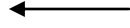


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLILAŞMIŞ PANC-1 HÜCRELERİNDE *INSIG1* GENİNİN
İNCELENMESİ**

MERYEM SEMA AYAZ

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ FEYZA NUR TUNCER KILINÇ**

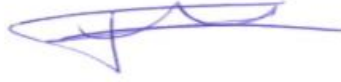
**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Meryem Sema AYAZ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur TUNCER KILINÇ'ın danışmanlığında hazırlanan "**Farklılaşmış PANC-1 Hücrelerinde INSIG1 Geninin İncelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11.09.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur TUNCER KILINÇ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Dr. Öğr. Üyesi Mehveş PODA
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Zeynep DOĞUSAN YAMALIOĞLU
İst. Yeni Yüzyıl Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Meryem Sema AYAZ



İTHAF

“Annem’e ve Babam’a ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, cesaret vererek tez çalışmamın bu aşamaya gelmesini sağlayan ve sürekli desteğini benden esirgemeyen, özellikle yoğun ilgisi ve sabrı için değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur TUNCER KILINÇ’a,

Hayatın her evresinde aşılan engellerin en büyük hediyesidir güzel insanlarla kurulan dostluklar... Yüksek lisans eğitimim süresince özellikle tez dönemimde hep yanımda olan dostluğunu her an hissettiğim sevgili Yeliz EKİCİ’ye,

Arkadaş olarak her zaman varlıklarından mutluluk duyduğum ve her konuda yardımlarını esirgemeyen, Gizem HASANOĞULLARI ve Khusan KHODZHAEV’e,

Maddi manevi destekleriyle beni her zaman motive eden ve her zaman minnettar kalacağım arkadaşlarım Şule ÇETİNER’e ve Didem TOPRAKMAN’a,

Hayatımın her evresinde yanımda olan ve yine yüksek lisans eğitimim boyunca da beni yalnız bırakmayan ve desteğini esirgemeyen kuzenlerim Arzu TAYTAN ve Özge TORLAK’a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak özellikle yüksek lisans yapmam için destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Varlığıyla ve dualarıyla her zaman yanımda olan çok değerli dedem Mehmet ESGÜN’e teşekkür ederim.

“Kişi sevdiğiyle beraberdir!” ve ben de bu felsefe ile sevdiklerimin bana olan inançları ve dualarıyla başardım. Hepiniz iyi ki varsınız. Teşekkür ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-27637

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Diyabet, Metabolik Sendrom, Obezite ve Kardiyovasküler Hastalık.....	2
2.2. PANC-1 Hücreleri	6
2.3. <i>INSIG1</i> Geni.....	8
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	14
2.5. Sanger Dizileme Yöntemi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kullanılan hücre hattı.....	22
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	22
3.1.3. Kullanılan kitler	23
3.1.4. Kullanılan cihazlar	24
3.1.5. Kullanılan veritabanları.....	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Hücre Kültürü Aşamaları:	26
3.2.2. <i>INSIG1</i> Gen Analizleri.....	29
3.2.2.1. DNA İzolasyonu.....	29
3.2.2.2. RNA İzolasyonu.....	30
3.2.2.3. Nükleik Asit Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	31

3.2.2.4. cDNA SENTEZİ	31
3.2.3. Primer Tasarımı.....	32
3.2.3.1. <i>INSIG1</i> gen dizilemesi için primer tasarımı.....	32
3.2.3.2. <i>INSIG1</i> ekspresyon tespiti için primer tasarımı	35
3.2.3.3. UPL Prob RT-PZR Primer Tasarımı.....	37
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
3.2.4.1. ZymoTaq Premix PZR	41
3.2.4.2. cDNA Sentezi Kontrolü ve PZR Ürün Analizi	42
3.2.4.3. SYBR Green I Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR.....	42
3.2.4.4. PZR Verim Hesaplama	44
3.2.4.5. UPL Prob Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	44
3.2.4.6. İstatistiksel Analiz.....	45
3.2.5. Sanger Dizileme Yöntemi	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Konvansiyonel ve Touchdown PZR çıktıları.....	46
4.2. Gen anlatım düzeylerinin tespiti ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	47
4.2.1. SYBR Green I kRT-PZR Anlatımı	48
4.2.2. UPL Prob kRT-PZR Anlatımı.....	50
4.2.2.1. PZR Verim Hesaplama	50
4.3. <i>INSIG1</i> DNA Dizi Analizi	53
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	62
HAM VERİLER	68
FORMLAR	69
ETİK KURUL KARARI	70
PATENT HAKKI İZNİ	71
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	72
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	22
Tablo 3-2. Kullanılan kitler ve markaları	23
Tablo 3-3. Kullanılan cihazlar	24
Tablo 3-4. Kullanılan elektronik veritabanları ve bilgisayar programları	25
Tablo 3-5. cDNA sentez protokolü	31
Tablo 3-6. INSIG1 genine ait farklı transkriptlerin ortak bölgelerini kapsayan, ekzon ve intron bölgelerini de içeren primerler	33
Tablo 3-7. <i>INSIG1</i> genine ait, kRT-PZR için kullanılan primerler	36
Tablo 3-8. RT-PZR SYBR Green I için kullanılan referans genlere ait primerler	36
Tablo 3-9. UPL Prob RT-PZR için kullanılan primer [#48 (cat. no. 04688082001)]	37
Tablo 3-10. Uygulanan MyTaq Red PZR Protokolü	39
Tablo 3-11. Uygulanan Touch-down PZR Protokolü	40
Tablo 3-12. Uygulanan Biolabs Taq DNA Polimeraz PZR Protokolü	40
Tablo 3-13. Uygulanan ZymoTaq Premix PZR Protokolü	41
Tablo 3-14. Uygulanan kRT-PZR Protokolü	43
Tablo 3-15. Uygulanan RT-PZR, UPL Probe Protokolü	44
Tablo 3-16. kRT-PZR rölatif kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu	45
Tablo 4-1. INSIG1 kRT-PZR ile ekspresyon miktarının istatistiksel analizleri	51
Tablo 4-2. <i>INSIG1</i> gen taramasında saptanan varyantların listesi	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. PANC-1 hücre hattının ışık mikroskobu altında görüntüsü gösterilmektedir. (A) Yeni ekilmiş hücrelerin ışık mikroskobu (10X) altındaki görüntüsü; (B) Konfluent (Confluent) PANC-1 hücrelerinin 10X ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	7
Şekil 2-2. <i>INSIG1</i> geninin 7. kromozom üzerindeki yeri gösterilmiştir [42].	8
Şekil 2-3. İnsan <i>INSIG1</i> geninin transmembran protein yapısı gösterilmektedir [38].	8
Şekil 2-4. <i>INSIG</i> gen proteinlerinin, ilişkili olduğu proteinler ile etkileşimleri gösterilmiştir [50].	10
Şekil 2-5. Sterol ile düzenlenen INSIG-SCAP-SREBP yolu [61].	11
Şekil 2-6. Hücredeki düşük ve yüksek sterole bağlı olarak INSIG-SCAP-SREBP davranışları şematize edilmesi gösterilmiştir [60].	13
Şekil 3-1. <i>INSIG1</i> genine ait transkriptlerin karşılaştırmalı olarak ortak ve farklı bölgeleri ve bu bölgeleri kapsayarak tasarlanan primerlerin yerleri gösterilmiştir.	33
Şekil 3-2. UPL prob primer tasarımı	37
Şekil 3-3. <i>INSIG1</i> UPL prob primerleri ok ile gösterilmektedir.....	38
Şekil 4-1. Konvansiyonel PZR jel görüntüleri.....	46
Şekil 4-2. Konvansiyonel PZR sonuçlarına ait jel görüntüsü	47
Şekil 4-3. Fragman 1'e ait jel görüntüsü	47
Şekil 4-4. RT-PZR SYBR Green I için kullanılan referans genlerin jel görüntüsü.....	48
Şekil 4-5. <i>INSIG1</i> geni SYBR Green I erime eğrisi analizi	48
Şekil 4-6. <i>INSIG1</i> ve <i>PPIA</i> geni SYBR Green I agaroz jel görüntüsü	49
Şekil 4-7. Değişik konsantrasyonlara sahip cDNA'ya bağlı <i>PPIA</i> verimi.....	50
Şekil 4-8. UPL Prob kantitatif RT-PZR görüntüsü.....	51
Şekil 4-9. <i>INSIG1</i> geninin belirlenen günlerde toplanan hücrelerdeki mRNA rölatif ekspresyon miktarları ve karşılaştırması.....	52
Şekil 4-10. Fragman 1'e ait dizinin T>C heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü	54
Şekil 4-11. Fragman 5'e ait dizinin NM_005542.5: c.804+37G>T heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü	54
Şekil 4-12. Fragman 6'ya ait dizinin NM_198336.3: c.419+13G>A heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü	55

Şekil 4-13. Fragman 7'ye ait dizinin NM_005542.5: c.805-16delT heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü	55
Şekil 4-14. Fragman 7'ye ait tespit edilen değişimin Mutation Taster raporu.....	56
Şekil 4-15. Fragman 7'deki NM:005542.5: c.805-16delT numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini.....	56
Şekil 4-16. . Fragman 10'a ait dizinin G>T ve G>A heterozigot değişimlerinin kromatogram görüntüsü	57



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ASCVD	Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık (Atherosclerotic cardiovascular disease)
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu (American type culture collection)
Bhlh-Zip	Temel sarmal-helezon-lösin fermuar (basic helix-loop-helix leucine zipper)
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsülfoksit
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory)
GLP-1	Glukagon benzeri peptid 1 (Glucagon-like peptide 1)
HMGR	HMG-CoA redüktaz (3-hidroksi-3 metil glutaril- koenzim A redüktaz)
IDX-1	Adacık duodenal homeobox (Islet duodenol homeobox 1)
INSIG1	İnsülin indükleyici gen 1 (Insulin induced gene 1)
INSIG2	İnsülin indükleyici gen 2 (Insulin induced gene 2)
KAH	Koroner arter hastalığı (Coronary artery disease)
KVH	Kardiyovasküler hastalık

LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Metabolik sendrom
NAFLD	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (Non-alcoholic Fatty Liver Disease)
OSAS	Obstrüktif uyku apnesi sendromu
NCEP-ATP	Ulusal Kolesterol Eğitim Programı- Erişkin Tedavi Paneli (National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel)
PANC-1	Pankreatik duktal adenokarsinom hücre hattı (Pancreatic ductal adenocarcinoma cell line)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
kRT-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PDAC	Pankreatik duktal adenokarsinom
S1P	Site 1 proteaz
S2P	Site 2 proteaz
SCAP	SRREBP klivaj aktive edici protein (SREBP cleavage-activating protein)
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
SRE	Sterol yanıtı element (Sterol response element)
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlama proteinleri (Sterol regulated element binding protein)

T1DM	Tip 1 Diyabetes Mellitus (Type 1 diabetes mellitus)
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus (Type 2 diabetes mellitus)
TG	Trigliserit
Uniprot	Evrensel protein kaynakları (Universal Protein Resources)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
QTL	Kantitatif nitelik lokusu (Quantitative Trait Locus)



ÖZET

Ayaz, M.S. Farklılaşmış PANC-1 hücrelerinde *INSIG1* geninin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018

PANC-1 hücre hattı, literatürde çoğunlukla pankreas kanserinin araştırılması ile ilişkili çalışmalarda kullanılmaktadır. İnsüline proliferatif yanıt verdiği bilinen bu hücre hattının metabolik hastalıkların açıklanmasında bir araç olarak kullanılabileceği öngörülmüş ve diyabet araştırmalarında deneysel bir model oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Bu kapsamda grubumuzda gerçekleştirilen bir önceki çalışmada PANC-1 hücreleri 14 günlük özel bir protokol ile farklılaştırılarak mikroarray analizine tabi tutulmuş ve hücre farklılaşmasının kolesterol metabolizması, lipogenez ve glikoz homeostazisi regülasyonunda rol alan *INSIG1* gen anlatımında 4 kat anlamlı değişime neden olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında ise, PANC-1 hücre hattında, uygulanan bu farklılaşma protokolünün *INSIG1* gen dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca bir önceki çalışmanın mikroarray çıktılarını doğrulamak amacıyla kantitatif RT-PZR de gerçekleştirilmiştir. Bu hedefler doğrultusunda öncelikle *INSIG1* geninin farklı transkriptlerini de kapsayacak şekilde primerler tasarlanarak bazal ve farklılaşmanın 14. gününe ait örneklerde *INSIG1* geni dizilenmiştir. Diğer bir hedef olan mikroarray çıktılarının validasyonu için ise farklılaşma protokolünün 0 ve 14. günlerinde toplanan PANC-1 hücrelerinden RNA izolasyonu yapılarak SYBR Green ve UPL Prob yöntemleri ile kantitatif RT-PZR gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizi sonucunda, farklı intronik bölgelerde beş tane tek nükleotit değişimi olmakla birlikte bir tane tek nükleotit delesyonu tespit edilmiştir. Ayrıca, kantitatif RT-PZR sonuçlarına göre mikroarray çıktıları, *INSIG1* gen anlatımının 14. güne gelindiğinde yaklaşık 4 kat az anlatım sergilediğinin tespiti ile valide edilmiştir.

Sonuç olarak, *INSIG1* geni ilk defa PANC-1 hücre hattında karakterize edilmiştir. Dizi analizi sonucuna göre, bu hücre hattında oluşan farklılaşmanın *INSIG1* gen dizisini mutasyona uğratmadığı görülmüştür. Ayrıca yapılan *INSIG1* mRNA ekspresyon analizi sonuçları ile mikroarray çıktıları valide edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : PANC-1, *INSIG1*, Farklılaşma, Sanger Dizilemesi, Metabolik Yolak

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-27637

ABSTRACT

Ayaz, M.S. Investigation of *INSIG1* gene in differentiated PANC-1 cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul. 2018

PANC-1 cell line is mainly used in studies explaining pancreatic cancer. Since this cell line was shown to have proliferative response to insulin, its use as a tool to explain metabolic diseases was planned. In this respect, our previous study involved creation of an experimental model utilizing PANC-1 cells. In this study, PANC-1 cells were differentiated by a special 14 day protocol and microarray analyses were carried out that revealed 4-fold significant change in expression of *INSIG1* gene, which is involved in cholesterol metabolism, lipogenesis and regulation of glucose homeostasis.

In this thesis, *INSIG1* gene was sequenced in the PANC-1 cell line to understand if this differentiation protocol had any effect at the DNA level. In addition, *INSIG1* mRNA expression levels were determined via quantitative RT-PCR to confirm the microarray results of the previous study. In line with these aims, *INSIG1* gene was amplified utilizing primer pairs that encompass different transcripts of the gene and that sequencing was performed on PANC-1 cells at basal level and day 14 of the differentiation protocol. For the expression analysis, cells were collected on day 0 and 14 of the differentiation protocol, followed by RNA isolation and cDNA synthesis. SYBR Green and UPL prob techniques were utilized in quantitative RT-PCR to detect relative expression of *INSIG1* in these cells.

As a result of the sequence analysis, we have detected 1 single nucleotide deletion and 5 single nucleotide changes in different intronic regions. Moreover, quantitative RT-PCR showed 4 fold decrease of *INSIG1* expression on day 14 samples, validating microarray results.

As a result, *INSIG1* was characterized first time in PANC-1 cell line. It was observed that the differentiation of the cells did not cause a change in *INSIG1* gene sequence. Moreover, *INSIG1* mRNA expression analysis confirmed microarray results.

Key Words: PANC-1, *INSIG1*, Differentiation, Sanger Sequencing, Metabolic Pathway

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2018-27637

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki kusurlardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır [1]. İnsülin, kandaki glikoz alımını iskelet kası hücreleri ve adipositler de dahil olmak üzere birçok hücrede düzenleyen ana hormondur [2]. İnsülin direnci ya da insülinin işlevinin bozulmuş olması, metabolik sendrom, obezite, tip 2 diyabet mellitus (T2DM), gestasyonel diyabet, kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ve çeşitli kanser tipleri gibi birçok medikal durum için risk faktörüdür [3-5].

Bu bağlamda, yukarıda bahsedilen hastalıklarla ilişkili olarak diyabet modeli önerisiyle başlatılan, Almanya ortaklı “Tip 1 Diyabet'in Rejeneratif Tedavisi: Pankreatik Beta-Hücre Proliferasyonuna Yönelik Yeni Teknoloji Geliştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK-INTENC (113S029) projesi kapsamında pankreas kanser hücre hattı olan PANC-1’de 14 günlük bir farklılaştırma protokol uygulanmış ve mikroarray ve yolak analizleri sonucunda hücrenin moleküler düzeyde değişimleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan, metabolizmaya ilişkin yolaklarda önemli role sahip INSIG1 gen anlatım düzeyinin PANC-1 farklılaşmasıyla 4 kat anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu bağlamda, bu tez projesi bahsi geçen TÜBİTAK-INTENC proje çıktılarını temel almaktadır. Bu doğrultuda tezin iki ana amacı bulunmaktadır. Bunlardan biri PANC-1 farklılaşmasından oluşan INSIG1 gen anlatımındaki değişimin DNA seviyesindeki etkisinin tespit edilmesi, diğeri ise mikroarray çıktılarının INSIG1 özelinde validasyonudur.

Bu amaçlar doğrultusunda, tez projesi kapsamında, farklılaştırılan PANC-1 hücreleri kullanılarak, metabolik yolaklarda önemli bir rol oynayan INSIG1 geni ilk kez bu hücrede karakterize edilmiştir. Bu kapsamda, INSIG1 geni farklı transkriptlerini kapsayacak şekilde bazal ve farklılaşmış PANC-1 hücrelerinde dizilenmiş ve mikroarray sonucu eş zamanlı kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR) ile valide edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet, Metabolik Sendrom, Obezite ve Kardiyovasküler Hastalık

Diyabet kronik, metabolik bir hastalık olarak dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen, 21. yüzyılın en büyük sağlık problemlerinden biri olarak anılmaktadır [1]. Diyabet, insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki kusurlardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Doğrudan ya da dolaylı olarak ve kişiden kişiye değişmekle birlikte, diyabet komplikasyonları arasında, kronik hiperglisemi, uzun süreli doku hasarı, ve/veya işlev bozukluğu ve farklı koronerlerin, özellikle gözlerin, böbreklerin, sinirlerin, kalp ve damarların yetmezliği gözlemlenebilmektedir [2].

Diyabet vakalarında etiyolojiye dayanarak, pankreatik adacıklarda β -hücrelerinin baskın otoimmün yıkımı sonucu mutlak insülin salgı eksikliği ile birlikte gelişen Tip 1 Diyabet (*Tip 1 Diabetes Mellitus* (T1DM)), bozulmuş insülin duyarlılığı ile birlikte β -hücre işlev bozukluğu sonucu yetersiz insülin salgısı ile gelişen Tip 2 Diyabet (*Tip 2 Diabetes Mellitus* (T2DM)), ve diğer nadir formlar olmak üzere çeşitli sınıflandırmalar yapılmaktadır [3, 4]. T2DM, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturur [4]. Bununla birlikte, T2DM'nin yaşam boyu riski, genel bir popülasyonda yaklaşık %7, her iki ebeveynin diyabetli olması durumunda yaklaşık %70 olduğu bildirilmiştir [5]. T2DM'nin oluşumu hakkında hali hazırdaki teoriler arasında kaslarda insülin indüklü glikoz alım mekanizmasının, pankreas β -hücrelerinin insülin salınım mekanizmasının, adipositlerin salgı fonksiyonunun veya karaciğerde insülin etkisinin bozulmuş olması yer almaktadır [4].

İnsülin, kandaki glikoz alımını iskelet kası hücreleri ve adipositler de dahil olmak üzere birçok hücrede düzenleyen ana hormondur [6]. Fizyolojik olarak, pankreatik β -hücreleri tarafından sürekli olarak sentezlenmekte ve bu hücrelerin vakuollerinde depolanmaktadır [7]. İnsülin, kandaki şeker seviyesinin yükselmesi ile pankreatik β -hücrelerinden sentezlenmekte ve kan dolaşımına salgılanmaktadır [7]. İnsülin aynı zamanda karaciğer ve iskelet kası hücrelerinde, dahili depolama için glikozun glikojene dönüştürülmesinde rol oynayan en önemli sinyaldir [8]. Kan glikoz seviyesindeki bir düşüş, β -hücrelerinden insülin salınımında bir azalmaya ve glikojenin

glikoza dönüşümünü uyaran α -hücrelerinden glukagon salınımında bir artışa neden olur [8]. İskelet kası, bütün vücut insülini uyarımlı glikoz alımının yaklaşık % 75'ini oluşturduğundan, bu dokudaki kusurlar, T2DM'li hastalarda glikoz homeostazında önemli bir rol oynamaktadır [6].

Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization* (WHO)) küresel raporu, diyabetle yaşayan yetişkin sayısının 1980 yılından bu yana yaklaşık dört kat artarak 422 milyon olduğunu göstermektedir [9]. Bu artış, özellikle T2DM'nin artmasına ve dolaylı olarak obeziteye yol açan faktörlerin artmasına da bağlıdır [1, 2]. Bu sonuçlara dayanarak yapılan araştırmalarda diyabetin obeziteyi indüklediği bildirilmiştir [10].

