitojenik transkripsiyon faktör ko-aktivatörü olan ASC-2 ile E2F1'in interaksyonu, hücrenin proliferasyonuna ve hücre siklusunun ilerlemesine neden olmaktadır (Kong ve ark. 2003).

Bir asetiltransferaz olan tat-interacting protein 60 (Tip60) ise Sisplatin'e maruz kalmış hücrelerde E2F1'ni Lys120 ve Lys125 rezidülerinden asetilasyona uğratarak proteinin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Van Den Broeck ve ark. 2012). Ayrıca Tip60/E2F1 kompleksi ERCC1'in (Enzyme Excision Repair Cross-Complementing Group 1) birikimini kontrol ederek Sisplatin muamelesi sonrası DNA tamirini kontrol altına almaktadır. Bilindiği üzere ERCC1 Sisplatin maruziyeti sonrası hasar görmüş DNA'nın tamiri ile doğrudan ilişkili bir molekül olup platinium tedavisine dirençlilik sağlamaktadır (Miyamoto ve ark. 2008, Steffensen ve ark. 2009).

E2F1, kendi deasetilasyonunu destekleyerek asetillenmesini kontrol altına alabilmektedir. Bunun için bir deasetilaz olan Sirtuin 1 (SIRT1) ekspresyonunu arttırarak asetilasyon üzerinde negatif geri besleme oluşturmaktadır (Pediconi ve ark. 2009). Bu negatif besleme mekanizması SIRT1 üzerinden engellendiğinde p53-negatif kanser hücrelerinin DNA hasarına bağlı hücre ölümünde artış olduğu görülmektedir. Bu bilgileri doğrulayıcı biçimde birçok ilaç dirençliliği bulunan kanser tiplerinde SIRT1 ekspresyonunda artış olduğu bilinmektedir (Olmos ve ark. 2011). Görüldüğü üzere kanserde ilaç dirençliliğinin önüne geçilmesinde; E2F1'in asetilasyonu ve SIRT1-aracılı deasetilasyonu muhtemel hedeflerin başında gelmektedir.

Diğer bir post-translasyonel modifikasyon olan metilasyonun da E2F1'in fonksiyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. Bir histon H3 metiltransferaz olan Set9 tarafından Lys185 rezidüsü metillenmektedir (Kontaki ve Talianidis 2010). Metillenmiş E2F1, DNA bağlanma affinitesinde değişim göstermez iken; ubiküitinlenme dolayısıyla degradasyona yakınlık gösterir. Beklenebileceği üzere, E2F1'in Lizin-Spesifik Demetilaz 1 (LSD1) tarafından demetillenmesi de E2F1'in

stabilizasyonunu sağlamaktadır (Kontaki ve Talianidis 2010, Xie *ve ark.* 2011). Set9'un yanı sıra bir diğer metil transferaz olan Protein Arjinin Metiltransferaz 5 (PRMT5), E2F1 proteinini Arg111 ve Arg 113 rezidülerinden tip 2 metilasyona uğratmaktadır. Bu metilasyon diğer metilasyonlar gibi E2F1'in ubikuitinleşmesini arttırarak E2F1'in degradasyonuna neden olmaktadır. PRMT5 inhibisyonu E2F1 proteinin hücre içerisinde birikmesine yol açmaktadır. Bu birikim E2F1 transkripsiyon faktörünün hedefi olan pro-apoptotik genlerin ekspresyonel artışına ve p53-bağımsız apoptozisin indüklenmesine neden olmaktadır. PRMT5 geni bulunmayan hücreler ilaç-bağımlı apoptoza yatkınlık gösterir. Aynı şekilde, PRMT5 metilasyon bölgeleri mutant olan E2F1'in pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu daha fazla artırdığı gözlenmiştir (Cho *ve ark.* 2012).

2.4.3. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün NEDDilasyonu

NEDDilasyon; ubikutin-benzer bir protein olan NEDD8 (Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated 8) bağlanması ile gerçekleşen bir modifikasyondur. E2F1 proteini NEDD8 aracılığıyla Lys185'den NEDDilasyona uğramaktadır. E2F1 NEDDilasyonu; aynı aminoasitte gerçekleşen metilasyona benzer bir biçimde; protein stabilizasyonunda ve transkripsiyonel aktivitede azalmaya yol açmaktadır (Loftus *ve ark.* 2012). DNA hasarı olmadığı durumlarda E2F1'in pro-apoptotik aktivitesini engelleyen NEDDilasyonun bu etkisi DNA hasarı sonrası NEDD8'in SENP8 (Sentrin-cysteine protease 8) aracılığıyla E2F1'den ayrılması ile son bulur. SENP8 tarafından gerçekleştirilen DeNEDDilasyon, E2F1'in p73 gibi hedef genlerinin ekspresyonunu arttırabilmesini sağlar (Aoki *ve ark.* 2013).

2.4.4. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Poli(ADP-Ribozil)asyonu

Poli(ADP-riboz) Polimeraz 1 (PARP1), genomik stabilite ve kromatin yeniden düzenlenmesi (remodelling) için önemli bir nükleer enzimdir. PARP1 enzimi, E2F1 ile etkileşime girdiğinde, ortamda büyüme faktörünün varlığına ve yokluğuna bağlı olarak E2F1'in fonksiyonunda farklı etkiler göstermektedir. Ortamda büyüme faktörü olduğunda E2F1'in aktivitesi indüklenerek G2/M hücre siklusunda duraksamaya neden olurken; serumsuz ortamda E2F1-aracılı apoptozisi arttırmaktadır (Kumari *ve ark.* 2015). Poli(ADP-ribozil)asyon'a uğrayan E2F1,

nükleusta bir tümör baskılayıcı protein olup, pRb-bağımsız E2F1 korepressörü gibi davranabilen BIN1 ile etkileşime geçer. BIN1'in E2F1'in ekspresyonuna neden olduğu genler arasında olması, bu modifikasyonun bir geri besleme mekanizması ile kontrol edildiğini göstermektedir.

2.4.5. E2F1'in Post-translasyonel Modifikasyonlarının Birbiri ile olan Etkileşimleri

Bu kadar farklı post-translasyonel modifikasyonun birbirinden bağımsız hareket etmesi düşünülemez. Nitekim, E2F1'in post-translasyonel modifikasyonlarının birbirleriyle etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. 2010 yılında E2F1'in Lys185 pozisyonundan metillenmesinin gösterilmesiyle post-translasyonel modifikasyonların birbiriyle olan ilişkisi de ortaya çıkmıştır (Kontaki ve Talianidis 2010). E2F1 proteini, Lys185'den Set9 tarafından metillenmesi sonucu N-terminal bölgesinden ubiquitinlenir ve degradasyona uğrar. Ayrıca, metillenmiş E2F1, P/CAF ve CHK2 için daha zayıf bir substrat haline gelir. Bu nedenle asetilasyon ve fosforilasyon engellenir. Bunun tersi olarak, Ser364'den fosforillenmesi Set9-aracılı asetilasyonlar için daha zayıf bir substrata dönmesine sebep olur ve metilasyonu gerçekleştiremeyen E2F1 proteini degradasyondan korunur (Kontaki ve Talianidis 2010).

DNA hasarı meydana geldiğinde hücre havuzunda bulunan metillenmiş E2F1, LSD1 demetilaz enzimi ile metillerinden kurtulur ve fosforillenmesi/asetillenmesi için CHK2 ve P/CAF substratı haline gelir. Fosforillenmiş/asetillenmiş E2F1 degradasyondan kurtulduğu için bu şartlarda döngünün durmasına veya apoptozis indüksiyonuna sebep olur.

2.4.6. E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Ubikuitinasyonu

Genel olarak, E2F1 degradasyondan pRB proteinine bağlanarak korunur ve yıkımı ubiquitin-proteazom sisteminde meydana gelir (Hateboer *ve ark.* 1996, Hofmann *ve ark.* 1996, Campanero ve Flemington 1997). Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün S/G2 fazında SCFSKP2-bağımlı ubiquitinasyona bağlı olarak seviyesi düşürülür (Marti *ve ark.* 1999, del Pozo *ve ark.* 2002). *In vitro* ortamda ise ROC-

cullin ligaz, E2F1'in Skp2-bağımsız ubiquitinlenmesinden sorumludur. E2F1'in Siklin-A / Cdk1 tarafından fosforilasyona uğraması E2F1 proteininin ubiquitinlenmesi üzerine herhangi bir etkiye sahip değildir (Ohta ve Xiong 2001). Diğer bir E3 ubiquitin ligaz kompleksi olan APC/C (The Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome) de E2F1 seviyesinin düzenlenmesinde etkilidir. APC/C, E2F1'in hücre döngüsünün geç S fazı boyunca stabilizasyonunu düzenlemektedir (Peart ve ark. 2010). Hücre döngüsü için bu kadar önemli olan ayrıca bir çok post-translasyonel modifikasyona uğrayan bir proteinin birden fazla E3 ligaz ile etkileşime girerek hücre içi seviyesinin sıkı kontrol altında tutulması, beklenen bir durumdur.

2.5. cAMP Aracılı Sinyal İletimi

Hücre içi ikincil mesajcı olarak tanımlanan ilk biyomolekül adenosin 3'5'-siklik monofosfat (siklik AMP)'dır (Rall ve Sutherland 1958). cAMP, her canlı hücrede bulunan ve Adenilat Siklaz tarafından ATP sübstrat alınarak oluşturulan bir moleküldür. cAMP doğrudan hücre fonksiyonlarını kontrol edebileceği gibi hücre metabolizmasından hücrede bulunan iyon kanallarının kontrolüne kadar birden fazla farklı etkiye sahiptir (Chin ve ark. 2002). cAMP yolağı; Jak/STAT yolağından ve Ca^{+2} aracılı sinyallerden sitokin cevabına kadar çok sayıda hücre içi sinyal iletimlerini kontrol etmektedir (David ve ark. 1996, Rogue ve ark. 1998). Aynı zamanda ERK aktivitesini olumsuz etkileyerek hücre proliferasyonuna negatif etki yapar (Cook ve McCormick 1993). Buna ek olarak olfaktör reseptörlerinde cAMP direkt olarak iyon kanallarını etkilemektedir (Biel 2009). cAMP'nin bağlanarak aktive ettiği iki hücresel hedefi vardır. Bunlardan biri Guanin Nükleotidi Değiştirme Faktörü olan EPAC diğeri ise Protein Kinaz A (PKA)'dır.

2.5.1. Protein Kinaz A

Protein Kinaz-A (PKA), intrasellüler cAMP'nin efektör molekülü olarak görev alıp çok sayıda yolağa etki eden bir enzimdir. PKA, hücre içi cAMP seviyesinin çok düşük olduğu şartlarda tetramerik bir yapı içindedir. Bu tetramerik yapı iki katalitik ve iki regülatör alt ünitelerden oluşur. Hücre içi cAMP miktarı yükseldiğinde cAMP regülatör alt ünitelere bağlanarak katalitik alt ünitelerin serbest

kalmasını sağlar. Serbest kalan katalitik alt ünite PDK1 tarafından S176 üzerinden fosforile edildikten sonra aktivite kazanır ve yapısında RXXT veya RRXS konsensus dizisi bulunduran proteinleri Serin veya Treonin amino asitinden fosforile eder (Songyang *ve ark.* 1994, Ubersax ve Ferrell 2007).

Regülatör alt üniteler kendi içinde dört farklı alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar RI α , RI β , RII α , RII β dır. Bu alt tipler farklı hücre türlerinde farklı seviyelerde sentezlenmektedir (Cadd ve McKnight 1989). Kendi aralarında ufak farklılıkları bulunsa da genel olarak bütün regülatör altgrup elemanları aynı fonksiyona sahiptir (Taylor *ve ark.* 2008). Regülatör alt ünitesinde olduğu gibi katalitik alt ünite de kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır. Bu katalitik ünitenin alt grupları C α , C β ve C γ dır. Bahsedilen katalitik alt grup elemanları fonksiyonel farklılık göstermektedir. Aynı hücrede değişik uyaranlar ile meydana gelen cAMP ve sonrasındaki PKA aktivasyonu değişik fizyolojik cevaplar doğurmaktadır (Steinberg ve Brunton 2001). Bu fizyolojik cevapların çeşitliliği PKA'nın sahip olduğu değişik alt gruplardan kaynaklanacağı gibi genel sinyalin aktarılmasında PKA'ya yardımcı olan AKAP (PKA Anchoring Proteins) gibi proteinlerin çeşitliliğinden de kaynaklanabilmektedir (Smith *ve ark.* 2006, Beene ve Scott 2007).

2.5.1.1. Protein Kinaz A'nın Hücre Siklusundaki Etkileri

Hücre proliferasyonunda, birçok farklı hücre içi sinyal yolağı görev almaktadır. cAMP ve PKA bu süreçte değişik görevler üstlenmiştir (Stork ve Schmitt 2002). Mitoz boyunca cAMP'nin hücre içindeki seviyesi minimal düzeyde olup; hücre siklusunun G₁ ve erken S fazında miktarı artmaktadır. Sentez fazında hücre içi miktarı artan cAMP mitoz bölünmenin Metafaz-Anafaz evreleri arasında bazı makromolekül komplekslerinin fosforilasyonu ile mitotik siklinlerin yıkılmasına ve kardeş kromatidlerin ayrılmasına katkı sağlamaktadır (Ferrari 2006).

Protein Kinaz A farklı hücrelerde hücre siklusu açısından farklı fizyolojik cevap oluşturmaktadır. cAMP, PKA aracılığıyla PC12 ve Sertoli hücrelerinde hücre büyümesini sağlarken (Vossler *ve ark.* 1997, Boulogne *ve ark.* 2003), NIH3T3 hücreleri ve adipositlerde hücre büyümesini inhibe etmektedir (Sevetson *ve ark.*

1993, Chen ve Iyengar 1994). Buna ek olarak; cAMP analoglarının hücre büyümesini engellediği ve glioma ve nöroblastoma hücrelerine dönüşümü arttırdığı da gösterilmiştir (Sato *ve ark.* 1975, Prasad *ve ark.* 2003, Moreno *ve ark.* 2006). Bu birbirinden farklı sonuçlar, hücrelerdeki bazal cAMP seviyelerinin farklı olmasından ve cAMP/PKA yolağının hedef intrasellüler makromoleküllerinin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır.

2.6. Hipotez

Hücrelerde besin sensörü olarak görev alan cAMP/PKA yolağının hücre döngüsünün kontrolü üzerine etkisinin olacağını düşünerek döngüde görev alan E2F1'in PKA substratı olabileceğini düşündük. Bunun için, E2F1'de PKA fosforilasyon motifinin olup olmadığına baktık ve üç adet muhtemel PKA fosforilasyon motifinin (RXXT veya RRXS) olduğunu saptadık. Bu motifler insanda RYET₁₃₀, RLLS₂₃₅ ve RMGS₃₆₄ amino asit dizilimine sahiptirler. Bu bağlamda, cAMP aracılığıyla aktive olan PKA'nın E2F1'i yukarıda belirtilen amino asitlerden fosforile etmesi durumunda, PKA aracılı fosforilasyonun E2F1 fonksiyon ve stabilitesine nasıl etki yapacağını sorguladık. Bunun için, klonladığımız ökaryotik E2F1 ekspresyon vektörünü kullanarak PKA tarafından fosforile edilebilecek T₁₃₀, S₂₃₅ ve S₃₆₄ amino asitlerinin kodonlarını fosforilasyonu mimikleyen ekşi yüklü glutamik asit (E) ve fosforile edilemeyen Alanin (A) kodonlarına çevirdik. Ardından, bu vektörleri insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 hücrelerinde stabil ekspresyonlarını gerçekleştirip bu vektörlerin hücrelerin proliferasyonuna, apoptozis indüksiyonuna, glukoz alımına ve Sisplatin duyarlılıklarına nasıl etki ettiğini göstermeye çalıştık.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda transforme insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) kullanıldı. Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serum (FBS-Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfotersin B (BI-03 033 113) ve gentamisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modifeid Eagle Medium – Biochrom FG0415) içinde monolayer kùlterler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

3.2. Hücrelerden TRİZOL ile RNA İzolasyonu

1. Hücre kùltürü kabından besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Hücreler üzerine 100mm'lik petriye (Corning-430167) 6 ml olacak şekilde direkt olarak TRİZOL (Sigma-T9424) eklendi.
3. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyondan sonra süspansiyon birer mililitrelik hacimlerde 1,5 ml'lik ependorf tüplere (Axygen MCT-150-C) bölündü.
4. Üzerine 100 µl 1-Bromo-3-chloropropane (BCP – Sigma B9673) eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı.
5. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 12.000g'de 15 dk 4°C'de santrifüj (Ependorf – Minispın) edildi.
6. Oluşan iki fazdan üstteki renksiz kısım yeni bir ependorfa aktarıldı.
7. Üzerine 500 µl izopropanol (Merck 995.1000) eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 12.000 g'de 8 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
9. Süpernatant atılarak RNA pelleti üzerine 1 mL %75'lik etanol (Merck 100967) ilave edilerek yıkandı.

10. 7.500 g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi.

11. Süpernatant atılarak RNA pelleti 3-5 dk kurumaya bırakıldı.

12. Peletin yoğunluğuna göre RNaz içermeyen H₂O eklendi.

3.3. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve miktarları spektrofotometre (Thermo Multiskan GO) ile ölçüldü ve aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı. cDNA sentezi için 1.5 µg RNA kullanıldı.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/mL}) = 40 \times A_{260} \times \text{DF (Dilüsyon Faktörü)}$$

3.4. İzole Edilen RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi Reaksiyonu

Bu reaksiyon için Roche Kiti (05 081 955 001) kullanıldı. Spektrofotometre ölçümü ile miktarı belirlenen RNA'dan 1,5 µg, Random Hekzamer'den 2 µl ve steril H₂O'dan 7,9 µl alınarak 0,2 mL'lik ependorf tüpüne konuldu ve 65°C'de 10 dakika denatüre edildi. Bu karışımın üzerine 4µl 5X Reaksiyon Tamponu, 0,5 µl Rnaz inhibitörü, 2 µl dNTP karışımı, 1 µl DTT (Dithiothreitol D0632) ve Revers Transkriptaz enzimi ilave edilerek final hacmi 20 µl olan bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon 55°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika olacak şekilde thermal cycler cihazında gerçekleştirildi.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi

PZR reaksiyonu Bio-Rad (MyCycler) ve PZR System (Gene Amp ®) marka thermal cyclerlarda gerçekleştirildi.

3.5.1. PZR Reaksiyonu, İçeriği ve Koşulları

İnsan E2F1 klonlama primerleri ile yaptığımız PZR koşulları şöyledir; 1X Tampon, 2mM MgCl₂, 1pmol dNTP, birer pmol ileri ve geri primerler, %5 DMSO (Sigma Cat. No:D5879), 2 ünite Taq Polimeraz ve 100 ng cDNA (Kit: Thermo Scientific – Fermentas – EP0401). Thermal Cycler cihazında 94°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 35 döngü olmak üzere; 94°C'de 1 dk, 65°C'de 1 dk, 72°C'de 4 dk ve

son uzatma 72°C’de 7 dk olacak şekilde amplifikasyon gerçekleştirildi. Reaksiyon agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

3.5.2. İnsan E2F1 cDNA’sının Amplifiye Edilmesi İçin Kullanılan Klonlama Primerleri

İleri primer : 5’-CCG GAA TTC GCC GCC ATG GCC TTG GCC GGG
GCC CCT GCG GG-3’

Geri primer : 5’- CCG GAA TTC GAA ATC CAG GGG GGT GAG GTC
CCC AAA GTC -3’

EcoRI kesim bölgesi altı çizgili olarak gösterilmiştir.

3.6. Amplifiye Edilen İnsan E2F1 cDNA’sının pcDNA 3.1 (B) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Klonlama işlemi için, insert olarak adlandırılan insan E2F1 cDNA’sı ve vektör EcoRI enzimi ile kesildi ve fenol ile temizlendi. Vektörün 5’-terminali defosforile edildikten sonra insert ile ligasyon işlemine tabi tutuldu. Ligasyon sonrasında vektördeki insert yönü XhoI enzim kesimi ile belirlendi.

3.6.1. İnsan E2F1 cDNA’sının ve pcDNA3.1 (B) Vektörünün EcoRI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

EcoRI enzim kesimi için Fermentas (ER0271) kiti kullanıldı. Reaksiyon koşulları: 1X Reaksiyon Tamponu, 10 ünite EcoRI enzimi, 1 µg pcDNA3.1(B) veya E2F1 cDNA ve sterile H₂O’dur. Reaksiyon 50 µl’de gerçekleştirildi ve gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi

3.6.2.1 %1,5 Agaroz Jelin Hazırlanması

1,5 gram toz agaroz (Sigma Cat. A5093) tartılarak 100 ml 1X TBE’de (Tris-Sigma / Borat- Merck 1.00165.1000 / EDTA – Sigma E5134) çözüldü. 50°C’ye

gelene kadar soğutuldu. 0,5 µg/ml etidyum bromür (Sigma E87519) ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıcak agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dk polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden çıkarıldı ve agaroz jel elektroforez tankına (BIORAD) yerleştirildi.

İşlemler

%1,5'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünü ve 100 bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 40 dk yürütüldü. Süre sonundan örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi. Syngene (İngenius) transilluminatör aletine bağlı olan monitör sistem kullanılarak fotoğraf alındı.

3.6.3. pcDNA3.1(B) Vektörünün ve E2F1 cDNA'sının Fenolle Çöktürme Yöntemiyle Temizlenmesi

Uygulama:

1. Enzim kesimi yapılmış örnek (50 µl) üzerine 250 µl 1X TE (Tris-EDTA) eklendi.
2. Üzerine 300 µl Fenol (AppliChem A1624.0500)/Kloroform (Merck 1.02445.2500) / İzoamil alkol (Merck 977.1000) (25:24:1) eklendi.
3. 30 saniye vorteks (Biosan V1 plus) yardımıyla karıştırıldıktan sonra 15 dakika buzda bekletildi.
4. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Ayrı bir tüpe üst fazın 250 µl'si alınarak 25 µl 3M Sodyum Asetat (pH:5.4)(Sigma S2889) ile karıştırıldı.
6. Bu karışım üzerine 2 hacim kadarıyla (550 µl) soğuk absolü etanol eklenerek bir saat -20°C'de bekletildi.
7. Süre sonunda 14.000 rpm'de, +4°C'de, 30 dakika santrifüj edildi.
8. Etanol uzaklaştırılarak kurutuldu ve steril H₂O'da çözüldü.

3.6.4. pcDNA3.1(B) Vektörünün Dana İntestin Alkalen Fosfataz (CIAP) ile Muamelesi

Enzim kesimi yapılmış vektörün klonlamada kullanılabilmesi için 5'-terminal kısımlarındaki fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Klonlama işlemi için hazırlanan vektörün CIAP reaksiyonu Invitrogen kiti (18009-027) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit koşulları şöyledir; 1X Buffer, 0,01 ünite CIAP enzim, 1µg vektör ve steril H₂O. Reaksiyon 40µl'de hazırlanmış ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda vektör fenolle temizleme işlemine tabii tutuldu ve %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

3.6.5. İnsan E2F1 cDNA'sının pcDNA3.1(B) Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzim Reaksiyonuyla Klonlanması

EcoRI ile kesilmiş ve fenolle çöktürme yöntemi ile temizlenmiş olan vektör içerisine insert T4 DNA ligaz (Invitrogen 15224-017) yardımıyla klonlandı. Reaksiyon koşulları şöyledir : 1X Reaksiyon Tamponu, 3 volüm (600 µg) insert (E2F1 cDNA'sı), 1 volüm (200 µ) vektör (pcDNA3.1(B)), 1 ünite T4 DNA Ligaz ve steril H₂O. Reaksiyon karışımı 12-16°C'de geceboyu inkübasyona bırakıldı. Klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediği %1 agaroz jelde kontrol edildi.

3.6.6. İnframe Klonlama İşleminin Oryantasyon Yönünün Belirlenmesi için XhoI Enzim Kesiminin Gerçekleştirilmesi

T4DNA Ligaz reaksiyonu sonrasında insert içeren vektörler %1 agaroz jelde belirlendi. Insertin vektörde yönünün (oryantasyonunun) saptanması için ilgili vektörün XhoI enzimi (Thermo Fisher ER0691) ile kesimi gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları şöyledir: 1X Reaksiyon Tamponu, 1X H₂O. Reaksiyon karışımı 30°C'de geceboyu inkübasyona bırakıldı ve %3'lük agaroz jelde kontrol edilerek vektörün anlamlı veya anlamsız yönü belirlendi.

3.7. Doğru Oryantasyon Klonlama Yönüne Sahip pcDNA3.1(B) Vektörün Çoğaltılması Amacıyla E.Coli DH5α Suşuna Transformasyonu

Vektörün çoğaltılması için E.coli DH5α suşu kullanıldı. Transformasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi amacıyla öncelikle DH5α suşu, plazmid vektörü

alabilecek kompetan hale getirildi ve ardından transformasyon işlemine geçildi.

3.7.1. CaCl₂ Yöntemiyle Kompetan DH5 α Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar

1. LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri: %2' lik olacak şekilde 4 g LB (Merck 1.10285.0500) toz 200 ml distile su içerisinde çözülerek otoklav edildi.
2. 50 mM CaCl₂ (Sigma C1016) /10 mM Tris (pH:7.4)
3. %100 gliserol (Sigma G2025)

Uygulama

1. Bir koloni ya da dondurulmuş DH5 α E.coli suşundan 20 μ l alındı ve 10 ml LB sıvı besiyerine konuldu.
2. 37°C çalkalamalı etüvde gece boyu inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonucunda 1-2 ml alınarak 200 ml LB besiyerine kondu ve 4 saat inkübe edildi.
4. Bakteri yoğunluğu O.D₆₀₀ =0,2-0,5 aralığında olmalıdır.
5. 200 ml besiyeri 10 dk buzda bekletildi.
6. 50 ml'lik falkonlara bölündü ve 2000 rpm'de 4°C' te 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine önceden soğutulmuş 50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH: 7.4)' den 100 ml ilave edildi.
8. 15 dk buzda bekletildi. 2000 rpm'de 4°C' de 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 9 ml 50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH: 7.4) ve 1 ml %100 gliserol karışımından konarak homojenizasyon sağlandı.
10. 250 μ l miktarlarında 1,5 ml'lik ependorf tüplere bölündü ve -80°C' de saklandı.

3.7.2. Agar Hazırlanması

2 gr LB Broth ve 1 gr Bakteriyolojik agar (Oxoid L11) üzerine 100 ml distile su ilave edilerek otoklavlandı. Agar donmadan hemen önce (yaklaşık 40 °C' de) 100ml agara 100 μ l ampisilin (50mg/ml) eklendi ve petri kaplarına dağıtılarak soğuması beklendi.

3.7.3. E. Coli DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu

1. DH5α kompetan E. colilerden 75 µl ve plazmidten 7 µl alınarak ependorfa kondu.
2. 30 dk buzda bekletildi.
3. 1 dk 42 °C' de su banyosunda bekletilerek tekrar buza alındı.
4. Tüpe 1 ml LB besiyeri kondu ve 1 saat 37°C' de 150 rpm' de çalkalayıcıda (Sartorius) inkübasyona bırakıldı.
5. Petriye ekim yapılacaksa 4 °C' de 5000 rpm' de 10 dk ya da 2500 rpm' de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanın 900 µl' si atıldı. Geri kalan 100µl ile pelet süspanse edildi.
6. "L" şeklindeki pastör pipeti ile 50 µg/ml ampisilinli (Sigma A9393) LB agara yayarak ekildi ve gece boyu 37 °C' de inkübe edildi.
7. Ertesi gün oluşan koloni alınarak 200 ml ampisilinli sıvı LB içerisine alınarak gece boyu 37 °C' de 150 rpm' de inkübasyon yapıldı.
8. 2500 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet -20°C' de saklandı.
9. Daha sonra peletten plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

3.8. Bakteriden Plazmid İzolasyonu:

Kullanılan Solüsyonlar

50 mM D-Glukoz (Sigma 16301) (MA: 180) Hazırlanışı: 0,9 gr glukoz 100 ml distile suda çözüldü.

10N NaOH (Sigma 06203) (MA: 40) Hazırlanışı: 40 gr NaOH 80 ml distile suda çözüldükten sonra hacim 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon I Hazırlanışı:

- | | | |
|---------------------------|---|----------------------------|
| 1. 50 mM D-Glukoz | : | 0,9 gr D-Glukoz |
| 2. 25 mM TrisHCl (pH:8.0) | : | 2,5 ml (1M tris stoktan) |
| 3. 10 mM EDTA | : | 10 ml (100mM EDTA stoktan) |
- Karışım 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon II Hazırlanışı: (Kullanımdan hemen önce hazırlanır)

1. 0,2 N NaOH : 2 ml (10 N NaOH stoktan)
 2. %1 SDS : 10 ml (%10' luk SDS stoktan) (SDS-Merck 8.22050.1000)
- Karışım 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon III Hazırlanışı:

1. 5M potasyum asetat (Codex 358907): 49,075g 100 ml' de çözülerek 60 ml' si kullanıldı.
2. 11,5 ml glacial asetik asit (Sigma 27222)
3. 28,5 ml steril H₂O.

Uygulama

1. 100 µg/ml Ampisilin içeren 100 ml besiyerinde gece boyu üretilen transforme bakteriler çoğaldıktan sonra 50 ml' lik falkonlara bölündü.
2. 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve pelet kaldırıldı. Pelet üzerine 5 ml Solüsyon I' den ilave edilerek vortekslendi ve 5 dk buzda bekletildi.
4. Üzerine 10 ml Solüsyon II'den ilave edildi. Tüp alt üst edilerek buzda 5 dk bekletildi.
5. Buzda bekletilen tüplere 7,5 ml Solüsyon III'den ilave edildi ve karıştırılarak 10 dk buzda bekletildi.
6. Tüpler, 5000-8000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
7. Üst faz yeni tüpe alınır, final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde RNaz ilave edildi. 37°C' de 30 dk su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
8. Süre sonunda eşit hacimde üzerine fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi ve 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Üzerine 2 hacim saf etanol eklendi. - 80°C'de 1 saat ya da gece boyu bekletildi.
10. Tüpler 8000 rpm' de 1 saat santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı, pelet kurutuldu ve 1 ml TE' de çözüldü.

3.9. HEK293 Hücrelerine Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu

Kullanılan Solüsyonlar

1. 2XHEPES – pH: 7,05

500 ml hazırlamak için;

280mM NaCl (Merck 1.06404.1000)	8g (susuz)
10mM KCl (Sigma H3375)	0,37g
1,5 mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck 1.06345.1000)	0,3g
12 mM D-Glukoz (Sigma 16301)	1g
50 mM Hepes (Sigma H3375)	5g

2. 2M CaCl₂ (Sigma C1016): 5,88 gr 20 ml distile suda çözülür. Deney aşamasında 0,25 M oranında kullanılır.

3. 0,1X TE pH:8.0

4. %10 gliserol içeren DMEM

5. Phosphate Buffer Saline (PBS) Solüsyonu: 8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözülür. NaOH ile pH 7.4' e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildi.

Uygulama

293T hücreleri transfeksiyondan bir gün önce 100 mm'lik petrilere pasajlandı ve ertesi gün yaklaşık %70-80 konfluent olan hücrelere transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonda 30 µg vektör DNA'sı Sodyum asetat/Etanol çöktürme yöntemi ile sterilize edildi ve çöken pelet 1 ml 2xHEPES pH:7.05 içinde çözülür. Bunun üzerine 0.25 Molar 1 mL CaCl₂ solüsyonu damlalar halinde ilave edildi ve iyice karıştırılan örnek laminar kabin içinde 30 dk bekletildi. Bu süre sonunda oluşan ve net olarak görülen kalsiyum fosfat-DNA kompleksi pipetaj ile daha küçük parçalara bölündü ve örnek 10 ml besiyerinde bulunan hücrelerin üzerine 20 cm mesafeden damlalar halinde bırakıldı. Gece boyu inkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler %10 gliserol içeren DMEM ile 1 dk şoklandı. Şoklamanın ardından şoklama

solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1XPBS ile iki kere yıkandı ve normal büyüme ortamı (%10 serum içeren DMEM) hücrelere verildi.

3.10. Transfekte Olan HEK Hücrelerinin Seçilmesi ve Tek Koloni Seçimi

Hücre kültüründe sadece transfecte edilen hücrelerin yaşıyor olmasını ve yaşayan hücrelerin aynı seviyede ekspresyon göstermesini sağlamak için hücre seçimi ve tek koloni seçimi gerçekleştirildi.

3.10.1. Transfecte Olan HEK Hücrelerinin Seçilmesi

pcDNA3 vektörünün seçim belirteci olarak yapısında neomisin/G418 direnç geni mevcuttur. Bu nedenle vektör ile transfecte olan HEK293 hücrelerinin seçimi için neomisin/G418 (Calbiochem 345810) (0,4g/mL) içeren DMEM besiyeri kullanıldı. Transfeksiyon işleminden iki gün sonra HEK293 transfecte hücreleri neomisin/G418 içeren besiyeri ile muamele edildi ve bundan sonraki aşamalarda bu hazırlanan seçici besiyeri kullanıldı.

3.10.2. Tek koloni Seçimi

Seçici besiyeri ile kültüre edilen transfecte HEK293 hücreleri tripsinize edilerek kaldırıldı ve 96 kuyucuklu neomisinli DMEM içeren kültür kaplarına kuyu başına bir hücre düşecek şekilde ekildi. Yaklaşık 1 ay süresince yapılan seçimde neomisinli ortamda çoğalabilen koloniler seçildi.

3.10.3. Seçilen Kolonilerdeki E2F1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

Tek koloni olarak seçilen ve devamında çoğaltılan hücreler tripsinize ederek 96-well plateden sırası ile 24-well plate'e, 6-well plate'e oradan da petrilere aktarıldı. Petrillerdeki hücrelerin lizatları alınarak Western Blot yöntemi ile ekspresyonu en uygun koloni sonraki deneyler için seçildi.

3.11. Hücrelere Forskolin, Laktasistein ve Kaspaz-3 İnhibitörü Muamelesi

1. Hücreler kültür kabını %70-80 kaplayana kadar %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde %5 CO₂' li etüvde kültüre edildi.
2. Hücrelerin bulunduğu besi ortamı uzaklaştırıldı.
3. İki defa 1xPBS ile yıkandı.

4. Hücrelere serum içermeyen besiyeri verildi.
5. Hücreler gece boyu veya 16 saat süresince serumsuz ortamda bekletildi.
6. Süre sonunda ilgili gruplara 10µM final konsantrasyonu olacak şekilde Forskolin, Laktasistein ve/veya Kaspaz 3 İnhibitörü verildi ve deney basamaklarına göre değişen süreler boyunca beklendi.
7. Muamele sonunda hücreler tekrar 1xPBS ile iki defa yıkandı.
8. Hücre kazıyıcısı (Greiner cell scraper 541 080) yardımıyla hücreler Lizis tamponu içerisinde kaldırıldı ve vortekslenerek lizatları hazırlandı.

3.12. Hücre Lizatı Hazırlanması

Kullanılan Solusyonlar:

Triton-X Lizis Tamponu

100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadate (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001). Solusyon pH: 7,4 (pH metre: Hanna Instruments pH 211)' e ayarlandı.

Uygulama

Besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 10 mL soğuk 1xPBS ile yıkandıktan sonra 1 mL Triton-X Lizis tamponu hücrelerin üzerine konarak hücreler kazındı ve steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne alındılar. Buz içinde 10 dk tutulan örnekler 1 dk. vortekslendikten sonra 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant lizat olarak steril bir ependorf tüpe transfer edildi. Örnekler kullanılana kadar -80°C'de (Thermo scientific 994) saklandı.

3.13. Protein Miktar Tayini

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standartına karşı gerçekleştirildi. Kısaca tarif etmek gerekirse, stok BSA (10mg/mL) solüsyonundan 1µg/µl olacak şekilde solüsyon hazırlandı. Standart eğrinin çizilmesi için bu solüsyondan üçlü tekrarlar olacak

şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7 ve 9 µg olacak şekilde ayrı ayrı konuldu. Yine -80°C'deki hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1'er µl ilave edildi. BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Üçlü tekrarların ortalama verisi alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.14. İmmünopresipitasyon Yöntemi

E2F1 ve PKA'nın fiziki olarak birbirine bağlandığını göstermek için her iki protein hem ekspresyon yapılmamış hem de 48 saat boyunca ekspresyonu yapılmış 293T hücrelerinden hazırlanan 2 mg hücre lizatı kullanılarak immünopresipitasyona tabii tutuldu.

Uygulama

1. 2mg protein lizatları üstüne 950 µl' ye tamamlayacak şekilde Triton X liziz tamponu eklendi.
2. Karışımın üstüne 50 µl Agaroz G/A bead (sc-2003) eklendi ve 1 ml' ye tamamlandı. Bu aşamada beadlerin homojenizasyonu oldukça önemlidir. Bu nedenle pipetaj yapılmalıdır.
3. Karışım nutatör yardımıyla 4°C'de 30 dk çalkalandı.
4. Süre sonunda tüp 10.000 rpm'de 4°C'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant yeni ependorflara dökülerek aktarıldı, bead içeren pellet atıldı. 20 µl Anti-E2F1 (Santa Cruz KH95) eklendi.
6. Nutatörde, 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonunda üzerine 100µl agaroz A/G bead eklendi ve gece boyu 4 °C çalkalandı.
8. Ertesi gün örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 1 ml Triton-X Liziz Tamponu eklenerek alt üst edildi. Bu yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı.
9. A/G beadler üzerinde tampon kalmayacak şekilde süpernatant atıldı.
10. Pelet üzerine 100 µl β-merkaptetanöl içeren SDS yükleme tampon konuldu ve tüpler kaynar suda 5 dk. bekletilerek vortekslendi.
11. Son olarak, örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

12. A/G beadlerden kurtulan ve süpernatantta mevcut olan proteinlerin 50 µl'si western blot yöntemiyle analiz edildi.

3.15. Western Blot Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5M TrisBase pH: 8.8. 1 lt.' si için 181,64 gr TrisBase tartıldı ve distile H₂O'da çözöldü.

Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5M TrisBase pH:6,8. 1 lt' si için 60,5 gr TrisBase tartıldı ve distile H₂O'da çözöldü.

Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8): 29g Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ve 0,8g Bisakrilamid (Merck 2610) 100 ml bidistile H₂O'da çözölererek 0,22 um' lik filtre kullanılarak filtre edildi.

Running Buffer (10X): 15 gr. TrisBase, 94 gr. Glisin (Vivantis PR0608), 50 ml %10 SDS karışımı 1lt' ye distile H₂O ile tamamlandı. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.

1X PBS-T: 1 lt 1xPBS solüsyonuna 1ml Tween20 (Merck 8.22184.1000) ilave edildi.

SDS Yükeme Tamponu: 1ml gliserol, 3ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000), 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH:6,7, 1-2 µg bromofenol mavisı eklendi. Filtreden geçirilerek kullanıldı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptöetanol (Sigma M3148) ilave edildi.

%10 Amonyum persölfat (APS): 0,1 gr APS (Sigma A3678) 1 ml distile suda çözöldü. Taze hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

Transfer Tamponu: 3,75g Glisin ve 7,25g TrisBase 1 lt distile suda çözölererek karışım 250 ml metanol eklendi.

3.15.1 Western Blot Yönteminde Kullanılan Jelin Hazırlanması

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking	5ml' lik	10ml' lik
Su	15ml	11,55ml	10,5ml	7,05ml	Su	3ml	6ml
Resolving Buffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml	Stacking Buffer	1,25ml	2,5ml
Acr(29:08)	7,05ml	10,5ml	12ml	15ml	Acr(29:08)	0,625ml	1,25ml
%10SDS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	%10SDS	50µl	100µl
%10 APS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	%10 APS	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml		5 ml	10 ml

3.15.2 Örneklerin Jelde Yürütülmesi

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 150 µg alınarak üzerine yarı hacminde β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dk bekletildi. Uygun pipet uçlarıyla hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 120 voltta, resolving jelde ise 150 voltta yürütüldü (Cihaz: Amersham 80-6171-96). Yürüme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.15.3 Jelde Yürümüş olan Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütüldükten sonra transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah veya negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri yerleştirildi. Üzerine transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı yerleştirildi. Bunun üzerine örneklerin yürütüldüğü jel cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak kondu. Jel üzerine saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Biorad Cat. No: 1620177) hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletmeden transfer tamponuyla doldurulan ve buz içerisine konulmuş transfer cihazına yerleştirildi. Örnekler gece boyu 70 voltta transfer edildi.

3.15.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi

Transferin ardından blot PBST-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) solüsyonunda 2 saat bloklandı. Bunun ardından, PBST-BSA içinde hazırlanan primer antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile 1,5 saat işaretlendi, takiben, antikor uzaklaştırıldı ve blot PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile otuzar dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, PBST-BSA içinde hazırlanmış uygun anti-mouse veya anti-rabbit sekonder antikorunun 1/5000 dilüsyonu ilave edildi ve işaretleme 1 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot PBST ile 30 dk yıkandı. ECL reaktifi (Biorad Clarity ECL Cat.1705061) ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra bu da uzaklaştırıldı ve kemilüminasana duyarlı film karanlık odada blot'ın üzerine konarak 1 dakika bekletildi. Görüntüleme için film, film banyo cihazında (Kodak 8116428) banyo edildi.

Görüntülenerek fosforilasyon seviyesi belirlenen proteinlerin, bazal seviyelerinin belirlemesi amacıyla işaretleme yapılacak spesifik antikor uygulamasından önce fosforile formun belirlendiği membrana “strip off” işlemi uygulandı.

3.15.5. Strip-Off İşlemi

Kullanılan Solüsyonlar:

Strip off Solüsyonu: 12.5 ml 0.5 M Tris PH.6.8, 20 mL %10'luk SDS, 67 ml steril distile su ve hazırlandıktan sonra 704 µl β-merkaptoetanol eklenecektir.

1X PBS, %0.1 Tween-20: Bölüm 3.15.' de açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

Uygulama:

Hazırlanmış olan strip off solüsyonu 55°C'e ısıtıldı (Mikrodalga Fırın) ve solüsyona çeker ocak içerisinde 704 µl β-merkaptoetanol eklendi. Aynı zamanda işlemin gerçekleştirileceği çalkalamalı inkübatör de aynı sıcaklığa getirildi. Ağzı kapalı plastik kaba konan membranın üzerine ısıtılmış strip off solüsyonu konuldu. Membran aynı dereceye ısıtılmış çalkalamalı inkübatörde 20 dk çalkalandı. Bunun ardından solüsyon uzaklaştırıldı ve blot PBS-T (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 30'ar

dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Bu aşamadan sonra membran tekrar daha önce bahsedilen koşullarda işaretlendi.

3.16. Monoklonal Antikor Yapımı

Kullanılacak E2F1 primer antikorun yapımı için hayvan immünizasyonu, hibridomanın oluşturulması ve oluşturulan hibridomaların denemeleri yapıldı.

3.16.1. İmmünizasyon

İmmünizasyon için 6 haftalık Balb/C türü fareler kullanıldı. Tasarlanan ve ticari olarak alınan E2F1 peptidi enjeksiyonluk su içinde final konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde çözüldü. 1.,15.,30. ve 59. günler bu peptid intraperitoneal olarak uygulandı.

3.16.1.1 İmmünizasyonun Kontrolü

İmmünizasyona tabi tutulan farelerin kuyruk damarından 30. ve 45. günler kan alındı. Alınan 250 µl kanın santrifügasyon yöntemi ile serumu ayrıldı. E2F1 peptidi SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve PVDF membrana aktarıldı. Fareden elde edilen serum primer antikor olarak kullanıldı ve PVDF membranın işaretleme yapıldı.

