

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERKEK SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BÖBREK PROLAKTİN RESEPTÖR mRNA
ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Mesut Cihan AYDEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2017

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERKEK SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BÖBREK PROLAKTİN RESEPTÖR mRNA
ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Mesut Cihan AYDEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FLY-2016-1174 no'lu proje ile desteklenmiştir.)**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERKEK SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BÖBREK PROLAKTİN RESEPTÖR mRNA
ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Mesut Cihan AYDEMİR

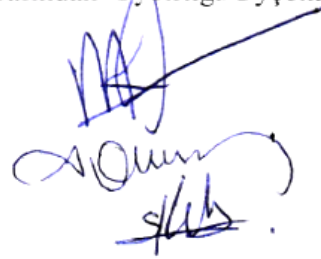
**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 23/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Yrd. Doç. Dr. Süreyya BOZKURT



ÖZET

ERKEK SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BÖBREK PROLAKTİN RESEPTÖR mRNA ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Mesut Cihan AYDEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Haziran 2017, 110 sayfa

Prolaktin reseptörü (PRLR) ve onunla ilişkili prolaktin hormonu (PRL), çoğunlukla laktasyon ve üreme ile ilgili fonksiyonları ile tanınmakla birlikte, omurgalılarda; ozmoregülasyon, proliferasyon, immünoregülasyon ve davranışında içinde bulunduğu 300'den fazla fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir.

Siçan PRLR geni (*s-prlr*) yaklaşık 190 kbç büyüklüğünde olup, en az iki farklı mRNA ve bunların ürünleri olan uzun ve kısa form (UF ve KF) olarak adlandırılmış iki farklı protein kodlamaktadır. PRLR'nin insanda 11, farede 4, domuz ve siçanda ise 2 varyantı bilinmektedir. Bu varyantlar, ya mRNA'nın 3' ucunun farklı ekzonlar ile sonlanması (ekzon 10 veya 11, siçan UF ve KF'de olduğu gibi) ya da 'iç ekzonların' (ekzon 3 ile 9 arası) bir ya da bir kaçının çıkarılması sonucu oluşmaktadır. Fare *prlr* geni ve ürünü olan mRNA'ları 3' ucu ekzonları ile farklılık gösteren bir uzun (ekzon 10) ve üç kısa form (ekzon 11, 12 ve 13) prolaktin reseptörü kodlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı sık kullanılan bir model organizma olan siçanda (*Rattus norvegicus*) olası yeni PRLR varyantlarının araştırılması ve 3' UTR bölgelerinin aydınlatılması olmuştur. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak 'iç ekzon' ve '3' ucu' varyantları aranmıştır. Bunu takiben, farede varlığı bilinen (ekzon 11 ve 12) ancak siçanda ifade edilip edilmediği bilinmeyen ekzon varyantlarının varlığı araştırılmıştır. Son olarak da, siçan PRLR UF ve KF'nin 3' ifade edilmeyen bölgelerinin (3' UTR) dizilerinin açığa çıkarılması hedeflenmiştir.

İç ekzon ve 3' ucu varyantlarının aranması için protein kodlayan ekzonları hedef alan primer çiftleri siçan *prlr* geni referans alınarak tasarlanmıştır. Farede ifade edilen (ekzon 11 ve 12) ancak siçanda bilinmeyen bu ekzonların homologları siçan ve diğer kemirgen *prlr* genlerinde araştırılmış ve siçanda yüksek bir homoloji ile korunduğu bulunmuştur. Bu bilgi doğrultusunda, yine siçan *prlr* gen dizisi referans alınarak bu olası ekzonlara özgü primerler tasarlanmıştır. Siçan PRLR varyantlarının 3' UTR dizilerinin aydınlatılması içinde, hem 3' UTR bölgelerini 1hem de bu mRNA'ların poli (A) kuyruklarını hedef alan primer setleri tasarlanmıştır.

Bu amaçların gerçekleştirilmesi için erkek ve dişi sıçan böbrek, karaciğer ve testislerinden toplam RNA ve mRNA izolasyonları yapılmıştır. Bu RNA’lardan rivörz transkriptaz reaksiyonu (RT-PCR) ile ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve devamında da çeşitli PCR yaklaşımları ile (3' RACE, Nested PCR ve Stepdown PCR) istenen bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin baz dizilemesi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3' ve iç ekzon varyantlarının aranması için gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda sıçan PRLR UF ve KF’nin çoğaltılması gerçekleştirilmiş ancak bu formların ekzon 10 veya 11 varyantlarına ya da ekzon 3 ile 9 arası varyantlarına rastlanmamıştır. Farede protein kodlayan (ekzon 11 ve 12) ve sıçanda da yüksek homoloji ile korunduğu ortaya konan bu ekzonlara yönelik tasarlanan primerler ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ancak bu bölgelerin ifade edildiğine yönelik bir bulguya rastlanmamıştır. Analiz edilen sıçan böbrek, karaciğer ve testislerinde; sıçan PRLR 3' ve iç ekzon varyantlarının bulunmadığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında daha önceki yapılan çalışmalarda Northern Blot yöntemi ile farklı boyutlarda elde edilen sıçan PRLR mRNA’larının hepsinin uzun ve kısa forma ait olduğu ve bu yüksek boyut farkının önemli bir kısmının 3' UTR’lerinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Sıçan PRLR varyantlarının 3' UTR’lerin aydınlatılmasına yönelik gerçekleştirilen reaksiyonlar, kısa formun yaklaşık 501-505 bç'lik bir 3' UTR bölgesine sahip olduğunu ve uzun formunda iki farklı 3' UTR bölgesine sahip olabileceğini işaret etmiştir. Bu formun 3' UTR bölgelerinden birinin yaklaşık 2000 bç'lik dizisi aydınlatılmıştır.

Sunulan tez projesinin kapsamı, sıçan erkek böbreği ile sınırlandırılmış olsa da, bu tez çalışmasında erkek ve dişi sıçanların böbrek, karaciğer ve testisleri yeni PRLR varyantlarının tanımlanması için kullanılmıştır. Çalışılan her iki cinsiyet ve tüm organlarda PRLR uzun ve kısa formun varlığı başarı ile gösterilmiş ancak bunların yeni 3' veya iç ekzon varyantlarına rastlanmamıştır. Fareye özgü varyantları kodlayan ekzonların bazı kemirgenlerde, özellikle sıçanda iyi korunmuş olduğu görülmüşse de, bu ekzonların sıçan karaciğer, böbrek ya da testisinde ifade edildiğine dair bir ip ucuna rastlanmamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Prolaktin reseptörü, sıçan *prlr* geni, PRLR varyantları, mRNA, cDNA, böbrek, karaciğer, testis.

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Danışman)

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Yrd. Doç. Dr. Süreyya BOZKURT

ABSTRACT

DETERMINATION of MALE RAT (*Rattus norvegicus*) KIDNEY PROLACTIN RECEPTOR mRNA DIVERSITY

Mesut Cihan AYDEMİR

Ms Thesis in Biology

Adviser: Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

June 2017, 110 pages

Prolactin receptor (PRLR) and its cognate hormone (prolactin, PRL) involve in over 300 different functions, including osmoregulation, immunoregulation, fat store regulation, proliferation, tumorigenesis and behaviour as well as its well known role in lactation and reproduction.

Rat prolactin gene (*r-prlr*) is about 190 kb and codes at least two different isoforms, named Long and Short forms (LF and SF). So far, 11 variants in human, 4 variants in mouse and 2 variants in pig and rat were identified. Some of these variants are formed either by substitution of exons in 3' ends of mRNAs (such as exons 10 and 11, in the LF and SF, respectively) or exclusion of one or few internal exons of 'the core exons', namely between exons 3 to 9.

The aim of this project was to investigate possibility of new rat PRLR variants and also to identify the 3' UTR of PRLR mRNAs. In order to this, first the 'internal exon' and the 3' end variants were searched and then, the possibility of expression of mouse SF exon variants (exons 11 and 12), their expression in rats are not known, in rat organs were investigated. Finally, the 3' UTR sequences of rat L- and SF PRLRs were tried to be revealed.

PCR primer sets, were used to investigate the 'internal exon' and the 3' end variants, were designed using rat *prlr* genome and its mRNA sequences. It is known that mouse *prlr* gene contains extra two more exons (exons 11 and 12) and their expression is not known in rats. A homology search were performed in rat and other available rodent *prlr* genes and it is found that these mouse exons (11 and 12) are highly conserved in the rat and some rodents. Therefore, primer sets, targeting the potential exons, were designed using rat *prlr* sequence. For determination of 3' UTR regions of

rat PRLR mRNAs, primers were designed, targeting 3' UTR regions and poly A ends of the mRNAs.

Organs (kidney, liver and testis) were collected from 22-24 weeks-old male and female rats and they were used for total RNA and mRNA isolations. Single strand cDNAs were synthesised by a reverse transcription reaction (RT-PCR) using either poly T or poly T Adaptor primers and then target PRLR regions were amplified using specific primers by either Standard PCR and/or other PCR applications (3' RACE, Nested PCR and Stepdown PCR). PCR products were run on 1-1.5% agarose gels and bands corresponding to expected amplicon sizes were sent for sequencing and provided sequences were analysed using appropriate programs.

Amplification products of agarose gels showed that all organs express the core region of PRLR gene (exons 3 to 9) as well as known rat PRLR variants (e.i L- and SFs). On the other hand, no specific amplification products were obtained for 3' (exons 10 and 11) and internal exon variants. In order to find out whether mouse exons (11 and 12, expressed in mouse but not known in rat) were also expressed in rats, PCR reactions were performed using specific primers but no rat *prlr* gene specific products were observed in both sexes and all organs. Using gene specific primers or gene specific and adaptor primer sets, it was found that SF PRLR mRNA has a 3' UTR region, about 500 bp, and LF PRLR mRNA contains a 3' UTR region, longer than 2 kbp as its about 2000 bp were successfully amplified and sequenced.

Although the thesis project is on male rat kidney, in this study both sexes (male and female) and their organs (kidneys, livers and testis) were studied for identification of new PRLR variants. In both sexes and all organs, rat PRLR L- and SFs were successfully amplified but no new PRLR variants (3' end or internal exon) were observed. It also seems that highly conserved mouse exons were not expressed in rat kidney, liver or testis.

KEY WORDS: Prolactin receptor, rat *prlr* gene, PRLR variants, mRNA, cDNA, kidney, liver, testis.

EXAM COMMITTEE: Associate Prof. Mehmet Akif KILIC (Supervisor)

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Associate Prof. Süreyya BOZKURT

ÖNSÖZ

DNA'nın 3 boyutlu yapısının keşfinden sonra geçen 50 yıl biyolojide baş döndürücü gelişmelere sahne oldu. Özellikle 2000 yılı sonrası, bir çok farklı canlının genomunun ortaya konması, moleküler biyologların ilgisini hücrenin temel elemanı olan DNA ve proteinlerden, o ana kadar daha çok bir 'aracı', 'taşıyıcı' ve 'yardımcı' gibi görülen RNA'nın yeni yapı ve fonksiyon çeşitliliğinin keşfi için bir hazine adası görevi gördü.

Moleküler biyolojinin ve genetiksel bilgi akışının içinde yer alan mRNA, rRNA ve tRNA gibi temel yapıların yanı sıra birçok RNA çeşidinin olduğu ve bunların fonksiyonlarının genetik bilgi taşıyıcılığından (genomları RNA olan virüsler gibi), hücre aktivitesinin düzenlenmesinin her basamağında (replikasyon, transkripsiyon, translasyon) yer alabildiği ve yalnızca proteinlere özgü olarak düşünülen enzimatik aktivitenin bazı özel RNA'lar tarafından da gerçekleştirilebildiği ortaya kondu.

Hal böyle olunca, tüm bu yeni bilgilerin ışığında bazı tanımların değişmesi ve ya kapsamının genişletilmesi gerekti. Bu Yüksek Lisans Tez konusunun kapsamına giren konuda kaçınılmaz olarak bu yeni tanım ve özellikleri barındırmaktadır. Burada sunulacak ve tartışılacak olan bilgilere, yakın dönemde yayınlanan makale ve kitaplardan ulaşılabilme imkanı olmakla birlikte, bu yüksek lisans tezinin konusu olan prolaktin reseptör geni ve onun ürünü olan mRNA'ların yapısının ve bununla ilişkili fonksiyon çeşitliliğinin anlaşılmasına bir ön bilgi olması amacı ile burada yer verilmesinin önemli olduğu düşünülmüştür.

- Ekzon kavramı
- Genin 'parçalı' konumu
- İntron işlenmesi ve düzenlenmesi
- Alternatif splayzing ve sonuçları

Prolaktin reseptör geni özelinde ve örneğinde; Gen ve mRNA yapısal elemanlarının değerlendirilmesi

- Çoklu promotor ve kontrol elemanları
- Protein kodlamayan 'ekzon'
- 5' UTR'ler üzerinden 'RNA fonksiyonun' tanımlanması
- 3' UTR'ler üzerinden (ve uzunluğunun değişkenliği) ve miRNA'lar ile olan ilişkileri

Tüm bu özellikler bağlamında prolaktin reseptörü RNA fonksiyon çeşitliliği bakımından son derece ilgi çekici bir örnek olmaktadır. Çok sayıda fizyolojik fonksiyon ile ilişkili olan prolaktin reseptörü, çoklu promotörler ile ifadesi düzenlenmekte olup yüksek sayıda ekzon taşımakta ana varyantları alternatif splayzingle üretilmekte ve yüksek sayıda 5' UTR ve 3' UTR çeşitliliği göstermektedir. Bu reseptör günümüz bilim anlayışı ile sorulabilen ve yeni gündeme gelen bilimsel soruların cevaplarını irdelemek için ideal bir çalışma alanı oluşturmaktadır.

Bu konuda çalışma olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve çalışma süresinde yaşadığım sorunlar karşısında yardımını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Mesut YILMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Biyoloji Bölümündeki desteklerini hissettiğim isimlerini ayrı ayrı yazamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen beni yetiştiren aileme; annem Fatma AYDEMİR'e, babam Celal AYDEMİR'e anneannem Keziban DEMİRDEN'e ve kardeşim Aslıhan AYDEMİR'e sevgi ve saygılarımı sunar teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. Prolaktin Reseptörü ve İlişkili Sitokin Süperaillesine Genel Bir Bakış	4
2.2. Memeli Prolaktin Reseptör Genleri.....	5
2.3. Sıçan Prolaktin Reseptör (<i>prlr</i>) Geni	9
2.4. Sıçan Prolaktin Reseptör mRNA'larının Yapısal Özellikleri.....	11
2.5. Sıçan PRLR mRNA varyantları.....	14
2.6. Sıçan prolaktin reseptör proteini.....	15
2.7. İnsan PRLR protein varyantları	16
2.8. Fare PRLR protein varyantları.....	18
2.9. Prolaktin Reseptör Proteinin Yapısal Özellikleri	18
2.10. Sinyal iletimi	20
2.10.1. JAK2'nin aktivasyonu	20
2.11. Prolaktin Reseptörü İle İlgili Patojeniler.....	22
2.11.1. Prolaktin, prolaktin reseptörü ve kanser.....	22
2.11.2. Prolaktin reseptörü ve Okratoksin A	23
2.12. Projenin Gerçekleştirilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	24
2.12.1. RNA eldesinde dikkat edilen noktalar.....	25
2.12.2. RNA miktarının ölçülmesi ve kalitesinin değerlendirilmesi	25
2.12.3. Rivörz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	26
2.12.4. Primer tasarımı	27
2.12.5. Stepdown (SD) PCR	28
2.12.6. Nested PCR.....	29
2.12.7. 3' cDNA sonlarının hızlı amplifikasyonu (3' RACE).....	30

3. MATERYAL ve METOT	31
3.1. Sıçan ve Organların Elde Edisi.....	31
3.2. Organ Parçalarının Homojenize Edilmesi.....	31
3.3. Organ Homojenatlarından Total RNA İzolasyonu	32
3.4. Elde Edilen Total RNA Miktarının Ölçülmesi ve Kalitesinin Değerlendirilmesi	33
3.5. Total RNA'dan mRNA izolasyonu.....	33
3.6. Rivörz Transkriptaz (RT) Reaksiyonu ve İlk İplik cDNA Sentezi.....	36
3.6.1. Rivörz transkriptaz kiti ve enzimin özelliği	36
3.6.2. RT-PCR (Rivörz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve ilk iplik cDNA eldesi	37
3.7. Sıçan Prolaktin Reseptör Geni (<i>prlr</i>) cDNA'larının Eldesi ve Çoğaltılması	39
3.7.1. Prolaktin reseptör geni (<i>prlr</i>) cDNA amplifikasyonu için kullanılan primerler.....	39
3.7.2. mRNA'ların çoğaltılmasına yönelik PCR reaksiyonları	42
3.7.2.1. Sıçan <i>prlr</i> (s- <i>prlr</i>) geni cDNA'larını amplifiye etmek için kullanılan Standart PCR prosedürü.....	42
3.7.2.2. 3' RACE-PCR (Rapid Amplification Of cDNA Ends) ve sıçan <i>prlr</i> geni mRNA'larının 3' UTR bölgelerinin amplifikasyonu.....	44
3.7.2.3. Stepdown PCR yöntemi ile özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin azaltılması	45
3.7.2.4. Nested PCR ile amplifikasyon miktar ve özgüllüğünün artırılması	46
3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve İncelenmesi.....	46
3.9. Agaroz Jelden DNA Fragmentlerinin İzolasyonu.....	47
3.10. PCR Ürünlerinin Dizilenmesi.....	48
3.11. Ham DNA Dizilerinin Kalite Analizi.....	49
3.12. Çift Yönlü Dizileme Sonuçlarının Birbirleri İle Karşılaştırılması	49
3.13. DNA Dizilerinin Veri Bankasından sorgulanması ve <i>prlr</i> mRNA Varyantlarının Belirlenmesi	49
3.14. Prolaktin Reseptör Geninin Yapısal Özelliklerinin Araştırılması	50
3.14.1. Gen dizilerinin eldesi.....	50
3.14.2. Sıçan prolaktin reseptör gen dizisi üzerindeki boşlukların azaltılması.....	50
3.14.3. Prolaktin reseptör mRNA'larının eldesi	51
3.14.4. mRNA'lar kullanılarak ekzonların gen üzerindeki yerlerinin belirlenmesi	51

3.14.5. Sıçan prolaktin reseptör geninin diğer organizmalara ait prolaktin reseptörleri ile karşılaştırılması	51
3.14.6. Sıçan prolaktin reseptör geni üzerinde olası yeni ekzonların belirlenmesi.....	51
4. BULGULAR.....	53
4.1. Sıçan <i>prlr</i> Geninde Olası Yeni Ekzon Bölgelerinin Tespit Edilmesi	53
4.1.1. Kemirgenlerde fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'nin korunmuşluğunun araştırılması.....	55
4.2. RNA İzolatlarının Miktarının ve Kalitesinin Değerlendirilmesi	56
4.3. PRLR İç Ekzon Varyantlarının Taraması.....	57
4.3.1. PRLR'lerin organlardaki dağılımı.....	59
4.4. Sıçan PRLR mRNA'larında 3' Varyantlarının Taranması	61
4.5. Sıçan <i>prlr</i> Geninde 'Yeni' Ekzon İfadesi Taraması.....	61
4.6. PRLR 3' UTR Dizilerinin Aydınlatılması	62
4.6.1. PRLR KF'nin 3' UTR bölgesine özgü primerlerle 3' UTR dizisinin aydınlatılması.....	63
4.6.2. PRLR UF'nin 3' UTR bölgesine özgü primerlerle 3' UTR dizisinin aydınlatılması.....	64
4.6.3. 3' RACE PCR ile 3' UTR dizisinin aydınlatılması.....	65
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ	69
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER.....	83
EK 1. Memeli (sıçan, fare, insan ve domuz) PRLR varyantları	83
EK 2. Memeli PRLR UF aminoasit dizileri ve homoloji düzeyleri	84
EK 3. Sıçan <i>prlr</i> geni ekzon nükleotit dizileri.....	86
EK 4. RNA miktar hesaplanması	89
EK 5. Manyetik partikül toplama tüplüğü	90
EK 6. RT-PCR, poli (T) primeri ile ilk iplik cDNA'ların elde edilmesi	91
EK 7. RT-PCR adaptör poli (T) ile ilk iplik cDNA'ların elde edilmesi ve 3' RACE PCR	92
EK 8. Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan DNA boyut belirteçleri	94
EK 9. <i>prlr</i> gen dizileri belirlenen gemirgen türleri ve bunlara ait Gen ve Genbank kimlik numaraları	95

EK 10. Fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'nin intron sonu bölgesinin diğer kemirgenler ile karşılaştırılması	96
EK 11. Fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'nin bölgesinin diğer kemirgenler ile karşılaştırılması.....	97
EK 12. F3-R9 primeri seti ile çoğaltılan bölgenin dizileme sonucu	98
EK 13. F3-R11 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR KF bölgesinin dizileme sonucu	100
EK 14. F9-R10.1 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF bölgesinin dizileme sonucu	102
EK 15. F9-R11UTR1.2 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR KF 3' UTR bölgesinin dizileme sonucu	104
EK 17. FUTR2-RUTR2 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF 3' UTR2 bölgesinin dizileme sonucu	107
EK 18. FUTR3-RUTR3 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF 3' UTR3 bölgesinin dizileme sonucu	109
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrad derece
pH	Hidrojen iyonu potansiyeli

Kısaltmalar

GH	Büyüme hormonu
PRL	Prolaktin
PL	Plasental Laktojen
PRLR	Prolaktin reseptörü
GHR	Büyüme hormonu reseptörü
<i>prlr</i>	Prolaktin reseptör geni
s-PRLR	Sıçan prolaktin reseptörü
f-PRLR	Fare prolaktin reseptörü
PRLR UF	Prolaktin reseptörü uzun form
PRLR KF	Prolaktin reseptörü kısa form
PRLR OF	Prolaktin reseptörü ortanca form
JAK	Janus kinaz
STAT	Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü
NCBI	National Centre for Biotechnology
BLAST	Basic local alignment search tool
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
RNaz	Ribonükleaz
cDNA	Komplementer DNA
UTR	Protein kodlamayan bölge

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Rivörz transkriptaz PCR
SD PCR	Stepdown PCR
RACE	cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu
OD	Optik yoğunluk
TAE	Tris-Asetat-EDTA
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
dH ₂ O	Distile su
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
sa	Saat
dk	Dakika
sn	Saniye
g	Gram
ng	Nanogram
v/v	Hacim/hacim
dNTP	Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin nükleotid karışımı
bç	Baz çifti
kb	Kilobaz
kbç	Kilobaz çifti
T _m	Denatürasyon sıcaklığı
F	İleri
R	Geri
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin

Trp	Triptofan
Pro	Prolin
Ser	Serin
V	Valin
L	Lösin
C	Sistein



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Prolaktin reseptörü uzun (UF) ve kısa (KF) formlarının şematize görüntüsü.....	4
Şekil 2.2. Memeli <i>prlr</i> gen ve genel iki mRNA yapısının şematize görüntüsü	6
Şekil 2.3. Fare <i>prlr</i> geni 5' ucu ekzon çeşitliliği ve bu ekzonların olgun mRNA formlarında bulunma motifi.....	7
Şekil 2.4. İnsan <i>prlr</i> gen aktivitesinin östrojen ve promotöre özgü ifadesinin kontrolü.....	8
Şekil 2.5. s- <i>prlr</i> geni ekzon haritası.	10
Şekil 2.6. Sıçan PRLR uzun form ve kısa form mRNA'sı.	11
Şekil 2.7. Sıçan PRLR mRNA'larının yapısal özellikleri.	12
Şekil 2.8. İnsan PRLR varyantları	17
Şekil 2.9. Fare ve sıçan <i>prlr</i> gen haritasının karşılaştırılması.....	18
Şekil 2.10. Prolaktin reseptörü domainleri.....	19
Şekil 2.11. Ligand bağlanması ve homodimerizasyonu takiben PRLR sinyalizasyonu için kullanılan JAK/STAT yolu özetini.....	21
Şekil 2.12. Bu tez projesinin gerçekleştirilmesinde kullanılan deneylerin ve sürecin özeti.	24
Şekil 2.13. Nested PCR yapmak için uygulanan iki PCR reaksiyonunun hedef bölgeleri. F1, 2 ve R1, 2 kullanılan primerlerdir.....	30
Şekil 4.1. Ekzon 3 ile 9 arasında iç ekzon varyantı taraması için kullanılan primerlerin mRNA üzerindeki konumları.....	57
Şekil 4.2. F3 ve R9 primerleri kullanılarak çoğaltılan s-PRLR UF ve KF'de korunmuş fragment.	58
Şekil 4.3. Sıçan PRLR uzun ve kısa form ve bunlarla ilişkili iç ekzon varyantlarının taranmasına yönelik kullanılan primerlerin mRNA üzerinde konumlarını	58
Şekil 4.4. PRLR uzun ve kısa form ile ilişkili iç ekzon varyantı taramasına yönelik Standart PCR'ın agaroz jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.5. 3' ucu varyantı aramaya yönelik 3' RACE PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	61
Şekil 4.6. Fare <i>prlr</i> genine özgü ekzon 11 ve 12'nin sıçanda ifade edip edilmediğini göstermek için kullanılan primerlerin konumu.....	62
Şekil 4.7. s-PRLR 3' UTR bölgelerinin dizilerini aydınlatmaya yönelik kullanılan primerlerin konumu	63
Şekil 4.8. Sıçan PRLR UF'nin 3' UTR 1, 2 ve 3 bölgesini aydınlatma yönelik gerçekleştirilen Standart PCR'ın ürünlerinin jel görüntüsü.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Memeli <i>prlr</i> geni ekzon sayıları.....	7
Çizelge 2.2. Memeli <i>prlr</i> genlerinde tanımlanmış promotör sayıları.....	8
Çizelge 2.3. Bilinen ekzon 1 varyantlarına bağlı sıçan PRLR pre-mRNA uzunlukları.....	12
Çizelge 2.4. Sıçan PRLR'ye ait mRNA varyantları.....	14
Çizelge 2.5. Memeli PRLR UF ve KF'lerin amino asit sayıları.....	16
Çizelge 2.6. RNA saflığının belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik ölçümlerin istenen değerleri ve olası problemlerin belirteçleri.....	26
Çizelge 2.7. Primer tasarlarırken dikkat edilmesi gereken parametreler.....	28
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan erkek ve dişi sıçanların toplam vücut ve organ ağırlıkları.....	31
Çizelge 3.2. Organ homojenatlarından total RNA izolasyonunda kullanılan kit ve içeriğinin kullanım amaçları.....	32
Çizelge 3.3. Total RNA'dan mRNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve gereçler.....	34
Çizelge 3.4. GeneAll HyperScript™ first strand sythesis kit içeriği.....	36
Çizelge 3.5. RT-PCR'da kullanılan Reaksiyon Karışımı I ve II'in içeriği ve miktarları.....	37
Çizelge 3.6. RT-PCR basamakları ve süreleri.....	38
Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere mRNA'ların poli (A) kuyruklarını hedef alan primerler.....	39
Çizelge 3.8. Hedeflenen cDNA bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin nükleotit dizileri.....	41
Çizelge 3.9. S- <i>prlr</i> genine özgü cDNA'ların çoğaltılması için kullanılan 30 µl hacimlik reaksiyon karışımı.....	43
Çizelge 3.10. Standart PCR reaksiyonunun sıcaklık ve süreleri.....	43
Çizelge 3.11. S- <i>prlr</i> geni mRNA'larının 3' UTR bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan 3' RACE PCR koşulları.....	44
Çizelge 3.12. Stepdown PCR reaksiyon koşulları.....	45
Çizelge 3.13. Agaroz jel yürütme tamponu içeriği (5x stok).....	46
Çizelge 3.14. Agaroz jelle örnek yükleme tamponu içeriği (6x stok).....	46
Çizelge 3.15. Agaroz jelden DNA izolasyon protokolü.....	48
Çizelge 4.1. Fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'nin sıçan <i>prlr</i> geni üzerindeki karşılığı.....	53
Çizelge 4.2. Fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'den kodlanan aminoasitler ve sıçandaki karşılıkları.....	54
Çizelge 4.3. Fare <i>prlr</i> ekzon 11 ve 12'nin karşılığını taşıyan bazı kemirgenlerin bu ekzonlar için fare ve sıçanda bulunan diziye benzerlik oranları.....	55
Çizelge 4.4. Toplam RNA izolatlarının RNA miktarı.....	56
Çizelge 4.5. Dokulardaki uzun ve kısa formun görülme durumu.....	60



1. GİRİŞ

Prolaktin reseptörü (PRLR) ve ona bağlanan hormonu olan prolaktin hücrede ve organizmada birçok farklı fonksiyonu yerine getirebilmektedir. Bunlar arasında en bilineni olan (ilk ortaya konan) memelilerde süt üretimi fonksiyonunun yanında, immün sistemin düzenlenmesinden böbrekte ozmoregülasyonun sağlanmasına kadar organizmanın homeostazinde önemli bir role sahiptir.

Prolaktin reseptörünün hücrelerde varlığı 1970'lerde antikor testleri ile ortaya konmuş ve 1989 yılında prolaktin reseptör mRNA'sının ilk defa sıçan karaciğerinden eldesi ile prolaktin reseptör dünyası aydınlanmaya başlamıştır. Sıçandan elde edilen bu ilk prolaktin reseptör mRNA'sı hem protein yapısı hakkında hem de bu proteine karşılık gelen ekzonlar ve onu kodlayan gen hakkında önemli bilgiler ortaya koymuştur. Bunun hemen arkasından prolaktin reseptörü hakkında ikinci bilgi yine sıçan ovaryumundan elde edilen mRNA'nın karakterizasyonu ile ortaya çıkarılmıştır. Bu mRNA'lar, iki farklı prolaktin reseptör proteininin varlığını göstermiş ve bu proteinler uzun ve kısa form (UF ve KF) olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Aynı dönemlerde fare prolaktin reseptör mRNA'ları karakterize edilerek fare prolaktin reseptör proteinin varyantları belirlenmiş ve farede bir UF ve üç KF olduğu rapor edilmiştir. Bunu takip eden yıllarda birçok diğer canlıdan (örneğin insan ve domuz gibi) ve yakın dönemlerde de tavuk ve zebra balığının prolaktin reseptör mRNA'ları üzerinden bu genin kodladığı protein çeşitleri tanımlanmıştır.

Prolaktin reseptörünün fonksiyonun anlaşılmasına yönelik *in vivo* çalışmalar daha çok domuz ve keçilerde süt bezlerinin gelişimi ve süt üretimi üzerine etkileri ve insanlarda da *in vitro* çalışmalar ile meme kanserindeki rolü üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalara paralel olarak insan da, omurgalıların çoğunda bilinen temel iki forma (UF ve KF) ek olarak, 9 farklı formu daha belirlenmiştir (bunların çoğu meme kanser hücre hattı veya immün sistem hücrelerinden tanımlanmıştır). Yani bugün itibari ile insanda, aynı genin alternatif splayzing ürünü olan 11 farklı mRNA ve bunun ürünü olan 11 farklı prolaktin reseptör protein formu bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı genç yetişkin sıçan (erkek ve dişi) ve onların organlarındaki (karaciğer, böbrek ve testis) prolaktin reseptör mRNA çeşitlerinin ve buna bağlı protein formlarının aydınlatılmasına odaklanmıştır. Prolaktin reseptör mRNA çeşitleri ve bunların miktarları; 1- cinsiyete, 2- organa (dokuya ve hücreye), 3- gelişimsel evreye ve 4- patolojik durumlara bağlı değişiklik gösterebilmektedir. Bu amaca bağlı olarak; prolaktin reseptör mRNA'sının iki bölgesi; protein kodlayan ekzon dizi bölgesi ve 3' UTR bölgesi ve bu bölgelerin olası varyasyonlarının aydınlatılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Prolaktin reseptör mRNA'sı ve geninin ilk tanımlandığı canlı sıçan olmasına rağmen, 1990'ların sonundan itibaren sıçanlara olan ilgi azalmış ve aydınlatılması gereken birçok soru cevapsız kalmıştır. 1990'lı yılların başından itibaren sıçan ile gerçekleştirilen çalışmalar sıçan organlarında (karaciğer, böbrek, ovaryum, testis) sayıları 3 ile 9 arasında değişen mRNA varlığına işaret etmiştir. Ancak bu çalışmaların ya eşeyssel olgunluğa ulaşmamış sıçanlar veya hormon veya dışarıdan müdahale ile madde verilmiş sıçanlar (ve çoğunlukla dişi sıçan) ile gerçekleştirilmiş olmasından dolayı, elde edilen veriler ve mRNA çeşitliliği, normal yetişkin sıçanların durumu

hakkında net bir bilgi vermemektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada her iki cinsiyetin ve yetişkin 'normal bireylerin' çalışılması bu organların normal fizyolojilerinde hangi PRLR mRNA çeşitlerinin ve formlarının bulunduğu aydınlatılmasında önemli bir yer arz etmektedir.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda, organların bu yüksek mRNA çeşitliliği hibridizasyon yöntemi (Northern Blot) ile ortaya konmuş ve bu çalışmalarda kullanılan problemlerin özellikleri ve özgüllüğü net olarak verilmediği veya o zamanın kısıtlı teknik ve bilgi birikiminden dolayı forma özgü prob kullanmakta güçlük çekilmiştir. Bu sebepten dolayı elde edilen verilerde bulunan mRNA çeşitlerinin hangi formlara ait olduğu, o gün çoğunlukla net olarak ortaya konmadığı gibi, bugünde hangi formlara karşılık geldiği net analiz edilememektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının verilerine göre, öyle görülüyor ki boyutları 1.8 ile 9.7 kb arasında değişen bu mRNA çeşitleri temelde KF ve UF'nin 5' UTR ve özellikle 3' UTR varyantlarına karşılık gelmektedir.

Prolaktin reseptörü organizmada çok farklı fonksiyonları yerine getirmesinden dolayı birçok çalışmanın içinde ya doğrudan ya da dolaylı olarak yer almaktadır. Bu çalışmalardan biri organizmanın belirli bir cinsiyetin, döneminde veya patolojik durumda (örneğin kanserde) o hücre grubu, doku veya organın mRNA çeşitliliğini (transkriptom) ve düzeyini belirlemeye yönelik olup bu amaç için mikroarray ve gene özgü mRNA problemleri kullanılmaktadır. Yakın dönemde gerçekleştirilen çalışmalar ve bunlarda kullanılan PRLR mRNA problemleri (4 farklı prob) incelendiği zaman, bu problemlerin PRLR mRNA'sının varlığını ortaya koymakta etkili olduğu ancak, bilinen iki protein varyantını (UF ve KF) birbirinden etkili şekilde ayıramadığı görülmektedir. Bunun bir nedeni bu problemlerin bu proteinin uzmanları tarafından dizayn edilmediğinden ve aynı zamanda literatürde sıçan PRLR formları hakkında çelişkili durumların bulunmasından da kaynaklanmaktadır (Örneğin PRLR geninde karşılığı olmayan ancak gen bankasında prolaktin reseptörü proteininin bir varyantı gibi girilmiş bir form). Bu çok kapsamlı (sıçanın birçok organını aynı anda tarayan) mRNA mikroarray deneylerinde kullanılan bu dört prob farklı formu ayıramayabilmekte ve yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Bu projenin dizayn aşamasında, bu veriler analiz edilip kullanılmak istenmişse de, bu hatalı durumun fark edilmesi aynı zamanda bu projenin gerçekleştirilmesi için önemli bir çıkış noktası olmuştur.

Yine fark edilmiştir ki, diğer yaygın model organizma olarak kullanılan farenin PRLR yönünden tanımlanmış dört farklı (bir uzun, üç kısa form) formunun olması, filogenetik olarak yakın ilişkili olan sıçanın bilinen iki formuna ek olarak, fare benzeri PRLR varyantlarının olabileceğini düşündürmüştür. Bu tezin proje aşaması için harcanan yaklaşık bir yıllık zaman diliminde; 1- sıçan PRLR geni iki farklı genom bankasından temin edilerek analiz edilmiş ve iki dizi arasındaki uyumsuzluklar ortadan kaldırılmış ve yine iki dizi arasındaki boşluklar (gene ait DNA dizi eksiklikleri) karşılaştırma yolu ile ortadan kaldırılarak, şu an için literatürdeki en iyi sıçan PRLR gen dizisi (yaklaşık 195 bin bp) tarafımızca oluşturulmuştur (Aydemir ve Kılıç 2016). 2- Sıçan PRLR geninin iyileştirilmesinden sonra, farede protein kodladığı bilinen ancak sıçanda ifade edildiğine yönelik bilgi olmayan iki ekzon bölgesine (ekzon 11 ve 12, fare PRLR genine göre adlandırma) karşılık gelen diziler homoloji temelli yaklaşım ile korunmuşlukları araştırılmıştır. Biyoinformatik yöntemlerin araçları ile yapılan analizler sonucu, farede ifade edilen ancak sıçanda varlığı bilinmeyen bu bölgelerin sıçanda da

korunmuşluk gösterdiği ve en azından birinin işlevsel olma ihtimalinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Kılıç ve Aydemir 2016). Gerçekleştirilen bu çalışmalarının devamı olarak, bu olası yeni sıçan PRLR ekzon bölgelerinin ifade edilip edilmediğinin araştırılması projeye dahil edilmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi sıçan bir çok çalışma için model organizma olarak kullanılmakta ve buna bağlı olarak ta 'normal sıçan' PRLR formlarının karakterize edilmesi önem arz etmektedir. Mikroarraylerde kullanılan PRLR problemlerinin bir kısmının yanıltıcı sonuç veriyor olması ve fare ile karşılaştırıldığı zaman sıçanda da PRLR'nin başka formlarının bulunma olasılığı, yine bu projenin bilimsel temellerine gerekçe olmuştur.

Prolaktin reseptörünün organizmanın homeostazinin sağlanması ve devamlılığında önemli rolleri olmakla birlikte, aynı zamanda bir sitokin reseptör ailesinin üyesi olarak çoğalma (proliferasyon) ve ölüm (apoptozis) arasında karar verici mekanizmanın bir parçası olması, bu reseptörün kanser araştırmalarının (özellikle meme ve prostat kanserinde) merkezine yerleşmesine neden olmaktadır. Bundan dolayıdır ki, bu reseptör proteinin formları ve fonksiyonu hakkında en kapsamlı bilgi, insan meme kanseri ve immün sistem üzerine olan etkilerinden elde edilmiştir. Bu tezin gerçekleştirildiği laboratuvarın da okratoksin A ilişkili böbrek kanseri üzerine çalışmalarının olması ve yakın zamanda gerçekleştirilen iki farklı çalışmada prolaktin reseptör mRNA düzeyinin bu toksin varlığında değiştiğinin ortaya konması, yine bu tezin gerçekleştirilmesi için başka bir temel oluşturmuştur.