Obezite, enerji tüketimine kıyasla fazla kalori alımı nedeniyle enerji dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte; yaş ve gelişim evresi, genler ve epigenetik faktörler, fiziksel aktivite, çevre, eğitim düzeyi ve beslenme eğitimi gibi diyet dışında çoklu faktörlere bağlı, fiziksel ve psikososyal etkileşimi değiştiren çok yönlü kompleks bir hastalıktır [11]. Obezite, T2DM, kalp hastalıkları, hipertansiyon ve çeşitli kanser türleri gibi eşlik eden metabolik ve kronik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir, ve bununla birlikte artan sağlık harcamaları da ülkelerin ekonomisine büyük bir yük oluşturmaktadır [12, 13]. Bu nedenle, aşırı kiloluluk ve obezite oranlarındaki artış yaş, cinsiyet, ırk, eğitim veya ekonomik seviyeden bağımsız olarak, tüm demografik grupları büyük oranda etkileyen önemli halk sağlığı sorunu olarak sınıflandırılabilir. Dünya çapında, aşırı kilolu ve obez bireylerin daha az kilolu bireylere kıyasla daha kısa yaşam sürdürdükleri bildirilmiştir [14]. WHO verilerine göre, 2016'da 18 yaş ve üzeri 1,9 milyar yetişkinin aşırı kilolu (erkeklerin %39'u ve kadınların %40'ı) ve 650 milyondan fazla yetişkinin ise obez olduğu tespit edilmiştir [14].

Obezite sonucu oluşan biyokimyasal değişikliklerde en büyük etken, yağ doku miktarındaki artıştır. Bu artış, temelde yağ dokusu kütlesinin artışına bağlı olarak, eklemlerde yırtıklara neden olması sonucu gelişen osteoartritler, obstrüktif uyku apnesi sendromu (*obstructive sleep apnea syndrome* (OSAS)) ve bunlarla ilişkili olarak meydana gelen sosyal ve psikolojik sorunların doğmasına neden olmaktadır [15]. Bir diğer etken ise; artmış yağ dokusu hücrelerinde, patojen ürün olan adipokinlerin salınımındaki artışla meydana gelmektedir. Bu adipokinlerin başında vücut yağ miktarının kontrolünde rol alan leptin hormonu gelmektedir [16]. Lipogenez ve glukoneogenez bozulmasına bağlı olarak salgılanan adipokinler, insülin salgısını etkilemekte ve bunun sonucunda oluşan leptin direnciyle birlikte, hiperinsülinemi ve

insülin direncinin gelişmesine yol açmaktadır [16]. İnsülin direnci, obezitede yağ dokusundan artmış serbest yağ asidi salınımı ve salınan bu yağ asitlerinin karaciğer ve çizgili kasta depolanması ile ilişkilidir [16]. Artmış ve uzun süre vuku bulan insülin direncini kompanse etmek amacıyla pankreas β -hücrelerinden artmış insülin salınımının gerçekleşmesi, zamanla bu hücrelerin insülin direncine yetişememesi sonucunu doğurmakta ve insülin direncine bağlı olarak T2DM'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [16].

Obezite, tüm sosyo-ekonomik yapıları ve etnik kökenleri etkileyen ve metabolik sendrom için bir ön gereklilik oluşturan medikal bir durumdur [17]. 2001 yılında yaygın olarak kullanılan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Yetişkin Tedavi Paneli III (*National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III)) raporunda, metabolik sendrom terimi kodlanmış ve sendromun bileşenleri olarak abdominal obezite (özellikle artmış bel çevresi ölçümü), insülin direnci, hiperglisemi, yüksek trigliserit, yüksek kan basıncı, dislipidemi gibi bozuklukları içeren bir durum vurgulanmıştır [18]. Metabolik sendrom ve pre-diyabet aynı metabolik bozuklukları paylaşmaktadır [19]. İnsülin direnci ya da insülinin işlevinin bozulmuş olması, metabolik sendrom, T2DM, gestasyonel diyabet, kardiyovasküler hastalıklar (*cardiovascular disease* (KVH)) ve çeşitli kanser tipleri gibi birçok medikal durum için risk faktörüdür [19]. Abdominal obezite, insülin direnci için klinik bir belirteçtir [19]. Bunlarla beraber, insülin sinyalizasyonundaki değişiklikler, genellikle lipid homeostazındaki dengesizliklerle birlikte obezite gibi insülin direncinin gelişimine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir [19].

Metabolik sendromlu bireylerde, kardiyovasküler (ateroskleroz ve non-ateroskleroz türleri), metabolik (T2DM ve dislipidemi), hormonal (polikistik over sendromu), uykuda bozuk solunum, psikolojik sıkıntılar (depresyon), kronik böbrek hastalığı, ortopedik/eklem hastalıkları ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (*non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) gibi çok uçlu organ hasarı gelişme riski oldukça yüksektir [20]. Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde metabolik sendrom insidansı ve prevalansı artış göstermektedir [17]. Metabolik sendromla birlikte, T2DM ve KVH riskinin sırasıyla yaklaşık beş ve üç kat arttığı bildirilmiştir [17]. NCEP-ATP III 2001 kriterlerine dayanan metabolik sendrom yaygınlığı, dünya genelinde erkeklerde %8-43 ile kadınlarda %7-56 oranlarında görülme değişkenliği gösterdiği bildirilmiştir [18].

Aynı şekilde çeşitli meta-analizlere göre, metabolik sendrom sonucu oluşan KVH riskinin, kadınlarda erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir [21, 22].

Bazı araştırmalara göre, metabolik sendromun kardiyovasküler riskin artışı ile ilişkili olmasının nedeni, metabolik sendromlu hastaların çoğunda aynı zamanda T2DM olduğu yönündedir [22]. T2DM gibi, bilinen diğer risk faktörlerinin varlığında metabolik sendroma bağlı aterosklerotik kardiyovasküler hastalık (*atherosclerotic cardiovascular disease* (ASCVD)) gelişimi incelenen ve 951.083 hasta ile yapılan 87 çalışmayı içeren bir meta-analiz ile metabolik sendromun, ASCVD ve kardiyovasküler mortalite için 2 kattan daha fazla artmış risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [23].

KVH'ler dünya genelinde mortalitenin önde gelen nedenlerinden sayılmaktadır [24]. Doğrudan diyabetle ilişkili mortalite oranı yaklaşık %3'tür ve diyabetik hastalarda kardiyovasküler risk 2-4 kat daha yüksektir. Ayrıca bu hastaların çoğunun da KVH'den yaşamını kaybettiği bildirilmiştir [25]. KVH'den, kanserden veya diyabetten ölümler, tüm ölümlerin yaklaşık %65'ini oluştururken, obeziteyle birlikte bu risk yüzdesi artış göstermektedir [25]. Diyabetli erişkinlerde kalp krizi ve felç riskinin 2-3 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir [26]. Hiperlipidemi, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi diğer risk faktörlerinin varlığı koroner arter hastalığı (*coronary artery disease* (KAH)) şiddetini daha da ağırlaştırmaktadır [27].

Yukarıda bahsedildiği üzere daha geniş çerçevede bu hastalıklar ve bu hastalıkların bağlantılı olduğu diğer birçok hastalık incelendiğinde, genetik, çevresel ve sosyo-ekonomik etkileri bireyi ve toplumu olumsuz etkileyerek, bireylerin hayat standartlarını düşürmektedir. Bu bağlamda, diyabet, obezite ve metabolik sendrom gibi metabolik hastalıklar doğrudan ya da dolaylı olarak, kardiyovasküler hastalıklar, dejeneratif hastalıklar ve kanserler ile bağlantılı olduklarında, bu hastalıkların gelişimlerinin tetiklenmesi ve önlenmesine dair hücresel mekanizmaların aydınlatılması yönündeki çalışmalar önem kazanmaktadır. Gerek diyabet, gerekse obezite ve metabolik sendrom gibi kompleks hastalıkların araştırılmasında insan materyali üzerinden yapılan çalışmalar yüksek öneme sahiptir. Öte yandan, bu hastalıkların çözümlenmesinde ancak post-mortem organlar üzerinde araştırmalar yapılabilmektedir ki bu da hastalık sürecinin izlenmesine olanak sağlayamamaktadır. Bu bağlamda, insan materyalinden elde edilmiş ve ölümsüzleştirilmiş hücre hattı (*immortalized cell-line*) kullanımı ile gerçekleştirilen modellemelerde hastalığa ilişkin hücresel mekanizmaların aydınlatılması güncel deneysel yaklaşımların temelini oluşturmaktadır.

2.2. PANC-1 Hücreleri

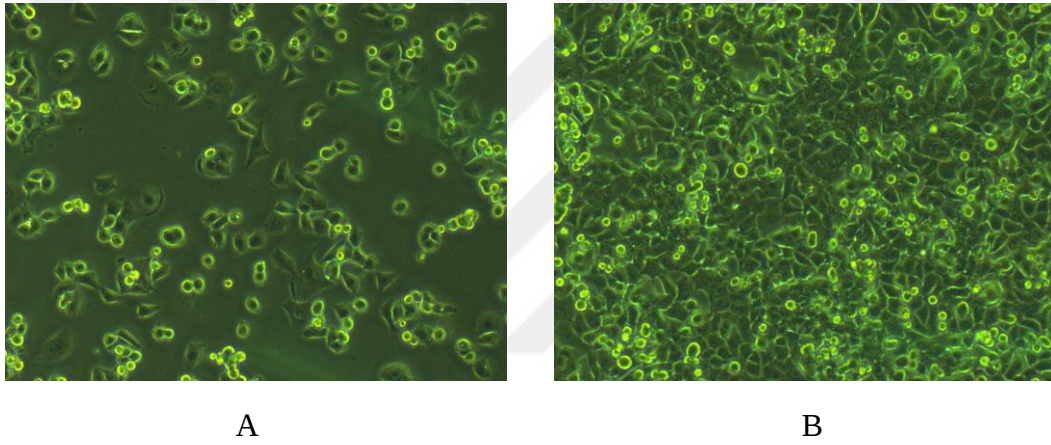
WHO sınıflamasına göre, kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer alan pankreas kanserinin, pankreasta oluşan malign ve benign tümörlerden meydana geldiği bildirilmiştir [28]. Pankreas malign tümörleri arasında en sık görülen ekzokrin karsinom tipini oluşturan duktal adenokarsinomdur. Bu adenokarsinom pankreas tümörlerinin yaklaşık % 85'ini oluştururken, adacık hücrelerinden kaynaklanan endokrin pankreaslardan türetilen tümörler pankreas tümörlerinin % 5'ini temsil etmektedir [29].

Pankreatik duktal adenokarsinomu (*pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC)), gelişmiş ülkelerde giderek artan bir oranla hastalarda gözlemlenmektedir. Pankreas kanseri daha ziyade erkeklerde görülen, ileri yaşlarda daha sık (40-85 yaş) ortaya çıkan, agresif seyirli, ölümcül kanserlerden biridir [28, 30]. Erken dönemde belirti vermediği için, çok zor tespit edilen ve çevresindeki organlara hızla yayılan hastalık, kanserin en ölümcül tiplerinden birisini oluşturmakta olup, tüm önemli kanserler arasında en düşük hayatta kalma oranına sahiptir [31]. Hemen hemen her ülkede, pankreas kanserinin beş yıllık sağ kalım oranı % 5'in altındadır [31, 32]. Küresel Kanser Gözlemevi 2012 (*Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN)) istatistik verilerine göre ülkemizde pankreatik kanser insidans oranı erkeklerde % 6,1 (10. sırada), kadınlarda % 3,1 (14. sırada); ölüm oranı ise erkeklerde % 6, kadınlarda % 2,9'dur ve dünyada 2020'de 418.000 yeni vaka ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir [33].

Pankreas kanseri olgularının %30'unun sigara kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [31]. Bununla birlikte, %5-10 arasında olguların genetik yapı ve kanser gelişimi arasında ilişki bulunmaktadır. Kronik pankreatit aile öyküsü olan kişilerde pankreas kanseri gelişme riski hayatları boyunca % 40-75 arasında olduğu bildirilmiştir [31]. Ayrıca diyabetik hastalarda pankreas kanser riski daha fazladır [31]. Bu sebeple birçok çalışmada, diyabet ve pankreas kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırmalarda pankreas kanseri hastalarının % 80 kadarının hiperglisemik veya diyabetik olduğu ve bunun pankreas kanseri taramasının erken tanısında belirgin bir ipucu olabileceği bildirilmiştir [31, 34]. İleri yaşlarda ortaya çıkan diyabetin, pankreas kanseri ile güçlü bir bağlantısı olduğu ve diyabetin pankreatik adenokarsinoma oluşumunu indüklediği gösterilmiştir [34].

Bu bağlamda, literatürde çoğunlukla pankreas kanserinin açıklanması ile ilişkili çalışmalarda genellikle kolay ulaşılabilir ve ticari olarak elde edilebilir olmasından

dolayı PANC-1 hücre hattı kullanılmaktadır. Bu hücre hattı, Kafkas kökenli, 56 yaşında bir erkek epiteliyoid karsinom hastasının pankreasından elde edilmiş ve ticari olarak ATCC'den (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA) temin edilebilmektedir. PANC-1 hücre hattı, 52 saatlik bir sürede sayıca iki katına çıkma yeteneğine sahip (Şekil 2-1). Bu hücrelerde gerçekleştirilen sitogenetik incelemeler hücrelerin, üç farklı marker kromozomu ve küçük halka kromozomu ile beraber, baskın kromozom sayısının (*modal chromosome number*) 63 olduğunu bildirilmiştir [35]. PANC-1 hipertriploid bir insan hücre hattıdır [35]. Hücrelerin çoğunluğunun (%32) kromozom sayısı 61 iken, daha az bir kısmı ise (%22) 63 kromozoma sahiptir [35]. Yüksek ploitliğe sahip (*ploidy*) hücrelerin oranı %8,5 olarak tespit edilmiştir [35].

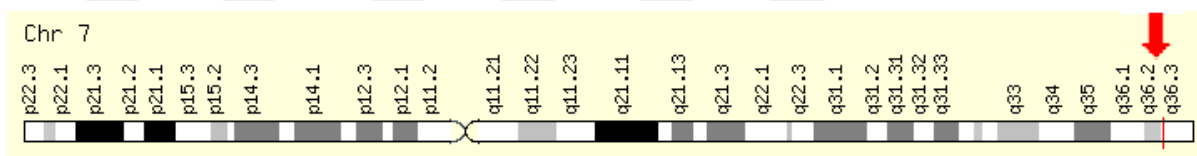


Şekil 2-1. PANC-1 hücre hattının ışık mikroskobu altında görüntüsü gösterilmektedir. (A) Yeni ekilmiş hücrelerin ışık mikroskobu (10X) altındaki görüntüsü; (B) Konfluent (*Confluent*) PANC-1 hücrelerinin 10X ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

PANC-1 hücre hattı, pankreas kanserinin açıklanması ile ilişkili çalışmalarda kullanılmasının yanı sıra, insülin etkisinin izlendiği bir takım çalışmalarda da yer almıştır. Bununla ilişkili olarak pankreatik duktal hücrelerinin, pankreas endokrin hücrelerinin üretiminde etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [36]. 2014 yılında yapılan bir çalışmada da yine bu hücre hattının insüline proliferatif yanıt verdiği bildirilmiştir [10, 37].

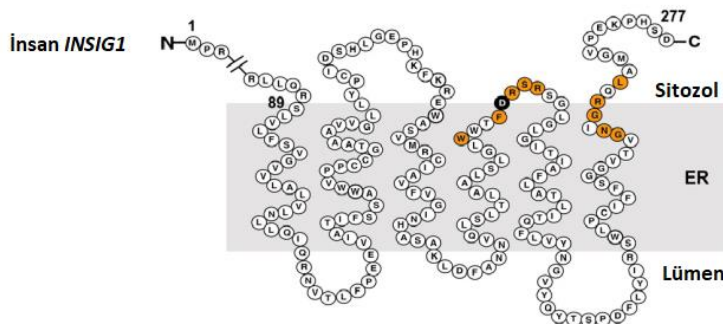
2.3. *INSIG1* Geni

INSIG gen ailesine ait (*Insulin induced gene 1 (INSG1)*) ve (*Insulin induced gene 2 (INSG2)*) genleri bulunmaktadır [38]. *INSG1* mRNA'sı ilk olarak 1991'de Mohn ve arkadaşları tarafından izole edilerek, rejenere sıçan karaciğeri ve kültürlenmiş sıçan H35 hepatom hücrelerinde insülin ile tedaviden sonra artan bir transkript olarak tanımlanmış [39, 40] ve *CL-6* olarak adlandırılmıştır [40, 41]. *CL-6*, H35 hücrelerinde insülini en fazla indükleyen gendir. Northern blot analizi ile *CL-6*'nın normal karaciğer ile böbrekte, ve ayrıca rejenere karaciğerde de eksprese olduğu gösterilmiştir. Daha sonra ilk olarak Peng ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır [40, 41]. Klonlama ile 7q36.3 kromozomuna atanma sonrasında bu gen *INSG1* olarak yeniden adlandırılmıştır [41] (Şekil 2-2).



Şekil 2-2. *INSIG1* geninin 7. kromozom üzerindeki yeri gösterilmiştir [42].

INSIG1 geni, 7. kromozomun q36.3 ile işaretli, 155.297.776 -155.310.235 baz çifti (bç) (GRCh38/hg38) arasındaki bölgeyi kapsamaktadır [42] (Şekil 2). Uzunluğu 12.460 nükleotit olan ve 277 amino asite sahip insan *INSIG1* geni son derece hidrofobiktir. Topoloji çalışmaları, proteinin çoğunun, kısa hidrofilik döngülerle ayrılmış altı transmembran helezondan oluştuğunu ileri sürmektedir [38, 43] (Şekil 2-3).

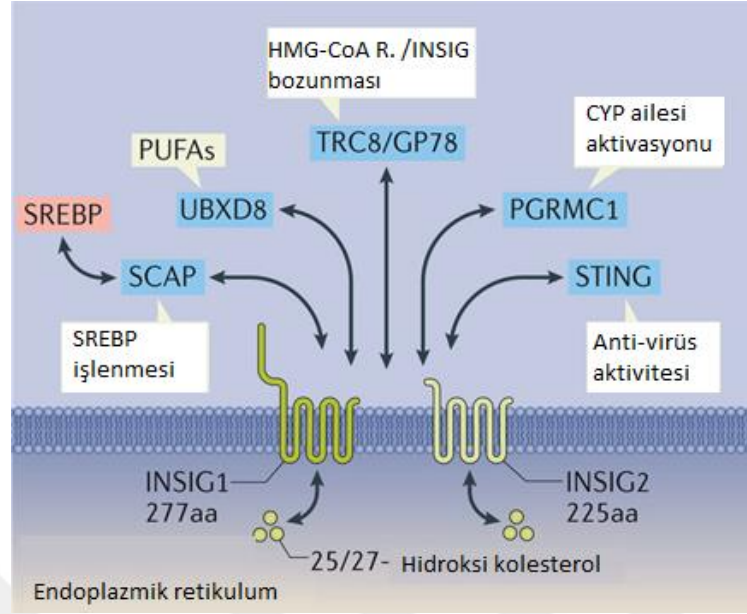


Şekil 2-3. İnsan *INSIG1* geninin transmembran protein yapısı gösterilmektedir [38].

INSIG2 geni ise, kromozom 2q14.2 üzerinde bulunur ve 225 amino asitten oluşmaktadır. NH₂ ve COOH terminal bölgelerinde bulunan kısa dizileri, iki *INSIG* geni arasındaki temel farklılıkları içerir. *INSIG2*'nin NH₂ terminal dizisi *INSIG1*'deki diziden 50 baz daha azdır. Bununla birlikte, iki proteinin membranöz bölgeleri % 85 özdeşdir [44, 45]. Bu gen, kolesterol metabolizmasını, lipogenezi ve glikoz homeostazını düzenleyen bir enzim retikulum (ER) membran proteinini kodlar. Sterol element bağlayıcı protein (*Sterol regulated element binding protein* (SREBP)), SREBP parçalanma aktive edici protein (*SREBP cleavage-activating protein* (SCAP)) ve HMG-CoA redüktaz'ın (*3-hidroksi-3 metil glutaril- koenzim A redüktaz* (HMGR)) sterol algılayan alanlarını bağlar. SCAP'nin ER tutulumunu ve HMGR'nin ubiquitin aracılı yıkımını teşvik eder [44].

Her iki *INSIG* proteini de, kolesterol yüklü SCAP'a bağlanır ve SCAP/SREBP kompleksini koruyarak SCAP/SREBP kompleksinin ER'de tutulmasına neden olabilir [44, 46]. *INSIG* proteinleri, ER zarını altı kere kapsayacak şekilde membrandan geçmektedir. Zar 4 ve 5 arasındaki sitozolik halkada bulunan *INSIG1* ve *INSIG2*'deki amino asit mutasyonunun, SCAP bağlanmasının kaybolmasına neden olduğu gösterilmiştir [43]. Her iki *INSIG* proteininde üçüncü ve dördüncü transmembran yayılımları, oksisterollerle etkileşim için gereklidir. [43] (Şekil 2-3).