3.16.2. Hücre Kültürü ve Hibridoma Oluşturma

Kullanılan Solüsyonlar:

Normal Besi Yeri: L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Bovin Serum (FBS-Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B (BI-03 033 113) ve gentamisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modifeid Eagle Medium – Biochrom FG0415)

Seçici Besi Yeri: Normal besiyerine litrede 20 ml olacak şekilde Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (50X)(GIBCO Cat.21-060-017) eklenerek hazırlandı.

PBS Solüsyonu: Phosphate Buffer Saline (PBS) Solüsyonu: 8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözüldü. NaOH ile pH 7.4' e ayarlandı ve toplam

hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildi.

3.16.2.1 Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 10 gün öncesinde kültürde normal besi yeri içerisinde çoğaltılan FO myeloma hücreleri hücre kültür petrilerinde çoğaltıldı. Füzyon günü kültür petri içindeki besi yeri steril bir şekilde uzaklaştırıldı ve hücreler pasajla 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı ve 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 10 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

3.16.2.2 Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

Füzyondan bir önceki gün gerçekleştirildi. Bu basamakta immünize olmamış normal fare kullanıldı. Farenin karın bölgesi yanlara doğru açıldı ve periton görünür hale getirildi. Yağsız bir bölgeden organlara değmeden periton içerisine 5 ml DMEM (serumsuz) verildi, farenin karnı DMEM ile kaplanmasından sonra enjektöre geri çekildi. Enjektör içerisindeki hücreler bir tüpe alındı ve hücre sayımı yapıldı. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına göre her kuyuya ~6000 hücre + normal besiyeri karışımı 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.

3.16.2.3. Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

Antijen ile immünize olan fareler servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü. Derisi %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Dalak yağ dokusundan arındırılmış bir şekilde 15 ml DMEM içerisine alındı ve bu şekilde laboratuvar ortamına taşındı. Steril kabin içinde dalak yabancı dokulardan temizlenerek 10 ml PBS tamponu içeren başka bir petri kabına alındı. Dalak küçük bir süzgeçte cam baget ile ezilerek hücreler açığa çıkarıldı ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Hücreler, PBS tamponunda 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 10 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

3.16.2.4. Hibridoma Oluşturma

Hücre sayımı yapılan FO myeloma hücreleri ve dalak hücreleri 1/6 oranı olacak şekilde birleştirildi ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kesim

atılarak çöken hücre karışımına 37°C’de ısıtılmış 1 ml Polietilen Glikol (PEG) 4000 1 dakika içerisinde oldukça yavaş eklenir. 2 dakika hücre karışımı 37°C beklendi. 10 ml sadece DMEM (FCS +antibiyotik içermeyen) 5 dakika içerisinde yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra 20 ml %10 FBS DMEM eklendi. Karışım 1 saat 37°C ısıdaki CO₂ etüvde bekletildikten sonra, santrifüj edildi. Çöken hücrelere seçici kültür ortamı ilave edilerek bir önceki gün makrofaj ekilmiş hücre kültür plaklarına 100 µl /kuyu olacak şekilde şeklinde dağıtıldı. 10 gün sonra hücrelerin üst sıvılarından 100 µl çekildi ve üzerine 100 µl seçici HAT içeren besiyeri ilave edildi. Hücrelerin gelişme periyoduna bağlı olarak normal besi yerine geçildi.

3.16.3. Hibridomaların Antikor Üretiminin Kontrolü

Hibridomaların antikor üretiminin kontrolü ELISA ve western blot yöntemleri ile gerçekleştirildi.

3.16.3.1. ELISA Yöntemi ile Antikor Üretiminin Kontrolü

Kullanılan Solüsyonlar:

1X PBS, %0.1 Tween-20: Bölüm 3.15.’ de açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

%1 BSA içeren 1X PBS-T: 100 ml 1X PBS-T içinde 1 gr BSA çözülerek hazırlanmıştır.

Uygulama:

1. 96 kuyuluk ELISA 1µg/µl konsantrasyondaki antijen çözeltisinden 100µl ile kaplandı.
2. Gece boyu veya en az 6 saat, +4 °C’de inkübe edildi.
3. ELISA plate, 3 kez PBS-Tween 20 solüsyonu ile yıkandı.
4. Her kuyuya 150 µl %1 BSA içeren 1X PBS-T solüsyonu eklendi.
5. 2 saat 37°C’de bekletildi.
6. Hibridoma üst besiyerleri direk olarak plaklara eklendi ve 37°C’de 1,5 saat bekletildi.
7. ELISA plakları 3 kez PBS-Tween 20 solüsyonu ile yıkandı.
8. Kuyular 1/1000 dilusyonunda anti mouse-IgG 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

9. Kuyular 5 kez yıkandıktan sonra substrat tamponu ilave edilerek (100 µl), 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi ve antikor düzeyi renk değişiminden 405 nm’de ELISA okuyucusunda (Thermo Labs. Multiskan Spectrum) belirlendi.

3.16.3.2. Western Blot Yöntemi ile Antikor Üretiminin Kontrolü

ELISA yöntemi ile diğer kolonilerden göreceli yüksek antikor sentezleyen hücreler seçildi. Seçilen kolonilerin hücre kültüründeki besiyeri SDS-PAGE yöntemiyle jelde yürütülmüş ve PVDF membrana transfer edilmiş E2F1 peptidi ve HEK293 hücre lizatının işaretlemesinde primer antikor olarak kullanıldı. İşaretlemeleri pozitif olarak görülen koloniler belirlendi.

3.17. *In Vitro* Kinaz Reaksiyonu

Hazırlık Aşaması

PKA enziminin E2F1’i fosforile ettiğinin gösterilmesi için HEK293 hücrelerinde 72 saat boyunca ekspresyonu sağlanan E2F1 proteini anti-E2F1 antikoru kullanılarak immünopresipitasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır. Aynı şekilde PKA enziminin E2F1 proteini ile etkileşimde olduğunu anlamak için PKA proteini anti-PKA antikoru kullanılarak immünopresipitasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Kullanılan Solüsyonlar

1X NEBuffer for Protein Kinases (PK):

50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
0.1 mM EDTA
2 mM DTT
0.01% Brij 35
pH 7.5 ve 25°C sıcaklıkta

cAMP-dependent Protein Kinase (PKA), catalytic subunit (NEB P6000S)

200 µM ATP

Uygulama

Yaptığımız E2F1 ekspresyon vektörü transfekte edildikten sonra Yetmiş iki saat inkübe edilen HEK293 hücrelerinden hücre lizatı hazırlanıp bunun iki miligramı sırası E2F1'i IP yöntemi ile çöktürmede kullanıldı. Çöktürme sonrası A/G bağlı agaroz beads'leri reaksiyon tamponu ile yıkandı. Yıkamadan sonra beadsler 50µl 1X Kinaz Tamponunda çözüldü. Tüplerin üzerine 10µM ATP ilave edildikten sonra örnekler 30°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Protein A/G-Agaroz Beads'lere bağlı proteinler santrifikasyon ile çöktürülerek lizis tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra final peletin üzerine 50 µl β-Merkaptoetanol içeren 2X SDS-yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dakika tutulduktan sonra örnek vortekslendi. Santrifüj edildi ve süpernatantın 50 µl'si %10'luk SDS-PAGE jelde elektroforeze tabi tutuldu. Proteinlerin gece boyu PVDF membrana transferinin ardından membran sadece PKA tarafından fosforile edilen proteinleri tanıyan "anti-fosfo PKA substrat antikoru" (Cell Signalling #9624S) ile işaretlendi ve film banyosunda görüntüsü alındı.

3.18. Site-Directed Mutagenesis Yöntemi (Bölge-Spesifik Mutasyon Yöntemi)

İnsan yabanıl tip E2F1 ekspresyon vektörü üzerinde oluşturulmak istenilen Alanin (T130A, S235A, S364A) ve Glutamik asit (T130E, S235E, S364E) mutantları için <https://www.genomics.agilent.com> internet sitesi aracılığıyla ilgili bölgelere özgü mutagenез primer çiftleri dizayn edildi. Bu mutagenез primerlerinin dizileri aşağıdaki gibidir:

Alanin Mutantı Primerleri:

T130A İleri	5'-agaagtcacgctatgaggcctcactgaatctgacc-3'	(35 mer; Tm:65)
T130A Geri	5'-ggtcagattcagtggcctcatagcgtgacttct-3'	(35 mer; Tm:65)
S235A İleri	5'-ctgcgcctgctcgccgaggacactg-3'	(25 mer; Tm:69)
S235A Geri	5'-cagtgtcctcggcgagcaggcgag-3'	(25 mer; Tm:69)
S364A İleri	5'-tcccggatgggcgcctgcgggctcc-3'	(26 mer; Tm:76)
S364A Geri	5'-ggagcccgaggcgcccatccggga-3'	(26 mer; Tm:76)

Glutamik Asit Mutantı Primerleri:

T130E İleri 5'-gggagaagtcacgctatgaggagtcactgaatctgaccaccaa-3' (43 mer; Tm:68)

T130E Geri 5'-ttggtggtcagattcagtgactcctcatagcgtgacttctccc-3' (43 mer; Tm:68)

S235E İleri 5'-cagctgcgcctgctcgaggaggacactgacagc-3' (33 mer; Tm:71)

S235E Geri 5'-gctgtcagtgctcctcgcagcaggcgcagctg-3' (33 mer; Tm:71)

S364E İleri 5'-gtcccggatgggcgagctgcgggctccc-3' (29 mer; Tm:75)

S364E Geri 5'-cgggagcccgagctcgcccatccgggac-3' (29 mer; Tm:75)

Uygulama

E2F1'in mutant formlarını oluşturmak amacıyla yukarıda belirtilen primer çiftleri ile HotStart DNA Polimeraz (Qiagen Cat.202602) enzimi kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Reaksiyon koşulları:

1X Reaksiyon Tamponu,
0,5 µM final konsatrasyonunda ileri ve geri primerler
1 pmol dNTP
2,5 ünite PFU DNA Polimeraz
50 ng kalıp plazmid
Steril H₂O.

Reaksiyon 50 µl'de kuruldu. Reaksiyon koşulları; ön denatürasyon 95°C'de 5 dakika, 30 döngü olmak üzere 95°C'de 1 dakika, 67°C'de 1 dk, 68°C'de 15 dk, son uzama için 72°C'de 15 dk ve daha sonrasında 4°C'de ∞ olarak belirlendi.

Bu reaksiyon koşulu temel alınarak E2F1'in yukarıda belirtilen bölgelerine yönelik olarak tekli ve kombinasyonel mutantlarını içeren memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu.

3.19. Plazmidlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi

Mutagenesis için mutant primerler E2F1 ekspresyon vektörü ile PZR amplifikasyonuna tabi tutulmuş ve reaksiyon ürünleri mutant plazmitleri seçmek için Dpn-I enzimi ile kesilmiştir. Kullandığımız vektör plazmit GATC dizilerinden G metile vaziyettedir. Bu metillenmiş dizilere spesifik kesim yapan Dpn-I enzimi (Roche 10 742 988 001) metillenmiş yabancı tip vektörü parçalarken in vitro çoğaltılan mutant plazmitleri kesmez.

Dpn-I Enzim Kesimi Reaksiyon Koşulları:

1x Reaksiyon tamponu,

20 µl SDM ürünü plazmid

1 µl Dpn-I enzimi

Steril H₂O

Reaksiyon 50 µl'de kurulmuş ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.20. Dpn-I Kesimi Ürünlerinden Mutant Plazmidlerin Seçimi

Dpn-I enzim kesiminden kurtulan mutant vektörler DH5α'ya transforme edilerek 50 mg/ml konsantrasyondaki Amfisilinli agar petrilere ekim yapıldı. Petriler geceboyu 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan koloniler seçildi ve her biri geceboyu amfisilinli LB sıvı besiyeri ortamında 37°C'de çalkalamalı etüvde çoğaltılarak plazmid izolasyonları gerçekleştirildi.

3.21. E2F1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgelerine Yönelik PZR Reaksiyonu

Beklenen mutasyonları tanımlamak ve doğrulamak için ilgili bölgelerin dizi analizini Sanger yöntemi ile yapıp mutant vektörlerimizi seçtik.

3.22. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

PZR veya enzim kesimi sonrası tüp içerisindeki ürün dışı reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı Invitrogen PZR Pürifikasyon Kiti (250'lik K3100-01) kullanılarak uygulandı.

Uygulama

1. PZR ürününün üzerine 100 µl B3 tamponu eklendi.
2. Pipet ile biraz karıştırıldıktan sonra filtreli tüplere aktarıldı.
3. 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
4. Filtreli tüpün altı boşaltılmadan üzerine 325 µl Yıkama Tamponu eklendi.
5. 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Filtreli tüpün altında biriken dökelti boşaltıldı.
7. 14.000 rpm'de 2 dk. kuru santrifüj yapıldı.
8. Sonra filtreli tüp 1,5 ml' lik ependorf tüplerine alındı.
9. Üzerine 30 µl elüsyon tamponu eklendi.
10. Oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
11. 14.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi ve filtreli tüp atıldı.

3.23. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonları PZR System 9700 (Gene Amp ®) marka Thermal Cyclers kullanılarak aşağıdaki programa göre yapıldı.

3.23.1. Dizileme Reaksiyonu

5X Tampon, Big Dye Terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit-Applied Biosystems), geri primer (3,2 pmol), kalıp DNA ve H₂O konularak final hacmi 10µl olacak şekilde hazırlandı.

3.23.2. Dizileme PZR Programı

Ön denatürasyon 96°C'de 1 dk; denatürasyon, 96°C'de 10 saniye; birleşme, 50°C'de 5 saniye, uzama, 60°C'de 4 dakika ve 25 döngü olacak şekilde ayarlandı. Pürifikasyon işlemine kadar tüpler +4°C'de bekletildi.

3.24. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi

Dizileme reaksiyonu sonrası tüp içerisindeki ürün dışı reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı Etanol- Sodyum Asetat çöktürmesi yöntemiyle gerçekleştirildi.

Uygulama

1. Hazırlanan yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere 2µl 3.2M sodyum asetat (pH:4.6) konuldu.
2. Üzerine 30µl %99 soğuk etanol ilave edildi.
3. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürününün tamamı eklendi ve vortekste karıştırıldı.
4. 20 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. Süre sonunda oda sıcaklığında 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı.
6. Çökelti üzerine 250µl %70 etanol ilave edildi.
7. Oda sıcaklığında 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı.
8. Tüplerin 10-15 dakika karanlıkta kuruması beklenildi.
9. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 25µl formamid ilave edildi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı.
10. Formamid eklenmiş olan dizileme reaksiyonu ürünleri tüp (Applied Biosystems) içerisine alındı.
11. Tüpün ağzı septa (Applied Biosystems) ile kapatıldıktan sonra 95 °C'de 5 dk. denatüre edildi.
12. Buzda 2 dk. bekletildikten sonra ABI Prism dizi analizi cihazına örnekler yüklendi. Daha sonra kapiller (Applied Biosystems), POP-6 polimer (Applied Biosystems), EDTA içeren Buffer (10x) (Applied Biosystems) ile dizi analizi cihazında (ABI 310 Prism) 36 dk. yürütüldü.
13. Örnekler yürütüldükten sonra, ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.
14. Sonuçlar NCBI aracılığıyla E2F1 cDNA dizisi referans alınarak diziler okundu ve mutasyonlar doğrulandı.

3.25. MTT Canlılık/Proliferasyon Testi

Kullanılan Solüsyonlar:

MTT (5 mg/ml): (Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231), belirtilen konsantrasyonda taze olarak PBS içerisinde çözündürüldü ve steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi.

3.25.1 Hücrelerin Ekimi ve FBS ile Muamelesi

Kontrol, yabancı tip ve mutant E2F1 eksprese eden hücreler, hücre sayımı için tripsinize edildi. Her hücre grubu, Thoma lamında sayılarak 3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 6 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri eklenerek 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. 24.cü saat sonunda serumsuz besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyulara %10 serumlu besiyeri eklendi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra MTT protokolü uygulanarak spektrofotometrik ölçümleri ve istatistiksel analizleri gerçekleştirildi.

3.25.2. Hücrelerin MTT ile Muamelesi, Ölçümü ve İstatistiksel Analizi

96 kuyulu kültür kabındaki hücrelere, 100 µl besiyeri varlığında 25 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve 3 saat 37°C' de tutuldu. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO (Sigma) eklendi, 15 dakika çalkalandıktan sonra test 540 nm, referans 690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen verilerin analizleri Prism GraphPad programları kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar normalize edilerek ve ± standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

3.26. İmmünfloresan Sitokimya Yöntemi

Hücre kültürasyonu için 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. 6 kuyucuklu petrilere lamel yerleştirildi (Menzel-Glaser 20x20mm). Sterilliğin sağlanması için gece boyu UV ışık altında bekletildi. Hücre sayımı için hücreler tripsinize edildi ve Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı belirlendi. Kuyu başına bir milyon hücre ekildi.

Kontrol, yabancı tip ve mutant E2F1 eksprese eden HEK293 hücreleri, %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri eklenerek hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile muamele edildi. 24. saat sonunda hücrelerin immünohistokimya boyaması gerçekleştirildi.

Kullanılan Solüsyonlar:

Bloklama Solüsyonu: Lab Vision™ Ultra V Block (Cat. TA-125-UB)

Kapatma Solüsyonu: VectaShield® Mounting Medium For Fluorescence With DAPI (Vector Cat. H-1200)

Metanol: Absolut Metanol (Merck)

Uygulama

1. 6 kuyulu ve tabanında lamel bulunan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı
2. Üzerine 1,5 ml soğuk metanol (Merck) eklenerek -20°C' de 20 dakika fiksasyon yapıldı.
3. Süre sonunda metanol çekilerek uzaklaştırıldı ve 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
4. Lameller, kuyulardan alınarak hücreleri bulunduran yüzey üste gelecek şekilde lamaların üzerine konuldu.
5. Lamellerin etrafı PAP-Pen (Sigma-Aldrich Z377821-1EA) ile çizildi.
6. Bloklama için lamellerin üzerine 100 µl bloklama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika tutuldu.
7. Süre sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve 100 µl primer antikor solüsyonu eklenerek iki saat inkübe edildi. Primer antikor solüsyonu, anti-Ki67 (BD, 556003), antikor sulandırma solüsyonu (Abcam) içerisinde 1:100 oranında sulandırılması ile hazırlandı.
8. İnkübasyondan sonra antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı.

9. Bu işlemden sonra lameller karanlık bir ortama alındı ve işlemler karanlıkta yapıldı.
10. 100 µl sekonder antikor solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat tutuldu. Sekonder antikor solüsyonu, anti-mouse Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch) antikorunun 1:200 oranında PBS içinde sulandırılması ile hazırlandı.
11. Süre sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kere 5' er dakika PBS ile yıkandı.
12. Lameller içerisinde DAPI bulunan kapatma solüsyonu ile lam üzerine kapatıldı.
13. İşaretlenmeler Olympus marka BX61 model floresan mikroskopi aracılığıyla görüntülendi.

3.27. Gerçek Zamanlı PZR Hazırlığı ve PZR Yöntemi

Hedef biyomoleküllerin sadece protein düzeyinde değil mRNA düzeyinde de değişimlerini tanımlamak için Gerçek Zamanlı (Real-Time) PZR gerçekleştirildi.

3.27.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation Kit (Qiagen cat. 11 828 665 001) kullanıldı. Kültüre edilen hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 200 µl PBS içerisinde petriden kaldırıldı. Bu işlemden sonra kitin önerdiği protokol uygulandı.

Uygulama:

1. PBS ile kaldırılan ve tüpe alınan hücrelerin üzerine 400 µl Lizis/Bağlama Tamponu eklendi.
2. 15 saniye vortex yardımıyla karıştırıldı.
3. Bu süspansiyon daha sonra filtreli kolona aktarıldı ve 8,000xg' de 15 saniye santrifükasyon gerçekleştirildi.
4. Santrifüj basamağından sonra her bir tüpün üzerine 100 µl DNase I İnkübasyon Tamponu içerisinde çözülen DNaseI eklendi.
5. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

6. İnkübasyondan sonra tüpün üzerine 500 µl Yıkama Tamponu eklendi.
7. 8,000xg' de 15 saniye santrifükasyon gerçekleştirildi.
8. İkinci yıkama işlemi için yine tüplerin üzerine 500 µl Yıkama Tamponu eklendi.
9. 8,000xg' de 15 saniye santrifükasyon gerçekleştirildi.
10. Kolonların üzerine 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi.
11. Oda sıcaklığında 2 dakika bekledikten sonra 8,000xg' de 1 dakika santrifükasyon işlemi gerçekleştirildi.
12. Toplama tüpünde biriken total RNA'lar cDNA eldesi için -80°C'de saklandı.

3.27.2. cDNA Elde Edilmesi

Total RNA izolasyonundan sonra cDNA kütüphanesi oluşturmak için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche Cat.05 081 955 001) kullanıldı.

Uygulama:

1. 5µl Total RNA, 2µl Random Hekzamer Primer ve 4,4µl H₂O bir tüpe konuldu.
2. 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Tüpün üzerine 4µl 5X Buffer, 0,5µl Protector Rnase İnhibitor, 2µl Deoxynucleotide Mix, 1µl DTT ve 1.1µl Reverse Transcriptase eklendi.
4. 45°C'de 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu.
5. Örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

3.27.3. Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi

Tez çalışmasında incelenen genlerin ekspresyon düzeyi SYBR Green Kit (Qiagen cat. No: 204143) ve LightCycler 480 (Roche) platformunda analiz edildi. Çoğaltılmak istenen hedef genlerin tespiti için genlere özgü primerler kullanıldı. Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan molekül kullanıldı. Göreceli gen ifadesinin normalizasyonu GAPDH geni kullanılarak gerçekleştirildi. Genler için tasarlanan spesifik primerler aşağıdaki gibidir.

Kazpaz 3 Primerleri:

5'-TTGTGGAATTGATGCGTGAT-3' (20 mer; Tm:60)

5'-GGCTCAGAAGCACACAAACA-3' (20 mer; Tm:60)

CREB Primerleri:

5'-GGAGCTTGTACCACCGGTAA-3' (20 mer; Tm:60)

5'-GCATCTCCACTCTGCTGGTT-3' (20 mer; Tm:60)

GAPDH Primerleri:

5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (20 mer; Tm:60)

5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (20 mer; Tm:60)

Gerçek zamanlı PZR yönteminde kullanılan koşullar: 95°C'de 10 dk pre-inkübasyon, 45 döngü olacak şekilde 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 54°C'de yapışma 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye uzama.

Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundan faydalanıldı. PZR reaksiyonunun veriminin yüzde yüz olduğunu varsayan bu metoda göre ifade düzeyleri aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$\Delta\Delta Ct = (C_{t_{hedef}} - C_{t_{ref}})_{\text{örnek}} - (C_{t_{hedef}} - C_{t_{ref}})_{\text{kontrol}} \quad (Ct: \text{cycle threshold})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(C_{t_{hedef}} - C_{t_{ref}})_{\text{örnek}} - (C_{t_{hedef}} - C_{t_{ref}})_{\text{kontrol}}]}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(2^{C_{t_{hedef}}} / 2^{C_{t_{ref}}})_{\text{örnek}}}{(2^{C_{t_{hedef}}} / 2^{C_{t_{ref}}})_{\text{kontrol}}}$$

Formülde de anlaşılabileceği gibi hedef genin Ct'sinin referans genin Ct'sine bölünmesi, örnekler arasındaki değişimlerin normalize edilmesini sağlamaktadır. Böylece, gen ifade düzeyinden kaynaklanmayan olası Ct farklılıkları elimine edilmektedir.

PZR koşumunu takiben, hedeflenen genler dışında bir ürünün çoğalmadığından ve primer dimerlerinin oluşmadığından emin olmak için ‘erime eğrisi analizi’ (melting curve analysis) gerçekleştirildi. Bunun için örnekler, 55°C’den 95 °C’ye kadar saniyede 0,2 °C artan bir ısı yükselmesine tabi tutulurlar. Bu süreçte, PZR ürününün bileşenine bağlı olarak, yaklaşık 75-80 °C aralığında erime eğrileri ortaya çıkmaktadır.

3.28. Sisplatin Sitotoksisite Testi

Sisplatin sitotoksisite testi için 293T, H1299, LNCaP ve PC3 hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatları yabancı tip E2F1 ve E2F1 mutant plazmidler ile ters transfeksiyon işlemine tabi tutuldu. Transfeksiyon işleminden sonra hücreler sisplatin ile muamele edildi.

3.28.1. Ters Transfeksiyon Yöntemi

Yabancı tip ve mutant E2F1 plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldü. Final konsantrasyonu 8 ng/μl olacak şekilde serumsuz besiyeri içerisinde çözüldü. Negatif kontrol olarak salmon spermi kullanıldı. 96 kuyucuklu platelerde her bir plazmid için yatay düzlemdeki her 10 kuyuya 25 μl ilgili plazmidi içeren serumsuz besiyeri eklendi.

Lipofektamin ® Transfeksiyon Solüsyonu (Thermo-Fisher Cat. 18324012) serumsuz besiyerinde final konsantrasyonu 1,2 μl/ 100 μl olacak şekilde sulandırıldı. Plazmidleri daha önce konulan kuyulara bu solüsyondan 25 μl/well şeklinde dağıtıldı.

Plazmid ve lipofektamin içeren plateler oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

İstenilen hücre hatları tripsinize edilerek kaldırıldı. Thoma lamı aracılığıyla hücre sayımı gerçekleştirildi. %10 FBS’li besiyeri içerisinde final konsantrasyonu 100 h/μl olacak şekilde sulandırıldı. Her bir kuyuya bu dilüsyondan 100μl konuldu. Hücreler 24 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li kültür ortamında inkübasyona bırakıldı.

3.28.2. Hücrelere Sisplatin Muamelesi

Transfekte edilen hücrelerin her bir yatay 5 kuyusuna 2 µg/well olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözölen sisplatin verildi. Diğör yatay 5 kuyu kontrol olarak kullanıldı.

3.28.3. Canlılık Testi

Sisplatin muamelesinden sonra hücrelerin canlılığını ölçmek için MTT yöntemi kullanıldı. MTT yöntemi daha önce 3.25.2’de açıklandığı gibi uygulandı.

3.29. Glukoz Alınım Testi

Hücrelerin dış ortamdaki glukoz alım miktarının tespiti için glukoz alım kiti (Cayman-Cell Based Glucose Uptake Assay Kit) kullanıldı.

Uygulama

1. Kontrol, yabancı tip ve mutant E2F1 eksprese eden hücreler, hücre sayımı için tripsinize edildi. Her hücre grubu, Thoma lamında sayılarak 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar olarak 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi.
2. Ertesi gün hücrelerdeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 100 µl glukoz bulunmayan besiyeri ile yıkandı.
3. Her kuyuya 1/100 oranında glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımından 100µl eklendi. Bu aşama ve sonraki aşamalar mümkün olduğunca karanlık ortamda gerçekleştirildi.
4. Hücreler 30 dk. 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li %95 nemli kültür ortamında inkübe edildi.
5. Süre sonunda glukoz analogu içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl cell based buffer ile 2 kez yıkandı.

6. Yıkama sonrasında hücrelerin üzerine 100 µl cell based buffer eklenerek floresan özellikli plate okuyucuda (Thermo Fluoroskan Ascent TM FL Microplate Fluorometer) plate okutuldu. (eksitasyon/emisyon=485/535 nm)

3.30. Kaspaz 3 Aracılı Apoptoz İndüksiyonunun Analizi

Yabanıl tip ve mutant E2F1 proteinlerinin kaspaz 3 apoptotik indeksinin belirlenmesi için Kaspaz-3/CPP32 Kolorimetrik Assay (BioVision Cat.K106-25) kiti kullanıldı.

Uygulama

1. Yabanıl tip ve mutant E2F1 plazmidini devamlı olarak bulunduran HEK293 hücre klonlarından hücre lizatı kitin içinden çıkan lizis tampon ile hazırlandı.
2. 150 µg protein 50µl Hücre Lizis Tamponunun içinde çözüldü.
3. Örnekler 96-well plate'in her kuyusuna bir örnek konulacak şekilde her örnekten üç tekrar hazırlandı..
4. Her bir kuyuda bulunan lizatının üzerine 10 mM DTT içeren 50µl 2X Reaksiyon bufferı eklendi.
5. Her bir kuyuya 4mM DEVD-pNA substratı eklendi.
6. 37°C'de bir buçuk saat inkübe edildi.
7. ELISA plate okuyucu'da 405 nm'de okutuldu.
8. İstatistiksel Analizleri yapıldı.

3.31. Grafikler ve İstatistiksel Analizler

Western Blot yönteminde elde edilen sonuçlar İmage J programı ile analiz edildi. Grafikler, GraphPad Prism programı ile oluşturuldu. İstatistiksel analizler yine GraphPad Prism programı aracılığıyla yapıldı.

BULGULAR

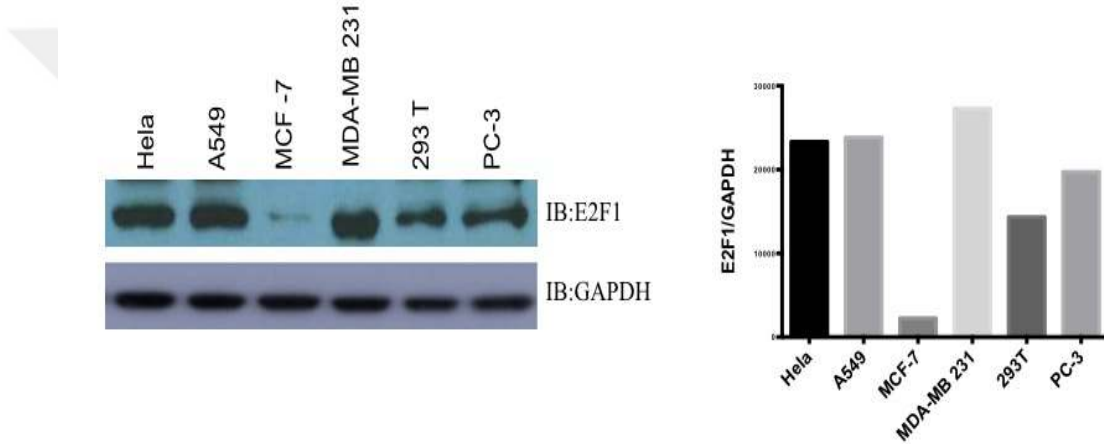
Hücre proliferasyonu sürecinde önemli rol oynayan E2F1'in her zaman her şartta aktif olmayacağını ve dolayısıyla bu proteinin post-translasyonel modifikasyonla düzenlenmesi gerektiğini öngördük. İnsan E2F1 aminoasit dizisini biyoinformatik olarak incelediğimizde, üç adet mükemmel derecede korunmuş konsensus PKA fosforilasyon motifi (RXXS/T veya RRXS/T) barındırdığını belirledik (Şekil 4.1). Bu motiflere göre, potansiyel PKA fosforilasyon bölgeleri RYET₁₃₀, RLLS₂₃₅ ve RMGS₃₆₄ dizileri içerisinde yer almaktadır. Ancak, bu dizilerin bir proteinde bulunması mutlaka PKA tarafından fosforile edileceği anlamına gelmez. E2F1'in, post-translasyonel düzenlenmesinde, PKA'nın rolü olup olmadığını belirlemek adına, bir dizi biyokimyasal ve genetik çalışmalar yaptık. Bu bağlamda ilk olarak insan E2F1 geninin ökaryotik ekspresyon vektörünü oluşturduk ve fosforilasyonunu gösterdik. Ardından bu bölgeye spesifik oluşturulan mutasyonların E2F1'in fonksiyonuna olan etkilerini test ettik.

**MALAGAPAGGPCAPALEALLGAGALRLLD
SSQIVIIISAAQDASAPPAPTGPAAPAAGP
CDPDLLEFATPQAPRPTPSAPRPALGRPP
VKRRLDLETDHQYLAESSGPARGRGRHPG
KGVKSPGEKS**RYET**₁₃₀SLNLTTKRFELELLS
HSADGVVDLNWAAEVLKVQKRRIYDITNV
LEGIQLIAKKSKNHIQWLGSHTTVGVGGR
LEGLTQDLRQLQESEQQLDHLMNICTTQL
RLLS₂₃₅EDTDSQRLAYVTCQDLRSIADPAE
QMVMVIKAPPETQLQAVDSSSENFQISLKS
KQGPIDVFLCPEETVGGISPGKTPSQEVT
SEEENRATDSATIVSPPPSSPPSSLTTDP
SQSLLSLEQEPLLS**RMGS**₃₆₄LRAPVDEDRL
SPLVAADSLLEHVREDFSGLLPEEFISLS
PPHEALDYHFGLEEGEGIRDLFDCDFGDL
TPLDF**

Şekil 4.1. E2F1 aminoasit dizisinde bulunan muhtemel PKA fosforilasyon bölgeleri

4.1. Çeşitli İnsan Kanser Hücre Hatlarında Endojen E2F1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

Proje çalışmamızda ilk olarak elimizde mevcut bulunan hücre hatlarının endojen E2F1 ekspresyonlarına Western Blot yöntemiyle baktık. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi farklı hücre hatlarında farklı E2F1 ekspresyonları görülmektedir. En yüksek E2F1 ekspresyonunu metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB231 hücrelerinde gördük. Bu durum, E2F1’in bu hücre hattının proliferasyon hızı ve metastatik kapasitesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



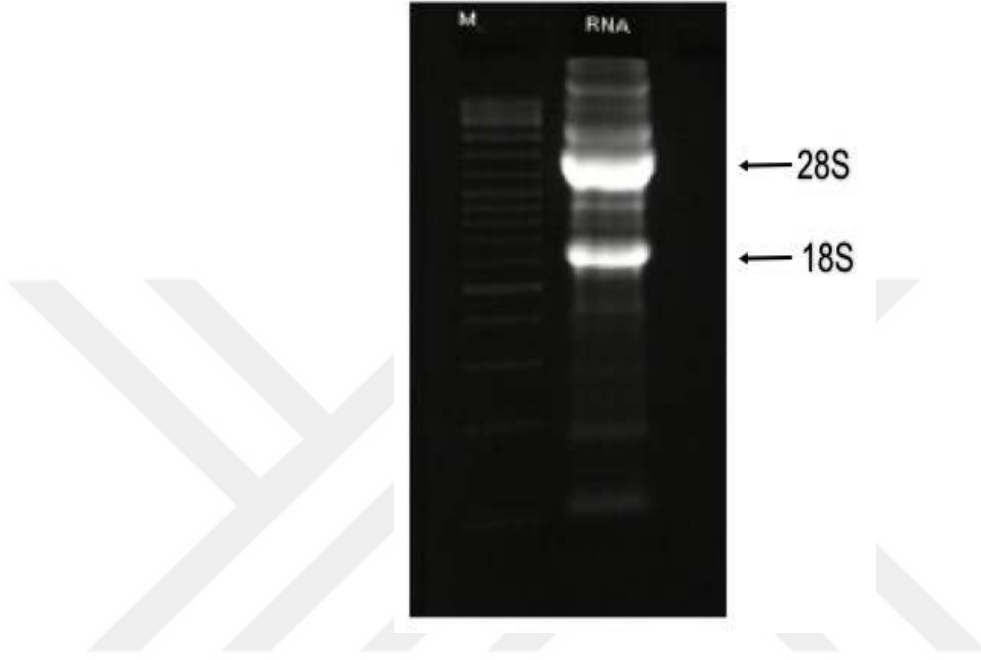
Şekil 4.2. Western Blot yöntemi ile hücre hatlarında E2F1 ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi. Blotlar, E2F1 ve GAPDH antikorları ile işaretlenip, E2F1 ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için her bir örneğin E2F1 bant intensitesi, aynı blot üzerindeki GAPDH bant intensitesine oranlandı. Bant intensitelerinin belirlenmesinde ImageJ, grafik oluşturulmasında GraphPad Prism yazılımlarından faydalandı. (IB: İmmünoblot)

4.2. İnsan E2F1 Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

Altı farklı insan hücre hattında yaptığımız Western Blot analizi ile en yüksek E2F1 ekspresyonunun MDA-MB231 hücre hattında olduğunu gözlediğimizden insan E2F1 ekspresyon vektörünün oluşturulması için mRNA kaynağı olarak bu hücre hattından faydalandık. Bunun için öncelikle MDA-MB231 hücre hattından cDNA kütüphanesi elde ettik, ardından E2F1 cDNA’sını çoğaltıp pcDNA3.1B plazmid iskeleti içerisine klonladık.

4.2.1. MDA-MB 231 Hücrelerinden RNA Eldesi

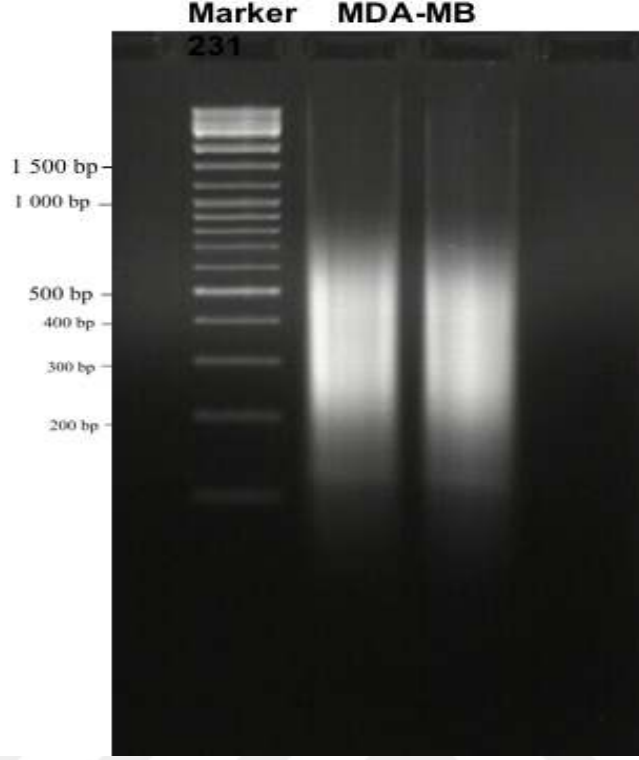
cDNA kütüphanesi oluşturmak amacıyla kullanılacak total RNA, MDA-MB 231 hücre hattından izole edilip RNA örnekleri agaroz jelde yürütüldü. Şekil 4.3’de, RNA agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.3. RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA’ların görüntülenmesi.MDA-MB 231 hücrelerinden elde edilen total RNA’nın %1,5 agaroz jelde gösterilmesi. Agaroz jel görüntüsü üzerinde, 18S ve 28S RNA bantları işaretlenmiştir.

4.2.2. MDA-MB 231 Hücrelerinden cDNA Elde Edilmesi

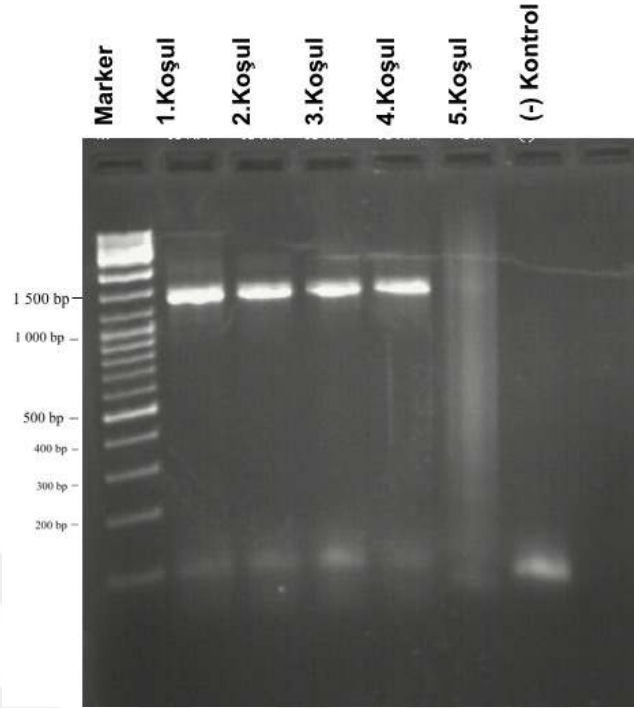
MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen RNA kullanılarak, cDNA kütüphanesi elde edildi ve reaksiyon ürünü %1 agaroz jelde yürütüldü. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. MDA-MB 231 hücrelerinden elde edilen cDNA kütüphanesinin %1 agaroz jelde gösterilmesi. Agaroz jel üzerinde fragment uzunluklarını gösteren marker işaretlenmiştir.

4.2.3. cDNA Kütüphanesi Kullanılarak E2F1 cDNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Amplifiye Edilmesi

MDA-MB-231 cDNA kütüphanesi kullanılarak, yöntemler bölümünde belirtilen primerlerle E2F1 cDNA'sı, 5 farklı polimeraz zincir reaksiyon koşulunda amplifiye edildi. Şekil 4.5'de, elde edilen PZR ürünlerinin %1 agaroz jelde yürütülme sonucu verilmiştir. Buna göre, denediğimiz beş farklı koşulun dördünde, olması gerektiği gibi 1334 nükleotid uzunluğundaki E2F1 cDNA'sını çoğaltabildik.



Şekil 4.5. PZR yöntemi ile E2F1 cDNA amplifikasyonunun %1 agaroz jelde gösterilmesi. PZR koşulunun optimizasyonu için, 5 farklı PZR şartı denendi. (-) kontrol, primerlerin bulunduğu fakat cDNA kütüphanesinden kalıp DNA eklenmemiş örnek.

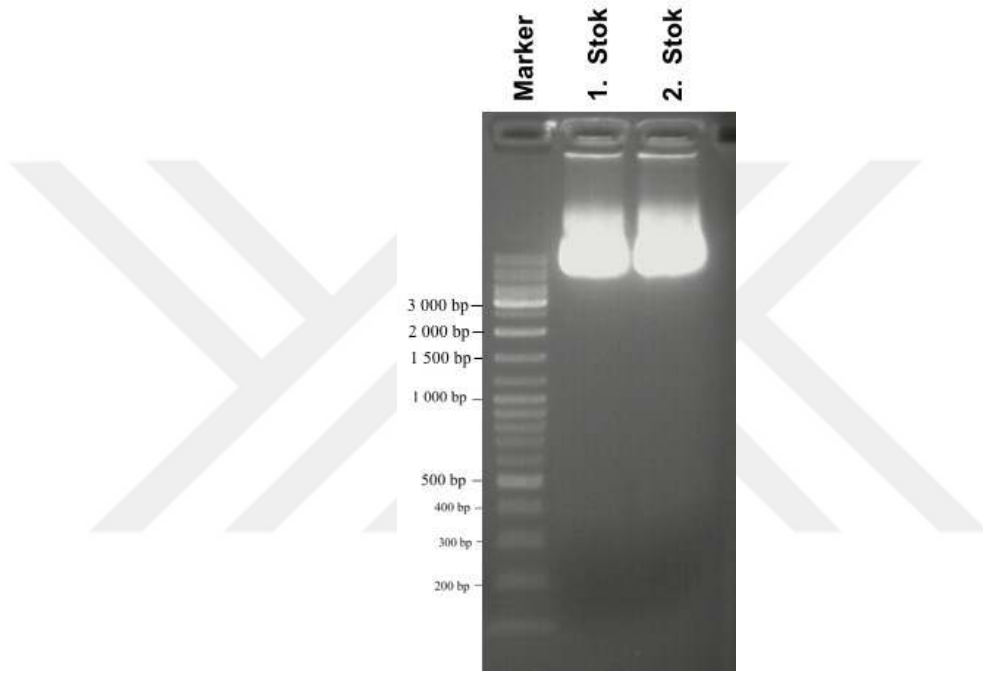
4.2.4. PZR ile Amplifiye Edilen E2F1 Geninin DNA Dizi Analizi İle Doğrulanması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile amplifiye edilen E2F1 geninin DNA dizi analizi ile doğrulanması yapıldı (Şekil 4.6).