Yukarıda anlatılan tüm bu gerekçelerden dolayı, bu ilgi çekici ve bir o kadarda kompleks etkileşim ağına sahip prolaktin reseptör varyant çeşitlerinin tanımlanması ve özellikle 3' UTR bölgelerinin aydınlatılması bu projenin amaç ve kapsamına girmiştir. Bu amaç doğrultusunda bu tez çalışmasında; erkek ve dişi sıçan karaciğer, böbrek ve testis örnekleri hayvanlardan toplanmış ve sıvı azot gazında hızla dondurularak -80 C'de muhafaza edilmiştir. Organlardan elde edilen toplam RNA veya mRNA örnekleri, rivörz transkriptaz PCR (RT-PCR) ile tek iplik cDNA'ya dönüştürülmüş ve daha sonra 'standart PCR' veya diğer PCR yaklaşımları ile prolaktin reseptörüne ait mRNA'ların cDNA'ları elde edilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin özellikleri (cDNA varlığı, miktarı ve büyüklükleri) öncelikli olarak agaroz jel yardımı ile analiz edilmiş ve buna bağlı olarak PRLR mRNA ve protein varyant çeşitlerinin ön analizi gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen bilgiler ışığında gerekli görülen PCR ürünleri diziletilmiş ve dizi sonuçlarına göre varyantların çeşitleri ve özellikleri belirlenmiştir.

Elde edilen veriler, analiz edilen organlarda, sıçana ait PRLR iç ekzon ve 3' varyantlarının bulunmadığını işaret etmiştir. Farede ifade edildiği bilinen fazladan iki ekzonun ise sıçanda ifade edildiğine yönelik bir bilgiye ulaşılamamıştır. Sıçan uzun ve kısa formun ekzon yapısı bilinmekle birlikte, bu ekzonların devamı olan 3' UTR'lerine yönelik detaylı deneysel bir veri bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile sıçan KF PRLR mRNA'sının 3' UTR bölgesi aydınlatılmış ve yaklaşık 500 bazdan oluştuğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmanın ana çıkış noktasını oluşturan hangi organda hangi varyantın var olduğuna- eğer varsa diğer varyantların varlığının belirlenmesi- yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışma; çalışılan organlarla sınırlı olmakla birlikte, sağlıklı yetişkin sıçanda prolaktin reseptörünün iki ana varyantının olduğu ve bunların da uzun ve kısa formlar olduğunu göstermiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

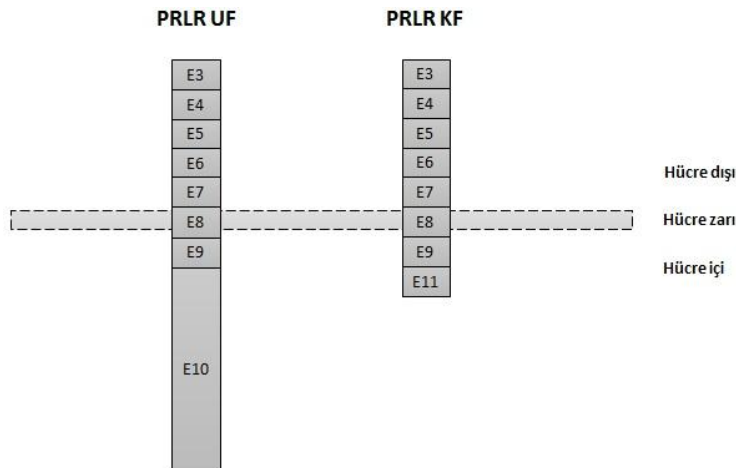
2.1. Prolaktin Reseptörü ve İlişkili Sitokin Süperailisine Genel Bir Bakış

Prolaktin reseptörü (PRLR), omurgalılarından itibaren görülen ve köken aldığı diğer reseptör ve hormonlarında içine alan sitokin reseptör süperailisinin bir üyesidir. Reseptörün birincil hormonu prolaktin (PRL) olmakla birlikte, bir dizi diğer hormonda (Büyüme hormonu ve Plasental laktojen gibi) bağlanarak farklı hücre içi sinyal iletim yollarını aktif hale getirebilmektedir.

Prolaktin ve büyüme hormonu, omurgalılarda geniş çaptaki biyolojik sürecin koordinasyonunda rol alan hormon/sitokinlerdir. Klasik endokrin düzenleyiciler (hormonlar) gibi tüm dolaşımda ya da bölgesel düzenleyiciler (sitokinler) gibi, parakrin ve otokrin işlev görebilirler.

İnsan prolaktin proteini en uzun 199 amino asitten oluşan 23 kDa ağırlığında tek polipeptitlik bir hormondur (Freeman vd 2000). Prolaktin ve prolaktin reseptörü omurgalılarda meme bezi gelişimi ve süt sentezi, su-tuz dengesi, immüno regulasyonunda dahil olduğu 300 farklı fizyolojik fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir. Prolaktin hormonun ana üretim yeri hipofiz olmakla birlikte hipofiz dışındaki hücre ve dokularda da ifade edilebilmektedir.

Prolaktin reseptörü (PRLR) yetmişli yıllarda tanımlanmış ve ilk defa 1988 yılında reseptörün mRNA'sı sıçan karaciğerinden klonlanmıştır (Boutin vd 1988). Prolaktin reseptörü tip 1 sitokin ailesinin üyesi olup memelilerde iki ana izoformu bulunmaktadır. Aynı genden alternatif splayzing sonucu üretilen bu izoformlar sahip oldukları 3' ucu ekzonları ile ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Bu izoformlar sahip oldukları son ekzonları ile bir birlerinden büyüklük olarak farklı olmalarından dolayı uzun (UF) ve kısa (KF) form olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Prolaktin reseptörü uzun (UF) ve kısa (KF) formlarının şematize görüntüsü.

UF ve KF prolaktin reseptör izoformları sahip oldukları son ekzonları ile

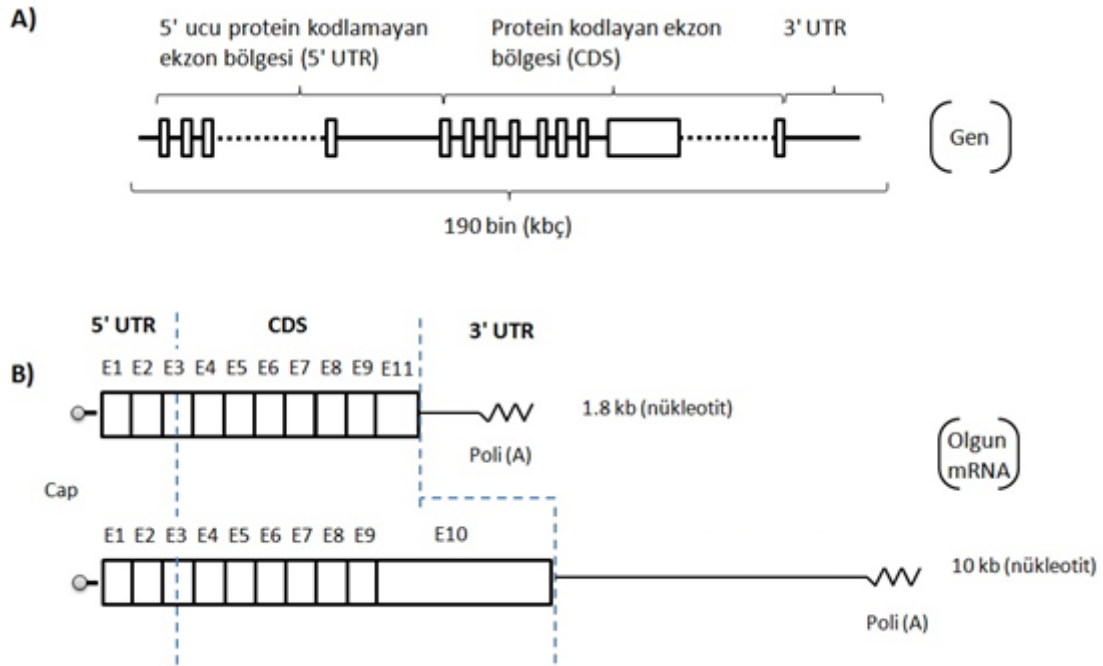
farklılık gösterirler (ekzon 10 uzun formda ve ekzon 11'de kısa formda bulunur). PRLR UF 610 amino asit, PRLR KF'da 310 amino asitten oluşur. Ekzon 3 ile 9 arası her iki izoformda da ortak olup, büyüklük farkını yaratan son ekzonlarının kodladığı amino asit sayısıdır (Ekzon 10 yaklaşık 330 a.a., ekzon 11 ise 30 a.a. kodlamaktadır). E, Ekzon. a.a., amino asit.

2.2. Memeli Prolaktin Reseptör Genleri

Prolaktin reseptör geni (*prlr*) köken aldığı 'büyüme reseptörleri' ailesinden balıklardan itibaren ayrılmış gibi görünmekte olup, memelilerde tek kopya halinde bulunmaktadır (Zebra balığı, *prlr-a* ve *prlr-b* olarak adlandırılan iki prolaktin reseptör genine sahiptir).

Memeli prolaktin reseptör geni büyük bir kısmı introndan oluşan ortalama 200 kbç uzunluğunda bir gendir (Şekil 2.2.a). İnsan, domuz, fare ve sıçanın da dahil olduğu memeli *prlr* geninden boyutları 35 bin ile 190 bin nükleotit arasında değişen pre-mRNA'lar kodlanmakta ve bu pre-mRNA'lar işlenerek (splayzing ve poliadenilasyon) boyutları 1.8 ile 10 kb (kilo baz; bin baz) arasında değişen olgun mRNA'lar vermektedir (Hu vd 1996) (Şekil 2.2.b).

Prolaktin reseptör geni ve mRNA'sı 3 temel kısımdan oluşmaktadır: 1- Protein kodlamayan 5' ucu ekzon bölgesi (5' UTR), 2- protein olarak ifade edilen ve tüm memelilerde bulunan iki yaygın izoformu (UF ve KF) kodlayan ekzon 3 ile ekzon 9 arasına karşılık gelen protein kodlayan bölge ve 3- bu mRNA'ların 3' ucuna karşılık gelen 3' UTR bölgesi (Şekil 2.2.a ve b)



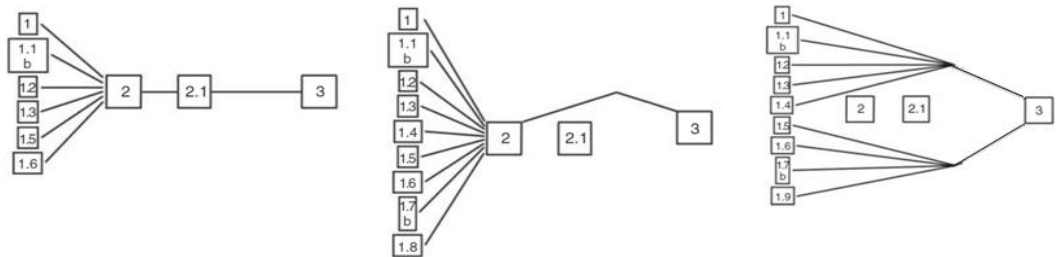
Şekil 2.2. Memeli *prlr* gen ve genel iki mRNA yapısının şematize görüntüsü. **A)** Memeli *prlr* genleri 190-210 kbç arasında değişmektedir. Gen 3 ana kısma ayrılmaktadır: 1- 5' ucu protein kodlamayan ekzon bölgesi (5' UTR, sayıları türden türe değişmekle birlikte bu bölgede 6 ile 14 protein kodlamayan ekzon bulunabilmektedir), 2- Protein kodlayan ekzon bölgesi (bu bölge tüm türlerde bulunan iki PRLR izoformunu- UF ve KF- kodladığı gibi, aynı zamanda bu ekzonların alternatif splayzingi sonucu birçok farklı PRLR izoformları da üretebilmektedir. İnsanda ki 11 PRLR izoformu, bu bölgedeki ekzonların alternatif splayzingi ve/veya alternatif protein sentez başlangıç ve dur kodonlarının kullanılması sonucu üretilmektedir. Bkz. Şekil 2.8). **B)** Prolaktin reseptör geninden üretilen iki ana PRLR izoformunun mRNA'ları. Olgun mRNA'ların 5' ucunda bulunan ekzon 3'ün ortasında bulunan protein sentez başlangıç kodonundan (AUG) protein sentezi başlatılmakta ve bunun devamındaki ekzonlar boyunca ilerlemektedir. Bu mRNA'lar ekzon 3 ile 9 arasında ortak ekzonlar barındırmakta ancak 3' uçları ise farklılık göstermektedir (Ekzon 10 UF PRLR'de, ekzon 11'de KF PRLR'de bulunmaktadır).

Memeli prolaktin reseptör genlerinin protein kodlamamayan 5' uç bölgesi yaklaşık 150 kilo baz çiftine karşılık gelmekte olup, bu kısımda çok sayıda protein kodlamayan ekzon bulunmakta (6 ile 14 ekzon) ve bunların sayıları türler arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Çizelge 2.1). Protein kodlayan ekzonların bulunduğu bölge ise yaklaşık 40 kbç'e karşılık gelmekte olup, insan, domuz ve farede 9 ekzon bilinirken, farede 11 ekzon bulunmaktadır (Çizelge 2.1) (Boutin vd 1988, Boutin vd 1989, Davis ve Linzer 1989, Shirota vd 1990, Clarke ve Linzer 1993, Hu vd 2001, Trott vd 2011).

Çizelge 2.1. Memeli *prlr* geni ekzon sayıları.

	Protein kodlamayan bölge ekzon sayısı	Protein kodlayan bölge ekzon sayısı
Sıçan	6	9
Fare	6	11
İnsan	7	9
Domuz	14	9

Prolaktin reseptör geninin ve ondan transkribe edilen mRNA'ların 5' ucu protein kodlamayan bölgesindeki (5' UTR) ekzon çeşitliliği, alternatif promotor kullanımı sonucu oluşabildiği gibi, aynı zamanda alternatif splayzing sonucunda oluşabilmekte ve bundan dolayı PRLR mRNA'larının 5' ucu bölgelerinde yüksek ekzon çeşitliliği ve splayz motifi görülebilmektedir (Ormandy vd 1998, Meng vd 2004, Hirai vd 2013, Schennink vd 2015). Bu bölgedeki en yüksek splayz motifi, en yüksek 5' ucu protein kodlamayan ekzonlara sahip olan (toplam 14 ekzon) domuzda görülmüştür (Şekil 2.3)



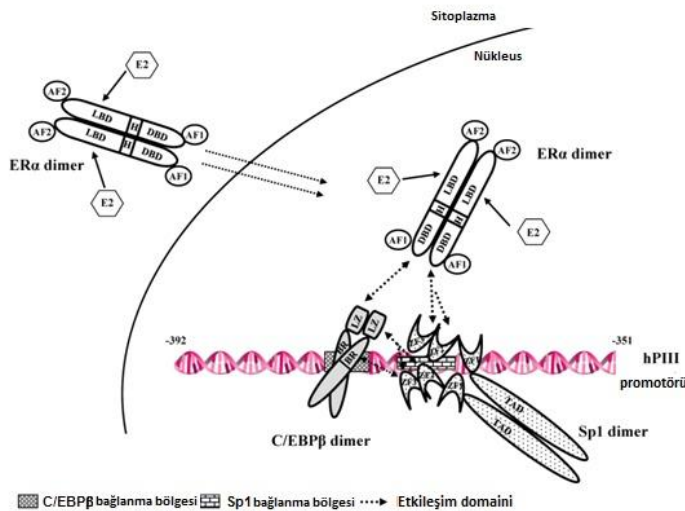
Çizelge 2.2. Memeli *prlr* genlerinde tanımlanmış promotör sayıları. Prolaktin reseptör genlerinde birden fazla promotör bulunması, genin hücre/doku, gelişimsel evre ve cinsiyete bağımlı nasıl ifade edildiği ve düzenlendiğini açıklarken, aynı zamanda çok farklı sayıda işlevi yerine getirmeyi nasıl başardığının göstergesidir.

	Promotor	Kaynak
Sıçan	3 (5)*	Hu vd 1996
Fare	5	Ormandy vd 1998
İnsan	6	Hu vd 1999, Hu vd 2002, Tsai-Morris ve Dufau 2012
Domuz	1**	Schennink vd 2013

* Sıçan *prlr* geninde tanımlanmış 3 adet promotör bulunmaktadır.

** Domuz *prlr* geninde henüz 1 adet promotör tanımlanmıştır.

Memeli *prlr* gen ifadesi çoklu ve hücre/doku tipine özgü promotörlerin kontrolü altındadır. Bu prolaktin reseptörünün hem fizyolojik çeşitliliğini arkasındaki mekanizmayı bir derecede açıklamakta ve hem de hücre/doku, organ, gelişimsel evre ve cinsiyete bağlı ifade şeklinin ve derecesinin nasıl çeşitlilik gösterdiğini de açıklamaktadır. Örneğin insan *prlr* gen ifadesi östrojen ve östrodiol ile değişebilmekte ve bununla düzenlenmesi insan promotör III (hPII) üzerinden gerçekleştirmektedir (Morris ve Dufau 2012). İnsan *prlr* gen aktivitesinin cinsiyet hormonu (östrodiol) bağlı ifadesinin nasıl düzenlendiği Şekil 2.4’de sunulmuştur.



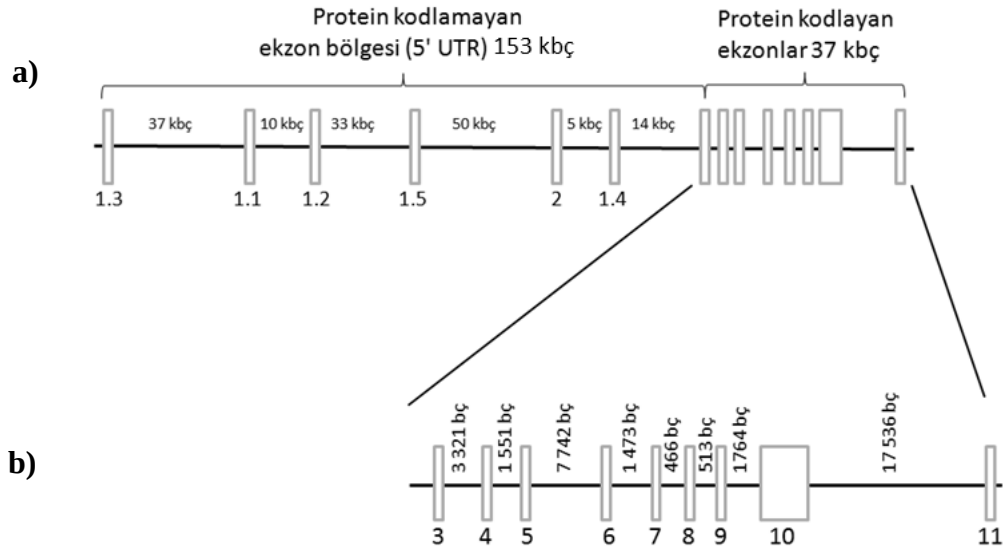
C/EBP β ve Sp1 transkripsiyon faktörlerine bağlanmasını sağlar. Aktive olmuş ER α 'nın transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girmesi hPIII (İnsan Promotör III) bağımlı transkripsiyonu aktive eder. Böylece *prlr* gen ifadesi ve PRLR mRNA ifadesi artırılmış olur.

Prolaktin hormonun kendisi ve diğer birçok molekül (buna östrojen ve testosteron hormonları da dahil olmak üzere), prolaktin reseptör gen ifadesini ve promotor kullanımını etkileyebilmektedir. Promotor kullanımı hücre/doku, organ ve gelişimsel evreye bağlı olarak değişebilmekte ve bundan dolayı farklı doku ve gelişimsel evrelerde farklı 5' ucu ekzon varyantları, protein izoform varyantları ve hatta 3' UTR varyantlarının üretildiği bilinmektedir. Ancak mRNA varyantlarının ve PRLR protein izoformlarının belirlenmesinde yer alan mekanizma hakkında hala kapsamlı bir bilgi bulunmamaktadır.

Bilinen bu *prlr* promotörleri içinde, 'generik' (her hücre tipinde ifade edilen) olarak adlandırılan promotör tüm memelilerde hücre/doku, gelişimsel dönem ve cinsiyetten bağımsız *prlr* gen ifadesinin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu alanda aydınlığa kavuşturulmayı bekleyen diğer bir konuda, bu promotörlerin alternatif kullanımına bağlı olarak, 5' ucu protein kodlamayan ekzon, protein kodlayan bölge ekzonları ve 3' UTR varyasyonlarının oluşumunda (özellikle PRLR izoform çeşitlerinin belirlenmesinde) bir rolünün olup olmadığı, eğer varsa nasıl bir rolünün olduğunun belirlenmesi olarak öne çıkmaktadır.

2.3. Sıçan Prolaktin Reseptör (*prlr*) Geni

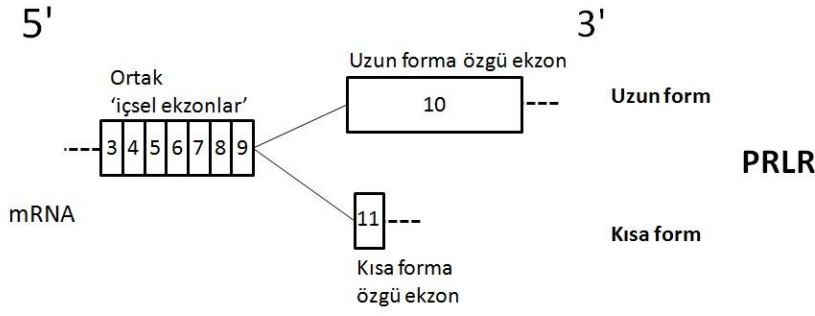
Sıçan *prlr* geni (*s-prlr*), sıçan genomunun 2. kromozomundan ifade edilmekte olup, diğer memelilerde olduğu gibi yaklaşık 200 kb'lık uzunluğundadır (Şekil 2.5.a). Sıçan *prlr* geninde tanımlanmış en az 15 ekzon bulunmakta olup, bunların 6 tanesi protein kodlamayan 5' ucu ekzonları (genin yaklaşık ilk 153 kb'lık kısmına yayılmıştır) ve 9 tanesinde amino asit kodlayan ekzonlardır ve genin son yaklaşık 37 kb'lık kısmında yer alır (Şekil 2.5.b).



Şekil 2.5. s-prlr geni ekzon haritası. a) prlr geninin tamamı (yaklaşık 190 kbç uzunluğundaki kısmı); sadece 5' UTR kısmındaki ekzonlar arasında mesafe verilmiştir. b) prlr geninin protein kodlayan ekzonlarının bulunduğu kısmı (yaklaşık 39 kbç).

Genin protein kodlamayan kısmında yer alan ekzonlar arasındaki intronlar, protein kodlayan kısımdaki intronlara göre göreceli olarak daha büyük olup (5 ile 50 kbç arasında), protein kodlayan ekzonlar (özellikle ekzon 3 ile 10) arasındaki intron büyüklükleri daha küçüktür (0.5 ile 8 kbç arasında değişmektedir) (Şekil 2.4.b). Buradan da net şekilde görülmektedir ki, prlr geninde protein kodlayan ekzonlar (kodlamayan ekzonlara göre) belirli bir bölgede kümelenmiştir.

Genin protein kodlayan 6 ekzonu; ekzon 3'den 11'e kadar olup (Şekil 2.5.b), tüm memelilerde bulunan iki PRLR izoformu, sıçanda da 3' ucunda hangi ekzonun bulunduğuna göre adlandırılmaktadır. Olgun mRNA'sının 3' ucu ekzon 10 ile biten ve ekzon 10'nun amino asitlerini bulunduran sıçan PRLR izoformu, diğer memelilerde de olduğu gibi, uzun form (UF) PRLR olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.6). Diğer taraftan mRNA'sının 3' ucunda ekzon 11'e ve onun amino asitlerini bulunduran ikinci PRLR izoformunda kısa form (KF) PRLR olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.6). Her iki izoformda da bulunan ve 'içsel ekzonlar' olarak adlandırılan ekzon 3 ile 9 arası, diğer memelilerde olduğu gibi, bu iki sıçan PRLR izoformunda da ortak ekzonlardır.

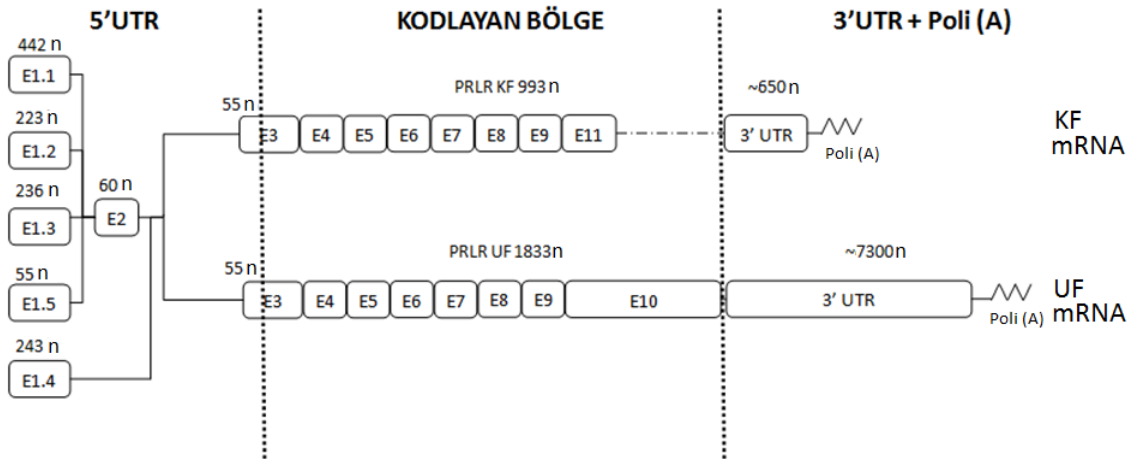


Şekil 2.6. Sıçan PRLR uzun form ve kısa form mRNA'sı.

Her iki izoformda da ortak olan ekzonlar; ekzon 3 ile 9 arası olup, bunlar 'içsel ekzonlar' olarak adlandırılmaktadır. mRNA'ların 3' ucunun hangi ekzon ile bittiği PRLR izoformunu belirlemekte olup, ekzon 10 uzun form ve ekzon 11'de kısa form PRLR'ye özgüdür. Transkribe edilen *prlr* pre-mRNA'sından hangi izoform mRNA'sının oluşturulacağı, ekzon 9 sonrası nasıl bir splayzing gerçekleştirileceğine bağlı olarak değişmektedir. Ekzon 9'un devamına ekzon 10 eklenirse uzun form PRLR izoformu, bunun yerine alternatif splayzing mekanizması ile ekzon 11 eklenirse kısa form PRLR mRNA'sı oluşturulmaktadır.

2.4. Sıçan Prolaktin Reseptör mRNA'larının Yapısal Özellikleri

Omurgalıların prolaktin reseptör yapısı hakkındaki ilk bilgiler, sıçan karaciğer ve ovaryumundan prolaktin reseptör mRNA'larının klonlanması ve bunların dizilenmesi ile elde edilmiştir (Boutin vd 1988, Shiota 1990). Bu mRNA'lar memelilerde iki ana formun bulunduğuna yönelik bilgi vermiş ve bunlara karşılık gelen PRLR proteinleri kısa (KF) ve uzun (UF) form olarak adlandırılmıştır. Bunu takiben gerçekleştirilen birçok çalışma ile bu mRNA'ların yapısal özellikleri karakterize edilmiştir. Şekil 2.7'da sıçan KF ve UF mRNA'larının yapısal özellikleri; protein kodlamayan ekzonların bulunduğu 5' UTR, protein kodlayan ekzonların bulunduğu bölge ve 3' UTR bölgeleri tanımlanmıştır.



Şekil 2.7. Sıçan PRLR mRNA'larının yapısal özellikleri.

Sıçan *prlr* geninden (~ 190 kbç) üretilen pre-mRNA'lar (34-187 kb arasında değişmekte), genin boyutu ile de ilişkili olarak, çok büyük mRNA zincirleri şeklinde transkribe edilmektedir. Memeli *prlr* mRNA boyutlarını artıran ana unsur 5' UTR bölgesinde bulunan ve protein kodlamasına katılmayan ekzonların gen üzerinde bulundukları konumlarından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.5.a). Sıçan *prlr* mRNA'sında bulunan ilk ekzonun (Ekzon 1) varyantına (Ekzon 1.1-1.5) bağlı olarak, uzun ve kısa form PRLR pre-mRNA'ların boyutlarının 34 kb ile 187 kb arasında değişebildiği Çizelge 2.3'de görülebilmektedir.

Çizelge 2.3. Bilinen ekzon 1 varyantlarına bağlı sıçan PRLR pre-mRNA uzunlukları. Pre-mRNA uzunlukları, ekzon 1'in gen üzerinde bulunduğu yerden, ekzon 10 (UF) ve ekzon 11'in (KF) sonlanma kodonuna kadar olan bölge üzerinden hesaplanmıştır (Bu formların 3' UTR ve poli A dizileri hesaplamaya dahil edilmemiştir).

	Pre-mRNA büyüklüğü (kb)*	
	UF	KF
E1.1	169	187
E1.2	132	150
E1.3	121	139
E1.4	34	52
E1.5	80	107

*mRNA uzunlukları yaklaşık olarak verilmiştir.

Sıçan PRLR pre-mRNA'ları bu kadar büyük boyutlara ulaşabilirken, bunlardan üretilen olgun mRNA'lar 10 kb altında kalmaktadır (Şekil 2.7 Bir organizmanın bu kadar büyük boyutta bir başlangıç mRNA'sı üretmesi enerji savurganlığı gibi gözükse de, bu ekzonlar arasında kalan intronların (özellikle protein kodlamayan ekzon 1 ile ekzon 3 arası) mRNA'nın etkili transkripsiyonundan, pre-mRNA'nın doğru ve etkili şekilde işlenmesine birçok mekanizmada önemli rol aldığı düşünülebilir. Bu intronların, boyutları 50 kb'ye kadar varabilen, mRNA formlarının ve PRLR izoformlarının belirlenmesindeki rollerinin aydınlatılması, prolaktin reseptör geni ifadesinin nasıl regüle edildiğinin açıklanmasına hizmet edebileceği gibi, aynı zamanda bu genin ürünleri ile ilişkili patolojilerin (örneğin meme kanseri gibi) aydınlatılmasında ve yeni tedavi yollarının oluşturulmasında önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Sıçan *prlr* mRNA 5' UTR bölgesi

Memelilerde olduğu gibi, sıçan *prlr* mRNA'larındaki ekzon 1 varyantların çeşidi, hücre/doku, gelişimsel dönem ve cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sıçan *prlr* genine ait şu ana kadar 5 adet ekzon 1 varyantı (ekzon 1.1-1.5) tanımlanmış olup (Hu vd 1996, Tanaka vd 2002, Tanaka vd 2005), bu varyantların çeşitleri, büyüklükleri (nükleotit sayısı) ve olgun mRNA üzerindeki konumları Şekil 2.7 gösterilmiştir. Bu ekzon 1 varyantlarının hangi çeşitlerinin hangi sıçan PRLR izoformlarında (UF ve KF) bulunduğu net bilinmemekle birlikte, bunların gen üzerindeki farklı promotörlerin (sıçanda 3 farklı promotör bilinmektedir) alternatif kullanımları sonucu oluşabildiği gibi, alternatif splayzing sonucunda oluşma ihtimali vardır (örneğin ekzon 1.5'in, alternatif splayzing ile mRNA yapısına katılma olasılığı vardır). Ekzon 1 varyantlarının, PRLR izoform çeşidi seçimi ve 3' UTR bölgeleri üzerine etkileride bilinmemektedir. Bu sıçan PRLR mRNA ekzon 1 varyantlarının hangi hücre/doku/organda tanımlandığı ve hangi durumlarda gözlemlendiği aşağıda kısaca anlatılmıştır.

Ekzon1.1: Ovaryumda ve çok düşük miktarda Leydig hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir (Hu vd 1996).

Ekzon1.2: Östrojenle ifadesi artıp testosteron ile baskılandığı ve cinsel olgunlaşma sırasında, karaciğerdeki ifade düzeyinin her iki cinsiyette de değiştiği görülmüştür (Tanaka vd 2005).

Ekzon1.3: Birçok dokuda ifade edilmektedir ve östrojen ile testesterondan bağımsızdır (Tanaka vd 2005). Bu isanda tanımlanan 'generik' (her zaman ifade edilen) insan PIII promotörü ile homolog ve özdeştir (Schennink vd 2015).

Ekzon 1.4: Doğum sonrası dönemdeki erkek ve dişi sıçanların kanlarındaki prolaktin hormonu seviyesi ile sıçan beyinde ifadesi incelenerek; E1.4'ün kandaki prolaktin miktarı ile uyuma sahip olduğu gösterilmiştir (Hirai 2013).

Ekzon1.5: Karaciğer, beyin ve böbrekte varlığı gösterilmiş ancak bağırsak, adrenal, dalak, ovaryum ve testiste görülmemiştir (Tanaka vd 2005). Erkek ve dişi sıçanların 5. günlerinde benzer ifade düzeyi görülürken; iki cinsiyette de (özellikle erkek sıçanlarda) 8. haftada ifade düzeyinde düşüş görülmüştür (Tanaka vd 2005).

Dişilere overektomi yapılması E1.5 ifadesini bir miktar düşürmesine rağmen, östrojen verildiğinde dengelenme gözlemlenmiştir. Kastrasyon yapılan erkeklerde ise ifade düzeyi pek değişmemiş, testosteron verilince normalin biraz altına düşmüştür (Tanaka vd 2005).

2.5. Sıçan PRLR mRNA varyantları

Bu tez projenin çıkış noktasını oluşturan ve bu projede cevaplanmaya çalışılan ana sorunun bilimsel gerekçesini, 1990'lı yıllarda gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler oluşturmaktadır.

1988-1996 yılları arasında sıçan PRLR mRNA'sına yönelik yapılan çalışmalarda; PRLR kısa formuna ait 1.8 ile 5.5 kb, PRLR uzun forma ait ise 2.5 ile 9.7 kb arası uzunluklarda değişen birçok mRNA varyantı görülmüştür (Shirota vd 1990, Hu ve Dufau 1991). Bu çalışmaların bir kısmı PRLR izoformuna özgü proplar kullanılarak gerçekleştirildiği gibi, bir kısmı ise izoform ayırımı yapamayan Northern blot propları ile yapılmış ve buna bağlı olarak elde edilen veriler sıçan PRLR mRNA çeşitliliğini ayırt etmek yerine, daha çok kaotik bir durum ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmalardan elde edilen veriler Çizelge 2.4'de sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Sıçan PRLR'ye ait mRNA varyantları.

Organ	mRNA Uzunlukları (kb)		Kaynak
	PRLR UF	PRLR KF	
Böbrek		2.1, >2.8	Boutin vd 1988
Karaciğer	5.5, 3.0, 2.5	5.5 kb, 3.0 kb, 1.8	Shirota vd 1990
		2.2	Boutin vd 1988
	9.7, 8.0, 3.5, 2.8 kb		Hu vd 1998
	(2.5-1.8 kb)		Hu vd 1996
Testis	9.7, 2.3, 1.8		Hu vd 1996
Ovaryum	9.7, 4.6	2.1, 1.8	Hu ve Dufau 1991
	(5.5-1.8)	5.5	Shirota vd 1990
		2.6, >2.8	Boutin vd 1988
		2.1, 1.8	Hu vd 1996
	(1.8-9.7)		Hu vd 1996
Meme bezi		2.1, >2.8, >2.8	Boutin vd 1988

Eşey hormonları uygulanmış 3.5 haftalık sıçan ovaryumunda PRLR'ye ait 9.7, 4.6, 2.6, 2.1 ve 1.8 kb uzunluğunda mRNA'ların varlığı tespit edilmiş ve izoformlara özgü problemler ile gerçekleştirildiğinden, 9.7 ve 4.6 kb uzunluğundaki mRNA'ların uzun forma, 2.1 ve 1.8 kb uzunluğundaki mRNA'ların ise kısa forma ait olduğunu net bir şekilde ortaya koymuştur (Hu ve Dufau 1991).

Östrojen uygulanmış diğer bir sıçan çalışmasında, karaciğerde 5.5, 3.0, 2.5 ve 1.8 kb uzunluğunda sıçan PRLR mRNA'ları bulunmuş ve 1.8 kb uzunluğundaki mRNA kısa forma özgü olduğu belirlenmiştir (Shirota vd 1990).

Erkek sıçanların testisi ile yapılan başka bir çalışmada ise 9.7, 2.3 ve 1.8 kb uzunluğunda sıçan PRLR'ye özgü mRNA'ların olduğu ortaya konmuş ancak bunların hangi izoforma ait olduğu belirlenememiştir (Hu vd 1996).

Sıçan meme bezinde ise bir tane 2.1 kb uzunluğunda iki tane de 2.8 kb'den büyük sıçan PRLR mRNA'sı daha görülmüşse de, hangi izoforma ait olduğu belirlenememiştir (Boutin vd 1988).

Böbrekte bir tane 2.1 kb uzunluğunda ve bir tane 2.8 kb'den büyük kısa forma ait mRNA bulunmuştur ancak bu çalışmada uzun forma bakılmamıştır (Boutin vd 1998).

Bu çalışmaların tamamı değerlendirildiğinde, 2.1 kb ve 1.8 kb uzunluğundaki mRNA'ların PRLR KF ait olduğu görülmektedir.

Sıçanın farklı doku/organlarından elde edilen bu kadar yüksek mRNA çeşitliliği, farklı içsel intron veya 3' ucu exon çeşitliliği olabileceğini işaret etmiş olsada, gerçekleştirmiş olduğumuz çalışma- 24 haftalık sağlıklı ve genç yetişkin erkek ve dişi böbrek, karaciğer ve testislerinde- sıçanların test edilen bu organlarında iki temel izoformun bulunduğunu işaret etmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken bir konu, yukarıda ve tabloda sunulan çalışmaların verilerin müdehale edilmiş (cinsiyet hormonu veya kimyasal verilmiş) sıçanlardan elde edilmiş olması ve prolaktin reseptör gen ifadesinin ve mRNA çeşitlerinin cinsiyet bağımlı hormonlar ile değiştiği gerçeğidir.

2.6. Sıçan prolaktin reseptör proteini

prlr geni ve proteinleri omurgalılarından itibaren görülmekte, balıklar arasındaki ayırım noktası tam olarak bilinmesede, prolaktin (PRL) ve onun reseptörü olan PRLR'nin beraber evrimleştikleri düşünülmektedir (Sandra vd 1995).

Prolaktin reseptörü, uzun ve kısa form olmak üzere iki temel forma sahiptir. Bu izoformlar alternatif splayzing yolu ile üretilmektedir. Temel iki formda ekzon, 3'den 9'a kadar olan ekzonları eksiksiz taşımakta olup (Şekil 2.1), ekzon 9'dan sonra ekzon 10 eklenerek uzun form ya da ekzon 11'in eklenmesi ile kısa form protein üretilmektedir. Sıçan UF ve KF PRLR proteinlerinin diğer memeliler ile (fare, domuz ve insan) büyüklük (proteinde bulunan amino asit sayısı) karşılaştırması Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Memeli PRLR UF ve KF'lerin amino asit sayıları.