Son zamanlarda *INSIG1* ve *INSIG2* gen ürünleri, kolesterol ve yağ asidi sentezinin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan ER membran proteinleri olarak tanımlanmışlardır [47] (Şekil 2-4). Yapılan çalışmalarda *INSIG1*'in hücrel kolesterolün geri bildirim düzenlemesini etkilediği gösterilmiştir [46, 47]. Kolesterol homeostazi; kolesterol seviyelerini izleyen, kolesterol biyosentezine ve alımına aracılık eden genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir geri bildirim mekanizmasıyla sağlanır [48]. Bu düzenleyici sistemin merkezinde bulunan SREBP'ler, hayvan hücrelerinde kolesterol ve yağ asitlerinin sentezini kontrol eden membrana bağlı transkripsiyon faktörlerinin bir ailesidir [48, 49]. Kolesterol ve diğer membran lipidlerinin sentezi, SREBP'lerin ER'den Golgi kompleksine kontrollü taşınmasıyla düzenlenir. SREBP'ler ER'de sentezlenir ve aktivasyonu SCAP adı verilen bir membran proteinine bağlıdır [49].



Şekil 2-4. INSIG gen proteinlerinin, ilişkili olduğu proteinler ile etkileşimleri gösterilmiştir [50].

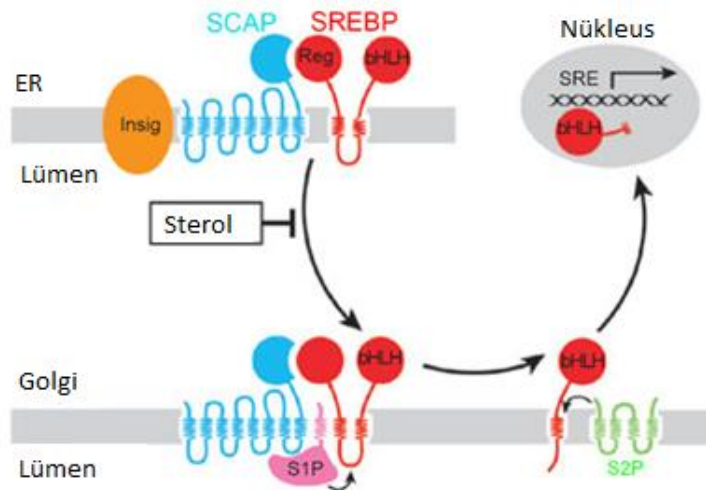
UBXD8 proteininin PUFA ile etkileşime girerek INSIG ile birlikte ubiquitasyonu sağladığı düşünülmektedir. INSIG'ler bozunma için TRC8 ile etkileşirler, SREBP aktivasyonunu düzenler.

Sterol düzenleyici element bağlama proteinleri, lipid metabolizmasını düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. SREBP'ler, asetil koenzim A (*acetyl coenzyme A (asetil CoA)*), kolesterol biyosentezi, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (*low density lipoprotein (LDLR)*), kolesterol alımı ve diğer lipid metabolizması yollarında rol alan genler ile ilişkilidirler [51]. İnsan genomunda SREBP'nin üç izoformu mevcuttur; SREBP-1a, SREBP-1c ve SREBP-2 [51, 52]. SREBP-1c yağ asidi sentezi için gerekli genleri aktive ederek, genlerin transkripsiyonunu tercihen artırmak suretiyle lipojenik yolların kontrolünü sağlarken, SREBP-1a ve SREBP-2 kolesterol sentezi için gerekli genleri aktifleştirerek, kolesterol biyosentezinde görev almaktadır [49, 51, 53].

SREBP'ler, transkripsiyon faktörlerinin temel sarmal-helezon-lösin fermuarı (*basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-Zip)*) ailesine aittir, ancak ER'ye bağlı inaktif öncül proteinler olarak sentezlendiğinden, diğer bHLH-Zip proteinlerinden farklıdır [52-54]. Diğer bHLH transkripsiyon faktörleri ile karşılaştırıldığında, SREBP'ler bHLH bölgesindeki arjinin yerine tirozin içermektedirler. Bu, SREBP'lerin, SRE'ye (Sterol yanıt elementi (*sterol response element (SRE)*)) bağlanabilmesi için

DNA bağlanma özelliklerini değiştirir. SREBP'lerin ikinci belirleyici özelliği, proteinin geniş C-terminali, ER zarında hizalanan, birbirine yakın mesafeli iki zar dizisi içermesidir. Bu, transkripsiyonal aktivasyon ve DNA bağlama alanlarını ihtiva eden N-terminal alanı membranının sitoplazmik tarafındaki C-terminal düzenleyici alanı ile yan yana koyar [48, 53]. SREBP'lerde, C-terminal bölgesi, metabolik düzenlenme sırasında ER'den Golgi aygıtına SREBP'leri taşıyan bir eşlik proteini olan SCAP ile etkileşime girer [53]. Nükleer DNA'ya erişebilmek için, SREBP'lerin veziküller içinde, proteolitik olarak işlendiği Golgi kompleksine gitmeleri gerekir [55, 56]. Bunun için SREBP'ler ile SCAP kompleks oluşturur. SCAP, SCAP/SREBP kompleksinin, Golgi kompleksine hareket eden COPII kaplı veziküllere dahil edilmesine aracılık eden COPII proteinleri için bir çekirdeklenme bölgesi gibi hareket eder [57, 58]. Sonuçta SREBP'ler Golgi'ye girdikten sonra, iki aşamalı proteolitik süreçte membrandan salınır. Golgi'de proteazların etkisi ile SREBP'nin N-terminal bölgesi C-terminal'den ayrılır. Daha sonra çekirdeğe geçen N-terminal bölgesi, kolesterol homeostazında rol oynayan HMGR ve *LDLR* genlerini transkripsiyonel olarak aktive eder [59] (Şekil 2-5).

Kolesterol homeostazı ve yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesinde, SCAP/SREBP kompleksinin ER'de kalması veya COPII vezikülleri ile Golgi'ye geçişi, doğrudan SCAP ile etkileşime giren INSIG'ler tarafından kontrol edilerek düzenlenmektedir [47, 60] (Şekil 2-5).

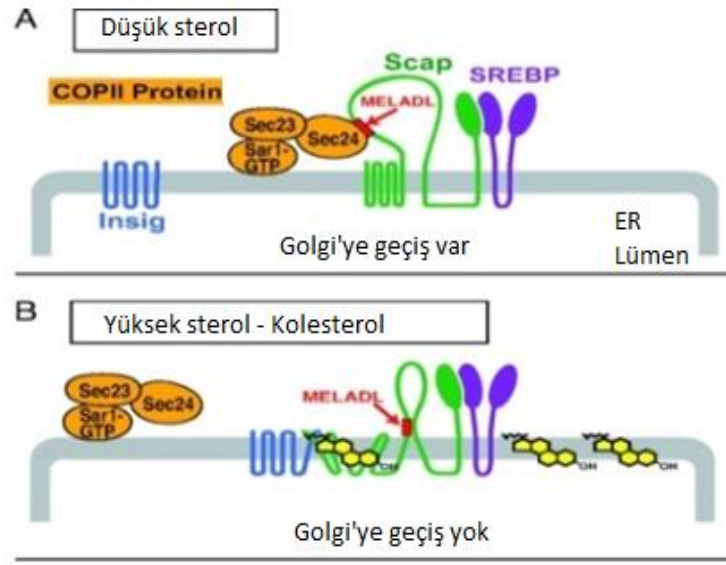


Şekil 2-5. Sterol ile düzenlenen INSIG-SCAP-SREBP yolu [61].

Hücre içi kolesterol miktarının düzenlenmesi, ER'deki kolesterol miktarının algılanması ile gerçekleşmektedir. Bu bağlamda SCAP, hem SREBP'lere eşlik eden protein, hem de sterollerin bir sensörü niteliğindedir [47].

Hücresel kolesterol seviyeleri düştüğü zaman, INSIG1, SCAP/SREBP kompleksinden ayrılır. SCAP, SREBP'nin, Golgi'de bulunan ve Site-1 serin proteaz (*site 1 protease* (S1P) [62] ve Site-2 çinko metalloproteaz (*site 2 protease* (S2P) [63] (bu iki proteaz kolesterol seviyesi düştüğü zaman SCAP tarafından aktiveleştirilir) tarafından aktivasyonu için gerekli olan SCAP/SREBP kompleksinin ER'den Golgi'ye geçişine aracılık eder. Böylece SCAP/SREBP kompleksi, COPII vezikülü ile Golgi aygıtına taşınır [64]. Golgi aygıtında iki proteaz membrandan SREBP'yi serbest bırakır. Proteazlar, SREBP'yi sırayla parçalamaktadır. Daha sonra parçalanan SREBP, hücre çekirdeğine girer ve orada bulunan genlerin önünde yer alan SRE'ye bağlanarak bu genleri aktive eder. Bu genler arasında bulunan HMGR hücre içi kolesterol üretiminin artmasına neden olur, LDLR ise kanda dolaşan LDL'nin hücrelere bağlanıp taşımakta olduğu kolesterolü hücrelere vermesini sağlar [51, 64] (Şekil 2-6 (A))

Hücresel kolesterol seviyeleri yükseldiği zaman ise, INSIG'ler, SCAP ve HMGR'ye bağlanır [65]. SCAP-INSIG bağlanması ile, SCAP/SREBP kompleksinin ER'den Golgi'ye hareketi engellenir, böylece HMGR'nin hızlı proteolitik bölünmesi [48] ve SREBP'nin transkripsiyonel aktivasyonu bloke olur. HMGR, INSIG bağlanması durumunda kolesterol sentezinde hızı sınırlayan enzimatik reaksiyonu yavaşlatarak ubiquitasyon ve bozunmayı artırır ve kolesterol sentezi azalır [59, 61]. INSIG1'den, SCAP/SREBP'yi ayırmak için ubiquitasyon gerekli değildir, ancak yeni INSIG1'in sentezi için bir gereklilik oluşturmaktadır. Yeni INSIG1 ve kolesterol SCAP'da birleştiğinde, SCAP/SREBP, INSIG1'e bağlanır ve ubiquitinasyon engellenir. INSIG1/SCAP/SREBP kompleksi, hücre tekrar sterolden yoksun bırakıldığında kurtarmaya hazır ER'de bekler [65] (Şekil 2-6 (B))



Şekil 2-6. Hücredeki düşük ve yüksek sterole bağlı olarak INSIG-SCAP-SREBP davranışları şematize edilmesi gösterilmiştir [60].

INSIG1 bağlanması, Scap'taki MELADL sıralama sinyaline COPII bağlanmasını engeller ve SREBP'lerin ER'den Golgi aygıtına taşınmasını inhibe eder.

Hücre kültürü çalışmaları, kolesterol biyosentez yolundaki HMGR ve diğer genlerin transkripsiyonunun, sterol ile düzenlenen membrana bağlı transkripsiyon faktörlerinden oluşan SREBP'lere bağlı olduğunu göstermiştir [53]. HMGR, kolesterol biyosentezinin hız sınırlandırıcı basamağında rol alır [66]. Bazı steroller biriktiğinde, enzim hızla bozunur ve böylece sterol sentezini sona erdirmeye yardımcı olur. HMGR, SREBP geninin transkripsiyonunu artırır. Bu protein, genin 5' ucunda bulunan SRE, DNA bölgesine bağlanır. SREBP inaktif durumda ER veya çekirdek zarına bağlıdır. INSIG bağlanması, SCAP ve HMGR için önemli derecede farklı sonuçlara sahiptir. Bağlanma üzerine, SCAP, ER'de tutulurken, redüktaz ubikitleşmiş ve parçalanmıştır. Bu da kolesterol sentezinin yavaşlaması ya da durmasına neden olmaktadır [66].

Bu bilgiler ışığında, kolesterol mekanizmasının aydınlatılması için farklı moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlardan transgenik farelerin karaciğerinde *INSIG1*'in aşırı eksprese edilmesiyle gerçekleştirilen bir çalışmada, nSREBP'lerin ve hedef lipojenik mRNA'ların hepsinin içeriğinin azaltılması sonucunda, nSREBP ve hedef mRNA'ların, kolesterol beslemesine tepki olarak azaldığı bildirilmiştir [61]. Sonuçta bu deneyler *INSIG1*'in aşırı eksprese edildiğinde karaciğerde hareket ettiğini

göstermiştir, ancak *INSIG1*'in normal koşullar altında bir rol oynayıp oynamadığını belirtmemiştir [61]. *INSIG1* ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda, genin karaciğer yenilenmesinde etkili olduğunu göstermekle birlikte, diyetle indüklenen obezitenin başlangıcındaki farelerde *INSIG1* geninin yağ dokusundaki anlatımının da dramatik olarak yükseldiği gösterilmiştir [67]. *In vitro* ve *in vivo* deneylerde, *INSIG1*'in aşırı ekspresyonunun lipogenezi önlediği ve preadiposit 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir [38, 47]. Aynı şekilde, preadipositlerdeki *INSIG1*'in aşırı ekspresyonu adipogenez sırasında lipid birikiminin başarısız olmasına yol açmaktadır. Preadipositlerdeki *INSIG1*'in mRNA ekspresyonundaki azalma ile trigliserit birikiminde bir artışa neden olup böylece preadipositlerin farklılaşmasını hızlandırdığı tespit edilmiştir [68].

Bu bilgilere ilaveten, SREBP1 ve *INSIG1*'in nöronal işlevlerde de etkili olduğu kortikal nöron kültüründe gerçekleştirilen bir çalışmada gösterilmiştir [69]. N -metil-D- aspartat glutamat reseptör (*N-methyl-D-aspartate glutamate receptors* (NMDAR)) aracılı SREBP1 aktivasyonunun, artan *INSIG1* bozunumundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Fokal iskemik inme sıçan modelinde, *INSIG1* uygulanmasının SREBP1 aktivasyonunu engellemediği, nöronal hasarı önemli ölçüde azalttığı ve davranışsal özellikleri iyileştirdiği gösterilmiştir [69].

Öte yandan insanlarda yapılan bir çalışmada, Çinli 705 obez çocuk ile 1325 non-obez kontrol grubu arasında SNP genotipleme yapılarak gerçekleştirilen çalışma sonucunda *INSIG1* ile aynı aileden olan *INSIG2* geninde meydana gelen nükleotit polimorfizmleri ile obeziteye yatkınlığın ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [70]. Aynı şekilde *INSIG2*'de yer alan *rs7566605*'in, 86 604 SNP arasında obezite ile ilişkili gen olduğu bildirilmiştir [71].

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonunun (*polymerase chain reaction* (PZR)) gelişimi, biyoloji ve bağlantılı olduğu birçok alanı da kapsayan etkisiyle moleküler bilimin seyrini değiştiren yeniliklerden biri olmuştur. 1985 yılında Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup [72], spesifik bir DNA parçasının *in vitro* koşullarda, yaşayan bir hücreye gerek kalmadan kopyalanması ve çoğaltılmasına olanak sağlayan basit, hızlı, etkin ve özellikle moleküler biyoloji alanında yaygın olarak

kullanılan enzimatik bir tekniktir. Bu teknik sayesinde genomun tamamı bilinmeden ve konak hücreye gerek kalmadan sadece istenilen DNA dizisinin bilinmesiyle, o DNA parçası *in vitro* olarak milyarlarca kez kopyalanabilir. PZR tekniğinin keşfinden günümüze kadar gelişen teknolojiyle birlikte pek çok PZR tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniklerden bazıları Gerçek Zamanlı PZR (RT-PCR), Touchdown PZR, Nested PZR ve Multipleks PZR dir [72, 73].

PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır:

1. Denatürasyon (*Denaturation*): Kalıp DNA, 92-95 °C’de 30 saniyeden 2 dakikaya kadar belirlenebilecek bir sürede tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [74].

2. Bağlanma (*Annealing*): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C’ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan tek iplikli haldeki DNA zincirlerinin kendilerine komplementer dizilere bağlanması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [74]. PZR’nin denatürasyon ve uzama basamaklarındaki ısılar değişmezken, bağlanma ısısı istenen DNA dizisinin AT/GC içeriğine göre değişebilmektedir.

3. Uzama (*Extesion*): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin Taq DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz enziminin 72°C’de maksimum aktiviteye sahip olduğu için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır [73, 75]. Uzamanın başlangıcı, hedef DNA’nın tek sarmalına komplementer eşleşmiş primerdir ve Taq DNA polimeraz ortamdaki dNTP’leri kullanarak bu DNA-primer eşleşmesindeki zinciri uzatır. PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır. Bu işlem genel olarak 25 ile 45 döngü olarak bu 3 adımın tekrarıyla devam eder ve yeni sentezlenen fragmanlar bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Böylelikle her döngüde çoğaltılmak istenen dizinin logaritmik (2^n ; $n=30-35$ döngü) bir artışı ile başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. PZR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamit jellerde yürütüldükten sonra gözlemlenir.

Döngü sayısı çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkilidir. Döngü sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına yol açarken, bu sayının az olması da üretilen DNA miktarının az olmasına sebep olabilmektedir.

PZR uygulamasında kullanılan kimyasallar;

dNTP: dNTP'ler (ATP, GTP, TTP, CTP) Taq DNA polimerazın substratlarıdır ve eşit konsantrasyondaki dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin karışımıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden optimum dNTP konsantrasyonunu kullanmak PZR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır. [74].

MgCl₂: Taq DNA polimeraz enzimin kofaktörüdür. Mg konsantrasyonu primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PZR sonucunda elde edilen DNA kalitesini, primer-dimer bağ oluşumlarını, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir. Ayrıca, Taq DNA polimeraz enziminin etkin bir şekilde çalışabilmesi için kalıp DNA, primerler ve nükleotit bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir [74].

Buffer: Kullanıma hazır PZR kitleri kapsamında, Taq DNA polimeraz'ın çalışması için gereken stabil pH şartlarını sağlayan özel bir solüsyondur.

Taq DNA Polimeraz: *Thermus aquaticus* adlı termofil bir bakteriden elde edilen ve PZR reaksiyonlarında kullanılan bu enzimler protein oldukları için denatüre olma riski taşırlar, ayrıca ortam şartları aktiviteleri üzerine etki eder. Bu nedenle düşük ısıda saklanmaları gerekir. Ancak düşük ısıda donacakları için denatüre olurlar. Bunu engellemek için enzim stokları gliserol içinde gelir ve -20°C'de saklanır. -80°C'de gliserol de donacağı için Taq DNA polimerazın -80°C'de saklanması tercih edilmez. Taq DNA polimerazın görevi DNA moleküllerinin komplementer bazlarla eşlenmesine yardımcı olup onların çoğaltılmasını sağlamaktır. Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün az olur. Enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilir [73].

DMSO: Kalıp DNA'nın oluşturduğu ikincil yapıları çözmektedir. Reaksiyondaki miktarının %2-10'dan fazla olması Taq polimeraz aktivitesini düşürür. Özellikle G/C açısından zengin hedef bölgelerin PZR amplifikasyonuna yardımcı olmak için kullanılır.

Betain: Genellikle DMSO ile birlikte yüksek G/C içeriğine sahip dizilerin amplifikasyonu için kullanılmaktadır. Betain, 1-1.7M DMSO ile aynı amaçla kullanılabilir [74].

PZR tekniğinin bulunmasından sonra teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PZR metotları geliştirilmiştir. Bunlardan çalışmalarımız süresince faydalandıklarımız aşağıda açıklanmaktadır:

Touchdown PZR: Uzun optimizasyonlar veya primerlerin yeniden tasarımı gerekmeksizin PZR'leri optimize etmek, özgünlüğü artırmak, hassasiyeti ve verimliliği artırmak için basit ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntem, standart PCR çalışmalarına çok benzemektedir. Bu yöntemde yüksek bağlanma ısısı ile başlanarak primerlerin spesifik diziye bağlanması amaçlanmaktadır. Bağlanma ısısı döngü sayısı ilerledikçe düşürülür ve böylece amplifiye olmaya başlayan hedef dizinin oranı arttığı için düşen ısıda artık yalnızca hedef dizi çoğalacaktır [76, 77].

Kantitatif gerçek zamanlı PZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR), hedeflenen bir DNA molekülünün amplifikasyonu ve eş zamanlı miktarını belirleyen temel laboratuvar araştırmalarında kullanılan standart bir teknik olmakla birlikte, özellikle gen anlatım (ekspresyon) analizlerinin saptanmasında önem arz etmektedir [78]. Reaksiyon, diziye özgü primerler ve her amplifikasyon döngüsü sırasında oluşan ürün miktarıyla orantılı floresan sinyal sağlayan bir DNA bağlama boyası veya probu kullanılarak gerçekleştirilir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri eş zamanlı saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemin pratik ve tercih edilebilir olmasını sağlamıştır. Ayrıca tüpler açılmadan deney tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır [78].

Amplifikasyon eğrilerinin analizi, örneklerin standart bir eğri ile kantifikasyonunu sağlar veya örnekler arasındaki nispi ekspresyon seviyelerini hesaplamak için kullanılır ve bunun için örneklerin döngü eşiği (*cycle threshold* (C_t)) değerinden yararlanılmaktadır. C_t değeri, ayarlanmış bir eşik floresan sinyal seviyesine ulaşmak için gereken döngü sayısını temsil eder. Belirlenen C_t değerini kullanarak, elde edilen verileri analiz etmek için mutlak niceleme ve göreceli niceleme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır [79, 80].