4.2.5. pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörü ve Çoklu Klonlama Bölgesi

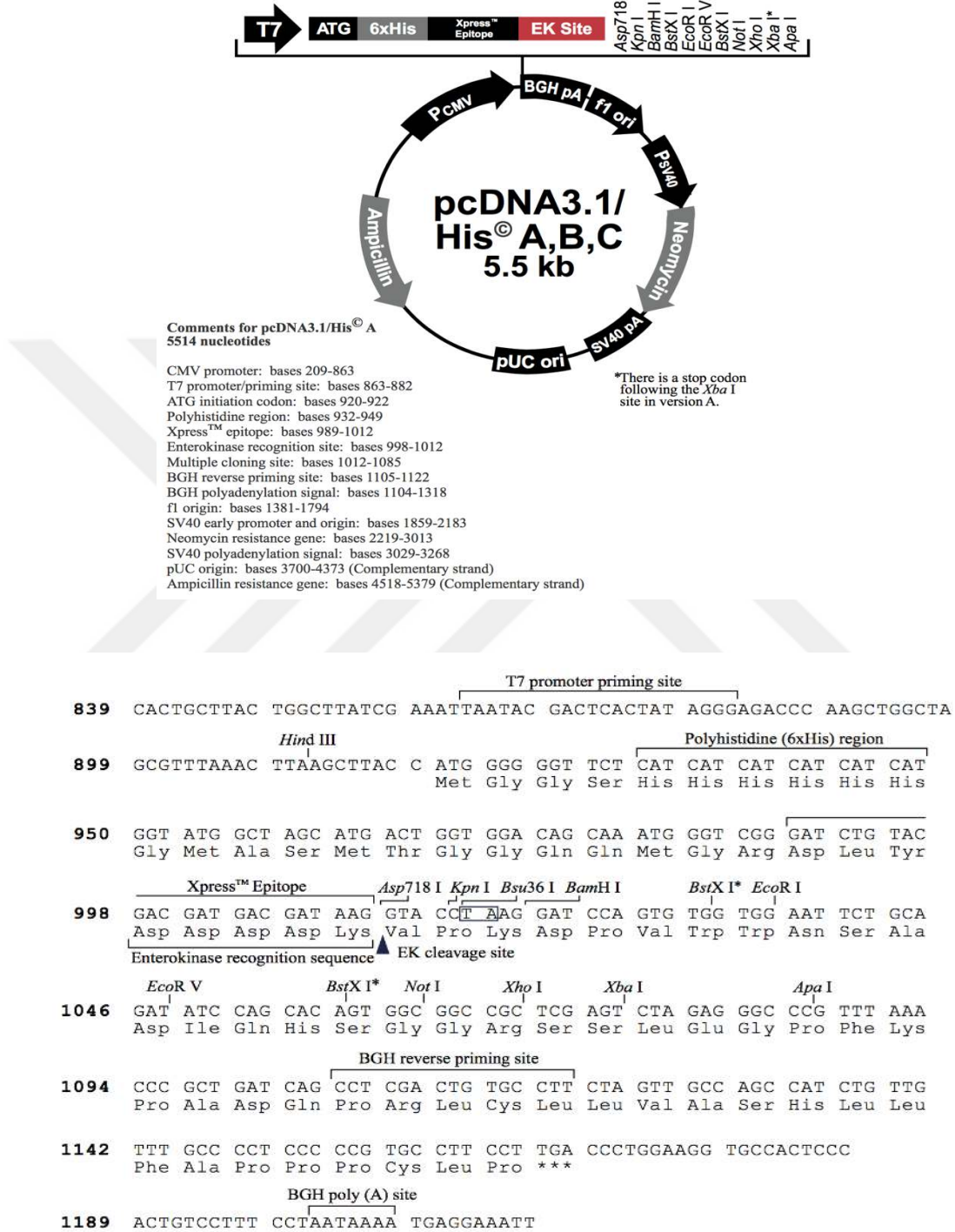
4.2.5.1. Stok pcDNA3.1(B) plazmidinin kontrol edilmesi

Elimizde mevcut olan içerisine insan E2F1 genini klonlamayı planladığımız pcDNA3.1(B) plazmidinin intaktlığı kontrol edildi. Stokta bulunan plazmid %1'lik agaroz jelde yürütülerek yürüme paterni incelendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Mevcut stok pcDNA3.1(B) plazmidlerin %1 agaroz jelde gösterilmesi. pcDNA plazmidinin agaroz jelde yürütülmesi sonucunda, yapısal bütünlüğünü koruduğunu gösterir şekilde bant görünimleri elde edilmiştir.

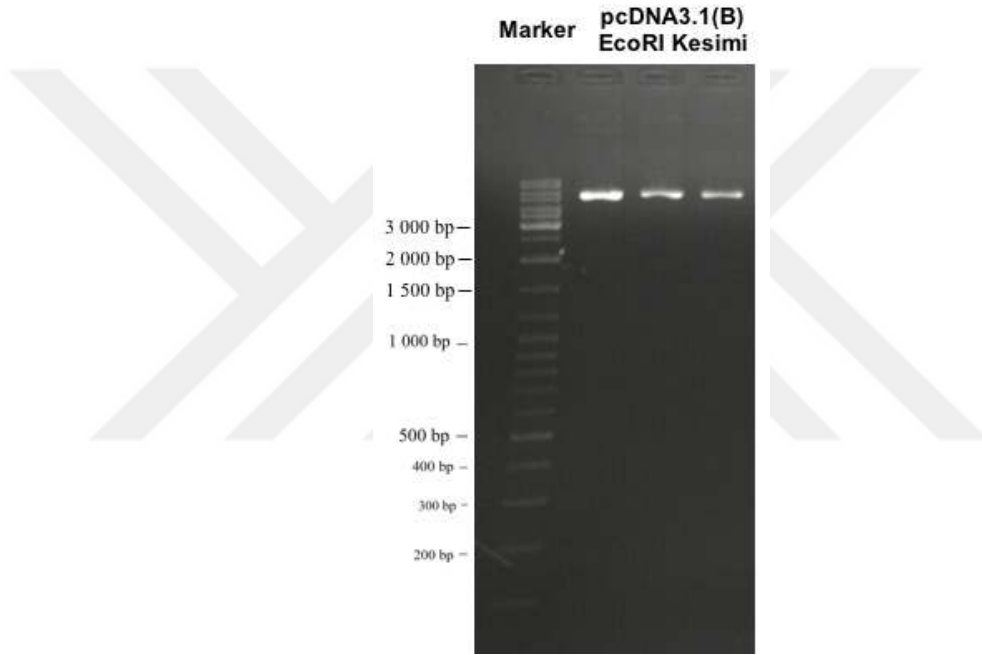
4.2.5.2.pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörünün ve Çoklu Kesim Bölgesinin Haritası



Şekil 4.8. Ekspresyon vektörünün ve içerdği çoklu kesim bölgesinin haritası . pcDNA3.1B plazmidinin haritası ve enzim kesim bölgeleri Thermo Fisher kullanma kılavuzundan alınmıştır. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V38520>

4.2.6. pcDNA3.1(B) Ekspresyon Vektörünün Klonlama İşlemi İçin Hazırlanması

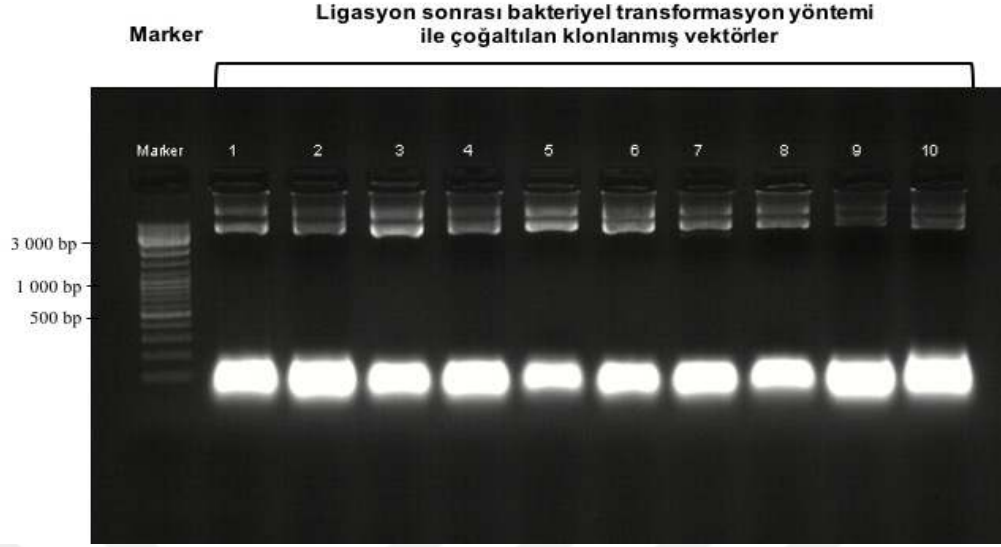
%1'lik agaroz jelde yürütölüp bütönlüğünü koruduğundan emin olunan ve E.Coli'nin DH5 α suşuna transforme edilip çoğaltılan pcDNA3.1(B) plazmidi konvansiyonel plazmid izolasyon yöntemi ile elde edildi, EcoRI enzimi ile kesildi (Şekil 4.9) ve CIAP (Calf İntestin Alkalen Fosfataz) ile plazmid uçlarındaki fosfatlar uzaklaştırıldıktan sonra ligasyon için hazır hale getirildi.



Şekil 4.9. E.coli DH α 5 suşunda çoğaltılıp izole edilen pcDNA3.1(B) plazmidinin EcoRI ile kesilmiş formunun %1 agaroz jelde gösterilmesi. Enzim kesimine uğratılmış plazmid lineer hale geldiği için, tek bant görünümü elde edilmiştir.

4.2.7. Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektörlerinin Bakteriye Aktarımı ve Çoğaltılması

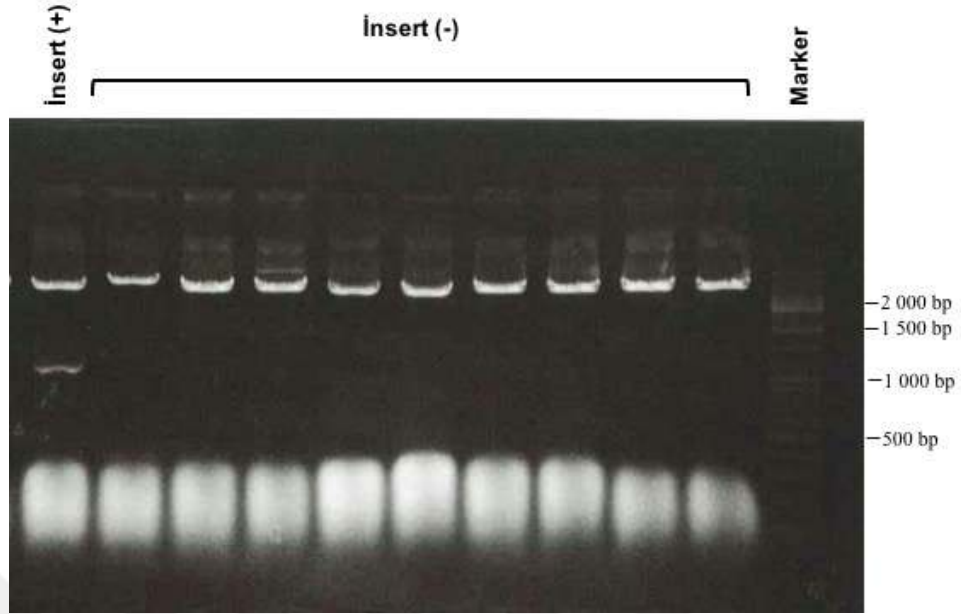
Vektör ve E2F1 cDNA'sının EcoRI kesim ürünleri T4 DNA Ligaz ile ligasyona tabii tutuldu. Ligasyon sonrası oluşan plazmidler E.coli DH α 5 suşuna aktarıldı. Çoğaltılan plazmidler konvansiyonel izolasyonla elde edilip %1 agaroz jelde görüntölendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ligasyon sonrası E2F1 cDNA insertünü içeren vektörlerin % 1 agaroz jelde görüntülenmesi. E2F1 cDNA'sı ve pcDNA3.1B vector iskeletinin ligasyon reaksiyonunun %1 agaroz jelde gösterilmesi sonucunda bütünlüğünü korumuş (intakt) plazmid yapılarının agaroz jel görüntüsü

4.2.8. Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektörlerinin Belirlenmesi

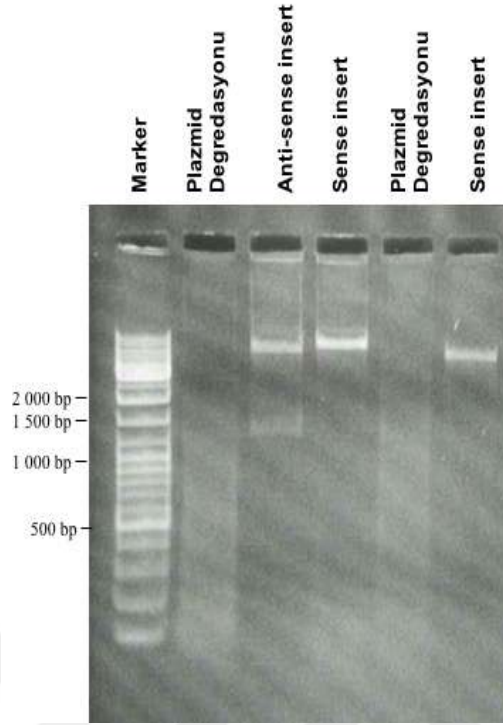
Ligasyon sonrası bakteriyel transformasyon aracılığıyla çoğaltılmış plazmidler EcoRI ile kesildiğinde E2F1 cDNA'sı ile uyumlu (1334bp uzunlukta) bantlar %1 agaroz jelde belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Ligasyon sonrası EcoRI enzim kesimi ile kontrolü. Ligasyon ürünü ile transforme edilmiş bakterilerden izole edilen plazmidler, EcoRI enzimi ile kesime tabi tutulup, kesim ürünleri agaroz jelde yürütüldü. İnsert(+), 1334bp uzunluğundaki E2F1 bandının görüldüğü; insert(-) 1334bp uzunluğundaki bandın görülmediği örnekler.

4.2.9. E2F1 cDNA'sı Klonlanmış pcDNA3.1(B) Vektöründe İnsert Yönünün Belirlenmesi

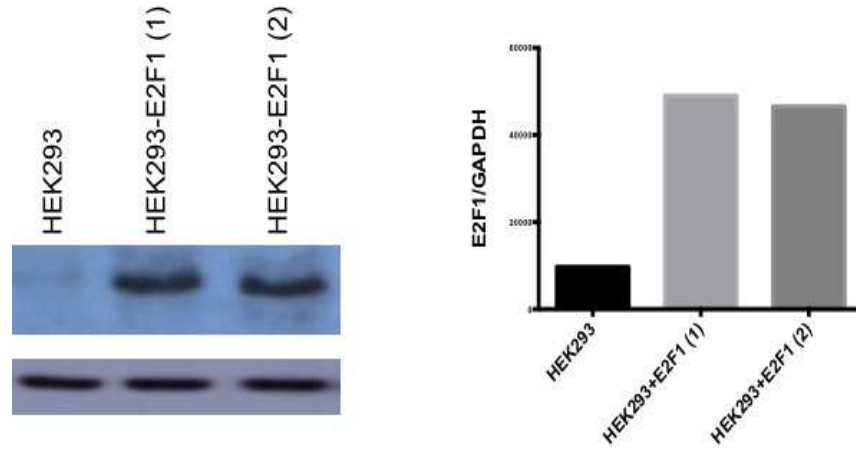
E2F1 cDNA'sı EcoRI fragmenti olarak klonlandığı için teorik olarak bu reaksiyondan hem anlamlı (sense) hem de anlamsız (anti-sense) yönde klonlama mümkündür. Bu ihtimal göz önüne alındığında klonlamanın yönünü belirlemek için XhoI enzimi kullanıldı. Çünkü, plasmidin 1221. ve E2F1 cDNA'sının 1243. pozisyonunda XhoI kesim bölgesi vardır. Anlamsız oriyantasyonda ligasyon yapan insert bu kesimden 1305 baz çifti uzunluğunda bant oluşturmaktadır. Bu iş için EcoRI kesimi ile insert varlığını gösterdiğimiz insert içeren örnekler XhoI ile kesildi. Kesim örnekleri % 2 agaroz jelde yürütülüp görüntülendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. pcDNA3.1(B) vektörüne klonlanan insan E2F1 cDNA'sının doğru oryantasyonunun belirlenmesi. pcDNA3.1(B) vektörüne klonlanan insan E2F1 cDNA'sını anlamlı (sense) ve anlamsız (anti-sense) oryantasyonda bulunduran plazmidlerin XhoI ile kesiminden elde edilen fragmentlerin %2 agaroz jeldeki görüntüsü

4.3. İnsan E2F1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

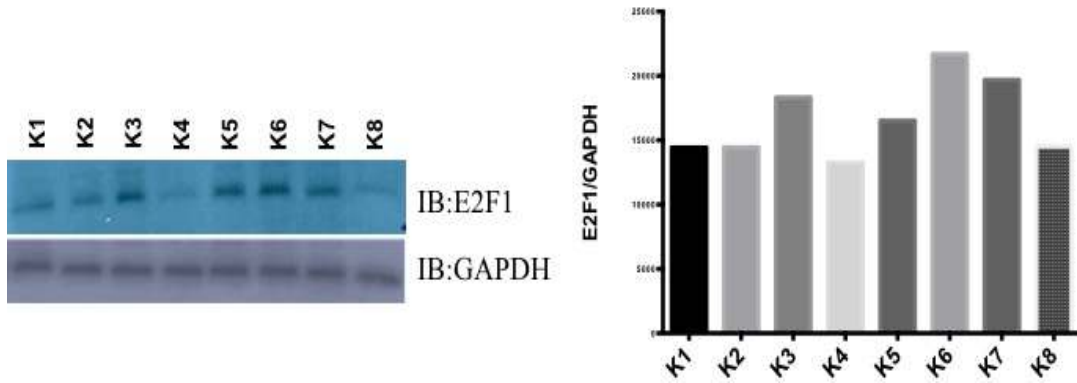
İnsan E2F1 cDNA'sının pcDNA3.1(B) vektörüne klonlanmasının ardından anlamlı (sense) vektörden protein ekspresyonunun olup olmadığının gösterilmesi gereklidir. Bunun için konvansiyonel plazmid izolasyonu ile ekspresyon vektörü yüksek konsantrasyonda elde edildi. Elde edilen plazmidler HEK293 hücrelerine transfekte edildi ve 72 saat sonra vektör bulunduran ve bulundurmeyan hücrelerden lizat toplanarak western blot analizi yapıldı. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi klonlanan vektörler başarılı bir şekilde E2F1 protein ekspresyonu sağlamaktadır.



Şekil 4.13. HEK293 hücrelerinde insan E2F1 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. Üst panel E2F1, alt panel GAPDH işaretlemesi. E2F1 bant intensitesi, aynı blot üzerindeki GAPDH bant intensitesine oranlandı. Bant intensitelerinin belirlenmesinde ImageJ, grafik oluşturulmasında GraphPad Prism yazılımlarından faydalandı.

4.4. İnsan E2F1 Yüksek Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hatlarının Oluşturulması ve Seçilmesi

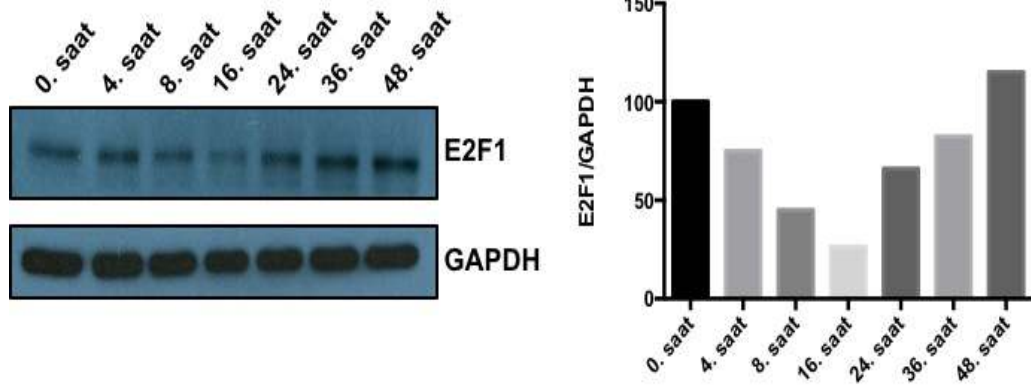
Yarattığımız yabancıl tip E2F1 ekspresyon vektöründen eşit seviyede ekspresyon gösteren kolonileri saptamak için tek koloni seçimi gerçekleştirildi. Tek hücreden koloni oluşturan hücreler petriye alındı. Tek hücreden köken alan ve yeterli sayıya gelen hücreler pasajlandı ve ikinci petrinin ertesi gün lizatı alındı. Farklı hücrelerden köken alan hatlarda E2F1 ekspresyon seviyesi Western Blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Tek koloniden oluşan HEK293-E2F1 hücre hatlarındaki E2F1 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. E2F1 ekspresyon seviyeleri, aynı blot üzerindeki GAPDH ekspresyon seviyelerine oranlanmıştır. (IB:İmmunoblot, K.Koloni)

4.5. Yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 (K6) Hücrelerde Forskolin Muamelesi ile Zamana Bağlı E2F1 Protein Düzeyinin Belirlenmesi

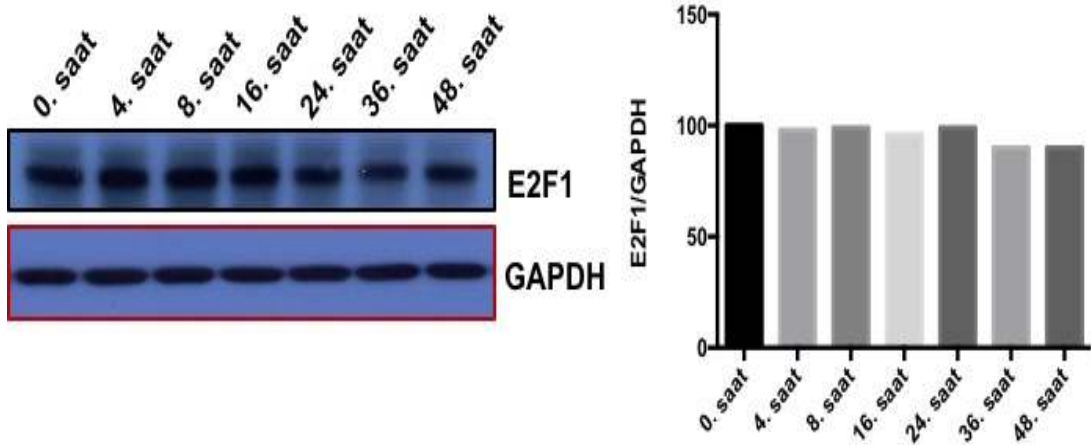
Forskolin, Hint Kolyoz bitkisinden izole edilen bir diterpenoid olup, hücre içi cAMP miktarını arttırarak PKA aktivite artışına neden olmaktadır (Alasbahi ve Melzig 2012). PKA aktivitesinin, E2F1 ile stabil transfeksiyona uğratılmış HEK293 hücrelerinde E2F1 ekspresyon seviyesine olan etkilerini belirlemek için, hücreler farklı süreler boyunca Forskolin ile muamele edilip E2F1 ekspresyon seviyesi western blot ile incelendi. Bunun için, öncelikle kültür kabını %70 oranından kaplayan transfekte HEK293 hücreleri, hücre sinyalizasyonunu minimum düzeye çekmek amacıyla serum bulunmayan ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler literatürde belirtilen 10 μ M final konsantrasyonunda olacak şekilde forskolin ile muamele edildi. Hücrelerin 0. saatte, 4., 8., 16., 24., 36. ve 48. saatte lizatları alındı. Bu çalışmanın sonucuna göre 4. saatte E2F1 seviyesi azalmaya başlarken, en düşük seviye 16. Saatte görülmektedir (Şekil 4.15). Bu sonuç bize, forskolin ile aktive edilen yolağın E2F1 degradasyonuna yol açtığını düşündürmüştür.



Şekil 4.15. HEK293+E2F1 (K6) hücrelerinde zamana bağlı forskolin muamelesinde E2F1 düzeylerinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. Farklı süreler boyunca forskoline tabi tutulan hücrelerden toplanan lizatlarda E2F1 işaretlemesi ve aynı blotlarda GAPDH işaretlemesi yapıp, E2F1 sinyal intensiteleri GAPDH sinyallerine oranlanarak normalizasyon sağlanmıştır.

4.6. PKA İnhibitörü'nün Forskolin Aracılı E2F1 Degradasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

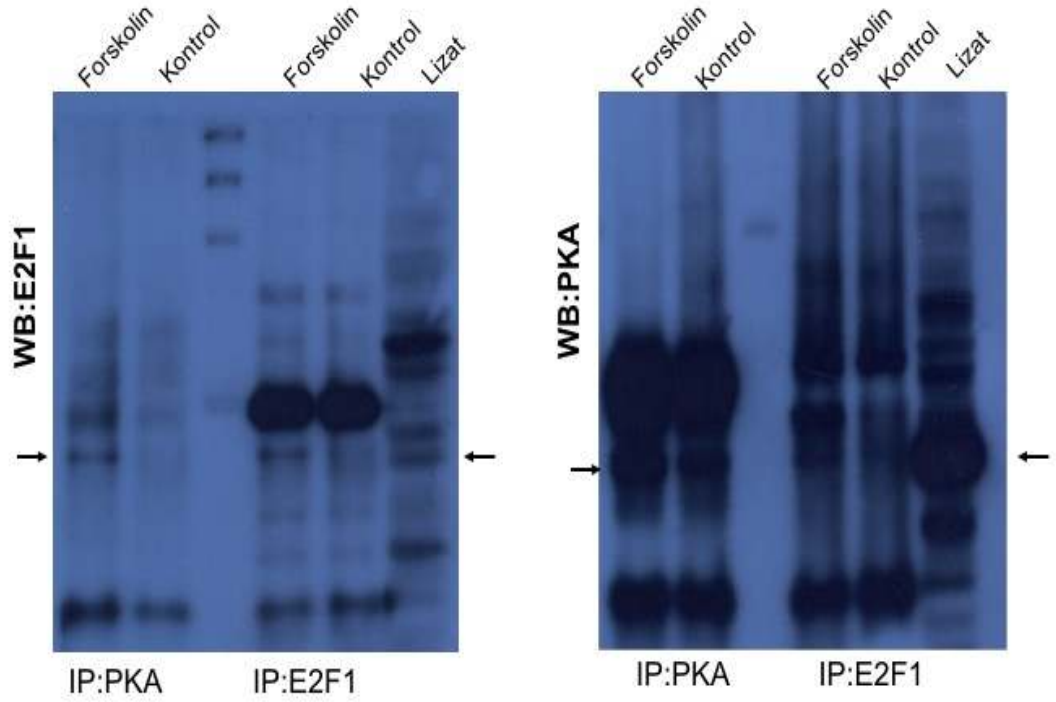
Forskolin muamelesinin transfekte HEK293 hücre hatlarında E2F1 seviyesi üzerine gösterdiği etkinin PKA aracılığıyla olup olmadığını anlamak için aynı deney PKA İnhibitörü varlığında gerçekleştirildi. Belirtilen saatlerde alınan hücre lizatlarındaki E2F1 protein seviyeleri western blot yöntemiyle gösterildi. PKA inhibitörünün, forskolinin neden olduğu E2F1 protein miktarı değişiminin engellendiği gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. HEK293+E2F1 (K6) hücrelerinde zamana bağlı PKA İnhibitörü varlığındaki forskolin muamelesinin E2F1 düzeyleri üzerine etkisinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. PKA inhibitörü varlığında farklı süreler boyunca forskoline tabi tutulan hücrelerden toplanan lizatlarda E2F1 işaretlemesi ve aynı blotlarda GAPDH işaretlemesi yapıp, E2F1 sinyal intensiteleri GAPDH sinyallerine oranlanarak normalizasyon sağlanmıştır.

4.7. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Yapan HEK293 Hücrelerinde E2F1 ve PKA'nın Birbirine Bağlanmasının İmmünpresipitasyon ile Gösterilmesi

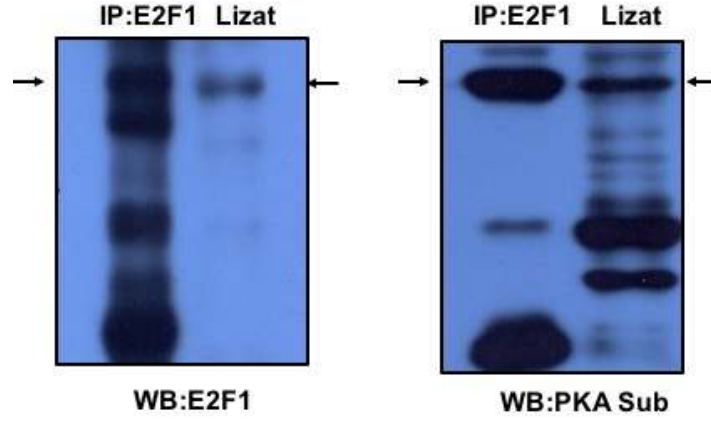
Proteinlerin fosforile olabilmeleri için birbirleri arasında direkt bir interaksiyon olması gerekmektedir. Bu nedenle birbirine bağlanan iki protein immünpresipitasyon ve proteinlere spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot aracılığıyla gösterilebilmektedir. Bu nedenle ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 (K6) hücrelerinde E2F1 antikorunu aracılığıyla immünpresipitasyon gerçekleştirildi. Örnek yürütülüp, PVDF membrana transfer edildikten sonra PKA antikorunu ile işaretlendi. Aynı şekilde aynı hücre lizatlarından PKA antikorunu aracılığıyla immünpresipitasyon gerçekleştirilerek bu sefer de E2F1 antikorunu ile işaretlendi. Proteinlerin pozisyonları yanlarında yürütülen lizatların işaretlenmesi ve moleküler büyüklükleri aracılığıyla doğrulandı. E2F1-PKA bağlantısı Şekil 4.17'de görülmektedir.



Şekil 4.17. E2F1 ve PKA'nın fiziki olarak bağlanmasının immünopresipitasyon ve Western Blot yöntemleri aracılığıyla gösterilmesi Kontrol: Forskolin muamelesi yapılmamış, Forskolin: bir saat Forskolin muamelesi yapılmış hücrelerden elde edilen immunpresipitasyon örnekleri, Lizat: İmmunpresipitasyon yapılmamış hücre lizatu, IP: İmmünopresipitasyon, WB: Western Blot

4.8. E2F1'in PKA Tarafından Fosforile Edilmesinin Gösterilmesi

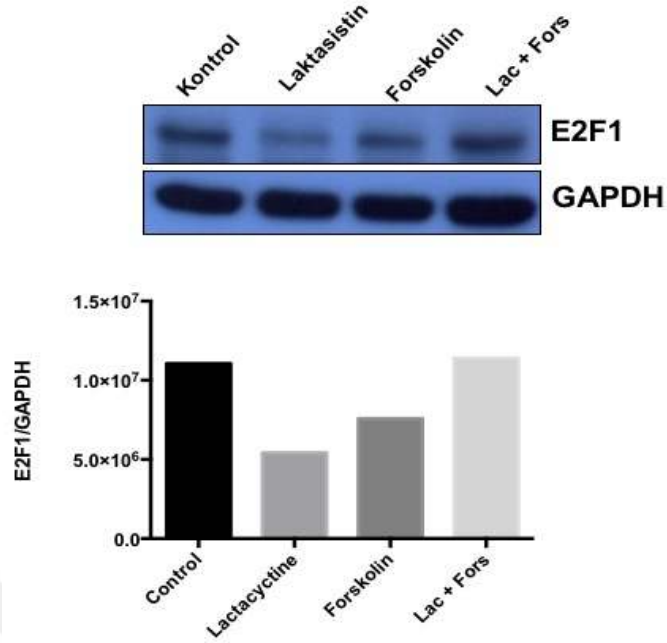
E2F1 ve PKA'nın fiziki olarak birbirine bağlandığını gösterdikten sonra PKA'nın *in vitro* şartlar altında E2F1'i fosforile edip etmediğinin gösterilmesi gerekirdi. Bu amaçla immünopresipitasyon yöntemi ile çöktürülen E2F1 proteinleri ve ticari olarak satın alınan PKA katalitik alt ünitesi *in vitro* kinaz reaksiyonuna tabi tutuldu. Fosforilasyon reaksiyonu sonrası proteinler SDS-PAGE'de yürütülüp PVDF membrana aktarıldı. Membrana aktarılan proteinler PKA'nın fosforile ettiği substratlara spesifik olan antikor ile işaretlendi. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi aktif PKA enzimi yabancı tip E2F1'i fosforile etmektedir.



Şekil 4.18. E2F1'in PKA tarafından fosforile edilmesinin *in vitro* kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi Sol panel *in vitro* kinaz reaksiyonunun E2F1 işaretlemesini, sağ panel PKA sübstrat işaretlemesini göstermektedir. IP: İmmünopresipitasyon, WB: Western Blot

4.9. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hattında Laktasistin (Proteozom İnhibitörü) Varlığında Forskolin Muamelesinin E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Forskolin muamelesi sonrası PKA aracılı E2F1 seviyesindeki düşme, PKA tarafından fosforilasyonu sonrası E2F1'in yıkıldığını göstermektedir. Bahsedilen bu degradasyonun proteazom aracılığıyla olup olmadığını anlamak için, ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren hücre hattında Laktasistin (proteazom inhibitörü) varlığında sekiz saat forskolin muamelesi gerçekleştirildi. Sekizinci saat sonunda hücrelerden elde edilen lizattan E2F1 seviyeleri Western Blot yöntemi ile belirlendi. Şekil 4.19'da gösterildiği gibi proteazom inhibitörü PKA fosforilasyonuna bağlı gözlenen E2F1 degradasyonunu engellemektedir.

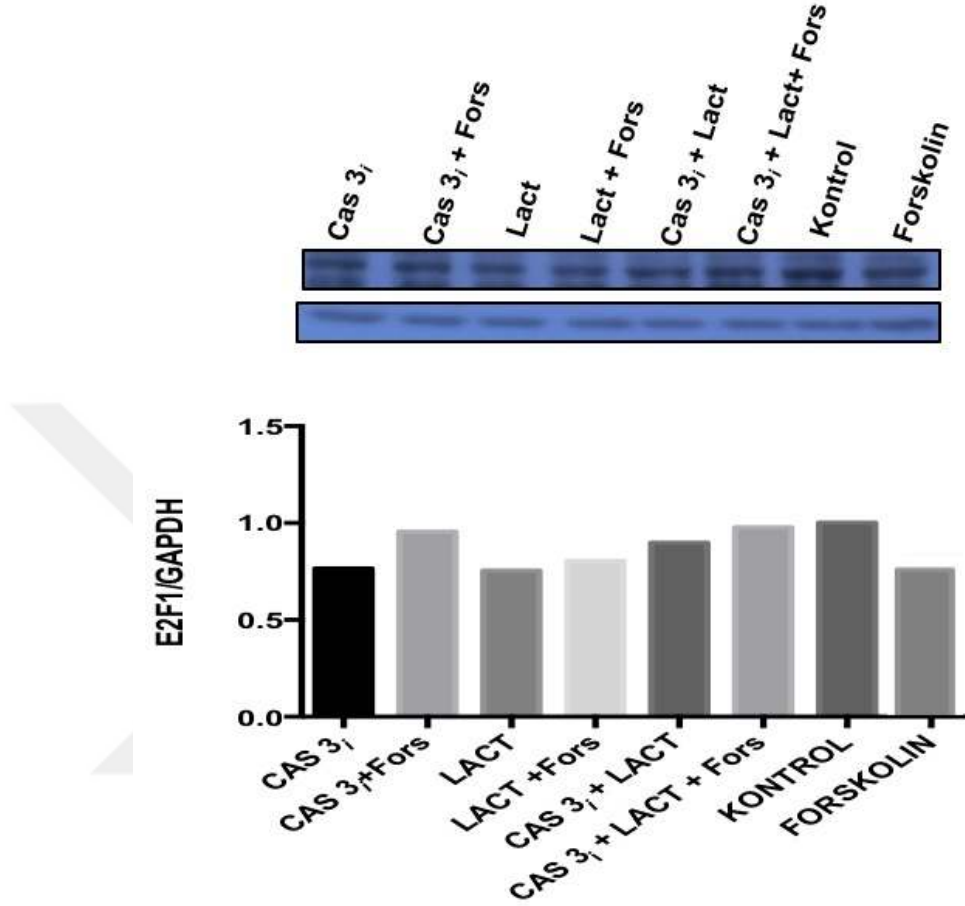


Şekil 4.19. Laktasistin ve Forskolin varlığında E2F1 protein seviyesindeki değişimin western blot yöntemiyle gösterilmesi. Forskolin ve/veya Laktacycline'e sekiz saat boyunca tabi tutulan hücrelerden toplanan lizatlarda E2F1 işaretlemesi ve aynı blotlarda GAPDH işaretlemesi yapıp, E2F1 sinyal intensiteleri GAPDH sinyallerine oranlanarak normalizasyon sağlanmıştır.

4.10. Ektopik E2F1 Ekspresyonu Gösteren HEK293 Hücre Hattında Laktasistin (Proteazom İnhibitörü) ve Kaspaz-3 İnhibitörü Varlığında Forskolin Muamelesinin E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Laktasistin (Proteazom İnhibitörü) varlığında, forskolin muamelesinin neden olduğu E2F1 protein seviyesinde azalmanın görülmemesi, PKA'nın proteazom üzerinden E2F1'in yıkımına neden olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan sadece Laktasistin varlığında E2F1 seviyesindeki düşme şaşırtıcıdır. Proteazom tarafından degradasyona uğrayan ve E2F1'in yıkımından da sorumlu başka bir ara molekül olduğunu akıllara getirmektedir. E2F1'in protein sekansına bakıldığında C'-terminal bölgesinde DLFD ve DFGD motiflerinin olduğu görülmektedir. Bu motifler kaspaz 3 için kesim noktalarıdır. E2F1'in kaspaz-3 tarafından da kesilip kesilmediğini anlamak için forskolin muamelesini kaspaz 3 inhibitörü varlığında yaptık. Forskolin, Laktasistin ve Kaspaz 3 inhibitörü varlığında sekizinci saat E2F1 protein miktarları değerlendirildi. Laktasistin ve Kaspaz 3 inhibitörü varlığında forskolin

muamelesindeki PKA aracılı E2F1 protein yıkımının engellendiği belirlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Laktasistin, Forskolin ve Kaspaz 3 İnhibitörü varlığında E2F1 protein seviyesindeki değişimin western blot yöntemiyle gösterilmesi. Sekiz saat boyunca Forskolin, Laktacycline ve Kaspaz 3 İnhibitörüne tek tek veya kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerden toplanan lizatlarda E2F1 işaretlemesi ve aynı blotlarda GAPDH işaretlemesi yapıp, E2F1 sinyal intensiteleri GAPDH sinyallerine oranlanarak normalizasyon sağlanmıştır.

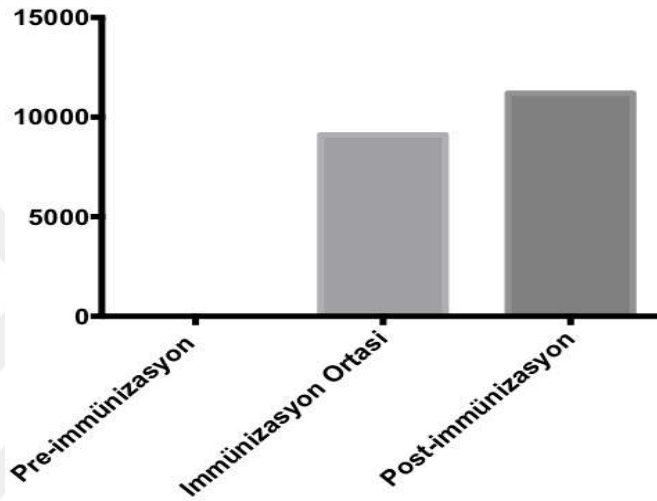
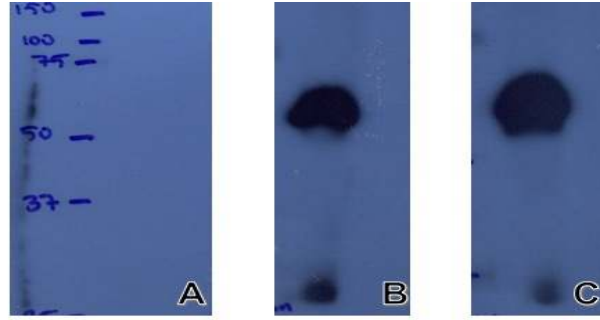
4.11. Monoklonal E2F1 Primer Antikor Yapılması

Primer antikor olarak kullanılacak E2F1'e karşı oluşturulan IgG yapısındaki peptidleri üreten hücreleri oluşturmak için ilk olarak Balb/c türü fare ticari olarak sentezlettiğimiz peptid ile immünizasyona tabi tutuldu. İmmünizasyon sonrası oluşan farenin serumunda bulunan Anti-E2F1 IgG yapıları western blot analizi ile test edildi.

4.11.1 İmmünizasyon Sonrası Oluşan Anti-E2F1 IgG Yapılarının Belirlenmesi

İmmünizasyon işleminin başında, ortasında ve de bitiminde Balb/c farenin kuyruğundan kan alındı. Heparinli tüpe alınan kandan santrifügasyon işlemi ile serum elde edildi. Ticari olarak satın alınan ve immünizasyonda kullanılan peptid, SDS-PAGE’de yürütölüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra serumun 1/500 dilüsyonu ile işaretlendi.

İmmünizasyon öncesi alınan serumdan işaretleme yapıldığında herhangi bir bant elde edilmezken; immünizasyon süresinin ortasında ve de sonunda alınan serum ile işaretlenen membranlardan sinyal alındı (Şekil 4.21). Alınan sinyal peptid büyüklüğü ile uyumluydu. Belirlenen zaman içerisinde Balb/c türü farenin immünizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve fareler verilen peptide karşı antikor oluşturmuştur. Antikor oluşturduğu belirlenen farelerin dalağı çıkarıldı ve hibridoma oluşturulmasında IgG sentezleyen hücre kaynağı olarak kullanıldı.



Şekil 4.21. İmmünizasyon işleminin başında, ortasında ve sonunda alınan serum ile western blot yöntemi ile peptidin işaretlenmesi. Ticari olarak satın alınan E2F1 peptidi lizis tampon içinde çözüldü ve %12 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membrana aktarıldı. Membran farenin kuyruk veninden alınan serumun 1/500 dilüsyonu ile işaretlendi (A, Pre-immünizasyon serumu ile işaretlenmiş PVDF membran; B, immünizasyon sürecinin ortasında alınmış serum ile işaretlenmiş PVDF membran; C, immünizasyon süreci sonunda alınmış serum ile işaretlenmiş PVDF membran).