	UF	KF
Sıçan	610	310
Fare*	608	292, 303, 310
Domuz	625	296
İnsan**	622	197, 217, 245, 268, 288, 310, 376

* Farede 3 kısa form PRLR bulunmakta olup, farklı 3' ucu protein kodlayan ekzonlarından (ekzon 11, 12 ve 13) köken almaktadır.

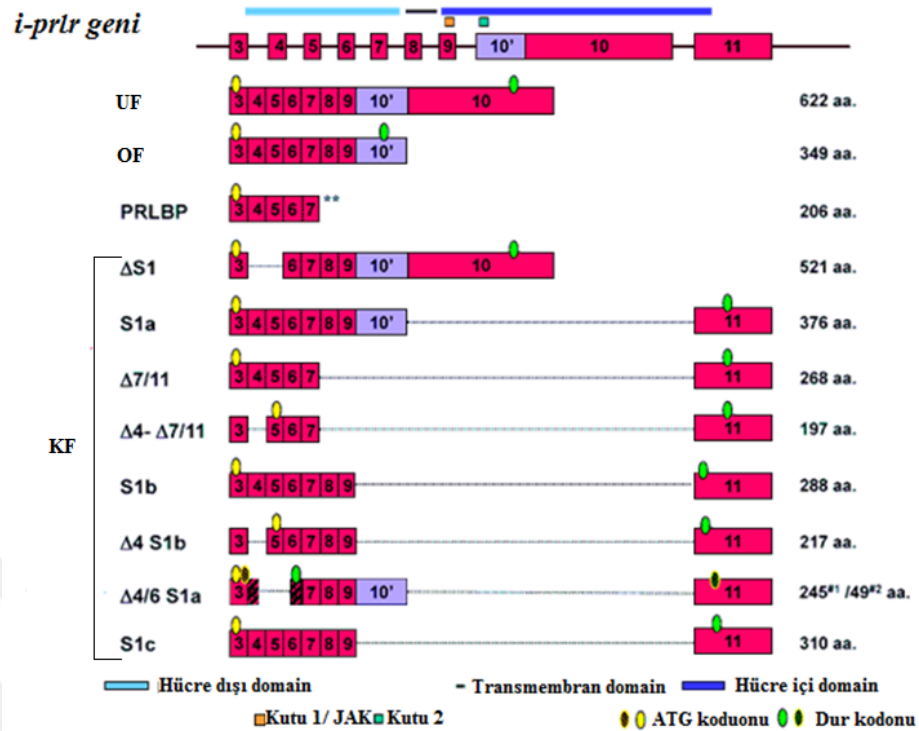
** İnsan da toplam 7 adet kısa form PRLR tanımlanmıştır. İnsanın, tüm memelilerde görülen ve ortak olan KF karşılık gelen PRLR proteini 310 amino asitlik olmaktadır. Diğer kısa form varyantları, 'içsel ekzonların' uzaklaştırılması ve/veya ekzon 10'un bir kısmını taşımasından kaynaklanmaktadır (Bkz. Şekil 2.8).

Şu ana kadar bahsedilen sıçan UF ve KF PRLR dışında, sıçan için bir PRLR formu daha bilinmekte olup, buda ortanca form (OF) olarak adlandırılmıştır. Bu form sıçan Nb2 hücre kültüründen (immün sistem hücresi) elde edilmiş olup, ekzon 10'nun kısmı kullanımı ile oluşmuş bir formdur (Ali vd 1991).

Türler arasında uzun form PRLR izoformu, diğer PRLR form ve varyantlarına göre daha iyi korunmuştur. Farklı türlerde PRLR UF'nin uzunlukları arasında farklılık görülmekle beraber (Çizelge 2.3), ekzon 10 tarafından kodlanan kısmında yüksek homoloji görülmektedir (Ek 2). Ancak türler arasında kısa form PRLR'in hem uzunluklarında (Çizelge 2.3) ve hem de içerdikleri ekzon çeşitleri bağlamında (örneğin farede ekzon 11, 12 ve 13 kısa form PRLR izoformlarını kodlamaktadır) büyük farklar bulunabilmektedir.

2.7. İnsan PRLR protein varyantları

Prolaktin reseptör çeşitliliği bağlamında en yüksek sayı insandan elde edilmiştir. Prolaktin ve prolaktin reseptörünün meme gelişimi ve meme kanserindeki ilişkisinden dolayı, insan hücre hatları (meme bezi, meme kanseri ve immün sistem hücreleri) ve bunların ifade ettiği PRLR formları en iyi tanımlanmış olanlardır. İnsan ve insan hücre hatlarından elde edilen PRLR varyantları Şekil 2.8'de sunulmuştur.



Şekil 2.8. İnsan PRLR varyantları (Tsai-Morris vd 2004). Tüm memelilerde bulunan uzun form (UF) ve kısa form (şekilde S1c olarak adlandırılmış olan) insanda da bulunmakla birlikte, insan da KF olarak adlandırılmış diğer PRLR formları (klasik UF ve KF tanımlarından farklı olarak) ekzon 10'da bulundurabilmektedir (örneğin, KF olarak adlandırılmış olan ΔS1, ekzon 10'un tamamını bulundurmakta veya KF S1a ve KF Δ4/6 S1a'da olduğu gibi, ekzon 11 ile birlikte ekzon 10'un bir kısmında bulunabilmektedir. Hücre hatlarından elde edilen bu insan kısa formlarının diğer bir özelliği de, 'içsel ekzon' varyantları sayısı ve çeşitliliğidir (örneğin, KF Δ4- Δ7/11 ve Δ4 S1b gibi).

İnsan UF PRLR ilk defa insan hepatoma ve meme kanseri hücrelerinden, KF PRLR ise insan sperm hücrelerinde tanımlanmıştır (Boutin vd 1989, Pujianto vd 2010). Şekil 2.7 dikkatle incelendiğinde, şu ana kadar bahsedilen klasik PRLR formları (UF ve KF) dışında, insan hücre hatlarından birçok farklı PRLR form ve varyantları tanımlanmıştır (Bkz. Şekil 2.8, şekil altı açıklaması).

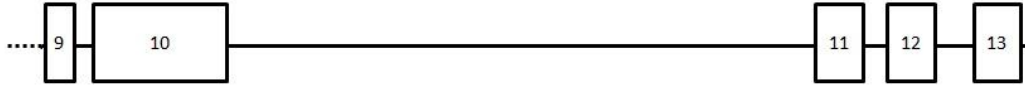
Sıçan, fare ve domuzda tanımlanmamış olan temel formlardan farklı olarak, ekzon 3 ile 9 arasındaki ekzonlardan bir veya bir kaçının çıkartılması ile oluşturulan insan PRLR varyantları meme kanseri hücrelerinde tanımlanmıştır (Kline vd 2002, Trott vd 2003). İnsanda tanımlanan diğer farklı bir PRLR formu ise, membrana yerleşmeyen (çünkü membran içine yerleşmesini sağlayacak protein kodlayan ekzon kısmı- ekzon 8-yoktur) ve bundan dolayı hücre içine veya hücre dışına salınan 'çözünür form' (soluble form) olarak adlandırılmış PRLR varyantıdır (Şekil 2.8, PRLBP).

Türler arasında en yüksek PRLR varyant çeşitliliği insanda bilinmekle birlikte, bu PRLR varyantlarının hemen hemen hepsi kanser hücre hatlarından tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu formların sağlıklı ve normal fizyolojiye sahip organizmada bulunup bulunmadığı hala tartışma konusudur.

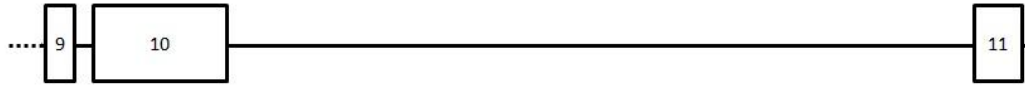
2.8. Fare PRLR protein varyantları

Fare PRLR varyantları hem sıçandan hem de insandan farklılık göstermektedir. Tüm memelilerde bulunan ortak iki izoform (UF ve KF) dışında, fare iki farklı kısa form daha bulundurmaktadır ve farenin kısa formları KF1, KF2 ve KF3 olarak adlandırılmaktadır (Davis ve Linzer 1989, Clarke ve Linzer 1993). Şekil 2.9'de fare *prlr* geni ile sıçan *prlr* geni ve bunların kodladığı ekzonlar karşılaştırılmıştır.

Fare *prlr*



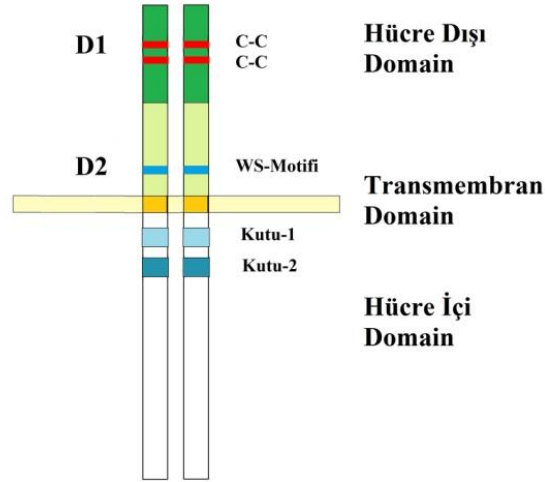
Sıçan *prlr*



Şekil 2.9. Fare ve sıçan *prlr* gen haritasının karşılaştırılması. (Genin ekzon 9'dan sonraki kısmı gösterilmiş ve karşılaştırılmıştır). Fare *prlr* geni sıçandan farklı olarak iki KF daha kodlamaktadır (fare geninde ekzon 11 ve 12 ile belirtilen ekzonlardan kodlanan PRLR kısa formları). Tüm memelilerde ortak olan ve sıçanda da bulunan KF (ekzon 11'den kodlanan), farede ekzon 13 olarak adlandırılmıştır. Fare *prlr* genin kısa formlarını kodlayan ekzonlarının bu adlandırılma şekli, hem literatürde hem de bu tez çalışmasında sıçan ve fare kısa form PRLR'nin karşılaştırılmasında problem yaratabilmektedir.

2.9. Prolaktin Reseptör Proteinin Yapısal Özellikleri

Prolaktin reseptörü üç ana domainden oluşur; hücre dışı, transmembran ve hücre içi domain (Şekil 2.10). Hücre dışı ve transmembran domainler tüm UF ve KF PRLR'lerde ortak olup (ekzon 3 ile 9 arası), bu iki izoform hücre içi domainler ile birbirlerinden farklılık gösterir (UF PRLR'de hücre için domain ekzon 10'dan, KF ise ekzon 11'den kodlanır).



Şekil 2.10. Prolaktin reseptörü domainleri. PRLR, D1 ve D2 olmak üzere iki subdomainden oluşmuş bir hücre dışı domain, bir transmembran domain ve bir hücre içi domaine sahiptir.

Hücre dışı domain: Yaklaşık 200 aminoasit uzunluğunda olan hücre dışı domain, D1 ve D2 olmak üzere iki alt domainden (tip 3 fibronektin-benzeri domain) oluşmaktadır (Bole-Feysot vd 1998). D1 iki çift sistein disülfid bağı (Cys¹², Cys²², Cys⁵¹, Cys⁶¹) ve D2 “WS-motifi” (Trp-Ser-x-Trp-Ser) içermektedir. WS-motifindeki ya da disülfid bağı yapan sisteinlerdeki değişimler reseptör fonksiyonunu azalmaktadır (Rozakis-Adcock ve Kelly 1991, 1992). Hücre dışı domaindeki iki triptofanın (Trp⁷² ve Trp¹³⁹) ligand bağlanmasına katıldığı bildirilmiştir (Bole-Feysot vd 1998). PRLR’nin hücre dışı domainin de hücre yüzeyinin hedeflenmesi için gerekli glikozizasyon bölgeleri mevcuttur (Buteau vd 1998).

Transmembran domain: PRLR membrandan sadece bir kere geçen tek bir transmembran domaine sahiptir. Bu transmembran domain yaklaşık 24 aminoasit uzunluğunda hidrofobik bir domaindir (Bole-Feysot vd 1998).

Hücre içi domain: PRLR hücre içi domaininde türler arasında en çok korunmuş olan kutu 1 bölgesi taşımaktadır ve bu kısım JAK (Janus kinaz) bağlanması için gereklidir. Kutu 1 prolince zengin hidrofobik motif (Pro-x-Pro) taşımaktadır. Kutu 2’nin korunmuşluğu daha düşüktür ve kısa form PRLR’de bulunmaz.

Prolaktin reseptörü domainleri üzerindeki bulunan motifler ve disülfid bağında rol alan sisteinler Ek 2’de verilen, fare, domuz ve insan PRLR UF’lerin aminoasit dizisi karşılaştırması üzerinde gösterilmiştir.

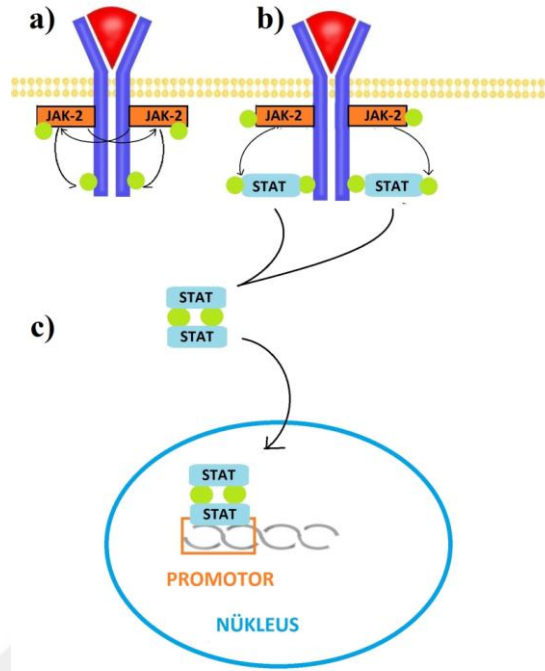
2.10. Sinyal iletimi

PRLR'nin sinyal iletiminin mekanizmasının başlamasında hücre içi domain anahtar rolü üstlenir (Bole-Feysot 1998). Kutu 1 stoplazmik proteinlerin bağlandığı bölgedir. Sinyal yolları reseptörün aktivasyonunu takin başlar.

2.10.1. JAK2'nin aktivasyonu

Prolaktin reseptörünün aktivasyonu ligand indüklü dimerizasyon ile gerçekleşir. PRLR'nin hücre içi domainin intrik kinaz aktivitesinden yoksun olmasına rağmen, PRLR'nin ligand aracılı aktivasyonu reseptörün kendisi (Kelly vd 1991, Nagano ve Kelly 1992) ve çeşitli hücrel proteinlerin fosforilasyonu ile sonuçlanır (Rillema vd 1992).

Prolaktin reseptörü sinyalizasyon için ağırlıklı kullanılan yolak JAK/STAT yolağıdır. Deneysel veriler JAK2 aktivasyonu için iki ana koşul önermektedir 1) PRLR'nin hücre içi domaininde prolince zengin kutu 1'in varlığı (Lebrun vd 1995), 2) ligand indüklü PRLR dimerlerinin homodimerik stokiyometri (Chang ve Clevenger 1998, Ferrag vd 1997, Ferrag vd 1998). JAK2'nin PRLR ile birleşmesi kesin olarak kanıtlanmasına rağmen (Campbell vd 1994, Lebrun vd 1994, Rui vd 1994) birleşimin kesin yapısı bilinmemektedir. Şekil 2.11'de PRLR'nin homodimerizasyonu takiben başlayan JAK/STAT iletimi özetlenmiştir. İki JAK2 molekülünü yakınlaştıran PRLR dimerizasyonunun takiben JAK2'ler transfosforillasyon ile aktif hale gelir (Ferrag vd 1998). JAK2 kinazlar birbirlerini transfosforile eder ve PRLR'nin tirozin residülerinin fosforilasyonuna katılır (Rui vd 1992). PRLR KFHücre içi domaininde 4 tane tirozin residüsü içermesine rağmen reseptörde kısa formun aktivasyonuna bağlı olarak tirozin fosforilasyonu gerçekleşmez (Goupille vd 1997). Poliferasyon gibi çeşitli hücrel fonksiyonlar (PRLR KF arayıcılığı ile gerçekleştirilir), PRLR fosforilasyonu olmaksızın gerçekleşir (Yao vd 1996). PRLR UF bir çok tirozin residüsü içerir, bunların çoğu prolaktin reseptörü aktivasyonuna bağlı olarak fosforillenir (Pezet vd 1997).



Şekil 2.11. Ligand bağlanması ve homodimerizasyonu takiben PRLR sinyalizasyonu için kullanılan JAK/STAT yolu özet: a) JAK'lar birbirlerini ve PRLR hücre içi domainindeki tirozinleri fosforiller, b) PRLR üzerindeki fosfotirozinlere STAT'lar bağlanır ve JAK'lar tarafından STAT'lar da fosforillenerek reseptör yüzeyinden ayrılır, c) fosforilenmiş STAT'lar dimerize olarak gen aktivitelerini düzenlenmesine katılmak üzere nükleusa gider.

Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatör (STAT, Signal transducer and activator of transcription) protein ailesi sitokin reseptör sinyalizasyonunda başlıca iletici moleküllerdir (Ihle vd 1994). STAT1, STAT3 ve özellikle STAT5a ve STAT5b PRLR'nin iletici molekülleri olarak tanımlanmıştır (Goffin vd 1998, Jabbour vd 1998). Fikir birliğine varılmış olan STAT aktivasyon modeline (Bole-Feysot 1998, Finidori 1995) göre, sitokin reseptörünün fosforile tirozin residüleri STAT proteinin SH2 domaini ile etkileşime girer, STAT reseptörler etkileşim halindeyken reseptör ile birleşmiş JAK'lar tarafından STAT'lar fosforillenir. Fosforillenen STAT'lar reseptörden ayrılır hetero- yada homodimerize olur (Bole-Feysot 1998). STAT dimerleri nükleusa gider ve hedef gen promotöründeki STAT DNA-bağlanma motifini aktive eder (Bole-Feysot 1998, Carter-Su vd 1998).

Diğer sinyalizasyon yolları: Ras/Raf/MAP kinaz yolu. JAK/STAT yolu prolaktin reseptörünün aktivasyonunun takiben başlatılan en önemli yolağın olmasına rağmen, bazı yayınlar mitojen aktive protein (MAP) kinazın karıştığını gösteriyor (Buckley vd 1994, Clevenger vd 1994, Das ve Vonderhaar 1995, DAS ve Vonderhaar 1996, Erwin vd 1995, Nemeth vd 1998, Nohara vd 1997, Piccoletti vd 1994). PRLR'nin fosfotirozin residüleri reseptörü Ras/Raf/MAPK kaskadları ile birleştiren

proteinler (Shc/Grb2/SOS) için bağlanma noktası oluşturur (Carter-S ve Smit 1998, Das ve Vonderhaar 1995).

Diğer Kinazlar: Src kinaz ailesinin üyelerinin (*c-src* (Berlanga vs 1995, Campbell-Burk ve Carpenter 1995, Sorensen ve Sheffield 1997) ve Fyn (Al-Sakkaf vd 1997)) prolaktin-indüklü aktivasyonunu bildirmiştir. Son zamanlarda insülin reseptör subrat 1 (IRS-1) ve fosfatidilinositol (PI) 3'-kinaz'ın (Baeuerle 1998, Berlanga vd 1997, Ratovondrahona vd 1998) alt ünitesinin prolaktin indüklü tirozin fosforilasyonu tanımlanmıştır. IRS-1 ve PI 3'-kinaz PRLR komplekse birleşiyor gibi gözükmemektedir. PI 3'-kinaz'ın prolaktin indüklü aktivasyonunun Fyn aracıılığı ile olduğu önerildi (Al-Sakkaf vd 1997).

Hüce içi iyon konsantrasyonu: En az iki olay ve PRLR'nin iki bölgesi prolaktin indüklü iyonik değişiminde rol alır. PRLR'nin hücre içi domaininde yer alan kutu 1 JAK2 aracıılığı ile tirozin kinaz bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonuna katılırken (Ratovondrahona vd 1998), hücre içi domainin COOH terminali intraselüler mesajcı olan {inositol 1,3,4,5-tetrakisposfat [$Ins(1,3,4,5)P_4$] ve inositol heksakisposfat ($InsP_6$)} üretimine katılır ve böylece voltaj-bağımsız Ca^{2+} kanalları açılır.

Prolaktin reseptörü sinyalizasyonunun negatif regülasyon (downregulasyonu): Sitokin reseptör sinyalizasyonunun negatif regülasyonu reseptörün biyolojik aktivitesini düzenlemek için önemli bir mekanizmadır. PRLR aktivasyonu için tirozin fosforilasyonu gerektiğinden, tirozin fosfatazların inaktivasyon ile ilişkili olması beklenir (Bole-Feysot vd 1998). Deneysel veriler SH2 taşıyan Tyr (Tirozin) fosfataz SHP-1 ve SHP-2'nin prolaktin reseptörü sinyalizasyonunun downregülasyonunda GH ya da diğer sitokinlerin sinyalizasyonundakinden daha az görev üstlendiğini göstermektedir (Ali vd 1996, Berchtold vd 1998, Edwards vd 1998, Pezet vd 1999, RAM ve Waxman 1997, Tourkine vd 1995). Jak/STAT yolağını inhibe eden SH2 içeren protein aileleri belirlendi. Bu protein ailelerinden sitokin-indüklü (ya da indüklenebilir) SH2 taşıyan protein (CIS, cytokine-inducible SH2) (Liang ve Pardee 1995, Masuhara vd 1977, Yoshimura vd 1995), ve sitokin sinyalizasyonu baskılayıcıları (SOCS, suppressors of cytokine signaling) (Endo vd 1997, Hilton vd 1998, Narazaki 1998, Nicholson ve Hilton 1998, Star ve Hilton 1998) olarak sözedilir. Bunların prolaktin reseptör sinyalizasyonundaki işlevi yakın zamanda belirlendi (Pezet vd 1999). Prolaktin SOCS-1 ve SOCS-2'nin akut ve geçici olan ifadesini indükler, SOCS-1 ve SOCS-2 JAK2'nin aktivitesini ve STAT'ların aktivasyonunu inhibe eder (Pezet vd 1999). CIS ve SOCS-2 genleri prolaktin uygulamasına uzatılmış aktivite olarak yanıt verirler ve SOCS-2 hücrelerin prolaktin reseptör uyarımına olan hassasiyetini, büyük ihtimalle SOCS-1'in inhibitör etkisini baskılayarak, artırıyor gibi görünüyor (Pezet vd 1999).

2.11. Prolaktin Reseptörü İle İlgili Patojeniler

2.11.1. Prolaktin, prolaktin reseptörü ve kanser

Prolaktin hormonunun meme bezi üzerindeki tümörojenik potansiyeli ilk kez yaklaşık 40 yıl önce vurgulanmıştır. Kemirgenlerde doğal ve indüklenmiş kanser

modelleri ile yapılan deneyler, kan dolaşımındaki yüksek PRL'nin tümör büyümesini arttırdığını göstermiştir (Boot vd 1962, Welsch vd 1977). Bununla uyumlu olarak, dopamin antagonisti (bromokriptin) uygulanarak dolaşımdaki (PRL) seviyesini düşürüldüğünde bu kemirgen modellerinde kayda değer düzeyde meme tümörü oluşumunda ve ilerleyişinde azalma görülmüştür (Welsch vd 1979). Deneysel verilerin aksine ilerlemiş meme kanseri hastalarında, bromokriptin uygulaması dolaşımdaki PRL seviyesini düşürmesine rağmen meme kanseri hastalarında faydalı bir etkisi gözlemlenmemiştir (Clevenger vd 2003).

PRL-PRLR ilişkili tümörögenezde, hipofiz dışı hücrelerde PRL üretimi ve meme kanseri hastalarında gösterilmiş olan sürekli aktif PRLR varyantları şüpheli olarak görülmektedir. Organizmada üretilen PRL'nin ana kaynağı ön hipofiz olmasına rağmen, birçok insan hücresi/dokusundan (meme bezi, prostat, beyin, bazı immün hücreler ve adipozitler gibi) PRL üretimi söz konusudur (Ben-Jonathan vd 1996). PRLR neredeyse bütün dokularda ifade edildiğinden (Bole-Feysot vd 1998), PRL geninin ifadesi bir otokrin-parakrin döngünün oluştuğu kabul edilir.

Otokrin-parakrik PRL'nin tümörögenezisteki etkisi; hipofiz dışı PRL üretiminin dopamin ya da agonisti tarafından yapılan düzenlemeden kaçır ve bu yüzden bölgesel ilaç yaklaşımı bu hücrelerden yapılan PRL ifadesini ve fonksiyonel sonuçlarını ölçmede yetersiz olmasından ve hipofiz dışı PRL üretimi insanda diğer hayvanlara göre daha sık görülüyor ve genetiği değiştirilmiş modeller kullanılmadan elde edilen verilerin her zaman bu soruya hitap etmemesinden dolayı, açık değildir.

Bu konu ile ilgili bir öncü çalışmada lokal PRL'nin reseptörünü aktif hale getirmesini PRL antikorlar ile engellendiğinde bunun hücre proliferasyonun azalttığı görüldü (Ginsburg ve Vonderhaar 1995). Kemirgenlerde hipofiz dışı PRL yaygın olmadığından dokuya özgü transgenik yaklaşımlar otokrin-parakrin döngünün fonksiyonel etkilerini değerlendirmek için daha uygundur. Memeye özgü PRL transgenezis modeli 2003 yılında yayınlandı ve lokal PRL'nin 16 aylık farelerde östrojen reseptörü negatif ve pozitif adenokarsinomaya dönüşecek pre-neoplastik lezyonları indüklediğini göstermiştir (Rose-Hellekant vd 2003).

PRLR 'ye ait I76V ve I146L olmak üzere iki tane tek nükleotit polimorfizim varyantı çoklu meme fibroadenomasında (MFA) gösterilmiştir (Canbay vd 2004, Lee vd 2007). PRLR-I76V hem deney hemde kontrol gruplarında görülürken, PRLR-I146L sadece MFA hastalarında gözlemlenmiştir (Courtilot vd 2010). Bu PRLR formu ligandsız yapısal olarak aktif fonksiyonel bir hastalıkla (MFA) ilişkilendirilmiş doğal bir varyant olarak görülmektedir (Bogorad vd 2008).

2.11.2. Prolaktin reseptörü ve Okratoksin A

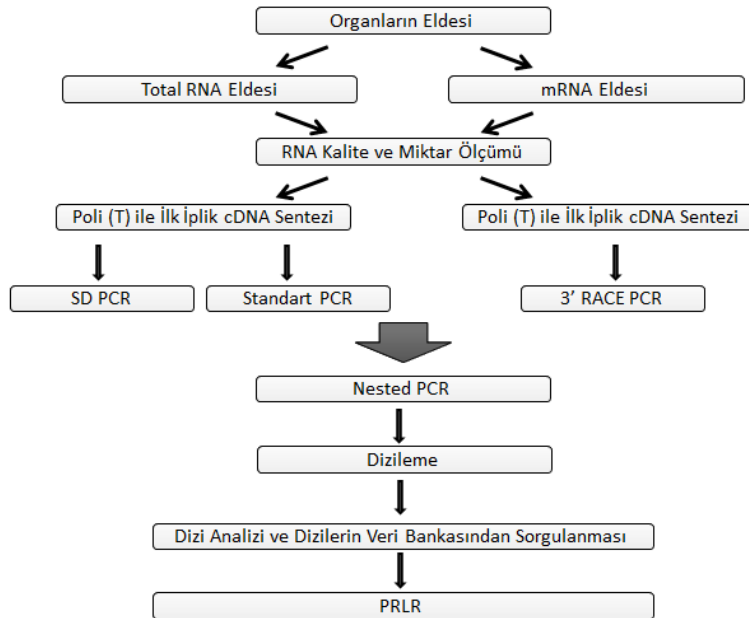
Okratoksin A (OTA), tükettiğimiz geniş çaptaki yiyeceklerde biriken, nefrotoksik ve kanserojen fungal bir toksindir. OTA alımının gen ifadesine etkisini araştıran birkaç çalışmada *prlr*'nin ifadesinin kayda değer bir şekilde değiştiği görülmüştür. On üç haftalık OTA uygulamasının sıçan karaciğerinde *prlr* geninin mRNA düzeyindeki ifade düzeyini 3-3.5 kat arttırdığı görülmüştür (Qi vd 2014).

Fischer cinsi erkek sıçanlara yaklaşık 12 ay OTA uygulamasının karaciğer ve böbrekteki PRLR ifadesini azalttığı görülmüştür (Marin-Kuan vd 2006). Zebra balığı embriyosuna OTA uygulamasının, zebra balığı *prlr*-a (zebra balığında iki tane *prlr* geni mevcuttur; *prlr*-a ve *prlr*-b) ifadesini azalttığı görülmüştür (Wu vd 2016). Ancak bu çalışmalarda PRLR varyantlarından hangilerinin ifade düzeylerinin değiştiği açık değildir.

Grubumuz tarafından OTA'nın toksik etkisinin testosterona bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Mor vd 2014) (ve östrojenle de ilişkili olduğunu gösteren yayınlanmamış verilerimiz vardır). Yukarıdaki sözü edilen çalışmalarda ifade düzeyi kayda değer şekilde değişen genlerden *prlr*'nin ifadesinin testesteron ve östrojene bağlı olarak değişmesi, OTA'nın toksik etkisi üzerinde *prlr*'nin etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

2.12. Projenin Gerçekleştirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Bu çalışmada prolaktin reseptörü cDNA'larını elde etmek için ilk olarak organlardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA eldesinden itibaren uygulanan süreç Şekil 2.12'de özetlenmiştir. Elde edilen toplam RNA ya da mRNA'lerden ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu ilk iplik cDNA'lar SD (Stepdown) PCR, 'Standart PCR' ya da RACE PCR ile çoğaltılmış ve bu çoğaltılan bölgeler ya doğrudan ya jelden kesilerek ya da Nested PCR yapıldıktan sonra dizilemesi yapılmıştır.



Şekil 2.12. Bu tez projesinin gerçekleştirilmesinde kullanılan deneylerin ve sürecin özeti.

2.12.1. RNA eldesinde dikkat edilen noktalar

RNA gerek kendi kararsız doğası gereği (riboz şekerinin 2' hidroksil grubunun nükleofilik davranmasından dolayı), gerekse RNaz'lerden (Ribonükleaz) dolayı parçalanmaya DNA'dan daha çok yatkındır. Bu sebepten dolayı çalışmanın RNA içeren doku elde edilmesinden, cDNA eldesine kadarki basamaklarında daha dikkatli davranılmalıdır. RNazlar prokaryotlardan ökaryotlara kadar her hücre tipinde bulunur. bir RNA örneğine bu enzimlerin küçük bir miktarının karışması RNA örneğini yok etmeye yeterlidir. Bir laboratuvarında RNaz kontaminasyonu kaynakları başlıca; deneyde kullanılan dokular-hücreler, solusyonlar, ortamda hava, yüzeyler ve toz ve en önemlisi insan teması (deri ve eller)'dir. Bütün çalışmalarda aseptik çalışma kurallarına uyarak çalışmak gerekmektedir.

Organlar-dokular alındıklarında hemen kullanılmayacaklarsa sıvı azot kullanılarak dondurulup, -80 °C'de depolanırlar. Bu şekilde RNA'nın gerek kendi doğasından gerekse hücrelerde bulunan yüksek miktardaki RNazdan dolayı degrade olması engellenir. Kullanım için taşınırken buz içerisinde taşınmalıdır. Organ-doku homojenize edilirken RNazları inhibe eden bir liziz edici ajan kullanımı hücre içinde bulunan RNazların aktivitesini engelleyecektir. Bu çalışmada kullanılan liziz edici ajan guanidyum tuzları içermekte böylece hücrel RNazları inhibe etmektedir.

RNA örneğine RNaz kontaminasyonunun en büyük kaynağı parmak uçlarıdır. Bu kontaminasyonu engellemek için eldiven giymek RNA çalışmalarının en önemli kuralıdır. Çalışma sırasında bir çok kere eldiven değiştirmekten çekinilmemelidir, çünkü eldiven ile ortam temaslarında (örneğin; mikropipetör, kapı kolu, buz dolabı kolu, bilgisayar klavyesi, telefon...) eldivenlere RNaz geçmektedir. RNazlar ısıya dayanıklıdır; kaynatma ya da otoklavlama ile materyeller RNazlardan arındırılamaz bundan dolayı sertifikalı RNaz içermeyen solusyonlar ve tek kullanımlık plastik gereçler (tüpler, pipet uçları...) kullanılmalıdır.

2.12.2. RNA miktarının ölçülmesi ve kalitesinin değerlendirilmesi

RNA kalitesinin ve miktarının değerlendirilmesi, RNA izolasyonu gerektiren bütün uygulamalarda zorunluluktur. İzole edilen RNA kullanılarak gerçekleştirilen yoğun emek ve maliyet gerektiren devam uygulamalarında üretkenliği, verimi ve hassasiyeti maksimum seviyeye çıkartmak için kalıp materyelin tam-yeterli olduğundan emin olunmalıdır. Böylece zamandan, emekten ve maliyetten tasarruf edilip verim alınabilir.

RNA örneğinin ölçüm işlemi ya RNA izolasyonunun hemen ardından veya örnek ölçülmeden depolandı ise, depolama işlemi sonrasında kullanılmadan önce yapılmalıdır. Ayrıca uzun bir depolama süreci geçiren RNA örneğinin kalitesi ve miktarı, RNA'ın degradasyonu olacağı için tekrar ölçülmelidir.

RNA örneğinin kalitesi ve miktarını spektrofotometrik olarak değerlendirilebilir. Spektrofotometrik analizle RNA miktarı ve kalitesi (saflığı) minimal kirlilikle

ölçülebilir. Ultraviyole (UV) ışık absorpsiyonu nükleik asit konsantrasyonu ve saflığı ile ilgili doğrudan bilgi verir. RNA ve DNA örnekleri 260 nm dalga boyunda ölçülebilir. Ölümde OD 1, yaklaşık olarak; 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml tek iplik RNA ya da DNA'ya ve 33 µg/ml tek iplik oligo nükleotide karşılık gelmektedir. RNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorbansı kullanılarak RNA miktarı EK 4'deki formülle bulunabilir.

Miktar hesaplaması yapılırken kullanılan A_{260} örneğin saflığı ve kalitesi hakkında çok az bilgi verir. Örnek yüksek miktarda tuz, protein ve/veya organik çözücü taşıyabilir. Nükleik asit saflığı için farklı dalga boylarında (240-320 nm arasında) ölçüm yapılmakta ve bu ölçümlerin oranları kullanılmaktadır. Yapılan ölçümlerin sıklıkla kullanılan oranları ile bu oranların karşılık gelmesi istenen değerler Çizelge 2.6'de verilmiştir ve bu değerlerin sapma durumuna sebep olacak problemler belirtilmiştir. A_{260}/A_{280} oranının 1.8'in altında olması sıklıkla protein kontaminasyonunu işaret eder. Bu metod saf protein çözeltisindeki nükleik asit kontaminasyonunu göstermek için iyi bir indikatördür (Warburg ve Christian 1942) ancak tersi doğru değildir. Nükleik asitler 260 nm dalga boyunda yüksek absorbans verirler ve 260 nm ile 280 nm dalga boylarında verdikleri absorbans proteinlerin verdiği absorbanstan daha yüksektir. Fakat önemli miktardaki protein kontaminasyonu 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbansın kayda değer seviyede değişmesine sebep olur. Bundan dolayı nükleik asit ölçümü bir miktar hatalı olabilmektedir. A_{260}/A_{230} oranı karbonhidrat, kalıntı fenol ve guanidin ya da glikojen gibi maddelerin kontaminasyonunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Çizelge 2.6. RNA saflığının belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik ölçümlerlerin istenen değerleri ve olası problemlerin belirteçleri.

Ölçüm	İstenen değerler	Olası problemler
A_{260}/A_{280}	2.0	Oranın 1.8'in altında olması protein kontaminasyonuna işaret eder
A_{260}/A_{230}	2.0-2.4	Oranın 1.8'in altında olması organik bileşik kontaminasyonuna işaret eder
A_{260}/A_{240}	1.4	Oranın 1.4'in altında olması örnekte yüksek miktarda tuz olduğuna işaret eder

2.12.3. Rivörz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Rivörz transkriptaz (RT) enzimi kullanılarak RNA kalıbından komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi işlemine rivörz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu denir. Kısaltma kullanılırken rivörz transkriptaz PCR, real-time PCR ile karıştırılabilmektedir; rivörz transkriptaz PCR için RT-PCR, real time PCR için qPCR kullanılmaktadır.

Esas olarak retrovirüslerle ilişkilendirilmiş olan Rivörz transkriptazın RNA-bağımlı DNA polimeraz ve ribonükleaz H aktivitesi baskın özelliği olmasına rağmen

kaynak organizmaya bağlı olarak DNA bağımlı polimeraz aktivitesi de gösterebilmektedir. Retroviral Rivörz transkriptaz; RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi, ribonükleaz H aktivitesi ve DNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi olmak üzere 3 aktivitesi vardır.

RNaz H aktivitesi uzun cDNA'ları sentezlerken istenmeyen bir işlemdir çünkü tam uzunlukta bir Rivörz transkripsiyon gerçekleşmeden önce RNA kalıbı degrades olabilir. cDNA sentezinin verimini arttırmak için enzimin RNaz H domaininde değiştirilerek RNaz aktivitesi azaltılmış ticari rivörz transkriptazlar bulunmaktadır.

Rivörz transkriptazın yüksek sıcaklıklara dayanabilmesi cDNA sentezinde önemli rol oynamaktadır. Yüksek reaksiyon sıcaklığı RNA'daki ikincil yapıların ve GC içeriğini bağlarını açarak rivörz transkriptazın diziyi okuyabilmesini sağlar. Bunun sonucunda daha yüksek sıcaklıklarda rivörz transkripsiyon daha yüksek verimde tam boy cDNA sentezini mümkün kılar (Gerard vd 2002, Brooks 1995).

Bu projede kullanılan rivörz transkriptaz modifiye edilmiş bir M-MLV rivörz transkriptazdır; termostabilitesi artırılmış 65 °C'ye kadar ilk zincir cDNA sentezini yapabilmekte ve RNAaz H aktivitesi düşürülmüş 13 kb uzunluğuna kadar RNA'dan ilk iplik cDNA sentezini yapabilmektedir. 1 pg - 2 µg başlangıç RNA'sını kalıp olarak kullanmaktadır.

2.12.4. Primer tasarımı

Primer DNA sentezi için başlangıç noktası oluşturan kısa RNA ya da DNA (gennellikle 18-22 nükleotit) zinciridir. Primerler DNA polimerazın nükleotit ekleyebileceği serbest 3' ucunu sağlar. Bir çok laboratuvar tekniğinde yüksek sıcaklıklarda kararlı olmasından dolayı DNA primerleri kullanılır.