Rölatif kantifikasyon; gen ifadesindeki değişikliklerin bir referans örneğe göre belirlenerek analiz edilmesidir. Rölatif kantifikasyon, mutlak nicelleştirmeden daha kolaydır ve standart bir eğri oluşturmaya gerek olmadığı için daha az reaktif gerektirir. Rölatif kantifikasyon sırasında, hedef ve referans gen miktarları aynı şekilde belirlenir. Reaksiyondan sonra, ikili veya üçlü şekilde çalışılan her bir örneğin arasındaki C_t oranı hedef ve referans gen için hesaplanır. Referans geni herhangi bir deneysel hataya karşı verilerin normalleştirilmesinde yardımcı olur. kRT-PZR veri analizi için rölatif kantifikasyon stratejisi olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [81] (Tablo 3-16). Bu yöntem, farklı örnekler arasında göreceli gen ekspresyon seviyelerini hesaplamak için kolay bir yoldur, çünkü hesaplama için kantitatif PZR sistemi tarafından üretilen eşik döngü değerleri (C_t) doğrudan kullanılmaktadır [81, 82].

Reaksiyon esnasında elde edilen ürün aşağıda açıklanan farklı metotlarla tespit edilerek kantitiye edilebilmektedir:

Diziye Özgü Olmayan Saptama Sistemi

SYBR Green I, çift zincirli DNA'ya bağlanmak suretiyle floresan ışıma veren bir boyadır. SYBR Green boyası kullanılan yöntemde göre, floresan ışıma, çift iplikli DNA miktarıyla orantılı olarak ortaya çıkmakta ve ürün miktarı ile eş zamanlı olarak artmaktadır. Reaksiyon karışımı için çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyası kullanılmaktadır [83]. Reaksiyon; primerler bağlanıp uzama başladığı anda, SYBR Green I boyasının çift zincirli DNA'nın arasına girmesi ve floresan ışıma yayması ile gerçekleşir. Reaksiyonun ilk döngüleri sırasında, PZR ürünlerine bağlanan SYBR Green I tarafından yayılan floresan sinyali genellikle çok zayıftır. Üstel fazda, her bir döngüde floresan sinyali iki katına çıkar. 30-35 döngüden sonra, reaksiyon plato fazına geçeceğinden floresan sinyalinin yoğunluğu da genellikle azalarak son bulur. Reaksiyonun analizinin gerçekleşebilmesi için belirli bir floresan seviyesine ulaşması gerekir. Bunun için gerekli olan döngü sayısına, döngü eşiği ya da eşik değer (C_t) sayısı denir. C_t , bir numunedeki başlangıçtaki hedef miktarı ile ilişkili olduğu için, bir hedefin diğerine göre göreceli konsantrasyonu, döngü sayısındaki farka yansır ($\Delta C_t = C_{t\text{örnek}} - C_{t\text{referans}}$). Analiz göreceli nicelleştirmeye dayandığından deney kontrol örneği de içermelidir. Normalizasyon için analiz edilecek gen ile birlikte bir *housekeeping* gen de amplifiye edilmelidir [84].

Diziye Özgü Belirleme Sistemi

UPL prob

DNA parçasının istenen diziye özgü bir bölgesinin çoğaltılarak saptanabilmesi için floresan işaretli problar kullanılır. UPL problar, kantitatif PZR özgünlüğünü arttırmak için tasarlanmış hidroliz problarıdır. Prob, çoğaltılmış olan ürünün tamamına değil, tek zincirli hedef DNA üzerinde komplementer olduğu bölgeye bağlanır. Probların 5' ucunda floresan raportör (*reporter*; R) molekül, 3' ucunda ise floresan baskılayıcı (*quencher*; Q) molekül bulunur. 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinden önce, raportör molekülü, probun 3' ucundaki baskılayıcı molekül tarafından "FRET" adı verilen bir mekanizma ile söndürülür. Bu şekilde prob floresan ışıma yapamaz. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi ile raportör molekül baskılayıcı molekülden ayrılır. Serbest hale geçen raportör molekül floresan ışıma oluşturur [85, 86]. Böylece gerçekleşen ışıma, cihaz tarafından algılanır ve PZR tüpü içerisinde ne kadar çok hedef DNA varsa o kadar çok prob bağlanacak ve floresan ışıma miktarı da o derecede fazla olacaktır. Buradaki temel amaç, çoğaltılmış olan PCR ürünleriyle, kullanılan probun etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. Bunun sonucunda hedef DNA'ya floresan veren boyaların bağlanmasıyla DNA kantitasyonu mümkün olabilmektedir.

2.5. Sanger Dizileme Yöntemi

Genom dizisinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem, 1977 yılında Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından bir virüsün genom dizisinin ortaya çıkarılmasıyla geliştirilmiş ve 1980 yılında Kimya Nobel Ödülü'ne layık görülerek bilim dünyasına ismini zincir sonlandırma ya da Sanger dizileme olarak duyurmuştur [87-89]. Sanger dizileme, DNA'nın nükleotit baz dizilerinin saptanması için kullanılmaktadır. DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında bilgi sağlamakla birlikte özellikle kalıtsal hastalıkların meydana gelme ve tedavi süreçleriyle ilgili mekanizmaların anlaşılması ve aydınlatılabilmesi için yapılan araştırmalara öncülük etmektedir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir .

Sanger dizilemesi, genom haritalarının çıkarılması, bireysel genotipin tanımlanması ve sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti ya da rekombinant DNA oluşumlarının tayini gibi çok farklı amaçlara yönelik kullanılmaktadır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri yine bu yöntemle belirlenebilmektedir. Bu yöntem, preimplantasyon genetik tanı ile kalıtsal hastalık tayininde oldukça kullanıldığı gibi, doku uygunluğu saptanmış embriyoların sağlıklı olanlarından elde edilen kordon kanı ve kemik iliği ile hasta kardeşlerin tedavisinde de kullanılmaktadır. Bunlardan farklı olarak, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik çalışmalar, ebeveyn ve akrabaların tespiti, kantitatif özellikteki gen lokuslarının saptanması, hastalık ve genetik bozuklukların teşhisi, adli tıp çalışmaları, moleküler arkeoloji alanlarında da yaygın bir kullanıma sahiptir [90].

Sanger dizileme yönteminde, kalıp DNA, primerler, Taq DNA polimeraz, dNTP, ddNTP kullanılmaktadır [75, 91]. Yöntemin temelini oluşturan bu maddeler aşağıda açıklanmaktadır:

Kalıp DNA: PZR tekniği ile elde edilen ve çoğaltılan DNA ipliği; yani dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp DNA olarak adlandırılmaktadır. PZR ürününden kalıp DNA'yı elde edebilmek için öncelikle DNA diğer kimyasallardan arındırılmalıdır. Eğer kalıp DNA yeterince temizlenemezse bir sonraki sonlanma reaksiyonuna da aktarılacak olan kimyasallar ve primer artıkları reaksiyonun hassasiyetini bozacaktır.

Primer: İstenilen DNA kalıbının çoğaltılması ve dizi analizinin yapılabilmesi için primerlere ihtiyaç vardır. Primer çiftleri, kullanılacak kalıp DNA'nın genomik DNA'dan elde edilmesinde ve çoğaltılmasında kullanılır. Ayrıca primerler yöntemin son aşaması olan sonlanma reaksiyonunda polimeraz enzimi için uygun 3' ucu sağlarlar.

ddNTP'ler: Zincir büyümesini sonlandıran, OH grubu taşımayan modifiye edilmiş nükleotit substratlardır. Bunlar riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan, fosfodiester bağının oluşumu engellenir. Bu şekilde, yeni nükleotitler yapıya katılamadığı için DNA zincir uzaması sonlanır. Biraz daha açacak olursak, ilk başta bu bazları dizileme cihazında, otomatik olarak tespit edilmek için, radyoaktif olarak işaretleme yapılır. Aynı şekilde işaretleme primerlere de yapılabilir. İşaretlemeden sonra zincir sonlanması reaksiyonlarına geçilir.

Zincir büyümesini sonlandıran dideoksinükleotitleri ayrı ayrı (ddNTP'ler: ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) içeren dört farklı reaksiyon ortamı hazırlanarak gerçekleştirilmektedir. Burda kullanılan ddNTP'lerin konsantrasyonun diğer maddelerden daha düşük olmasına dikkat edilmelidir. ddNTP'ler ve dNTP'ler aynı karışıma konduğunda aralarında uzayan zincire eklenmek için bir yarış olur. Substrat olarak dNTP'ler kullanıldığı sürece uzama devam eder. Sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde deoksinükleotitlerle arasında bağ kurulamadığından DNA zinciri sonlanır ve her tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon gerçekleşmiş olur. Sonuçta, çeşitli uzunluklarda oluşan DNA parçalarının ucundaki ddNTP'ler kapiller elektroforez yöntemiyle okunur. Her bir bazın dizi kromatogramındaki rengi farklı olduğundan bazlar ayırt edilebilir [92, 93].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan hücre hattı

Bu çalışmada PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) hücre hattı kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3-1’de listelenmiştir.

Tablo 3-1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka	Katalog Numarası
Etanol	EMSURE	K45722983429
6X Loading Dye	Thermo Scientific	R0611
TAE Buffer (50X)	Genemark	GB01-1
Seakem LE Agarose	Lonza	50002
100 bp DNA Ladder H3 RTU	GeneDirex	DM003-R500
50 bp DNA Ladder	Bioline-HyperLadder	BIO-33054

3.1.3. Kullanılan kitler

Çalışmada kullanılan kitler Tablo 3-2’de listelenmiştir.

Tablo 3-2. Kullanılan kitler ve markaları

Kit Adı	Marka	Katalog Numarası
SuperScriptIII First-Strand Synthesis	Invitrogen	18080051
PureLink Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen	K182001
MyTaq Red DNA Polymerase	Bioline	BIO-21108
PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen	12183018
UPL-Probe Master Mix	Roche Lifescience	
Zymotag Premix	Zymo research	E2004
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline	BIO-98020
10X Standart Taq	Biolabs	B9015S
Dntp Set	Bioline	BIO-39025

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3-3'te listelenmiştir.

Tablo 3-3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Bilgisayarlar	HP
Işık mikroskobu	Olympus CKX41
İnkübatör	Hibrigene Techne
Jel görüntüleme sistemi	UVP Imaging System
Jel dökümantasyon sistemi	UVP GelDoc-It
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter Microfuge 16
NanoDrop spektrofotometre	Thermo Scientific (ND-1000)
Light cycler	Roche, Light Cycler 480 II
Santrifüj	Beckman Coulter Mikrofuje16
PZR	Bio-rad T100 Thermal Cycler
Pipetler	Eppendorf,
Plate santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-22 Centrifuge
Steril kabin	Thermo Scientific, HERA
Hassas terazi	KERN, EMB 200-2
Vorteks	Kermanlar
+4°C Buzdolabı	Sanyo Labcool

-20 °C Derin dondurucu	Panasonic
-80 °C Derin dondurucu	Heraeus Sepatech

3.1.5. Kullanılan veritabanları

Çalışmada kullanılan veritabanları Tablo 3-4'te listelenmiştir.

Tablo 3-4. Kullanılan elektronik veritabanları ve bilgisayar programları

Adı	Web Adresi	Kullanım Amacı
NCBI / BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Proteinlerin aminoasit dizlerini veya DNA dizileri gibi dizi bilgilerini karşılaştırmak için kullanılan bir programdır.
Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3_plus.cgi/	Çoğaltılmak istenen hedef DNA dizisi için primer tasarımı yapılan bir programdır.
Ensembl	http://www.ensembl.org	Birçok genoma ait referans dizilerini içeren bir programdır.
UCSC genome browser	http://genome.ucsc.edu/	Birçok genoma ait referans dizileri bulunduğu ve <i>in silico</i> PZR ile tasarlanan primerlerin kontrolünün de yapıldığı programdır.
Reverse Complement	http://reverse-complement.com/	Belirli bir DNA ve RNA dizinin ters komplement DNA dizisinin elde edilmesini sağlayan programdır.
CLC Main Workbench 6.5		Sanger dizilemesi sonrası analizlerde kullanılan, DNA dizilerinin derlenmesi ve hizalanmasında kullanılan bir programdır.
GeneMANIA	www.genemania.org/	Program istenen bir genin ilişkili olduğu genleri göstermektedir.

GnomAD Browser	http://gnomad.broadinstitute.org/	Genom verilerinin toplandığı bir veritabanıdır.
ExAC Browser	http://exac.broadinstitute.org/	Ekzom verilerinin toplandığı bir veritabanıdır.
Polymorphism Phenotyping (PolyPhen-2)	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	Amino asit değişimlerinin insan proteininin fonksiyonu ve yapısına verdiği olası etkiyi tahmin eden biyoinformatik araçtır.
Mutation Taster	http://www.mutationtaster.org/	Her tip dizideki tüm varyant çeşitlerinin hastalıkla ilişkili olup olmadığını yordayan biyoinformatik araçtır
GraphPad		Verilerin istatistiksel olarak anlamlandırılmasında kullanılan yazılım aracıdır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Aşamaları:

Yüksek lisans tezimin temeli Almanya ile ortak gerçekleştirilen 113S029 kodlu “Tip 1 Diyabet'in Rejeneratif Tedavisi: Pankreatik Beta-Hücre Proliferasyonuna Yönelik Yeni Teknoloji Geliştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK-INTENC çıktılarına dayanmaktadır. Bu kapsamda, PANC-1 hücrelerinde gerçekleştirilen 14 günlük farklılaştırma protokolü aşağıda detaylandırılmış olup, tarafımda gözlemlenmiştir.

Bu kapsamda, 14 günlük PANC-1 farklılaştırma protokolüne tabi tutulan hücreler, 0 ve 14. günlerde analiz edilmek üzere toplanmıştır.

4. gün büyüme ortamına Taurine kimyasalı eklenmiştir. Her 2 günde bir medyumlar tazelenmiş, 14. günde ise deney protokolü tamamlanarak hücre toplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

0. GÜN

1. DAY0 medyumunu hazırlanır:

2. Dört adet 6'lı plate kullanılır. Her kuyuya 4 ml DAY0 medyumunu ile 2×10^6 hücre ekilir.

*0, 1, 2 ve 3. gün DAY0 medyumunu ile beslenmiştir.

DAY0 medyum içeriği: 5 ml %10 BSA + 45mL DMEM/F12 + 0,5 ml ITS (100x) + 250 uL Pen/Strep

*0.gün farklılaşma protokolü uygulandıktan 24 saat sonraki gün

1. GÜN

RNA izolasyonunu gerçekleştirmek üzere toplanacak hücreler için aşağıdaki işlem uygulanır:

1. Bir plate'in ilk üç sırası birer 15 ml falkona toplanır.
2. 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üst sıvı dökülür.
3. 1 ml PBS ile 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üst sıvı dökülür.
4. Falkonlara 350'şer μ L RLT Plus Buffer (*1 ml RLT + 10 μ L beta-Mercaptoethanol*) eklenir.
5. Hücreler tüplere alınır ve daha sonra RNA izole edilmek üzere -80°C 'de saklanır.
7. Kalan diğer kuyuların medyumları tazelenir. 3 ml medyum çekilerek yerine 3 ml DAY0 medyum eklenir.

DNA izolasyonunu gerçekleştirmek üzere toplanacak hücreler için aşağıdaki işlem uygulanır:

1. Bir plate'in ilk üç sırası birer 15 ml falkona toplanır.
2. 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üst sıvı dökülür.
3. 1 ml PBS ile 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Üst sıvı dökülür.
4. Her deney için üçer kuyudan toplanan hücreler, 1 ml PBS içinde saklanır.

2. GÜN

1. Kuyulardan 1,5 ml medyum çekilip yerine D0 medyumunu eklenir.

3. GÜN

1. Kuyulardan 1,5 ml medyum çekilip yerine D0 medyumunu eklenir.

4. GÜN

2. Kuyuların medyumları DAY4 medyumunu ile değiştirilir.

Hücreler; 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. günlerde DAY4 medyumunu ile beslenmiştir.

DAY4 medyum içeriği: DAY0 medyum + 30 µL taurine

6. GÜN

1. Kuyulardan 1,5 ml medyum çekilip yerine D4 medyumunu eklenir.

8.GÜN

1. Kuyulardan 1,5 ml medyum çekilip yerine D4 medyumunu eklenir.

10. GÜN

2. Medyumlar, D10 medyumunu ile değiştirilir.

Hücreler; 10, 11, 12 ve 13. günlerde DAY10 medyumunu ile beslenmiştir.

D10 medyum içeriği: DMEM/F12 42,5 + BSA 7,5 ml + 0,5 ml ITS (100x) + 250 µL Pen/Strep + 300 µL Taurine + 50 µL Nicotinamide + 25 µL Exendrin + 500 µL NEAA

DAY 12

1. Kuyulardan 1,5 ml medyum çekilip yerine D10 medyum eklenir.

14.GÜN

RNA ve DNA izolasyonu için hücreler 1'inci günde belirtilen adımlar takip edilerek toplanır.

3.2.2. *INSIG1* Gen Analizleri

3.2.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki basamakları takip ederek gerçekleştirilmiştir.

** PANC-1 farklılaşma protokolü uygulamasında bazal (herhangi bir farklılaşmaya uğramamış) ve 14. günlerde toplanan hücrelerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Protokol

- Spin kolona 20 µl Proteinaz K koyulup üzerine hazır hücreler eklenir.
- 20 µl RNase A eklenir, 5 saniye (sn) vortex ve sonrasında 5000 rpm’de 10 sn spin down yapılır.
- 200 µl Lysis Buffer eklenir, 10 sn. vortex ve sonrasında 5000 rpm’de 10 sn. spin down yapılır ve 55°C de 10 dakika (dk) tutulur.
- Üzerine %100’lük 200 µl yeni etanol eklenir, 5 sn vortex ve sonrasında spin down yapılır ve spin kolon atılır.
- Ependorf tüpte kalan örnek yeni spin kolona aktarılır ve 10000 rpm’de 1 dk çevrilir.
- Kolon yeni tüpe aktarılır, üzerine 500 µl Wash Buffer 1 eklenir. 10000 rpm’de 1 dk çevrilir ve tüp değiştirilir.
- Kolon yeni tüpe aktarılır, üzerine 500 µl Wash Buffer 2 eklenir. Maximum hızda 3 dk çevrilir.
- 50 µl Elution Buffer eklenir, 1 dk bekletilir ve maximum hızda 1 dk çevrilir. Konsantrasyon ve OD ölçümü yapılır.

3.2.2.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, Invitrogen Purelink Genomic RNA Mini Kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki basamakları takip ederek gerçekleştirilmiştir.

** PANC-1 farklılaşma protokolü uygulamasında bazal, 0 ve 14. günlerde toplanan hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzolasyona başlamadan önce kit içerisinde bulunan;

- Wash Buffer 2'ye ilk kullanımdan önce 60 ml %96-100'lük etanol eklenmiştir.
- Lysis Buffer'ın her 1 ml'si için 10 µl β-merkapttoetanol eklenerek hazır hale getirilmiştir.

Protokol

- 1×10^6 - 5×10^6 hücre peletinin üzerine 0,6 ml Lysis Buffer eklenir ($<1 \times 10^6$ için 0,3ml eklenir) ve hücreler 1ml'lik şırınga yardımı ile 5-10 kez lysis edilir.
- Homojenat üzerine bir volume %70 etanol eklenir (0,6ml ise 0,6ml; 0,3ml ise 0,3 ml etanol eklenir). 5-10 sn vortex yapılır.
- Örnek spin kolona aktarılır (Spin kolon 700 µl hacimlidir). 12.000 rpm'de, 15 sn santrifüjlenir.
- Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır ve 12.000 rpm, oda sıcaklığında 15 sn santrifüjlenir.
- Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alınır, 700 µl Wash Buffer 1 eklenir ve 12.000 rpm'de, 15 sn santrifüjlenir.
- Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alınır, 500 µl Wash Buffer 2 eklenir. 12.000 rpm'de, 15sn santrifüjlenir.
- Yukarıdaki aşama tekrar edilir (Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alınır, 500 µl Wash Buffer 2 eklenir ve 12.000 rpm'de, 15sn santrifüjlenir.)
- Spin kolon membranını kurutmak için 12.000 rpm'de, 1-2 dk santrifüjlenir.
- Spin kolon 1,5ml'lik son toplama tüpüne aktarılır. Spin kolon membranının merkezine 40 µl Rnase'dan yoksun su eklenir. Bu işlem yapılırken kolonun membranına değmemeye özen gösterilir.
- Oda sıcaklığında 1 dk bekletilir ve 12.000 rpm'de, 2 dk santrifüjlenir.
- RNA son toplama tüpüne alınır ve kalite kontrol için konsantrasyon ve OD ölçümü yapılarak daha sonra kullanılmak üzere -80°C 'de saklanır.

3.2.2.3. Nükleik Asit Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Hücre kültürü sonrası elde edilen hücrelerden yapılan izolasyon sonucu DNA ve RNA materyallerinin bir sonraki aşamalarda kullanılmasından önce kalite kontrolleri gerçekleştirilmiştir.