4.11.2 Hibridoma Sonrası Anti-E2F1 IgG Üreten Kolonilerin Belirlenmesi

Hibridoma ile stabil ve Anti-E2F1 IgG sentezleyen hücreler oluşturuldu. Hibridoma oluşturulduktan sonra hücrelerin süpernatant besiyerleri ile ELISA yöntemiyle E2F1'e karşı oluşturdukları antikorlar belirlendi (Şekil 4.21). Hibridomalar besi ortamına sentezledikleri Anti-E2F1 IgG'yi salgılayacaklardır. Besi ortamındaki Anti-E2F1 IgG substrat olarak kullanarak ELISA yöntemi gerçekleştirildi. En yüksek sentez ve salınım gösteren koloniler belirlendi. Antikor yapımına bu koloniler üzerinden devam etmek için hücreler 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına geçirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.948	0.906	0.941	0.943	0.656	0.527	0.474	0.510	0.741	0.701	0.713	0.627
B	0.839	1.224	1.310	0.893	1.260	0.614	0.635	0.549	0.893	0.828	0.696	0.629
C	0.929	1.517	1.422	1.059	0.753	0.522	0.615	0.531	0.733	0.944	0.737	0.807
D	1.347	1.693	1.511	1.136	1.050	0.563	0.852	0.857	0.790	0.972	0.921	0.767
E	0.991	1.010	1.033	0.950	0.879	0.618	0.752	0.720	0.936	0.944	0.888	0.742
F	1.024	0.858	0.868	0.900	0.853	0.731	0.681	0.711	0.841	0.894	0.825	0.872
G	1.634	1.293	1.287	1.372	0.941	0.838	1.073	1.072	0.968	0.896	0.947	0.854
H	1.117	1.337	1.258	1.063	0.850	0.848	1.139	1.128	1.018	0.976	0.815	0.840

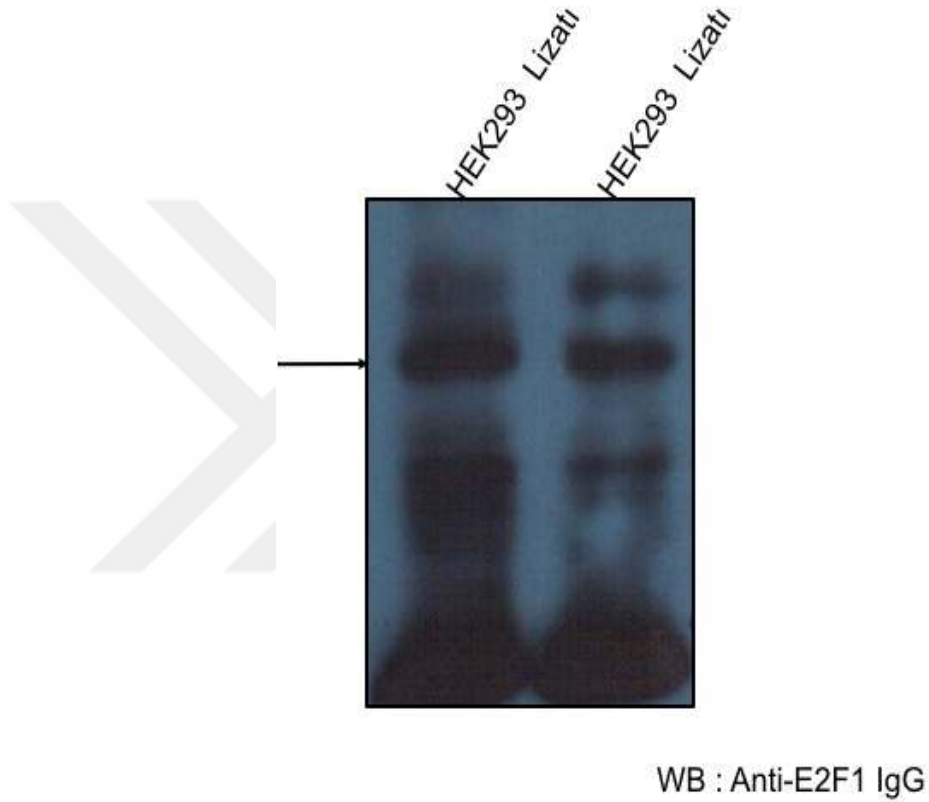
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.729	1.440	1.511	1.172	1.189	1.638	1.009	0.709	0.911	0.897	0.690	0.670
B	2.038	2.277	1.634	1.479	1.873	1.440	1.165	0.966	0.765	1.140	0.990	0.727
C	1.708	1.995	1.646	1.328	1.684	1.160	1.398	0.875	0.679	0.877	1.047	1.358
D	1.616	1.664	1.492	1.673	1.601	1.243	1.654	1.171	0.805	1.376	1.171	1.251
E	1.180	1.070	1.169	1.083	1.189	1.208	1.360	1.194	0.965	1.055	1.123	1.295
F	1.337	1.181	1.168	0.953	1.127	1.213	1.277	0.801	1.077	1.422	1.224	1.235
G	1.160	1.118	0.980	1.069	1.350	1.108	1.243	1.241	1.107	1.337	1.404	1.270
H	0.923	1.015	0.965	1.036	1.038	1.050	1.221	1.193	0.993	1.470	1.261	1.125

Şekil 4.22. Hibridoma sonrası elde edilen kolonilerin salgıladıkları Anti-E2F1 seviyesinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi. ELISA kapları peptid ile kaplandıktan sonra, besiyeri örnekleri primer antikor, HRP konjüge anti-fare IgG antikoruna da sekonder antikor olarak kullanılarak ELISA yapılmıştır.

4.11.3 Elde Edilen Anti-E2F1 IgG Yapısının Hücre Lizatlarında Denenmesi

Ticari olarak sentezlenen E2F1'e karşı bağlanma gösteren antikor yapısının hücre lizatlarındaki E2F1'i tanıyıp bu proteinlere bağlanıp bağlanmayacağını gösterilmesi bu antikoru sonraki deneylerde kullanılması için önemliydi. Bu

nedenle yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücrelerinden elde edilen lizat %10'luk poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membrana aktarıldı. Bu membran üzerinde, ELISA'da pozitif sonuç vermiş olan besi ortamları antikor olarak kullanılarak işaretleme yapıldı.

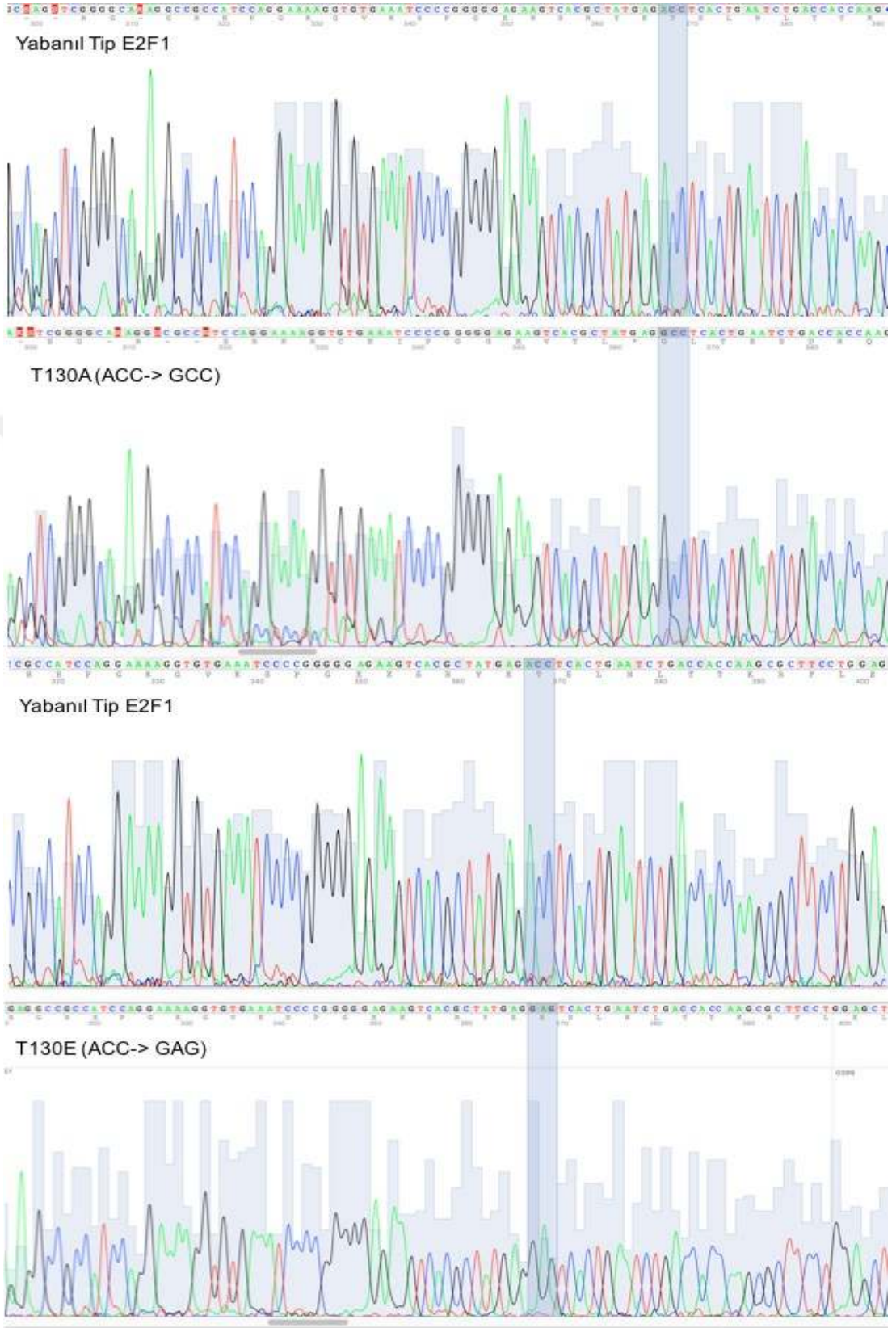


Şekil 4.23. Hibridoma sonrası elde edilen Anti-E2F1 IgG'nin Western Blot yöntemi ile test edilmesi.Hibridoma sonrası elde edilen kolonilerin salgıladıkları Anti-E2F1 seviyesinin yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren hücre lizatlarında western blot yöntemi ile denemesi

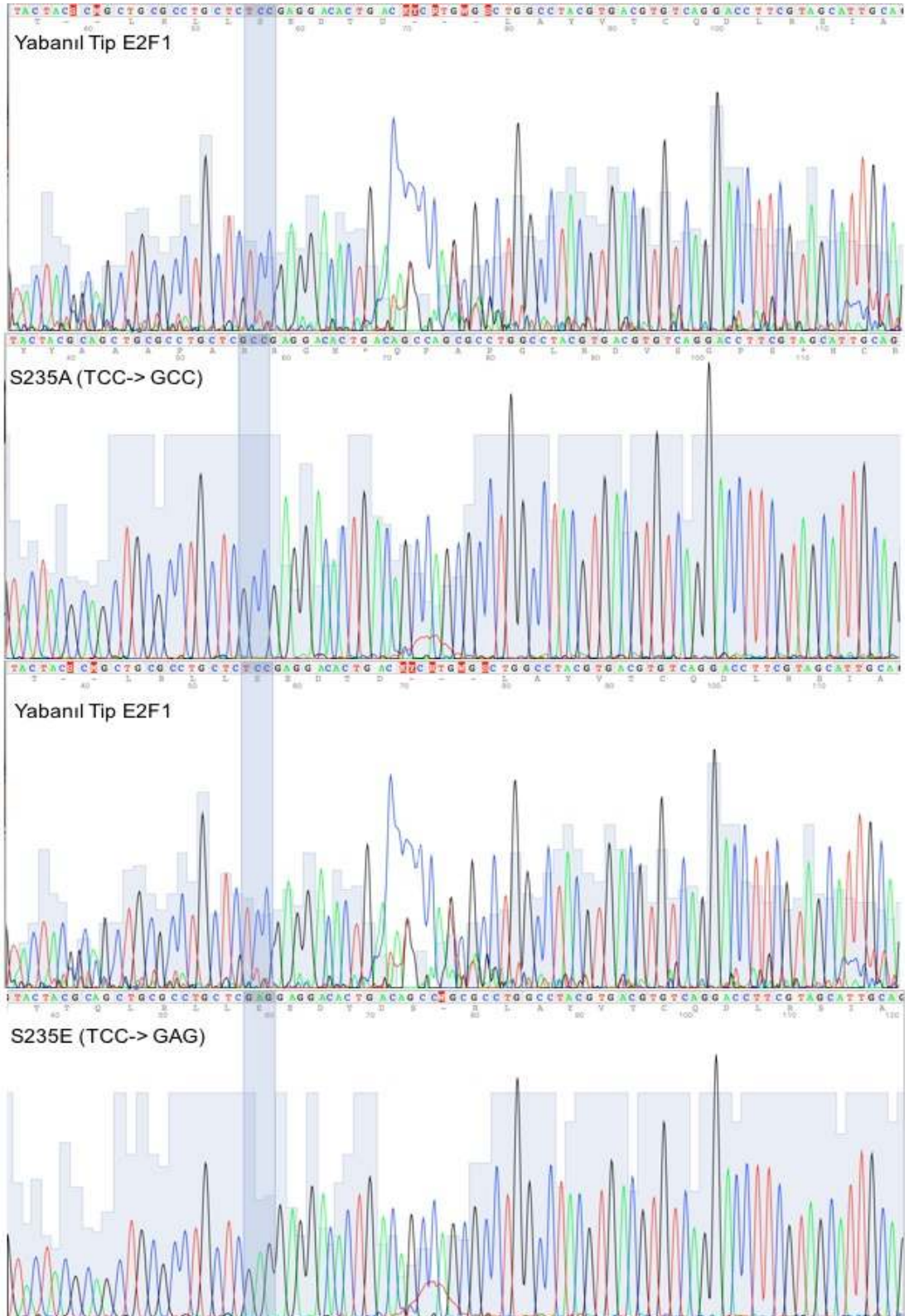
4.12. İnsan E2F1 Proteininin Site-Directed Mutagenez (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Yapılması

Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak PKA'nın E2F1'i fosforile ettiğini ve bu fosforilasyonun E2F1'in degradasyonuna neden olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamızda ileri sürdüğümüz PKA'nın muhtemel fosforilasyon bölgelerinin yolak üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde gösterebilmek için insan E2F1 proteininin

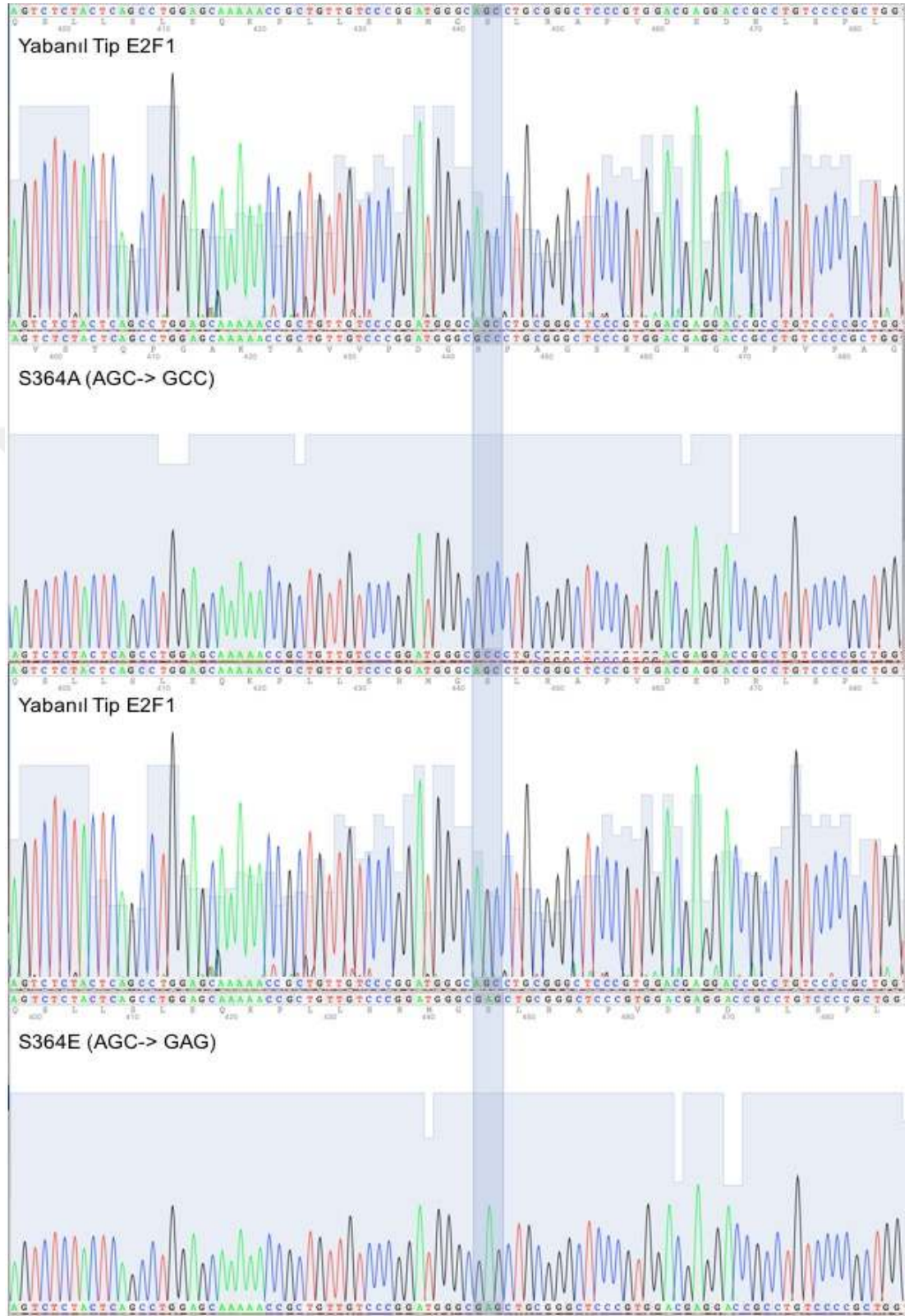
PKA fosforilasyon noktaları olduğunu düşündüğümüz Treonin130 (T616), Serin235 (S235) ve Serin364(S364) nolu amino asitlerin kodonlarını fosforile edilemez Alanin (A) ve fosforilasyonu taklit eden Glutamik Asit (E) kodonlarına tekli ve kombinasyon olarak SDM yöntemi ile çevirdik (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26). Mutant plazmidler E.coli DH5 α suşuna transforme edildikten sonra Amfisilin içeren agar petrilerinde oluşan bakteri kolonileri çoğaltılarak bunlardan plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen mutant plazmidler kalıp alınarak E2F1'in ilgili bölgelerine spesifik primerler aracılığıyla PZR amplifikasyonları ve devamında DNA dizi analizleri gerçekleştirildi ve mutasyonlar doğrulandı. SDM yöntemi baz alınarak ilgili bölgelerin tekli ve kombinasyonel mutantlarını içeren toplam 14 memeli ekspresyon vektörü oluşturuldu.



Şekil 4.24. İnsan E2F1 T130. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri



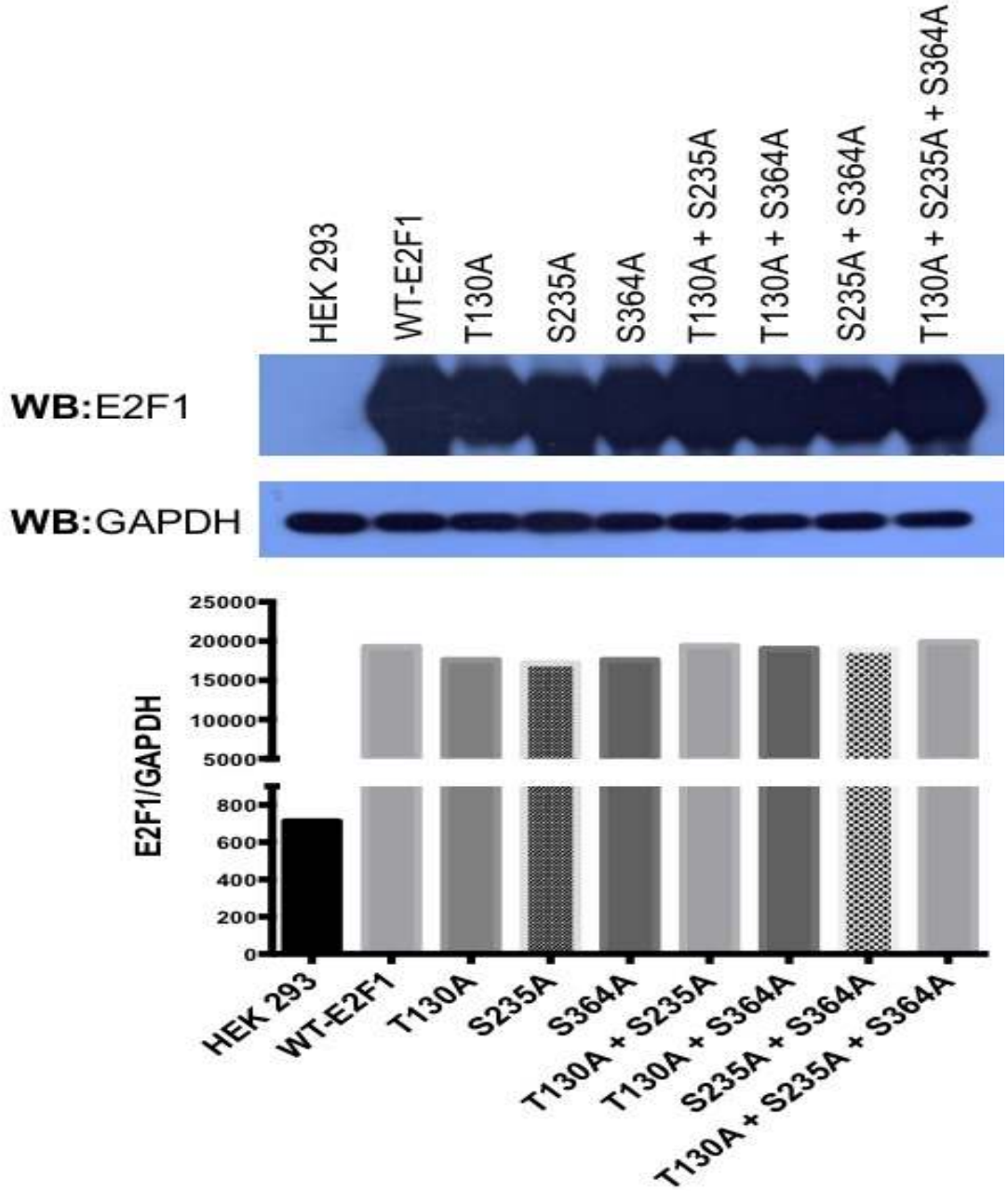
Şekil 4.25 İnsan E2F1 S235. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri



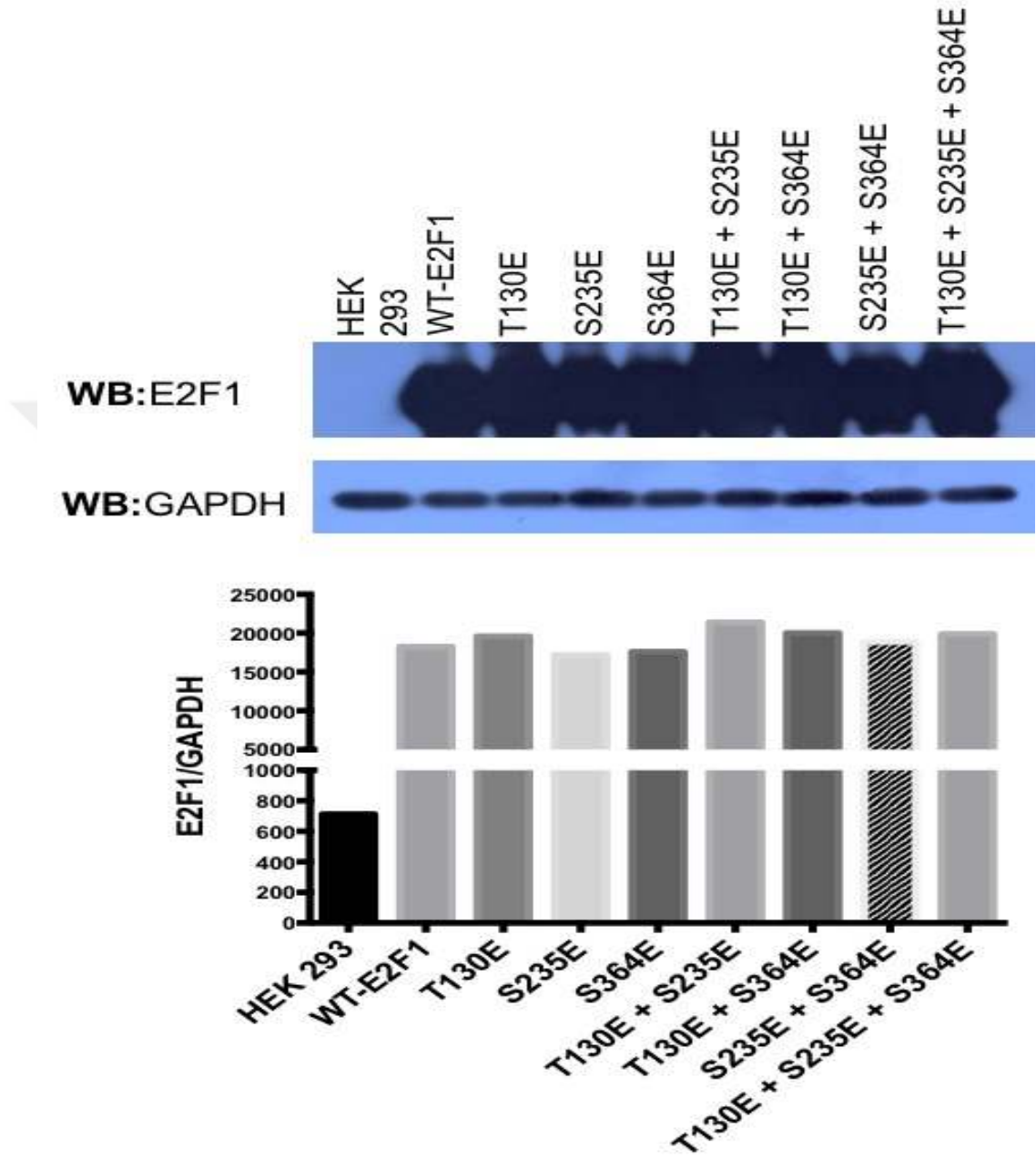
Şekil 4.26 İnsan E2F1 S364. bölgesine spesifik oluşturulan mutasyonların sekans analizleri

4.13. İnsan E2F1 Proteininin Site-Directed Mutagenez (SDM) Yöntemi ile Oluşturulan Mutantlarının HEK293 Hücrelerinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi

SDM yöntemi ile mutasyonlar oluşturulduktan sonra elde edilen vektörlerde SDM amplifikasyonu sırasında sonlandırma kodonlarının oluşma olasılığını dışlamak, plazmidin doğru bir şekilde amplifiye edildiğinden emin olmak ve mutant E2F1'lerin sentezinin yapıldığını göstermek için Kalsiyum Fosfat transfeksiyon yöntemi ile 10 µg plazmid DNA'ları HEK293 hücrelerine verilmiştir. Kontrol olarak, HEK293 hücreleri, içerisine herhangi bir gen klonlanmamış boş pcDNA3.1B plazmidi ile transfekte edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen lizatlar kullanılarak mutant E2F1 proteinlerinin ekspresyonu western blot ile gösterilmiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28). SDM sürecinde mutantların ekspresyonunu olumsuz etkileyecek bir durum oluşmamış, mutant proteinler yüksek miktarda ekspresyon göstermişlerdir.



Şekil 4.27. İnsan E2F1 A (Alanin) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin HEK293 hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi. Boş pcDNA3.1B, E2F1 yabanıl tip ve mutant memeli ekspresyon vektörleri HEK293 hücrelerine kalsiyum fosfat yöntemi ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler TritonX 100 içeren liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle E2F1 antikoru ile işaretlendi. Aynı membran strip-off işlemi sonrası yükleme kontrolü olarak GAPDH antikoru ile işaretlendi. WB: Western Blot



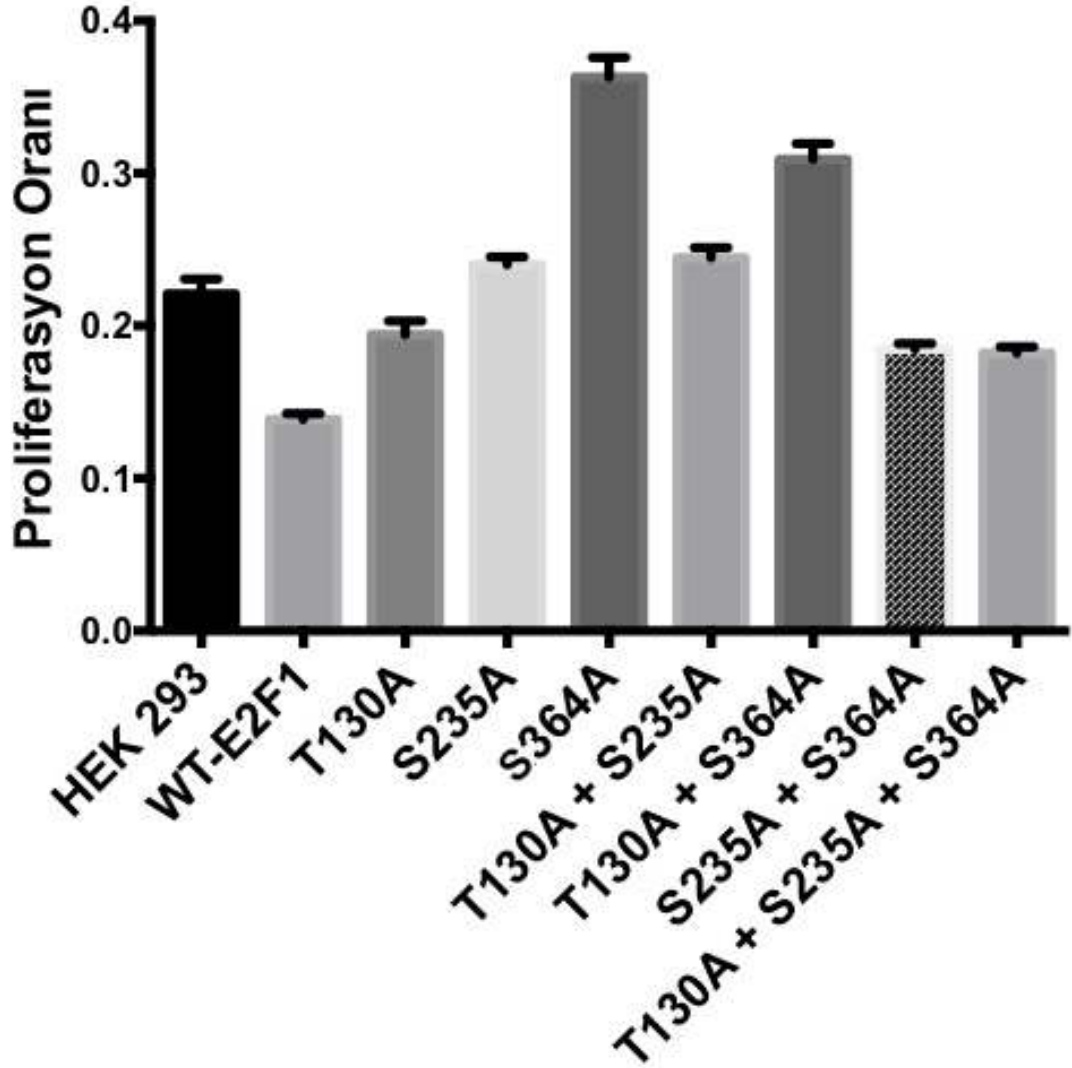
Şekil 4.28. İnsan E2F1 E (Glutamik Asit) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi. E2F1 yabancıl tip ve mutant memeli ekspresyon vektörleri E2F1 hücrelerin CaPO₄ yöntemi ile transfekte edildi. Hücreler seçiliminden sonra, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatu %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle E2F1 antikoru ile işaretlendi. Aynı membran strip-off işlemi sonrası yükleme kontrolü olarak GAPDH antikoru ile işaretlendi. HEK293: boş pcDNA3.1B vektörü ile transfekte edilmiş hücreler. WB: Western Blot

4.14. Yabanıl Tip ve Mutant İnsan E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin Proliferasyon Oranlarının Belirlenmesi

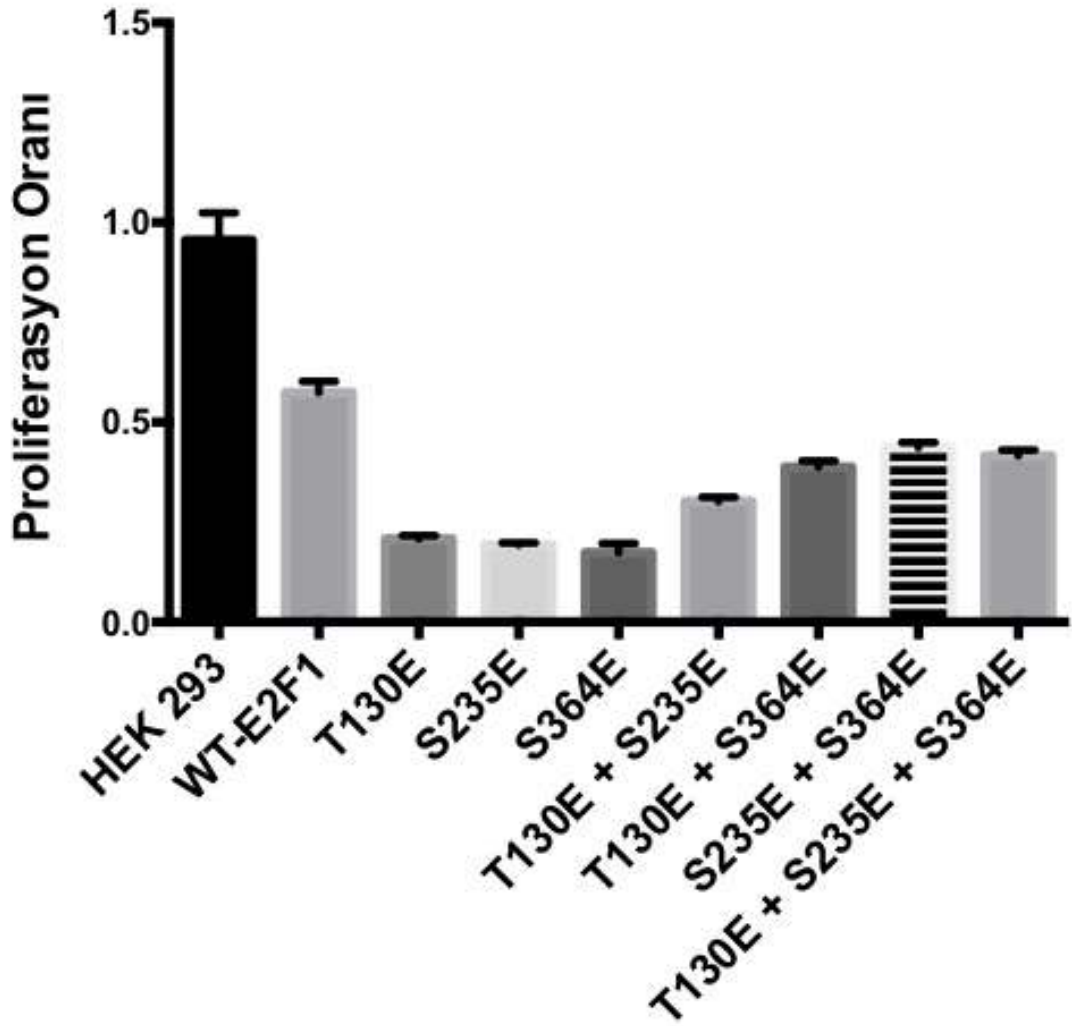
PKA tarafından fosforile edilen E2F1 proteininin hücrelerin proliferasyonları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla fosforilasyonu taklit eden ve fosforile edilemeyen mutant vektörleri ektopik eksprese eden hücrelerde MTT analizi ve Ki67 immünfloresan boyama gerçekleştirildi.

4.14.1. Yabanıl Tip ve Mutant E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin 24. Saatte Proliferasyon Oranlarının MTT Yöntemiyle Belirlenmesi

Yabanıl tip ve mutant vektörlerle transfekte eden hücreler 24 saat serumsuz besiyerinde tutulduktan sonra 24 saat serumlu besiyeri muamelesi yapıldı. Belirtilen uygulamalar sonrasında MTT analizi yapılarak proliferasyon hızları üzerine mutant vektörlerin etkileri araştırıldı. 24. saat sonunda A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı; E mutantları eksprese eden hücrelerin ise proliferasyon hızının yavaşlattığı görüldü. Özellikle S364A mutantının proliferasyonu hızlandırdığı ve S364E mutasyonunun proliferasyonu yavaşlattığı görülmüştür (Şekil 4.29, Şekil 4.30).



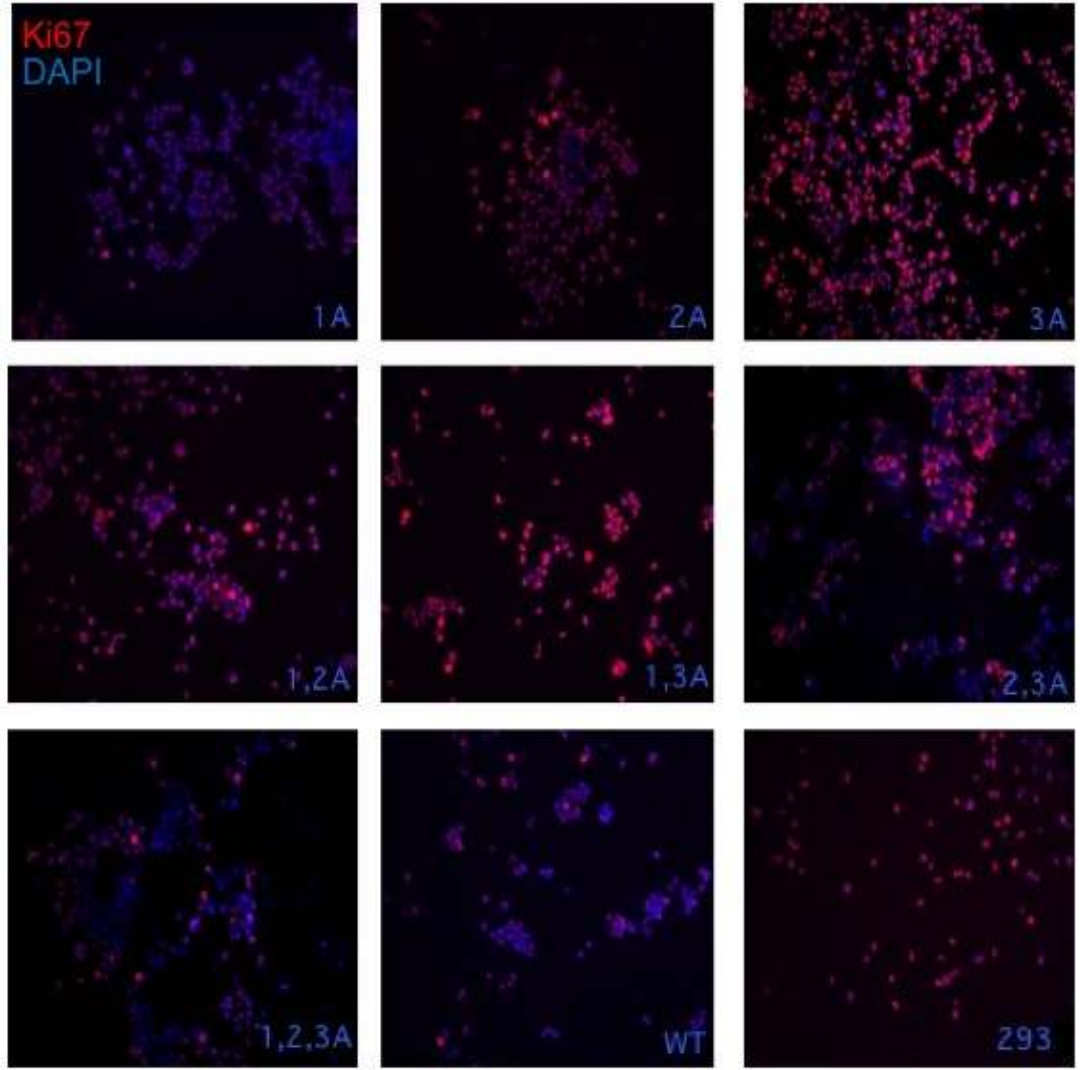
Şekil 4.29. HEK293, yabancı tip E2F1 ve E2F1 A mutantlarını eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması. Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 tekrar halinde 96 kuyulu kültür kabına ekildi. %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ li kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri ile 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda hücre grubunun üzerine her kuyuda son hacim %10 olacak şekilde serumlu DMEM eklendi ve 24. saatin sonunda MTT uygulanarak spektrofotometrik ölçümler ve yabancı tip kontrol alınarak istatistiksel analizler gerçekleştirildi. (Bir düzenekte her grup n=6 tekrar halinde ekilmiş olup, düzeneğe bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır.)



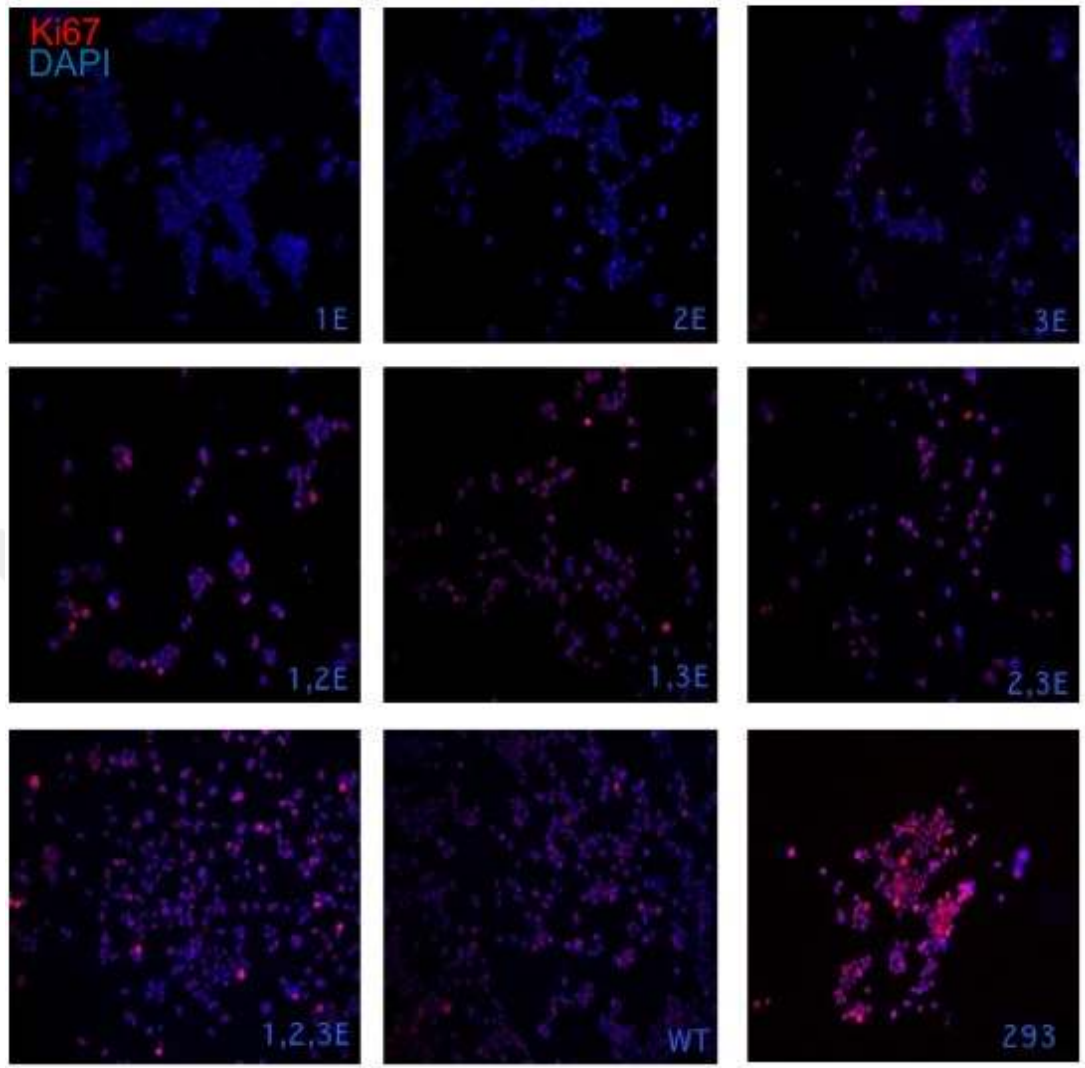
Şekil 4.30. HEK293, yabanıl tip E2F1 ve E2F1 E mutantlarını eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması. Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 tekrar halinde 96 kuyulu kültür kabına ekildi. %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ li kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri ile 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda hücre grubunun üzerine her kuyuda son hacim %10 olacak şekilde serumlu DMEM eklendi ve 24. saatin sonunda MTT uygulanarak spektrofotometrik ölçümler yapıldı ve yabanıl tip kontrol alınarak istatistiksel analizler gerçekleştirildi. (Bir düzenekte her grup n=6 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır.)