Primerler PCR sonunda oluşan ürünlerin özgüllüğüne ve verimine büyük ölçüde etki ettiğinden tasarlanırken dikkat edilmesi önem taşımaktadır. Primerler tasarlanırken amplifiye edilecek bölgeye özgü olması son derece önemlidir. Primer tasarlanırken; primer uzunluğu ve primer çifti arasındaki uzunluk farkı, GC içeriği, primerin 3' ucunun nükleotit içeriği, primerlerin *T_m* sıcaklığı ve primer çifti arasındaki *T_m* sıcaklığı farkı ilk olarak incelenmesi gereken özellikleridir (McPherson vd 1995, Rozen ve Skaletsky 2000, Sambrook ve Russel 2001, Wu vd 2004). Ayrıca primerlerin ikincil yapıları dimerler, saç tokası ve spesifitesi hesaba katılır (Vallone ve Butler 2004, Ye vd 2012). Primerler tasarlanırken dikkat edilecek parametreler özet olarak Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Primer tasarlarırken dikkat edilmesi gereken parametreler.

Primerler tasarlanırken göz önünde tutulan parametreler	Optimum Değerler
1. Özgün oligonükleotit dizisine sahip olmalı	-
2. 3' ucunda G/C kümesi içermeli	1-2 G/C nükleotiti
3. Kendi üstünde komplementer bölgeler olmamalı	≤ 3 sınırdaş nükleotit
4. Antisens karşılığı ile komplementerliği olmamalı	≤ 3 sınırdaş nükleotit
5. Rastgele baz dağılımına ve içeriğine sahip olmalı	%40-60 G/C içeriği
6. Primer uzunluğu	18-25 nükleotit
7. Primer TmS' nin birbiri ile eşleşmeli	-
8. Primer arası dizinin uzunluğu ve içeriği	100-600 nükleotit uzunluğu

. Ortalama primer uzunluğu 16-28 nükleotit uzunluğund olmalı (Wu vd 2004). Daha kısa olması spesifitesini azaltacaktır, daha uzun olmasıda sekonder yapılar oluşturmaya sebep olarak PCR verimini düşürecektir.

GC oranı primer üzerindeki guanin nükleoti ve sitozin nükleoti yüzdesini belirtir. Uygun GC oranı %40-60 arasındadır. Bu oranın yükselmesi Tm sıcaklığını etkilemektedir.

Primerlerin 3' ucunun GC nükleotitleri ile bitmesi önemlidir. GC nükleotit eşleşmesi termodinamik olarak daha stabildir dolayısı ile bu GC içeren 3' uç daha sağlam bir şekilde DNA'ya bağlanır.

Tm sıcaklığı başarılı bir PCR reaksiyonu gerçekleştirebilmek için kritik öneme sahiptir. Genellikle primer çiftleri arasındaki sıcaklık 5 °C'yi geçmiyorsa, 50-62 °C arası Tm sıcaklığında PCR reaksiyonu gerçekleştirilebilir. Tm sıcaklığı Wallace vd (1979) formülü ($Tm=2(A+T)+4(G+C)$) kullanılarak hesaplanabilir.

Primerlerin dimer oluşturması PCR reaksiyonunda istenmeyen bir olaydır, istenen bölgelere primerlerin bağlanamamasına sebep olur. Forward ve revers primer komplementerlik taşıyorsa birbirleri ile hibrit oluşturabildiği gibi, bir forward primer forward primer ile ya da revers primer revers primerle hibrit oluşturabilir. Bu yüzden bu primerlerin birbirleri ile komplementerlik durumları incelenmelidir.

Primerlerin kendi üstüne katlanması saç tokası denen ikincil yapıların oluşmasına sebep olur. Bu durum için primerler bireysel olarak incelenmelidir.

2.12.5. Stepdown (SD) PCR

Anneling sıcaklığının normalden yüksek bir sıcaklıkta reaksiyonu başlatılıp kademeli olarak düşürülmesi ile gerçekleştirilen Stepdown PCR (Hecker ve Roux 1996), TD (Touchdown) PCR'ın (Don vd 1991) modifiye bir formudur. PCR ürünleri

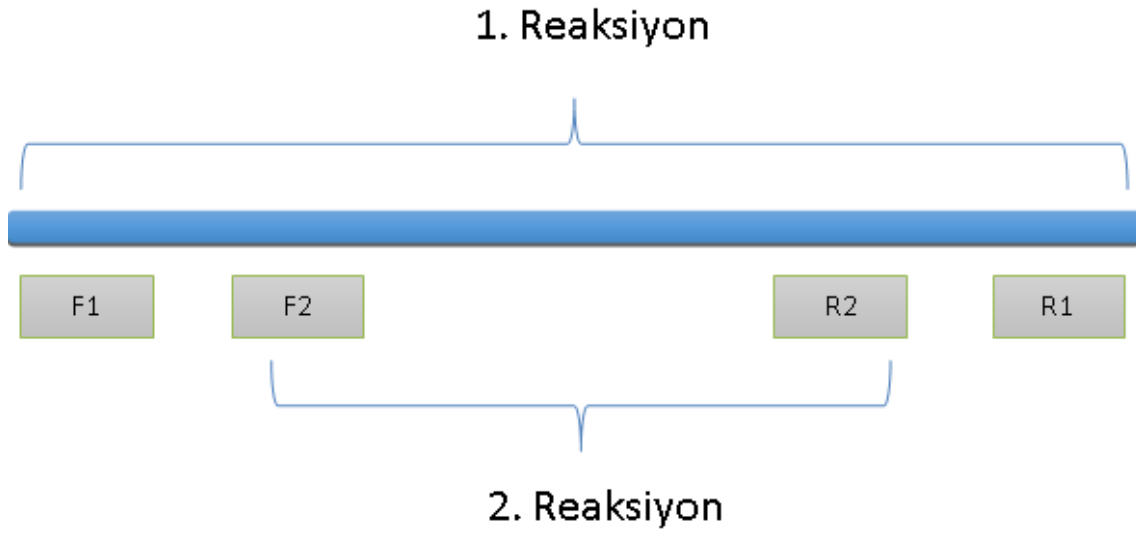
miktarı yeni primer setleri denenmesine rağmen düşükse bunun sebebi; amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğinin yüksek olması ya da o bölgede sekonder yapıların yoğun bulunmasından dolayı primerlerin bağlanma veriminin düşmesi olabilmektedir.

Primer bağlanma sıcaklığının yüksek sıcaklıktan başlanması amacı, kullanılan primerlerin hedefe özgü bölgelere bağlanma olasılığını artırmak ve böylece özgül olmayan PCR ürünlerinin ilk basamaklarda oluşmasını azaltarak, istenen bölgenin amplikasyon oranını artırmaktır.

Özgül olmayan cDNA dizilerinin amplifikasyonu; a- özgül bölgenin amplifikasyon verimini azaltmakta (ortama eklenen kaynakların özgül olmayan dizi bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldığından) ve b- aynı zamanda birçok farklı uzunlukta DNA batların oluşması sonucu, hangisinin PRLR gen bölgesine ait olduğunun anlaşılmasında yaratmış olduğu sıkıntıdır (Bu projenin amaçlarından biri de, PRLR geninin mRNA varyantlarını tanımlamak olduğundan, özgül primerler ile ortaya çıkan ve beklenen uzunluktan kısa olan her dizinin yeni bir PRLR mRNA varyantı olma olasılığı olduğundan, özgül amplifikasyon ürünü olmayan bu kısa DNA amplikasyonları, tanımlamada ciddi bir zaman ve emek kaybına neden olmaktadır).

2.12.6. Nested PCR

Nested PCR, Standart PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin veriminin yetersiz ya da beklenenden fazla amplifikasyon olması durumunda, verimi ve özgüllüğü arttırmak amacı ile kullanılmıştır. Nested PCR'ı, standart PCR'dan ayıran özellik, birinci amplifikasyon ürününün, ikinci bir primer veya primer seti ile amplifikasyonudur (Şekil 2.13). Burada gerçekleştirilmek istenen, birinci PCR amplifikasyonu sonucu yeterince ürün elde edilemeyen bir PCR reaksiyonundan, birinci amplikasyon ürününün içinde yer alan bir bölgeyi hedef alan primer ile daha yüksek verimde üretilmesini sağlamak veya birinci amplikasyon sonucu elde edilen ürünün, aranan gen bölgesine ait olduğunun teyit edilmesidir. Ayrıca PCR ürünü miktarını arttırmak için birinci reaksiyonda kullanılan primerler ile tekrar PCR reaksiyonu gerçekleştirilmesi durumunda, ilk reaksiyonda non-spesifik amplikasyon jel üzerinde görülme bile, ikinci reaksiyonda non-spesifik amplifikasyonlarında miktarını yüksek derecede arttırdığından bu şekilde PCR ürünü artırma yoluna gidilmemiştir.



Şekil 2.13. Nested PCR yapmak için uygulanan iki PCR reaksiyonunun hedef bölgeleri. F1, 2 ve R1, 2 kullanılan primerlerdir.

2.12.7. 3' cDNA sonlarının hızlı amplifikasyonu (3' RACE)

3' RACE (Rapid Amplification Of cDNA Ends) mRNA'ların 3' uçlarını amplifiye etmek için kullanılan bir stratejidir. Bu çalışmada yeni 3' yeni varyant tarama ve 3' UTR aydınlatılmasında kullanılmıştır.

3' RACE iki adımda gerçekleştirilmektedir; cDNA uçuna bir adaptör dizi eklenmesi ve bir tane gene özgü primer ile adaptöre bağlanacak primerle PCR reaksiyonu gerçekleştirilmesi. Sonunda adaptör dizi taşıyan cDNA, RT basamağında primer olarak adaptör diziyi taşıyan primerler kullanılarak kolayca elde edilmektedir (Bkz. EK 7).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Sıçan ve Organların Elde Edisi

Çalışmada kullanılan Wistar çeşidi sıçanlar (*Rattus norvegicus*) Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilmiştir. Etik kurul izini 13.07.2015 tarihinde, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 70904504 sayılı belgesinde (Karar no: 55) onaylanmıştır.

Çalışmada, 24 ve 22 haftalık bir erkek ve bir dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden alındıktan sonra ağırlıkları ölçülmüş ve sonrasında kapalı bir fanus içerisinde yaklaşık 90 sn eter buharına maruz bırakılarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Bu sıçanların böbrek, karaciğer ve testisleri alınmış, böbrek ve karaciğerlerin ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Bu organlar bekletilmeden bir makas yardımı ile daha küçük parçalara bölünüp 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilerek sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Dondurulan organlar -80 °C'de derin dondurucuda kullanılacakları zamana kadar muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan erkek ve dişi sıçanların toplam vücut ve organ ağırlıkları.

Cinsiyet	Sıçan	Ağırlık (gram)		
		Böbrek*	Karaciğer	Testis
Erkek	334.50	5.44	15.39	Ölçülmedi
Dişi	235.00	3.66	8.40	---

* Her iki böbreğin toplam ağırlığıdır.

3.2. Organ Parçalarının Homojenize Edilmesi

Organlardan RNA eldesi için, dokuların parçalanması bir homojenizatör yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik, hücreleri parçalamak için fenol ve guanidin tuzları içeren monofazik bir solüsyon olan ve aynı zamanda nükleaz enzimlerini de inhibe eden RiboEx Total RNA İzolasyon Solüsyonu ve bununla birlikte gelen kit (GeneAll Cat. No. 305-101) içeriği kullanılmıştır. RNA eldesi için 100-150 mg ağırlıklarında doku parçaları kullanılmıştır. Her 100 mg'lık doku parçasına karşılık 1 ml RiboEx Total RNA İzolasyon Solüsyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne eklenmiş ve tüp buz içerisindeyken homojenizatör (Marka: Isolab) ile yaklaşık 30 000 rpm hızında 30-60 sn süresince dokular homojenize edilmiştir.

Homojenat, hücre parçalanmasının tamamlanması ve nükleoprotein komplekslerinin çözünür hale gelmesi için oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında, homojenat 2 ml hacimli plastik tüplere aktararak 4 °C’de 12 000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant ya hemen kullanılmış veya kullanılıncaya kadar -40 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.3. Organ Homojenatlarından Total RNA İzolasyonu

Doku homojenatlarından total RNA izolasyonu, Hybrid-R total RNA izolasyon kiti (GeneAll Cat. No. 305-101) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu üretici firma tarafından sağlanan protokole göre gerçekleştirilmiştir. Bu kit RB1, SW1, RNW solüsyonları ve spin kolonlardan oluşmakta olup, kit içeriğinin ayrıntısı ve kullanım amaçları Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Organ homojenatlarından total RNA izolasyonunda kullanılan kit ve içeriğinin kullanım amaçları.

Kit içeriği ve kullanılan solüsyonlar	Kullanım amacı	Açıklama
Fenol kloroform İzoamil alkol	Faz ayrımı	Proteinlerin denatürasyonu ve nükleik asitlerin diğer biyomoleküllerden ayrıştırılması için kullanılır.
Spin kolon (RNA bağlama kolonu)	RNA bağlanması	Solüsyon içerisindeki RNA’ların katı bir yüzeye bağlanarak, santrifügasyon işlemi ile solüsyon ve diğer hücresel atıkların uzaklaştırılması
RB1	RNA bağlanması	Spin kolona RNA’ların bağlanması için kullanılır
SW1, RNW	RNA yıkanması	Kolonda kalan tuzların uzaklaştırılması

Organ homojenatlarından total RNA izolasyonunun ilk basamağı, nükleik asitler ile diğer biyomoleküller arasında faz farkı oluşturarak birbirlerinden ayırmak olup bu amaç için fenol-kloroform karışımı kullanılır. Homejenizasyon sırasında hücrelerin

parçalanması için eklenen her 1 ml RiboEx Total RNA İzolasyon Solusyonu için, santrifügasyon işlemi sonrasında 0.2 ml fenol-kloroform izoamil alkol karışımı (25:24:1 v/v, Sigma cat. no:P-2069) eklenmiştir. Fenol-kloroform karışımının mümkün oldukça daha fazla biyomolekül ile temas etmesi ve hücrel proteinleri etkili bir şekilde denatüre etmesi için karışım 15 sn hızla çalkalanmış ve daha sonra 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda karışım 4 °C’de 12 000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan üst faz temiz bir tüpe alınmıştır.

Total RNA izolasyonunda ikinci basamak, RNA'nın kolona bağlanması ve bu yolla atıkların uzaklaştırılmasıdır. Yeni bir tüpe aktarılan nükleik asitlerin bulunduğu bu faza bir hacim RB1 solusyonu eklenerek tüp yavaşça ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım RNA bağlama kolonuna 700 µl'yi geçmeyecek şekilde eklenmiş ve oda sıcaklığında 12.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Eğer karışımın başlangıç hacmi 700 µl’den fazla ise, aynı basamak tekrarlanmıştır.

Toplam RNA'nın kolona bağlanması sonrası, RNA bağlama kolonuna 500 µl SW1 yıkama solusyonu eklenip, kolon oda sıcaklığında 12 000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Aynı kolona 500 µl ikinci bir yıkama solusyonu (RNW) eklenmiş ve yine oda sıcaklığında 12 000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Tampon kalıntılarını uzaklaştırmak için kolon, oda sıcaklığında 12 000 rpm’de 1 dk daha santrifüj edilmiştir.

Kolondan RNA'nın geri kazanılması santrifügasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için 75-100 µl RNaz içermeyen su kolona eklenmiş, oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiş ve sonrasında kolon RNaz içermeyen 2 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpü ile birleştirilerek oda sıcaklığında 12 000 rpm’de 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası, RNA'ların kolondan ayrılarak mikrosantrifüj tüpüne toplanması sağlanmıştır. Elde edilen total RNA’lar hemen kullanılacaksa 4 °C buz içerisinde, hemen kullanılmayacaklar ise -40 °C’ de muhafaza edilmişlerdir.

3.4. Elde Edilen Total RNA Miktarının Ölçülmesi ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

Elde edilen total RNA’nın miktarı nanodrop spektrofotometre ile (Thermo NanoDrop 1000) RNA-40 modunda ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen RNA'nın saflık durumu A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları ölçülerek belirlenmiştir. Bölüm 2.6.2’de Çizelge 2.1’de RNA saflığının tayininde kullanılan belirleyici özellikler verilmiş olup, bu bilgiler dahilinde A_{260}/A_{280} oranı 2.0’nin altında olan ve A_{260}/A_{230} oranı 2.0-2.4 aralığının dışında kalan RNA izolatları kullanılmamış ya da saflığının iyileştirilmesi için bunlar tekrar RNA izolasyonuna tabi tutulmuştur.

3.5. Total RNA’dan mRNA izolasyonu

Bu çalışma, sıçan prolaktin reseptörü mRNA'larının amplifikasyonu ve bunların karakterizasyonuna yönelik olup, ortamda mRNA dışında diğer RNA'ların bulunması

(total RNA'nın yalnızca %1-5 mRNA'ya karşılık gelmektedir), PCR reaksiyonlarında problem yaratabildiği gibi, amplifiye edilmek istenen RNA'nın da yetersiz kalmasına neden olabilmektedir. Hedef RNA (mRNA) miktarını ve buna bağlı olarak istenen PCR ürününün kalitesini artırmanın bir yolu da, total RNA'dan mRNA'ların izole edilerek, amplifikasyon için doğrudan mRNA'ların kullanılmasıdır.

Total RNA'dan mRNA izolasyonu için Thermo Scientific MagJET mRNA Enrichment Kit (#K2811) kullanılmıştır. Bu kitin içeriği ve kullanım amacı Çizelge 3.3'de sunulmuştur. Kit içeriğine ek olarak, su banyosu, vorteks, buz ve tarafımızca hazırlanan Manyetik Partikül Toplama Tüplüğü (Bkz. Ek 5) kullanılmıştır.

Tarafımızca tasarlanmış olan “manyetik partikül toplama tüplüğü”, manyetik partiküller ile sıvı kısmını birbirinden ayırmak için kullanılmıştır. Manyetik partikül toplama tüplüğü strafor kullanılarak yapılmıştır; strafora 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün oturması için bir yuva ve o yuvanın dip kısmına mıknatıs eklenmiştir. Böylece manyetik partiküller tüpün iç yüzeyinde bir noktada toplanarak sıvı kısımdan ayrılmış ve sıvı faz pipet yardımı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3.3. Total RNA'dan mRNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve gereçler.

Kimyasallar ve gereçler	Kullanım amacı	Tanım
Manyetik partikül toplama tüplüğü	Magjet oligo (dT) boncuklarını sıvı fazdan ayırarak mRNA'ların toplanması.	Alt kısmında bir mıknatıs içeren, 2 ml'lik santrifüj tüpleri için tasarlanmış bir tüplük.
Magjet oligo (dT) partikülleri	Poli (A) kuyruğu taşıyan mRNA'ların yakalanması (partikülün poli (dT) kısmına bağlanması).	Yüzeyine poli (dT) ₂₅ nükleotit dizisi bağlanmış olan manyetik boncuklardır.
Hibridizasyon tamponu	mRNA poli (A) ile Magjet boncuklarındaki oligo (dT) kısımları arasında hibridizasyonun gerçekleşmesini kolaylaştıran tampon.	Ortama total RNA eklenmeden önce, Magjet nanopartikülleri hibridizasyon tamponu ile yıkanarak, hibridizasyon için hazır hale getirilir.
Yıkama tamponu	Ortamda bulunan RNA'ların (poli (A) kuyruğu taşımayan) uzaklaştırılması.	-

RNA çalışmalarında RNA'nın parçalanması istenmeyen bir durum olup, RNaz kontaminasyonuna bağlı RNA'nın zarar görmesini engellemeye yönelik temel tedbirler alınıp bunlara özen gösterilmiştir (Bkz. Bölüm 2.6.1).

Total RNA'nın ve manyetik partiküllerin izolasyona hazırlanması: Manyetik partiküller ile total RNA birleştirmeden önce mRNA'lar ve manyetik partiküller hibridizasyon için ayrı ayrı hazırlanmışlardır.

RNA'da bulunan sekonder yapıların açılması için total RNA örneğinden 100 µl alınarak, 2 ml'lik kapaklı mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş ve su banyosunda 65 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir.

Manyetik partiküllerin mRNA eldesi için hazır hale getirilmesi stoktan alınan manyetik partiküllerin hibridizasyon tamponu ile yıkanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak, manyetik partikül stoğu kullanılmadan önce vorteks yardımı ile iyice homojen hale getirilmiş ve yeni bir tüpe alınan manyetik partiküllerin (50 µl) üzerine iki defa 100 µl hibridizasyon tamponu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama ve hibridizasyona hazır hale getirme işlemi, manyetik partiküllerin, manyetik partikül toplama tüplüğünde bulunan mıknatıs yardımı ile toplanması ve geriye kalan sıvının uzaklaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Mıknatıs yardımı ile manyetik partiküllerin toplanması temel bir basamak olup, aşağıda anlatılan kısımlarda tekrarlanmıştır.

mRNA'nın manyetik partiküllerin üzerindeki poli (T) dizilerine bağlanması: Total RNA içerisindeki mRNA'ları manyetik partiküllere bağlamak için; manyetik partikülleri içeren tüpe 100 µl hibridizasyon tamponu eklenerek ve tekrarlı pipetasyon yapılarak manyetik partiküllerin hibridizasyon tamponu ile aktive olması sağlanmış ve sonra da üzerine total RNA (100 µl) eklenmiştir. Manyetik partiküllerin hibridizasyon tamponunda homojen olarak dağılması ve ortamda bulunan mRNA'ların poli (A) kısımlarının manyetik partiküllerdeki poli (T) kısımları ile buluşma olasılığını artırmak için, tüp içinde bulunan karışım manyetik alanın bulunmadığı (yani mıknatısın olmadığı) ortamda tekrarlı pipetasyona tabi tutulmuştur. Bunu takiben, mRNA'ların manyetik partiküllere bağlı poli (T) dizileri ile hibridize olabilmesi için tüp yavaşça ters-düz edilerek oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. Manyetik tüplük (mıknatıs içeren) kullanılarak, manyetik partiküllerin tüpün bir kısmında toplanması sağlanmış ve sıvı kısım manyetik partiküllerden uzaklaştırılmıştır.

mRNA olmayan RNA'ların uzaklaştırılması: mRNA'lar manyetik partiküllere bağlandıktan sonra mRNA olmayan RNA'ların ortamdaki uzaklaştırılması yıkama işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için ortama 100 µL yıkama tamponu eklenmiş ve karışım manyetik alanın olmadığı bir yerde pipetlenerek homojen hale getirilmiş ve devamında da tüp manyetik tüplüğe yerleştirilerek, manyetik partiküllerin tüpün bir köşesinde toplanması sağlanmıştır. Yıkama işlemi 3 defa gerçekleştirilmiş ve işlemin sonunda tüpün içinde yıkama tamponu kalıntısının kalmamasına özen gösterilmiştir.

mRNA'nın manyetik partiküllerden ayrılması ve toplanması: mRNA'ların manyetik partiküllerden ayrılması ve geri kazanılması için mikrosantrifüj tüpüne 50 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve örnek 2 dk 60 °C su banyosunda tutulmuştur. Bu

inkübasyon süresinin sonunda, tüp hızlıca manyetik partikül toplama standına konarak ayrılan mRNA'ların tekrar partiküllere bağlanmasını önlemek için sıvı kısım hızla yeni bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen mRNA'ların miktarı spektrofotometrik olarak (Nanodrop ile) belirlenmiş ve örnekler hemen kullanılacaksa buz içerisinde, daha sonra kullanılacaksa -40 °C'de saklanmıştır.

3.6. Rivörz Transkriptaz (RT) Reaksiyonu ve İlk İplik cDNA Sentezi

Sıçan organ (böbrek, karaciğer ve testis) homojenatlarından elde edilen total RNA ve mRNA'lardan ilk iplik cDNA sentezi rivörz transkriptaz (RT) reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik kullanılan kitin özellikleri (3.6.1), reaksiyon koşulları (3.6.2) ve kullanılan primeler (3.6.3) ilgili bölümlerde ayrıntısı ile sunulmuştur.

3.6.1. Rivörz transkriptaz kiti ve enzimin özelliği

Rivörz transkriptaz (RT-PCR için) reaksiyonu için GeneAll HyperScript™ first strand sythesis kiti (Cat. No: 601-005) kullanılmıştır. Saflaştırılmış mRNA ya da total RNA'dan ilk zincir cDNA sentezi yapabilen bu kit; su (RNaz içermeyen), dNTP, Oligo dT₂₂ primeri, RNaz inhibitörü, RT tamponu, DTT ve RT Polimeraz içermekte olup, kit içeriğinin ayrıntısı Çizelge 3.4'de verilmiştir. HyperScript™ rivörz polimeraz, sıcaklık kararlılığı arttırılmış (65 °C'ye kadar ilk zincir cDNA sentezi yapabilmektedir) ve RNAaz H aktivitesi azaltılmış bir M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) rivörz transkriptazdır. Bu enzim, 1 pg'den 2 µg'a kadar başlangıç RNA'sını kalıp olarak kullanılabilmekte ve 13 kb uzunluğuna kadar ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirebilmektedir. Reaksiyon üretici firmanın sağladığı ve 3.6.2'de sunulan protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. GeneAll HyperScript™ first strand sythesis kit içeriği.

Kit içeriği*	Hacim	Miktar
Primer (oligo (dT) ₂₂)	50 µl	50 µM
dNTP karışımı	250 µl	10 mM
DTT	250 µl	0.1 M
RT polimeraz enzimi	50 µl	200 U/µl
RNaz inhibitörü	100 µl	40 U/µl
RNaz içermeyen su	1000 µl	-
10X RTaz Tamponu	500 µl	-

*Kit içeriğinde "Random hekzamer" adı verilen bir primer çeşidi de bulunmakla birlikte, bu projede kullanılmadığı için bu çizelgede sunulmamıştır.

3.6.2. RT-PCR (Rivörz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve ilk iplik cDNA eldesi

Organlardan elde edilen mRNA'lar (total RNA veya mRNA olarak), rivörz transkripsiyon reaksiyonu ile tek zincir cDNA'ya dönüştürülmüştür. İlk iplik cDNA sentezi için iki reaksiyon karışımı hazırlanmış (Reaksiyon Karışım I ve II, Çizelge 3.5) ve RT-PCR iki basamakta gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.6). Reaksiyon Karışımı I, 65 °C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 1 dk buz içerisinde bekletilmiş ve reaksiyon karışımı II ile birleştirilip Çizelge 3.6'da verilen II. basamak uygulanmıştır.

Çizelge 3.5. RT-PCR'da kullanılan Reaksiyon Karışımı I ve II'in içeriği ve miktarları.

Reaksiyon Karışımı I	Miktar (µl)
Total RNA (veya mRNA)	2-6*
Primer (Poli (A) bölgesine özgü)	1
dNTP	1
Su (RNaz içermeyen)	12-6**
Toplam	14

Reaksiyon Karışımı II	Miktar (µl)
RT tamponu	2
DTT	2
RT polimeraz enzimi	1
RNaz inhibitörü	1
Toplam	6

Toplam reaksiyon hacmi: 20 µl

* Eklenen RNA hacmi, eklenmek istenen RNA miktarına göre ayarlanmıştır. Her bir reaksiyon için 2 ile 4 µg arasında total RNA veya 20 ng ile 50 ng µg arasında mRNA kullanılmıştır.

** Eklenen su miktarı, reaksiyon hacmi toplamda 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.6. RT-PCR basamakları ve süreleri.

İlk İplik cDNA sentezi (RT-PCR)	Sıcaklık	Süre
Basamak I*		
Sekonder yapı denatürasyonu	65 °C	5dk
Buz muamelesi (1 dk)		
Basamak II		
Tek iplik DNA sentezi**	45 °C***	1 sa
Rivörz transkriptaz denatürasyonu	85 °C	5 dk

*Bu basamakta sadece reaksiyon karışımı I kullanılmıştır. Basamağın sonunda reaksiyon karışımı I ve II birleştirilmiş ve II. basamaktaki reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

** Rivörz transkriptaz ile ilk iplik sentezi, üretici firmanın da önerdiği gibi, çoğunlukla 45 °C'de gerçekleştirilmiş ancak ihtiyaca göre bu 40-55 °C arasında değiştirilmiştir.

*** Oligo (dT)₂₂ primeri için kullanılan sıklıkla kullanılan sıcaklık değeri.

3.6.3. İlk iplik cDNA eldesi için kullanılan primerler

mRNA'lerden ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirmek için kit ile birlikte satın alınan primere ek olarak poli (A) kuyruğunu hedef alan üç primer daha (Çizelge 3.7) bu tez projesinde kullanılmıştır. Bu üç primerden biri RpT primeri (25 timin, poli (dT)₂₅) olup, rivörz transkriptaz kiti ile satın alınan oligo (dT)₂₅ primeri ile benzerdir. Diğer iki primer ise Poly-dT-Adaptor 1 ve 2 (Integrated DNA Technologies firması tarafından sunulmuştur) olup, 3' RACE PCR'da ilk iplik cDNA sentezi için kullanılmaktadır. Kullanılan primerlerin mRNA üzerine bağlandığı bölgeler ve ilk iplik cDNA sentezindeki rolleri Ek 6 ve 7'de özetlenmiştir.

RACE PCR bilinmeyen dizileri amplifiye etmek için uygulanan bir yöntemdir. 3' RACE için ön koşul cDNA'nın poli (T) kuyruğuna bir adaptör dizi eklenmesidir. Bu işlem RT basamağında adaptör bir dizi taşıyan poli (T) primeri kullanılarak kolayca gerçekleştirilir. RT sonrasında adaptör dizi taşıyan cDNA'lar gene özgü primer ve adaptöre bağlanacak bir primer ile PCR'a tabi tutulur.

Çizelge 3.7. RT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere mRNA'ların poli (A) kuyruklarını hedef alan primerler.

Ad		R Primerler Dizisi	Tm °C	Nükleotit
1 RpT (Poli (dT) ₂₅)	5'-	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-3'	43
2 Poly_dT_Adaptor-1	5'-	<u>GCGCACGCGTCGACTAGTACT</u> TTTTTTTTT TTTTTTTTTV	-3'	40*
3 Poly_dT_Adaptor-2	5'-	<u>GCGCACGCGTCGACTAGTACT</u> TTTTTTTTT TTTTTTTTTVN	-3'	42*

V: A, G ya da C nükleotiti

N: A, T, C ya da G nükleotiti

GCGCACGCGTCGACTAGTAC: Adaptör dizidir (Bkz. 3' RACE PCR)

*Adaptör dizi ilk iplik cDNA sentezine katılmadığı için, T_m hesaplanırken dikkate alınmamış olup verilen değerler poli (T) kısmına aittir.

**Yine aynı şekilde, parantez içinde verilen nükleotit sayıları da poli (T) kısmına karşılık gelmektedir.

3.7. Sıçan Prolaktin Reseptör Geni (*prlr*) cDNA'larının Eldesi ve Çoğaltılması

Total RNA'nın içinde bulunan mRNA'lar veya saf olarak elde edilmiş mRNA'lar, rivörz transkriptaz enzimi ve bu mRNA'ların poli (A) kuyruğunu hedef alan primerler (Bkz. Çizelge 7) kullanılarak tek iplik cDNA'ya dönüştürülmüş ve sonrasında sıçan *prlr* genine özgü primerler (Bkz. Bölüm 3.7.1, Çizelge 3.8) kullanılarak bu tek iplikli cDNA'lardan çift iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk iplik *prlr* cDNA'larının çift iplik cDNA'ya dönüştürülmesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları, Thermo Px2 Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması, PRLR geninin mRNA varyantlarını ve bu varyantların 3' UTR bölgelerinin tanımlanmasına yönelik olduğundan, bu amaca yönelik olarak PCR primerleri tasarlanmış ve kullanılmıştır.

3.7.1. Prolaktin reseptör geni (*prlr*) cDNA amplifikasyonu için kullanılan primerler

Primerlerin tasarımı, esasen bilinen genel kuralların tarafımızca uygulanması ile birlikte, CLC Genomics Workbench (Versiyon 3.6.5) programından da destek alınması

ile gerçekleştirilmiştir. Primer tasarlarırken dikkat edilen parametreler Bölüm 2.6.4’de verilmiştir.

Sıçan *prlr* geni mRNA ve ekzon varyantlarının cDNA'larının eldesi için kullanılan primerlerin tasarlanmasında, sıçan *prlr* geni (NC_005101.4, Sıçan Genomu versiyon 6; Rno_6) ve bu genin ürünü olan mRNA varyantlarının (NM_001034111.1 ve NM_012630.2) dizileri kullanılmıştır. Bu mRNA'ların 3' UTR bölgelerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin tasarlanmasında da, ya hali hazırda bilinen sıçan mRNA 3' UTR bölgeleri ya da fare *prlr* geni tarafından kodlanan mRNA ekzon varyantlarının 3' UTR bölgeleri kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda tasarlanan, F (Forward) ve R (Reverse) primer setleri ve özellikleri Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Hedeflenen cDNA bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin nükleotit dizileri.

	F (Forward)*	Primerlerin nükleotit dizileri		T_m °C	%GC	Nükleotit
1	F3.1	5'- ATGCCATCTGCACTTGCTTTTCG	-3'	63	50	22
2	F3.2	5' CCTACTTGTCTCAACATCAGCC	-3'	63	48	23
3	F9	5'- CATGATGACCTGCATCTTTCCACC	-3'	63	50	24
4	F10	5'- CAACCTCAAGCAACCGCAGACTCC	-3'	69	58	24
5	FUTR1.1	5'- CACTCCTTTCAGTATAGCTAGAC	-3'	64	46	24
6	FUTR1.2	5'- ATGAAGTAATGTGGTCTGCTAG	-3'	58	41	22
7	FUTR2	5'- CCAGTATTGCTGTTTACGTATTTCG	-3'	62	42	24
8	FUTR3	5'- TTGGAAATTGTGTTTGCAGC	-3'	54	40	20
9	F11UTR2	5'- AAGACATACCAGAGCCAATGCC	-3'	62	50	22
10	F11UTR3	5'- ATATCTTTTGTCTAGGCTGCTCC	-3'	61	43	23

	R (Reverse)*	R primer dizileri		T_m °C	%GC	Nükleotit
1	R9	5'- CCAGCAGATGGGTATCAAATCC	-3'	60	50	22
2	R10.1	5'- TCAGTGAAAGGAGTGCATGAAGC	-3'	62	48	23
3	R10.2	5' GGCACCTCAGCAGCTCTTCAGAC	-3'	66	59	22
4	R11	5'- GTCAAGTTCCCTGCATTGTCC	-3'	63	55	22
5	Rm11.1	5'- CAGGGAACCTTCTGAGGATTGG	-3'	60	50	22
6	Rm11.2	5'- AGAGGTGGGTGTGGTAGAATG	-3'	61	52	21
7	Rm11-3	5'- TTTCTGAGGATTGGCCTTT	-3'	53	42	19
8	Rm12.1	5'- CGAGGAGCTAAAAAGTAGGAAGG	-3'	60	48	23
9	Rm12.2	5'- GTCAACTGGAGAATAGAATACCAG	-3'	61	42	24
10	Rm12.3	5'- CACAAACCACACCCAGATCTACA	-3'	63	48	23
11	RUTR1	5'- TGTTTTTCATCCACTTTGCATTCC	-3'	59	39	23
12	RUTR1.2	5'- TTGGCTGGTGTCTTGGGAATG	-3'	61	55	20
13	RUTR1.3	5'- TTGCTGTTTGAAGTATCCTGGG	-3'	60	46	22
14	RUTR2	5'- AAAATGCTTCTCCAGCTCGATC	-3'	60	45	22
15	RUTR3	5'- ATACGAGAACAGAGCTTTGAGG	-3'	60	45	22
16	R11UTR1	5'- CCTATCCTCTCCCATCTGCCTCC	-3'	68	61	23
17	R11UTR1.b	5'- TTAAGCACACTCAAGCCCAGA	-3'	59	48	21
18	R11UTR2	5'- AGTCCCATCACTAAAGTCTACAG	-3'	61	43	23
19	R11UTR3	5'- GGCAGTGTGTTGGGAGATTATGG	-3'	63	48	23
20	Adaptör	5'- GCGCACGCGTCGACTAGTAC	-3'	65	65	20

*F (Forward) primerler sıçan *prlr* geninin mRNA dizisi ile R (Reverse) primerler ise mRNA dizisinin rivörz komplementeri ile aynı diziye sahiptir.

Primer sentezi, stok ve kullanım solusyonları: Tarafımızca tasarlanan primerlerin sentezi hizmet alımı ile Macrogen tarafından gerçekleştirilmiştir (Primerler, üretim sonrası HPLC gibi özel bir saflaştırmaya tabi tutulmamıştır). Primer ana stokları

100 pmol/μl primer olacak şekilde, kullanım stokları ise 10 pmol/μl primer olacak şekilde hazırlanmış ve kullanıncaya kadar -40 °C’de saklanmışlardır.

3.7.2. mRNA'ların çoğaltılmasına yönelik PCR reaksiyonları

Sıçan *prlr* geni mRNA varyantlarının tanımlanmasına yönelik birçok farklı PCR yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşımların temel çıkış noktası elde edilmek istenen hedefe yönelik olup, bu hedefler 4 grup altında toplanabilir:

- 1- Ekzon 3 ile Ekzon 9 arası varyantların tanımlanması,
- 2- Ekzon 10 ve 11 formlarının organlardaki varlığının gösterilmesi,
- 3- Farede ifade edilen Ekzon 11 ve 12 varyantların sıçanda aranması ve
- 4- Sıçan PRLR uzun ve kısa formlarının 3' UTR bölgelerinin dizilerinin aydınlatılması.

PCR strateji seçiminde belirleyici nokta; çoğaltılmak istenen bölgenin baz uzunluğu, verimi ve yine bunlarla ilişkili olarak elde edilen ürünün doğrudan dizileme için kullanılıp kullanılamayacağı olmuştur. Bu projede gerçekleştirilen PCR reaksiyonları ve gerçekleştirme şartları Bölüm 3.7.2.1-4 arasında sunulmuştur.

3.7.2.1. Sıçan *prlr* (s-*prlr*) geni cDNA'larını amplifiye etmek için kullanılan Standart PCR prosedürü

S-prlr geni cDNA'ları kullanım amacı fark etmeksizin ilk olarak, “Standart PCR” olarak isimlendirdiğimiz koşullarda çoğaltılıp incelenmiştir. Standart PCR sonucu elde edilen ürünlerin miktarı ve özgüllüğü yeterli görülmediğinde; ya yeniden ilk iplik cDNA’dan istenen bölgenin amplifikasyonu Stepdown PCR (Bkz. 3.7.2.3) ile gerçekleştirilmiş ya da standart PCR’den elde edilen ürünler Nested PCR (Bkz. 3.7.2.3) için kullanılmıştır.

Standart PCR için GeneAll AmpMaster™ *Taq* (Cat. No: 541-050) kullanılmıştır. Standart PCR reaksiyonu toplam 30 μl’de gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışımı Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. *S-prlr* genine özgü cDNA'ların çoğaltılması için kullanılan 30 µl hacimlik reaksiyon karışımı.

Kimyasallar	Miktar
AmpMaster™ Taq *	15 µl
Primer F (10 pmol/µl)	1 µl
Primer R (10 pmol/µl)	1 µl
Kalıp DNA (İlk iplik cDNA)**	2 µl
Su	11 µl
Toplam hacim	30 µl

* 15 µl AmpMaster™ Taq kullanılarak hazırlanan 30 µl'lik Standart PCR reaksiyon karışımı; 2.5 U Taq DNA polimeraz, 800 µM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, yükleme boyası ve stabilizör içermektedir.