Bu bağlamda, NanoDrop ND-1000 spektrofotometresi kullanılarak örneklerin miktar ve saflıkları ölçülmektedir. Bunun için 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında gönderilen ışığın optik yoğunluk OD (optical density) değerleri tespit edilerek, A260/A280 oranının 1,8-2,0 olması dikkate alınmıştır. OD değeri, A260/280 oranı, nükleik asitlerin saflığının değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılmaktadır. Kabul edilmiş olan oranın, DNA için ~1,8 ve RNA için ~2,0 olması nükleik asitlerin saf yani kaliteli olduğunu belirtir. Bu oranın belirtilen değerlerden düşük çıkması, ortamda protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığını göstermektedir. Böyle bir durumda A260 Nükleik asitlerin maksimum absorbans, A280 Proteinlerin maksimum absorbans, A230 ise fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur [94].

Bir diğer kalite kontrolü olan jel elektroforezi ile DNA ve RNA kalite kontrolünün ikinci basamağı da gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, jelde görülmesi gereken bant(lar) ve boyutları ile Nanodrop verileri onaylanmış olacaktır.

3.2.2.4. cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi, kullanılan Invitrogen First strand cDNA sentez kiti protokolüne bağlı kalınarak Tablo 3-5'te gösterilen basamaklar takip edilerek, iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-5. cDNA sentez protokolü

(Total:10µl) 1µg RNA, 1µl %10 Dnase 1 Reaction Buffer, 1µl Dnase1 Amp Grade, H2O ↓ 15 dk oda sıcaklığı ↓ 1µl 25µm EDTA ↓ 65°C - 10 dk inkübe	First strand cDNA sentezi (Total:20µl) 1µl oligo dt (50µm), 11µl RNA, 1µl 10µm dNTP mix ↓ 65°C - 5 dk inkübe sonra 1 dk buzda beklet ↓ 4µl 5x First strand buffer, 1µl 0.1M DTT, 2µl Superscript3 reverse transkriptaz ↓ 50°C - 50 dak inkübe ↓ 70°C - 15 dk
--	--

3.2.3. Primer Tasarımı

Primer tasarımı, PZR uygulamasının başarılı olması için en önemli kriterlerden biridir. Düzgün tasarlanmamış olan primerler yapılan PZR'ın çalışmamasına neden olacaktır. Bu aşamada belirli parametreler dikkate alınarak primerler tasarlanmalıdır. Bu parametrelerden, primer uzunluğu; bağlanma sıcaklığı ve bağlanma süresini etkilediğinden dolayı PZR'nin başarılı olabilmesi için çok önemlidir. Bu sebeple sekansa özel bağlanması istenen primerler genellikle 18-24 baz uzunluğunda tasarlanmalıdır, çünkü primer uzunluğuna ters orantılı olarak bağlanma verimi etkilenecek ve dolayısıyla çoğaltılan ürün de buna bağlı olarak azalacaktır. Bir diğer parametre erime sıcaklığı (T_m) değeridir. T_m değeri, 18-24 baz uzunluğuna sahip primerlerin tasarlandığı düşünülürse 54-72°C arasında olması, amplifikasyonun verimli olmasını ve primerlerin istenilen spesifik diziye özgü bağlanmasını sağlayacaktır. T_m değerinin tasarlanan her iki primer dizisi için de benzer olması dikkate alınmalıdır. G/C oranına bağlı olarak da amplifikasyon verimi etkilenmektedir. Optimum G/C oranı %40-60 olmalıdır. Aynı şekilde düşük G/C oranı ve buna bağlı olarak yükselen A/T oranı da primerlerin hedef diziye daha az bağlanmasıyla ürün veriminin düşmesine neden olacaktır.

3.2.3.1. *INSIG1* gen dizilemesi için primer tasarımı

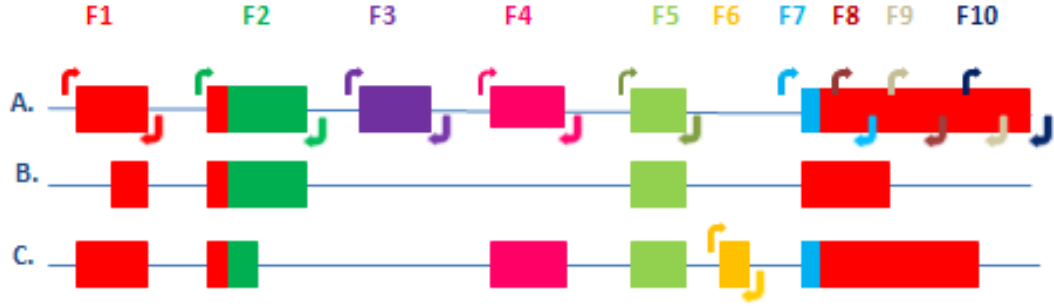
INSIG1 geninin tüm transkriptlerini ve bu transkriptlerin tüm ekzonları, ekzon-intron aralıkları ve translasyona uğramayan (UTR) bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerçekleştirilen primer tasarımı için Ensembl, UCSC ve Primer3 Plus programları kullanılmıştır.

Primer3 Plus programındaki parametreler istenilen değerler doğrultusunda seçilmiştir.

Parametreler:

1. Primer T_m değeri minimum 57°C, optimum 60°C ve maksimum değeri 63°C olarak belirlenmiştir.
2. Primer seçilirken, primer uzunluklarının 20 bp civarı olmasına dikkat edilmiştir.
3. Primerlerin G/C oranının ~ % 40-55 arasında olmasına dikkat edilmiştir.

Tasarlanan primerlerin, UCSC-In silico programı üzerinden SNP bölgelerine denk gelip gelmediği kontrol edilmiştir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1. INSIG1 genine ait transkriptlerin karşılaştırmalı olarak ortak ve farklı bölgeleri ve bu bölgeleri kapsayarak tasarlanan primerlerin yerleri gösterilmiştir.

A. Transkript 201'e ait NM_001346592.1 ve NM_005542.5'i kapsayan diziler, B. Transkript 202'ye ait NM_198337.3'ü kapsayan dizi, C. Transkript 203'e ait NM_198336.3'ü kapsayan diziye ait şekillerdir. Kırmızı renkle belirtilen kutucuklar UTR bölgesini, yeşil, mor, pembe, sarı ve mavi kutucuklar ekzon bölgelerini göstermektedir. A, B ve C'de mavi çizgi intron bölgelerini göstermektedir. Şekilde görülen oklar tasarlanan primerlerin yerleri ve kapsadığı bölgeleri ifade etmektedir.

INSIG1 geni dizilemesi için tasarlanan primerler Tablo 3-6'da yer almaktadır. Ayrıca primerler, Şekil 3-1'de gösterilen NM_005542.5 koduna sahip en uzun transkript olan, INSIG1-201 olarak isimlendirilen transkript kullanılarak tasarlanmıştır.

Fragman 7'nin spesifik bir bölgesindeki değişimin anlamlandırılabilmesi için, yeni bir primer tasarlanmıştır.

Tablo 3-6. INSIG1 genine ait farklı transkriptlerin ortak bölgelerini kapsayan, ekzon ve intron bölgelerini de içeren primerler

Ensembl ID	Kapsadığı ekzonlar	Primer adı	Primer dizisi	Tm değeri	GC değeri	Fragman uzunluğu
NM_005542.5	5'UTR	FRAGMAN 1	F 5' TCACCCAAGGATGCAAGC 3' R 5' TCCCAAAGACCCAACAGG 3'	60.8 59.4	55.6 55.6	734 bç
NM_005542.5	Ekzon 1 + 5'UTR	FRAGMAN 2	F 5' CCTTCCTCGCTCTTTGTCTC 3' R 5' CCAAGACTGGAGATGCACAC 3'	59.2 59.3	55.0 55.0	625 bç

NM_005542.5	Ekzon 2	FRAGMAN 3	F 5' TGACCACGTTGAAATTCTGG 3' R 5' CATCGATAGCCCCATTCTTC 3'	59.5 59.5	45.0 50.0	358 bç
NM_005542.5	Ekzon 3	FRAGMAN 4	F 5' CCCATGTTTTTAACCCTTGTG 3' R 5' TGGATAGCAGCATTTTTGAGA 3'	59.2 58.5	42.9 38.1	400 bç
NM_005542.5	Ekzon 4	FRAGMAN 5	F 5' GAATTGAGCCAGGTGAAATTG 3' R 5' CGAGGGCTCTAGTTCCTTTTC 3'	59.6 59.5	42.9 52.4	381 bç
NM_198336.3	Ekzon 4	FRAGMAN 6	F 5' CGGAGATAAGCTCTGGGAAA 3' R 5' TGAGAAATTTGGCAGCAGAG 3'	59.4 59.1	50.0 45.0	197 bç
NM_005542.5	Ekzon 5 + 3'UTR	FRAGMAN 7	F 5' TCCCACCTCTCAATCTTGTTG 3' R 5' CGACCCCACTTAGAGTGTGAC 3'	60.1 59.6	47.6 57.1	703 bç
NM_005542.5	3'UTR	FRAGMAN 8	F 5' AGGAGGTAGGTTGATGGTGC 3' R 5' CAAGGCTCAGATTGGTTTTCA 3'	59.0 60.2	55.0 42.9	682 bç
NM_005542.5	3'UTR	FRAGMAN 9	F 5' TGGCATAGACCATAACCAGACC 3' R 5' AATGCTGACATCTTCATTGGA 3'	59.8 58.2	52.4 38.1	649 bç
NM_005542.5	3'UTR	FRAGMAN 10	F 5' TTTGAGGGAAATGTCTTGGAG 3' R 5' TCCCAAGAGGTTGTGTCAAA 3'	59.2 59.1	42.9 45.0	647 bç
NM_005542.5	Ekzon 5 + 3'UTR	*FRAGMAN 7	F 5' CCCATGTTAGGACCTACTTAATTG 3' R 5' GAAGACTTCAGGGTAAGTCATCA 3'	58.1 57.5	41.7 43.5	315 bç

*Fragman 7'nin kapsadığı bölge içerisinde daha küçük bir alana özgü yeni tasarlanan primerler

**GRCh38(hg38) veritabanı sürümü

[3'UTR bölgesi 4 parçaya ayrılmıştır ve Fr 7, 8, 9, 10 kapsamındadır.]

3.2.3.2. *INSIG1* ekspresyon tespiti için primer tasarımı

Primer tasarımı aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

Primer tasarımı için NCBI, Ensembl, Primer3 Plus, UCSC in-silico PCR, Reverse Complement programları kullanılmıştır.

NCBI programı üzerinden *INSIG1* geninin en fazla kodlama yapan bölgesine ait transkriptinin NM_005542.5 koduna ait dizi alınarak Ensembl programında kontrol edilip daha sonra dizi, Word dosyası üzerinden uzunluğuna göre dizinin tamamını çoğaltması dikkate alınarak eşit parçalara ayrılmıştır. Bu parçalar daha sonra Primer3 Plus programı kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Primer3 Plus programında kullanılan parametreler:

1. Primer Tm değeri minimum 57°C, optimum 60°C ve maksimum değeri 63°C olarak belirlenmiştir.
2. Primer seçilirken, primer uzunluklarının 20 bp civarı olmasına dikkat edilmiştir .
3. Primerlerin G/C oranının %45-55 arasında olmasına dikkat edilmiştir.
4. Primerlerin üzerinde eğer varyasyon varsa MAF değeri kontrol edilerek “Population Genetics” kısmından SNP verilerine bakılarak MAF<0.001 olanlar dikkate alınmamıştır.

Sistemdeki Reverse primer, Reverse Complement programı kullanılarak 5'→3' formatına çevrilerek Ensembl'da kontrolü gerçekleştirilmiştir. Ayrıca primerler dizilemede herhangi bir kayıp yaşamamak adına bir önceki dizinin içinden başlatılmak suretiyle tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin, UCSC *in silico* programı üzerinden de yine SNP bölgelerine denk gelip gelmediği kontrol edilmiştir. Buna göre *INSIG1* için iki farklı primer çifti tasarlanmış olup Tablo 3-7'de dizileri gösterilmektedir. Bununla birlikte, 3 farklı *housekeeping* (referans) gen için primerler tasarlanmış olup, dizileri Tablo 3-8'de gösterilmektedir.

Tablo 3-7. *INSIG1* genine ait, kRT-PZR için kullanılan primerler

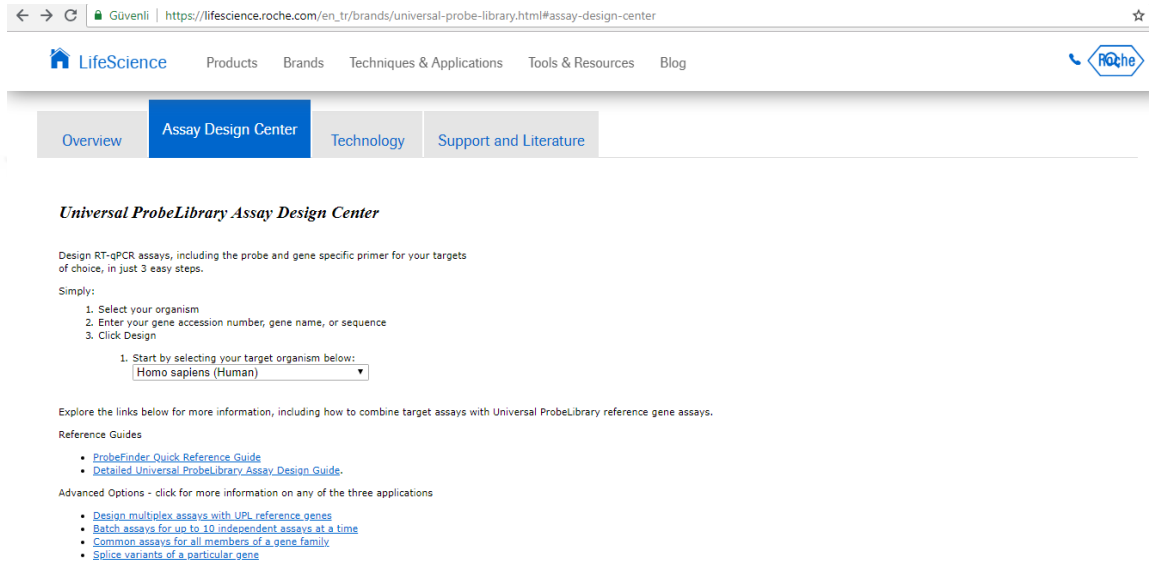
Primer	Primer dizisi	Tm	%GC	Uzunluğu	Kapsadığı ekzon
INSIG1	F 5' GCCGTGACTCCTCCTTTCC 3'	60.08	63.16	82	1-2.Ekzon
	R 5' CAAGAGGCGCTTCCTGGC 3'	61.13	66.67		
INSIG1(tekrar)	F 5'TTGGCCTACTGTACCCCTGT 3'	59.47	55.00	111	3.Ekzon
	R 5'CGTGGTTAATGCCAACAAAA 3'	59.46	40.00		

Tablo 3-8. RT-PZR SYBR Green I için kullanılan referans genlere ait primerler

Primer	Primer dizisi	Tm	%GC	Uzunluğu
ACTB	F 5'GTCATTCCAAATATGAGATGCGT 3'	57.32	39.13	105
	R 5'TGTGGACTTGGGAGAGGACT 3'	59.81	55.00	
PPIA	F 5' GCCGAGGAAAACCGTGTACT 3'	60.32	55.00	109
	R 5' TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG 3'	59.32	47.62	
GAPDH	F 5' CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC 3'	59.83	60.00	109
	R 5' ACCAAATCCGTTGACTCCGA 3'	59.32	50.00	

3.2.3.3. UPL Prob RT-PZR Primer Tasarımı

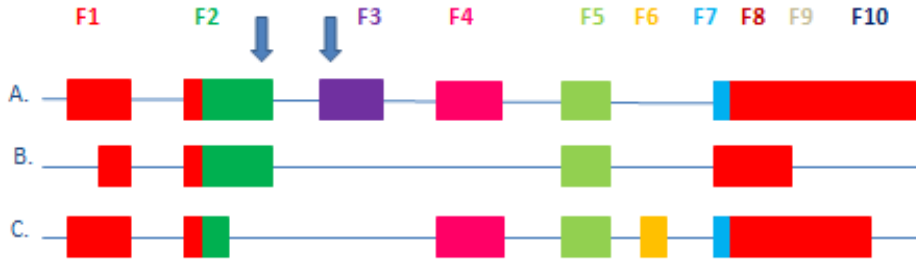
Primerler, UPL web sitesinin Test Tasarım Merkezi [95] kullanılarak tasarlanmıştır. Bunun için kullanılan web sayfasının ekran görüntüsü Şekil 3-2’de gösterilmektedir. Web sayfasından INSIG1 geni ile PPIA housekeeping geni için seçilen primer çiftleri ve bunlara özgü prob numaraları sırasıyla Tablo 3-9’da gösterilmektedir.



Şekil 3-2. UPL prob primer tasarımı

Tablo 3-9. UPL Prob RT-PZR için kullanılan primer [#48 (cat. no. 04688082001)]

Primer adı	Primer dizisi	Tm değeri	GC değeri	Primer uzunluğu
*INSIG1	F 5' ATCTTTTCCTCCGCCTGGT 3' R 5' GGGGTACAGTAGGCCAACAA 3'	60 59	53 55	72 bç
**PPIA	F 5' ATGCTGGACCCAACACAAAT 3' R 5' TCTTTCACTTTGCCAAACACC 3'	60 60	45 43	97 bç
*[#56 (cat. no. 04688538001)]				
**[#48 (cat. no. 04688082001)]				



Şekil 3-3. *INSIG1* UPL prob primerleri ok ile gösterilmektedir.

INSIG1 geni UPL prob RT-PZR için tasarlanan primerlerin yerleri gösterilmektedir.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MyTaq Red DNA Polimeraz, Sanger dizilemesi için *INSIG1* geninin PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılması için kullanılmıştır. Yüksek verimli amplifikasyonu ve hızlı bir PZR koşuluna sahip olması tercih edilmesini sağlamıştır. İçerisinde bulunan kırmızı boya, örneklerin PZR sonrasında doğrudan bir jel üzerine yüklenmesini sağlar. Ayrıca dNTP ve $MgCl_2$ 'nin tampon solüsyonunda bulunması ile optimizasyonun hızlı ve etkin şekilde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bu verilere dayanarak, Tablo 3-10'da gösterilen deney protokolü uygulanmış ve sonuçta Fragman2, Fragman3, Fragman4, Fragman5, Fragman9 optimize edilerek çoğaltılmıştır.

Kırmızı reaksiyon tamponu, pipetlemenin görselleştirilmesini sağlar. Ayrıca, örneklerle yükleme tamponu eklemeye gerek kalmadan, PCR'den sonra doğrudan jel üzerine yüklenmesini sağlar.

Tablo 3-10. Uygulanan MyTaq Red PZR Protokolü

	My Taq Red DNA	MM (µL)	Sıcaklık	Zaman
		1x	95°C	1 dk
	H ₂ O	14,6	35 Döngü	
	5x Buffer	5	95°C	15 sn.
10µM	Forward primer	1	57°C	15 sn.
10µM	Reverse primer	1	72°C	10 sn.
	Taq polimeraz	0,4	Final Uzama	
	Alikot	22	72°C	15 sn.
60ng/µL	DNA	3		

Optimizasyonlar sırasında, fragmanların uzun dizilere sahip olması ve yüksek GC oranlarına bağlı, yüksek T_m değerleri sebebiyle daha önce uygulanan My Taq Red kiti kullanılarak, konvansiyonel PZR deney metodu ile çoğalmayan Fragman6 ve Fragman8 Touchdown PZR metodu ile optimize edilerek çoğaltılmıştır. Koşullar, Tablo 3-11’de gösterilmektedir.

Uygulanan Touchdown PZR protokolüne göre, yüksek bağlanma ısısı ile başlanır ve bağlanma ısısı döngü sayısı ilerledikçe düşürülür. Amplifiye olmaya başlayan hedef dizinin diğerlerine oranı arttığı için düşen ısıda artık yalnızca hedef dizi çoğalacaktır. Az sayıda da olsa hedef dizinin amplifiye olması beklenir.

Uygulanan MyTaq Red DNA kiti ile optimize edilemeyen fragmanlar için, Biolabs Taq DNA polimeraz kiti kullanılmış ve üç farklı şekilde protokol uygulanarak Touchdown PZR ile optimize edilmeye çalışılmıştır. Kullanılan protokollerde sırasıyla; üretici firmanın protokolü uygulanmıştır (koşul 1), kit protokolüne ek olarak DMSO kullanımı ile (koşul 2) ve kit protokolüne ek olarak Betaine ve DMSO eklenmesi ile (koşul 3) gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde Fragman7 ve Fragman10 optimize edilerek çoğaltılması sağlanmıştır. Koşullar Tablo 3-12’de gösterilmektedir.

Tablo 3-11.Uygulanan Touch-down PZR Protokolü

	My Taq Red DNA	MM (µL)	Sıcaklık	Zaman
		1x	95°C	3 dk
	dH ₂ O	14,6	15 döngü (-0.5°C)	
	5x Buffer	5	95°C	15 sn.
	Red Taq polimeraz	0,4	61°C	15 sn.
	Alikot	20	72°C	10 sn.
10µM	Forward primer	1	20 döngü	
10µM	Reverse primer	1	95°C	15 sn.
60ng/µL	DNA	3	57°C	15 sn.
			72°C	10 sn.
			Final Uzama	
			72°C	15 sn.