4.14.2. Yabanıl Tip ve Mutant İnsan E2F1 Proteini Eksprese Eden HEK293 Hücrelerinin 24. Saatte Proliferasyon Oranlarının Ki67 Floresan İmmünositokimya Yöntemiyle Belirlenmesi

Yabanıl tip ve mutant vektörler altında lamel bulunan 6 kuyucuklu kültür kaplarına 750.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ekimi gerçekleştirilen hücrelere 24 saat serumsuz besiyerinden sonra 24 saat serumlu besiyeri muamelesi yapıldı. Belirtilen uygulamalar sonrasında proliferasyon biyobelirteci olan Ki67 protein seviyelerinin ölçülmesi için immünfloresan sitokimya deneyi gerçekleştirildi (Şekil 4.31, Şekil 4.32). Elde edilen sonuçlarda MTT analizi ile elde ettiğimiz sonuçlara uyumlu bir şekilde; 24. saat sonundan A mutantlarını eksprese eden hücrelerde Ki67 boyamasının HEK293 ve yabanıl tip E2F1 ekspresyonu yapan hücrelere göre daha fazla olduğu ve bunun aksine E mutantlarında is bu boyanmanın daha az olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.31. Yabancıl tip E2F1 ve E2F1 A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının Ki67 boyaması ile doğrulanması. Bir düzenekte her grup n=5 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 5 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme



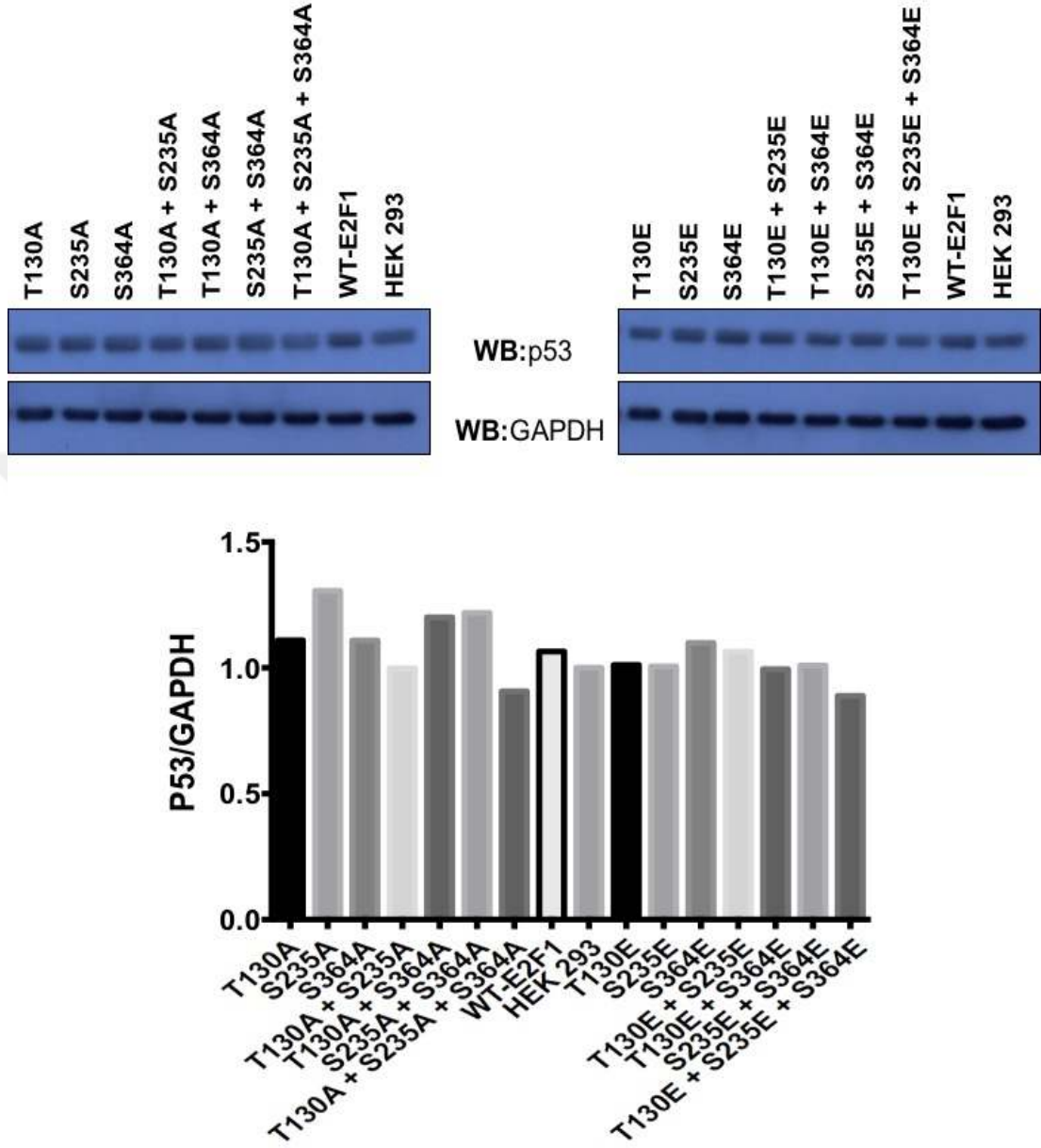
Şekil 4.32. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 E mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının Ki67 boyaması ile doğrulanması. Bir düzeneğe her grup n=5 tekrar halinde ekilmiş olup, düzeneğe bağımsız olarak 5 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme

4.15. Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının E2F1 Hedefi Genlerin Protein Seviyelerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

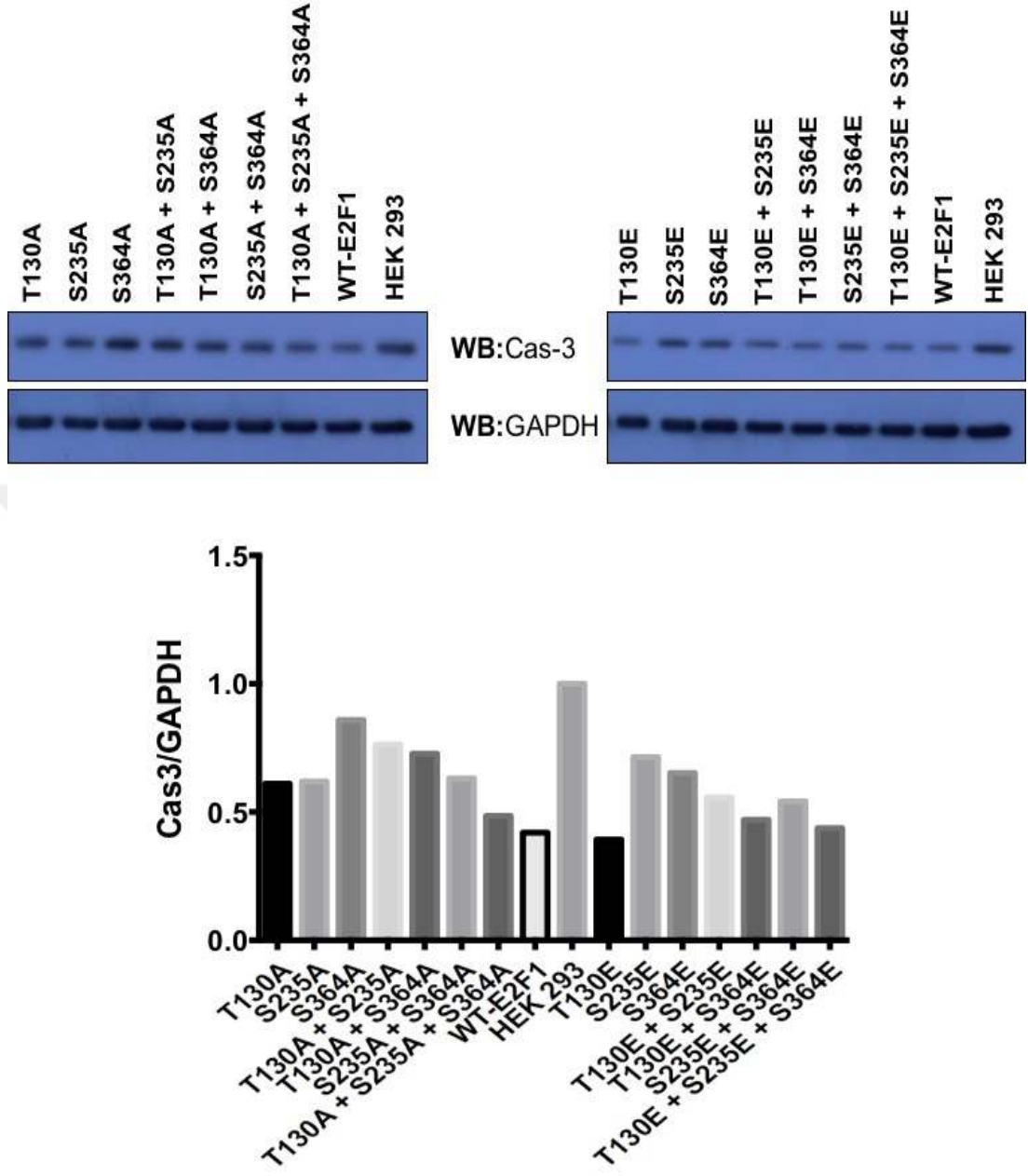
E2F1 proteininin PKA tarafından fosforile edilmesi ya da PKA aracılı fosforilasyonunun engellenmesiyle E2F1 hedef genlerinin ekspresyonunun nasıl etkileneceğini belirlemek için, yabancı tip ve mutasyona uğratılmış E2F1 vektörleri ile transfekte edilmiş hücrelerin lizatları alındı. Transfeksiyon harici hiçbir muamele uygulanmadan hazırlanan protein lizatları %10 poliakrilamid jelde yürütölüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra western blot işaretleme ile p53, kaspaz 3 ve CREB ekspresyon seviyeleri belirlendi.

p53 işaretleme sonucunda; stabil bir şekilde yabancı tip ve mutant E2F1 ile transfekte edilmiş HEK293 hücre hatlarında E2F1 hedef genlerinden p53'ün protein ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.33). Pro-kaspaz 3 antikor ile yapılan western blot sonucunda ise, yabancı tip E2F1 ile transfekte hücrelerde boş plazmidle transfekte edilen hücrelere nazaran pro-kaspaz 3 seviyesinin azaldığı, T130E ve T130E/S235E/S364E mutantlarıyla transfekte edilmiş hücrelerde pro-kaspaz seviyesinin yabancı tipten daha az miktarda olduğu, T130A/S235A/S364A ve T130'/S364E mutasyonlarında ise yabancı tip E2F1 aynı seviyede pro-kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmiştir. Diğer mutasyonlarsa yabancı tip E2F1'e göre daha yüksek pro-kaspaz 3 ekspresyonuna yol açmıştır (Şekil 4.34).

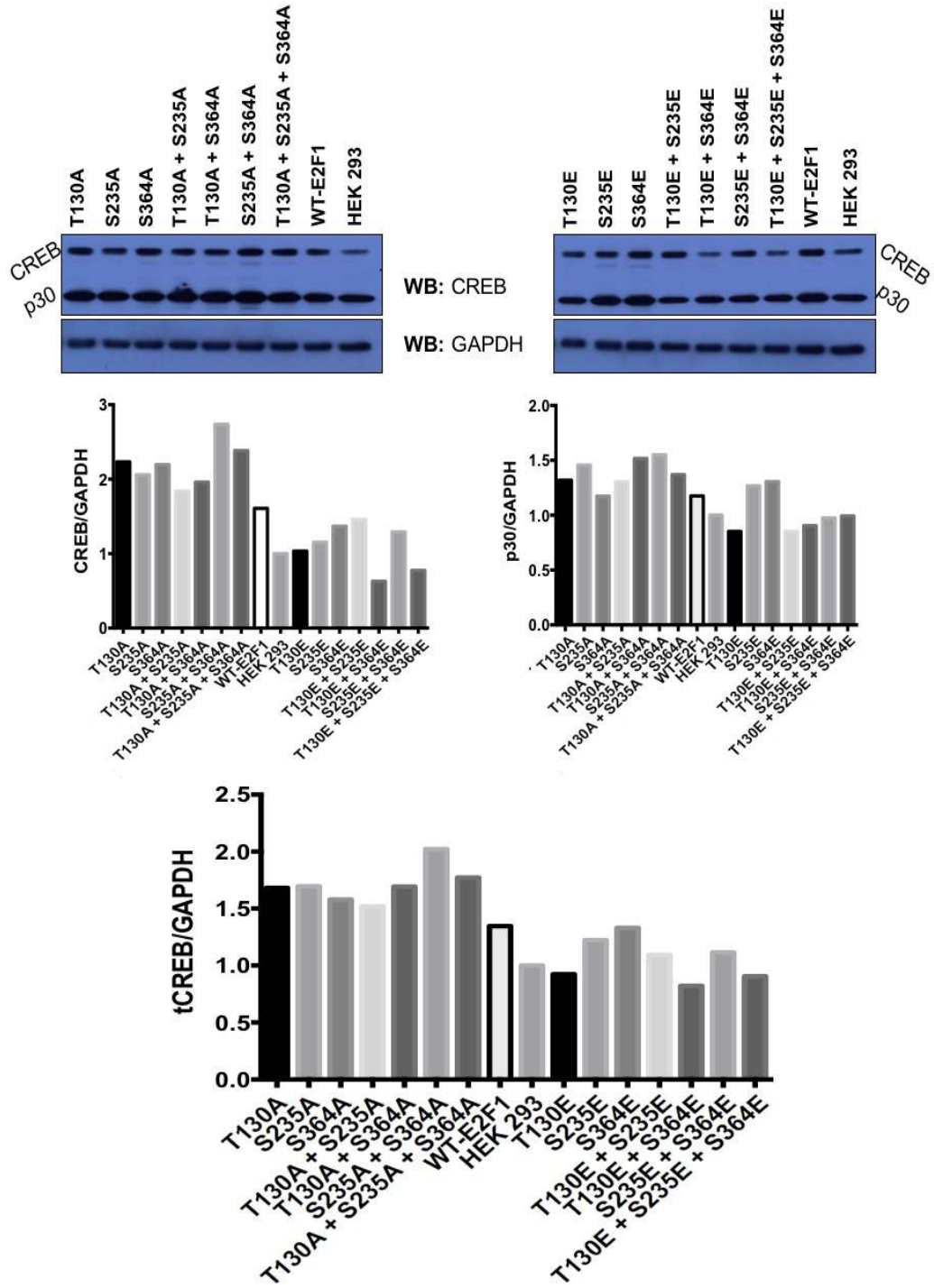
Aynı lizatlar kullanılarak western blot yöntemiyle CREB işaretleme yapıldığında ise yabancı tip E2F1 protein sentezinin HEK293'lere göre CREB ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Yine E2F1'de bulunan muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin A mutantları CREB seviyesinde artışa neden olmuştur. CREB işaretlemesini yaparken p30 olarak adlandırılan ve CREB'in yıkım ürünü olan 30 kDa boyutunda bir bant paterni de karşımıza çıkmaktadır. p30 seviyeleri karşılaştırıldığında yabancı tip ve A mutantı içeren E2F1'in HEK293'den daha fazla p30 seviyesine sahip olduğu görülmektedir. CREB ve p30 bantlarının birlikte değerlendirildiği ve total CREB olarak adlandırdığımız analizde de total CREB seviyesinin, A mutantları ve yabancı tip E2F1 aşırı ekspresyonu gösteren hücrelerde, kontrol HEK293'den daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.35).



Şekil 4.33. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerde p53 seviyesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. Ekspresyon çalışması, stabil transfekte hücrelerde yapılmış olup, p53 seviyeleri GAPDH seviyelerine oranlanarak normalize edilmiştir. WB: Western Blot



Şekil 4.34. Yabancı tip ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarının eksprese eden hücrelerde Pro-kaspaz 3 seviyesinin western blot yöntemi ile gösterilmesi Ekspresyon çalışması, stabil transfekte hücrelerde yapılmış olup, pro-kaspaz3 seviyeleri GAPDH seviyelerine oranlanarak normalize edilmiştir. WB: Western Blot



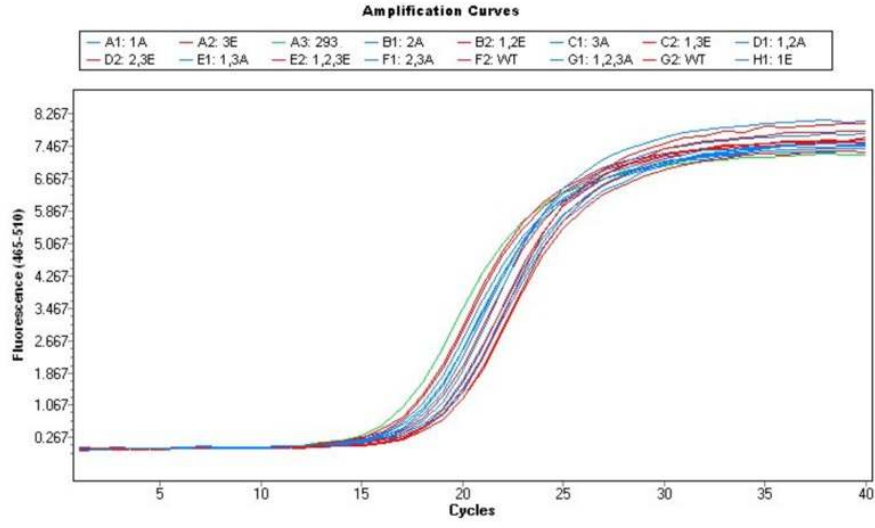
Şekil 4.35. Yabancı tip ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde CREB ve Total CREB seviyelerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. Ekspresyon çalışması, stabil transfekte hücrelerde yapılmış olup, CREB ya da p30 seviyeleri GAPDH seviyelerine oranlanarak normalize edilmiştir. WB: Western Blot

4.16. Yabanıl Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının E2F1 Hedef Genlerinin mRNA Ekspresyonuna Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Nicel gerçek-zamanlı PZR’da doğru molekülün çoğaldığından emin olmak için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Floresan boya olarak SYBR Green molekülünün kullanıldığı durumlarda, bu boyanın doğası gereği çoğalan dizinin doğruluğundan ve özgül olmayan (non-spesifik) ürünlerin çoğalmadığından emin olmak için, reaksiyon sonuna ‘erime eğrisi analizi’ basamağı eklenmektedir. Bu basamakta, sıcaklık yaklaşık 50 °C’den 90 °C’ye 0,2 °C/saniye hızla arttırılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. SYBR Green tek zincirli DNA moleküllerine bağlanamadığından, ortaya giderek azalan bir floresan grafiği çıkmaktadır. Cihazın yazılımı tarafından bu grafiğin türevi alındığında ise erime tepeleri elde edilmektedir. Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.39’da görüldüğü gibi çoğalan örneklerde ‘non-spesifik’ veya farklı bir ürün bulunmamaktadır.

Yabanıl tip ve mutant E2F1 ekspresyonunun varlığında muhtemel PKA fosforilasyon bölgesindeki fosforilasyonun E2F1 transkripsiyon faktörünün hedef genleri üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde belirlemek amacıyla transfekte hücrelerin hiç bir tedavi uygulamaksızın mRNA’ları elde edildi. Hazırlanan mRNA’lar protein seviye değişimi gösteren kaspaz 3 ve CREB mRNA’larını belirlemede kullanıldı. Referans (House-keeping) gen olarak GAPDH seçildi.

Spesifik primerler ile Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonu sonucu GAPDH mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi (Şekil 4.36). GAPDH mRNA ekspresyon seviyesi Kaspaz 3 ve CREB ekspresyonlarını analiz etmek için kullanıldı.



Subset Name GAPDH465-510VALL

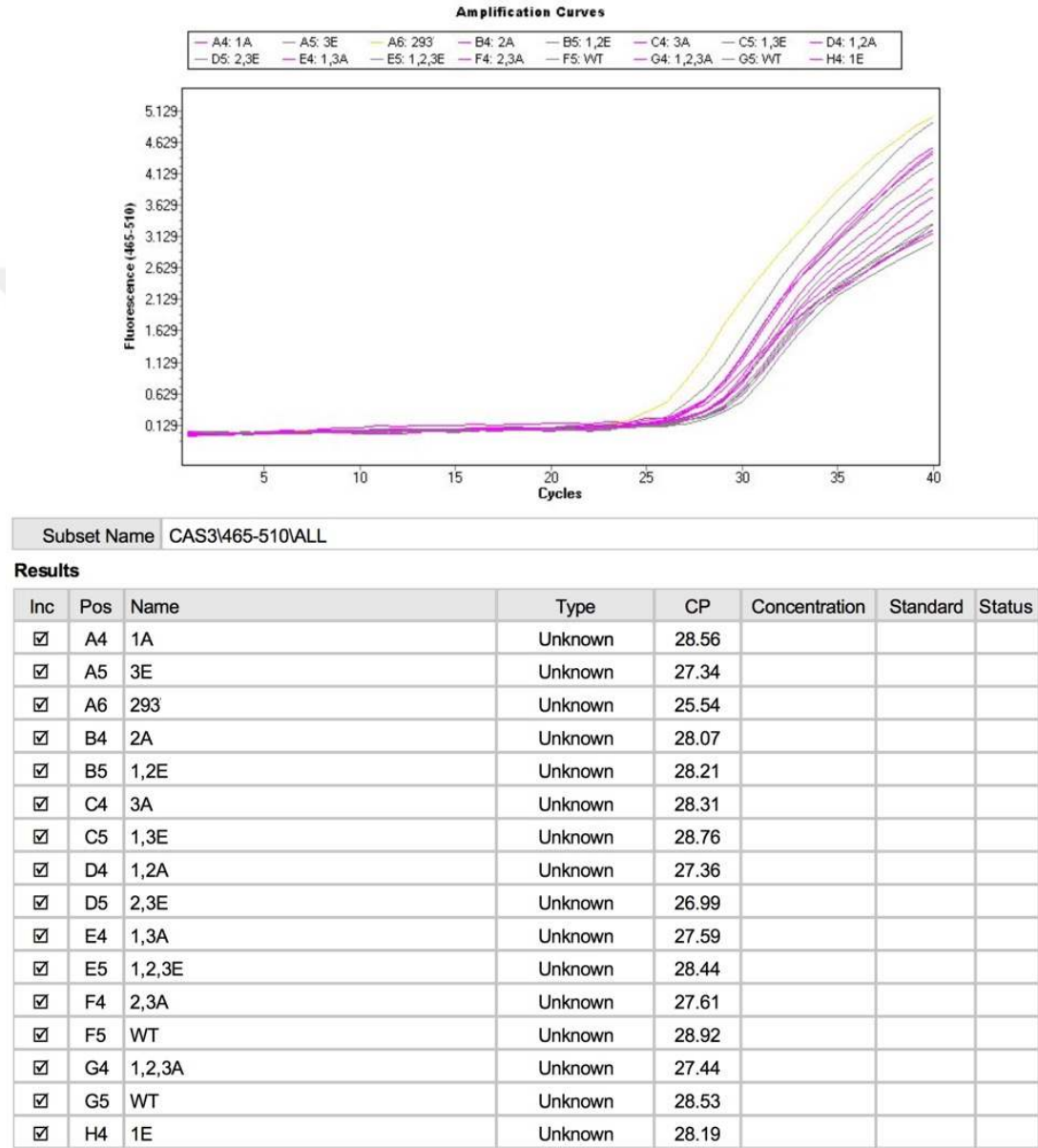
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	1A	Unknown	18.69			
☒	A2	3E	Unknown	16.93			
☒	A3	293	Unknown	16.28			
☒	B1	2A	Unknown	18.32			
☒	B2	1,2E	Unknown	17.93			
☒	C1	3A	Unknown	18.66			
☒	C2	1,3E	Unknown	19.02			
☒	D1	1,2A	Unknown	17.11			
☒	D2	2,3E	Unknown	16.89			
☒	E1	1,3A	Unknown	17.46			
☒	E2	1,2,3E	Unknown	18.83			
☒	F1	2,3A	Unknown	17.51			
☒	F2	WT	Unknown	18.93			
☒	G1	1,2,3A	Unknown	17.77			
☒	G2	WT	Unknown	18.52			
☒	H1	1E	Unknown	18.21			

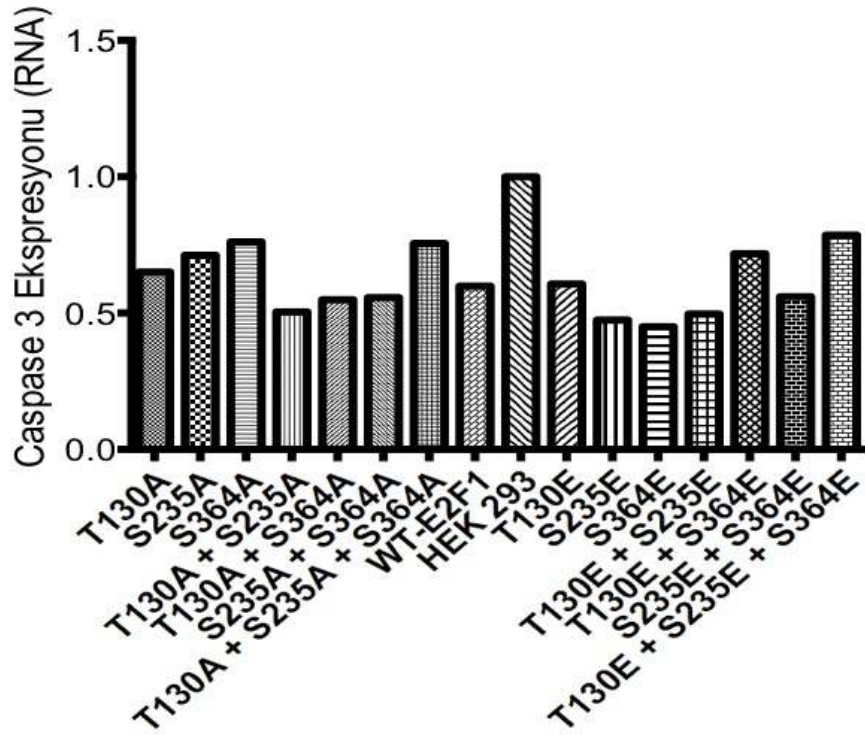
Şekil 4.36. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin GAPDH mRNA seviyeleri

Kaspaz 3 geninin nicel gerçek-zamanlı PZR’da çoğaltılması ile elde edilen eğriler Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Her örnek için Kaspaz 3’ün yanında, ifade düzeylerinin normalizasyonunda GAPDH geni referans olarak kullanıldı ve Kaspaz3/GAPDH oranları, deney grupları arasında gen anlatımı açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4.38). Protein ekspresyon seviyesindeki

farklılık tutarlı bir şekilde, E2F1 A mutantları ile transfekte hücrelerin, transfekte edilmemiş hücrelerden daha az kaspaz 3 ifadesine sahip olduğu, E mutantlarında ise özellikle S235E/S364E ve T130E/S235E/S364E'nin yabancı tip E2F1'e göre daha etkin bir şekilde Kaspaz 3 ekspresyonunu indüklediği belirlendi.

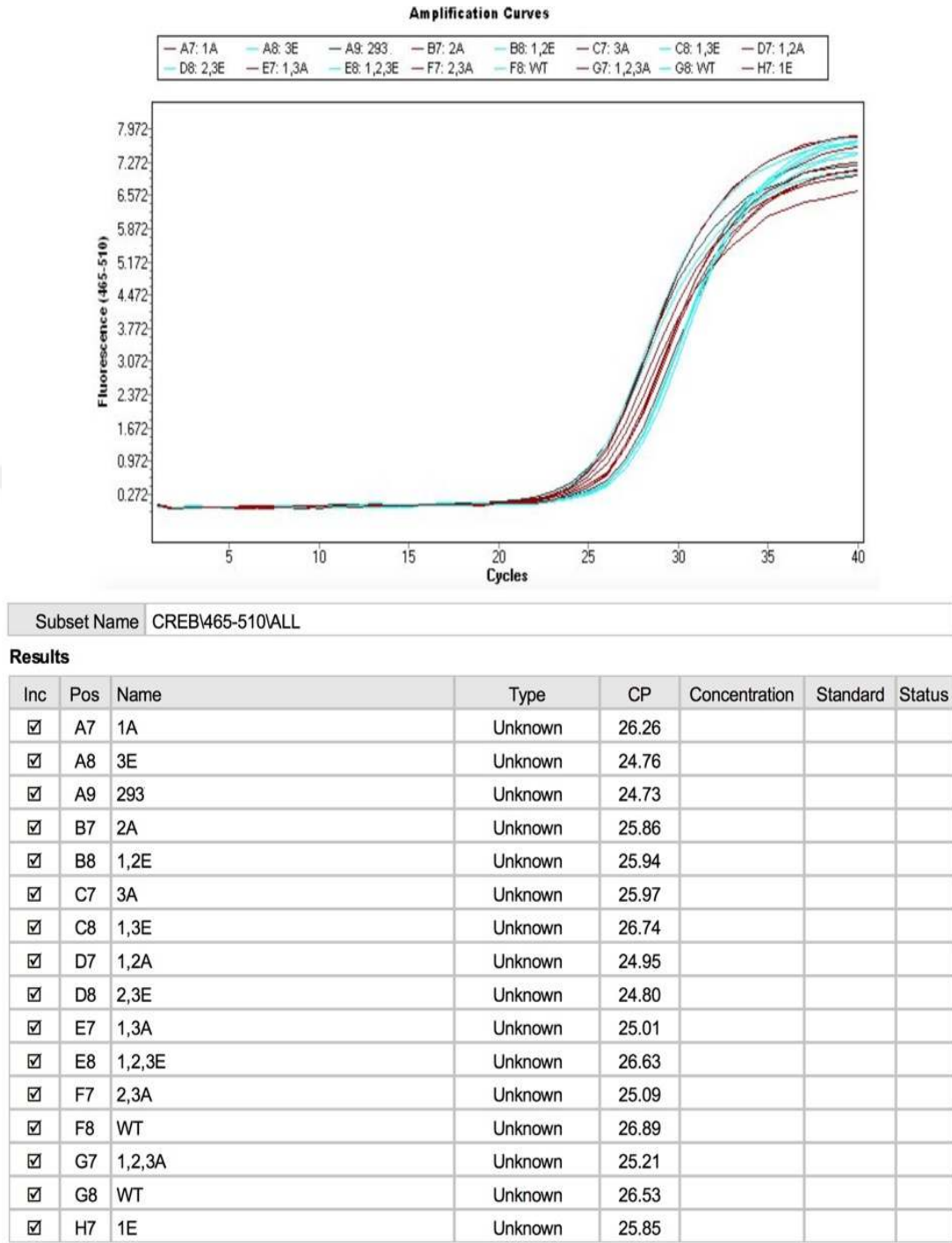


Şekil 4.37. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyeleri

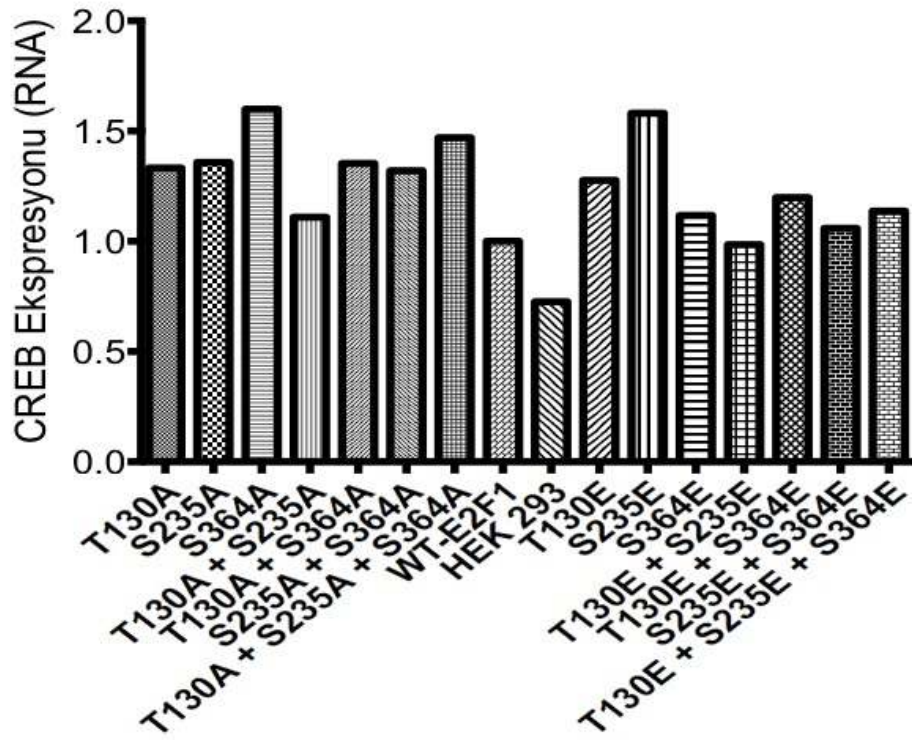


Şekil 4.38. Yabanıl tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA oranları. Yabanıl tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyelerinin GAPDH seviyelerine oranlanmasıyla (hedef/referans) elde edilen grafik

CREB geninin nicel gerçek-zamanlı PZR’da çoğaltılması ile elde edilen eğriler de Şekil 4.39’da gösterilmiştir. Her örnek için CREB ifadesi yanında, ifade düzeylerinin normalizasyonunda GAPDH geni referans olarak kullanıldı ve CREB/GAPDH oranları, deney grupları arasında gen anlatımı açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4.40). Yabanıl tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon mutasyonlarına sahip E2F1 vektörleri ile transfekte edilmiş hücrelerde CREB mRNA ifadesinin HEK293 hücrelerdeki CREB ifadesinden daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.39. E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin CREB mRNA seviyeleri



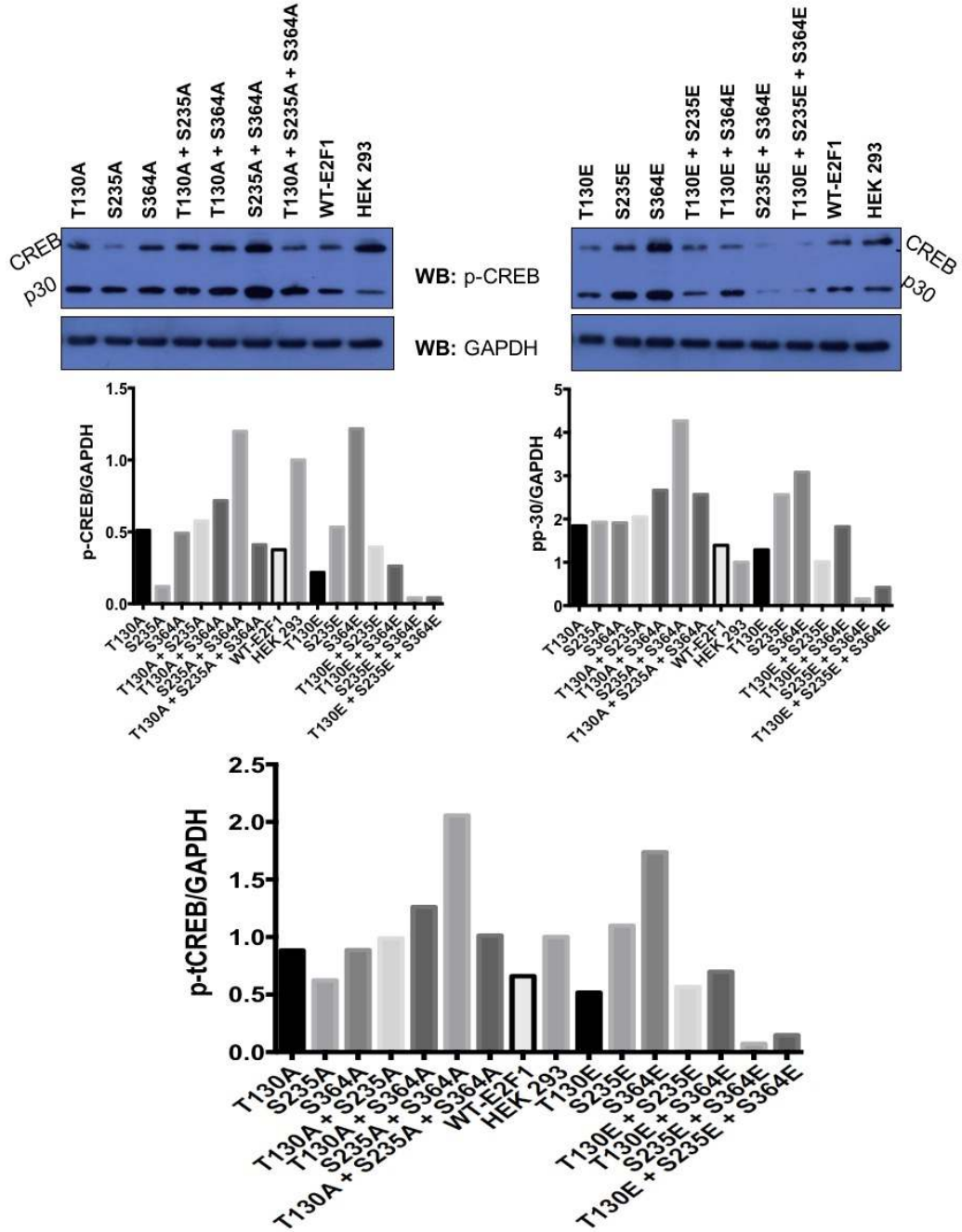
Şekil 4.40. Yabancı tip E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin CREB mRNA oranları. E2F1 ve muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin mutant formlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinin CREB mRNA seviyelerinin GAPDH seviyelerine oranlanmasıyla (hedef/referans) elde edilen grafik

4.17. Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının CREB Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

E2F1'in muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutasyonlarının CREB protein seviyesindeki değişimi ile mRNA ifadesindeki değişimin birbiri ile korelasyon göstermemesi üzerine bu PKA fosforilasyon bölgelerinin CREB'in post-translasyonel modifikasyonları üzerine etkisini araştırmak için, stabil transfekte hücrelerden alınan lizatları, western blot yöntemini kullanarak p-CREB (Cell Signalling, #9198) antikoru ile işaretledik.

p-CREB seviyelerine bakıldığında, yabancı tip E2F1 aşırı ekspresyonunun p-CREB seviyesini azalttığı görülmektedir (Şekil 4.41). S235A mutanlığı haricindeki A mutanları p-CREB seviyesini artırırken; T130E, T130E/S364E, S235E/S364E ve T130E/S235E/S364 mutanları CREB fosforilasyonunda azalmaya neden olmaktadır.

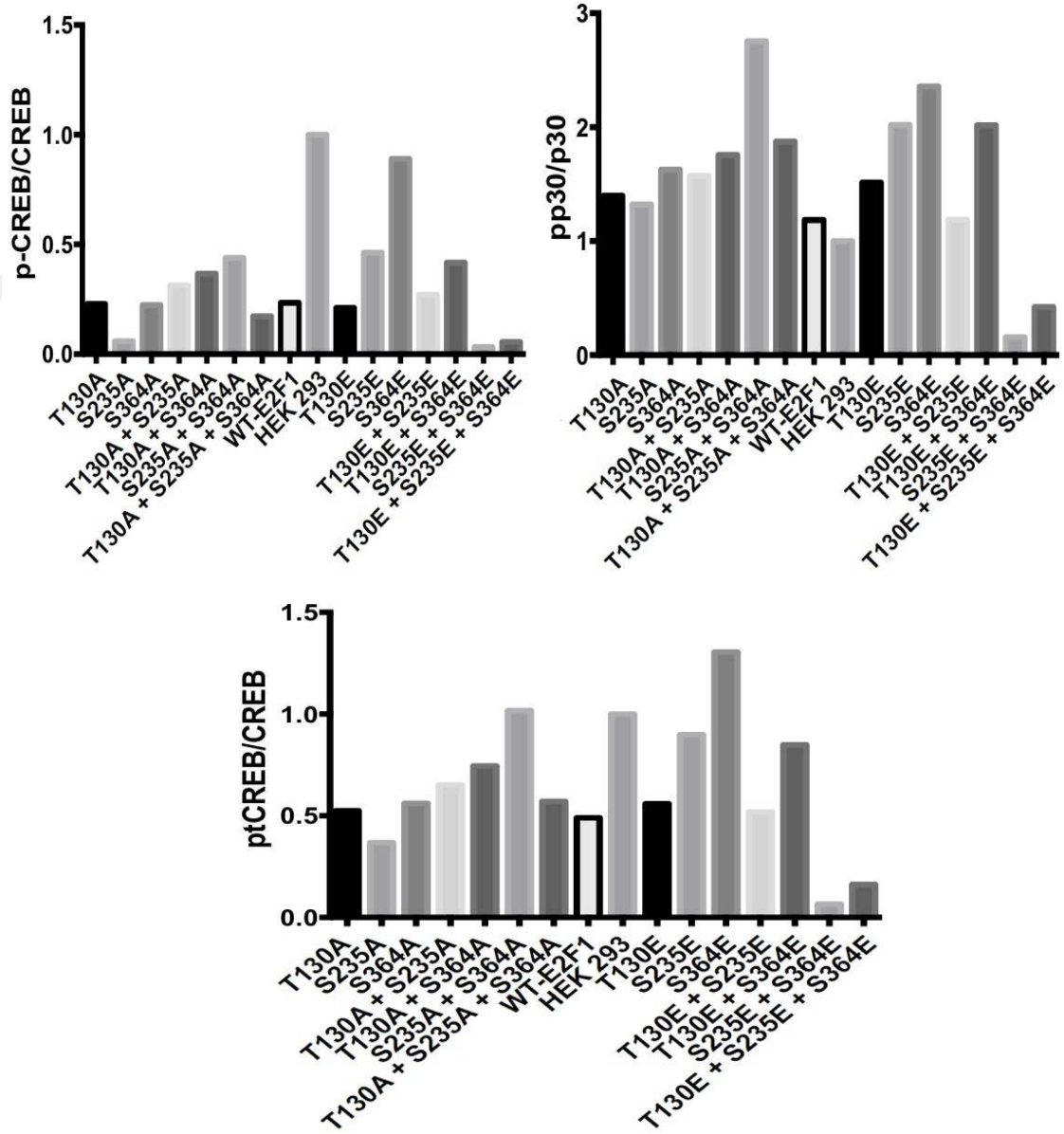
CREB'in yıkım ürünü olan p30'un fosforilasyonunun ise T130E/S235E, S235E/S364E ve T130E/S235E/S364E mutanları haricindeki bütün transfeksiyonlarla arttığı belirlendi. p30 ve CREB işaretlemelerini birlikte analiz ederek oluşturduğumuz total CREB'in fosforilasyon seviyesi ise S235A mutanlığı haricinde Alanin mutanlarında artış göstermektedir. S235E ve S364E mutanlarının aşırı ekspresyonu CREB fosforilasyonunda artışa neden olurken, diğer glutamik asit mutanlarında fosforilasyon seviyelerinde azalma görülmektedir.