** Hazırlanmış olan cDNA, 800 ng total RNA'ya karşılık gelecek miktarda eklenmiştir.

Amplifiye etmek istenen bölgelerin uzunluğuna bağlı olarak *prlr* cDNA'ları farklı denatürasyon, bağlanma ve uzama koşulları kullanılarak PCR'a tabi tutulmuş ve daha yüksek verimde ürün elde edebilmek için reaksiyon basamaklarının süreleri ve sıcaklıkları değiştirilmiştir. Temelde kullanılan üç farklı reaksiyon şartının sıcaklık ve süreleri Çizelge 3.10'da verilmiştir. PCR reaksiyonları 30-35 döngü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.10. Standart PCR reaksiyonunun sıcaklık ve süreleri.

Döngü	Basamak	I*		II**		III***	
		Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
	İlk denatürasyon	95 °C	5 dk	95 °C	5 dk	95 °C	5 dk
	Denatürasyon	95 °C	40 sn	95 °C	40 sn	95 °C	40 sn
30-35x	Bağlanma	57 °C	25 sn	60 °C	25 sn	60 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	1,5 dk	72 °C	1,5 dk	72 °C	2,5 dk
	Son uzama	72 °C	5 dk	72 °C	5 dk	72 °C	5 dk

* Kısa amplifikasyon bölgelerini (<1000 bp) amplifiye etmek için kullanılmıştır.

** 3'-UTR bölgelerini kapsayan 1000 bp'den kısa bölgeleri çoğaltmak için kullanılmıştır.

*** Uzun amplifikasyon bölgelerini (>1500 bp) amplifiye etmek için kullanılmıştır.

3.7.2.2. 3' RACE-PCR (Rapid Amplification Of cDNA Ends) ve sıçan *prlr* geni mRNA'larının 3' UTR bölgelerinin amplifikasyonu

3' RACE PCR, bir mRNA dizisinin 3' ucu bölgesinin amplifikasyonuna yönelik bir strateji olup, bu projede sıçan *prlr* geninin bilinen iki farklı mRNA varyantının (sPRLR uzun ve kısa form) ve olası yeni 3' ekzon varyantlarının 3'-UTR bölgelerinin nükleotid dizilerinin ortaya konabilmesi için kullanılmıştır.

3' RACE PCR'ın rivörz transkriptaz basamağında (RT-PCR), yalnızca poli (T)'den oluşan bir primer kullanılabildiği gibi, poli (T) ve adaptör diziden oluşan primerler de kullanılabilmektedir. İlk iplik cDNA sentezi sonrasında bu primerlerin yapısında yer alan bir diziye karşılık gelen Adaptör primer kullanımı, PCR reaksiyonun özgüllüğünü artırabilmekte ve buna bağlı olarak ta mRNA'ların 3' UTR bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. 3' RACE PCR'ın ilk iplik cDNA sentezinde Poly_dT_Adaptör 1 veya 2 primerleri (Çizelge 3.7) kullanılmış ve bir sonraki PCR basamağında ise bir F primeri olarak (F3 veya F9) ve R primeri olarak da bir Adaptör primer (Çizelge 3.8) kullanılmıştır (Primerlerin çalışma prensibi ve 3' RACE PCR'ın şematize özeti Ek 7'de sunulmuştur).

3' RACE PCR için kullanılan rivörz transkriptaz ve DNA polimeraz enzim ve karışımları, RT-PCR ve Standart PCR için kullanılan enzimler ile aynı olup (Bölüm 3.7.2), Standart PCR reaksiyon koşullarından farklı olarak, ilk iplik cDNA'ların 3' UTR'lerindeki sekonder yapıları açmak için, 97 °C'de 1,5 dk'lık ek bir denatürasyon (Başlangıç Denatürasyon Basamağı 2) gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. S-*prlr* geni mRNA'larının 3' UTR bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan 3' RACE PCR koşulları

Döngü	Basamak	Sıcaklık	Süre
-	Başlangıç Denatürasyonu 1	95 °C	4.5 dk
-	Başlangıç Denatürasyonu 2	97 °C	1.5 dk
30x	Denatürasyon	95 °C	40 sn
	Bağlanma	60 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	2.5 dk
-	Son uzama	72 °C	5 dk

3.7.2.3. Stepdown PCR yöntemi ile özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin azaltılması

Stepdown (SD) PCR'ın temeli, primer bağlanma sıcaklığını primerin olası bağlanma sıcaklığının en yüksek değerlerinden başlanıp (örneğin 70 °C gibi), bağlanma sıcaklığının kademeli olarak düşürülmesi ve bu yol ile istenen gen bölgelerinin amplifikasyon özgülüğünün ve veriminin artırılmasına dayanmaktadır.

Bu yöntemin bu çalışmada kullanılmasının nedeni, Standart PCR şartlarında, gene özgü primerlerin hedef bölge dışında farklı yerleri de amplifiye ederek istenmeyen birçok amplifikasyon ürünü vermesi ve buna bağlı olarak *prlr* mRNA varyantlarının tanımlanma ve dizilenmesinde problem yaratmasıdır. Özgül olmayan amplifikasyon ürünlerini azaltmaya yönelik Stepdown PCR yöntemi tercih edilmiş ve koşulları Çizelge 3.12'de sunulmuştur. Kullanılan enzim, reaksiyon hacmi ve karışımın içeriği Standart PCR ile aynıdır (Bölüm 7.2).

Çizelge 3.12. Stepdown PCR reaksiyon koşulları.

Döngü	Basamak	Sıcaklık	Süre
	Başlangıç Denatürasyonu*	97 °C	5 dk
6X	Denatürasyon	95 °C	50 sn
	Bağlanma	70 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	2,5 dk
6X	Denatürasyon	95 °C	50 sn
	Bağlanma	67 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	2,5 dk
6X	Denatürasyon	95 °C	50 sn
	Bağlanma	64 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	2,5 dk
25X	Denatürasyon	95 °C	50 sn
	Bağlanma	61 °C	25 sn
	Uzama	72 °C	2,5 dk
	Son Uzama	72 °C	5 dk

**Taq* DNA polimeraz bu basamaktan sonra eklenmiştir.

3.7.2.4. Nested PCR ile amplifikasyon miktar ve özgüllüğünün artırılması

Bu projede gerçekleştirilen Nested PCR koşulları ve reaksiyon karışımları, Standart PCR reaksiyonundaki gibidir (Bölüm 3.7.2). Standart PCR sonrasında agaroz jelde bariz bir bant vermeyen veya düşük amplifikasyon ürünü veren sıçan *prlr* cDNA'ları, ikinci bir primer seti ile Nested PCR'a tabi tutulmuştur. Bu amaca yönelik, ilk PCR reaksiyonundan 1 µl ürün alınarak ikinci PCR reaksiyonu kurulmuştur. İkinci PCR; birinci PCR'da amplifiye edilmek istenen bölgenin içerisindeki daha küçük bir bölgeyi amplifiye edecek primer çifti kullanılarak reaksiyonu ürünlerinin özgüllüğü ve ürün miktarı arttırılmıştır (Nested PCR'ın temel prensibi ve bu projede nasıl kullanıldığı Bölüm 2.6.6'da anlatılmıştır).

3.8. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve İncelenmesi

PCR reaksiyonu sonucu DNA amplifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek ve PCR ürünlerinin uzunluklarının tanımlanması için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jelin hazırlamasında ve yürütülmesinde TAE tamponu kullanılmıştır. TAE tamponu 5X olarak hazırlanmış (içeriği Çizelge 3.13'de verilmiştir) ve distile su ile seyreltilerek 1X'e dönüştürülerek kullanılmıştır. Agaroz jel örnek yükleme tamponu 6X olarak hazırlanmış olup içeriği Çizelge 3.14'de verilmiştir.

Çizelge 3.13. Agaroz jel yürütme tamponu içeriği (5x stok)

Kimyasal	Miktar
Tris	24,2 g
Asetikasit	5,71 ml
EDTA (500mM EDTA, pH 8,0)	10 ml
dH ₂ O	1 L' ye tamamlanır

Çizelge 3.14. Agaroz jelle örnek yükleme tamponu içeriği (6x stok)

Kimyasal	Miktar
Gliserol	3 ml
Bromfenol mavisi	25 mg
dH ₂ O	7 ml

Agaroz jeller, 1X TAE tamponu kullanılarak %0.8-1.5 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Örnekler ve bir DNA büyüklük belirteci (100-2.000 veya 1.000- 10.000 bp uzunluklarında) 3X agaroz jel yükleme tamponu ile jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Kullanılan bu DNA büyüklük belirteçlerinin boyutları ve jel görüntüleri Ek 8’de verilmiştir. Örnek yüklenen jeller 110 volta (14 V/cm) 40-45 dk yürütülmüştür.

Yürütme işlemi sonunda jeller etidyum bromür çözeltisi (10 µg/ml) içerisinde yaklaşık 15 dk karanlıkta bekletilerek boyanmıştır. Etidyum bromür ile boyanan jellerin fotoğrafları jel görüntüleyicisi ile (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) çekildikten sonra yorumlaması yapılmıştır.

3.9. Agaroz Jelden DNA Fragmentlerinin İzolasyonu

Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesinin ardından, dizileme kalitesini olumsuz yönde etki edebilecek bantların görülmesi durumunda, istenen DNA bandı agaroz jelden kesilerek, izolasyonu yapılmıştır.

Amplifikasyon ürününün yürütüldüğü agaroz jel boyama sonrası jel görüntüleme sistemi üzerine yerleştirilmiş ve hızlı bir görüntüleme ile kesilmek istenen DNA bandının yeri belirlenmiştir. UV ışığı DNA’da hasarlara neden olabildiğinden, örneğin timin dimerleri gibi, kesme işlemi minimum UV ışığına maruz bırakılacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu amaca yönelik olarak, kesilmek istenen DNA bandı UV ışığında görünür hale getirilmiş ve temiz bir bistürü ucu ile istenen bant bölgesi hızla kesilerek temiz plastik bir tüpe alınmıştır. Alınan örnekten DNA fragmentinin izolasyonu NanoHelix Gel Extraction Kit (GE50) kullanılarak Çizelge 3.15’ de verilen protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Kit ile birlikte sağlanmayan ancak izolasyon için gerekli olan izopropanol alkol (IPA %99) ve %80’lik etanolde (moleküler kalitede) hazırlanmıştır. Saflaştırma ile agaroz, etidyum bromür, yükleme ve yürütme tampon içerikleri uzaklaştırılmış ve izole edilen DNA fragmentleri Standart ya da Nested PCR için kullanılmıştır.

Çizelge 3.15. Agaroz jelden DNA izolasyon protokolü

- 1- Jelden istenilen boyuttaki DNA fragmenti jel ile birlikte kesilmiş ve ağırlığı ölçülmüştür. Ölçülen ağırlığın üç katı hacminde GEB tamponu (örnek; 100 mg jel için 300 µl GEB) örneğe eklenmiş ve agarozun eriyip çözünür hale gelmesi için 60 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
- 2- Çözülmüş jel karışımına bir hacim izopropanol eklendikten sonra, karışım DNA bağlama kolonuna (spin kolon) eklenmiş ve 12 000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- 3- Agaroz jel içeriğinin ve kalıntılarının uzaklaştırılması için 750 µl (%80'lik) DNA bağlama kolonuna etanol eklenmiş ve sonrasında 12 000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolon içindeki muhtemel etanol kalıntısının uzaklaştırılması için DNA bağlama kolonu 2 dk daha santrifüj edilmiştir.
- 4- Santrifügasyon sonrası DNA bağlama kolonuna 50 µl saf su eklenip oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Sonrasında spin kolona nükleaz içermeyen bir 2 ml hacimli minisantrifüj tüpü takılarak oda sıcaklığında 12 000 rpm'de santrifüj edilerek DNA toplanmıştır.

3.10. PCR Ürünlerinin Dizilenmesi

Amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünlerinin dizileme için uygun olup olmadığı, ürünlerin agaroz jelde yürütülmesi ile belirlenmiştir. Agaroz jel görüntülemesi sonrası yeterli ürün verdiği anlaşılan amplifikasyonlar, doğrudan dizilemeye gönderilirken, yeterli ürün vermeyen veya birden fazla bant veren ürünler de ise istenen bant agaroz jelden izole edilerek tekrar Standart PCR işlemine ya da elde edilen PCR ürünü Nested PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR ürünlerinin dizilemesi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon sonrası yeterli ürün verdiği anlaşılan PCR ürününden 20 µl'lik kısmı ve bununla birlikte 10 µl Forward (F) ve Rivörz (R) primerleri (10 pmol/µl), dizileme hizmeti sağlayan firmaya kargo ile gönderilmiştir.

PCR ürünlerinin, istenen DNA bölgesine özgü R ve F primerleri kullanılarak çift yönlü dizilemesi yapılmıştır. Dizileme işleminde; ABI 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Dizileme sonuçları “.ab1” uzantılı kromatogram dosyaları ile alınmıştır.

3.11. Ham DNA Dizilerinin Kalite Analizi

Hizmet sağlayıcı firmanın gönderdiği dizilerin kalitesi ve güvenilirliği dizileme sonuçlarının yer aldığı kromatogram dosyalarının Chromas (Versiyon 2.6.2) programı ile incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Arka plan kirlilikleri ve olası yanlış dizilemeler değerlendirilmiştir.

Dizilemenin ham kromatogram verileri, arka plan kirliliği ve bunların elde edilen DNA nükleotit dizisine olan etkisi bağlamında değerlendirilmiş, arka plan kirliliği yüksek olan dizilemeler ileri bir değerlendirmeye tabi tutulmamıştır. Arka plan kirliliği düşük olan dizilerin, DNA nükleotit dizisi ile kromatogram pikleri arasındaki uyum değerlendirilmiş ve gerekli görüldüğü yerde, piklerin gerçek konumuna karşılık gelen nükleotit ile değiştirilmiştir. Bu değerlendirmeden geçen DNA dizileri tez projesine dahil edilmiştir.

3.12. Çift Yönlü Dizileme Sonuçlarının Birbirleri İle Karşılaştırılması

Dizileme kalitesi kriterlerini geçen DNA dizileri ilk olarak F ve R okumaların görüntüleme yönü mRNA'daki ile aynı olacak hale getirilmiştir. F primerleri ile gerçekleştirilen dizileme sonuçlarının okunma yönü mRNA ile aynı olduğundan, sadece R primerleri kullanılarak yapılan dizileme sonuçlarının yönü revers komplementeri (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) alınarak mRNA dizisi ile aynı hale getirilmiştir. Bundan sonra, ileri ve tersten okuma nükleotit dizilerinin uyumu Clustal Omega programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yaklaşık 600 bp uzunluğunda olan fragmentlerin F ve R dizilemelerinin birbiri ile olan tutarlılığı incelenmiştir. Uzunluğu yaklaşık 1200 bp olan DNA fragmentlerinde ise F ve R dizilemelerin uzunluğu, bir uçtan diğer uca kadar okunmasını mümkün kılmadığından, üst üste çakışmayan bölgelerin tutarlılığı sadece referans dizi ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Çok daha uzun diziler de ise F ve R okumalarının karşılaştırılması LAST programı (<http://lastweb.cbrc.jp/>) kullanılarak referans diziye göre gerçekleştirilmiştir.

3.13. DNA Dizilerinin Veri Bankasından sorgulanması ve *prlr* mRNA Varyantlarının Belirlenmesi

Dizileme kalitesi ve ileri ve tersten okumanın komplementerlik uyumları kontrol edilen DNA dizilerin sıçan *prlr* geni ile olan ilişkisi ve gen üzerindeki yeri BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve LAST programları kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Böylece amplifikasyon ürünlerinin prolaktin reseptörü ile ilişkili olup olmadığı ve prolaktin reseptörüne ait ise hangi ekzonları taşıdığı incelenmiştir.

Bu programlar kullanılarak elde edilen dizilerin veri bankasındaki (BLAST ile yapılan analizde olduğu gibi) veya iki farklı genom veri bankasından indirilen ve tarafımızca tekrar düzenlenen sıçan *prlr* geni dizisinin LAST programında karşılaştırması ile % uyum değerleri ve hangi ekzonlara karşılık geldiği ve buna bağlı olarak ta sıçan PRLR geninin mRNA varyant çeşidinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

3.14. Prolaktin Reseptör Geninin Yapısal Özelliklerinin Araştırılması

Sıçan prolaktin reseptörünün mevcut gen dizisi (NC_005101.4, Rno_6) boşluklar içermekte olduğundan bu boşluklar; sıçan prolaktin reseptörü gen dizisinin diğer versiyonları (NC_005101.3 ve AC_000070.1) referans alınarak düzeltilmiştir. Sıçan prolaktin reseptörü uzun ve kısa form mRNA'ları ve makale referansları (Bakınız Çizelge ??, Ek?) kullanılarak sıçan *prlr* geni ekzon haritası yapılmıştır. Diğer organizmalara ait (özellikle fare) *prlr* geni ve mRNA'ları ile sıçan prolaktin reseptör geni ve mRNA'ları karşılaştırılmış olası yeni sıçan *prlr* geni ekzonları ve olası yeni ekzon varantları tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.14.1. Gen dizilerinin eldesi

İncelenecek prolaktin reseptörü genleri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) üzerinden elde edilmiştir. EK 10'da verilen kemirgenler ile domuz ve insan *prlr* gen dizileri FASTA formatında indirilmiştir. Sıçan için verilmiş olan dizilemelerde yüksek düzeyde boşluklar olduğundan üç farklı dizileme (NC_005101.3, NC_005101.4 ve AC_000070.1) indirilmiştir.

3.14.2. Sıçan prolaktin reseptör gen dizisi üzerindeki boşlukların azaltılması

Sıçan prolaktin reseptör geni üzerinde boşluklar ve tekrarlar bulunduğundan bu boşlukları en aza indirmek için üç dizi (NC_005101.3, NC_005101.4 ve AC_000070.1) LAST kullanılarak bu üç sıçan prolaktin reseptör geni ve fare prolaktin reseptör geni karşılaştırılmıştır. Boşlukların yerinde olması gereken diziler belirlenmiş ve bu boşluklar yerine dizilere sahip olan versiyonlardaki bölgeler eklenmiştir. Böylece boşlukları daha az olan bir sıçan prolaktin reseptör geni versiyonu elde edilmiş ve çalışmalar bunun üzerinden devam ettirilmiştir.

3.14.3. Prolaktin reseptör mRNA'larının eldesi

mRNA dizileri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>) üzerinden indirilmiştir. Aynı zamanda ENSEMBLE (<http://www.ensembl.org>) üzerinden de nükleotit dizileri incelenmiştir. ENSEMBLE üzerinde Genbank ID'si olan diziler kullanılmıştır.

3.14.4. mRNA'lar kullanılarak ekzonların gen üzerindeki yerlerinin belirlenmesi

İndirilen mRNA'lar ve sıçan prolaktin reseptör geninin LAST üzerinde karşılaştırılması yapılmıştır. LAST diğer alignement araçlarına göre ekzon belirleme gibi çalışmalar için daha kullanışlı olmasından dolayı seçilmiştir. LAST mRNA dizisini gen üzerinde dağıtarak ekzonların yerini göstermiştir. Bunun sonrasında LAST'ın gösterdiği ekzonlardaki intron başlangıç ve intron sonu bölgeleri incelenmiş ve mRNA'nın yanlış dağıtılma olasılığı değerlendirilerek ekzonların yerleri belirlenmiştir. Literatürde yayınlanmış (Hu vd 1996, Tanaka vd 2002, Tanaka vd 2005) olan promotor ve ekzon 1 dizileri doğrudan kullanılmıştır.

3.14.5. Sıçan prolaktin reseptör geninin diğer organizmalara ait prolaktin reseptörleri ile karşılaştırılması

Sıçan prolaktin reseptör geni Ensembl (<http://www.ensembl.org>) üzerinden diğer organizmalara ait prolaktin reseptör genleri ile karşılaştırılmış, benzerlikler ve farklılıklar değerlendirilmiştir. Dizi alignmentlerinde ENSEMBL ekzonların büyük çoğunluğunu doğru olarak gösterebilmektedir.

3.14.6. Sıçan prolaktin reseptör geni üzerinde olası yeni ekzonların belirlenmesi

Sıçanda karşılığı bulunmayan bir prolaktin reseptörü varyantına sahip olan canlıların özellikle rodentlerden farenin bu farklı varyantına ait mRNA'ları indirilmiştir. Farklılığı yaratan, post-transyonel bir modifikasyon değil de, bir ekzon farklılığı ise bu ekzonun o canlının prolaktin reseptörü geni üzerindeki ekzonu kapsayan bölge LAST kullanılarak sıçan prolaktin reseptör geni üzerinde aranmıştır. Korunmuşluğu olan bölgelere rastlandığında bu bölgenin diğer kemirgenlerdeki (Ek 10'da bu kemirgenlerin Türkçe ve Latince isimleri ile kullanılan gen dizilerinin Genbank ID'leri verilmiştir) korunmuşluğu incelenmiştir.

Ensembl üzerinden gerçekleştirilen yaklaşık 40 canlının prolaktin reseptör dizi karşılaştırmasında diğeri canlının ekzon bölgelerinin karşılıklarının sıçan prolaktin reseptöründe korunmuşluğeri incelenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Sıçan *prlr* Geninde Olası Yeni Ekzon Bölgelerinin Tespit Edilmesi

Fare PRLR KF1 ve KF2'nin üretilmesinde kullanılan ekzonların (sırası ile fare *prlr* geni ekzon 11 ve ekzon 12 fare *prlr* geni üzerindeki konumu LAST (<http://last.cbrc.jp/>) uygulaması kullanılarak tespit edilmiştir. Bu iki ekzon bölgesinin fare *prl* geni üzerindeki dizisi ilk olarak sıçan *prlr* geni üzerinde karşılığı aranmış yüksek uyumla bulunmuştur. Bu bölgelerin dizilerinin karşılaştırılması Clustal Omega uygulaması (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ile yapılmış sonucunda fare *prlr* ekzon 11 bölgesinin sıçan *prlr* genindeki karşılığı ile % 77.5 uyum, fare *prlr* ekzon 12 bölgesinin sıçan *prlr* genindeki karşılığı ile % 68.6 uyum bulunmuştur (Çizelge 4.?).

Çizelge 4.1. Fare *prlr* ekzon 11 ve 12'nin sıçan *prlr* geni üzerindeki karşılığı. a) fare *prlr* ekzon 12'in sıçan *prlr* geni üzerindeki karşılığı, b) fare *prlr* ekzon 12'in sıçan *prlr* geni üzerindeki karşılığı

a) Ekzon 11 Bölgesi

	Intron Sonu	
Fare	TTTGATTGGCAG	G TTCACAACAAAGAGCAACTTGAAAATTATGTCTACTAAGAGAGG
Sıçan	CTTGATTGGCAG	G TTCACAACAAAGAGTAAGTCAAAAGTTATGCCTATTACAGAAA
	*****	*****
Fare	GACCAGTCCTCAGAAAGGTTTCTGCCATGTCTTTTCCAAAGGAGAAATTGTAAGATGTCCTT	
Sıçan	GGCCAATCCTCAGAAAGTTCCCTGCCATACAGCTGATCAAAGGAGAAATTTAATGCGTCCTT	
	*****	*****

Benzerlik: % 77.5

b) Ekzon 12 Bölgesi

	Intron Sonu	
Fare	TCTGTCTTTTCAG	CTCTGGTGTCTTATTCTCCAGTTGAC----TTCCCTGGTGAAGATTC
Sıçan	TCTGTCTTCAAG	CTCTGGTATTCTATTCTCCAGTTGACCCACTCCCCTGGTGAAGATTC
	*****	*****
Fare	CAACAAGTGTGTTTATGTGATTATGAATATTTTCACTGCTGAAATTTCAATTTGTCTT	
Sıçan	----AACTAAGTGTGTTTATTTACTTTATGAATCTTTTCACTGCTGAAATTTGATTTGTCCT	
	*****	*****
Fare	TC-TATTTTCAAGCTCCTTGTT	
Sıçan	TCCTACTTTTCTAGCTCCTCGTT	
	** ** *	*****

Benzerlik: % 68.6

(İntron sonu: Bu ekzon bölgelerinin başında yer alan intron kesim bölgeleri de verilmiştir. Ayrım için konulan boşluktan sonra ekzon devam etmektedir)

Fare *prlr* ekzon 11 ve 12’de ki protein kodlayan bölgeler sıçan *prlr* genindeki karşılıkları ile detaylı olarak incelenmiştir (Bkz. Çizelge 4.?) bu protein kodlayan bölgelerde sırası ile % 84.6 ve 66.7 uyum görülmüştür. Bu ekzonların sıçandaki karşılıklarında aynı okuma çerçevesi ile protein kodlayacağı varsayılmış değerlendirme buna göre yapılmıştır. Sıçanda fare *prlr* ekzon 11 bölgesi (sıçan m11 diye söz edilecektir) oldukça korunmuştur; protein kodlayan 39 nükleotit uzunluğundaki bölgede sadece 3 nükleotit farklılığı mevcuttur. Ancak fare *prlr* ekzon 11’deki 16. sitozin (C) yerine timin (T) gelerek daha erken bir dur kodonu oluşmasına sebep olmuştur. Bundan dolayı fare *prlr* ekzon 11’den 11 aminoasit kodlanırken sıçandaki karşılığının 5 aminoasit kodlanması beklenmektedir. Ekzon 12 bölgesinde fare ve sıçandaki uyumun bozulmasına yol açan en büyük etmen 4 nükleotit insersyonundan kaynaklanan çerçeçe kaymasıdır. Fare *prlr* ekzon 12 ve sıçandaki karşılığının (sıçan m12 olarak söz edilecektir) benzer uzunlukta (23 aminoasit) kodlayacaktır ancak aralarındaki uyum 9. aminoasitten sonra bozulmakta 16. aminoasitten sonra bir uyum yakalanmaktadır. Bu fare *prlr* ekzon 11 ve 12’nin sıçan da ifade edildiğini göstermek üzere yapılan deneysel çalışmalar Bölüm 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Fare *prlr* ekzon 11 ve 12’den kodlanan aminoasitler ve sıçandaki karşılıkları. a) Ekzon 11 ve kodlanan amino asitleri b) Ekzon 12 ve kodlanan amino asitleri

a) Ekzon 11 Bölgesi

	V	H	N	K	E	Q	L	E	N	Y	V	Y	DUR
Fare:	GTT	CAC	AAC	AAA	GAG	CAA	CTT	GAA	AAT	TAT	GTC	TAC	TAA
Sıçan:	GTT	CAC	AAC	AAA	GAG	TAA	CTC	AAA	AGT	TAT	GCC	TAT	TAA
	V	H	N	K	E	DUR							

b) Ekzon 12 Bölgesi

	L	W	C	S	I	L	Q	L	T	S	L	V	K
Fare:	CTC	TGG	TGT	TCT	ATT	CTC	CAG	TTG	ACT	TCC	CTG	GTG	AAG
Sıçan:	CTC	TGG	TAT	TCT	ATT	CTC	CAG	TTG	ACC	CAC	TCC	CCT	GGT
	L	W	C	S	I	L	Q	L	T	H	S	P	G
	I	P	T	T	E	F	L	C	D	L	DUR		
Fare:	ATT	CCA	ACA	ACT	GAG	TTT	TTA	TGT	GAT	TTA	TGA		
Sıçan:	GAA	GAT	TCA	ACT	AAG	TTT	TTA	TTT	ACT	TTA	TGA		
	E	D	S	T	K	F	L	F	T	L	DUR		

4.1.1. Kemirgenlerde fare *prlr* ekzon 11 ve 12'nin korunmuşluğunun araştırılması

Fare *prlr* ekzon 11 ve 12 bölgeleri Ek 9'da verilen kemirgen türlerinin *prlr* genleri içerisindeki karşılığı aranmıştır. Bu ekzon bölgelerinde korunmuşluğu yüksek olan türlerdeki (Sıçan, *Microtus ochrogaster*, *Cricetulus griseus*, *Mesocricetus auratus*) ekzona karşılık gelen dizilerin ve bu ekzonların önünde bulunan intron sonu bölgeleri incelenmiştir. Bu bölgelerde çoğunlukla intron sonu sinyalinin (AG nükleotit çifti) ekzonun başında korunmuş olduğu görülmüştür (Ek 10). Fare ekzon 11 intron kesim bölgesine en çok benzeyenin sıçan (%88), Fare ekzon 12 intron kesim bölgesine en çok benzeyen türün de *Microtus ochrogaster* (%83) ve sıçan (%79) olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2a). Fare *prlr* ekzon 11 ve 12 ile homoloji gösteren diziye sahip türlerdeki bu bölgelerin dizi karşılaştırmaları yapılmıştır (Ek 11). Bu iki bölge için en yüksek homoloji (%71) sıçan *prlr* geni üzerinde görülmüştür.

Çizelge 4.3. Fare *prlr* ekzon 11 ve 12'nin karşılığını taşıyan bazı kemirgenlerin bu ekzonlar için fare ve sıçanda bulunan diziye benzerlik oranları (değerler yuvarlanmıştır). a) intron sonu bölgeleri, b) Ekzon bölgeleri

a) İtron sonu bölgesi benzerlik matrisi

% Benzerlik	Ekzon 11		Ekzon 12	
	Fare	Sıçan	Fare	Sıçan
Fare	100	88	100	79
Sıçan	88	100	79	100
Moch	-	-	83	88
Cgri	72	76	63	75
Maur	68	72	71	83

b) Ekzon benzerlik matrisi

% Benzerlik	Ekzon 11		Ekzon 12	
	Fare	Sıçan	Fare	Sıçan
Fare	100	76	100	71
Sıçan	76	100	71	100
Moch	-	-	57	69
Cgri	50	48	65	75
Maur	74	72	62	70

4.2. RNA İzolatlarının Miktarının ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

Homojenize edilen sıçan böbrek, karaciğer ve testislerinden RNA izolasyonu GeneAll Hybrid-RT™ RNA toplam RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bazı toplam RNA'lerden Thermo Scientific Magjet mRNA zenginleştirme kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam RNA ve mRNA örneklerinin spektrofotometrik olarak miktar ölçümü ve saflık değerlendirmesi yapılmıştır. Çizelge 4.4'de istenen saflık değerlerine sahip RNA izolatlarından (Bkz Bölüm 2.6.2) elde edilen total RNA miktarı verilmiştir. Total RNA izolasyonundan mRNA izolasyonu yapıldığında toplam RNA'nın %0,1 ile %1 (yaklaşık 1.5-15 ng/μl) kadar mRNA izole edildiği görülmüştür.

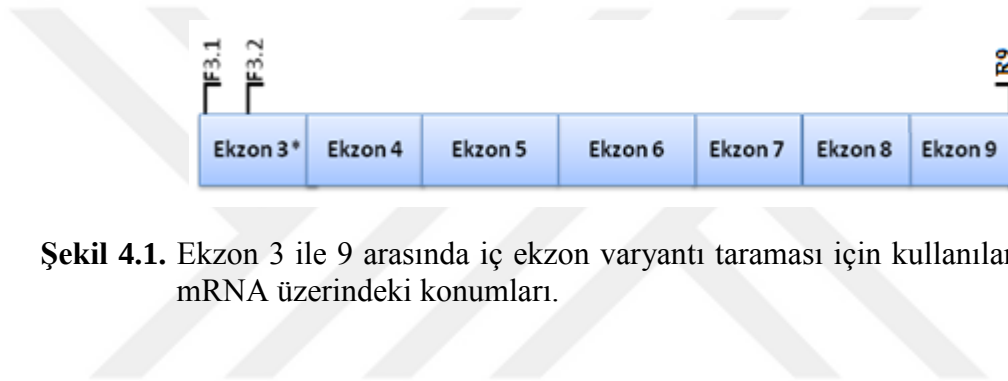
Çizelge 4.4. Toplam RNA izolatlarının RNA miktarı

Erkek Böbrek	Ağırlık (gram)	RNA Miktarı (ng/μl)
	0,1	0,462
	0,1	856
	0,1	1018
Erkek Karaciğer	Ağırlık (gram)	RNA Miktarı (ng/μl)
	0,1	1792
	0,1	2020
	0,1	621
Erkek Testis	Ağırlık (gram)	RNA Miktarı (ng/μl)
	0,1	1235
	0,1	1396
	0,157	1916
Dişi Böbrek	Ağırlık (gram)	RNA Miktarı (ng/μl)
	0,1	233
	0,1	698
	0,1	1568
Dişi Karaciğer	Ağırlık (gram)	RNA Miktarı (ng/μl)
	0,1	1361
	0,1	978
	0,157	2305

4.3. PRLR İç Ekzon Varyantlarının Taraması

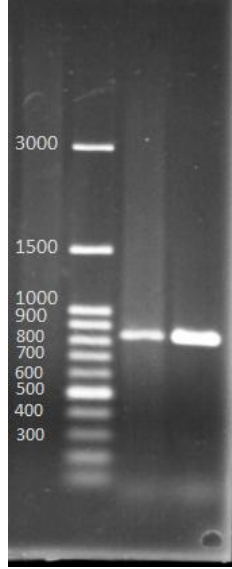
İnsan PRLR'leri; mRNA'dan ekzon 3 ile 9 arasındaki ekzonlardan bir veya bir kaçının çıkarılması ile oluşturulmuş RNA örneklerine sahiptir. Bu tip varyantların sıçanda varlığının araştırılması için; beş organdan (erkek böbrek, karaciğer ve testis ile dişi böbrek ve karaciğer) izole edilen RNA'lardan poli (T) primeri ilk iplik cDNA'lar sentezlenmiş ve toplamda aşağıda belirtilecek primer çiftleri ile Standart PCR yapılmıştır.

Şekil 4.1'de ekzon 3 ile 9 arasındaki olası iç ekzon varyatlarını aramak için kullanılan primerlerin mRNA üzerindeki konumu gösterilmektedir. Bu primer setleri ile yapılacak amplifikasyonlar herhangi bu ekzonlar arasında bir iç ekzon varyantı olup olmadığını gösterirken, bunun hangi forma ait olduğu hakkında bilgi vermeyecektir.



Şekil 4.1. Ekzon 3 ile 9 arasında iç ekzon varyantı taraması için kullanılan primerlerin mRNA üzerindeki konumları.

Elde edilmiş cDNA'lar kullanılarak F3.1-R9 primerleri ile Standart PCR reaksiyonları yapılmıştır. Kullanılan bütün organlarda yaklaşık 840 bp uzunluğunda sıçan PRLR uzun ve kısa formda bulunan bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş (Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2) ve bu bölgenin çift dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Bu yaklaşık 840 bp uzunluğundaki fragmentin referans dizi ile uyumu yüksek olan dizileme sonucu Ek 12'de referans dizi ile beraber verilmiştir. Bunun yanı sıra bazı reaksiyonlarda yaklaşık 280 bp uzunluğunda bir fragment daha görülmüş ve bu fragment jelden izole edilerek çift yönlü dizilemesi hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Yaklaşık 280 bp uzunluğundaki fragment BLAST ile NCBI üzerinde ve sıçan *prlr* geni üzerinde aranmış ve *prlr* ile ilişkili olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.2. F3 ve R9 primerleri kullanılarak çoğaltılan s-PRLR UF ve KF’de korunmuş fragment.

Sıçan PRLR uzun ve kısa form ile ilişkili iç ekzon varyantlarını taramak için ekzon üç üzerinde bulunan primerler (F3.1 ve F3.2) ile uzun forma özgü primerler (R10.1 ve R10.2) ve kısa forma özgü primer (R10) kullanılarak Standart PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Hedeflenen bölge için Bkz. Şekil 4.3 a ve b).

a)

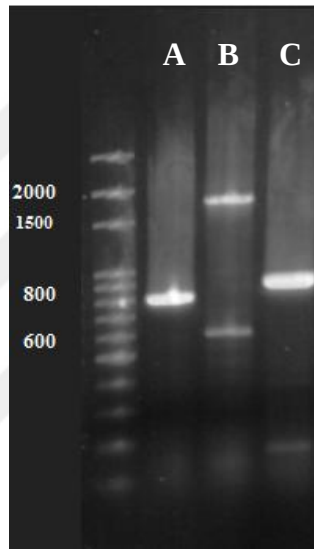


b)



Şekil 4.3. Sıçan PRLR uzun ve kısa form ve bunlarla ilişkili iç ekzon varyantlarının taranmasına yönelik kullanılan primerlerin mRNA üzerinde konumlarını.

Uzun form ile ilişkili iç ekzon varyantı aramak için gerçekleştirilen reaksiyonlarda PRLR UF'nin amplifikasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir ve F3.2-R10.1 primer çifti ile gerçekleştirilen Standart PCR sonucunda agaroz jelde, uzun forma ait fragmentin (1810 bp uzunluğunda) yanında yaklaşık 600 bp uzunluğunda farklı bir fragment görülmüştür (Şekil 4.4.b). Görülen bu fragment jelden izole edilip dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Bu 600 bp uzunluğundaki fragmentin BLAST kullanılarak veri bankasında ve LAST ile sıçan *prlr* geni üzerinde aranmıştır. Bu fragmentin *prlr* geni ile alakalı bir bölge olmadığı görülmüştür. Kısa form ile ilişkili iç ekzon varyantı aramak için gerçekleştirilen Standart PCR reaksiyonunda kısa formun amplifikasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir ancak PRLR kısa form dışında başka bir fragmente rastlanmamıştır (Şekil 4.4c).



Şekil 4.4. PRLR uzun ve kısa form ile ilişkili iç ekzon varyantı taramasına yönelik Standart PCR'ın agaroz jel görüntüsü. A) F3.2-R9, B) F3.2-R10.1 ve (C) F3.2-R11 primleriyle gerçekleştirilen Standart PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

4.3.1. PRLR'lerin organlardaki dağılımı

Sıçan PRLR uzun ve kısa formun erkek böbrek, karaciğer ve testisi ile dişi böbrek ve karaciğerindeki varlıkları araştırılmıştır. Ayrıca hücre kültüründe tanımlanmış olan sıçan PRLR OF'nin bu organlardaki varlığı araştırılmıştır. Elde edilen RNA izolatlarından poli (T) veya adaptör poli (T) primerleri ile sentezlenen ilk iplik cDNA'lar PCR reaksiyonları ile bu bölgeler çoğaltılmıştır. Bu amaç için PCR reaksiyonlarında kullanılan primer setlerinin mRNA üzerindeki konumları Şekil 4.3'de verilmiştir.