Tablo 3-12. Uygulanan Biolabs Taq DNA Polimeraz PZR Protokolü

	Biolabs Taq DNA Polymerase	Koşul 1	Koşul 2	Koşul 3
		x1	x1	x1
	dH ₂ O	13,86	11,86	7,04
	10X standard taq reaction buffer	2,5	2,5	2,5
25mM	Mg	2	2	2
5M	Betaine	0	0	6,5
	DMSO	0	2	0,32
2.5µM	dNTP	0,5	0,5	0,5
	Taq	0,14	0,14	0,14
60ng/µL	DNA	2	2	2
	Alikot	21	21	21
2.5µM	Forward primer	2	2	2
2.5µM	Reverse primer	2	2	2
DNA		60ng/µL		

3.2.4.1. ZymoTaq Premix PZR

GC oranı bakımından zengin olan Fragman1'in çoğaltılması için ve Tablo 3-10, Tablo 3-11 ve Tablo 3-12'de gösterilen deneylerin başarısız olması sebebiyle, Zymo Taq Premix kiti kullanılarak optimize edilmiştir. Deney koşulları Tablo 3-13'te gösterilmektedir.

ZymoTaq PreMix, ısı aktive edilmiş, termal-kararlı DNA polimerazın dahil edilmesi, PZR gerçekleştirirken oluşabilecek primer dimer ve spesifik olmayan ürün oluşumuna karşı kullanılmıştır. Kullanılan kit özellikle yüksek GC oranına sahip olan bölgelerin çoğaltılmasında kullanılmaktadır.

Tablo 3-13. Uygulanan ZymoTaq Premix PZR Protokolü

	Zymo Taq Premix	MM (µL)	Sıcaklık	Zaman
		1x	95°C	10 dk
	dH ₂ O	7,5	35 Döngü	
	Zymo Taq Premix	12,5	95°C	30 sn.
10µM	Forward primer	1	56°C	30 sn.
10µM	Reverse primer	1	72°C	30 sn.
	Mix paylaşımı	22	Final Uzama	
60ng/µL	DNA	3	72°C	7 dk

3.2.4.2. cDNA Sentezi Kontrolü ve PZR Ürün Analizi

Yapılan cDNA sentezinin doğruluğunu göstermek amacıyla daha önce optimize edilmiş olan PZR protokolüne göre hali hazırda bulunan housekeeping primerler ile PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra doğruluğu kanıtlanan cDNA'lar ile RT-PZR aşaması gerçekleştirilmiştir.

PZR aşamasını takiben oluşan ürünlerin doğruluğunu tayin edebilmek için PZR ürünü doğrudan etidyum bromür (EtBr) içeren %2'lik agaroz jele yüklenmişlerdir. Bu konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1 gr agaroz tartılarak, bir beherde 50 ml 1X TAE solüsyonu içinde karıştırılıp karışım mikrodalga fırında homojen olana kadar kaynatıldı. Karışım içerisine 10mg/ml etidyum bromür (EtBr) solüsyonu çeker ocak altında eklendi. Daha sonra sıvı agaroz karışımı, elektroforez tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve jelin donması için beklendi. Tepsi 1X TAE tampon solüsyonu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi. 5 µl PZR ürünü alınarak (yapılan deneye göre) 6X yükleme boyası ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele 100bp DNA marker (Genedirex-H3 RTU) ile yüklenen PZR ürünleri, 100 voltta yaklaşık 25 dakika yürütülerek UVP Imaging System aracılığı ile ultraviyole (UV) ışığı altında görüntülenmiştir.

3.2.4.3. SYBR Green I Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

INSIG1 gen ekspresyon miktarının analiz edilebilmesi için ilk olarak kRT-PZR ile SYBR Green I yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için öncelikle konvansiyonel PZR ile deney optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon *housekeeping* genler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve kontrolü agaroz jel elektroforezi yapılarak sağlanmıştır. Uygun koşulların sağlanmasının ardından kRT-PZR'ye geçilmiştir. LC480 cihazında gerçekleştirilen kRT-PZR için uygulanan protokol Tablo 3-14'te gösterilmektedir.

Tablo 3-14. Uygulanan kRT-PZR Protokolü

	0. GÜN			14. GÜN			NEGATİF KONTROL					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB			
B	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA			
C	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH			
D	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1	INSIG1			
E												
F												
G												
H												

SYBR Green		ACTB PPIA GAPDH INSIG1					Döngü parametresi		
	Son konsant rasyon	X1 (µl)	X10 (µl)	X10 (µl)	X10 (µl)	X10 (µl)	95°C	2 dk	
SYBR Mix		5	50	50	50	50	95°C	10 sn.	X40 devir
Forward primer	3µM	1,3	13	13	13	13	62°C	30 sn.	
Reverse primer	3µM	1,3	13	13	13	13			
H ₂ O		0,4	4	4	4	4			
Alikot		8	8	8	8	8			
cDNA	(1:5)	2	2	2	2	2			

Tablo 3-14'te verilen protokole göre deneyler, 96 kuyucuklu plateler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler için, 0 ve 14. günlerde toplanan hücrelerden elde edilen cDNA'lar kullanılarak *ACTB*, *GAPDH*, *PPIA*, *INSIG1* gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Deneyler iki kopya halinde çalışılmıştır.

Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını doğrulamak için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Bu şekilde PZR ürününün spesifik olup olmadığı belirlenmektedir.

3.2.4.4. PZR Verim Hesaplama

Farklı günlerde gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR çalışmalarını karşılaştırmak için yöntem kısmında anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır, sonrasında 1:1, 1:10, 1:100 oranında sulandırılmış bir bazal hücrelerden elde edilmiş cDNA *PPIA housekeeping* geni için kRT-PZR gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Doğrusal denklemin eğimi, Excel'deki eğim formülüne göre verimliliği hesaplamak için kullanılmıştır.

3.2.4.5. UPL Prob Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

SYBR Green metodu kullanılarak yapılan kRT-PZR çoğaltmasında *INSIG1* genine özgü dizinin çoğaltılamaması sebebi ile diziye özgü olan UPL Prob kullanılarak çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir.

kRT-PZR, UPL Prob master mix (ref.04688082001, ref.04688538001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *INSIG1* ve *PPIA housekeeping* gen dizileri Tablo 3-9'da ve uygulanan protokol Tablo 3-15'te gösterilmiştir.

Tablo 3-15. Uygulanan RT-PZR, UPL Probe Protokolü

UPL Protokol			Döngü parametresi	
	Son konsantrasyon	X1 (µL)	95°C	10 dk
H ₂ O		0,7	95°C	10 sn.
Forward primer	5 µM	0,8	60°C	30 sn.
Reverse primer	5 µM	0,8	72°C	1 sn.
UPL Prob	10 µM	0,2	40°C	30 sn.
Master Mix(2X)		5	X45 döngü	
Alikot		7,5		
cDNA	1:5	2,5		
TOTAL		10 µl		

3.2.4.6. İstatistiksel Analiz

Ekspresyon miktarını rölatif olarak hesaplamak için Tablo 2-1’de verilen $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile Graphpad yazılımı kullanılmıştır.

Deneyler en az iki kopya halinde çalışılmıştır ve analiz sırasında bu örneklerin Ct ortalaması alınarak $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Daha sonra aynı koşullarda yapılan bağımsız deneyler Graphpad yazılımına eklenmiştir. Deneylere ait örnekler, bazal ve DAY 0 kalibratörlerine göre karşılaştırılmıştır. İlk önce, bazal kalibratör olarak kullanılmış ve DAY 0 ve DAY 14 ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra DAY 0 kalibratör olarak kullanılmış ve DAY 14 ile karşılaştırılmıştır. Analizler için GraphPad programında ANOVA ve t Test hesaplamaları ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-16. kRT-PZR rölatif kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu

$$\Delta Ct (\text{kontrol}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referansı geni}$$

$$\Delta Ct (\text{örnek}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referansı geni}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{örnek}) - \Delta Ct (\text{kontrol}).$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta Ct \text{ kontrol}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.5. Sanger Dizileme Yöntemi

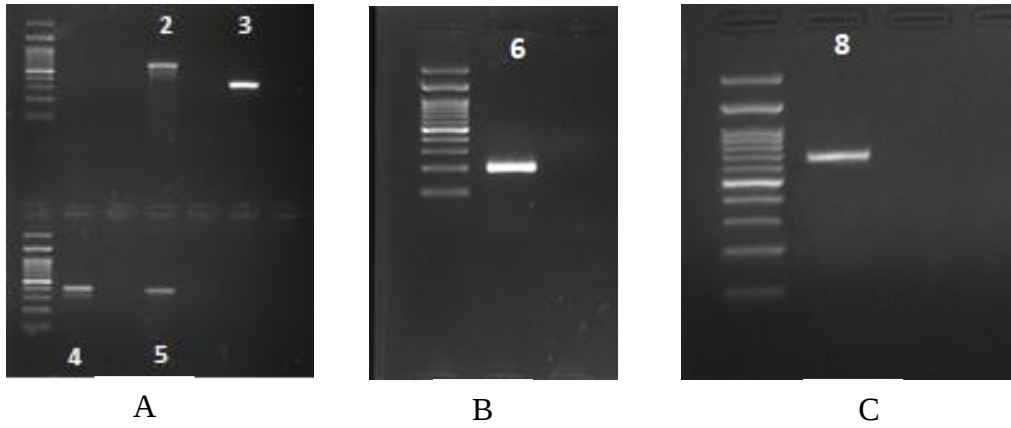
PZR’den elde edilen ürünler ile 10 μM 20 μl hacimde hazırlanan primerler Medsantek firmasına Sanger dizilemesi için gönderilmiştir. Firma dizileme reaksiyonlarını Thermo Fisher Scientific kitleri kullanarak, Applied Biosystems 3500 XL cihazında gerçekleştirmekte ve dizileme sonuçlarını “.ab1” dosya uzantısı olarak iletmektedir. Bu dosyalar CLC Main Workbench 6 kullanılarak *INSIG1* genine ait referans kodlayan dizileri (NM_005542.5, NM_001346592.1, NM_198336.3) ile karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak, kodlanmayan bölgeler için de “UCSC *in silico* PCR” aracı kullanılarak tespit edilen fragman dizileri referans dizi olarak kullanılmıştır. Mutalyzer programı kullanılarak, karşılaştırmalardan elde edilen varyantlar kontrol edilmiş ve nükleotid değişim pozisyonu ile buna karşılık gelen amino asit değişim pozisyonu tespit edilmiştir. UCSC veri tabanında, cDNA’da tespit edilen değişimlerin bilinen bir varyant olup olmadığına bakılarak kontrolleri gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Konvansiyonel ve Touchdown PZR çıktıları

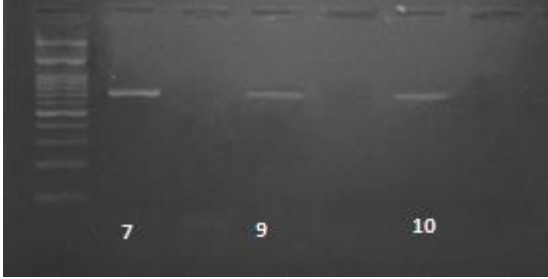
Konvansiyonel PZR gerçekleştirilen örnekler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Jel elektroforezi için, 5µl DNA merdiveni (*DNA Ladder* (100 bç); H3RTU-GeneDirex) ve 5 µl örnek (mytaq red protokolü uygulanmayan örneklerin tümü 1µl 6X yükleme boyası (6X *Loading Dye*;Thermo Scientific ile 5µl örnek, karışım yapılarak) olacak şekilde jele yüklenmiştir. 100-3000 bç boyutunda olan DNA merdiveni referans alınarak kontrol edilen örneklerin Tablo 3-6'da gösterilen boyutlarının istenen yerde olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca kontaminasyon varlığının tespiti için yüklenen negatif kontrol örneklerinde de bant görülmemektedir.

Şekil 4-1'de gösterilen bantlar, Tablo 3-10'da gösterilen Mytaq Red PZR protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. A'da sırasıyla *INSIG1* Fragman 2, 3, 4 ve 5 gösterilmektedir. B'de *INSIG1* Fragman 6 ve C'de *INSIG1* Fragman 8 gösterilmektedir. Fragman 8 için Touchdown PZR protokolü uygulanmıştır (Tablo 3-11).



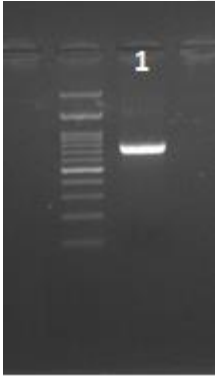
Şekil 4-1.Konvansiyonel PZR jel görüntüleri

Şekil 4-2’de gösterilen bantlar sırasıyla *INSIG1* Fragman 7, 9 ve 10 örneklerine aittir. Deneyler Biolabs kit protokolü uygulanarak Touchdown PZR ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-12).



Şekil 4-2.Konvansiyonel PZR sonuçlarına ait jel görüntüsü

Şekil 4-3’te *INSIG1* Fragman 1’e ait jel görüntüsü verilmiştir. Deney Zymotaq Premix kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-13).



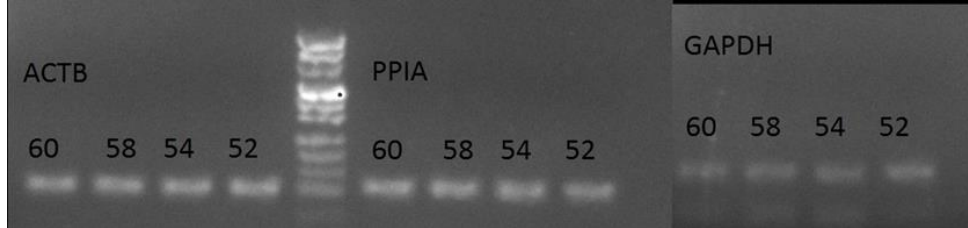
Şekil 4-3. Fragman 1'e ait jel görüntüsü

4.2. Gen anlatım düzeylerinin tespiti ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

kRT-PZR, mikroarray ekspresyon analizi ile elde edilen sonuçları doğrulamak için gerçekleştirilmiştir. Deney için öncelikle PANC-1 hücrelerinden ekstrakte edilen RNA'dan cDNA sentezi Invitrogen'in "SuperScriptIII First-Strand Synthesis" kitini kullanarak gerçekleştirilmiştir. *INSIG1* mRNA seviyeleri, SYBR Green I ve UPL prob yöntemleri kullanılarak kRT-PZR ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ analizi yapılarak hesaplanmıştır.

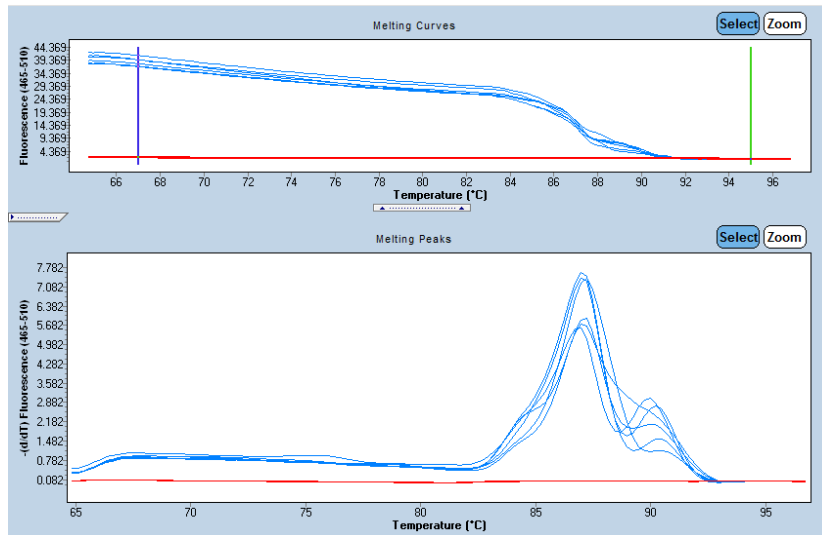
4.2.1. SYBR Green I kRT-PZR Anlatımı

SYBR Green I kit protokolü uygulanarak, konvansiyonel PZR ile öncelikle referans genlerle optimizasyon gerçekleştirilmiş ve Şekil 4-4'te jel görüntüleri gösterilmektedir.



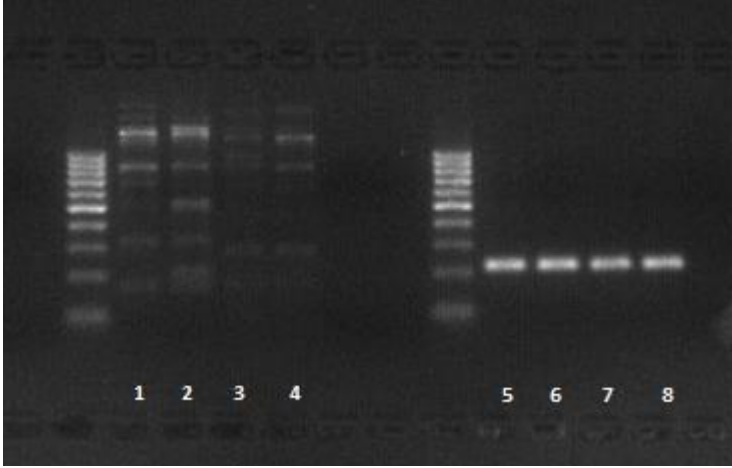
Şekil 4-4. RT-PZR SYBR Green I için kullanılan referans genlerin jel görüntüsü

Optimizasyon deneyleri, Tablo 3-14'te verilen koşullar kullanılarak Tablo 3-8'de bilgileri verilen *housekeeping* genlere ait primerler ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra LC480 cihazında kRT-PZR yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan erime eğrisi analizi yapılarak *housekeeping* genler arasında *PPIA* geni seçilmiştir. Daha sonra *INSIG1* genine ait Tablo 3-7'de verilen “INSIG1” kodlu primer çifti kullanılarak kRT-PZR gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4-5'te erime eğrisi analizi ve 4-6'da jel görüntüsü şeklinde gösterilmektedir.



Şekil 4-5. *INSIG1* geni SYBR Green I erime eğrisi analizi

Şekil 4-5'te SYBR Green I protokolü uygulanan deneyin erime eğrisi gösterilmektedir.



Şekil 4-6. *INSIG1* ve *PPIA* geni SYBR Green I agaroz jel görüntüsü

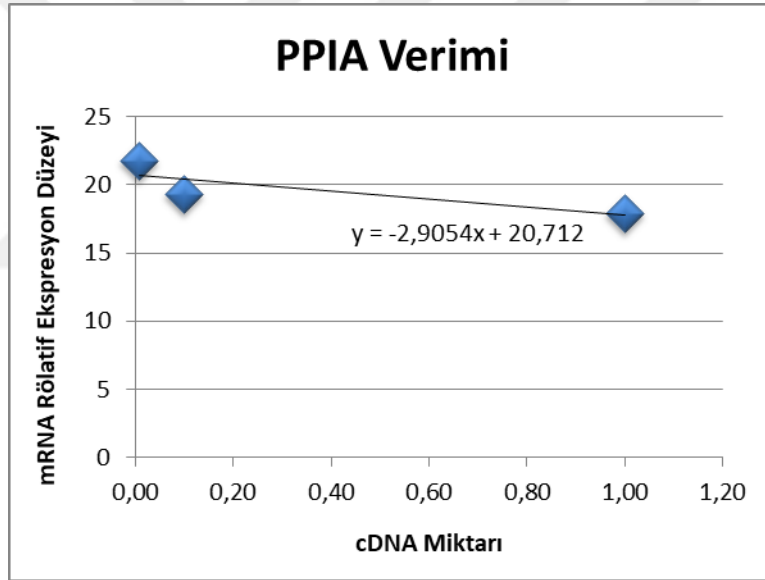
SYBR Green I kit protokolü uygulanarak RT-PZR ile çoğaltılması beklenen *INSIG1* ve *PPIA* genlerine ait jel görüntüleri gösterilmektedir. Sırasıyla kullanılan örnekler, 0. güne ait örneklerde *INSIG1* geni (1, 2) ve *PPIA* geni (5, 6) sonuçları ile 14. güne ait örneklerde *INSIG1* geni (3, 4) ve *PPIA* geni (7, 8) sonuçları gösterilmektedir.

Şekil 4-5 ve 4-6’da görüldüğü gibi, *INSIG1* genine özgü tasarlanan “*INSIG1*” kodlu primer çifti kullanımı ile ekspresyon analizi, SYBR Green I metoduyla gerçekleştirilememiştir. Daha sonra yapılan “*INSIG1*(tekrar)” kodlu primer çifti kullanılarak yapılan deneyde de aynı şekilde ekspresyon analizi gerçekleştirilememiştir. (Tablo 3-7).Şekil 4-5’te *INSIG1*’e ait verilen erime eğrisi analizinde birden fazla *peak* olması sebebiyle ve aynı şekilde Şekil 4-6’da verilen jel görüntüsünde *INSIG1*’e ait sonuçlarda birden fazla bant görülmesinden dolayı *INSIG1* geni anlatımına bakılamamıştır. Bu sebeple, Şekil 4-5 ve 4-6’da verilen sonuçlar “*INSIG1*” kodlu primer çiftine aittir. Aynı şekilde diğer primer için de benzer sonuçlar elde edildiğinden dolayı primer-prob yöntemi ile kRT-PZR analizine geçilmiştir.