Şekil 4.41. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde p-CREB ve Total p-CREB seviyelerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. Ekspresyon çalışması, stabil transfekte hücrelerde yapılmış olup, p-CREB ya da p-p30 seviyeleri GAPDH seviyelerine oranlanarak normalize edilmiştir. WB: Western Blot

Mevcut CREB'in fosforilasyon seviyesi hakkında daha gerçekçi bilgi almak için, pCREB/GAPDH oranının yeterli olmayacağı düşünülerek, pCREB/CREB analizi yapıldı (Şekil 4.42). Yabanıl tip E2F1 aşırı ekspresyonu, CREB fosforilasyonunu azaltırken, T130A ve T130E mutantları CREB fosforilasyonunda herhangi bir değişime neden olmamaktadır. S235A mutanti CREB fosforilasyonunu azaltmakta, S235E mutanti ise CREB fosforilasyonunu arttırmaktadır. S364A mutasyonu yabanıl tip E2F1'e benzer CREB fosforilasyonu gösterirken, S364E mutantının hücrede bulunan mevcut CREB fosforilasyonunu arttırdığı belirlenmiştir.

PKA fosforilasyon bölgelerinin ikili kombinasyonlarında ise T130A/S235A mutanti CREB üzerinde az miktarda fosforilasyon artışına neden olmakla birlikte bu bölgelerin Glutamik Asit mutantlarının CREB fosforilasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.42). T130 ve S364 aminoasitlerinin hem Alanin mutantları hem de Glutamik Asit mutantları fosforilasyon seviyesinde bir artışa neden olmaktadır. S235 ve S364 aminoasitlerinin alanine dönüştürülmesi fosforilasyonda artışa yol açarken, Glutamik Asit mutantlarında CREB fosforilasyonunda anlamlı bir azalma görülmektedir. Yine aynı şekilde, üç potansiyel PKA fosforilasyon bölgesinin birden Glutamik Asite dönüştürülmesiyle CREB fosforilasyon seviyesi azalmaktadır.

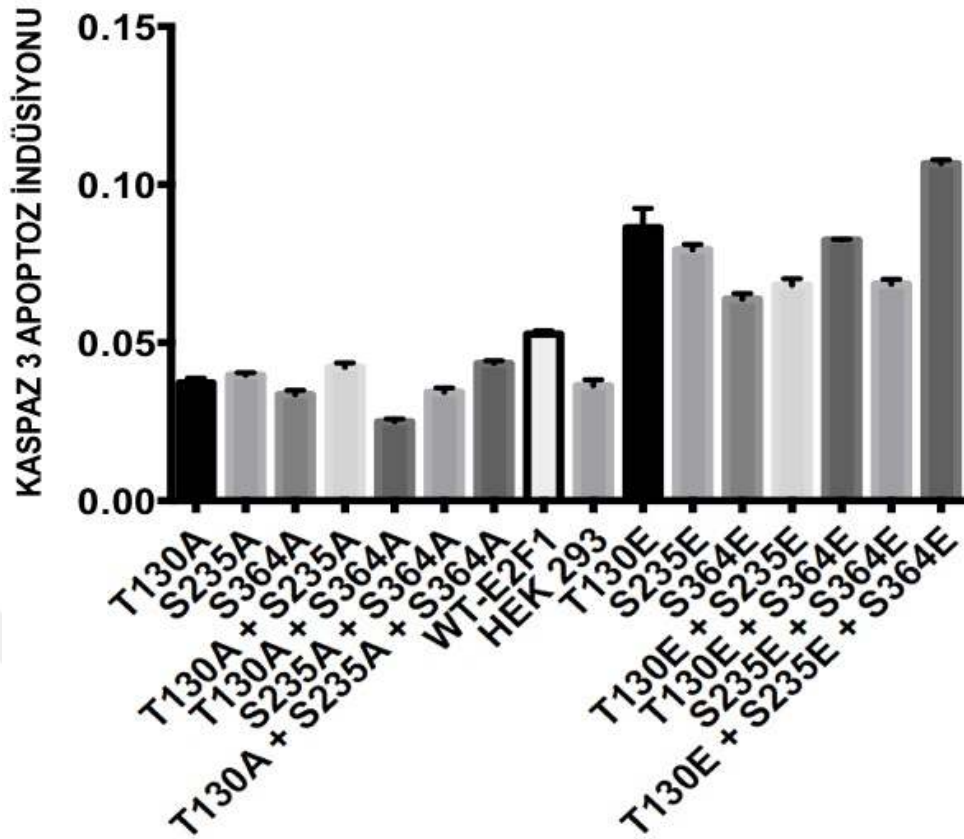


Şekil 4.42. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden hücrelerinde p-CREB/CREB seviyelerinin grafiği

4.18. Yabanıl Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Kaspaz 3 Aracılı Apoptozis İndüksiyonuna Olan Etkilerinin Belirlenmesi

E2F1 proteininin hücre döngüsü kadar apoptotik süreçte de önemli görevler aldığını bilmekteyiz. Hem kaspazların, hem de Apaf1'in transkripsiyon faktörü olan E2F1, apoptozom oluşumunu, dolayısıyla kaspaz 3-aracılı apoptozisi indükleyebilmektedir (Furukawa ve ark. 2002, Korotayev ve Ginsberg 2008). E2F1 proteini üzerinde bulunan muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin kaspaz 3 aktivasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan western blot ile kaspaz 3 işaretlemesi apoptotik süreçteki bu mutasyonların görevini tam olarak açıklayamamaktadır. Bu nedenle biz de, E2F1 mutasyonlarının kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozis indüksiyonu kapasitelerini incelemek istedik. Bunun için de, yabanıl tip E2F1 ve E2F1 PKA fosforilasyon bölgesi mutantları ile transfekte hücrelerden aldığımız lizatlarda kaspaz 3 aktivasyon kiti kullanılarak kaspaz aktivitesini araştırdık. Bu yöntemde, hücre içi kaspaz 3, dışarıdan sağlanan pNA işaretli DEVD peptidi ile uygun şartlarda inkübe edilir. Hücre içindeki aktif kaspaz, peptidi kıracağı için ne kadar aktif kaspaz varsa o kadar yüksek sinyal alınır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, E2F1 aşırı ekspresyonu apoptoz indüksiyonuna neden olmakta, Alanin mutantları ise yabanıl tip E2F1 ekspresyonu gösteren hücrelere göre daha az kaspaz 3-aracılı apoptozis indüksiyona neden olmaktadır. Bunun aksine Glutamik Asit mutantları, kaspaz 3 aracılı apoptotik indüksiyonunu arttırmaktadır (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin muhtemel PKA fosforilasyon bölgesi mutantlarını eksprese eden HEK293 hücrelerinde Kaspaz 3 aracılı apoptoz indüksiyon seviyeleri. Kolorimetrik assay kiti kullanılarak yapılan deneyde, bütün değerler, hücresel lizat bulunmaksızın, sadece lizis tamponu kullanılarak yapılan negatif kontrol deneyine göre normalize edilmiştir. Analiz için Multiskan Ascent Software ve GraphPad Prism yazılımlarından faydalanılmıştır.

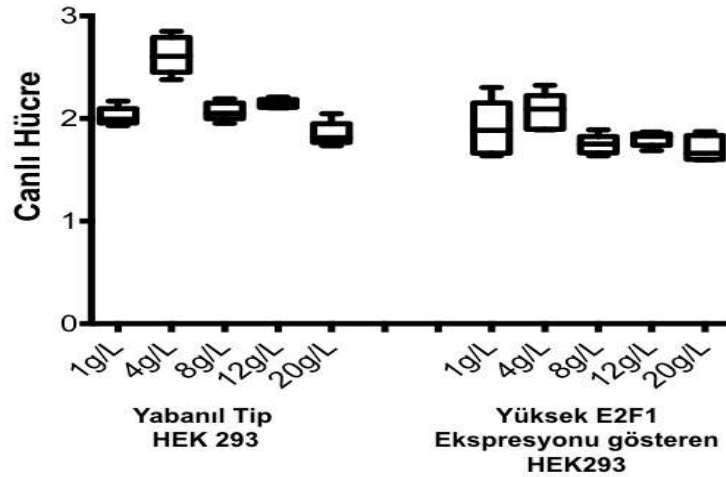
4.19. E2F1'in PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Glukoz Metabolizması Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Bir besin sensörü olarak görev yapan Protein Kinaz A'nın E2F1'in post-translasyonel modifikasyonunda söz sahibi olması besin, glikoz ve E2F1 arasında bir etkileşimin olup olmadığının araştırılması gerekliliğini göstermektedir. Hücre içerisinde yüksek glikoz varlığında, cAMP miktarı azalır. cAMP, PKA'nın aktivasyonu için olmazsa olmaz molekül olduğundan, azalan cAMP miktarı, PKA aktivasyonunun da azalmasına neden olur. Hücresinin glukoz/cAMP/PKA aktivitesi

dengeinde E2F1'in ve bilhassa PKA tarafından E2F1 üzerinde gerçekleştirilen fosforilasyonların rolünü anlayabilmek için, E2F1 mutantlarının hücre içi glikoz alımını nasıl etkilediğini araştırdık.

4.19.1. E2F1'in Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Hücre Proliferasyonu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Ektopik yabancı tip E2F1 ekspresyonu gösteren ve transfekte edilmemiş HEK293 hücrelerinin farklı glukoz konsantrasyonlardaki büyüme hızlarını araştırdık. Bunun için 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 1g/L, 4g/L, 8g/L, 12g/L ve 20g/L glikoz konsantrasyonunda besiyerleri ile muamele edildi. Yirmi dört saat sonra MTT analizleri gerçekleştirildi. Bu veriler doğrultusunda yabancı tip HEK 293 hücrelerinin, 4g/L glikoz konsantrasyonunda en yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olduğu görüldü. HEK 293 hücrelerinin 1g/L, 8g/L, 12g/L ve 20g/L glikoz konsantrasyonunda daha az hücre proliferasyonu belirlendi, bilhassa 20g/L glukoz konsantrasyonu, hücre proliferasyonu üzerinde negatif bir etkiye sahipti (Şekil 4.44). Yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK 293 hücrelerinde ise glikoz konsantrasyonu ve hücre proliferasyonları arasında anlamlı bir fark görülmedi.

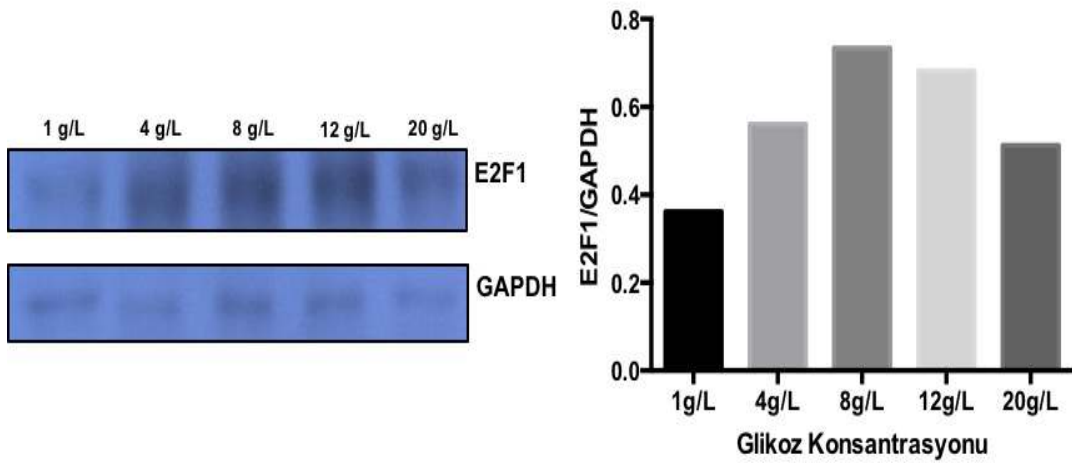


Şekil 4.44. Yabancı tip ve yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücrelerinde farklı glikoz konsantrasyonlarındaki hücre proliferasyonlarının karşılaştırılması. Yabancı tip ve Yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücreleri farklı glikoz konsantrasyonlarında inkübasyona bırakıldı. Üç günün sonunda MTT analizleri gerçekleştirildi.

4.19.2. Farklı Glikoz Konsantrasyonlarının E2F1 Protein Seviyesi Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada ektopik yabancı tip E2F1 ekspresyon gösteren HEK293 hücrelerinde farklı glikoz konsantrasyonlarının E2F1 protein seviyesi üzerine olan etkilerini araştırdık. 24 saat farklı glikoz konsantrasyonlarındaki besiyerinde kültüre edilen bu hücrelerden lizat elde ettik ve bunun 100 mikrogramını %10 poliakrilamid jelde yürütüp PVDF membrana transfer ettik ve membranı anti-E2F1 antikoruna ile işaretledik (Şekil 4.45).

Şekil 4.45’de de gösterildiği gibi ortamdaki glukoz konsantrasyonu, E2F1 protein seviyesini etkilemektedir. Buna göre en yüksek E2F1 ekspresyonu 8g/L glikoz konsantrasyonunda gözlenirken; en düşük E2F1 protein seviyesi 1g/L glikoz konsantrasyonunda saptanmaktadır.

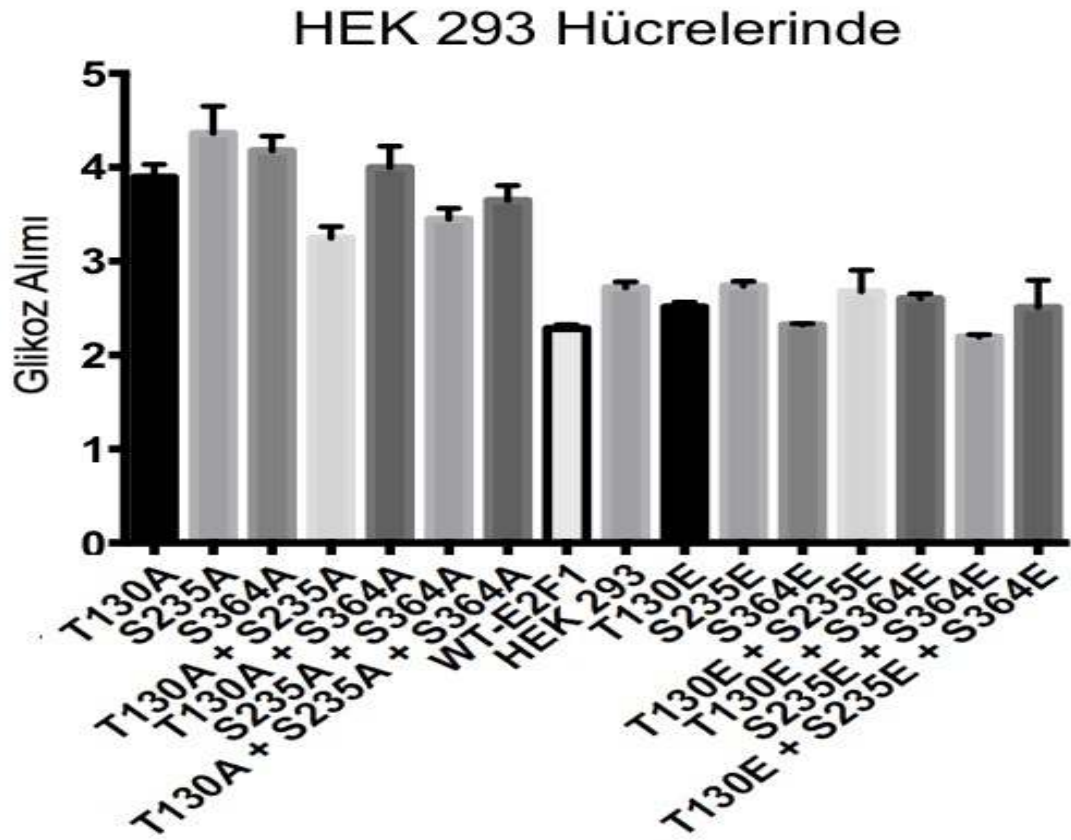


Şekil 4.45. E2F1 transfekte HEK293 hücrelerinde farklı glikoz konsantrasyonlarındaki E2F1 protein seviyelerinin western blot tekniği ile gösterilmesi. Farklı glikoz konsantrasyonlarına tabi tutulan hücrelerden toplanan lizatlarda E2F1 işaretlemesi ve aynı blotlarda GAPDH işaretlemesi yapıp, E2F1 sinyal intensiteleri GAPDH sinyallerine oranlanarak normalizasyon sağlanmıştır.

4.19.3. Yabanıl Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Fosforilasyon Mutantlarının Glukoz Alınımı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

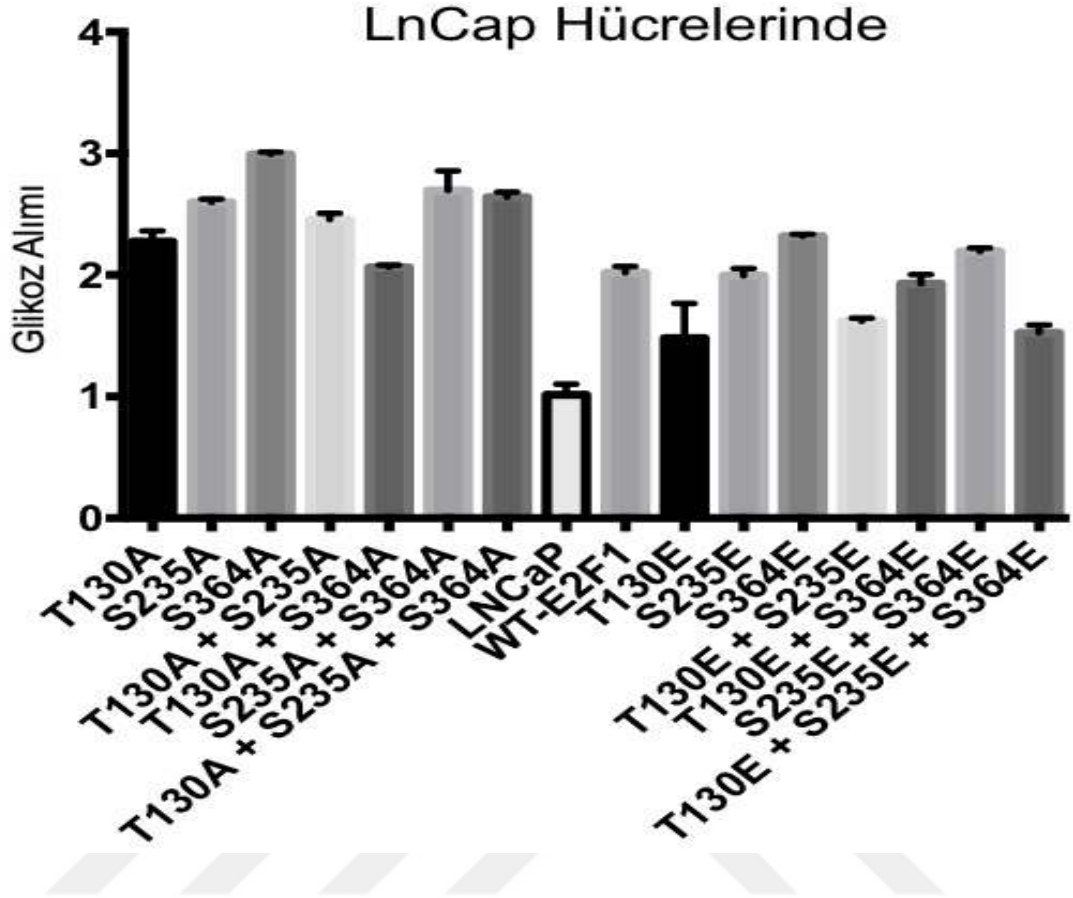
PKA tarafından fosforile edilen E2F1'in hücrenin glukoz alımı üzerine etkilerini belirlemek için mutant vektörleri ektopik olarak eksprese eden hücreleri FBS'li ortamda eşit sayıda ektik (n:3) Ertesi gün, hücreler glukoz bulunmayan besiyeri ortamıyla yıkandı. Bir grup sadece floresan işaretli glukoz analogu içeren glukozsuz besiyeri ile diğer grup ise glukoz analogu ve 100 ng/mL insülin içeren glukozsuz besiyeri ile 30 dakika inkübe edildi.

Şekil 4.46'da görüldüğü gibi yabanıl tip E2F1 ektopik ekspresyonunun hücre içine glikoz alınımını, yabanıl tip HEK293 hücrelerine göre azalttığı görülürken, muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin Alanin mutantları, glukoz alınımını anlamlı bir şekilde arttırmıştır. PKA fosforilasyon bölgelerinin Glutamik asit mutantlarının glukoz alımı üzerine olan etkisi ise daha sınırlı olmuştur.



Şekil 4.46. Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını ifade eden HEK293 hücrelerinin normal koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi. Hücrelerin 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi ve %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde gece boyu inkübe edildi. Hücreler, glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımı ile muamele edildi ve hücrelerin CTCF değerleri hesaplandı.

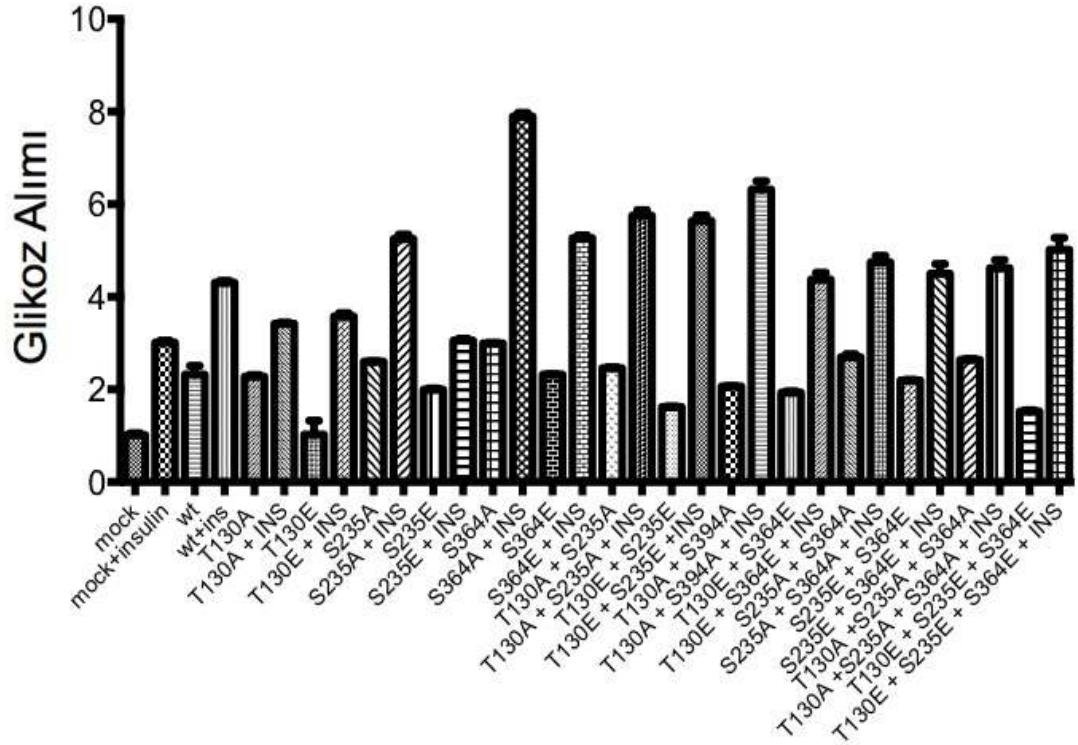
E2F1'in glukoz alımı üzerine olan etkisinin hücre tipine bağlı olup olmadığını göstermek için aynı deneyi LNCaP hücre hattında tekrarladık. HEK293 hücre hattının aksine, yabanıl tip E2F1 transfekte LNCaP hücrelerinde boş vektörle transfekte hücrelere göre glukoz alımı artmıştı. Bu hücrelerde, bütün E2F1 plazmidleri glukoz alımını arttırırken, HEK293'e benzer şekilde, glukoz alımının en bariz arttığı hücreler E2F1 Alanin mutantları ile transfekte edilmiş hücreler olmuştur. (Şekil 4.47).



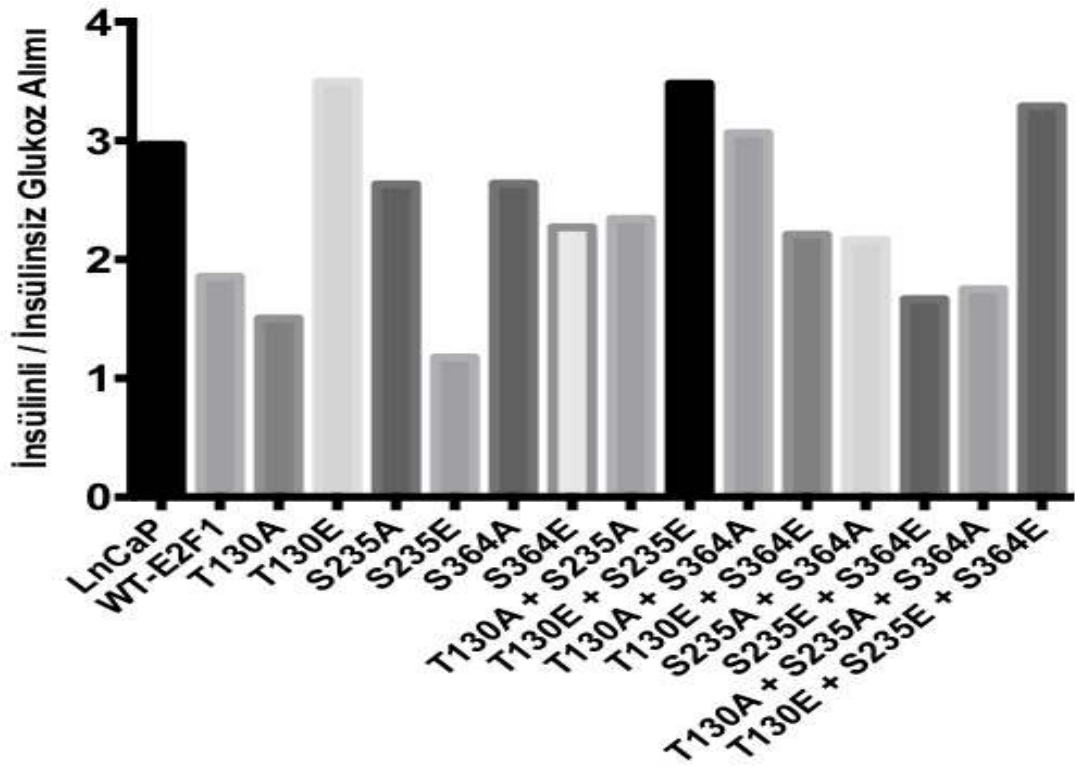
Şekil 4.47. Yabancıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını ifade eden LNCaP hücrelerinin normal koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi. Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi ve %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde gece boyu inkübe edildi. Hücreler, glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımı ile muamele edildi ve hücrelerin CTCF değerleri hesaplandı.

Ektopik E2F1 ekspresyonunun bazal seviye glukoz alımına olumlu etki yaptığını gösterdikten sonra, E2F1 ekspresyonunun insülin-aracılı glukoz alımını nasıl etkileyeceğini sorguladık. Şekil 4.48’de görüldüğü gibi en fazla glukoz alımı, insülin varlığında S364A ve T130A/S364A mutantlarında gözlenmiştir (Şekil 4.48). Bunun yanı sıra, insülin duyarlılığı E2F1 T130E, T130E/S235E ve T130E/S235E/S364E mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerde en fazla artmıştır (Şekil 4.49).

LnCaP Hücrelerinde



Şekil 4.48. Yabancıl tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını ifade eden LNCaP hücrelerinin normal koşullarda insülin muamelesinde glukoz alım miktarlarının belirlenmesi. Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi ve %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde gece boyu inkübe edildi. Hücreler, glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımı ve 100 ng/µl insülin ile muamele edildi.



Şekil 4.49. Yabancı tip E2F1 ve E2F1 proteininin A ve E mutantlarını eksprese eden LNCaP hücrelerinin insülin aracılı glukoz alımının değerlendirilmesi. E2F1 mutantları ile transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinin insülin varlığında hücre içine aldığı glukoz miktarı insülinli ortamda hücre içine aldığı glukoz miktarına bölünerek glukoz alımının insülin duyarlılığı (fold induction) değerlendirildi.

4.20. Yabancı Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Kemoterapi Duyarlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

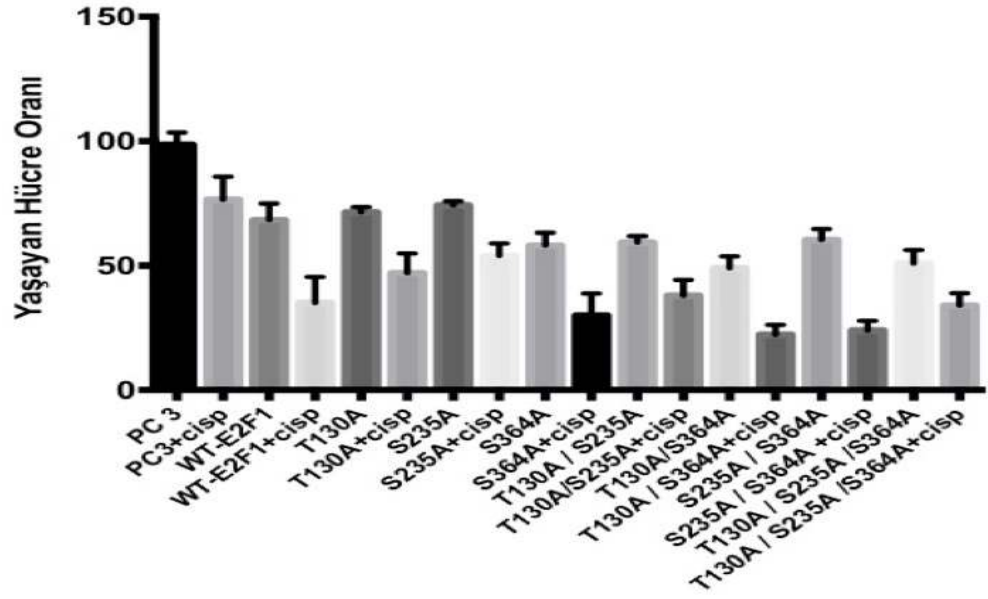
E2F1'in PKA tarafından fosforilasyonunun hücre proliferasyonu ve glukoz alınımı üzerine etki ettiğini belirlememiz, bu modifikasyonun kanser hücrelerinin kemoterapötiklere verdiği cevabı da etkileyebileceğini düşünmemize neden oldu. PKA tarafından fosforile edilen E2F1'in kemoterapi etkinliği üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla prostat kanseri hücre hattı (PC3), prostat kanseri lenf nodu metastaz hücre hattı (LNCaP), Büyük Hücreli Akciğer Kanseri hücre hattı (H1299) ve transforme insan embriyonik böbrek hücre hattı (293T) hücreleri yabancı tip ve mutant vektörler ile transfekte edildikten 24 saat sonra 2 µg/ml dozda Sisplatin muamelesi yapılmış ve hücreler Cisplatin ile 72 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

4.20.1. Yabancıl Tip E2F1 ve PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Sisplatin Duyarlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

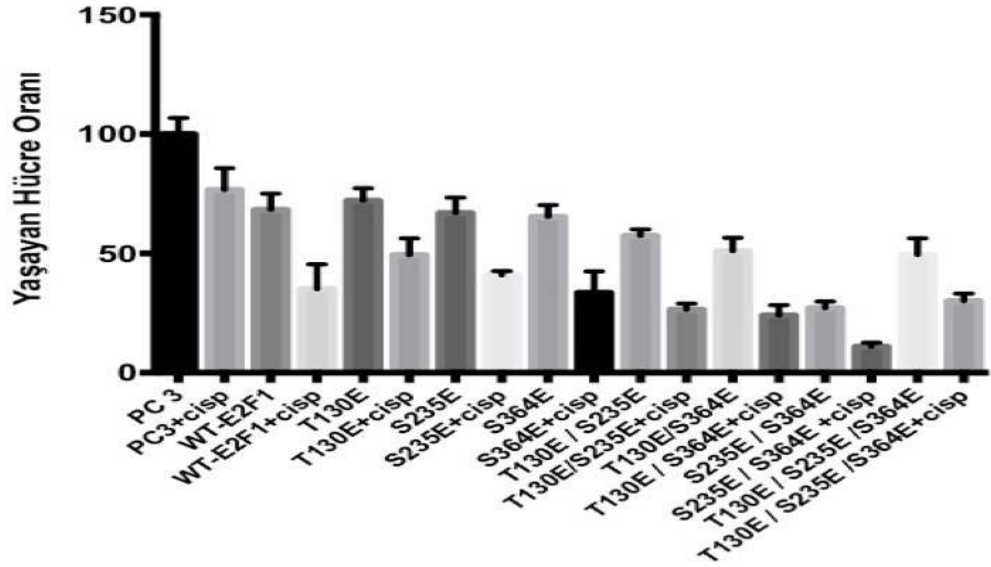
E2F1 mutantlarının sisplatin duyarlılığına etkisinin incelendiği dört hücre hattında da transfeksiyonlar sisplatinli 5, sisplatinsiz 5 tekrar olmasını sağlayacak şekilde 10'ar tekrar halinde gerçekleştirildi.

Prostat Kanseri hücre hattı olarak bilinen PC3 hücre hattında, ektopik E2F1 ekspresyonu, sisplatin duyarlılığını yabancıl tip PC3 hücre hattına göre yaklaşık iki kat arttırmışken, S235A haricindeki bütün A mutantlarında boş plazmidle transfekte edilmiş PC3 hücrelerine göre artmış sisplatin duyarlılığı gözlenmiştir (Şekil 4.50A). Beklenilenin aksine, E2F1'in bütün E mutantlarında da yine sisplatin duyarlılığında artış gözlenmiştir (Şekil 4.50B).

A)



B)

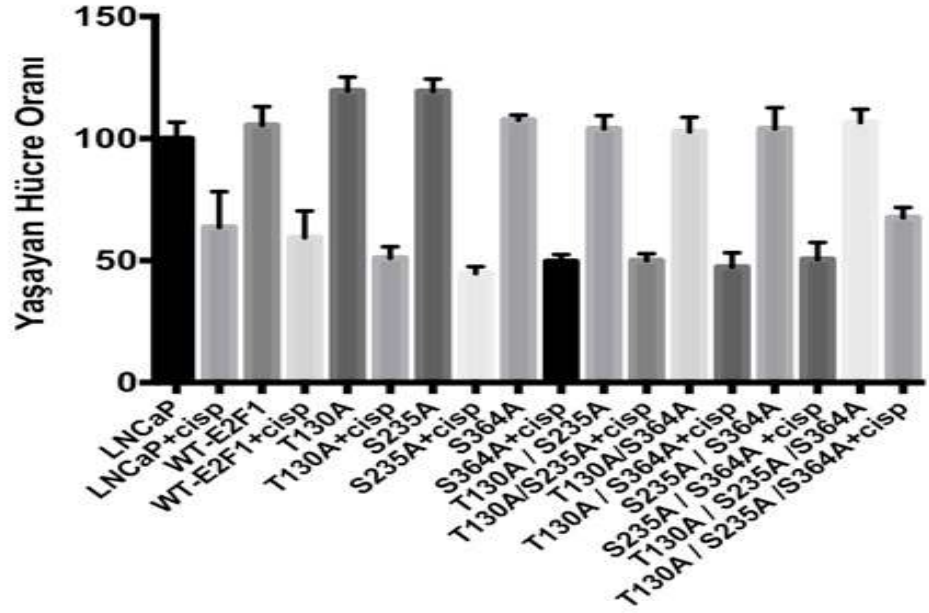


Şekil 4.50. E2F1 mutantlarının PC3 hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 5 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabında E2F1 A mutantları (A) ve E mutantları (B) ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası 24.saatte, sisplatin uygulanacak kuyulara 2µg/well olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözölen sisplatin verildi. Üç gün inkübasyon sonunda MTT analizi gerçekleştirildi.

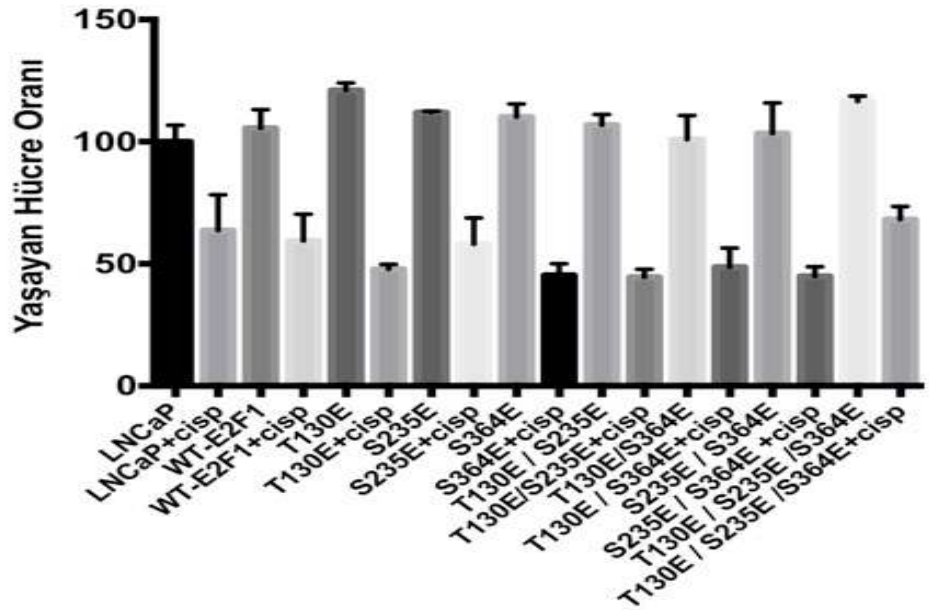
Yabanıl tip E2F1 ve E2F1 PKA bölge mutantlarının ektopik ekspresyonunun prostat kanserinin lenf nodu metastazı olan LnCAP hücreleri üzerindeki etkisine baktığımızda ise mutant ya da yabanıl tip E2F1'in sisplatin duyarlılığı üzerindeki etkisi dikkate değer seviyede değildir (Şekil 4.51A ve Şekil 4.51B).

LNCaP ve PC3 hücrelerinin yanı sıra, prostattan farklı doku kökenli bir kanser hücre hattında E2F1 mutantlarının sisplatin duyarlılığına olan etkisini tespit edebilmek amacıyla, aynı deneyi H1299 hücrelerinde tekrarladığımızda, bu hücrelerin normalde sisplatin aracılı ölüme direnç gösterdiğini, E2F1 transfeksiyonuyla sisplatine bir nebze de olsa duyarlılık gösterdiğini belirledik. E2F1'in T130A ve S235A mutantları ise, yabanıl tip E2F1'in aksine sisplatin duyarlılığını pozitif değil negatif etkilemiştir. Bilhassa hücre proliferasyonu arttıran E2F1 mutantları ise sisplatin duyarlılığına pozitif katkıda bulunmuştur (Şekil 4.52A ve Şekil 4.52B)

A)

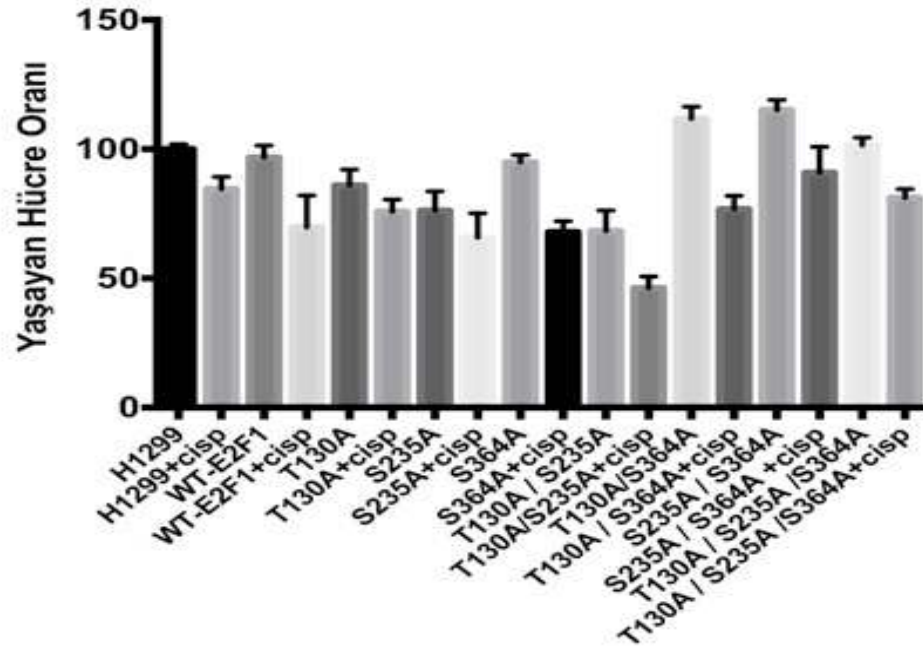


B)

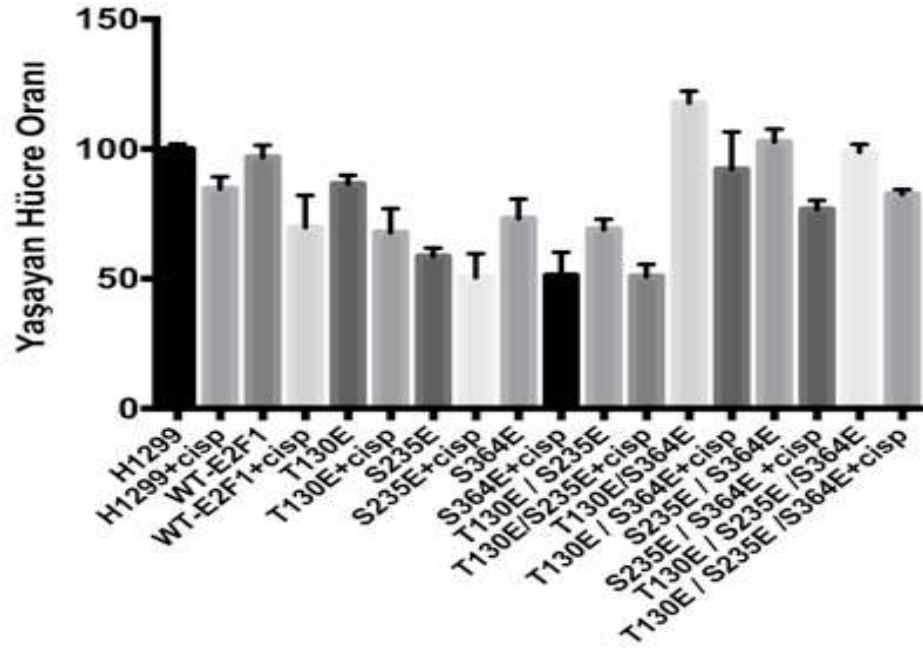


Şekil 4.51. E2F1 mutantlarının LNCaP hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 5 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabında E2F1 A mutantları (A) ve E mutantları (B) ile transfeke edildi. Transfeksiyon sonrası 24.saatte, sisplatin uygulanacak kuyulara 2µg/well olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözülen sisplatin verildi. Üç gün inkübasyon sonunda MTT analizi gerçekleştirildi.