Sıçan PRLR uzun ve kısa formun organlardaki dağılımı görmek için, izole edilen RNA'lerden poli (T) primeri kullanılarak ilk iplik cDNA'lar sentezlenmiş ve bu cDNA'lar; F3.1, F3.2 veya F9 primerleri ile uzun forma özgü primerler (R10.1 ve R10.2) ve kısa forma özgü primerle (R11) Standart PCR' tabi tutulmuştur. PCR ürünleri agaroz jel üzerinde yürütülmüş ve beklenen uzunlukta fragmentler görülmüştür. PRLR UF için F9-R10 primer seti kullanılarak ve PRLR KF için F3-R11 primer seti kullanılarak gerçekleştirilen Standart PCR'ın ürünlerinin çift yönlü dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Elde edilen PRLR KF'nin dizisi referans dizi ile beraber Ek 13'de, PRLR UF'nin dizisi referans dizi ile beraber Ek 14'de verilmiştir. Kısa form söz edilen beş organda da görülmüş uzun form erkek testis ve dişi karaciğerinde bariz bir şekilde görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Dokulardaki uzun ve kısa formun görülme durumu.

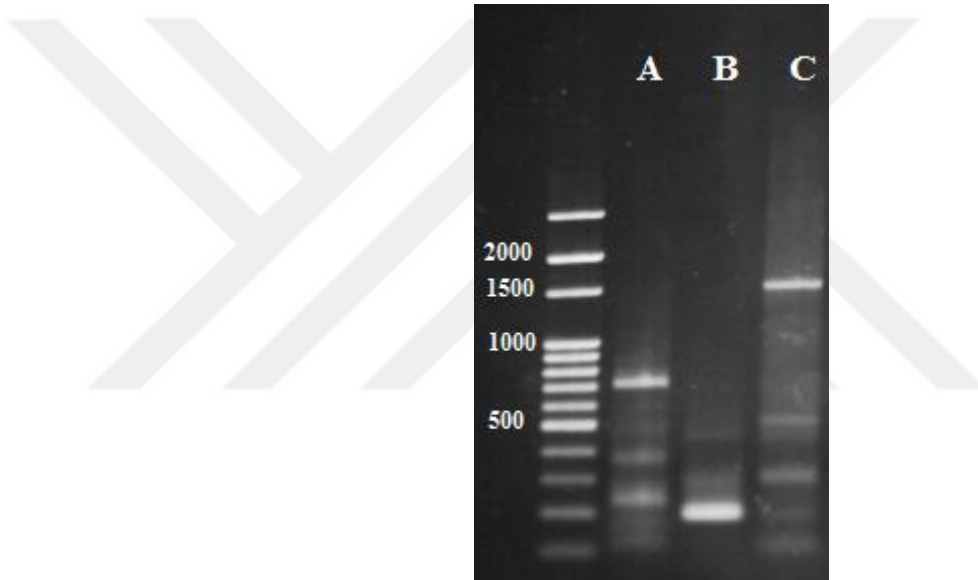
Organ	Uzun Form	Kısa Form
Erkek Böbrek :	+	+
Erkek Karaciğer :	-	+
Erkek Testis :	+	+
Dişi Böbrek :	-	+
Dişi Karaciğer :	+	+

*Nested PCR sonucu elde edilmiştir.

PRLR OF'yi ilk olarak poli (T) ile sentezlenmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak F3.1, F3.2 ve F9 primerleri ile R10.1 primeri kullanılarak Standart PCR gerçekleştirilmiştir. F3.2-R10.1 primer seti kullanılarak gerçekleştirilen amplifikasyon'un ürünleri agaroz jelde yürütüldüğünde yaklaşık 1800 bp uzunluğunda (PRLR UF 1810 bp uzunluğunda bant vermesi bekleniyor) ve yaklaşık 600 bp uzunluğunda bant vermiştir. Bu yaklaşık 600 bp uzunluğundaki fragment NanoHelix Gel Extraction Kit kullanılarak jelden izole edilmiş ve çift yönlü dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Dizileme sonuçları *s-prlr* geni içerisinde ve BLAST ile veri bankasında taranmıştır ve *prlr* ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca adaptör poli (T) kullanılarak sentezlenmiş ilk iplik cDNA'lardan F3-Adaptör primer seti ile gerçekleştirilen Stepdown PCR'ın ürünleri, F9-R10 primer seti ile Nested PCR'a tabi tutulmuş ve Nested PCR'ın ürünleri agaroz jelde yürütüldüğünde PRLR UF'nin (1066 bp) yanında yaklaşık 600 bp uzunluğunda bir fragment daha görülmüştür. Bu fragment agaroz jelden izole edilerek hizmet alımı yolu ile dizilemesi yapılmıştır. Dizileme sonuçları *prlr* geni üzerinde ve BLAST ile NCBI üzerinde aranmış PRLR ile ilişkili olmadığı görülmüştür.

4.4. Sıçan PRLR mRNA'larında 3' Varyantlarının Taranması

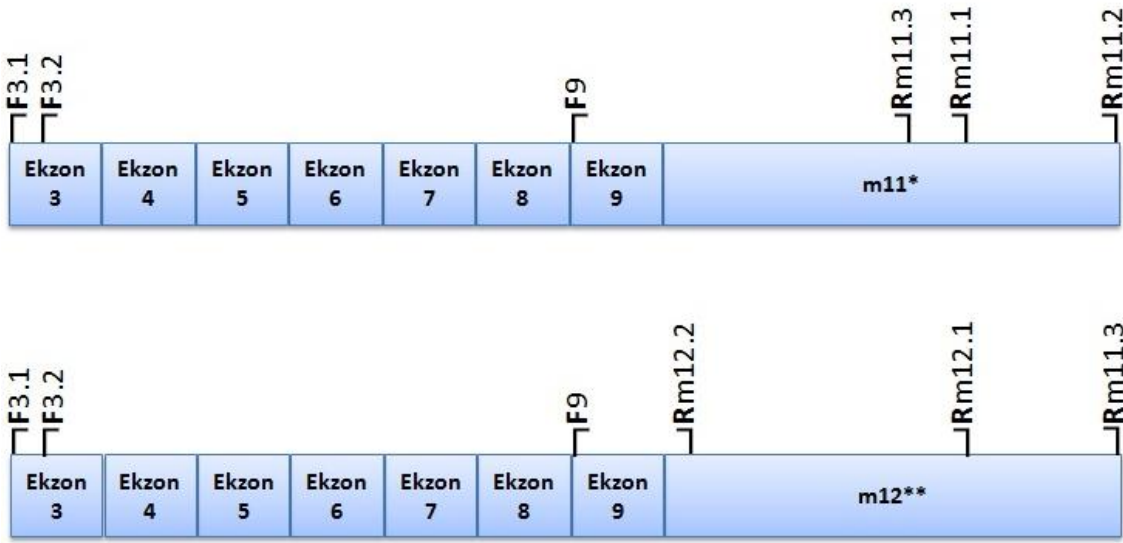
Sıçan, fare, domuz ve insanda ekzon 3'den ekzon 9'a kadar ekzonlar kullanıldıktan sonra ya ekzon 10'nun tamamı getirilerek PRLR UF ya da farklı ekzonlar getirilerek kısa formlar oluşturulmaktadır. Bu tip yeni '3' ucu varyantlarının' tanımlanması amacı ile 3' RACE yapılmıştır. Sıçan böbrek, karaciğer ve testislerinden izole edilen RNA'lardan 3' RACE'de kullanılmak üzere adaptör poli (T) primeri ile ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu cDNA'lar F3.1, F3.2 ve F9 primerleri ile Adaptör primeri kullanılarak 3' RACE PCR'ye tabi tutulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jel üzerinde yürütülmüştür (Şekil 4.5). PCR ürünlerinin hizmet alımı yolu ile dizilemesi yapılmıştır. Dizileme sonuçları *prrl* geni üzerinde ve BLAST ile NCBI üzerinde aranmış PRLR ile ilişkili yeni bir varyant görülmemiştir.



Şekil 4.5. 3' ucu varyantı aramaya yönelik 3' RACE PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. A) F3-Adaptör primer seti, B) F3.2-Adaptör primer seti, C) F9-Adaptör primer seti.

4.5. Sıçan *prrl* Geninde 'Yeni' Ekzon İfadesi Taraması

Bölüm 4.2'de sözü edilen olası ekzonların ifade edildiğini göstermek üzere her bir ekzon üzerindeki bölgelere özgü 3'er tane R (Rivörz) primer tasarlanmıştır (Şekil 4.6). Bu ekzonların f-PRLR KF1 ve 2'dekine benzer bir şekilde (ekzon 3'den ekzon 9'a kadar olan ekzonların tamamı sonrasında ekzon 11 ve ya 12 gelecek şekilde) ifade edileceği düşünülerek buna göre primer setleri kullanılmıştır.



*m11 şeklindeki kutuda ekzon başlangıcından itibaren 168 bp uzunluğundaki bölgeyi göstermektedir.

**m12 şeklindeki kutuda ekzon başlangıcından itibaren 399 bp uzunluğundaki bölgeyi göstermektedir.

Şekil 4.6. Fare *prlr* genine özgü ekzon 11 ve 12'nin sıçanda ifade edip edilmediğini göstermek için kullanılan primerlerin konumu (Ekzonlar orantılı verilmemiştir).

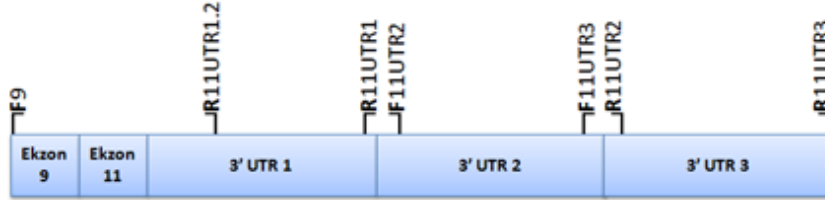
Sıçanda m11'in ifadesinin araştırılması için F3.1-Rm11.1, F3.2-Rm11.1, F9-Rm11.1, F9-Rm11.2 ve F9-Rm11.3 setleri, m12'in ifadesinin araştırılması için de F3.1-Rm12.1, F3.2-Rm12.1, F9-Rm12.1, F9-Rm12.2 ve F9-Rm12.3 primer setleri ile Standart PCR yapılmıştır. Standart PCR sonucunda agaroz jel üzerinde fragment elde edildiği görülen örneklerin dizilemesi yapılmış ancak bu ekzonların ifade edildiğini gösteren bir diziye rastlanmamıştır.

4.6. PRLR 3' UTR Dizilerinin Aydınlatılması

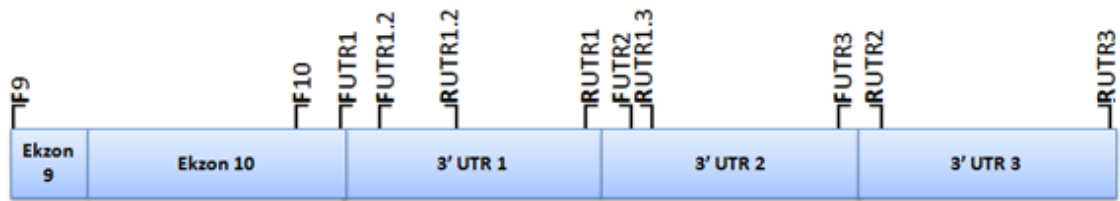
Veri bankasındaki s-PRLR UF ve KF mRNA dizisinin, f-PRLR UF ve KF mRNA dizisi ile karşılaştırması yapıldığında fare PRLR'lerde çok daha uzun bir 3' UTR bölgesi olduğu görülmüştür. Fare PRLR formlarının 3' UTR'nin karşılığı olan bölgeler sıçan *prlr* geni üzerinde bulunmuştur. Bu bölgelerin tamamının ya da bir kısmının sıçanda da ifade edilip edilmediğini göstermek için iki strateji uygulanmıştır; a) Adaptör poli (T) primeri kullanılarak sentezlenen ilk iplik cDNA'lar kullanılarak bir ekzona özgü primer ve Adaptör primer ile 3' RACE, b) poli (T) primeri kullanılarak sentezlenmiş ilk iplik cDNA'ların, UTR bölgesi üzerindeki bölgelere özgü tasarlanmış primer setleri ile Standart PCR kullanılarak 3' UTR bölgelerinin çoğaltılması.

Sıçan PRLR UF ve KF’de bulunması beklenen UTR’lere özgü primer setleri tasarlanırken bu dizilerin ilk 3000 bç uzunluğundaki bölgeleri kullanılmıştır. UTR’ler yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki bölgelere ayrılmış ve bu bölgeleri amplifiye etmeye yönelik primer setleri tasarlanmıştır (Şekil 4.7).

a) s-PRLR KF



b) s-PRLR UF



Şekil 4.7. s-PRLR 3' UTR bölgelerinin dizilerini aydınlatmaya yönelik kullanılan primerlerin konumu. a) s-PRLR kısa formun UTR 1, 2 ve 3 bölgesine özgü primerlerin konumu, b) s-PRLR uzun formun UTR 1, 2 ve 3 bölgesine özgü primerlerin konumu.

4.6.1. PRLR KF’nin 3' UTR bölgesine özgü primerlerle 3' UTR dizisinin aydınlatılması

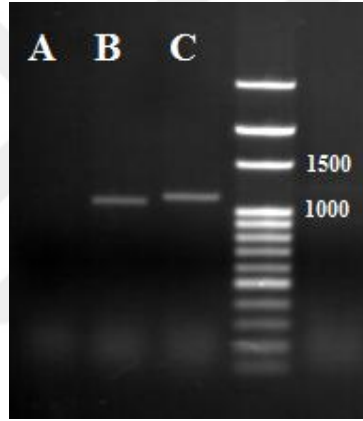
s-PRLR KF’nin 3' UTR’sini aydınlatmaya yönelik olarak F9-R11UTR1, F11UTR2-R11UTR2 ve F11UTR3-R11UTR3 primer setleri ile gerçekleştirilen Standart PCR’ın ürünlerinin jel görüntüsünde beklenen uzunluklarda bantlar görülmemiştir. Ancak F9-R11UTR1.2 primer seti ile gerçekleştirilen Standart PCR ile yaklaşık 650 bç uzunluğunda tek bir fragmentin amplifikasyonu gerçekleştiği görülmüştür. Bu fragmentin hizmet alımı yolu ile çift yönlü dizilemesi yapılmış ve Ek 15’de referans dizi ile beraber verilmiştir. F9 ve R11UTR1.2 arasındaki bölgenin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği görülmüştür.

Amplifikasyonu gerçekleştirilemeyen UTR bölgelerinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek amacı ile ilk iplik cDNA kalıbından F9-R11UTR3, F9-R11UTR2, ve

F11UTR2-F11UTR3 primer setleri ile Standart PCR gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel üzerinde değerlendirilebilir bir ürüne rastlanmamıştır.

4.6.2. PRLR UF'nin 3' UTR bölgesine özgü primerlerle 3' UTR dizisinin aydınlatılması

s-PRLR UF'nin 3' UTR'sinin UTR 1, UTR 2 ve UTR 3 bölgesini aydınlatmaya yönelik sırası ile FUTR1-RUTR1, FUTR2-RUTR2, FUTR3-RUTR3 ve primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Standart PCR'nin ürünleri agaroz jelde yürütülmüş, jelin görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir. FUTR2-RUTR2 ve FUTR3-RUTR3 ile gerçekleştirilen Standart PCR'nin ürünlerinin dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. Sonuçlar referans dizilerle beraber Ek 17 (FUTR2-RUTR2) ve Ek 18'de (FUTR3-RUTR3) verilmiştir. Sıçan PRLR LF 3' UTR 2 ve 3 bölgesinin elde edildiği doğrulanmıştır.



Şekil 4.8. Sıçan PRLR UF'nin 3' UTR 1, 2 ve 3 bölgesini aydınlatma yönelik gerçekleştirilen Standart PCR'nin ürünlerinin jel görüntüsü. A) FUTR1-RUTR1 primer seti, B) FUTR2-RUTR2 primer seti, C) FUTR3-RUTR3 primer seti.

3' UTR 1 bölgesinin dizisi FUTR1-RUTR1 primerleri kullanılarak elde edilemediğinden aynı cDNA kalıplarından F9-RUTR1, F9-RUTR2, FUTR1-RUTR2, FUTR1-RUTR3, F9-RUTR1.2, F10-RUTR1.2, FUTR1.2-RUTR1.2 ve FUTR1.3-RUTR2 primer seti ile Standart PCR gerçekleştirilmesine rağmen agaroz jel üzerinde herhangi anlamlı bir amplifikasyon ürününe rastlanmamıştır. Bunun neticesinde F9-RUTR2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Standart PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak FUTR1-RUTR1 primerleri ile Nested PCR gerçekleştirilmiş ancak agaroz jelde görüntülenebilen bir ürüne rastlanmamıştır.

4.6.3. 3' RACE PCR ile 3' UTR dizisinin aydınlatılması

F9- Adaptör primer setleri ile yapılan 3' RACE PCR sonucunda yaklaşık 700 bp uzunluğunda bir fragment elde edilmiş dizilemesi hizmet alımı yolu ile yapılmıştır. PRLR KF'nin ekzon 11'den poli (A) kuyruğuna kadar dizisinin elde edildiği saptanmış Ek 16' de referans dizi ile beraber verilmiştir.



5. TARTIŞMA

Prolaktin reseptörü (PRLR) omurgalılarda 300'den fazla fonksiyon ile ilişkilendirilmiş bir çok fizyolojik olayda etkisi olduğu bilinen bir sitokin reseptörüdür. Bu kadar farklı olayda rol almayı farklı varyantları ve farklı zaman dilimlerinde ve hücrelerde aktif olması ile yapabilmektedir. İnsanda 11 tane PRLR varyantı, fare 4 PRLR varyantı ve sıçanda 2 PRLR varyantı tanımlanmıştır. Sıçanda farklı boyutlarda PRLR mRNA'ları olduğu bilinmektedir ve bu mRNA'ların o zaman diliminde kullanılan problemlerin özelliğinden dolayı hangi formlara ait olduğu yönünde bir ayırım gerçekleştirilememiştir. Bu çalışmada her iki cinsiyetin böbrek, karaciğer (ve testisleri) PRLR varyant çeşitliliği bağlamında araştırılmış, sağlıklı 24 haftalık genç yetişkinlerin bu organlarda ifade edilen PRLR çeşitlerinin uzun ve kısa forma ait olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, geçmiş çalışmalardan elde edilen çok farklı boyut ve sayıda mRNA'lar uzun ve kısa forma karşılık geliyor gözükmemektedir.

Sıçanında insan ve örneğinde olduğu gibi yüksek PRLR varyantı sayısına olabileceği düşünülmüştür. Yaygın kullanılan bir model organizma olan sıçanda, bu denli yüksek sayıda fonksiyonla ilişkilendirilmiş reseptörün olası yeni varyantlarını literatüre kazandırmak amacı ile yeni varyant taraması ve sıçan PRLR UF ile KF'de gen regülasyonunda önemli role sahip olan 3' UTR'sinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

Sıçan PRLR'nin varyantlarını ararken ilk uygulanan strateji ekzon 3 ile 9 arasında ve uzun form ya da kısa form ile ilişkili bir 'iç ekzon' varyantı aramak olmuştur. Bu amaca yönelik deneylerde prolaktin reseptörü uzun ve kısa amplifikasyonu gerçekleştirilmiş kısa formun iki cinsiyetteki sıçanın böbrek, karaciğer ve testisinde olduğu görülmüş, uzun formun ise erkek testisinde ve dişi karaciğerinde kayda değer seviyede ifade edildiği görülmüştür. Ancak ekzon 3 ile 9 arasında, uzun ya da kısa form ile ilişkili bir iç ekzon varyantına ya da hücre kültüründe tanımlanmış olan sıçan PRLR OF'nin bu organlarında ifade edildiğine dair bir bulguya rastlanmamıştır.

Yeni varyant aramak için kullanılan ikinci strateji 3' RACE ile ekzon 9'dan sonra herhangi bir yeni ekzon eklenmesi ile oluşturulacak yeni bir '3' ucu varyantı' aramak olmuştur. Bu sistem kullanılarak bu organlarda herhangi bir 3' ucu varyantı tespit edilememiştir. Bunun sebebi olası varyantların, 3' ucunun uzun olma ihtimali ya da Adaptör primerin gene özgü primerle beraber PCR reaksiyonunda etkin olamama ihtimalinden dolayı olabilir. Bu deney sistemini uzun bölgelerin amplifikasyonlarını yapabilen (>15 kbç) farklı DNA polimeraz enzimlerini kullanarak ya da 3' RACE sistemi ile tekrarlamak gerekmektedir.

Son olarak fareye özgü olan kısa formlar üzerine yoğunlaşmıştır. Fareye özgü olan PRLR KF1 ve KF2'nin protein dizisi ve bu formları kodlayan nükleotit dizileri, farklı canlılarda tanımlanmış bu formlara benzeyen formları bulmak amacı ile NCBI üzerinden BLAST aracı ile sorgulanmıştır. Ancak bu formlara benzeyen başka canlıda tanımlanmış PRLR'ye ait nükleotit ya da protein dizisine rastlanmamıştır. Bu iki formun farklı türlerde ifade edilip edilemeyeceğini (özellikle sıçan) incelemek amacı ile fareye filogenetik olarak yakın olan genomu tamamlanmış türlerde, bu iki proteini kodlayan bölgelerin korunmuşluğu incelenmiştir. Fare PRLR KF1 ve KF2'yi kodlayan ekzon 11 ve 12'nin sıçan *prlr* geninde ve birkaç kemirgen türünde korunduğu

görülmüştür (Bkz. Bölüm 4.1). Bu korunmuşluk incelendiğinde bu iki ekzonunda sıçanda ifade edilebileceği düşünülmüştür. Bu ekzonların sıçan *prlr* genindeki dizileri referans alınarak bu ekzola özgü primer setleri tasarlanarak bu bölgelerin ifade edilip edilmediğini göstermek hedeflenmiştir. Bu ekzonların 24-22 haftalık sıçan böbrek, karaciğer ve testisinde ifade edildiğine dair bir bulguya rastlanmamıştır. Bu ekzonların diğer organlarda da varlığı araştırılmalı gerekirse farklı stratejiler uygulanarak ifade edilip edilmediği araştırılmalıdır.

Prolaktin reseptörünün yeni varyant aramaya yönelik gerçekleştirilen yukarıda söz edilen 3 strateji (iç ekzon varyantı arama, 3' ucu varyantı arama ve fareye özgü PRLR'lerin sıçanda ifadesinin aranması) yüksek sayıda tekrar ile test edilmiştir. Bu bilgiler ışığında sıçan analiz edilen böbrek, karaciğer ve testislerinde bu dönemde (24-22 hafta) uzun ve kısa form dışında PRLR varyantı olmadığı görülmüştür.

Sıçan PRLR'sine ait 1.8 b ile 9.7 b uzunluğunda mRNA'lar bulunmaktadır (Boutin vd 1988, Hu vd 1996, Hu vd 1998, Hu ve Dufau 1991, Shirota vd 1990). Yeni varyant aramaya yönelik yaptığımız çalışmalarda yeni PRLR varyantlarına dair bir bulguya rastlamamız bu mRNA'lardaki uzunluk farkının 3' UTR kaynaklı olduğunu işaret etmektedir. 3' UTR poliadenilasyona, translasyon verimine, yer belirlenmesine ve mRNA'nın kararlılığına etki eder. 3' UTR üzerinde miRNA'ların ve represör proteinlerin bağlanacağı bölgeleri içermekle beraber bölgenin kendi fiziksel özellikleri (uzunluk ve sekonder yapı oluşturma) ile de gen ifadesinin düzenlenmesinde etkindir. Gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenen bu bölgelerin sıçan PRLR formlarındaki tam dizilerini elde etmek için bu bölgelere özgü tasarlanmış primerlerle PCR reaksiyonları gerçekleştirilerek ve 3' RACE PCR kullanılarak araştırılmıştır.

Uzun ve kısa formun sahip olabileceği 3' UTR'nin yaklaşık 3000 nükleotit uzunluğundaki kısmının mRNA olarak ifade edilip edilmediği araştırılmıştır. Bunun için sıçan *prlr* genindeki bu 3' UTR dizileri belirlenmiş ilk 3000 nükleotit uzunluğundaki kısmı 3 bölgeye ayrılarak bu bölgeleri amplifiye etmek üzere primer setleri tasarlanmıştır.

3' RACE PCR kullanılarak sıçan PRLR KF'ye ait 3' UTR'nin poli (A) kuyruğuna kadar olan dizisi elde edilmiştir (Ek 10). Veri bankasındaki kısa forma ait mRNA dizisi ile karşılaştırılmış yaklaşık 5 nükleotit daha uzun olduğu görülmüştür. Kısa formun 3' UTR'sine özgü primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında Sıçan PRLR KF 3' UTR'sinin veri bankasında belirtilmiş olan bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak sıçan PRLR KF 3' UTR'sinin diğer bölgelerinin (yaklaşık 3000 b uzunluğundaki bölgenin) varlığını işaret eden bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmanın kapsamı genişletilip yeni primer setleri ile deneylerin tekrar edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sıçan PRLR UF'nin 3' UTR bölgesini aydınlatmaya yönelik bu bölgeye özgü primerleri kullanarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda 3' UTR 2 ve 3 bölgesinin dizisi elde edilerek bu yaklaşık 2 kb uzunluğundaki UTR'nin varlığı gösterilmiştir. Ancak 3' UTR 1 bölgesinin amplifiye edildiğine dair bir gözlem yapılamamıştır (Bkz. Bölüm 4.6.2). Bu durum veri bankasında verilmiş olan sıçan PRLR UF'nin dışında daha uzun 3' UTR bölgesine sahip olan bir sıçan PRLR UF olabileceğini düşündürmektedir. Uzun formun bu olası iki 3' UTR varyantı alternatif poliadenilasyon (APA) ile oluşturulmuş olabilir. Gerçekten de bu sıçan PRLR uzun

formunda 3' UTR 1 bölgesi çıkarılmışsa bu o bölgedeki poliadenilasyon sinyali dizisini kaldıracağından 3' UTR'nin daha sonraki bir kısmındaki bir poliadenilasyon sinyali ile mRNA'nın sonlanmasına sebep olacaktır. Ancak son söz, ekzon 9'dan itibaren ekzon 10 ve 3' UTR'nin poli (A) kuyruğuna kadar olan dizi elde edildiğinde söylenebilecektir. Bu aşamadan sonra uygun programlar ile bu 3' UTR'ler ile ilişkili miRNA ve diğer düzenleyici faktörlerin olası bağlanma bölgeleri ve bu ilişkilerin etkisini ortaya koymaya yönelik deney düzenekleri tasarlanabilir.



6. SONUÇ

Erkek sıçan böbreğinde yeni prolaktin reseptörü çeşitliliğinin araştırılmasını hedefleyen bu çalışmanın kapsamı genişletilerek; erkek karaciğer ve testisi ile dişi böbrek karaciğeri de çalışmanın kapsamına eklenmiştir.

İlk olarak insanda örneği bulunan ‘içsel ekzon varyantlarının’ ve hücre kültüründe tanımlanmış sıçan PRLR OF’nin bu organlarda varlığı araştırılmış bu varyantların bu organlarda varlığına dair bir bulguya rastlanmamıştır. Bu sırada sıçan PRLR KF’nin bu dokuların hepsinde ifadesi gözlemlenirken, kayda değer uzun form ifadesi erkek testis ve dişi karaciğerinde görülmüştür.

İkinci olarak ‘3’ ucu varyantları, F9 ve Adaptör primeri kullanılarak gerçekleştirilen 3’ RACE PCR kullanılarak ekzon 9’dan sonra mevcut uzun form ve kısa forma ait ekzon 10 ve 11’den farklı ekzon eklenerek oluşturulan bir varyanta rastlanmamıştır.

Yeni varyant varlığını araştırmak için son olarak fareye özgü PRLR KF1 ve KF2’nin benzeri varyantları kodlayan ekzonların, gerçekleştirilen biyoinformatik çalışmaları sonucunda sıçan *prlr* geninde de korunduğu görülmüştür. Bu formların sıçanda ifade edilip edilmediği incelenmiş deneysel veriler bu organlarda iki varyanta benzer bir sıçan PRLR varyantı olduğunu göstermemektedir.

Yeni varyant aramaya yönelik yapılan çalışmalarda 24-22 haftalık sıçanların böbrek, karaciğer ve testislerinde uzun ve kısa form dışında yeni bir varyantı olmadığı görülmüştür. Bu daha önceki çalışmalarda saptanan sıçan PRLR’ye ait 1.8 kb ile 9.7 kb uzunluğu arasında değişen mRNA’ların uzun ve kısa forma ait mRNA’lar olduğunu işaret etmektedir.

Çalışmanın son amacı olan prolaktin reseptörü mRNA’sı 3’ UTR’lerine ait dizilerin açığa çıkarılması olmuştur. Sıçan kısa form PRLR’nin stop kodonundan poli (A) kuyruğuna kadar amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 501-505 nükleotit uzunluğunda iki 3’ UTR tespit edilmiştir. Bu daha önceki çalışmalarda gerçekleştirilen kısa forma ait olduğu bilinen 1.8 ve 2.1 kb uzunluğundaki sıçan PRLR mRNA’ları arasındaki boyut farkının 5’ UTR’den kaynaklandığını göstermektedir. Sıçan PRLR UF’nin veri bankasında belirtilmiş uzunluktan 2000 nükleotit daha uzun bir kısmının varlığı görülmüştür.



7. KAYNAKLAR

- ADAMSON, A. D., FRIEDRICHSEN, S., SEMPRINI, S., HARPER, C. V., MULLINS, J. J., WHITE, M. R. H., & DAVIS, J. R. E. 2008. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor- α signaling. *Endocrinology*, 149(2), 687-694.
- ALI, S., CHEN, Z., LEBRUN, J. J., VOGEL, W., KHARITONENKOV, A., KELLY, P. A., and ULLRICH, A. 1996. PTP1D is a positive regulator of the prolactin signal leading to beta-casein promoter activation. *EMBO J.*, 15: 135–142.
- ALI, S. U. H. A. D., PELLEGRİNİ, I., & KELLY, P. A. 1991. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 20110-20117.
- AL-SAKKAF, K.A., DOBSON, P. R., and BROWN, B. L. 1997. Prolactin induced tyrosine phosphorylation of p59fyn may mediate phosphatidylinositol 3-kinase activation in Nb2 cells. *J Mol Endocrinol*, 19: 347–350.
- ANTHONY, R. V., LINESAND, S. W., FANNING, M. D., & LIANG, R. 1998. Placental lactogen and growth hormone. In *Endocrinology of Pregnancy*, Humana Press, 461-490.
- BAEUERLE, P. A. 1998. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NFkappaB puzzle. *Curr. Biol.*, 8: R19–R22.
- BAR-SHAI, M., HASNIS, E., WIENER-MEGNAZI, Z., & REZNIK, A. Z. 2006. The role of reactive nitrogen species and cigarette smoke in activation of transcription factor NF-kB and implication to inflammatory processes. *Journal of physiology and pharmacology*, 57, 39-44.
- BEN-JONATHAN, N., MERSHON, J. L., ALLEN, D. L., & STEINMETZ, R. W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews*, 17(6), 639-669.
- BERCHTOLD, S., VOLAREVIC, S., MORIGGL, R., MERCEP, M., and GRONER, B., 1998. Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. *Mol Endocrinol* 12: 556–567.
- BERLANGA, J. J., FRESNO VARA, J. A., MARTIN-PEREZ, J. and GARCIA-RUIZ J. P. 1995. Prolactin receptor associated with c-src kinase in rat liver. *Mol. Endocrinol*, 9: 1461–1467.
- BERLANGA, J. J., GUALILLO, O., BUTEAU, H., APPLANAT, M., KELLY, P. A. and EDERY, M. 1997. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J. Biol. Chem.*, 272: 2050–2052.

- BOGORAD, R. L., COURTILLOT, C., MESTAYER, C., BERNICHTEIN, S., HARUTYUNYAN, L., JOMAIN, J. B., BACHELOT, A., KUTTENN, F., KELLY, P. A., GOFFIN, V., TOURAINE, P. 2008. Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14533-14538.
- BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N., & KELLY, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*, 19(3), 225-268.
- BOOT, L. M., MUHLBOCK, O. & ROPCKE, G. 1962. Prolactin and the induction of mammary tumors in mice. *In General and Comparative Endocrinology*, 2, 601-603.
- BOUTIN, J. M., JOLICOEUR, C., OKAMURA, H., GAGNON, J., EDERY, M., SHIROTA, M., BANVILLE, D., DUSANTER-FOURT, I., DJIANE, J., KELLY, P. A. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*, 53:69-77.
- BROOKS, E. M., SHEFLIN, L. G., SPAULDING, S. W. 1995. Secondary structure in the 3'-UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *Biotechniques*, 19:806-812.
- BROOKS, C. L. 2012. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocrine reviews*, 33(4), 504-525.
- BUCK, K. A. T. R. I. N., VANEK, M. I. R. K. A., GRONER, B. E. R. N. D. & BALL, R. K. 1992. Multiple forms of prolactin receptor messenger ribonucleic acid are specifically expressed and regulated in murine tissues and the mammary cell line HC11. *Endocrinology*, 130(3), 1108-1114.
- BUCKLEY, A. R., RAO, Y. P., BUCKLEY, D. J. and GOUT, P. W. 1994. Prolactin-induced phosphorylation and nuclear translocation of MAP kinase in Nb2 lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204: 1158-1164.
- BUTEAU, H., PEZET, A., FERRAG, F., PERROT-APPLANAT, M., KELLY, P. A., EDERY, M. 1998. N-glycosylation of the prolactin receptor is not required for activation of genetranscription but is crucial for its cell surface targeting. *Mol. Endocrinol.*, 12:544-55.
- CAMPBELL, G. S., ARGETSINGER, L. S., IHLE, J. N., KELLY, P. A., RILLEMA, J. A. and CARTER-SU, C. 1994. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5232-5236.
- CAMPBELL-BURK, S. and CARPENTER, J. W. 1995. Refolding and purification of Ras proteins. *Methods Enzymol.*, 255: 3-13.
- CANBAY, E., DEGERLI, N., GULLUOGLU, B. M., KAYA, H., SEN, M., & BARDAKCI, F. (2004). Could prolactin receptor gene polymorphism play a role

- in pathogenesis of breast carcinoma?. *Current medical research and opinion*, 20(4), 533-540.
- CARTER-SU, C. and SMIT, L. S. 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 53: 61–82.
- CHANG WP, YE Y, AND CLEVENGER CV. Stoichiometric structurefunction analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras. *Mol Cell Biol* 18: 896–905, 1998
- CLAPP, C., MARTIAL, J. A., GUZMAN, R. C., RENTIER-DELURE, F., & WEINER, R. I. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 133(3), 1292-1299.
- CLARKE, D. L., LINZER, D. I. 1993. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology*, 133:224-32.
- CLEVENGER, C. V. and KLINE, J. B. 2001. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus*, 10:706-18
- CLEVENGER, C. V., TORIGOE, T. and REED, J. C. 1994. Prolactin induces rapid phosphorylation and activation of prolactin receptor-associated RAF-1 kinase in a T-cell line. *J. Biol. Chem.*, 269: 5559–5565.
- CLEVENGER, C. V., FURTH, P. A., HANKINSON, S. E., & SCHULER, L. A. 2003. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine reviews*, 24(1), 1-27.
- COOKE, N. E., & LIEBHABER, S. A. 1995. Molecular biology of the growth hormone-prolactin gene system. *Vitamins & Hormones*, 50, 385-459.
- COOKE, N. E., COIT, D., WEINER, R. I., BAXTER, J. D., & MARTIAL, J. A. 1980. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 255(13), 6502-6510.
- COOKE, N. E., COIT, D., SHINE, J., BAXTER, J. D., & MARTIAL, J. A. 1981. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *Journal of Biological Chemistry*, 256(8), 4007-4016.
- COURTILLOT, C., CHAKHTOURA, Z., BOGORAD, R., GENESTIE, C., BERNICHTEIN, S., BADACHI, Y., JANAUD, G., AKAKPO, J. P., BACHELOT, A., KUTTENN, F., GOFFIN, V., TOURAINE, P. 2010. Characterization of two constitutively active prolactin receptor variants in a cohort of 95 women with multiple breast fibroadenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(1), 271-279.
- DAS, R. and VONDERHAAR, B. K. 1996. Activation of raf-1, MEK and MAP kinase in prolactin responsive mammary cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 40: 141–149.
- DAS, R. and VONDERHAAR, B. K. 1995a. Involvement of SHC, GRB2, SOS and RAS in prolactin signal transduction in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 13: 1139–1145.

- DAS, R. and VONDERHAAR, B. K. 1995b. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Mol. Endocrinol*, 9: 1750–1759.
- DAVIS, J. A., LINZER, D. I. 1989. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol. Endocrinol* 3:674-80.
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K., & MATTICK, J. S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*, 19(14), 4008.
- EDWARDS, G. M., WILFORD, F. H., LIU, X., HENNIGHAUSEN, L., DJIANE, J., & STREULI, C. H. 1998. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9495-9500.
- ELLENS, E. R., KITTELSON, J. D., HALL, J. A., SOWER, S. A., & SHERIDAN, M. A. 2013. Evolutionary origin and divergence of the growth hormone receptor family: insight from studies on sea lamprey. *General and comparative endocrinology*, 192, 222-236.
- ENDO, T. A., MASUHARA, M., YOKOUCHI, M., SUZUKI, R., SAKAMOTO, H., MITSUI, K., MATSUMOTO, A., TANIMURA, S., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAZAKI, T., LEONOR, N., TANIGUCHI, T., FUJITA, T., KANAKURA, Y., KOMIYA, S., and YOSHIMURA, A. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387: 921–924, 1997
- ERWIN, R. A., KIRKEN, R. A., MALABARBA, M. G., FARRAR, W. L., and RUI, H. 1995. Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. *Endocrinology* 136: 3512–3518.
- FERRAG, F., GOFFIN, V., BUTEAU, H., and KELLY, P. A. 1997. Immune function of prolactin (PRL) and signal transduction by PRL/GH/cytokine receptors: specificity, redundancy and lessons from chimaeras. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 3: 197–213.
- FERRAG, F., PEZET, A., CHIARENZA, A., BUTEAU, H., NELSON, B. H., GOFFIN, V. and KELLY, P. A. 1998. Homodimerization of IL-2 receptor beta chain is necessary and sufficient to activate Jak2 and downstream signaling pathways. *FEBS Lett.* 421: 32–36.
- FINIDORI, J. and KELLY, P. A. 1995. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases and signal transducers and activators of transcription. *J. Endocrinol*, 147: 11–23.
- FIEDOROWICZ, M. 2004. Układ prolaktynergiczny? Wytwarzanie i rola prolaktyny w mózgu. *Kosmos*, 53(3-4), 305-314.