A)



B)

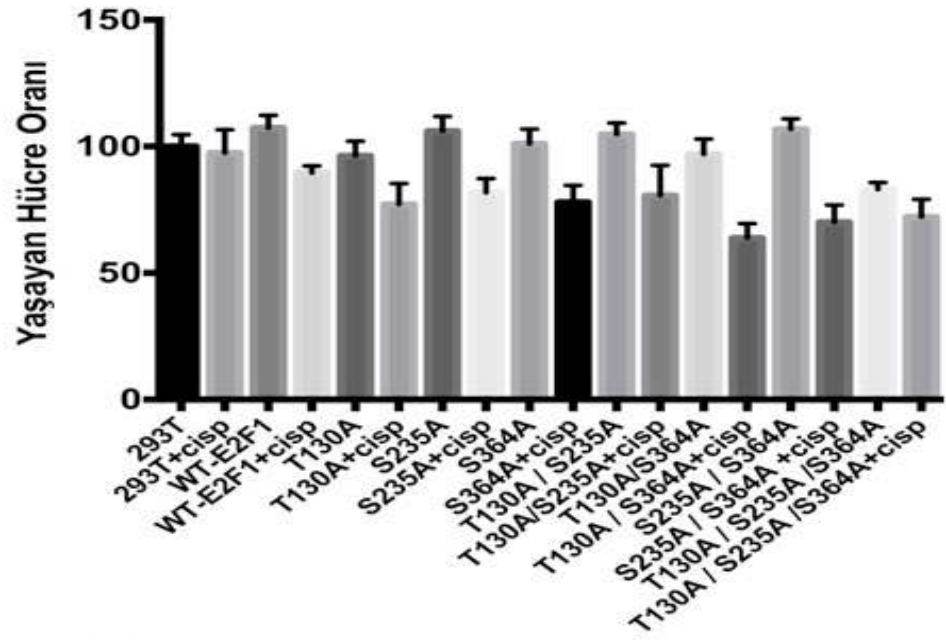


Şekil 4.52. E2F1 mutantlarının H1299 hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 5 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabında E2F1 A mutantları (A) ve E mutantları (B) ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası 24.saatte, sisplatin uygulanacak kuyulara 2µg/well olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözölen sisplatin verildi. Üç gün inkübasyon sonunda MTT analizi gerçekleştirildi.

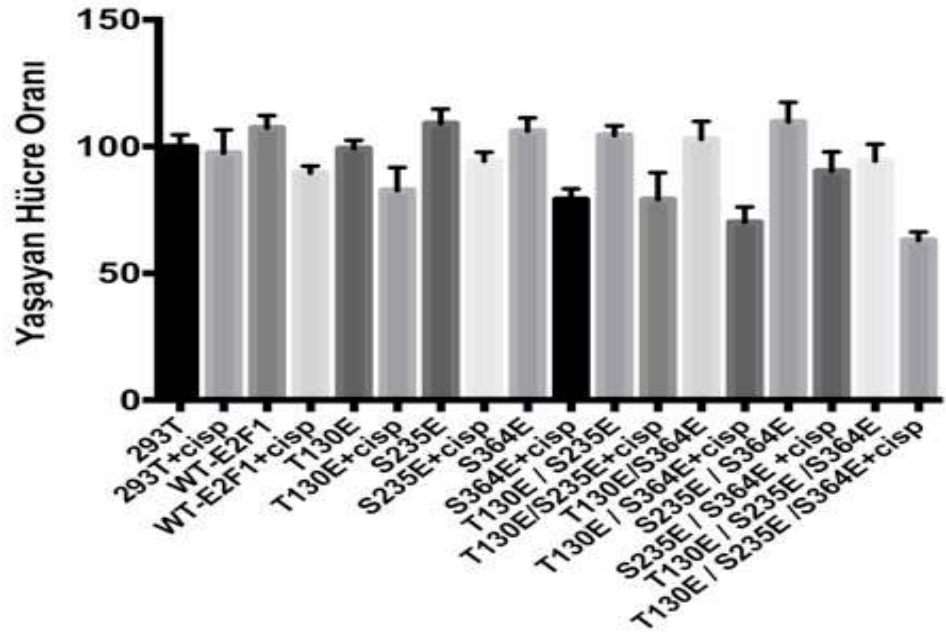
Kanser hücrelerinde E2F1'in PKA fosforilasyon mutantlarının sisplatin duyarlılığına karşı belirgin bir etkisi olmadığını belirlediğimiz için, aynı durumun E1A ve SV40-T antijeni ile transforme edilmiş 293T hücrelerinde de geçerli olup olmadığını inceledik. Şekil 4.53A ve şekil 4.53B'de görüldüğü gibi, 293T hücreleri normalde sisplatin dirençli hücrelerken, E2F1 ektopik ekspresyonuyla sisplatin duyarlı hale gelmektedir. Her ne kadar E2F1 A mutantları E2F1 ile transfekte edilmemiş 293T hücrelerine göre sisplatine daha duyarlı olsa da (Şekil 4.53A), E2F1 E mutantlarıyla edinilen sisplatin duyarlılığı çok daha fazladır (Şekil 4.53B).



A)



B)



Şekil 4.53. E2F1 mutantlarının 293T hücrelerinin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin belirlenmesi Hücreler 10000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 5 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabında E2F1 A mutantları (A) ve E mutantları (B) ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası 24.saatte, sisplatin uygulanacak kuyulara 2µg/well olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözölen sisplatin verildi. Üç gün inkübasyon sonunda MTT analizi gerçekleştirildi.

TARTIŞMA

E2F transkripsiyon faktör ailesi, 8 üye ve 10 farklı izoformdan oluşup, hücre döngüsünün, replikasyonun (Johnson *ve ark.* 1993), mitozun (Sotillo *ve ark.* 2007), DNA hasar tamirinin (Polager *ve ark.* 2002, Biswas *ve Johnson* 2012), apoptozis (Field *ve ark.* 1996) ve farklılaşmanın (Persengiev *ve ark.* 1999, Amanullah *ve ark.* 2000, Fajas *ve ark.* 2002, Wong *ve ark.* 2003, Deschenes *ve ark.* 2004) düzenlenmesi gibi birçok farklı ve önemli süreçte rol alır. Bu ailenin tanımlanmış ilk üyesi olan E2F1, transkripsiyonel kontrol altında olup, maksimum ekspresyonu hücre döngüsünün G1/S geçişinde gözlenir (Cam *ve Dynlacht* 2003, DeGregori *ve Johnson* 2006). E2F1'in, transkripsiyonel kontrolünün yanı sıra , Rb bağlanması ile (Bandara *ve La Thangue* 1991, Kaelin *ve ark.* 1992) ve çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarla (Bagchi *ve ark.* 1989) da hücre içi seviyesi ve transkripsiyonel etkinliği kontrol edilmektedir.

E2F1'in geçirdiği post-translasyonel modifikasyonlar, DNA bağlanma etkinliğini ve stabilitesini kontrol edebilmektedir. Örneğin; asetilasyon E2F1 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma etkinliğini ve stabilizasyonunu sağlarken (Marzio *ve ark.* 2000), metilasyon ve NEDDilasyon DNA bağlanma etkinliğini düşürüp, ubiquitinleşmesine yol açarak degradasyonu için sinyal teşkil eder (Kontaki *ve Talianidis* 2010, Xie *ve ark.* 2011, Loftus *ve ark.* 2012). E2F1 fosforilasyonu ise, E2F1 stabilitesi ya da DNA bağlanma etkinliği üzerinde farklı etkilere yol açabilmektedir. Örneğin; ATM ve Chk2 tarafından gerçekleştirilen fosforilasyonlar, E2F1 stabilizasyonunu sağlarken (Berkovich *ve Ginsberg* 2003, Rogoff *ve ark.* 2004), p34cdc2 tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon E2F1'in Rb ile etkileşimini engelleyerek aktivitesinin artmasına neden olur (Fagan *ve ark.* 1994). Stres indüklü kinaz JNK1 tarafından E2F1'in fosforile edilmesi ise, E2F1 stabilitesinde azalmaya ve DNA bağlanma etkinliğinde düşmeye yol açmaktadır (Wang *ve ark.* 1999). 1989 yılında, E2F1'in post-translasyonel modifikasyonlara uğradığının ilk kez gösterildiği yayında, fosfatazlarla muamele edilen E2F1'in DNA bağlanma yetisini kaybettiği, fosfataz ile muamele edildikten sonra cAMP bağımlı protein kinaz tarafından *in vitro* fosforilasyona uğratıldığında ise E2F1'in DNA'ya bağlanma aktivitesini tekrar kazandığı rapor edilmiştir (Bagchi *ve ark.* 1989). Çeyrek asırdan daha fazla bir süre

önce yayınlanan bu bulguya rağmen, cAMP bağımlı protein kinazın E2F1'i hücre içerisinde de fosforile edip edemediğine, eğer fosforile ediyorsa bu fosforilasyonun hangi koşullarda hangi aminoasitlerde gerçekleştiğine ve fosforilasyonun gerçekleşmesi yahut engellenmesi durumunda ne gibi sonuçlar doğduğuna dair herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

cAMP bağımlı protein kinaz, ya da daha sonra verilen adıyla protein kinaz A (PKA), birçok hücresel faaliyet için, özellikle de hücre metabolizmasıyla ilgili süreçlerde önemli roller oynamaktadır. PKA, cAMP tarafından aktive edilmesi nedeniyle bir tür glukoz sensörü gibi davranması ve birçok farklı yolla hücre içi glukoz alımını ve glukoz metabolizmasını düzenlemesinin yanı sıra (Chernogubova ve ark. 2004, Jensen 2007, Subramanian ve ark. 2009, Kim ve ark. 2012, Kaihara ve ark. 2015), hücre döngüsünün kontrolünde de rol oynar. *Xenopus* yumurtalarında yapılan bir çalışmada, PKA'nın S fazına geçiş açısından olmazsa olmaz bir protein olduğu saptanmış (Costanzo ve ark. 1999). PKA aktivitesinin inhibe edilmesiyle Cdc6'nın kromatinden ayrılışının engellenmesi, bu durumun altında yatan nedenlerden biri olarak belirtilmiştir. Çok daha yakın bir zamanda, *Saccharomyces cerevisiae*'de yapılan çalışmada ise, PKA'nın G1/S geçişini kontrol etmesinde rol oynayan bir diğer protein olarak Swi4 gösterilmiştir (Amigoni ve ark. 2015). S fazına geçişin kontrolünün yanı sıra, mitoz esnasında (Searle ve ark. 2004) ya da mitozdan çıkışta (Anghileri ve ark. 1999) da PKA'nın rol oynadığı bilinmektedir. Hem PKA, hem de E2F1 hücre döngüsü açısından bu kadar önemliyken, E2F1 ve PKA arasındaki bağlantı ve birbirleri üzerindeki kontrol mekanizmaları da önemli hale gelmektedir.

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, E2F1'in PKA tarafından fosforile edilip edilmediğini; eğer E2F1, PKA tarafından fosforile ediliyorsa, bu fosforilasyonun E2F1'in hücre proliferasyonu, apoptozis, hedef gen ekspresyonu, glukoz alımı ve kemoterapötiklere verilen cevap gibi süreçlerdeki rolünü nasıl etkilediğini belirlemeyi amaçladık. Kendi yaptığımız E2F1 ekspresyon vektörünü kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile HEK293 hücrelerine transfekte ettik ve

Geneticin ile vektörlerimizi kararlı şekilde bulunduran hücre klonlarını (stable transformants) seçtik ve sonraki çalışmalar için bu klonları kullandık.

Hipotezimiz, hücre içi cAMP miktarını artıran ve Adenilat Siklaz aktivatörü olan Forskolin ile HEK293 hücrelerini muamele ettiğimizde PKA aktivasyonunun E2F1 protein seviyesine olumlu veya olumsuz etki edeceği şeklindeydi. Şekil 4.15’de de görüldüğü gibi Forskolin muamelesinin 16. saatinde E2F1 ekspresyon seviyesinin dikkate değer seviyede düştüğü ve ardından tekrar yükselişe geçtiği görülmektedir. E2F1 seviyesindeki bu değişimin, cAMP miktarına bağlı olarak PKA aktivitesinden mi, yoksa cAMP tarafından aktive edilen diğer yollar aracılığı ile mi gerçekleştiğini anlayabilmek için, aynı deneyi PKA inhibitörü varlığında tekrarladığımızda, E2F1 seviyesindeki değişimin ortadan kalktığını saptadık (Şekil 4.16). Dolayısıyla, forskolin muamelesi ile E2F1 seviyesindeki değişimin doğrudan cAMP yükselmesinden ziyade, cAMP aracılığıyla gerçekleşen PKA aktivasyonundan kaynaklandığı sonucuna vardık.

PKA aktivasyonu sağlandığında hücre içi E2F1 miktarındaki dalgalanma, E2F1’in PKA aktivasyonu durumunda zamana bağlı olarak degradasyona uğrayıp, daha sonra geri besleme mekanizması sayesinde hücre içi seviyesinin normale dönmesine işaret edebilir. Bunun yanı sıra, E2F1’in PKA tarafından fosforilasyonunun antikör tanıma bölgesi (epitop) üzerinde gerçekleşmesi, bunun da E2F1’in bu antikör tarafından tanınmasını engellemesi ihtimali de söz konusudur. Nitekim S364 noktası, antikör epitopu içerisindedir. Hücre içi fosfatazlar, forskolin muamelesinden önce verdiğimiz fosfataz inhibitörünün 24. Saat itibarıyla etkisinin azalması sayesinde E2F1’in PKA tarafından uğradığı fosforilasyonu ortadan kaldırıp, E2F1’i tekrar antikör tarafından tanınabilir hale getirmiş olabilir.

PKA aktivasyonu sonucunda E2F1, PKA tarafından fosforile edilerek proteozomal degradasyon açısından hedef haline geliyor olabilir. Bu olasılığı sorgulamak için, proteazom inhibitörü laktasistin varlığında forskolinin E2F1 seviyesini nasıl değiştirdiğini araştırdık. Her ne kadar PKA aktivasyonunun E2F1 miktarında yol açtığı düşüş proteazomların inhibisyonu ile ortadan kalkıyor olsa da,

laktasistin forskolin olmaksızın tek başına verildiğinde E2F1 seviyesinde forskolinden daha yüksek bir düşüşe yol açmaktadır. Bunun nedeni, proteozomal degradasyonla kontrol edilen bir proteinin E2F1 seviyesini kontrol etmesi, veya E2F1'in proteazom sisteminin yokluğunda ubiquitinlenmesinin bu proteinin antikör tarafından tanınmasını bloke etmesi olabilir. Eğer ikinci olasılık geçerliyse, PKA tarafından meydana getirilen bir fosforilasyon, E2F1 ubiquitinasyonu için engelleyici rol oynuyor olmalıdır. Birinci olasılığın geçerli olması durumundaysa, E2F1'in degradasyonunda proteozom sistemi değil, başka bir sistem rol oynuyor olmalıdır. Bu sistem, E2F1'in hedefi de olan ve E2F1 üzerinde potansiyel kesim noktası bulunan kaspaz-3 enzimi olabilir. Bu nedenle, bir sonraki aşamada kaspaz-3 inhibitörü ve laktasistin ile beraber forskolinin etkisini sorguladık. Laktasistin E2F1 seviyesinde meydana getirdiği düşüş, kaspaz-3'ün inhibisyonu ile ortadan kalkmaktadır. Kaspaz-3 inhibisyonu, aynı zamanda forskolinin E2F1 seviyesinde meydana getirdiği düşüşü de ortadan kaldırmakta, fakat tek başına uygulandığında yine E2F1 seviyesinde düşüşe yol açmaktadır. Bu durumda, eğer E2F1 hem proteozom hem de kaspaz-3 tarafından parçalanıyorsa kaspaz-3 inhibitörü varlığında E2F1 seviyesindeki azalma proteozom komponentlerinden bazılarının kaspaz-3 hedefi olduğunu düşündürmektedir.

Beklendiği gibi E2F1'in PKA tarafından hücre içi koşullarda fosforile edilebilmesi için, öncelikle bu iki protein arasında fiziksel bir bağlanmanın olması gerekir. Bu nedenle, E2F1 ve PKA proteinlerinin her ikisini de forskolin muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerden immunopresipitasyon yoluyla çöktürüp her iki kompleks içerisinde karşılıklı (resiprokal) bağlanmayı göstermek istedik. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi *in vivo* şartlarda PKA ve E2F1 birbirine bağlanmakta ve bağlanma forskolin aracılı PKA aktivasyonu durumunda daha da kuvvetlenmektedir. İki protein arasındaki bağlanmanın gösterilmesinden sonra hücrelerden immunopresipitasyon ile çöktürülen E2F1'in, saf PKA katalitik alt ünitesi ile *in vitro* kinaz reaksiyonu kurulup reaksiyon ürünleri PKA sübstrat antikoru ile işaretlendiğinde, PKA'nın E2F1'i fosforile de edebildiğini de belirledik (Şekil 4.18).

E2F1'in PKA tarafından fosforilasyonunun E2F1 fonksiyonunu nasıl etkilediğini araştırabilmek için, E2F1 üzerindeki potansiyel PKA fosforilasyon bölgelerini Alanin (A) ve glutamik asit (E) aminoasitlerine dönüştürdük. Elde ettiğimiz mutantların transfeksiyonu ile ektopik E2F1 ekspresyonu sağlayabildiğimizi belirledikten sonra (Şekil 4.27, Şekil 4.28) bu mutantların E2F1 fonksiyonuna nasıl etki edeceğini belirlemeye çalıştık.

E2F1, hücre döngüsünün kontrolündeki anahtar transkripsiyon faktörlerinden biri olduğu için, hücre proliferasyonu üzerine de doğrudan bir etkisi söz konusudur. Hücre proliferasyonunu sorgularken, hem hücre döngüsünün aktif fazlarında bulunan hücre miktarı, hem de halihazırda metabolik aktivite gösteren, yani yaşayan hücre sayısının önem arz edeceğini düşündük.

Hücre döngüsünün aktif fazında bulunan hücre miktarını belirlemek için, Ki67 işaretlemesinden faydalandık. Ki67, mitoz esnasında kromozomların yüzeyinde, G1, G2 ve S fazlarında ise nükleusta bulunan bir proteindir. G0 evresindeki hücrelerde ise ekspresyonu bulunmamaktadır (Scholzen ve Gerdes 2000). Dolayısıyla bu proteinin işaretlenmesiyle, hücre döngüsünün aktif fazlarındaki hücreler saptanabilir. E2F1 mutantları ile stabil transfeksiyona uğratılmış hücrelerde, E2F1'in PKA fosforilasyonunu taklit eden mutantların hücre döngüsüne girişi yavaşlattığını, PKA fosforilasyonunun engellendiği mutantlarında ise hücre döngüsünün aktif fazında bulunan hücre miktarını arttırdığını, dolayısıyla sıklusa girişi kolaylaştırdığını saptadık.

Hücre döngüsünün aktif fazında ya da dinlenme fazında olduğu fark etmeksizin, metabolik aktivite gösteren, yani yaşayan hücre miktarının belirlenmesinde, MTT analizinden faydalandık. MTT, yani 3-(4,5-dimetillthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, hücresel NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktazlar tarafından formazan'a indirgenir. Formazan'ın renginin yoğunluğuna yönelik kolorimetrik analizlerle, o anda analiz edilen örneklerdeki metabolik aktivite gösteren hücre miktarı göreceli olarak hesaplanabilir (Mosmann 1983). MTT analizi de, Ki67 deneyiyle tutarlı olarak, proliferasyonun E2F1'in A mutantları tarafından

arttırıldığını, E mutantları tarafından ise yabancı tip E2F1'e göre anlamlı bir şekilde baskılandığını gösterdi. Dolayısıyla, E2F1'in PKA tarafından fosforilasyonunun, E2F1'in proliferatif özelliğini baskılamak yönünde bir etki gösterdiği iddia edilebilir.

E2F1, hücre döngüsünün düzenlenmesinin yanı sıra, apoptozisin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Qin ve ark. 1994, Shan ve Lee 1994). Bu nedenle, E2F1 mutantlarının proliferasyona olan etkisi hakkında daha net bir kanıya varabilmemiz için, E2F1 aracılı apoptozisin E2F1 fosforilasyon mutantları tarafından nasıl düzenlendiğini de belirlememiz gerektiğini düşündük. Kaspaz-3 aktivasyon miktarının belirlendiği analizde, yabancı tip E2F1'in, kaspaz-3 aktivasyonunu boş plazmidle transfekte edilmiş hücrelere göre yaklaşık %50 oranında arttırdığını belirledik. E mutantlarındaki kaspaz aktivasyonu yabancı tip E2F1'e göre çok daha yüksekken, A mutantlarında kaspaz 3 aktivasyonunun azaldığını saptadık. Özellikle T130A/S364A mutanlığı, kaspaz 3 aktivasyonunu boş plazmidle transfekte edilmiş hücreden bile daha düşük bir seviyeye çekmiştir (Şekil 4.43). Bu sonuçlara göre, hücre içi cAMP miktarının artmasına paralel olarak aktive olan PKA bizim belirlediğimiz üç amino asit üzerinden E2F1'i fosforile ettiğinde E2F1'in hedef gen tercihini değiştirmekte ve E2F1'in apoptozis indüksiyonuna sebep olan kaspaz-3 gibi genlerin promotoruna yönlendirmektedir.

E2F1, hem kaspaz-3'ü hem de Apaf1 gibi apoptotik genlerin ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Matsumura ve ark. 2003). Bu nedenle, kaspaz-3 ekspresyonunun E2F1 fosforilasyon mutantlarından nasıl etkilendiğini de araştırdık. Gerçek zamanlı PCR ile kaspaz 3 transkripsiyon seviyesini incelediğimizde, beklediğimiz aksine yabancı tip E2F1 ile transfekte edilmiş hücrelerin kaspaz-3 transkripsiyon seviyesinin boş plazmidle transfekte edilmiş HEK293 hücrelerine göre daha düşük olduğunu saptadık. E2F1'in tekli E mutantları, kaspaz-3 ekspresyonunu baskılamaya yönelik etki gösterirken, tekli A mutantları kaspaz-3 transkripsiyonunu yabancı tip E2F1'e göre arttırmaktaydı. Her ne kadar bu tablo kaspaz 3 aktivasyon sonuçlarıyla tam olarak tutarlı görünmese de, en düşük kaspaz-3 aktivasyonu gösteren mutant T130A/S364A'nın kaspaz 3 mRNA seviyesinin yabancı tipe göre daha düşük olması, en yüksek kaspaz-3 aktivasyonuna yol açan mutant T130E/S235E/S364E'nin

aynı zamanda en yüksek kaspaz 3 mRNA seviyesine sahip olması tutarlı bir sonuç olarak görünmektedir. Kaspaz-3 mRNA seviyesinin yanı sıra, E2F1 mutantlarının kaspaz-3 protein seviyesine olan etkisini araştırdığımızda, T130A/S364A mutanti ile transfekte edilmiş hücrelerin yabancı tip E2F1 ile transfekte edilmiş hücrelere göre daha yüksek kaspaz-3 proteinine sahip olduğunu, T130E/S235E/S364E mutantiyla transfekte edilmiş hücrelerinse yabancı tip E2F1 ile transfekte edilmiş hücrelerle aynı seviyede kaspaz 3 proteini barındırdığını saptadık. Dolayısıyla, kaspaz-3 mRNA ve protein seviyeleri göz önüne alındığında; E2F1'in özellikle E mutantlarının kaspaz-3 aktivasyonuna olan etkisinin kaspaz-3 indüksiyonundan ziyade, diğer apoptotik proteinlerin ekspresyon/aktivasyonu ile oluştuğunu iddia edebiliriz.

E2F1'in apoptozis ve proliferasyon dengesinin ayarlanmasında önemli olan bir diğer hedefi p53'e baktığımızda, E2F1'in S235A, T130A/S364A ve S235A/S364A mutantlarını eksprese eden hücrelerde p53 seviyesinin arttığını; ancak, E mutantlarında p53 seviyesini anlamlı bir şekilde etkilenmediğini saptadık (Şekil 4.33). p53 protein seviyesinde herhangi bir değişimin gözlenmemesi üzerine p53 mRNA ifadeleri arasındaki farkın incelenmesine gerek duyulmadı.

E2F1'in transkripsiyonel olarak kontrol ettiği ve hücre döngüsünde görev alan diğer bir protein olan CREB'in (Chae ve ark. 2015) protein seviyelerinin değişimine baktığımızda E2F1'in özellikle S235A/S364A mutantları başta olmak üzere E2F1'in PKA tarafından fosforilasyonunun engellendiği mutantlarda CREB'in protein seviyesinin arttığını, E mutantlarının ise CREB seviyesini anlamlı bir şekilde etkilemediğini saptadık (Şekil 4.35). Bunun üzerine, E2F1 mutantlarının CREB mRNA seviyesine etki edip etmediğini incelediğimizde hem Alanin hem de Glutamik Asit mutantlarının mRNA seviyesini artırdığını saptadık. Bir genin protein seviyesi ile mRNA'sı arasındaki tutarsızlık, ilgili proteinin translasyon sonrası modifikasyona uğrama ihtimalini akıllara getirmektedir (Saeki ve ark. 1999). Bu ifade farkları sonrası p-CREB seviyeleri incelendiğinde p-CREB seviyelerinde bir değişim olduğu görülmektedir. Bu değişimlerin anlamlı olarak değerlendirilmesi bakımından mutantların p-CREB/CREB oranı hesaplandı (Şekil 4.42). Sonuçlar incelendiğinde E2F1'in ektopik ekspresyonunun CREB fosforilasyon oranının azalmasına neden

olduğunu saptadık. CREB proteinin fosforilasyon oranını en aşağı seviyeye çeken S235A mutanıtı iken; T130A, S364A ve T130A/S235A/S364A mutantrları yabarııl tip E2F1 ile aynı seviyede CREB fosforilasyonuna neden olmuştur. Öte yandan, T130A/S364A ve özellikle S235A/S364A mutantrları CREB fosforilasyon oranını ciddi seviyede artırmakta, S235E/S364E mutanıtı ise CREB'in fosforilasyonunu adeta yok etmektedir. Özellikle, S235A/S364A ve S235E/S364E'nin CREB fosforilasyonu üzerine olan etkilerinin zıt olması ya PKA tarafından fosforile edilen E2F1'in CREB defosforilasyonunu indüklediğini ya da PKA'yı kendinde tutuklayarak (sequester) CREB fosforilasyonunu engellediğini düşündürmektedir.

Hücre proliferasyonu enerji üretimine bağılı bir süreçtir ve E2F1'in bu süreçte görev almış olabileceğine yönelik ilk bulgular fonksiyonel olarak aktif olmayan pRB varlığında oksidatif metabolizmanın artması ile gösterilmiştir (Hansen *ve ark.* 2004). pRB'nin bu özelliğı deney hayvanları ile yapılan deneyler ile de doğrulanmıştır. Farelerde pRB'nin adipoz doku spesifik knock-out edilmesi adipoz dokuda mitokondri sayısının artmasına ve bazı mitokondriyal genlerin ekspresyonlarının indüklenmesine sebep olmuştur. (Dali-Youcef *ve ark.* 2007). Benzer şekilde E2F1'in hücre içinde susturulması durumunda da mitokondriyal biyogenezin arttığı gösterilmiştir (Goto *ve ark.* 2006). Bu bulgular, pRB/E2F1 yolağının hücrenin enerji metabolizması üzerinde etkin rol oynadığını düşündürmektedir. Ektopik E2F1 ekspresyonunun olduğı hücrelerde yüksek proliferasyon seviyesiyle birlikte aerobik glikolizin de arttığı gösterilmesine rağmen E2F1'in kaybı da farelerin kas dokusundaki glikoz oksidasyonunu arttırmaktadır. E2F1, glikoz oksidasyonu üzerindeki etkisini besin sensörü olarak görev yapan ve glukoz oksidasyon inhibitörü olan PDK-4 (Piruvat Dehidrogenaz Kinaz 4) enziminin transkripsiyonunu artırarak gösterir (Sugden ve Holness 2006), yani E2F1-aracılı PDK-4 indüksiyonu glikoz oksidasyonunu baskılar (Hsieh *ve ark.* 2008), bu durum muhtemelen negatif geri besleme mekanizması olarak kullanılmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda, PKA-aracılı E2F1 fosforilasyonunun glukoz metabolizması üzerinde etkisi olup olmadığını belirlemek için ilk olarak E2F1 ve ortamdaki glukoz konsantrasyonu arasında ilişki olup olmadığı incelendi. Şekil

4.45’de görüldüğü gibi glukoz konsantrasyonunun artmasına paralel olarak hücresel E2F1 seviyesinin de arttığı ve 8g/L glukoz konsantrasyonunda en yüksek seviyeye çıktığı görülmektedir, her ne kadar 20g/L glukoz konsantrasyonunda E2F1 seviyesi biraz azalsa da yinede bu noktadaki e2F1 seviyesi 1g/L glukoz konsantrasyonuna göre daha yüksektir. Bu sonuçlara göre, artan glukoz konsantrasyonu, E2F1 stabilizasyonuna katkı sağlayarak E2F1 seviyesinin yükselmesine sebep olmaktadır. 20 g/L glikoz varlığında hem hücre proliferasyonunun hem E2F1 seviyesinin azalması literatürde de belirtilen glikoz toksisitesi ile uyumludur (Lorenzi *ve ark.* 1985). Her ne kadar ektopik E2F1 ekspresyonu göstermeyen hücrelerde 4g/L glukoz varlığında hücre proliferasyonu daha fazla gözlenirse de ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücrelerinde artan glukoz ve artan E2F1 miktarları ile orantılı bir proliferasyon söz konusu değildir, hatta glukoz toksisitesinin ortadan kalktığı söylenebilir (şekil 4.44). Bu durum E2F1-PDK-4 ekspresyonunun indüksiyonuna bağlı olarak glikoliz ve devamında oksidatif fosforilasyonun dengelenmesi olarak açıklanabilir, yani hücrelerde sınırsız bölünme ve enerji üretimine mücadele edilmemektedir.

E2F1-aracılı PDK-4 geninin ekspresyonunun indüklendiği şartlar oluşana kadar artan E2F1 ekspresyonunun aerobik glikolizi ve oksidatif fosforilasyonu artırdığı bilinmektedir. Buna paralel olarak hücre proliferasyonuna enerji sağlamak için E2F1’in hücre içine glukoz alımına etki edebileceğini düşündüğümüzden yabancı tip ve tüm mutantları ektopik olarak eksprese eden hücrelerde “Glikoz Uptake Assay” testinden faydalandık. Şekil 4.46 ve 47’de görüldüğü gibi, 293T hücrelerinde Alanin mutantlarının hepsi hücre içine glukoz alımını artırırken Glutamik asit mutantları bunu fazla etkilememiştir, oysa LnCAP hücrelerinde de Alanin mutantları yabancı tip ve glutamik asit mutantlarına göre daha fazla glukoz alımını indüklemiştir.

Pankreastaki Beta hücrelerinde E2F1’in insülin salınımı, kas ve yağ dokusunda ise insülin duyarlılığı üzerine etkisi olduğu bilinmektedir (Fajas *ve ark.* 2004, Annicotte *ve ark.* 2009, Blanchet *ve ark.* 2011). LNCaP hücrelerinde yapılan deneyde her mutantın insüline bir cevap oluşturduğu saptandı (Şekil 4.48). Normal LNCaP hücrelerinde insülin muamelesi ile glikoz hücre içi alımını yaklaşık üç katına çıkırmıştır.

Yabanıl tip ektopik E2F1 varlığında insüline verilen cevap insülinli ortama göre iki kat daha artmıştır ki bu durum da E2F1'in yüksek insülinli ortamlarda da hücre içine glukoz alımını desteklediğini göstermektedir. E2F1'in PKA tarafından fosforillenmesi sonucu hücre içi glikoz alım oranları ile proliferasyon özellikleri değerlendirildiğinde aslında doğru orantılı bir ilişki olduğu aşıkardır. Yani, E2F1 ektopik ekspresyonu proliferasyon sürecinde enerji kaynağı olan glukozun hücre içine alımını artırarak da proliferasyona katkı yapmaktadır.

pRB/E2F1 yolağı glioblastoma, akciğer, meme, mide, prostat ve kolon kanseri gibi değişik kanser türlerinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Chen ve ark. 2009). Bu yolak, kanser hücrelerinde sadece hücre döngüsünü değil, lipid biyosentezini, glikolizi ve oksidatif fosforilasyonu da düzenleyerek kanser hücresinin proliferasyonunu kontrol eder. Literatürde E2F1 ekspresyon seviyesini ve aktivasyonunu çeşitli anti-kanser tedavilerinin sonucunu da etkilemektedir (Cao ve ark. 2014, Chen ve ark. 2014, Yan ve ark. 2014). E2F1'in post-translasyonel modifikasyonlarının kanser hücrelerinin fizyolojisini etkilediği literatürde belirtilmesine rağmen post-translasyonel modifikasyonun kanser tedavisinde ilaç dirençliliği üzerine etki gösterip göstermediği literatürde bahsedilmemiş bir konudur (Meng ve Ghosh 2014). Bizim sonuçlarımıza göre PKA-aracılı E2F1 fosforilasyonu hücrelerin proliferasyonunu etkilemektedir, ancak bu fosforilasyonunun kanser hücrelerinde kemoterapi ilaçlarına olan duyarlılık üzerine de etki edip etmediği merak edilmiştir. Bu amaçla, PC3, LNCaP, H1299 ve 293T hücre hatlarında E2F1'in yabanıl tip ve mutantlarının ektopik ekspresyonları sağlandıktan sonra bu hücreler 2 µg/ml Sisplatin ile 72 saat inkübe edilmiş ve ardından bu hücrelerin canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Elimizdeki sonuçlara göre yabanıl tip ve mutant E2F1'lerin ektopik ekspresyonu farklı hücrelerde farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Örneğin, p53-negatif olan H1299 akciğer kanser hücrelerinde E2F1'in hem Alanin hem de Glutamik asitin ikili ve üçlü mutantları bu hücreleri Sisplatine dirençli hale çevirirken yine p53-negatif olan prostat kanser hattı PC3 hücrelerinde aynı mutantlar bu hücrelerin Sisplatin duyarlılığını ciddi seviyede arttırmıştır. Oysa, p53-pozitif olan LNCaP ve 293T hücrelerinde mutantların etkisi yabanıl tip E2F1'den farklı değildir. Literatürde de belirtildiği gibi E2F1 yüksek ekspresyonu Sisplatin direncine sebep olmaktadır; ancak

bizim sonuçlarımıza göre E2F1-aracılı cisplatin direnci p53'den bağımsız bir mekanizma ile sağlanıyor görünmektedir.



SONUÇLAR

1. Hücre içi fizyolojik koşullarda, PKA'nın katalitik alt ünitesi ve E2F1 birbirine bağlanmaktadır ve bu bağlanma PKA aktivasyonu ile artmaktadır.
2. E2F1, PKA tarafından fosforile edilebilmektedir.
3. Forskolin aracılı protein kinaz A aktivasyonu, E2F1 protein seviyesini negatif etkilemektedir. Forskolinin bu etkisi, PKA inhibitörü ve kaspaz 3 inhibitörü ile ortadan kaldırılabilir. Proteozom sisteminin inhibisyonu ise forskolinin E2F1 seviyesi üzerindeki negatif etkisini hafifletmektedir.
4. E2F1 üzerindeki üç potansiyel PKA fosforilasyon bölgesinin fosforile edilemez Alanin (A) ve fosforilasyonu taklit eden Glutamik Asit (E) mutantları başarıyla elde edilmiştir.
5. E2F1'in Alanin mutantlarının ektopik ekspresyonu hücre proliferasyonunu arttırmaktadır.
6. E2F1'in Glutamik asit mutantları hücre proliferasyonunu baskılamakta, ve apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır.
7. E2F1'in PKA fosforilasyon bölge mutantları, kaspaz 3, CREB ve p53 proteinlerinin ekspresyonlarını farklı olarak etkilemiştir.
8. Farklı glukoz konsantrasyonları, E2F1'in ektopik ekspresyonunda hücre içi E2F1 protein seviyesinde dalgalanmalara yol açmaktadır.
9. E2F1'in ektopik ekspresyonu, hücre proliferasyonunun glukozla bağlı düzenlenmesini ortadan kaldırmaktadır.

10. E2F1'in PKA tarafından fosforilasyonunun engellenmesi, hücre içi glukoz alımını arttırmaktadır ve bu hücre proliferasyonunun hızlanmasına katkı yapmaktadır.
11. S235 aminoasidinin fosforilasyonu hücrelerin insüline verdiği glukoz alım tepkisini negatif etkilerken, T130 ve S364 aminoasitlerinin fosforilasyonu pozitif etkilemektedir.
12. E2F1'in ektopik ekspresyonu, PC3 (p53-/-), LNCaP (p53 wt), H1299 (p53 -/-) ve 293T (p53 wt) hücrelerinde sisplatin duyarlılığını arttırmıştır.

KAYNAKLAR

- Alasbahi, R. H. and M. F. Melzig** (2012). "*Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP.*" *Pharmazie* **67**(1): 5-13.
- Amanullah, A., B. Hoffman and D. A. Liebermann** (2000). "*Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15(INK4B) and p16(INK4A).*" *Blood* **96**(2): 475-482.
- Amasaki, H., M. Ogawa, J. Nagasao, K. Mutoh, N. Ichihara, M. Asari and K. Shiota** (2003). "*Distributional changes of BrdU, PCNA, E2F1 and PAL31 molecules in developing murine palatal rugae.*" *Ann Anat* **185**(6): 517-523.
- Amigoni, L., S. Colombo, F. Belotti, L. Alberghina and E. Martegani** (2015). "*The transcription factor Swi4 is target for PKA regulation of cell size at the G1 to S transition in Saccharomyces cerevisiae.*" *Cell Cycle* **14**(15): 2429-2438.
- Andreeva, V., J. Cardarelli and P. C. Yelick** (2012). "*Rb1 mRNA expression in developing mouse teeth.*" *Gene Expr Patterns* **12**(3-4): 130-135.
- Andrusiak, M. G., K. A. McClellan, D. Dugal-Tessier, L. M. Julian, S. P. Rodrigues, D. S. Park, T. E. Kennedy and R. S. Slack** (2011). "*Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration.*" *Mol Cell Biol* **31**(2): 238-247.
- Anghileri, P., P. Branduardi, F. Sternieri, P. Monti, R. Visintin, A. Bevilacqua, L. Alberghina, E. Martegani and M. D. Baroni** (1999). "*Chromosome separation and exit from mitosis in budding yeast: dependence on growth revealed by cAMP-mediated inhibition.*" *Exp Cell Res* **250**(2): 510-523.
- Annicotte, J. S., E. Blanchet, C. Chavey, I. Iankova, S. Costes, S. Assou, J. Teyssier, S. Dalle, C. Sardet and L. Fajas** (2009). "*The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion.*" *Nat Cell Biol* **11**(8): 1017-1023.
- Aoki, I., M. Higuchi and Y. Gotoh** (2013). "*NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction.*" *Oncogene* **32**(34): 3954-3964.
- Attwooll, C., E. Lazzerini Denchi and K. Helin** (2004). "*The E2F family: specific functions and overlapping interests.*" *EMBO J* **23**(24): 4709-4716.
- Bagchi, S., P. Raychaudhuri and J. R. Nevins** (1989). "*Phosphorylation-dependent activation of the adenovirus-inducible E2F transcription factor in a cell-free system.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(12): 4352-4356.

- Baldi, A., V. Boccia, P. P. Claudio, A. De Luca and A. Giordano** (1996). "Genomic structure of the human retinoblastoma-related *Rb2/p130* gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4629-4632.
- Bandara, L. R. and N. B. La Thangue** (1991). "Adenovirus *E1a* prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor." *Nature* **351**(6326): 494-497.
- Banerjee, D., R. Gorlick, A. Liefshitz, K. Danenberg, P. C. Danenberg, P. V. Danenberg, D. Klimstra, S. Jhanwar, C. Cordon-Cardo, Y. Fong, N. Kemeny and J. R. Bertino** (2000). "Levels of *E2F-1* expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase." *Cancer Res* **60**(9): 2365-2367.
- Banerjee, D., B. Schnieders, J. Z. Fu, D. Adhikari, S. C. Zhao and J. R. Bertino** (1998). "Role of *E2F-1* in chemosensitivity." *Cancer Res* **58**(19): 4292-4296.
- Bashari, D., D. Hacohen and D. Ginsberg** (2011). "JNK activation is regulated by *E2F* and promotes *E2F1*-induced apoptosis." *Cell Signal* **23**(1): 65-70.
- Beene, D. L. and J. D. Scott** (2007). "A-kinase anchoring proteins take shape." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 192-198.
- Berger, B., D. Capper, D. Lemke, P. N. Pfenning, M. Platten, M. Weller, A. von Deimling, W. Wick and M. Weiler** (2010). "Defective *p53* antiangiogenic signaling in glioblastoma." *Neuro Oncol* **12**(9): 894-907.
- Berkovich, E. and D. Ginsberg** (2003). "ATM is a target for positive regulation by *E2F-1*." *Oncogene* **22**(2): 161-167.
- Biel, M.** (2009). "Cyclic nucleotide-regulated cation channels." *J Biol Chem* **284**(14): 9017-9021.
- Biswas, A. K. and D. G. Johnson** (2012). "Transcriptional and nontranscriptional functions of *E2F1* in response to DNA damage." *Cancer Res* **72**(1): 13-17.
- Blanchet, E., J. S. Annicotte and L. Fajas** (2009). "Cell cycle regulators in the control of metabolism." *Cell Cycle* **8**(24): 4029-4031.
- Blanchet, E., J. S. Annicotte, S. Lagarrigue, V. Aguilar, C. Clape, C. Chavey, V. Fritz, F. Casas, F. Apparailly, J. Auwerx and L. Fajas** (2011). "*E2F* transcription factor-1 regulates oxidative metabolism." *Nat Cell Biol* **13**(9): 1146-1152.
- Blum, R., I. Nakdimon, L. Goldberg, R. Elkon, R. Shamir, G. Rechavi and Y. Kloog** (2006). "*E2F1* identified by promoter and biochemical analysis as a central target of glioblastoma cell-cycle arrest in response to Ras inhibition." *Int J Cancer* **119**(3): 527-538.

Boulogne, B., R. Habert and C. Levacher (2003). "Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and Sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells." *Mol Reprod Dev* **65**(2): 194-203.

Bracken, A. P., M. Ciro, A. Cocito and K. Helin (2004). "E2F target genes: unraveling the biology." *Trends Biochem Sci* **29**(8): 409-417.

Cadd, G. and G. S. McKnight (1989). "Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain." *Neuron* **3**(1): 71-79.

Cam, H. and B. D. Dynlacht (2003). "Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication." *Cancer Cell* **3**(4): 311-316.

Campanero, M. R. and E. K. Flemington (1997). "Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2221-2226.

Campbell, G. R., A. Baudhuin, K. Vranizan and J. Ngai (2011). "Transcription factors expressed in olfactory bulb local progenitor cells revealed by genome-wide transcriptome profiling." *Mol Cell Neurosci* **46**(2): 548-561.

Cao, J. X., S. Y. Li, G. S. An, Z. B. Mao, H. T. Jia and J. H. Ni (2014). "E2F1-regulated DROSHA promotes miR-630 biosynthesis in cisplatin-exposed cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **450**(1): 470-475.

Carthy, C. M., B. Yanagawa, H. Luo, D. J. Granville, D. Yang, P. Cheung, C. Cheung, M. Esfandiarei, C. M. Rudin, C. B. Thompson, D. W. Hunt and B. M. McManus (2003). "Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection." *Virology* **313**(1): 147-157.

Chae, H. D., B. Mitton, N. J. Lacayo and K. M. Sakamoto (2015). "Replication factor C3 is a CREB target gene that regulates cell cycle progression through the modulation of chromatin loading of PCNA." *Leukemia* **29**(6): 1379-1389.

Chang, W. Y., D. M. Bryce, S. J. D'Souza and L. Dagnino (2004). "The DP-1 transcription factor is required for keratinocyte growth and epidermal stratification." *J Biol Chem* **279**(49): 51343-51353.

Chen, D., E. Padiernos, F. Ding, I. S. Lossos and C. D. Lopez (2005). "Apoptosis-stimulating protein of p53-2 (ASPP2/53BP2L) is an E2F target gene." *Cell Death Differ* **12**(4): 358-368.

Chen, H. Z., S. Y. Tsai and G. Leone (2009). "Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control." *Nat Rev Cancer* **9**(11): 785-797.

Chen, J. and R. Iyengar (1994). "*Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated G alpha s.*" *Science* **263**(5151): 1278-1281.

Chen, W., Y. Yang, B. Chen, P. Lu, L. Zhan, Q. Yu, K. Cao and Q. Li (2014). "*MiR-136 targets E2F1 to reverse cisplatin chemosensitivity in glioma cells.*" *J Neurooncol* **120**(1): 43-53.

Chernogubova, E., B. Cannon and T. Bengtsson (2004). "*Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via beta3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs.*" *Endocrinology* **145**(1): 269-280.

Chin, K. V., W. L. Yang, R. Ravatn, T. Kita, E. Reitman, D. Vettori, M. E. Cvijic, M. Shin and L. Iacono (2002). "*Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling.*" *Ann N Y Acad Sci* **968**: 49-64.

Cho, E. C., S. Zheng, S. Munro, G. Liu, S. M. Carr, J. Moehlenbrink, Y. C. Lu, L. Stimson, O. Khan, R. Konietzny, J. McGouran, A. S. Coutts, B. Kessler, D. J. Kerr and N. B. Thangue (2012). "*Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1.*" *EMBO J* **31**(7): 1785-1797.

Cook, S. J. and F. McCormick (1993). "*Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf.*" *Science* **262**(5136): 1069-1072.

Costanzo, V., E. V. Avvedimento, M. E. Gottesman, J. Gautier and D. Grieco (1999). "*Protein kinase A is required for chromosomal DNA replication.*" *Curr Biol* **9**(16): 903-906.

Dailey, L., E. Laplantine, R. Priore and C. Basilico (2003). "*A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation.*" *J Cell Biol* **161**(6): 1053-1066.

Dali-Youcef, N., C. Matak, A. Coste, N. Messaddeq, S. Giroud, S. Blanc, C. Koehl, M. F. Champy, P. Chambon, L. Fajas, D. Metzger, K. Schoonjans and J. Auwerx (2007). "*Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(25): 10703-10708.

Darville, M. I., I. V. Antoine, J. R. Mertens-Strijthagen, V. J. Dupriez and G. G. Rousseau (1995). "*An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis.*" *Oncogene* **11**(8): 1509-1517.

David, M., E. Petricoin, 3rd and A. C. Larner (1996). "*Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells.*" *J Biol Chem* **271**(9): 4585-4588.

De Luca, A., T. K. MacLachlan, L. Bagella, C. Dean, C. M. Howard, P. P. Claudio, A. Baldi, K. Khalili and A. Giordano (1997). "*A unique domain of*

pRb2/p130 acts as an inhibitor of Cdk2 kinase activity." J Biol Chem **272**(34): 20971-20974.

de Olano, N., C. Y. Koo, L. J. Monteiro, P. H. Pinto, A. R. Gomes, R. Aligue and E. W. Lam (2012). "*The p38 MAPK-MK2 axis regulates E2F1 and FOXM1 expression after epirubicin treatment.*" Mol Cancer Res **10**(9): 1189-1202.

DeGregori, J. and D. G. Johnson (2006). "*Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis.*" Curr Mol Med **6**(7): 739-748.

DeGregori, J., T. Kowalik and J. R. Nevins (1995). "*Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes.*" Mol Cell Biol **15**(8): 4215-4224.

del Pozo, J. C., M. B. Boniotti and C. Gutierrez (2002). "*Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light.*" Plant Cell **14**(12): 3057-3071.

Deschenes, C., L. Alvarez, M. E. Lizotte, A. Vezina and N. Rivard (2004). "*The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation.*" J Cell Physiol **199**(2): 262-273.

Di Stefano, L., M. R. Jensen and K. Helin (2003). "*E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes.*" EMBO J **22**(23): 6289-6298.

Dimova, D. K. and N. J. Dyson (2005). "*The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces.*" Oncogene **24**(17): 2810-2826.

Dowdy, S. F., P. W. Hinds, K. Louie, S. I. Reed, A. Arnold and R. A. Weinberg (1993). "*Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins.*" Cell **73**(3): 499-511.

Duronio, R. J., P. H. O'Farrell, J. E. Xie, A. Brook and N. Dyson (1995). "*The transcription factor E2F is required for S phase during Drosophila embryogenesis.*" Genes Dev **9**(12): 1445-1455.

Dyson, N. (1998). "*The regulation of E2F by pRB-family proteins.*" Genes Dev **12**(15): 2245-2262.

Enders, G. H. (2004). "*Colon cancer metastasis: is E2F-1 a driving force?*" Cancer Biol Ther **3**(4): 400-401.

Ertosun, M. G., F. Z. Hapil and O. Osman Nidai (2016). "*E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling.*" Cytokine Growth Factor Rev.

Fagan, R., K. J. Flint and N. Jones (1994). "*Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein.*" *Cell* **78**(5): 799-811.

Fajas, L., J. S. Annicotte, S. Miard, D. Sarruf, M. Watanabe and J. Auwerx (2004). "*Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice.*" *J Clin Invest* **113**(9): 1288-1295.

Fajas, L., R. L. Landsberg, Y. Huss-Garcia, C. Sardet, J. A. Lees and J. Auwerx (2002). "*E2Fs regulate adipocyte differentiation.*" *Dev Cell* **3**(1): 39-49.

Ferrari, S. (2006). "*Protein kinases controlling the onset of mitosis.*" *Cell Mol Life Sci* **63**(7-8): 781-795.

Field, S. J., F. Y. Tsai, F. Kuo, A. M. Zubiaga, W. G. Kaelin, Jr., D. M. Livingston, S. H. Orkin and M. E. Greenberg (1996). "*E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation.*" *Cell* **85**(4): 549-561.

Fogal, V., N. N. Kartasheva, G. Trigiante, S. Llanos, D. Yap, K. H. Vousden and X. Lu (2005). "*ASPP1 and ASPP2 are new transcriptional targets of E2F.*" *Cell Death Differ* **12**(4): 369-376.

Furukawa, Y., N. Nishimura, Y. Furukawa, M. Satoh, H. Endo, S. Iwase, H. Yamada, M. Matsuda, Y. Kano and M. Nakamura (2002). "*Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis.*" *J Biol Chem* **277**(42): 39760-39768.

Garcia-Alvarez, G., V. Ventura, O. Ros, R. Aligue, J. Gil and A. Tauler (2007). "*Glycogen synthase kinase-3beta binds to E2F1 and regulates its transcriptional activity.*" *Biochim Biophys Acta* **1773**(3): 375-382.

Gaubatz, S., G. J. Lindeman, S. Ishida, L. Jakoi, J. R. Nevins, D. M. Livingston and R. E. Rempel (2000). "*E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control.*" *Mol Cell* **6**(3): 729-735.

Geng, Y., Q. Yu, W. Whoriskey, F. Dick, K. Y. Tsai, H. L. Ford, D. K. Biswas, A. B. Pardee, B. Amati, T. Jacks, A. Richardson, N. Dyson and P. Sicinski (2001). "*Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13138-13143.

George, C. M., N. J. Vogelzang, B. I. Rini, F. J. Geoffroy, P. Kollipara and W. M. Stadler (2002). "*A phase II trial of weekly intravenous gemcitabine and cisplatin with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell carcinoma.*" *Ann Oncol* **13**(1): 116-120.

Giacinti, C. and A. Giordano (2006). "*RB and cell cycle progression.*" *Oncogene* **25**(38): 5220-5227.

Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "*Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133.*" *Cell* **59**(4): 675-680.

Goto, Y., R. Hayashi, D. Kang and K. Yoshida (2006). "*Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa cells.*" J Cell Physiol **209**(3): 923-934.

Hansen, J. B., C. Jorgensen, R. K. Petersen, P. Hallenborg, R. De Matteis, H. A. Boye, N. Petrovic, S. Enerback, J. Nedergaard, S. Cinti, H. te Riele and K. Kristiansen (2004). "*Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation.*" Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4112-4117.

Hateboer, G., R. M. Kerkhoven, A. Shvarts, R. Bernards and R. L. Beijersbergen (1996). "*Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins.*" Genes Dev **10**(23): 2960-2970.

Hazar-Rethinam, M., L. Endo-Munoz, O. Gannon and N. Saunders (2011). "*The role of the E2F transcription factor family in UV-induced apoptosis.*" Int J Mol Sci **12**(12): 8947-8960.

Helin, K., E. Harlow and A. Fattaey (1993). "*Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein.*" Mol Cell Biol **13**(10): 6501-6508.

Hitomi, M. and D. W. Stacey (1999). "*Cyclin D1 production in cycling cells depends on ras in a cell-cycle-specific manner.*" Curr Biol **9**(19): 1075-1084.

Hochegger, H., S. Takeda and T. Hunt (2008). "*Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?*" Nat Rev Mol Cell Biol **9**(11): 910-916.

Hofmann, F., F. Martelli, D. M. Livingston and Z. Wang (1996). "*The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway.*" Genes Dev **10**(23): 2949-2959.

Hsieh, M. C., D. Das, N. Sambandam, M. Q. Zhang and Z. Nahle (2008). "*Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex.*" J Biol Chem **283**(41): 27410-27417.

Iaquinta, P. J. and J. A. Lees (2007). "*Life and death decisions by the E2F transcription factors.*" Curr Opin Cell Biol **19**(6): 649-657.

Ichimura, K., H. Hanafusa, H. Takimoto, Y. Ohgama, T. Akagi and K. Shimizu (2000). "*Structure of the human retinoblastoma-related p107 gene and its intragenic deletion in a B-cell lymphoma cell line.*" Gene **251**(1): 37-43.

Inoshita, S., Y. Terada, O. Nakashima, M. Kuwahara, S. Sasaki and F. Marumo (1999). "*Roles of E2F1 in mesangial cell proliferation in vitro.*" Kidney Int **56**(6): 2085-2095.

Irwin, M., M. C. Marin, A. C. Phillips, R. S. Seelan, D. I. Smith, W. Liu, E. R. Flores, K. Y. Tsai, T. Jacks, K. H. Vousden and W. G. Kaelin, Jr. (2000). "*Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis.*" *Nature* **407**(6804): 645-648.

Ivanova, I. A., S. J. D'Souza and L. Dagnino (2005). "*Signalling in the epidermis: the E2F cell cycle regulatory pathway in epidermal morphogenesis, regeneration and transformation.*" *Int J Biol Sci* **1**(2): 87-95.

Ivanova, I. A., K. A. Nakrieko and L. Dagnino (2009). "*Phosphorylation by p38 MAP kinase is required for E2F1 degradation and keratinocyte differentiation.*" *Oncogene* **28**(1): 52-62.

Iwamoto, M., D. Banerjee, L. G. Menon, A. Jurkiewicz, P. H. Rao, N. E. Kemeny, Y. Fong, S. C. Jhanwar, R. Gorlick and J. R. Bertino (2004). "*Overexpression of E2F-1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification.*" *Cancer Biol Ther* **3**(4): 395-399.

Jackman, M., M. Firth and J. Pines (1995). "*Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus.*" *EMBO J* **14**(8): 1646-1654.

Jensen, J. (2007). "*More PKA independent beta-adrenergic signalling via cAMP: is Rap1-mediated glucose uptake in vascular smooth cells physiologically important?*" *Br J Pharmacol* **151**(4): 423-425.

Jiang, Z., P. Liang, R. Leng, Z. Guo, Y. Liu, X. Liu, S. Bubnic, A. Keating, D. Murray, P. Goss and E. Zacksenhaus (2000). "*E2F1 and p53 are dispensable, whereas p21(Waf1/Cip1) cooperates with Rb to restrict endoreduplication and apoptosis during skeletal myogenesis.*" *Dev Biol* **227**(1): 8-41.

Johnson, D. G., J. K. Schwarz, W. D. Cress and J. R. Nevins (1993). "*Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.*" *Nature* **365**(6444): 349-352.

Johnson, J. L., S. Pillai, D. Pernazza, S. M. Sebt, N. J. Lawrence and S. P. Chellappan (2012). "*Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease.*" *Cancer Res* **72**(2): 516-526.

Kaelin, W. G., Jr., W. Krek, W. R. Sellers, J. A. DeCaprio, F. Ajchenbaum, C. S. Fuchs, T. Chittenden, Y. Li, P. J. Farnham, M. A. Blanar and et al. (1992). "*Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties.*" *Cell* **70**(2): 351-364.

Kaihara, K. A., L. M. Dickson, J. H. Ellenbroek, C. M. Orr, B. T. Layden and B. Wicksteed (2015). "*PKA Enhances the Acute Insulin Response Leading to the Restoration of Glucose Control.*" *Diabetes* **64**(5): 1688-1697.

Kim, M. O., Y. J. Lee, J. H. Park, J. M. Ryu, S. P. Yun and H. J. Han (2012). "*PKA and cAMP stimulate proliferation of mouse embryonic stem cells by elevating GLUT1 expression mediated by the NF-kappaB and CREB/CBP signaling pathways.*" *Biochim Biophys Acta* **1820**(10): 1636-1646.

Kong, H. J., H. J. Yu, S. Hong, M. J. Park, Y. H. Choi, W. G. An, J. W. Lee and J. Cheong (2003). "*Interaction and functional cooperation of the cancer-amplified transcriptional coactivator activating signal cointegrator-2 and E2F-1 in cell proliferation.*" *Mol Cancer Res* **1**(13): 948-958.

Kontaki, H. and I. Talianidis (2010). "*Cross-talk between post-translational modifications regulate life or death decisions by E2F1.*" *Cell Cycle* **9**(19): 3836-3837.

Kontaki, H. and I. Talianidis (2010). "*Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death.*" *Mol Cell* **39**(1): 152-160.

Korotayev, K. and D. Ginsberg (2008). "*Many pathways to apoptosis: E2F1 regulates splicing of apoptotic genes.*" *Cell Death Differ* **15**(12): 1813-1814.

Kovesdi, I., R. Reichel and J. R. Nevins (1986). "*Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation.*" *Cell* **45**(2): 219-228.

Krek, W., G. Xu and D. M. Livingston (1995). "*Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint.*" *Cell* **83**(7): 1149-1158.

Kumari, A., T. Iwasaki, S. Pyndiah, E. K. Cassimere, C. D. Palani and D. Sakamuro (2015). "*Regulation of E2F1-induced apoptosis by poly(ADP-ribosylation).*" *Cell Death Differ* **22**(2): 311-322.

Kusek, J. C., R. M. Greene and M. M. Pisano (2001). "*Expression of the E2F and retinoblastoma families of proteins during neural differentiation.*" *Brain Res Bull* **54**(2): 187-198.

La Thangue, N. B. (1994). "*DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control.*" *Curr Opin Cell Biol* **6**(3): 443-450.

Lee, J. O., A. A. Russo and N. P. Pavletich (1998). "*Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7.*" *Nature* **391**(6670): 859-865.

Li, B. and E. DiCicco-Bloom (2004). "*Basic fibroblast growth factor exhibits dual and rapid regulation of cyclin D1 and p27 to stimulate proliferation of rat cerebral cortical precursors.*" *Dev Neurosci* **26**(2-4): 197-207.

- Li, W. W., J. Fan, D. Hochhauser and J. R. Bertino** (1997). "*Overexpression of p21waf1 leads to increased inhibition of E2F-1 phosphorylation and sensitivity to anticancer drugs in retinoblastoma-negative human sarcoma cells.*" *Cancer Res* **57**(11): 2193-2199.
- Lim, S. and P. Kaldis** (2013). "*Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation.*" *Development* **140**(15): 3079-3093.
- Lin, D. L. and C. Chang** (1996). "*p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily.*" *J Biol Chem* **271**(25): 14649-14652.
- Lin, W. C., F. T. Lin and J. R. Nevins** (2001). "*Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation.*" *Genes Dev* **15**(14): 1833-1844.
- Lindstrom, M. S. and K. G. Wiman** (2003). "*Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts.*" *Oncogene* **22**(32): 4993-5005.
- Loftus, S. J., G. Liu, S. M. Carr, S. Munro and N. B. La Thangue** (2012). "*NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription.*" *EMBO Rep* **13**(9): 811-818.
- Lorenzi, M., E. Cagliero and S. Toledo** (1985). "*Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death.*" *Diabetes* **34**(7): 621-627.
- Ma, Y., R. Croxton, R. L. Moorer, Jr. and W. D. Cress** (2002). "*Identification of novel E2F1-regulated genes by microarray.*" *Arch Biochem Biophys* **399**(2): 212-224.
- Marti, A., C. Wirbelauer, M. Scheffner and W. Krek** (1999). "*Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation.*" *Nat Cell Biol* **1**(1): 14-19.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, S. J. Nielsen, A. Brehm and T. Kouzarides** (2000). "*Regulation of E2F1 activity by acetylation.*" *EMBO J* **19**(4): 662-671.
- Marzio, G., C. Wagener, M. I. Gutierrez, P. Cartwright, K. Helin and M. Giacca** (2000). "*E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation.*" *J Biol Chem* **275**(15): 10887-10892.
- Matsumura, I., H. Tanaka and Y. Kanakura** (2003). "*E2F1 and c-Myc in cell growth and death.*" *Cell Cycle* **2**(4): 333-338.

Meng, P. and R. Ghosh (2014). "*Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy?*" *Cell Death Dis* **5**: e1360.

Merdzhanova, G., S. Gout, M. Keramidas, V. Edmond, J. L. Coll, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin (2010). "*The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo.*" *Oncogene* **29**(39): 5392-5403.

Minamide, R., K. Fujiwara, K. Hasegawa and K. Yoshikawa (2014). "*Antagonistic interplay between *necdin* and *Bmi1* controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex.*" *PLoS One* **9**(1): e84460.

Miyamoto, N., H. Izumi, T. Noguchi, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, M. Shiota, A. Kidani, A. Tawara and K. Kohno (2008). "*Tip60 is regulated by circadian transcription factor clock and is involved in cisplatin resistance.*" *J Biol Chem* **283**(26): 18218-18226.

Mohan, V., R. A. Sinha, A. Pathak, L. Rastogi, P. Kumar, A. Pal and M. M. Godbole (2012). "*Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico-genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis.*" *Exp Neurol* **237**(2): 477-488.

Mongan, M., J. Wang, H. Liu, Y. Fan, C. Jin, W. Y. Kao and Y. Xia (2011). "*Loss of MAP3K1 enhances proliferation and apoptosis during retinal development.*" *Development* **138**(18): 4001-4012.

Moreno, M. J., M. Ball, M. F. Andrade, A. McDermid and D. B. Stanimirovic (2006). "*Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) is a novel anti-angiogenic and anti-tumorigenic mediator secreted by dibutyryl cyclic AMP (dB-cAMP)-differentiated glioblastoma cells.*" *Glia* **53**(8): 845-857.

Morgan DO. *The cell cycle: principles of control.* USA, N. S. P., 2007.

Morkel, M., J. Wenkel, A. J. Bannister, T. Kouzarides and C. Hagemeier (1997). "*An E2F-like repressor of transcription.*" *Nature* **390**(6660): 567-568.

Moroni, M. C., E. S. Hickman, E. Lazzerini Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Muller and K. Helin (2001). "*Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53.*" *Nat Cell Biol* **3**(6): 552-558.

Mosmann, T. (1983). "*Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.*" *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.

Muller, H., A. P. Bracken, R. Vernell, M. C. Moroni, F. Christians, E. Grassilli, E. Prosperini, E. Vigo, J. D. Oliner and K. Helin (2001). "*E2Fs regulate the*

expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis." Genes Dev **15**(3): 267-285.

Nelson, M. A., S. H. Reynolds, U. N. Rao, A. C. Goulet, Y. Feng, A. Beas, B. Honchak, J. Averill, D. T. Lowry, J. R. Senft, A. M. Jefferson, R. C. Johnson and L. M. Sargent (2006). "*Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma.*" Cancer Biol Ther **5**(4): 407-412.

Ohta, T. and Y. Xiong (2001). "*Phosphorylation- and Skp1-independent in vitro ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases.*" Cancer Res **61**(4): 1347-1353.

Ohtani, K., J. DeGregori and J. R. Nevins (1995). "*Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1.*" Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12146-12150.

Olmos, Y., J. J. Brosens and E. W. Lam (2011). "*Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer.*" Drug Resist Updat **14**(1): 35-44.

Ormondroyd, E., S. de la Luna and N. B. La Thangue (1995). "*A new member of the DP family, DP-3, with distinct protein products suggests a regulatory role for alternative splicing in the cell cycle transcription factor DRTF1/E2F.*" Oncogene **11**(8): 1437-1446.

Page, B. D., S. Guedes, D. Waring and J. R. Priess (2001). "*The C. elegans E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling.*" Mol Cell **7**(3): 451-460.

Paggi, M. G., A. Baldi, F. Bonetto and A. Giordano (1996). "*Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review.*" J Cell Biochem **62**(3): 418-430.

Peart, M. J., M. V. Poyurovsky, E. M. Kass, M. Urist, E. W. Verschuren, M. K. Summers, P. K. Jackson and C. Prives (2010). "*APC/C(Cdc20) targets E2F1 for degradation in prometaphase.*" Cell Cycle **9**(19): 3956-3964.

Pediconi, N., F. Guerrieri, S. Vossio, T. Bruno, L. Belloni, V. Schinzari, C. Scisciani, M. Fanciulli and M. Levrero (2009). "*hSirT1-dependent regulation of the PCAF-E2F1-p73 apoptotic pathway in response to DNA damage.*" Mol Cell Biol **29**(8): 1989-1998.

Peeper, D. S., P. Keblusek, K. Helin, M. Toebes, A. J. van der Eb and A. Zantema (1995). "*Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro.*" Oncogene **10**(1): 39-48.

Persengiev, S. P., Kondova, II and D. L. Kilpatrick (1999). "*E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation.*" Mol Cell Biol **19**(9): 6048-6056.

Pillai, S., M. Kovacs and S. Chellappan (2010). "Regulation of vascular endothelial growth factor receptors by Rb and E2F1: role of acetylation." *Cancer Res* **70**(12): 4931-4940.

Polager, S. and D. Ginsberg (2008). "E2F - at the crossroads of life and death." *Trends Cell Biol* **18**(11): 528-535.

Polager, S., Y. Kalma, E. Berkovich and D. Ginsberg (2002). "E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis." *Oncogene* **21**(3): 437-446.

Powers, J. T., S. Hong, C. N. Mayhew, P. M. Rogers, E. S. Knudsen and D. G. Johnson (2004). "E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis." *Mol Cancer Res* **2**(4): 203-214.

Prasad, K. N., W. C. Cole, X. D. Yan, P. Nahreini, B. Kumar, A. Hanson and J. E. Prasad (2003). "Defects in cAMP-pathway may initiate carcinogenesis in dividing nerve cells: a review." *Apoptosis* **8**(6): 579-586.

Qin, G., R. Kishore, C. M. Dolan, M. Silver, A. Wecker, C. N. Luedemann, T. Thorne, A. Hanley, C. Curry, L. Heyd, D. Dinesh, M. Kearney, F. Martelli, T. Murayama, D. A. Goukassian, Y. Zhu and D. W. Losordo (2006). "Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 11015-11020.

Qin, X. Q., D. M. Livingston, W. G. Kaelin, Jr. and P. D. Adams (1994). "Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10918-10922.

Rall, T. W. and E. W. Sutherland (1958). "Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles." *J Biol Chem* **232**(2): 1065-1076.

Rocha-Sanchez, S. M. and K. W. Beisel (2007). "Pocket proteins and cell cycle regulation in inner ear development." *Int J Dev Biol* **51**(6-7): 585-595.

Rogoff, H. A., M. T. Pickering, F. M. Frame, M. E. Debatis, Y. Sanchez, S. Jones and T. F. Kowalik (2004). "Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2968-2977.

Rogue, P. J., J. P. Humbert, A. Meyer, S. Freyermuth, M. M. Krady and A. N. Malviya (1998). "cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca²⁺-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9178-9183.

Rovani, M. K., C. B. Brachmann, G. Ramsay and A. L. Katzen (2012). "The dREAM/Myb-MuvB complex and Grim are key regulators of the programmed death of neural precursor cells at the *Drosophila* posterior wing margin." *Dev Biol* **372**(1): 88-102.

Saeki, K., A. Yuo and F. Takaku (1999). "*Cell-cycle-regulated phosphorylation of cAMP response element-binding protein: identification of novel phosphorylation sites.*" *Biochem J* **338** (Pt 1): 49-54.

Salon, C., G. Merdzhanova, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin (2007). "*E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors.*" *Oncogene* **26**(48): 6927-6936.

Sato, S., T. Sugimura, K. Yoda and S. Fujimura (1975). "*Morphological differentiation of cultured mouse glioblastoma cells induced by dibutyl cyclic adenosine monophosphate.*" *Cancer Res* **35**(9): 2494-2499.

Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "*The Ki-67 protein: from the known and the unknown.*" *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.

Schuler, M. and D. R. Green (2001). "*Mechanisms of p53-dependent apoptosis.*" *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 6): 684-688.

Searle, J. S., K. L. Schollaert, B. J. Wilkins and Y. Sanchez (2004). "*The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression.*" *Nat Cell Biol* **6**(2): 138-145.

Sevetson, B. R., X. Kong and J. C. Lawrence, Jr. (1993). "*Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10305-10309.

Shan, B. and W. H. Lee (1994). "*Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis.*" *Mol Cell Biol* **14**(12): 8166-8173.

Shankland, S. J. and G. Wolf (2000). "*Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis.*" *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(4): F515-529.

Sherr, C. J. (1996). "*Cancer cell cycles.*" *Science* **274**(5293): 1672-1677.

Sherr, C. J. (1998). "*Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway.*" *Genes Dev* **12**(19): 2984-2991.

Slansky, J. E., Y. Li, W. G. Kaelin and P. J. Farnham (1993). "*A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter.*" *Mol Cell Biol* **13**(3): 1610-1618.

Smith, F. D., L. K. Langeberg and J. D. Scott (2006). "*The where's and when's of kinase anchoring.*" *Trends Biochem Sci* **31**(6): 316-323.

- Songyang, Z., S. Blechner, N. Hoagland, M. F. Hoekstra, H. Piwnica-Worms and L. C. Cantley** (1994). "*Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases.*" *Curr Biol* **4**(11): 973-982.
- Sotillo, R., E. Hernando, E. Diaz-Rodriguez, J. Teruya-Feldstein, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe and R. Benezra** (2007). "*Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice.*" *Cancer Cell* **11**(1): 9-23.
- Stanelle, J. and B. M. Putzer** (2006). "*E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics.*" *Trends Mol Med* **12**(4): 177-185.
- Stanelle, J., T. Stiewe, C. C. Theseling, M. Peter and B. M. Putzer** (2002). "*Gene expression changes in response to E2F1 activation.*" *Nucleic Acids Res* **30**(8): 1859-1867.
- Steffensen, K. D., M. Waldstrom and A. Jakobsen** (2009). "*The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer.*" *Int J Gynecol Cancer* **19**(5): 820-825.
- Steinberg, S. F. and L. L. Brunton** (2001). "*Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes.*" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 751-773.
- Stevens, C., L. Smith and N. B. La Thangue** (2003). "*Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage.*" *Nat Cell Biol* **5**(5): 401-409.
- Stork, P. J. and J. M. Schmitt** (2002). "*Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation.*" *Trends Cell Biol* **12**(6): 258-266.
- Subramanian, S., P. Glitz, H. Kipp, R. K. Kinne and F. Castaneda** (2009). "*Protein kinase-A affects sorting and conformation of the sodium-dependent glucose co-transporter SGLT1.*" *J Cell Biochem* **106**(3): 444-452.
- Sugden, M. C. and M. J. Holness** (2006). "*Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases.*" *Arch Physiol Biochem* **112**(3): 139-149.
- Sun, H., Y. Chang, B. Schweers, M. A. Dyer, X. Zhang, S. W. Hayward and D. W. Goodrich** (2006). "*An E2F binding-deficient Rb1 protein partially rescues developmental defects associated with Rb1 nullizygosity.*" *Mol Cell Biol* **26**(4): 1527-1537.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger and G. Kroemer** (1999). "*Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.*" *Nature* **397**(6718): 441-446.

Suzuki, A. and A. Hemmati-Brivanlou (2000). "*Xenopus* embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis." *Mol Cell* **5**(2): 217-229.

Takahashi, C., N. Sasaki and S. Kitajima (2012). "*Twists in views on RB functions in cellular signaling, metabolism and stem cells.*" *Cancer Sci* **103**(7): 1182-1188.

Takahashi, Y., J. B. Rayman and B. D. Dynlacht (2000). "*Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression.*" *Genes Dev* **14**(7): 804-816.

Tanaka, T., T. Ono, N. Kitamura and J. Y. Kato (2003). "*Dominant negative E2F inhibits progression of the cell cycle after the midblastula transition in Xenopus.*" *Cell Struct Funct* **28**(6): 515-522.

Taylor, S. S., C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. Brown, J. Wu and N. Kannan (2008). "*Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design.*" *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 16-26.

Teodoro, J. G., S. K. Evans and M. R. Green (2007). "*Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome.*" *J Mol Med (Berl)* **85**(11): 1175-1186.

Thomassen, M., Q. Tan and T. A. Kruse (2008). "*Gene expression meta-analysis identifies metastatic pathways and transcription factors in breast cancer.*" *BMC Cancer* **8**: 394.

Tsai, K. Y., Y. Hu, K. F. Macleod, D. Crowley, L. Yamasaki and T. Jacks (1998). "*Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos.*" *Mol Cell* **2**(3): 293-304.

Tsai, S. Y., R. Opavsky, N. Sharma, L. Wu, S. Naidu, E. Nolan, E. Feria-Arias, C. Timmers, J. Opavska, A. de Bruin, J. L. Chong, P. Trikha, S. A. Fernandez, P. Stromberg, T. J. Rosol and G. Leone (2008). "*Mouse development with a single E2F activator.*" *Nature* **454**(7208): 1137-1141.

Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "*Mechanisms of specificity in protein phosphorylation.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-541.

Van Den Broeck, A., D. Nissou, E. Brambilla, B. Eymin and S. Gazzeri (2012). "*Activation of a Tip60/E2F1/ERCC1 network in human lung adenocarcinoma cells exposed to cisplatin.*" *Carcinogenesis* **33**(2): 320-325.

van der Watt, P. J., E. Ngarande and V. D. Leaner (2011). "*Overexpression of Kpnbeta1 and Kpnalpha2 importin proteins in cancer derives from deregulated E2F activity.*" *PLoS One* **6**(11): e27723.

Vandel, L. and T. Kouzarides (1999). "*Residues phosphorylated by TFIIF are required for E2F-1 degradation during S-phase.*" *EMBO J* **18**(15): 4280-4291.

Verheyde, J., L. de Saint-Georges, L. Leyns and M. A. Benotmane (2006). "*The role of Trp53 in the transcriptional response to ionizing radiation in the developing brain.*" *DNA Res* **13**(2): 65-75.

Vossler, M. R., H. Yao, R. D. York, M. G. Pan, C. S. Rim and P. J. Stork (1997). "*cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway.*" *Cell* **89**(1): 73-82.

Wang, B., K. Liu, F. T. Lin and W. C. Lin (2004). "*A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis.*" *J Biol Chem* **279**(52): 54140-54152.

Wang, S., N. Nath, A. Minden and S. Chellappan (1999). "*Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases.*" *EMBO J* **18**(6): 1559-1570.

Weinberg, R. A. (1995). "*The retinoblastoma protein and cell cycle control.*" *Cell* **81**(3): 323-330.

Wikonkal, N. M., E. Remenyik, D. Knezevic, W. Zhang, M. Liu, H. Zhao, T. R. Berton, D. G. Johnson and D. E. Brash (2003). "*Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice.*" *Nat Cell Biol* **5**(7): 655-660.

Wong, C. F., L. M. Barnes, A. L. Dahler, L. Smith, M. M. Serewko-Auret, C. Popa, I. Abdul-Jabbar and N. A. Saunders (2003). "*E2F modulates keratinocyte squamous differentiation: implications for E2F inhibition in squamous cell carcinoma.*" *J Biol Chem* **278**(31): 28516-28522.

Wu, X. and A. J. Levine (1994). "*p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3602-3606.

Xie, Q., Y. Bai, J. Wu, Y. Sun, Y. Wang, Y. Zhang, P. Mei and Z. Yuan (2011). "*Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death.*" *J Recept Signal Transduct Res* **31**(2): 139-146.

Yan, L. H., W. Y. Wei, W. L. Cao, X. S. Zhang, Y. B. Xie and Q. Xiao (2014). "*Overexpression of E2F1 in human gastric carcinoma is involved in anti-cancer drug resistance.*" *BMC Cancer* **14**: 904.

Yang, J. and S. Kornbluth (1999). "*All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners.*" *Trends Cell Biol* **9**(6): 207-210.

Yasui, W., K. Naka, T. Suzuki, J. Fujimoto, K. Hayashi, N. Matsutani, H. Yokozaki and E. Tahara (1999). "*Expression of p27Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma.*" *Oncol Rep* **6**(5): 983-987.

Yu, F., J. Megyesi, R. L. Safirstein and P. M. Price (2007). "*Involvement of the CDK2-E2F1 pathway in cisplatin cytotoxicity in vitro and in vivo.*" *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(1): F52-59.

Zhang, S. Y., S. C. Liu, D. G. Johnson and A. J. Klein-Szanto (2000). "*E2F-1 gene transfer enhances invasiveness of human head and neck carcinoma cell lines.*" *Cancer Res* **60**(21): 5972-5976.

Zhang, W., B. Vazquez, V. Andreeva, D. Spear, E. Kong, P. W. Hinds and P. C. Yelick (2012). "*Discrete phosphorylated retinoblastoma protein isoform expression in mouse tooth development.*" *J Mol Histol* **43**(3): 281-288.

Zhao, J., R. Ramos and M. Demma (2013). "*CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation.*" *Oncogene* **32**(30): 3520-3530.

Zou, C., Y. Wang and Z. Shen (2005). "*2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement.*" *J Biochem Biophys Methods* **64**(3): 207-215.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Gökhan ERTOSUN, MD

1. KİŞİSEL BİLGİLER:

AD : Mustafa Gökhan ERTOSUN
DOĞUM TARİHİ : 20 Ocak 1986
ADRES : Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı/ ANTALYA

2. EĞİTİM:

2010- Tıbbi Genetik Doktora,
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD/Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tez: “E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Aktivasyonunda Protein Kinaz A'nın Rolünün Araştırılması”
Danışman: Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ
2004 - 2010 Tıp Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya, Türkiye.
2001 – 2004 Lise, Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi, Ankara, Türkiye

3. GÖREV ALDIĞI PROJELER:

- E2F1 Transkripsiyon Faktörünün Aktivasyonunda Protein Kinaz A'nın Rolünün Araştırılması
- Kompozit Doku Nakli Yapılan Hastalarda miRNA Ekspresyon Profili
- Böbrek Nakli Hastalarında miRNA İşlenmesinde Görev Alan Komponentlerin Ekspresyon Profili
- Obez Olmayan Diyabete Dirençli (NOR) Farelerde Diyabet Oluşturucu Etkisinin Araştırılması
- Metastatik ve Non-Metastatik Tümörlerde Nefronektin Ekspresyonu

- TWIST1 transkripsiyon faktörünün aktivasyon mekanizmasının araştırılması
- Tümör Nekrosis Faktör Reseptör 1'in (TNFR1) aktivasyon mekanizmasının Araştırılması.

4. ÖDÜLLER:

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. Nisan 2013 | 2.Ödülü, Diabetes Mellitus En İyi Bilimsel Yayın
Türkiye Diyabet Vakfı |
| 2. 09-11 Nisan 2010 | 1.Ödülü, Poster Sunumu
II. Pamukkale Üniversitesi Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi
Denizli, Türkiye |
| 3. 26-28 Mart 2010 | 1.Ödülü, Sözel Araştırma Sunumu
II. Akdeniz Üniversitesi Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi
Antalya, Türkiye |
| 4. Ekim 2007 | Teşvik Ödülü,
XII. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diabet Kongresi
Eskişehir, Türkiye |

5. ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER:

- 1. ERTOSUN, M. G., F. Z. HAPIL AND O. OSMAN NIDAI (2016).** "*E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling.*" Cytokine Growth Factor Rev.
- 2. KAHRAMAN, S., E. DIRICE, F. Z. HAPIL, M. G. ERTOSUN, S. OZTURK, T. S. GRIFFITH, S. SANLIOGLU AND A. D. SANLIOGLU (2011).** "*Tracing of islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging.*" Diabetes Metab Res Rev 27(6): 575-583.

6. ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER:

1. Mustafa Gökhan ERTOSUN, Özlenen ÖZKAN, Ömer ÖZKAN. "Transplantations Which Might Shed Light on Organ Rejections: Composite Tissue Transplantations", Akdeniz Tıp Dergisi. DOI:10.17954/amj.2015.12

7. BİLDİRİLER ve SUNUMLAR:

1. Sayra DİLMAÇ, Nuray ERİN, Necdet DEMİR, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Gamze TANRIÖVER. "*Nephronectin is decreased in metastatic breast carcinoma and related to metastatic organs*" Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye. 30 Nisan- 3 Mayıs 2016
2. **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Fatma Zehra HAPİL, Osman Nidai ÖZEŞ. "*Post-translational regulation of E2F1 activity by Protein Kinase A (PKA)*" 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye. 26-30 Ekim 2015. (Sözlü Sunum)
3. **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Süray PEHLİVANOĞLU, Sayra DİLMAÇ, Gamze TANRIÖVER, Nuray ERİN, Osman Nidai ÖZEŞ. "*Phosphorylation of Transcription Factor TWIST1 By AKT Leads To Metastasis In Vivo*" 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye. 26-30 Ekim 2015.
4. Esra Nizam, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Nuray ERİN. "*Effects of neurokinin-2receptor antagonist (GR159897) on metastatic breast cancer cells*" 3rd Anticancer Agent Development Congress, İzmir, Turkey. 18-19 Mayıs 2015.
5. Ayşen Bingöl, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Reha ARTAN, Aygen YILMAZ, Banu Nur GÜZEL, Münire ERMAN AKAR, İnanç MENDİLCİOĞLU, Mehmet ŞİMŞEK, Durkadın DEMİR, Süray

PEHLİVANOĞLU, Elanur YILMAZ, Özgül ALPER. “Cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in Turkish patients with cystic fibrosis” 37th European Cystic Fibrosis Conference, Gothenburg, İsveç. 11-14 Haziran 2014.

6. Osman Nidai ÖZEŞ, Süray Pehlivanoglu, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Gökhan Görgişen, Nuray ERİN, Duygu UNAL, Gamze TANRIÖVER. “AKT-mediated phosphorylation is responsible for TWIST1-mediated tumor growth and metastasis” Annual Meeting of American Association for Cancer Research, San Diego, USA. 5-9 Nisan 2014.
7. Sevim KAHRAMAN, Ercument DİRİCE, Fatma Zehra HAPİL, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Saffet ÖZTÜRK, Thomas S. GRIFFITH, Salih SANLIOĞLU, Ahter Dilsad SANLIOĞLU. “In Vivo Fluorescence Tracing Of Xenogeneic Islet Graft Survival In Type 1 Diabetes” IX. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İstanbul, Türkiye. 01-05 Aralık 2010.
8. Sevim KAHRAMAN, Ercument DİRİCE, Ozlem ELPEK, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, M Kemal BALCI, A OMER, Salih SANLIOĞLU, Ahter Dilsad SANLIOĞLU. “Spontaneous type 1 diabetes in NOD mice is related to an increase in DcR1 expression.” XVIII. Avrupa Gen ve Hücre Tedavi Kongresi, Milano, İtalya. 22-25 Ekim 2010.
9. Sevim KAHRAMAN, Ercument DİRİCE, Fatma Zehra HAPİL, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Saffet ÖZTÜRK, Thomas S. GRIFFITH, Salih SANLIOĞLU, Ahter Dilsad SANLIOĞLU. “In Vivo Fluorescence Imaging Of Xenogeneic Islet Graft Survival” XVIII. Avrupa Gen ve Hücre Tedavi Kongresi, Milano, İtalya. 22-25 Ekim 2010.
10. Sevim KAHRAMAN, **Mustafa Gökhan ERTOSUN**, Fatma Zehra HAPİL, Ercument DİRİCE, Saffet ÖZTÜRK, Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU, Salih ŞANLIOĞLU. “In vivo Floresan Görüntüleme Yöntemiyle Xenojenik Pankreatik Adacık Transplantasyonu Başarısının ve Sağkalımının Takibi.” II.

Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye. 09-11 Nisan 2010.

11. Mustafa Gökhan ERTOSUN. “*Pankreatik Adacık Transplantasyon Başarısının ve Sağkalımının İn-vivo Olarak Değerlendirilmesi.*” II. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye. 26-28 Mart 2010. (Sözel Araştırma Sunumu)

12. Sevim KAHRAMAN, Fatma Zehra HAPIL, Mustafa Gokhan ERTOSUN, Ercument DIRICE, Ahter Dilsad SANLIOGLU, Salih SANLIOGLU. “*In Vivo fluorescence Imaging as a Method to Assess Pancreatic Islet Xenograft Failure.*” XVII. Avrupa Gen ve Hücre Tedavi Kongresi, Hannover, Almanya. 21-25 Kasım 2009.

13. Suray PEHLIVANOGLU, Munire AKAR, Mustafa USTA, Mehmet SIMSEK, Gokhan ERTOSUN, Ozgul ALPER, Guven LULECI. “*CFTR Gene Mutation Profile in a Limited Number of Turkish Infertile Cases with CAUV and CBAVD.*” Avrupa Tıbbi Genetik Derneği, Mediterranean Medical Genetics 2009 Meeting, Ankara, Türkiye. 28 Haziran- 1 Temmuz 2009.

8. KATILDIĞI KURSLAR ve SERTİFİKALAR

- Mikrodizin Eğitim Çalıştayı, Antalya, Türkiye, 18-21 Mayıs 2014
- Türk-Amerikan Flow-Sitometri Kursu, 2011
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Türkiye 2011
- Katılım Belgesi “Medical Genetics and Genome Analysis in Isolated and Consanguineous Populations”. Avrupa Tıbbi Genetik Derneği, Türkiye 2009

9. KONUŞABİLDİĞİ DİLLER:

- Türkçe – Anadil
- İngilizce – İleri Seviye

10. BİLİMSEL AKTİVİTELER:

- Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Topluluğu (AKDUBAT) Kurucusu ve Dönem Başkanı (2009-2010)
- Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Topluluğu (AKDUBAT) Akademik Danışmanı (2011-2013)
- Ulusal Akdeniz Üniversitesi Tıp Öğrenci Kongresi Başkanı “*Genel Dahiliye*”. 27-29 Mart 2009
- 2. Ulusal Akdeniz Üniversitesi Tıp Öğrenci Kongresi Eş Başkanı, “*Tıpta Görüntüleme Teknikleri*”. 26-28 Mart 2010
- 3. Ulusal Akdeniz Üniversitesi Tıp Öğrenci Kongresi Organizasyon ve Bilimsel Komite Başkanı, “*Birinci Basamak Hekime Yönelik Pediatri*”. 4-6 Mart 2011
- 4. Ulusal Akdeniz Üniversitesi Tıp Öğrenci Kongresi Organizasyon ve Bilimsel Komite Başkanı, “*Pratisyen Hekime Yönelik Kardiyoloji*”. 9-11 Mart 2012
- 5. Ulusal Akdeniz Üniversitesi Tıp Öğrenci Kongresi Organizasyon ve Bilimsel Komite Başkanı, “*Transplantasyon*”. 15-17 Mart 2013 (Türkiye’de gerçekleştirilmiş En Büyük Tıp Öğrenci Kongresi)