- FORSYTH, I. A., & WALLIS, M. 2002. Growth hormone and prolactin—molecular and functional evolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(3), 291-312.
- FREEMAN, M. E., KANYICKA, B., LERANT, A., & NAGY, G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 80(4), 1523-1631.
- GERARD, G. F., POTTER, R. J., SMITH, M. D., ROSENTHAL, K., DHARIWAL, G., LEE, J. & CHATTERJEE, D. K. 2002. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic acids research*, 30(14), 3118-3129.
- GERTLER, A., & DJIANE, J. 2002. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. *Molecular genetics and metabolism*, 75(3), 189-201.
- GINSBURG, E. & VONDERHAAR, B. K. 1995. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Research*, 55(12), 2591-2595.
- GLASEL, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18(1), 62-63.
- GOFFIN, V., BOUCHARD, B., ORMANDY, C. J., WEIMANN, E., FERRAG, F., TOURAINE, P., BOLE-FEYSOT, C., MAASKANT, R. A., CLEMENT-LACROIX, P., EDERY, M., BINART, N. and KELLY, P. A. 1998. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann. NY Acad. Sci.*, 840: 498–509.
- GOFFIN, V., BINART, N., TOURAINE, P. & KELLY, P. A. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annual review of physiology*, 64(1), 47-67.
- GOUPILLE, O., DANIEL, N., BIGNON, C., JOLIVET, G., and DJIANE, J. 1997. Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxy-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for JAK2 and STAT5 activation. *Mol. Cell Endocrinol.*, 127: 155–169, 1997.
- HECKER, K. H., & ROUX, K. H. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 20(3), 478-485.
- HILTON, D. J., RICHARDSON, R. T., ALEXANDER, W. S., VINEY, E. M., WILLSON, T. A., SPRIGG, N. S., STARR, R., NICHOLSON, S. E., METCALF, D., and NICOLA, N. A. 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 114–119.
- HIRAI, J., NISHITA, M., NAKAO, N., SAITO, T. R., TANAKA M. 2013. Regulation of Prolactin Receptor Gene Expression in the Rat Choroid Plexus via Transcriptional Activation of Multiple First Exons during Postnatal Development and Lactation. *Experimental Animals*, 62(1), 49–56.

- Hu, Z. Z., & Dufau, M. L. 1991. Multiple and differential regulation of ovarian prolactin receptor messenger RNAs and their expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(1), 219-225.
- HU, Z., ZHUANG, L., DUFAU, M. L. 1996. Multiple and tissue-specific promoter control of gonadal and non- gonadal prolactin receptor gene expression,. *J. Biol. Chem.* 271:10242-6.
- HU, Z. Z., MENG, J., & DUFAU, M. L. 2001. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41086-41094.
- IHLE, J. N., WITTHUHN, B. A., QUELLE, F. W., YAMAMOTO, K., THIERFELDER, W. E., KREIDER, B., and SILVENNOINEN, O. 1994. Signalling by the cytokine receptor superfamily: Jaks and Stats. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 222–227, 1994.
- Invitrogen, Corp. 2002. High performance RT for reliability in every experiment. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/711_011003_SuperScript_bro.pdf.
- JABBOUR, H. N., CRITCHLEY, H. O., and BODDY, S.C. 1998. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 2545–2553, 1998
- KELLY, P. A., DJIANE, J., POSTEL-VINAY, M. C., & EDERY, M. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine reviews*, 12(3), 235-251.
- KINET, V., SABATEL, C., BLACHER, S., NOËL, A., MARTIAL, J. A., & STRUMAN, I. 2009. Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth. *Cancer letters*, 284(2), 222-228.
- KLINE, J. B., RYCYZYN, M. A. & CLEVINGER, C. V. 2002. Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (Δ S1PRLr) containing only one extracellular fibronectin-like domain. *Molecular Endocrinology*, 16(10), 2310-2322.
- LEBRUN, J. J., ALI, S., SOFER, L., ULLRICH, A., and KELLY, P. A. 1994. Prolactininduced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J. Biol. Chem.*, 269: 14021–14026.
- LEBRUN, J. J., ALI S, ULRICH A, and KELLY PA. Proline-rich sequencemediated JAK2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal trans transduction. *J. Biol. Chem.*, 270: 10664–10670, 1995.
- LEE, S. A., HAIMAN, C. A., BURTT, N. P., POOLER, L. C., CHENG, I., KOLONEL, L. N., PIKE MC,ALTSHULER D, HIRSCHHORN JN, HENDERSON BE, &

- STRAM, D. O. 2007. A comprehensive analysis of common genetic variation in prolactin (PRL) and PRL receptor (PRLR) genes in relation to plasma prolactin levels and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *BMC medical genetics*, 8(1), 72.
- LEE, S. H., KUNZ, J., LIN, S. H., & YU-LEE, L. Y. 2007. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer research*, 67(22), 11045-11053.
- LIANG, P. and PARDEE, A. B. 1995. Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.*, 7: 274–280.
- MANCHESTER, K. L. 1995. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*, 19(2), 208-210.
- MANCHESTER, K. L. 1996. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20(6), 968-970.
- MARIN-KUAN, M., NESTLER, S., VERGUET, C., BEZENCON, C., PIGUET, D., MANSOURIAN, R., HOLZWARTH, J., GRIGOROV, M., DELATOUR, T., MANTLE, P. and CAVIN, C., 2006. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences*, 89(1), 120-134.
- MASUHARA, M., SAKAMOTO, H., MATSUMOTO, A., SUZUKI, R., YASUKAWA, H., MITSUI, K., WAKIOKA, T., TANIMURA, S., SASAKI, A., MISAWA, H., YOKOUCHI, M., OHTSUBO, M., and YOSHIMURA, A. 1997. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239: 439–446.
- MCPHERSON, M. J., HAMES, B. D., TAYLOR, G. R. 1995. PCR 2: a practical approach. *Oxford University Press*, New York
- MOLDRUP, A., ORMANDY, C., NAGANO, M., MURTHY, K., BANVILLE, D., TRONCHE, F., KELLY, P. A. 1996. Differential promoter usage in prolactin receptor gene expression: hepatocyte nuclear factor 4 binds to and activates the promoter preferentially active in the liver. *Mol. Endocrinol.*, 10:661-71
- MOR, F., KILIÇ, M.A., OZMEN, O., YILMAZ, M., EKER, I., URAN, K., 2014. The effects of orchidectomy on toxicological responses to dietary ochratoxin A in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66: 267–275.
- MOORE, R. C., & TAKAMI, O. 1993. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the murine mammary gland long-form prolactin receptor. *Gene*, 134(2), 263-265.
- NAGANO, M. and KELLY, P. A. 1992. Absence of a putative ATP/GTP binding site in the rat prolactin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183: 610–618.
- NARAZAKI, M., FUJIMOTO, M., MATSUMOTO, T., MORITA, Y., SAITO, H., KAJITA, T., YOSHIZAKI, K., NAKA, T., and KISHIMOTO, T. 1998. Three

- distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13130–13134.
- NEMETH, E., BOLE-FEYSOT, C., and TASHIMA, L. S. 1998. Suppression subtractive hybridization (SSH) identifies prolactin stimulation of p38 MAP kinase gene expression in Nb2 T lymphoma cells: molecular cloning of rat p38 MAP kinase. *J. Mol. Endocrinol.*, 20: 151–156.
- NICHOLSON, S. E. and HILTON, D. J. 1998. The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.*, 63: 665–668.
- NIALL, H. D., HOGAN, M. L., SAUER, R., ROSENBLUM, I. Y., & GREENWOOD, F. C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 866-869.
- NOHARA, A., OHMACHI, M., KOIKE, K., JIKIHARA, H., KIMURA, A., MASUHARA, K., IKEGAMI, H., INOUE, M., MIYAKE, A. and MURATA, Y. 1997. Prolactin stimulates mitogen-activated protein kinase in human leiomyoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 473–477, 1997.
- OWERBACH, D., RUTTER, W. J., COOKE, N. E., MARTIAL, J. A. & SHOWS, T. B. 1981. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*, 212(4496), 815-816.
- PEZET, A., FAVRE, H., KELLY, P. A., and EDERY, M. 1999. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J. Biol. Chem.*, 274: 24497–24502.
- PEZET, A., FERRAG, F., KELLY, P. A. and EDERY, M. 1997. Tyrosine docking sites of the rat prolactin receptor required for association and activation of Stat5. *J. Biol. Chem.*, 272: 25043–25050.
- PICCOLETTI, R., MARONI, P., BENDINELLI, P. AND BERNELLI-ZAZZERA, A. 1994. Rapid stimulation of mitogen-activated protein kinase of rat liver by prolactin. *Biochem. J.*, 303: 429–433.
- PUJANTO, D. A., CURRY, B. J. & AITKEN, R. J. 2010. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology*, 151(3), 1269-1279.
- POSNER, B. I., KELLY, P. A., SHIU, R.P., FRIESEN, H. G. 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology*, 95:521-31.
- QI, X., YANG, X., CHEN, S., HE, X., DWEEP, H., GUO, M., CHENG, W.H., XU, W., LUO, Y., GRETZ, N. AND DAI, Q. 2014. Ochratoxin A induced early hepatotoxicity: new mechanistic insights from microRNA, mRNA and proteomic profiling studies. *Scientific reports*, 4.

- RAM, P. A. and WAXMAN, D. J. 1997. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear Jak2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 272: 17694–17702.
- RATOVONDRAHONA, D., FOURNIER, B., ODESSA, M. F., and DUFY, B. 1998. Prolactin stimulation of phosphoinositide metabolism in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243: 127–130.
- REEM, G. H., & RAY, D. W. 1999. The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP. *Journal of molecular endocrinology*, 22(3), 285-292.
- RILLEMA, J. A., CAMPBELL, G.S., LAWSON, D. M., and CARTER-SU, C. 1992. Evidence for a rapid stimulation of tyrosine kinase activity by prolactin in Nb2 rat lymphoma cells. *Endocrinology*, 131: 973–975.
- RIDDLE, O., BATES, R. W., & DYKSHORN, S. W. 1933. The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 105(1), 191-216.
- ROSE-HELLEKANT, T. A., ARENDT, L. M., SCHROEDER, M. D., GILCHRIST, K., SANDGREN, E. P., & SCHULER, L. A. 2003. Prolactin induces ER α -positive and ER α -negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene*, 22(30), 4664-4674.
- ROZAKIS-ADCOCK, M., KELLY, P. A. 1991. Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J. Biol. Chem.*, 266:16472-7.
- ROZAKIS-ADCOCK, M., KELLY, P. A. 1992. Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *J. Biol. Chem.*, 267:7428-33.
- ROZEN, S., SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.*, 132(3):365–386
- RUI, H., DJEU, J. Y., EVANS, G. A., KELLY, P. A. and FARRAR, W. L. 1992. Prolactin receptor triggering. Evidence for rapid tyrosine kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 267: 24076–24081.
- RUI, H., KIRKEN, R. A. and FARRAR, W. L. 1994. Activation of receptor-associated tyrosine kinase Jak2 by prolactin. *J. Biol. Chem.*, 269: 5364–5368.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *CSHL Press Cold Spring Harbor*, New York
- SANDRA, O., SOHM, F., DE LUZE, A., PRUNET, P., EDERY, M., & KELLY, P. A. 1995. Expression cloning of a cDNA encoding a fish prolactin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 6037-6041.
- SCHENNINK, A., TROTT J. F., MANJARIN, R., LEMAY, D.G., FREKING, B.A., HOVEY, R. C. 2015. Comparative genomics reveals tissue-specific regulation of prolactin receptor gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 54, 1–15

- SCHULER, L. A., & KESSLER, M. A. 1992. Bovine placental prolactin-related hormones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 3(9), 334-338.
- SHIROTA, M., BANVILLE, D., ALI, S., JOLICOEUR, C., BOUTIN, J. M., EDERY, M., DJIANE, J., KELLY, P. A. 1990. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol. Endocrinol.*, 4:1136-43.
- SHIU, R. P., FRIESEN, H. G. 1974a. Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem. J.*, 140:301-11.
- SHIU, R. P., FRIESEN, H. G. 1974b. Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *J. Biol. Chem.*, 249:7902-11.
- SOARES, M. J., & LINZER, D. I. 2001. Rodent prolactin family and pregnancy. In *Prolactin, Springer US*, 139-167.
- SOARES, M. J., MÜLLER, H., ORWIG, K. E., PETERS, T. J., & DAI, G. 1998. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biology of reproduction*, 58(2), 273-284.
- SORENSEN, P., and SHEFFIELD, L. G. 1997. Involvement of c-src in beta-casein expression by mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241: 710-713.
- STARR, R. and HILTON, D. J. 1998. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 30: 1081-1085.
- STREULI, C. H. 1998. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 273: 9495-9500.
- STRICKER, P., & GRUETER, R. 1928. Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la montee laiteuse. *CR Soc. Biol.*, 99(1978), 80.
- STRUMAN, I., BENTZIEN, F., LEE, H., MAINFROID, V., D'ANGELO, G., GOFFIN, V., WEINERT, R., & MARTIAL, J. A. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1246-1251.
- TANAKA, M., HAYASHIDA, Y., IGUCHI, T., NAKAO, N., SUZUKI, M., NAKAI, N., NAKASHIMA, K. 2002. Identification of a novel first exon of prolactin receptor gene expressed in the rat brain. *Endocrinology*, 143, 2080-2084.
- TANAKA, M., SUZUKI, M., KAWANA, T., SEGAWA, M., YOSHIKAWA, M., MORI, M., KOBAYASHI, M., NAKAI, N., SAITO, T. R. 2005. Differential effects of sex steroid hormones on the expression of multiple first exons including a novel first exon of prolactin receptor gene in the rat liver. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 667-673.
- TOURKINE, N., SCHINDLER, C., LAROSE, M., and HOUDEBINE, L. M. 1995. Activation of STAT factors by prolactin, interferon-gamma, growth hormones,

- and a tyrosine phosphatase inhibitor in rabbit primary mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 270: 20952–20961.
- TRUONG, A. T., DUEZ, C., BELAYEW, A., RENARD, A., PICTET, R., BELL, G. I., & MARTIAL, J. A. 1984. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *The EMBO journal*, 3(2), 429.
- TSAI-MORRIS C.H., DUFAU M., L., 2004. PRLR (Prolactin receptor). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 8(4):321-324.
- VALLONE, P. M., BUTLER, J. M. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37(2):226–231.
- WALLACE, R.B., SHAFFER, J., MURPHY, R. F., BONNER, J., HIROSE, T., ITAKURA, K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.*, 6(11):3543–3557.
- WALLIS, O. C., MAC-KWASHIE, A. O., MAKRI, G., & WALLIS, M. 2005. Molecular evolution of prolactin in primates. *Journal of molecular evolution*, 60(5), 606-614.
- WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.*, 310:384-421.
- WELSCH, C. W., & NAGASAWA, H. 1977. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Research*, 37(4), 951-963.
- WELSCH, C. W., BROWN, C. K., GOODRICH-SMITH, M., VAN, J., DENENBERG, B., ANDERSON, T. M., & BROOKS, C. L. 1979. Inhibition of mammary tumorigenesis in carcinogen-treated Lewis rats by suppression of prolactin secretion. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(5), 1211-1214.
- WILFINGER, W. W., MACKKEY, K., & CHOMCZYNSKI, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-6.
- WU, J. S., LEE, C., WU, C. C., SHIUE, Y. L. 2004. Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*, 20(11):1710–1717
- WU, T.S., YANG, J.J., WANG, Y.W., YU, F.Y. and LIU, B.H., 2016. Mycotoxin ochratoxin A disrupts renal development via a miR-731/prolactin receptor axis in zebrafish. *Toxicology Research*, 5(2), 519-529.
- YAO, X. Q., LIU, Y., TUNG, F., and DESIR, G. V. 1996. Genomic structure and regulation of Kcn1, a cGMP-gated potassium channel. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271: F37–F41.
- YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S., MADDEN, T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1):134

- YOSHIMURA, A., OHKUBO, T., KIGUCHI, T., JENKINS, N. A., GILBERT, D. J., COPELAND, N. G., HARA, T., and MIYAJIMA, A. 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosinephosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*, 14: 2816–2826.



8. EKLER

EK 1. Memeli (sıçan, fare, insan ve domuz) PRLR varyantları

Organizma	Varyant Adı	Veribankası No	Aminoasit Sayısı	Yıl-Kaynak
Sıçan	s-PRLR KF	NP_001029283.1	610	Shirota vd 1990
Sıçan	s-PRLR KF	NP_036762.1	310	Boutin vd 1988
Sıçan*	s-PRLR OF	AAA41946	412	Ali vd 1991
Fare	f-PRLR UF	NP_035299.4	608	Clarke ve Linzer 1993
Fare	f-PRLR SF1	AAA39977.1	292	Davis ve Linzer 1989
Fare	f-PRLR KF2	NP_001240711.1	303	Davis ve Linzer 1989
Fare	f-PRLR KF3	NP_001240710.1	310	Davis ve Linzer 1989
İnsan	i-PRLR UF	NP_000940.1	622	Boutin vd 1989
İnsan	i-PRLR OF	NP_001191244.1	349	Kline vd 1999
İnsan	i-PRLR-S1a	NP_001191245.1	376	Hu vd 2001
İnsan	i-PRLR-S1b	NP_001191246.1	288	Hu vd 2001
İnsan	i-PRLR-ΔS1	NP_001191246.1	521	Kline vd 2002
İnsan	i-PRLR-Δ4-SF1b	AAM11661.1	217	Trott vd 2003
İnsan	i-PRLR-Δ7/11	NP_001191247.1	268	Trott vd 2003
İnsan	i-PRLR-Δ4-Δ7/11	AAM11660.1	197	Trott vd 2003
İnsan	i-PRLR-Δ4/6 S1a		245	
İnsan	i-PRLR-S1c	ACZ04321.1	309	Pujianto vd 2010
Domuz	d-PRLR-LF	NP_001001868.1	625	Vincent vd 1997
Domuz	d-PRLR-SF	ADJ19119.1	296	Trott vd 2011

*Bu varyant hücre kültüründen elde edilmiştir.

EK 2. Memeli PRLR UF aminoasit dizileri ve homoloji düzeyleri

Sıçan, fare, domuz ve insan PRLR UF'lerinin aminoasit dizileri karşılaştırılmıştır. Proteindeki aminoasitler kodlandıkları ekzonlara göre ayrılmıştır.

Sıçan (NP_001029283) 610 aa

Fare (NP_035299) 608 aa

Domuz (NP_001001868) 625 aa

İnsan (NP_000940) 622 aa

HÜCRE DIŞI DOMAIN

Ekzon 3:

```
Sıçan      ----MPSALAF-VLLVLNISLLK
Fare       ----MSSALAY-MLLVLNISLLN
Domuz      MKENVPSTVVFILLFLNISLLN
İnsan      MKENVASATVFTLLLFLNTCLLN
           : *: .: :*.*. .**:
```

Ekzon 4:

```
Sıçan      GQSPPGKPEIHKCRSPDKETFTCWNNPGTDGGLPTNYSLTYSKE
Fare       GQSPPGKPEIHKCRSPDKETFTCWNNPGSDGGLPTNYSLTYSKE
Domuz      GQSPPGKPEIFKCRSPEKETFTCWWKPGADGGLPTNYTLTYHKE
İnsan      GQLPPGKPEIFKCRSPNKETFTCWWRPBGTDGGLPTNYSLTYHRE
           ** *****.*****:*****.**:*****:*** :*
```

Ekzon 5:

```
Sıçan      GEKTTYECPDYKTSGPNSCFFSKQYTSIWKIYIITVNATNQMGSSSSDPLYVDVTYIV
Fare       GEKNTYECPDYKTSGPNSCFFSKQYTSIWKIYIITVNATNEMGSSTSDPLYVDVTYIV
Domuz      GETFTHECPDYKTGGPNSCYFNKKHTSIWTIYIITVNATNQMGSSSSDPRYVDVTYIV
İnsan      GETLMHECPDYITGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSFSDELYVDVTYIV
           **. :***** *.*****.*.**:***: ** :*****:*** ** *****
```

Ekzon 6:

```
Sıçan      EPEPPRNLTLLEVQKLDKKTYLWVKWSPPTITDVKTGWFTMEYEIRLKPEEAEEW
Fare       EPEPPRNLTLLEVQKLDKKTYLWVKWLPPTITDVKTGWFTMEYEIRLKSEEADEW
Domuz      EPDPVNLTLLELKKPEDQKPYLWIKWLPPTLVDVRSGWLTQYEIRLQPEKTAEW
İnsan      QPDPPLELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGWFTLLYEIRLKPEKAAEW
           :*: ** :*:*:*: :*: ***:** *: :*:*:*: *****: *: **
```

Ekzon 7:

```
Sıçan      EIHFTGHQTQFKVFDLYPGQKYLQTRCKPDHGYWSRWSQESSVEMPEN
Fare       EIHFTGHQTQFKVFDLYPGQKYLQTRCKPDHGYWSRWGQEKSIPIPN
Domuz      ETHFAGQQTQFKILSLYPGQKYLQVRCKPDHGFWSSEWSPESSIQIPN
İnsan      EIHFAQQTEFKILSLHPGQKYLQVRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPS
           * ***:***:***:***:*****.*****:*** *. . :*:
```

TRANSMEMBRAN DOMAIN

Ekzon 8:

```
Sıçan      DFTLKDTTVWIIIVAILSAVICLIMVVAVALKGYS
Fare       DFTLKDTTVWIIIVAVLSAVICLIMVVAVALKGYS
Domuz      DFMSKDTTMWIFVAILSASVCLIMIWAVALKGYS
İnsan      DFTMNDTTVWISVAVLSAVICLIIVVAVALKGYS
           **::*:** ***:*****:*****:*****
```

Ekzon 3 ve 4'deki dolgu C aminoasitleri disülfid bağı yapmaktadır.

Ekzon 7'de WS motifi bulunmaktadır.

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 2. (Devamı)

HÜCRE İÇİ DOMAIN

Ekzon 9:

Sıçan MMTCIFPPVPGPKIKGFDTHLLE
 Fare MMTCIFPPVPGPKIKGFDTHLLE
 Domuz MVACILPPVPGPKIKGFDTHLLE
 İnsan MVTCIFPPVPGPKIKGFD AHLLE
 :.:*****:****
 Kutu 1

Ekzon 10:

Sıçan KGKSEELLSALGCQDFPPTSDCEDLLVEFLEVDDNEDEFLMPSHSKEYPGQGVKPTHLDLP
 Fare KGKSEELLSALGCQDFPPTSDCEDLLVEFLEVDDNEDEFLMPSHSKEYPGQGVKPTHLDLP
 Domuz KGKSEELLSALGCQDFPPTSDCEDLLVEFLEVDDSEDDQLMPAHSKEHPSQGRKPTHLDLP
 İnsan KGKSEELLSALGCQDFPPTSDYEDLLVEYLEVDDSEDDQLMSVHSKEHPSQGMKPTYLDP
 *****:*****:.*:.* ***:.* ***:.*
 Kutu 2

Sıçan DSDSGHGSYDSHSLLEKCEEPQAYPPTLHIPEITEKPENPEANIPPTVDPQST-----N
 Fare DSDSGHGSYDSHSLLEKCEEPQAYPPAFHIPEITEKPENPEANIPPTPNPQNN-----T
 Domuz DSDSGRGSCDSPSLLSEKCEPRANPPKFHTPEGIEKPGDPETNLPRPQDPQSTSVESKL
 İnsan DTDSGRGSCDSPSLLSEKCEEPQANPSTFYDPEVIEKPENPETTH--TWDPQCISMEGKI
 :.:.* ** *****:.*:.* :.: ** ***:.*:.* :.*

Sıçan PNFHVDAPKSSTWPLLP--QGHMPRSPYHSVADVCKLAGSPVNTLDSFLDKAEENVLKLKLS
 Fare PNCHTDTSKSTTWPLLP--QGHTRRSPYHSIADVCKLAGSPGDTLDSFLDKAEENVLKLKLS
 Domuz LYFHADGSKSSTWPLPQPPILHDPGSSYHNLADVGQLVLGTAGATAALLEKTDRHAFNPP
 İnsan PYFHAGGSKCSTWPLPQPS-QHNPRSSYHNITDVCELAVGPAGAPATLLNEAGKDALKSS
 *.. *:.*:**** * * *:.*:.* :.* . :.:*:.*:.* :.*:

Sıçan KALETGEEEVAK-QKGAKSFPS-DKQNTWPWLLQEKSPVYVKPPDYVEIHKVNKDGVLKLS
 Fare E--DAGEEEVAV-QEGAKSFPS-DKQNTSWPPLQEKGPVYAKPPDYVEIHKVNKDGVLKLS
 Domuz KTTETGGEGRATEQKESESFHSKTDQGTWVLLPQDKGPFVSPKPMYVEIHKVSKDGALA
 İnsan QTIKSREEGKATQREVESFHSETDQDTPWLLPQEKTPFGSAKPLDYVEIHKVNKDGALS
 : .: * * * . : ** * . * * * *: * * ** :*****.*.*:

Sıçan LFPKQRENN-QTEKPGVPETSKEYAKVSGIMDNNILVLVPDSRAQNTALLEESAKKAPPS
 Fare LLPKQRENH-QTENPGVPETSKEYAKVSGVTDNNILVLVPDSRAQNTALLEESAKKVPPS
 Domuz LLPKQQENGDRPEKAGAPETSKEYAQVSRVMDNHILVLVQDPRARNVAPFEEPTKETPPS
 İnsan LLPKQRENSGKPKPGTPENNKEYAKVSGVMDNNILVLVPDPHAKNVACFEESAKEAPPS
 *:***.* : : : *.**..*****:* : **:***** * :*:.* :** :*:.*

Sıçan FEADQSEKDLASFTATSSNRRLQLGRLDYLDPTCFMHSFH
 Fare LEQNQSEKDLASFTATSSNCRLQLGRLDYLDPTCFMHSFH
 Domuz RPQNPAAKDLAGFTTAPGHCRLPLGGLDYLDPAFGMHSFQ
 İnsan LEQNQAEKALANFTATSSKRLQLGGLDYLDPAFTHSFH
 : : * **.*: : : * ** *****: * ***:

EK 3. Sıçan *prlr* geni ekzon nükleotit dizileri**E1.1 (Promotor I: U34897.1, E1b: U34729.1)**

ACATCTTGGTGGCCAGAGCCATGGACAGTCAAAGGTATTGGGCATTTCTCCTCTGGTTAGCAAACTCAG
 TTGAGTTCTTGTGTTTCTCTCAAGAAACCAGTGGGCGGGTTAGGTAGATCCTCCAAACCTGCCCATCTCC
 CTCAGAAAACCTTAGAGCCATTCTCCCAGTACTGTGAATATTTGCTGTGCCTTGGCATACTTTTCATGGGAG
 AAGAGACAGAAGCAAAGGTTCTGTCCCTTCACGATGCCATCTCTCCGCTCAGCCTGAATCAGTCACGATAA
 TCCTCAAGGTGACTAGAAGAAAAGGAGGGGCTAGTGACCTCCGAGGAAAGAGTTTGGCAGAAGCAGCTTG
 AGGGAGACTGTTGTGATGTTTCGGCCGTCCCCTCTTGTGCGCATGCAGCTCCTACCACAGCTAACCTTTAC
 ACCTGGTGCTCTAGAGACAAAG

E1.2 (Promotor II: U34898.1, E1a: U34728.1)

GCATAGTCCCTGGCAGGTGTGTGTGAGACTCTTTTCAGGGGACTACTGTGCCAGGAGAATAAGAACAACCTTG
 CCTGGCAAAGAGGGAAGCTGACTCAAGGGGGCAAAGTCAAGCGAGCTGGATTCTAGGGAAACATAGAAGA
 GTAATCATCCAGAGAGGGGCTCTGGTGGAGCTCACTAGCCATTGACTGTTCTTTTCAGAAGTCTGGACTC
 CCTGACCTACAAGGCCTCTCAAG

E1.3 (Promotor III: U34899.1, E1c: U34731.1)

AGCTTCTTCTCAGAGACACGCGGCTGGCGACTGCGGAGCAGAGGCTAAAATCCCCAGACGCCGGGTCTTC
 TGGGCTGGGCTTTCCCGCCTTCTGTCTGTCTCACTCGCTCCTCTCCTGCGTTCTGGATTTTACACGG
 GGCTCAGGAAACAGCTTTACCTGTCTCAGAGACAGAGCTCACGTCTTTGCAGGAAGTGCACAGCCTCTGGT
 ATGGCAGACTTTTCTCTCCAGCAGAA

E1.4 (E1.4: AB071022.1)

ATTCTTAAAGCAGTCTATGGGGGGAAAAAGATTAAAATGGCCCTGATTAGATTAGCATAGCCTGCTACTT
 CCCCATCCCCCTGGGGCTGGACACCTGATGCCTGACTAGATTCTGAATAAAAACAAAGGGCGAAGTGGGTG
 CTGGAGAAGAACCTGCTGTTGGTGGATAGGGCTGTGTCAAAGACAAGGAAGTTTGTCTCAGCTGAGAGG
 CACCCTCCAAAGCACCTCATCACCTTGACCAG

E1.5

GCAGGCTGTTACTACATGTGTTGTGACTGACACCACAACCAG

E2 (E2:U34900.1)

CTAAAGGACACTTCTCTGTGAAGGTGAGCACTGCAGATGTTTTGCACATGAGCCCTGAAG

(Devamı sonraki sayfada)

EK 3. (Devamı)**E3**

ATGCCATCTGCACTTGCTTTTCGTCCTACTTGTTCTCAACATCAGCCTCCTGAAGG*

E4

GACAGTCACCACCAGGGAAACCTGAGATCCACAAATGTCGCTCTCCTGACAAGGAAACATTACCTGCTG
GTGGAATCCTGGGACAGATGGAGGACTTCCTACCAATTATTCCTGACTTACAGCAAAGAAGG

E5

AGAGAAAACCACCTACGAATGTCCAGACTACAAAACCAGCGGCCCCAACTCCTGCTTCTTTAGCAAGCAG
TACACTTCCATCTGGAAAATATATATCATCACAGTAAATGCCACGAACCAAATGGGAAGCAGTTCCTCGG
ATCCACTTTATGTGGATGTGACTTACATCG

E6

TTGAGCCAGAGCCTCCTCGGAACCTGACATTAGAAGTAAACAGCTAAAAGACAAAAAACATATCTGTG
GGTAAAATGGTCCCCACCCACCATAACTGATGTGAAAACCTGGTTGGTTTACAATGGAATATGAAATTCGA
TTAAAGCCTGAAGAAGCAGAAGAGTGGGAG

E7

ATCCATTTTACAGGTCATCAAACACAGTTTAAAGTTTTTGACCTATATCCAGGGCAAAAGTATCTTGTC
AGACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGAGAGTTCCGTTGAAATGCCAA
TG

E8

ACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTGTGGCCATTCTCTCTGCTGTCATCTGTTTGATTAT
GGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTATAG

E9

CATGATGACCTGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCATCTGCTGGAG

Altı çizili kısım translasyon başlama kodudur.

(Devamı sonraki sayfada)

EK 3. (Devamı)**E10**

AAGGGCAAGTCTGAAGAGCTGCTGAGTGCCTTGGGGTGCCAAGACTTTCCCCCTACTTCTGACTGTGAGG
 ACTTGCTGGTGGAGTTCTTAGAAGTTGATGACAATGAGGACGAGCGGCTAATGCCATCCCATTCCAAAGA
 GTATCCAGGTCAAGGTGTTAAGCCCACACACCTAGATCCCACAGTGACTCTGGTCACGGAAGCTATGAC
 AGCCATTCTCTTTTATCTGAAAAGTGTGAGGAACCCAGGCCTACCCCCCTACTTTGCACATCCCTGAGA
 TCACTGAGAAGCCAGAGAATCCTGAAGCAAATATTCCTCCCACCGTGGACCCCCAAAGCACCAACCCCCA
 TTTTCATGTAGATGCACCCAAATCTTCAACATGGCCATTACTGCCTGGCCAACACATGCCCAGATCTCCT
 TACCACAGTGTGCTGATGTGTGCAAGCTAGCCGGAAGTCCTGTGAATACACTGGACTCTTTCTTGGACA
 AAGCAGAGGAAAATGTTCTAAAGTTGTCTAAAGCCCTTGAGACTGGAGAGGAAGAAGTGGCTGAGCAAAA
 AGGGGCAAAAAGCTTCCCTTCTGACAAACAAAACACACCTTGGCCGCTGCTCCAGGAGAAAAGCCCCACT
 GTCTATGTTAAACCCCCAGATTATGTGGAGATTCACAAAGTCAACAAAGATGGAGTGCTATCATTATTCC
 CCAAGCAGAGAGAAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCTGAAACCAGTAAGGAGTATGCCAAGGT
 GTCTGGCATTACGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACACAGCGTTGCTC
 GAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAGCTGACCAATCTGAGAAAGATCTGGCCAGCTTCA
 CTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAACCTGGGTAGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCA
 CTCCTTTCACTGA

E11

ACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGGAGGATTCCAGAACTGGACA
 ATGCAGGGGAACCTTGACTACTGA

Altı çizili kısım translasyonda sonlanma kodudur.

EK 4. RNA miktar hesaplanması

$$[\text{RNA}]\mu\text{g/ml}^* = A_{260} \times \text{Seyreltme} \times 40$$

40= RNA için ortalama sönme kaysayı

Seyreltme = Seyreltme faktörü

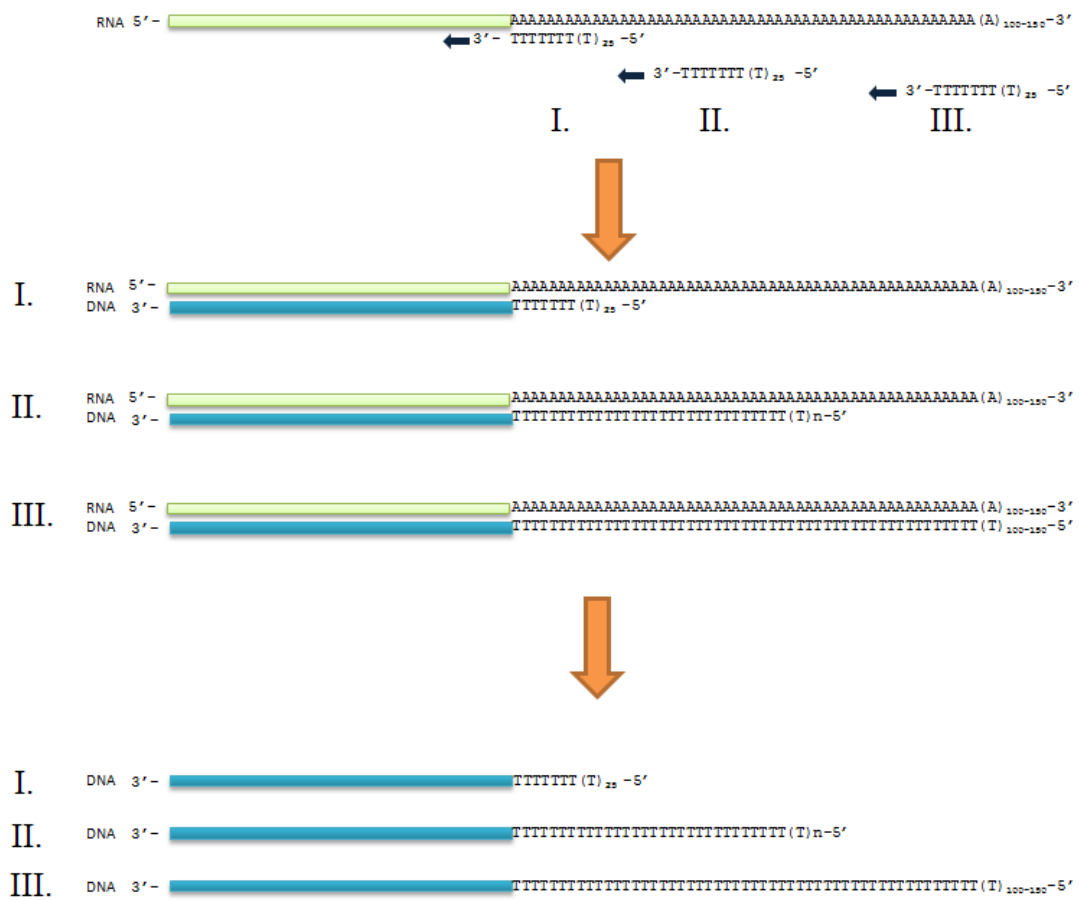
A_{260} = 260 nm dalga boyundaki absorbans

*Nükleik asit miktarı düzeyi ifade edilirken $\mu\text{g/ml}$ birimi değil, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden verilir.



EK 5. Manyetik partikül toplama tüplüğü

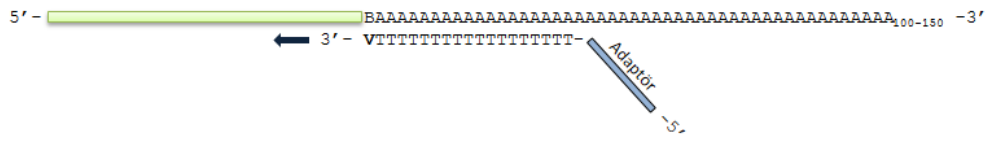
EK 6. RT-PCR, poli (T) primeri ile ilk iplik cDNA'ların elde edilmesi



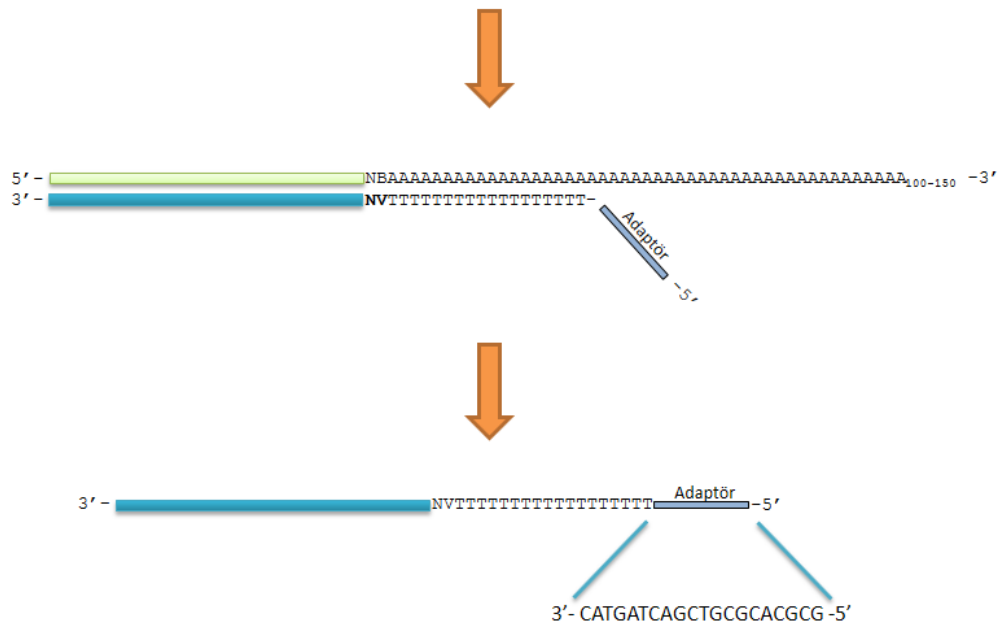
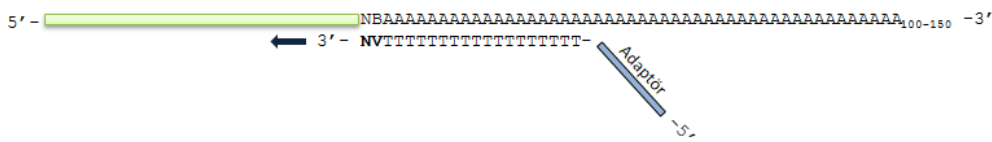
mRNA'lar 100-150 nükleotit uzunluğunda poli (A) kuyruğuna sahiptir. Kullanılan oligo (dT) primeri bu poli (A) kuyruğunun herhangi bir kısmına bağlanıp ilk iplik cDNA sentezini başlata bilmektedir. I, II ve III'de poliA kuyruğunun başlangıç bölgesine, poli (A) kuyruğunun ortalarında bir yere ve poli (A) kuyruğunun sonlarına bağlanması ile oluşacak cDNA'ları gösterilmiştir.

EK 7. RT-PCR adaptör poli (T) ile ilk iplik cDNA'ların elde edilmesi ve 3' RACE PCR

I.



II.



N: A, T, G veya C nükleotitlerinden biri

V: A, G veya C nükleotitlerinden biri

B: T, G veya C nükleotitlerinden biri

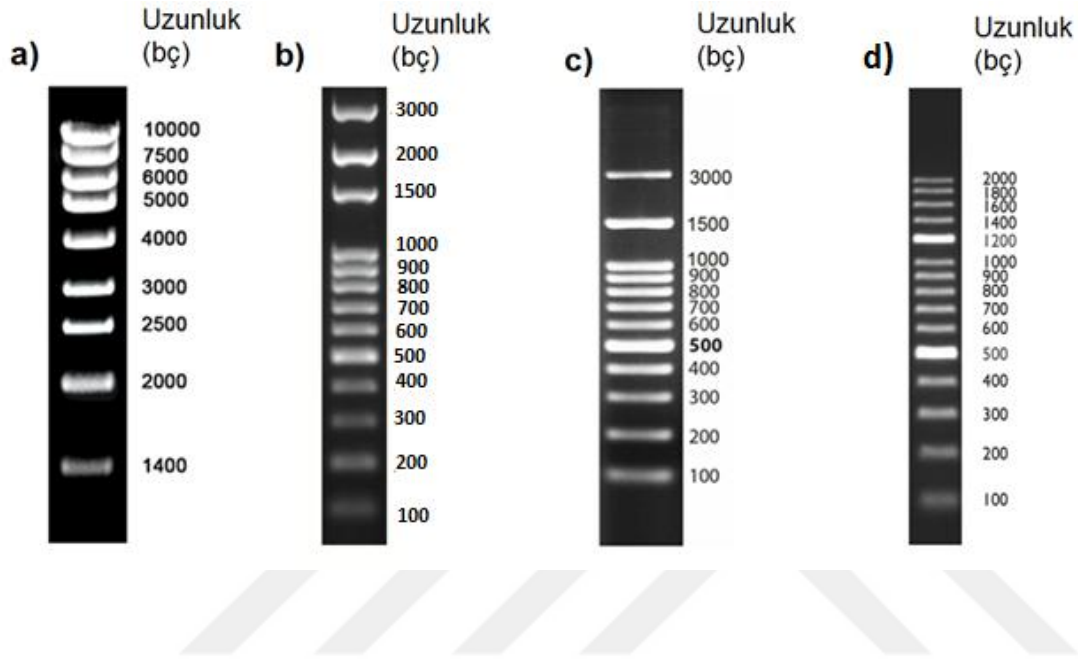
Poly_dT_Adaptor-1 (Şekilde I ile gösterilmiştir) ve Poly_dT_Adaptor-2 (Şekilde II ile gösterilmiştir) bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Sonraki basamaklarda iki primerle de aynı diziye sahip, 5' ucunda adaptör olan cDNA eldecektir.

(Devamı sonraki sayfa)

EK 7. (Devamı)



RT-PCR ile elde edilen ilk iplik cDNA, PCR reaksiyonunda özgül bir primer (F) ile çift iplikli cDNA'ya dönüştürülür. Adaptör primer (R) ile bu ikinci iplikteki özgül yere bağlanarak cDNA'nın poli (A) kuyruğuna kadar olan bölgesinin amplifikasyonunu sağlar.

EK 8. Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan DNA boyut belirteçleri

- a) Nyztech Nzydna Ladder II (MBO4301), %1 TAE Agaroz Jel,
b) Solis Bioyne 100 bp ladder, %1.5 TAE Agaroz Jel,
c) ABM (G193), %1.5 TAE Agaroz Jel,
d) Genesta™ (GA-010), %1.5 TAE Agaroz Jel.

EK 9. *prlr* gen dizileri belirlenen gemirgen türleri ve bunlara ait Gen ve Genbank kimlik numaraları

Türkçe İsim	Latince Adlandırma	Kısaltma*	Gen ID	Genbank ID
Sıçan	<i>Rattus norvegicus</i>	Rnor	24684	NC_005101.3 NC_005101.4 AC_000070.1
Fare	<i>Mus musculus</i>	Mmus	19116	NC_000081.5
Arap tavşanı	<i>Jaculus jaculus</i>	Jjac	101608275	NW_004504320.1
Kobay	<i>Cavia porcellus</i>	Cpor	100722352	NT_176390.1
Çıplak kör sıçan	<i>Heterocephalus glaber</i>	Hgla	101712151	NW_004624759.1
Çin hamstırı	<i>Cricetulus griseus</i>	Cgri	100757415	NW_003614037.1
Damara köstebek-sıçanı	<i>Fukomys damarensis</i>	Fdam	104849146	NW_011046431.1
Heybetli sıçan	<i>Mesocricetus auratus</i>	Maur	101838338	NW_004801682.1
Otuz çizgili yer sincabı	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Itri	101963701	NW_004624759.1
Kuzey Amerika geyik faresi	<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	Pman	102916130	NW_006501556.1
Galilee dağları kör köstebek sıçanı	<i>Nannospalax galili</i>	Ngal	103735901	NW_008329320.1
Çayır-tarla faresi	<i>Microtus ochrogaster</i>	Moch	102002764	NW_004949028.1
Uzun kuyruklu çinçilla	<i>Chinchilla lanigera</i>	Clan	102007036	NW_004955426.1

NCBI veri bankasından prolaktin reseptörü anahtar kelimesi ile arama yapılmış bu aramanın sonucunda elde edilen tüm kemirgen *prlr* gen dizileri bulunduranlar bu listeye dahil edilmiştir.

Gen ID: Tür için bildirilmiş *prlr* genine referans veren numara.

Genbank ID: Gene özgü dizi.

* Nükleotit dizisi karşılaştırması yapılırken yer kaplamaması açısından kullanılan kısaltmalar verilmiştir.

EK 10. Fare *prlr* ekzon 11 ve 12'nin intron sonu bölgesinin diğer kemirgenler ile karşılaştırılması

Fare *prlr* ekzon 11 önü intron kesim bölgesi

Fare	-TCATTGTGCTTTGATTGGCAG
Sıçan	-TAATTATGCCTTGATTGGCAG
Maur	ATAATT-TGCCTTGATTAGGAA
Cgri	ATAATT-TGCCTTGATTGGGAA
	* * * * *

Fare *prlr* ekzon 12 önü intron kesim bölgesi

Fare	-TTATATCTTTCTGTCTTTCAG
Sıçan	-TCATATTTGTCTGTCTTCAAG
Moch	TTTATATTTCTGTCTTTCAG
Maur	-TTATATTTGTCTATCTCCAAG
Cgri	TTTATATTTGTCTAATTCCAAG
	* * * * *

Maur: *Mesocricetus auratus*

Moch: *Microtus ochrogaster*

Cgri: *Cricetulus griseus*

Altı çizgili AG nükleotitleri intron kesim sinyalidir.

EK 11. Fare *prlr* ekzon 11 ve 12'nin bölgesinin diğer kemirgenler ile karşılaştırılması**Fare *prlr* ekzon 11 bölgesi**

Fare	GTTCAACAAGAGCAACTTGAAAATTATGTCTACTAAGAGAGGGACCAGTCCTCAGAA
Sıçan	GTTCAACAAGAGTAACCTCAAAAGTTATGCCTATTAACAGAAAGGCCAATCCTCAGAA
Maur	-TTCAAAAGAAAGAGCAACTTGAAAATTACACCTGCTAAGAGGAAGGCCAATCCTCTCAA
Cgri	-TTCAAAAGAAAGAGCAACTTGAAAATTACACCTGCTAAGAGGTAGTTTACTGAAAAATA
	**** * ***** **** * * * * * *
Fare	AGGTTTCTGCCATGTCTTTTCCAAAGGAGAAATTGTAAGATGTCCTT
Sıçan	AGTTCCCTGCCATACAGCTGATCAAAGGAGAAATTTAATGCGTCCTT
Maur	AGTTTCTTACCATGCAGTTTACTGAAAATAAATTATAAGCTGTCTTT
Cgri	AATTAAGATGTCCCTGTAAGTACAACTTTCTTCA--GCAAGAGT-
	* * * * *

Fare *prlr* ekzon 12 bölgesi

Fare	CTCTGGTGTCTATTCTCCAGTTGACTTC-CCTGGTGAAGATTCCAACAACTGAGTTTTT
Sıçan	CTCTGGTATTCTATTCTCCAGTTGACCCA-CTCCCTGGTGAAGATTCAACTAAGTTTTT
Maur	CACCTGATATTCTACCCTCCAGTTGGTCCA-CTTTATTGGTGAAGATTCAACTGGGTTTTT
Moch	CTCTGATAGTCTACCTCCAGGTGGTCCA-CTTGAATGGAGAAGATTAACTGAGTTTTT
Cgri	ATCTGATACTCTACCCTCCAGTTGATCCACTTTTACTGGTAAAGATTCAACTGAGTTTTT
	*** * ***** ** *****
Fare	ATGTGATTTATGAATATTTTCACTGCTGAAATTTCAATTTGTCTTTCTATTTTCAAG-CT
Sıçan	ATTTACTTTATGAATCTTTTCACTGCTGAAATTTTCGATTTGTCCTTCTACTTTTTAGCT
Maur	ATTTGATTTATTAATCTTTTCAATTTTGAACCTTCAGTTTGTCTGTTTTTGTCTTCCAGC
Moch	ATTTAGTTTATTCAACTTCTCGCTTTTGGCACTTCAATTTGTTTGTCTTACTTTCTGGT
Cgri	GTTTGATTTATTAATCTTTTCAATTTTGAACCTTCAGTTTGTCTGCTT-----
	* * ***** * * * * * * * * * *
Fare	CCTTGTT-
Sıçan	CCTCGTT-
Maur	TCTTTGTT
Moch	CCTTTGT-
Cgri	-----

Maur: *Mesocricetus auratus*Moch: *Microtus ochrogaster*Cgri: *Cricetulus griseus*

EK 12. F3-R9 primeri seti ile çoğaltılan bölgenin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR UF ve KF’de korunmuş olan sıçan *prlr* ekzon 3’den 9’a kadar olan ekzonları içermektedir.

F3-R9 Referans	----- ATGCCATCTGCACTTGCTTTCGTCCTACTTGTTCTCAACATCAGCCTCCTGAAGGGACAG
F3-R9 Referans	-----AACCTGAGATCCACAAATGTCGCTCTCCTGACAAGGAAACATTACCC TCACCACCAGGGAAACCTGAGATCCACAAATGTCGCTCTCCTGACAAGGAAACATTACCC *****
F3-R9 Referans	TGCTGGTGGAATCCTGGGACAGATGGAGGACTTCCTACCAATTATTCACTGACTTACAGC TGCTGGTGGAATCCTGGGACAGATGGAGGACTTCCTACCAATTATTCACTGACTTACAGC *****
F3-R9 Referans	AAAGAAGGAGAGAAAACACCTACGAATGTCCAGACTACAAAACAGTGGCCCCAACTCC AAAGAAGGAGAGAAAACACCTACGAATGTCCAGACTACAAAACAGCGGCCCACTCC *****
F3-R9 Referans	TGCTTCTTTAGCAAGCAGTACACTTCCATCTGGAAAATATATATCATCACAGTAAATGCC TGCTTCTTTAGCAAGCAGTACACTTCCATCTGGAAAATATATATCATCACAGTAAATGCC *****
F3-R9 Referans	ACGAACCAAATGGGAAGCAGTTCTCGGATCCACTTTATGTGGATGTGACTTACATCGTT ACGAACCAAATGGGAAGCAGTTCTCGGATCCACTTTATGTGGATGTGACTTACATCGTT *****
F3-R9 Referans	GAGCCAGAGCCTCCTCGGAACCTGACATTAGAAGTAAACAGCTAAAAGACAAAAAACA GAGCCAGAGCCTCCTCGGAACCTGACATTAGAAGTAAACAGCTAAAAGACAAAAAACA *****
F3-R9 Referans	TATCTGTGGGTAAATGGTCCCCACCCACCATAACTGATGTgaAAACTGGTTGGTTTACA TATCTGTGGGTAAATGGTCCCCACCCACCATAACTGATGTGAAAACCTGGTTGGTTTACA *****
F3-R9 Referans	ATGGAATATGAAATTCGATTAAAGCCTGAAGAAGCAGAAGAGTGGGAGATCCATTTTACA ATGGAATATGAAATTCGATTAAAGCCTGAAGAAGCAGAAGAGTGGGAGATCCATTTTACA *****
F3-R9 Referans	GGTCATCAAACACAGTTTAAAGTTTTTGACCTATATCCAGGGCAAAGTATCTTGTCCAG GGTCATCAAACACAGTTTAAAGTTTTTGACCTATATCCAGGGCAAAGTATCTTGTCCAG *****

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 12. (Devamı)

F3-R9
Referans
 ACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGAGAGTTCCGTTGAA
 ACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGAGAGTTCCGTTGAA

F3-R9
Referans
 ATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTGTGGCCATTCTCTCT
 ATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTGTGGCCATTCTCTCT

F3-R9
Referans
 GCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTGAA-GGGCTATAGCATGATGTCC
 GCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTATAGCATGATGACC
 ***** * ***** **

F3-R9
Referans
 TGCATCT-----
 TGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCATCTGCTGGAG

EK 13. F3-R11 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR KF bölgesinin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR KF'yi kodlamakta olup ekzon 3'den ekzon 11'e kadar olan ekzonların nükleotit dizisidir.

F3-R11	-----GAAG
Referans	ATGCCATCTGCACTTGCTTTCGTCCTACTTGTCTCAACATCAGCCTCCTGAAGGGACAG **
F3-R11	TC-ACCACCAGGGAACCTGAGACCCACAAACGTCGCCC-CCCCGACAGGAAACACTCACC
Referans	TCACCACCAGGGAACCTGAGATCCACAAATGTCGCTCTCCTGACAAGGAAACATTACCC ** * * ** ***** ***** * ** ***** *****
F3-R11	CGCCGGTGGAAATCCTGGGACAGATGGAGGACCTCCTACCAATTATTCAGTACTTACAGC
Referans	TGCTGGTGGAAATCCTGGGACAGATGGAGGACTTCTACCAATTATTCAGTACTTACAGC ** ***** *****
F3-R11	AAAGAAGGAGAGAAAACCACCTACGAATGTCCAGACTACAAAACCAGTGGCCCCAACTCC
Referans	AAAGAAGGAGAGAAAACCACCTACGAATGTCCAGACTACAAAACCAGCGGCCCACTCC *****
F3-R11	TGCTTCTTTAGCAAGCAGTACACTTCCATCTGGAAAATATATATCATCACAGTAAATGCC
Referans	TGCTTCTTTAGCAAGCAGTACACTTCCATCTGGAAAATATATATCATCACAGTAAATGCC *****
F3-R11	ACGAACCAAATGGGAAGCAGTTCCTCGGATCC--TTTATGTGGATGTGACTTACATCGTT
Referans	ACGAACCAAATGGGAAGCAGTTCCTCGGATCCACTTTATGTGGATGTGACTTACATCGTT *****
F3-R11	GAGCCAGAGCCTCCTCGGAACCTGACATTAGAAGTAAAACAGCTAAAAGACAAAAAACA
Referans	GAGCCAGAGCCTCCTCGGAACCTGACATTAGAAGTAAAACAGCTAAAAGACAAAAAACA *****
F3-R11	TATCTGTGGGTAAAATGGTCCCCACCCACCATAACTGATGTGAAAAGTGGTTGGTTTACA
Referans	TATCTGTGGGTAAAATGGTCCCCACCCACCATAACTGATGTGAAAAGTGGTTGGTTTACA *****
F3-R11	ATGGAATATGAAATTCGATTAAAGCCTGAAGAAGCAGAAGAGTGGGAGATCCATTTTACA
Referans	ATGGAATATGAAATTCGATTAAAGCCTGAAGAAGCAGAAGAGTGGGAGATCCATTTTACA *****
F3-R11	GGTCATCAAACACAGTTTAAAGTTTTTGACCTATATCCAGGGCAAAGTATCTTGTCCAG
Referans	GGTCATCAAACACAGTTTAAAGTTTTTGACCTATATCCAGGGCAAAGTATCTTGTCCAG *****

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 13. (Devamı)

F3-R11	ACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGAGAGTTCCGTTGAA
Referans	ACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGAGAGTTCCGTTGAA *****
F3-R11	ATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTGTGGCCATTCTCTCT
Referans	ATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTGTGGCCATTCTCTCT *****
F3-R11	GCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTATAGCATGATGACC
Referans	GCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTATAGCATGATGACC *****
F3-R11	TGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCATCTGCTGGAG
Referans	TGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCATCTGCTGGAG *****
F3-R11	ACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTAC-----
Referans	ACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCTGGAGGATTCCAG *****
F3-R11	-----
Referans	AAACTGGACAATGCAGGGGAACCTTGAC

EK 14. F9-R10.1 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF bölgesinin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR UF'ye ait olup ekzon 9'den ekzon 10'nun dur kodonuna kadar olan nükleotit dizisini içermektedir.

F9-R10.1 Referans	-----AAAATAAAAGGATTGATACCCA CATGATGACCTGCATCTTTCCACCAGTTCTGGGCCAAAATAAAAGGATTGATACCCA *****
F9-R10.1 Referans	TCTGCTGGAGAAGGGCAAGTCTGAAGAGCTGCTGAGTGCCTTGGGGTGCCAAGACTTTCC TCTGCTGGAGAAGGGCAAGTCTGAAGAGCTGCTGAGTGCCTTGGGGTGCCAAGACTTTCC *****
F9-R10.1 Referans	CCCTACTTCTGACTGTGAGGACTTGCTGGTGGAGTTCTTAGAAGTTGATGACAATGAGGA CCCTACTTCTGACTGTGAGGACTTGCTGGTGGAGTTCTTAGAAGTTGATGACAATGAGGA *****
F9-R10.1 Referans	CGAGCGGCTAATGCCATCCCATTCCAAAGAGTATCCAGGTCAAGGTGTTA-GCCACACA CGAGCGGCTAATGCCATCCCATTCCAAAGAGTATCCAGGTCAAGGTGTTAAGCCACACA *****
F9-R10.1 Referans	CCTAGATCCCGACAGTGACTCTGGTCACGGAAGCTATGACAGCCATTCTCTTTTATCTGA CCTAGATCCCGACAGTGACTCTGGTCACGGAAGCTATGACAGCCATTCTCTTTTATCTGA *****
F9-R10.1 Referans	AAAGTGTGAGGAACCCCAAGCCTACCCCTACTTTGCAAATCCCTGAAATCACTGAAAA AAAGTGTGAGGAACCCCAAGCCTACCCCTACTTTGCACATCCCTGAGATCACTGAGAA *****
F9-R10.1 Referans	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTCCTCCCATCGTGGACCCCCAAAGCACCAACCCAA GCCAGAGAATCCTGAAGCAAATATTCCTCCACCGTGGACCCCCAAAGCACCAACCCAA * *****
F9-R10.1 Referans	TTTTTCATGTAGATGCACCCAAATCTTCAACATGGCCATTACTGCCTGGCCAACACATGCC TTTTTCATGTAGATGCACCCAAATCTTCAACATGGCCATTACTGCCTGGCCAACACATGCC *****
F9-R10.1 Referans	CAGATCTCCTTACCACAGTGTGCTGATGTGTGCAAGCTAGCCGGAAGTCCTGTGAATAC CAGATCTCCTTACCACAGTGTGCTGATGTGTGCAAGCTAGCCGGAAGTCCTGTGAATAC *****
F9-R10.1 Referans	ACTGGACTCTTTCTTGGACAAAGCAGAGGAAAATGTTCTAAAGTTGTCTAAAGCCCTTGA ACTGGACTCTTTCTTGGACAAAGCAGAGGAAAATGTTCTAAAGTTGTCTAAAGCCCTTGA *****

N okunamayan nükleotitleri göstermektedir.

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 14. (Devamı)

F9-R10.1
Referans
GACTGGAGAGGAAGAAGTGGCTAAGCAAAAAGGGGCAAAAAGCTTCCCTTCTGACAAACA
GACTGGAGAGGAAGAAGTGGCTGAGCAAAAAGGGGCAAAAAGCTTCCCTTCTGACAAACA

F9-R10.1
Referans
AAACACACCTTGGCCGCTGCTCCAGGAGAAAAGCCCCACTGTCTATGTTAAACCCCCAGA
AAACACACCTTGGCCGCTGCTCCAGGAGAAAAGCCCCACTGTCTATGTTAAACCCCCAGA

F9-R10.1
Referans
TTATGTGGAGATTACAAAAGTCAACAAAGATGGAGTGCTATCATTATTCCTCAAGCAGAG
TTATGTGGAGATTACAAAAGTCAACAAAGATGGAGTGCTATCATTATTCCTCAAGCAGAG

F9-R10.1
Referans
AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAGTAAGGAGTATGCCAAGGT
AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAGTAAGGAGTATGCCAAGGT

F9-R10.1
Referans
GTCTGGCATTATGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC
GTCTGGCATTACGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC

F9-R10.1
Referans
AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAGCTGACCAATCTGA
AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAGCTGACCAATCTGA

F9-R10.1
Referans
GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAAGTGGGTAGGCT
GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAAGTGGGTAGGCT

F9-R10.1
Referans
GGAT-----
GGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTCCTTTCCTGA

EK 15. F9-R11UTR1.2 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR KF 3' UTR bölgesinin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR kısa forma ait olup, ekzon 9 ile ekzon 11'deki stop kodonundan sonra 440 nükleotit daha devam etmektedir.

F9-R11UTR1.2	-----AAATAAGGATTTGATACCCA
Referans	CATGATGACCTGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCA * * *
F9-R11UTR1.2	TCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGG
Referans	TCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGG *****
F9-R11UTR1.2	AGGATTCCAGAAACTGGACAATGCAGGGGAACCTTGACTACTGAAGCTGCAGACTCAAATA
Referans	AGGATTCCAGAAACTGGACAATGCAGGGGAACCTTGACTACTGAAGCTGCAGACTCAAATA *****
F9-R11UTR1.2	GGAGCCTCTCAAAATGGGTTCTACCACCATCGCAACAAATGCTGAGAACAAGACAGAAAT
Referans	GGAGCCTCTCAAAATGGGTTCTACCACCATCGCAACAAATGCTGAGAACAAGACAGAAAT *****
F9-R11UTR1.2	TTCCCAGTGCCAATAATCTAGTATCCAGGACGCCTGCCTGGTTAGACTTTAAATTTGCTC
Referans	TTCCCAGTGCCAATAATCTAGTATCCAGGACGCCTGCCTGGTTAGACTTTAAATTTGCTC *****
F9-R11UTR1.2	AATGACAAACGAGATCAGTGTTAATTGTGTTTCTTGAGCAGCTCTCGTTTGTTTTTCTCT
Referans	AATGACAAACGAGATCAGTGTTAATTGTGTTTCTTGAGCAGCTCTCGTTTGTTTTTCTCT *****
F9-R11UTR1.2	TTTGTCAGCCTCAGCCATCTGCCATCTTGATCCCTCAGTCTCACGTGGTGATATCTATCT
Referans	TTTGTCAGCCTCAGCCATCTGCCATCTTGATCCCTCAGTCTCACGTGGTGATATCTATCT *****
F9-R11UTR1.2	TTCTGTGTGTGTGTGTATCTCTGTGTGTCTCTCTGTGTCTATCTCTGTCTCTATGTGTC
Referans	TTCTGTGTGTGTGTGTATCTCTGTGTGTCTCTCTGTGTCTATCTCTGTCTCTATGTGTC *****
F9-R11UTR1.2	TCTGTTCCCTCTGTGTCTTCCTTTGTCCCTTTGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
Referans	TCTGTTCCCTCTGTGTCTTCCTTTGTCCCTTTGTGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC *****
F9-R11UTR1.2	TCTCTCTCTCTCTCTCTCACTTG-----
Referans	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAACTTGCTTCATGCTTTTCTGGGCTTGAGTGTGCT ***** **
F9-R11UTR1.2	---
Referans	TAA

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.)

EK 16. F9-Adaptör primer seti çoğaltılan s-PRLR SF'nin ait 3' UTR bölgesine ait dizileme sonucu

Referans dizi olarak literatürdeki s-PRLR KF'ye ait dizi (NM_012630.2) kullanılmıştır.

F9-Adap-1	-----AAGGGATTTGATACCCA
F9-Adap-2	-----AACATAGGGGCAAATACAGGATTTGATACCCA
Referans	CATGATGACCTGCATCTTTCCACCAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAAGGATTTGATACCCA * *****
F9-Adap-1	TCTGCTGGAGACTGGTTCTC-CAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGG
F9-Adap-2	TCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGG
Referans	TCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGG *****
F9-Adap-1	AGGATTCCAGAACTGGACAATGCAGGGGAACCTGACTACTGAAGCTGCAGACTCAAATA
F9-Adap-2	AGGATTCCAGAACTGGACAATGCAGGGGAACCTGACTACTGAAGCTGCAGACTCAAATA
Referans	AGGATTCCAGAACTGGACAATGCAGGGGAACCTGACTACTGAAGCTGCAGACTCAAATA *****
F9-Adap-1	GGAGCCTCTCAAAATGGGTCTTACCACCATCGCAACAAATGCTGAGAACAAGACAGAAAT
F9-Adap-2	GGAGCCTCTCAAAATGGGTCTTACCACCATCGCAACAAATGCTGAGAACAAGACAGAAAT
Referans	GGAGCCTCTCAAAATGGGTCTTACCACCATCGCAACAAATGCTGAGAACAAGACAGAAAT *****
F9-Adap-1	TTCCCAGTGCCAATAATCTAGTATCCAGGACGCCTGCCTGGTTAGACTTTAAATTTGCTC
F9-Adap-2	TTCCCAGTGCCAATAATCTAGTATCCAGGACGCCTGCCTGGTTAGACTTTAAATTTGCTC
Referans	TTCCCAGTGCCAATAATCTAGTATCCAGGACGCCTGCCTGGTTAGACTTTAAATTTGCTC *****
F9-Adap-1	AATGACAAACGAGATCAGTGTTAATTGTGTTTCTTGAGCAGCTCTCGTTTGTCTCTCT
F9-Adap-2	AATGACAAACGAGATCAGTGTTAATTGTGTTTCTTGAGCAGCTCTCGTTTGTCTCTCT
Referans	AATGACAAACGAGATCAGTGTTAATTGTGTTTCTTGAGCAGCTCTCGTTTGTCTCTCT *****
F9-Adap-1	TTTGTCAGCCTCAGCCATCTGCCATCTTGATCCCTCAGTCTCACGTGGTGATATCTATCT
F9-Adap-2	TTTGTCAGCCTCAGCCATCTGCCATCTTGATCCCTCAGTCTCACGTGGTGATATCTATCT
Referans	TTTGTCAGCCTCAGCCATCTGCCATCTTGATCCCTCAGTCTCACGTGGTGATATCTATCT *****
F9-Adap-1	TTCTGTGTGTGTGTATCTCTGTGTGTCTCTCTGTGTATCTCTGTCTCTATGTGTC
F9-Adap-2	TTCTGTGTGTGTGTATCTCTGTGTGTCTCTCTGTGTATCTCTGTCTCTATGTGTC
Referans	TTCTGTGTGTGTGTATCTCTGTGTGTCTCTCTGTGTATCTCTGTCTCTATGTGTC *****

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

[illegible]

EK 17. FUTR2-RUTR2 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF 3' UTR2 bölgesinin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR UF'nin 3' bulunması beklenen '3' UTR2' (1064 bp) bölgesine aittir.

FUTR2-RUTR2 Referans	-----TATTTCTGCTGCCAAGTTACAATGAG AGTATTGCTGTTTACGTATTCGAGTGAGTAGAGTAATTTCTGCTGCCAAGTTACAATGAG *****
FUTR2-RUTR2 Referans	TATTCAAAGTTGTTTCAGGGTATGCAGTCCCTGTAAACTGAAGTGCCCGGCAACCCATTG TATTCAAAGTTGTTTCAGTGTATGCAGTCCCTGTAAACTGAAGTGCCAGGCAACCCATTG *****
FUTR2-RUTR2 Referans	CCCATTGAGGAATGCAAAGTGAGGAGAAAACACCAATTGAGTACAATAGAGTAAAGTTTAT CCCATTGAGGAATGCAAAGTGAGTGAACACCAATTGAGTACAATAGAGTAAAGTTTAT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	CTGATTATTTTATCCCCAGGATACTTCAAACAGCAACCATCACTAACTTTGGGTTTGTAGA CTGATTATTTTATCCCCAGGATACTTCAAACAGCAACCATCACTAACTTTGGGTTTGTAGA *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GCTTTCTATAGACCTATTTCTCCCATGAGCTTAGGGCTCTGCCACGTATGAGTGAATCT GCTTTCTATAGACCTATTTCTCCCATGAGCTTAGGGCTCTGCCACGTATGAGTGAATCT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	CACAAACCACCATGAACAAGGATAGTGGTGGTGAATGAGGGTTTCCAAGACAGAAATCT CACAAACCACCATGAACAAGGATAGTGGTGGTGAATGAGGGTTTCCAAGACAGAAATCT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GACTTTGTTTCATTTACTTTTATCCTGAACACAAAAGGATTTTGAAGCAAAATCAAACGTC GACTTTGTTTCATTTACTTTTATCCTGAACACAAAAGGATTTTGAAGCAAAATCAAACGTC *****
FUTR2-RUTR2 Referans	AGCATCTCCTTGAATACATCCATTTGTAAGATCTTGGCAGAGGTTGTGCTTACGTCAGG AGCATCTCCTTGAATACATCCATTTGTAAGATCTTGGCAGAGGTTGTGCTTACGTCAGG *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GATGTTAAGATAAAAGTTTTAGGGAAGCAAGCATCTGCCCTGTGATAAGAACAGTTTTTAA GATGTTAAGATAAAAGTTTTAGGGAAGCAAGCATCTGCCAGTGATAAGAACAGTTTTTAA *****
FUTR2-RUTR2 Referans	AGGTCAGGGGATGGTAGAATCGGCAAGGCAAGTCCAAGGGCAGGCTTCCTGAGAAGGTTTC AGGTCAGGGGATGGTAGAATCGGCAAGGCAAGTCCAAGGGCAGGCTTCCTGAGAAGGTTTC *****

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 17. (Devamı)

FUTR2-RUTR2 Referans	AAAGCAAAGCCTTGGATCTCCAACAGCATCTATAACTCAGCTTCCTCCACTTCTCACCT AAAGCAAAGCCTTGGATCTCCAACAGCATCTATGACTCAGCTTCCTCCACTTCTCACCT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	ATTGGCAAATCAAGTCTCTCTCCTTTCACCGACTGGATGTGAAGACTGAACTCAGATCTT ATTGGCAAATCAAGTCTCTCTCCTTTCACCGACTGGATGTGAAGACTGAACTCAGATCTT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GTGACGCCAGCGTCACATGGTGGTAGAAGCAGGACTCAAAGATTCTCCAATGACTGAAA GTGACGCCAGCGTCACATGGTGGTAGAAGCAGGACTCAAAGATTCTCCAATGACTGAAA *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GGAAACCTAGAGCCAATGAACTTCCAGAACTCCCAATGCAAACAGCCCAAGCTTATATTC GGAAACCTAGAGCCAATGAACTTCCAGAACTCCAAATGCAAACAGCCCAAGCTTATATTC *****
FUTR2-RUTR2 Referans	CTAATACACAAAGTATCTTGTGAATGGCAGAAGCATTGAGAAAGATTGTCCAGGCTCAC CTAATACACAAAGTATCTTGTGAATGGCAGAAGCATTGAGAAAGATTGTCCAGGCTCAC *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GCAATACCCTGAAAGCCTCCATACTGAATGTCTAAAAACCAACTGCATCACAGGGGCACT GCAATACCCTGAAAGCCTCCATACTGAATGTCTAAGAACCAACTGCATCACAGGGGCACT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	GCTTGGGAAATTGTGTTGCAGCTTCTTAAGCTTCTTCCAAGACATACAGAAATTGGAGT GCTTGGA-AATTGTGTTGCAGCTTCTTAAGCTTCTTCCAAGACATACAGAA-TTGGAGT *****
FUTR2-RUTR2 Referans	CTGAATTTTACTGCCTTTACTCAGTTCCCAGATAATCA----- CTGAATTTTACTGCCTTTACTCAGTTCCCAGATAACTCACAGGCATGATCGAGCTGGAGA *****
FUTR2-RUTR2 Referans	----- AGCATTT

Not: Noktalı altı çizili bölgeler (Referans dizideki son 123 nükleotit) UTR2 ve UTR3 bölgesinin kesişim noktalarıdır.

EK 18. FUTR3-RUTR3 primeri seti ile çoğaltılan s-PRLR UF 3' UTR3 bölgesinin dizileme sonucu

Referans dizi; s-PRLR UF'nin 3' bulunması beklenen '3' UTR3' (1131 bç) bölgesine aittir.

FUTR3-RUTR3 Referans	-----CTTTAAGCTTTTTCGAAGACATACAGAATTGGAGTCTGA TTGGAAATTGTGTTTGCAGCTTCTTAAGCTTCTCGAAGACATACAGAATTGGAGTCTGA *****
FUTR3-RUTR3 Referans	ATTTTACTGCCTTTATTCAGTTCACAGGATGATCGAGCTGGAGAAGCA ATTTTACTGCCTTTACTCAGTTCACAGGATGATCGAGCTGGAGAAGCA *****
FUTR3-RUTR3 Referans	TTTTTTTTCTATGATCGTTTTCATGACAAATTATTTTCTCTCTGTTGCAAAGGATGAAG TTTTTTTTCTATGATCGTTTTCATGACAAATTATTTTCTCTCTGTTGCAAAGGATGAAG *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CAAGCCTATTTCACTCAAAATAAACACTGTACGTAAAGAGAAAACAAAACAAACTCTT CAAGCCTATTTCACTCAAAATAAACACTGTACGTAAAGAGAAAACAAAACAAACTCTT *****
FUTR3-RUTR3 Referans	AGTGATTTTCAGATTCACATAATGATGTAACCTATATAAAGTCACACAAGACAATGAGATG AGTGATTTTCAGATTCACATAATGATGTAACCTATATAAAGTCACACAAGACAATGAGATG *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CAAAATATACATAAACTTCCAAGAGGGTCAGTGAACCTTCACTCACCTTGAAAATCACTGA CAAAATATACATAAACTTCCAAGAGGGTCAGTGAACCTTCACTCACCTTGAAAATCACTGA *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CAAAGAAGATAAATTCCTAAGCCAGTGCAGACTAAACCTTCTTTCCCAACATAGTCTATC CAAAGAAGATAAATTCCTAAGCCAGTGCAGACTAAACCTTCTTTCCCAACATAGTCTATC *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CTAATAAATCAATGCATTTATTTACAAATCACCCTATATAAATGATAGTGCATCGCTTG CTAATAAATCAATGCATTTATTTACAAATCACCCTATATAAATGATAGTGCATCGCTTG *****
FUTR3-RUTR3 Referans	AAATTTCTAAAAATCGGCTTCAGATATATAATTTTGCAAATGTGGAAAACATGGCTGTCT AAATTTCTAAAAATCGGCTTCAGATATATAATTTTGCAAATGTGGAAAACATGGCTGTCT *****
FUTR3-RUTR3 Referans	GAAGTTGTTGCATCACAAAAATAAGTTAGCATTCACGGAAGAAAATCAAATCTACATAGT GAAGTTGTTGCATCACAAAAATAAGTTAGCATTCACGGAAGAAAATCAAATCTACATAGT *****

Not: Noktalı altı çizili bölgeler (Referans dizideki ilk 123 nükleotit) UTR2 ve UTR3 bölgesinin kesişim noktalarıdır.

(*: dizilerde ortak nükleotit uyumlarını göstermektedir.) (Devamı sonraki sayfada)

EK 18. (Devamı)

FUTR3-RUTR3 Referans	TCTACTCATTTATTGAATTTTTGTGGTCAAATATTTTCAATCTAAAGCTTGGATGAAAGA TCTACTCATTTATTGAATTTTTGTGGTCAAATATTTTCAATCTAAAGCTTGGATGAAAGA *****
FUTR3-RUTR3 Referans	AGGCATATTAGGGGTCAAGATACCTGGGTCTAGTCCTGTTTGCCTTGGAAGACCAACT AGGCATATTAGGGGTCAAGATACCTGGGTCTAGTCCTGTTTGCCTTGGAAGACCAACT *****
FUTR3-RUTR3 Referans	GCCTATTGTAGCTTTCTCTGTGTGGACCAATCATTTCTACAGCCTTTTGAAATTCAGTC GCCTATTGTAGCTTTCTCTGTGTGGACCAATCATTTCTACAGCCTTTTGAAATTCAGTC *****
FUTR3-RUTR3 Referans	TCTTTGATTCTATGGCTCAGTGAATAATCAGAACCAATCCCTTGCATCTTAATGACGTTT TCTTTGATTCTATGGCTCAGTGAATAATCAGAACCAATCCCTTGCATCTTAATGACGTTT *****
FUTR3-RUTR3 Referans	TCAGGCAATTAGGGAAACACAGAGTCACTTTCATTCATGTGCTCATCCTGCTTCGCTCTT TCAGGCAATTAGGGAAACACAGAGTCACTTTCATTCATGTGCTCATCCTGCTTCGCTCTT *****
FUTR3-RUTR3 Referans	TAAAGTCTCAGCACCCATTTGTCTTCACATACTGAACATGTATTTACATTATATGGACA TAAAGTCTCAGCACCCATTTGTCTTCACATACTGAACATGTATTTACATTATATGGACA *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CGGTGTAAGTCAGACTCTAGGATCATGTGCAAATATGTGTGCTAAGGTAAGATGTAGCAC CGGTGTAAGTCAGACTCTAGGATCATGTGCAAATATGTGTGCTAAGGTAAGATGTAGCAC *****
FUTR3-RUTR3 Referans	TAAGAAAGACACAGGAAATGAGACATAAGTCTTTAGAAAAAGTACGCTTTATGCATCAAG TAAGAAAGACACAGGAAATGAGACATAAGTCTTTAGAAAAAGTACGCTTTATGCATCAAG *****
FUTR3-RUTR3 Referans	CCATGCTCATCCTACATGTCCACGGG----- CCATGCTCATTCTTACATGGAGCCAACAGCCTCAAAGCTCTGTTCTCGTAT ***** * *

ÖZGEÇMİŞ



Mesut Cihan AYDEMİR 1991 yılında İstanbul'un Kadıköy ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2010 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.