4.2.2. UPL Prob kRT-PZR Anlatımı

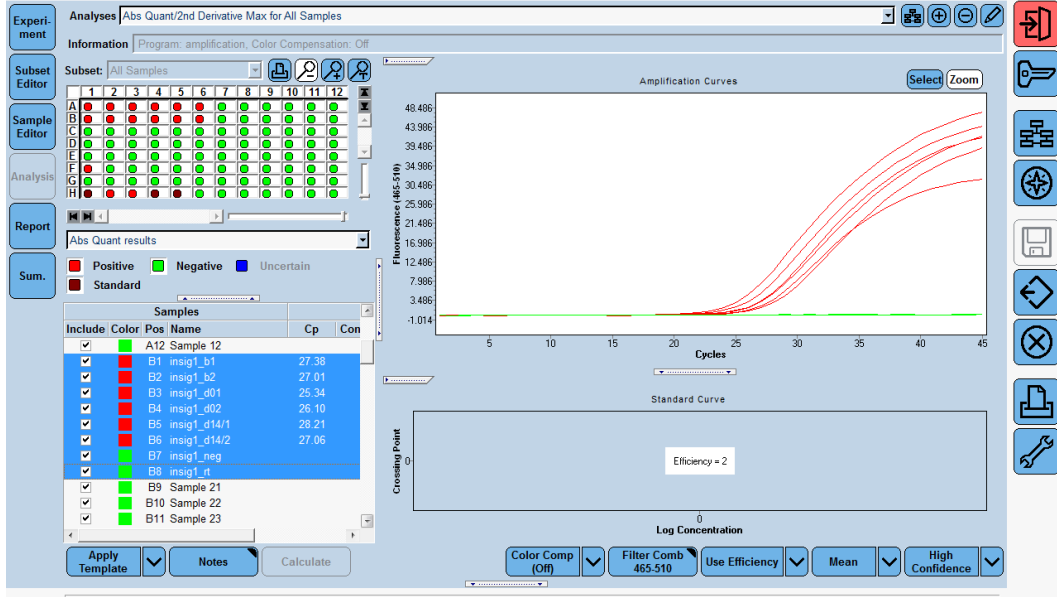
4.2.2.1. PZR Verim Hesaplama

Farklı günlerde gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR çalışmalarını karşılaştırmak için yöntem kısmında anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır, sonrasında 1:1, 1:10, 1:100 oranında sulandırılmış bir bazal hücrelerden elde edilmiş cDNA *PPIA housekeeping* geni için kRT-PZR PZR veriminin hesaplandığı deneyde 3 farklı cDNA dilüsyonu tek örnek olacak şekilde çalışılmıştır ve bu deney yalnızca *PPIA* referans geni için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri ile standart eğri oluşturulmuştur. Doğrusal denklemin eğimi, Excel'deki eğim hesabı formülüne göre verimliliği hesaplamak için kullanılmıştır. Şekil 4-7'de gösterilen eğim $\sim -2,91$ olarak hesaplanmıştır. Bu eğime göre *PPIA* verimi $\sim \%113$ çıkmıştır.



Şekil 4-7. Değişik konsantrasyonlara sahip cDNA'ya bağlı *PPIA* verimi

SYBR Green I ile hesaplanamayan *INSIG1* gen anlatım düzeyleri, UPL primer-prob sistemi kullanılarak, LC480 cihazında (Light Cycler®480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science) hesaplanmıştır. Her bir PZR için 96 kuyu içeren plateler kullanılarak aynı deney protokolü ile bağımsız iki deney yapılmıştır. Her bir deney, ikişer kopya olacak şekilde çalışılmıştır. Deneylerden birine ait olan amplifikasyon eğrisi Şekil 4-8'de gösterilmektedir.



Şekil 4-8. UPL Pro kantitatif RT-PZR görüntüsü

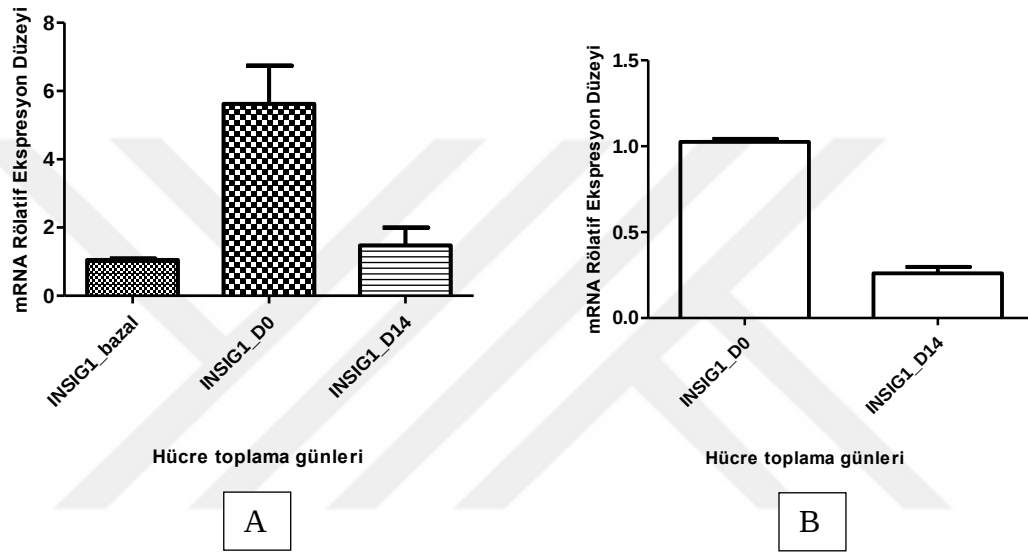
14 günlük hücre farklılaşması kapsamında 0. ve 14. günlerde toplanan örneklerin kRT-PZR ile ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4-1). Sonuçlara ilişkin $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplamaları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4-1. INSIG1 kRT-PZR ile ekspresyon miktarının istatistiksel analizleri

			$2^{-\Delta\Delta CT}$ ortalaması	Standart Sapma
A	1. Deney	Bazal	1,0065	0,1620
		DAY 0	4,5055	1,8245
		DAY 14	0,9623	0,1082
	2. Deney	Bazal	1,0902	0,5768
		DAY 0	6,7454	1,0247
		DAY 14	1,9944	0,9756
B	1. Deney	DAY 0	1,0437	0,4226
		DAY 14	0,2229	0,0250
	2. Deney	DAY 0	1,0073	0,1530
		DAY 14	0,2978	0,1457

Tablo 4-1, A’da verilen bilgiler Şekil 4-9’daki A grafiğine aittir. B’de verilen bilgiler ise Şekil 4-9’daki B grafiğine aittir. GraphPad yazılımına girilen bu veriler ile aşağıdaki bahsedilen grafikler oluşturulmuştur.

INSIG1 gen fonksiyonu hücre kültürü protokolü uygulandıktan 24 saat sonra (0. gün (DAY 0)) yaklaşık 4 kat artmıştır ve mikroarray sonuçlarıyla aynı yönlü olarak DAY 0’dan DAY 14’e azalmış ve 14. günün sonunda (DAY 14) yine bazal haline yakın bir seviyeye gelmiştir (Şekil4-9).



Şekil 4-9. *INSIG1* geninin belirlenen günlerde toplanan hücrelerdeki mRNA rölatif ekspresyon miktarları ve karşılaştırması

Şekil 4-9’da verilen grafiklerde Bazal, DAY 0 ve DAY 14 örneklerine ait anlatım farkları gösterilmiştir. Ayrıca kalibratör olarak; A’da *INSIG1_bazal* ve B’de *INSIG1_D0* sadece normalizasyon amacıyla kullanılmıştır ve sayısal değer olarak 1’e karşılık gelmektedir. Örneklerdeki rölatif artış ve azalışlar bu kalibratörler sabit kabul edilerek değerlendirilmiştir.

A’da verilen grafiklerde bazal kalibratör olarak seçilmiştir. Değişimin anlamlandırılması için ANOVA ile hesaplanmıştır. Sonuçta $p=0,0347$ ($p<0,05$) ile değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.

B’de verilen grafiklerde DAY0 kalibratör olarak seçilmiştir. Değişimin anlamlandırılması için t Test ile hesaplanmıştır. Sonuçta $p=0,0029$ ($p<0,05$) ile değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.

4.3. *INSIG1* DNA Dizi Analizi

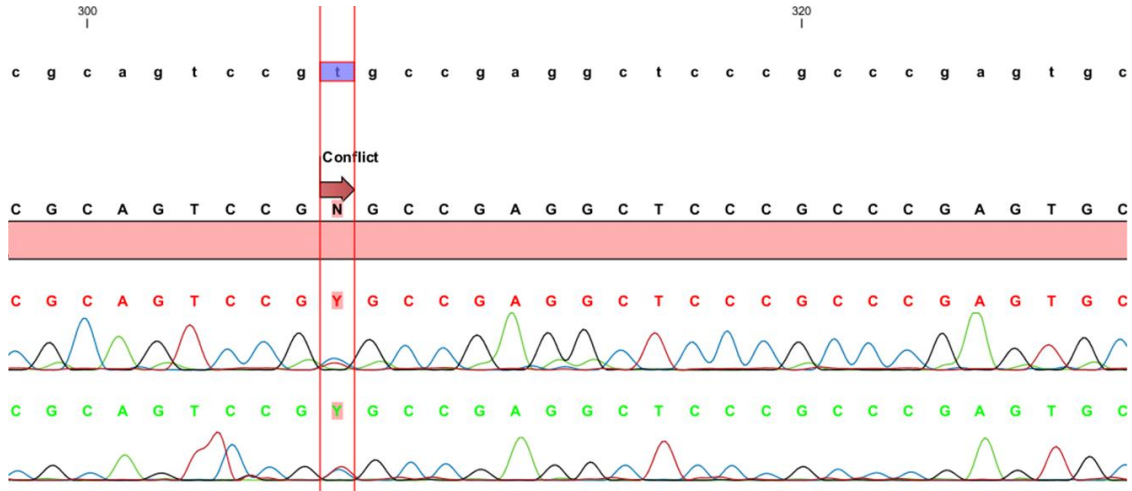
INSIG1 genine ait Fragmanlar, kodlayan/kodlanmayan gen bölgelerinin bazal ve DAY 14 örneklerinde çoğaltılmıştır. PZR ile çoğaltılmasını takiben doğrudan dizileme yöntemi ile dizilenmiş ve elde edilen varyantların olası etkileri NCBI, Ensembl, ExAC Browser, GnomAD Browser, Mutation Taster veritabanlarında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda bazal ve Day 14'teki değişimler aynı çıkmıştır ve Fragmanlara ait bulunan farklı varyantlar ayrıntılı olarak Tablo 4-2'de sunulmuştur.

Tablo 4-2. *INSIG1* gen taramasında saptanan varyantların listesi

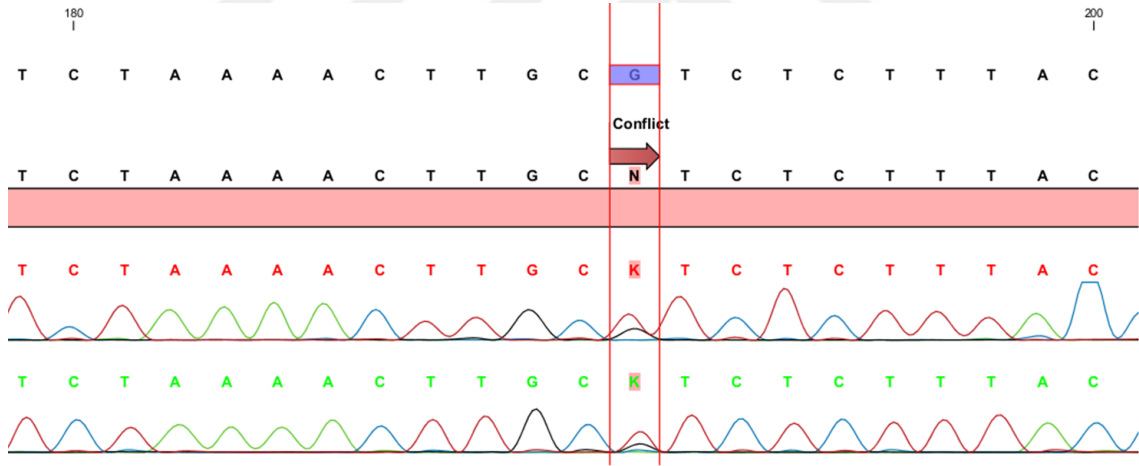
Adı	Kromozomal pozisyon (GRCh38/hg38)	GRCh37/hg19 pozisyonu	SNP Numarası	MAF**	Değişim (Heterozigot)	Değişimin gendeki konumu
Fr 1	chr7:155297634	155089344	-	-	T>C	Intron
Fr 2*	-	-	-	-	-	-
Fr 3*	-	-	-	-	-	-
Fr 4*	-	-	-	-	-	-
Fr 5	chr7:155302693	155094593	rs11772189	0,31	NM_005542.5: c.804+37G>T	Intron
Fr 6	chr7:155303908	155095618	-	-	NM_198336.3: c.419+13G>A	Intron
Fr 7	chr7:155308225	155099935	-	-	NM_005542.5: c.805-16delT	Intron
Fr 8*	-	-	-	-	-	-
Fr 9*	-	-	-	-	-	-
Fr 10	chr7:155310280	155101990	-	-	G>T	Intron
	chr7:155310205	155102015			G>A	

*Yabanıl tip (*wild type*)

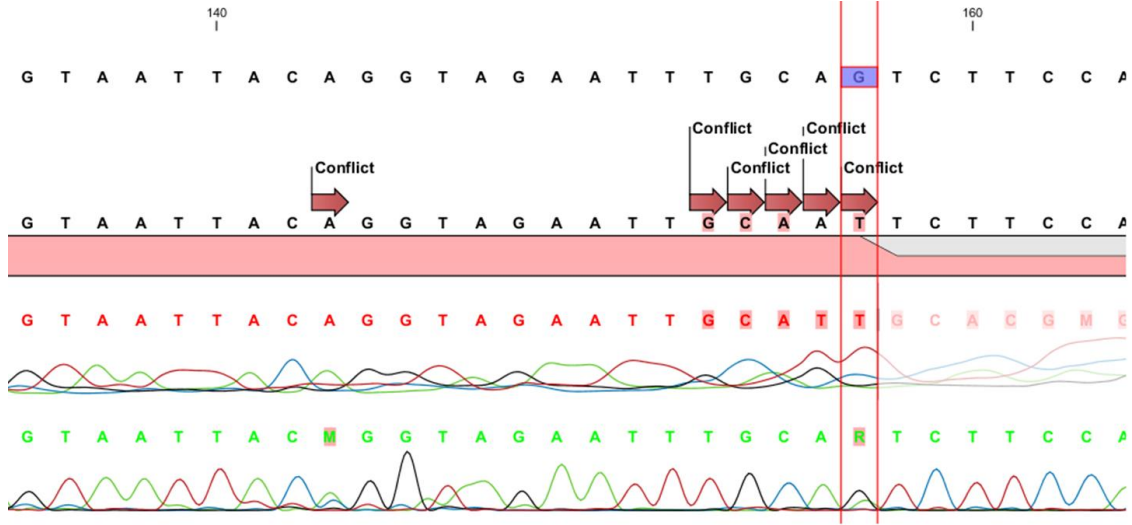
**MAF: Popülasyondaki görülme sıklığı (*Minor Allele Frequency* (MAF))



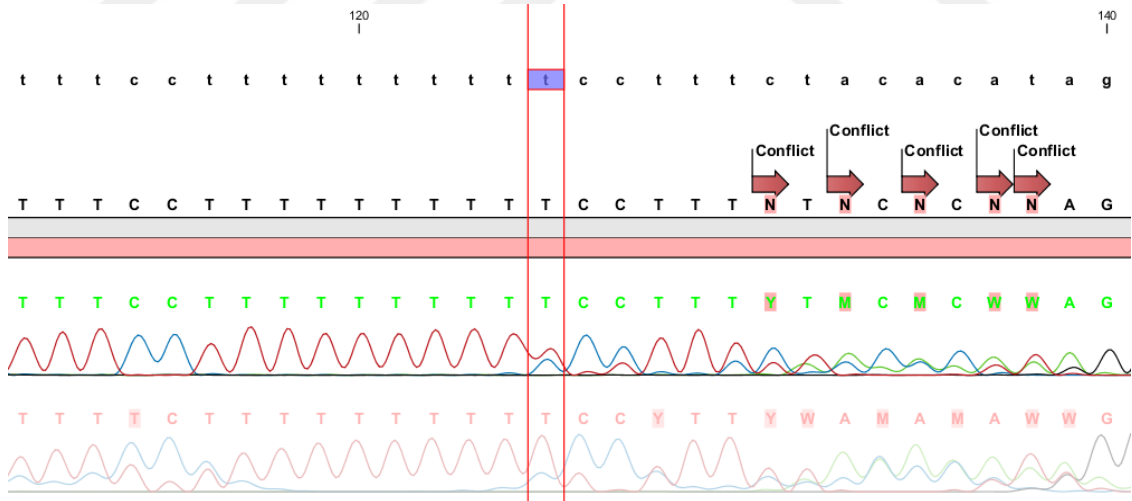
Şekil 4-10. Fragman 1'e ait dizinin T>C heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü



Şekil 4-11. Fragman 5'e ait dizinin NM_005542.5: c.804+37G>T heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü



Şekil 4-12. Fragman 6'ya ait dizinin NM_198336.3: c.419+13G>A heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü



Şekil 4-13. Fragman 7'ye ait dizinin NM_005542.5: c.805-16delT heterozigot değişimin kromatogram görüntüsü

Tablo 4-2’de gösterilen varyant NM_005542.5: c.805-16delT Fragman 7’deki değişim Mutation Taster raporunda polimorfizm olarak verilmiştir (Şekil 4-11)

Mutation Taster [documentation](#)

mutation t@sting

Prediction **polymorphism** **Model: without_aae, prob: 0.99997907099063** [\(explain\)](#)

Summary [hyperlink](#)

- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr7:155099935_155099935delT
HGNC symbol	INSIG1
Ensembl transcript ID	ENST00000340368
Genbank transcript ID	NM_005542
UniProt peptide	Q15503
alteration type	deletion
alteration region	intron
DNA changes	g.10450_10450delT
AA changes	N/A
possibility of altered AA	N/A
if AA alteration in CDS	N/A
frameshift	N/A
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC

Şekil 4-14. Fragman 7'ye ait tespit edilen değişimin Mutation Taster raporu

Fragman 7’ de ki NM_005542.5: c.805-16delT intronik bölgede meydana gelen değişimin Human Splicing Finder veritabanında kırılmayla ilgili tahmini hesabı Şekil 4-12’de gösterilmektedir.

Human Splicing Finder [Aix-Marseille University](#) [Inserm](#)
GENETICS & BIOINFORMATICS TEAM

Home Analyse Now! What's New? Help & Tutorials Credits & Publications Our Other Tools Contact Us Other Analysis

Results

Sequences

Reference sequence [INSIG1](#) Gene > [ENST00000476756](#) Transcript

1 caatctttcc catgttagga cctacttaat tggtaattaa aatatttata catttagtgc taattttctc ttctcatttt ttttcccttt ctacacatag
101 [GGTGTTCCTG](#) AAAAGCCCCA TAGTGATTGA
Total sequence length: 130 nucleotides

Mutant sequence Deletion at position 85 (1 nucleotides deleted)

1 caatctttcc catgttagga cctacttaat tggtaattaa aatatttata catttagtgc taattttctc ttctcatttt ttttcccttt ctacacatag
101 [GGTGTTCCTG](#) AAAAGCCCCA TAGTGATTGA
Total sequence length: 130 nucleotides

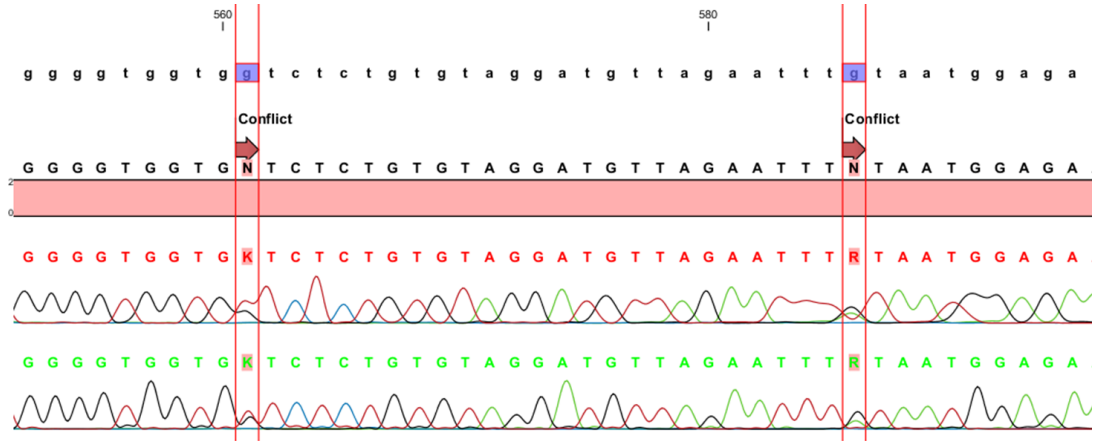
The sequences analyzed in HSF are [underlined](#).

Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.
The mutation occurs in the late intronic positions, the following table show results of acceptor splice sites that could be affected by the mutation

No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.

Şekil 4-15. Fragman 7'deki NM:005542.5: c.805-16delT numaralı varyantının HSF veritabanı fenotip tahmini



Şekil 4-16. . Fragman 10'a ait dizinin G>T ve G>A heterozigot değişimlerinin kromatogram görüntüsü

Sonuç olarak gerçekleştirdiğimiz tez projesi kapsamında elde edilen varyantların, TÜBİTAK projesi kapsamında uygulanan 14 günlük farklılaşma protokolü kaynaklı olmadığı görülmüştür, çünkü bazal ve DAY 14'te aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu şekilde *INSIG1* geni karakterize edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Pankreasın hormonal açıdan ve organizmanın dengesi açısından merkezi role sahip olmasından yola çıkarak TÜBİTAK-INTENC projesi kapsamında PANC-1 hücre hattı farklılaştırması yapılmıştır. Farklılaşan hücrelerin öncesi ve sonrası karşılaştırılması mikroarray analizi ile irdelenmiş ve bunun sonucunda *INSIG1*'in anlamlı değişim gösteren genler arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu tez projesinde, *INSIG1* geninin diğer genler ve yollar ile ilişkisi araştırılarak pankreastaki önemi vurgulamak ve bir önceki proje çıktılarından *INSIG1* genindeki değişimin anlamlandırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda iki temel çalışma gerçekleştirilmiştir: İkincil bir metot olan kRT-PZR ile TÜBİTAK-INTENC projesinden *INSIG1* için elde edilmiş mikroarray sonuçlarını doğrulamak ve PANC-1 farklılaşması sonucunda *INSIG1* gen dizisinde oluşabilecek herhangi bir değişimi tespit etmek için DNA dizi analizi gerçekleştirmek.

Bu doğrultuda, kRT-PZR öncesi yapılan optimizasyonlar sonucunda her ne kadar *ACTB*, *GAPDH* ve *PPIA* genlerinin özgünlüğü agaroz jelde tespit edilmiş olsa da, farklılaşan hücrelerde gerçekleştirilen kRT-PZR'de sonuçlarına göre bu *housekeeping* genlerden en stabil anlatım sergileyeninin *PPIA* geni olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple *PPIA* geni ekspresyon analizinde *housekeeping* gen olarak tercih edilmiştir.

SYBR Green I yöntemi sonrasında floresan ışımanın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için erime eğrisi (*melting curve*) analizi yapılır [96]. Tez çalışmasında SYBR Green yöntemi kullanılmasının sonucunda *INSIG1* geni erime eğrisi analizinde birden fazla pik-tepecik (*peak*) görülmektedir. Deney sonrası yapılan jel elektroforezinde de birden fazla bant görülmektedir. Bu verilerden dolayı primerlere özgü alanın çoğaltılamaması sebebiyle UPL prob yöntemi kullanılmıştır.

Kantitatif PZR çalışmalarından önce çalışılacak her bir gen için PZR veriminin hesaplanması ve genlere ait bu verimin birbirine paralel olması beklenmektedir. Ancak bu hesap maliyeti oldukça arttırdığından en azından kRT-PZR'de kullanılacak *housekeeping* geninin PZR verimini hesaplamak gerektiğini düşünmekteyiz. Çünkü bu hesap bize yalnızca bu *housekeeping* gene özgü PZR verimini vermekle kalmayacak,

aynı zamanda bu genin hesaplamaya uygun stabil anlatım sergileyen, *housekeeping* gen amacına uygun olup olmadığını da gösterecektir. Bu kapsamda, PZR verimi standart eğrinin eğimi ile doğru orantılıdır ($\text{Verim} = [10^{(-1/\text{eğim})}] - 1$). Buna göre -3.332'lik bir eğim %100'lük bir verime karşılık gelir [99]. Normalde %100 verim göstermek için her örnekten en az iki kopya halinde çalışılması gerekmektedir. Bu kopyaların ortalamaları alınarak standart hata en aza indirilir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen PZR veriminin hesaplandığı deneyde 3 farklı cDNA dilüsyonu tek örnek olacak şekilde çalışılmıştır ve bu deney yalnızca *PPIA* referans geni için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *PPIA* verimi ~ %113 çıkmıştır. Sonuçta verimin %90-110 aralığında çıkması kabul edildir [99]. Çıkan sonuç verilen değer aralığına oldukça yakındır ve muhtemelen pipetaj hatasından doğan bir fark nedeniyle üst sınırı biraz geçmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda maliyeti arttırmamak adına, *INSIG1* geninin de *housekeeping PPIA* genine paralel PZR verimliliğine sahip olduğunu varsayarak doğrudan kRT-PZR deneylerine geçilmiştir. Bu varsayımı yapabilmemizin önemli bir nedeni ise aynı firmaya ait standart primer-prob çiftleri ile amplifikasyon kitlerini kullanmamız gösterilebilir.

SYBR Green metodu ile analizi gerçekleştirilemeyen *INSIG1* geni için diziye özgü bağlanma sağlayan UPL prob yöntemi ile diziye özgü primerler tasarlanarak dizinin çoğaltılması gerçekleştirilmiş ve floresan ışığa yaptığı görülmüştür. Daha sonra yapılan $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla verilerin analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, mikroarray çıktıları ile örtüşmektedir ancak iki deney bire bir aynı ekspresyon kat sayı farkına sahip değildir (mikroarray 4,81 kat değişim verirken bizim deneylerimiz sonucunda 4,03 kat değişim elde edilmiştir.). Bunun nedeni tez çalışmasında kullanılan UPL prob yönteminde yalnızca şekil 3-3'te gösterilen *INSIG1* transkriptine ait kantitasyonun hesaplanmasıdır. Bu şekilde, çalışma tek bir transkript üzerinden yapılmıştır, ancak mikroarray yönteminde ise hücrelerde olası birden fazla *INSIG1* transkriptini yakalayarak total bir sonuç verilmektedir.

Kantitatif PZR için gerçekleştirilen deneylerde bazal, 0 ve 14. günlere ait tüm örnekler iki kopya olarak çalışılmıştır ve deneyler tekrarlı olarak çalışılamamıştır. Bu durum nedeniyle çalışmamızda yer alan örneklerin standart sapmasının beklenenden daha fazla olduğu düşünülmektedir. Bu sapmanın nedenleri arasında deneylerde kullanılan örneklerin pipetajlarında varyasyonlar olma durumu düşünülmektedir.

Sonuçta elde edilen bulgular bazal (farklılaşmamış örnekler) sonuçlarını kontrol olarak DAY 0 ve DAY 14 ile karşılaştırılarak ekspresyon kat farkı ile farklılaşmanın istatistiksel olarak anlamlandırılması sağlanmıştır. Ayrıca, DAY 0 sonuçlarını kontrol olarak DAY 0 ve DAY 14 ile kıyaslandığında mikroarray çıktılarındaki *INSIG1* anlatımının farklılaşmış hücrelerdeki KRT-PZR anlatımıyla doğru orantılı olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda insüline proliferatif yanıt verdiği bildirilen PANC-1 hücrelerinin farklılaşma protokolü sonrasındaki *INSIG1*'in anlamlı değişimi ile ilişkilendirilebileceğini düşünmekteyiz. Bu açıdan yapılan çalışmada elde edilen bulgular daha önce yapılmış olan yayınlarda iddia edilenleri desteklemektedir.

Gerçekleştirilen bu tezde, PANC-1 hücre hattında ilk kez *INSIG1* geni dizilenmiştir. Ayrıca, TÜBİTAK-INTENC projesi ile ilk kez PANC-1 hücre hattında uygulanan 14 günlük farklılaşma protokolünün *INSIG1* gen dizisinde herhangi bir değişime sebep olmadığı da bazal ve farklılaşmış PANC-1 hücreler karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Bu kapsamda *INSIG1* geni PANC-1 hücre hattında ilk kez karakterize edilerek çıkan sonuçlarda Tablo 4-1'de verilen varyasyonlar tanımlanmıştır. Veritabanlarında bu varyasyonlardan rs11772189 numaralı varyantın popülasyonda görülme sıklığı yüksek bulunmuştur, muhtemelen polimorfizmdir ve bu hücre hattına özgü bir değişim değildir. Diğer varyantlar için herhangi bir tek nükleotit polimorfizmi bulunamamıştır ve veritabanlarında da yoktur. *INSIG1* gen dizilemesi sonucu bulunan varyantların, CLINVAR'da yapılan incelemeleri sonucunda da herhangi bir hastalıkla ilişkisi bulunamamıştır. Bu varyantlar hücre hattına özgü değişimlerdir ve ilk kez bu çalışmada bildirilmektedir. Kullanılan PANC-1 hücre hattı, bir kanser hücre hattıdır ve bu sebeple pasajlamalarla mutasyonlara da uğradığı göz önünde bulundurulmalıdır, fakat pankreasa ilişkin çalışmalarda bu hücre hattı sıkça kullanılmaktadır. *INSIG1* geninin ise diyabetle ilişkili ve diğer metabolik yollarda merkezi role sahip bir gen olarak, bu hücre hattında tanımlanmasının *INSIG1*'in rol aldığı yollarda yapılacak olan gelecek çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Bu sonuçtan yola çıkarak farklılaşma protokolünün, PANC-1 hücrelerinin gelişimini uyardığı ve gen dizilerinde herhangi bir değişime yol açmadığı düşünülmektedir. Transkripsiyon faktörleri ile etkileşim yoluyla, DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, gen ekspresyonunu düzenleyebilir. Bu sebeple gen anlatımını değiştiren faktörlerin, epigenetik mekanizmalara bağlı ve/veya *INSIG1* ile

ilişkili olan diğer genlerdeki dizilerde meydana gelen mutasyonlar olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu tez kapsamında elde edilen veriler, *INSIG1* geni ile ilişkili olan diğer genlerin anlatım düzeylerine bakılarak farklılaşmış PANC-1 hücrelerindeki bu genlerin ve yolakların mekanizmasının incelenmeye değer olduğunu belirtmektedir. Çalışmanın sonraki hedefleri arasında PANC-1 hücre hattında *INSIG1* geninin de içinde bulunduğu SREBP yolağındaki diğer genlerin de anlatımlarına bakılarak yolak analizi yapılabilir ve böylece kolesterol ve yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan genler ile PANC-1 hücre hattının bu düzenlemede ilişkisi bakılarak, *in vitro* çalışmalar için model olarak kullanılması için araştırılabileceği düşünülmektedir.

MikroRNA'lar, diziye özgü bir şekilde hedef genlerinin transkripsiyon sonrası regülasyonunda yer alan küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Ortaya çıkan kanıtlar miRNA'ların, lipid sentezi, yağ asidi oksidasyonu ve lipoprotein oluşumu ve sekresyonunun kritik düzenleyicileri olduğunu göstermektedir [100]. Bunlardan miR24'ün, *INSIG1*'i baskılayarak hepatik lipid birikimini ve hiperlipidemiye desteklediği gösterilmiştir ve NAFLD ve/veya ateroskleroz için potansiyel bir terapötik ajan olarak miR24 inhibitörünün kullanılabileceği önerilmiştir [101]. Bu verilerden yola çıkarak PANC-1 hücre hattında benzer bir çalışma yapılarak *INSIG1* geninin bu hücre hattındaki etkinliği gelecek çalışmalarda araştırılabilir. Buna ilave olarak, insülin ile uyarılan PANC-1 hücre hattının insüline proliferatif yanıt verdiği bildirilmiştir [37]. Gelecek çalışmalarda, PANC-1 hücrelerinde *INSIG1* genini hedefleyen miRNA'lar ile bu genin susturulması yapılarak insülin proliferasyonuna etkisi araştırılabilir. Elde edilen yanıtı göre 14 günlük farklılaşma protokolü ve miRNA'ların etkisinin birlikte kullanılması ile PANC-1 hücrelerinin diyabet modeline dönüştürülmesi sağlanabilir ve belki yeni diyabet ilaçlarının *in vitro* taramalarında kullanıma konulabilir.

Sonuçta pankreasın merkezi rolü ile metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi sebebiyle PANC-1 hücre hattında yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. Bu sebeple *INSIG1* geniyle ilişkili diğer genler ve bağlantılı bulunduğu yolakların analizlerinin araştırılarak ilişkili olduğu diğer hastalıkların aydınlatılmasında PANC-1 hücre hattı model olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Boles, A., R. Kandimalla, and P.H. Reddy, *Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1863**(5): p. 1026-1036.
2. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2010. **33 Suppl 1**: p. S62-9.
3. Das, S.K. and S.C. Elbein, *The Genetic Basis of Type 2 Diabetes*. Cellscience, 2006. **2**(4): p. 100-131.
4. Lin, Y. and Z. Sun, *Current views on type 2 diabetes*. J Endocrinol, 2010. **204**(1): p. 1-11.
5. Majithia, A.R. and J.C. Florez, *Clinical translation of genetic predictors for type 2 diabetes*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(2): p. 100-6.
6. Bjornholm, M. and J.R. Zierath, *Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 354-7.
7. Rudy Bilous, R.D., *Handbook of Diabetes, 4th Edition*. (Excerpt #4: Normal Physiology of Insulin Secretion and Action).
8. Dimitriadis, G., et al., *Insulin effects in muscle and adipose tissue*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S52-9.
9. <http://www.who.int/diabetes/en/>.
10. Chan, M.T., et al., *Effects of insulin on human pancreatic cancer progression modeled in vitro*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 814.
11. Heber, D., *An integrative view of obesity*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(1): p. 280S-283S.
12. Tsai, A.G., D.F. Williamson, and H.A. Glick, *Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systematic review*. Obes Rev, 2011. **12**(1): p. 50-61.
13. Berghofer, A., et al., *Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review*. BMC Public Health, 2008. **8**: p. 200.
14. <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
15. Drager, L.F., et al., *Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(7): p. 569-76.
16. Paniagua, J.A., *Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome*. World J Diabetes, 2016. **7**(19): p. 483-514.
17. O'Neill, S. and L. O'Driscoll, *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. Obes Rev, 2015. **16**(1): p. 1-12.
18. Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in, *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
19. Grundy, S.M., *Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 1999. **83**(9B): p. 25F-29F.
20. <https://www.healthline.com/health/metabolic-syndrome#risk-factors>.

21. Santilli, F., et al., *Metabolic Syndrome: Sex-Related Cardiovascular Risk and Therapeutic Approach*. Curr Med Chem, 2017. **24**(24): p. 2602-2627.
22. Mottillo, S., et al., *The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(14): p. 1113-32.
23. Sperling, L.S., et al., *The CardioMetabolic Health Alliance: Working Toward a New Care Model for the Metabolic Syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(9): p. 1050-67.
24. *Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease. A joint editorial statement by the American Diabetes Association; The National Heart, Lung, and Blood Institute; The Juvenile Diabetes Foundation International; The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and The American Heart Association*. Circulation, 1999. **100**(10): p. 1132-3.
25. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
26. Grundy, S.M., et al., *Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. Circulation, 1999. **100**(10): p. 1134-46.
27. Emerging Risk Factors, C., et al., *Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies*. Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2215-22.
28. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
29. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(44): p. 9694-9705.
30. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/pancreatic-cancer/mortality#heading-One>.
31. Wolfgang, C.L., et al., *Recent progress in pancreatic cancer*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(5): p. 318-48.
32. Soreide, K. and M. Sund, *Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer*. Cancer Lett, 2015. **356**(2 Pt A): p. 281-8.
33. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
34. Zhang, C., et al., *The early diagnosis of pancreatic cancer and diabetes: what's the relationship?* J Gastrointest Oncol, 2014. **5**(6): p. 481-8.
35. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.
36. Bonner-Weir, S., et al., *A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development*. Diabetes, 1993. **42**(12): p. 1715-20.
37. Hardikar, A.A., et al., *Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7117-22.
38. Dong, X.Y. and S.Q. Tang, *Insulin-induced gene: a new regulator in lipid metabolism*. Peptides, 2010. **31**(11): p. 2145-50.
39. Diamond, R.H., et al., *Novel delayed-early and highly insulin-induced growth response genes. Identification of HRS, a potential regulator of alternative pre-mRNA splicing*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15185-92.
40. Mohn, K.L., et al., *The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells*

- and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(1): p. 381-90.
41. Peng, Y., et al., *Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene*. *Genomics*, 1997. **43**(3): p. 278-84.
 42. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INSIG1>.
 43. Feramisco, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 8487-96.
 44. Yabe, D., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12753-8.
 45. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=INSIG2>.
 46. Radhakrishnan, A., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(16): p. 6511-8.
 47. Yang, T., et al., *Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER*. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 489-500.
 48. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11041-8.
 49. Espenshade, P.J., *SREBPs: sterol-regulated transcription factors*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 6): p. 973-6.
 50. Shimano, H. and R. Sato, *SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology*. *Nat Rev Endocrinol*, 2017. **13**(12): p. 710-730.
 51. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
 52. Goldstein, J.L., R.B. Rawson, and M.S. Brown, *Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2): p. 139-48.
 53. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 331-40.
 54. Horton, J.D., et al., *Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12027-32.
 55. Nohturfft, A., et al., *Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11235-40.
 56. Nohturfft, A., et al., *Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes*. *Cell*, 2000. **102**(3): p. 315-23.
 57. Espenshade, P.J., W.P. Li, and D. Yabe, *Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11694-9.
 58. Sun, L.P., et al., *Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(28): p. 26483-90.

59. Radhakrishnan, A., et al., *Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 259-68.
60. Sun, L.P., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6519-26.
61. DeBose-Boyd, R.A., *Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase*. Cell Res, 2008. **18**(6): p. 609-21.
62. Espenshade, P.J., et al., *Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22795-804.
63. Zelenski, N.G., et al., *Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21973-80.
64. Espenshade, P.J. and A.L. Hughes, *Regulation of sterol synthesis in eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 401-27.
65. Gong, Y., et al., *Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake*. Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 15-24.
66. Song, B.L., N. Sever, and R.A. DeBose-Boyd, *Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 829-40.
67. Takaishi, K., et al., *Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7106-11.
68. Li, J., et al., *Insig-1 "brakes" lipogenesis in adipocytes and inhibits differentiation of preadipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9476-81.
69. Taghibiglou, C., et al., *Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries*. Nat Med, 2009. **15**(12): p. 1399-406.
70. Liu, F.H., et al., *The gene-gene interaction of INSIG-SCAP-SREBP pathway on the risk of obesity in Chinese children*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 538564.
71. Herbert, A., et al., *A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity*. Science, 2006. **312**(5771): p. 279-83.
72. Mullis, K.B., *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Sci Am, 1990. **262**(4): p. 56-61, 64-5.
73. Erlich, H.A., D. Gelfand, and J.J. Sninsky, *Recent advances in the polymerase chain reaction*. Science, 1991. **252**(5013): p. 1643-51.
74. M. A. Innis, D.H.G., John J. Sninsky, Thomas J. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990: p. 3-13.
75. Innis, M.A., et al., *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9436-40.
76. Don, R.H., et al., *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(14): p. 4008.

77. Hecker, K.H. and K.H. Roux, *High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR*. Biotechniques, 1996. **20**(3): p. 478-85.
78. Dorak, M.T., *Real-time PCR*. (An introduction to real-time PCR).
79. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-85.
80. Pabinger, S., et al., *A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data*. Biomol Detect Quantif, 2014. **1**(1): p. 23-33.
81. Rao, X., et al., *An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostat Bioinforma Biomath, 2013. **3**(3): p. 71-85.
82. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
83. RANDY RASMUSSEN, T.M., MARK HERRMANN, and CARL WITTEW, *Quantitative PCR by Continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA Specific Binding Dye*. BIOCHEMICA, 1998.
84. Liu, W. and D.A. Saint, *A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics*. Anal Biochem, 2002. **302**(1): p. 52-9.
85. Wilhelm, J. and A. Pingoud, *Real-time polymerase chain reaction*. Chembiochem, 2003. **4**(11): p. 1120-8.
86. Fernandez-Pinero, J., et al., *Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library*. Transbound Emerg Dis, 2013. **60**(1): p. 48-58.
87. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
88. Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(2): p. 560-4.
89. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-bio.html.
90. Hutchison, C.A., 3rd, *DNA sequencing: bench to bedside and beyond*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(18): p. 6227-37.
91. Chen, C.Y., *DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 305.
92. Heather, J.M. and B. Chain, *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. Genomics, 2016. **107**(1): p. 1-8.
93. Pettersson, E., J. Lundeberg, and A. Ahmadian, *Generations of sequencing technologies*. Genomics, 2009. **93**(2): p. 105-11.
94. <http://stmichaelshospitalresearch.ca/wp-content/uploads/2015/09/NanoDrop-ND-1000-Spectrophotometer.pdf>.
95. https://lifescience.roche.com/en_tr/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center.
96. Barbara D'haene, P.D.J.H.P.D., *The Importance of Quality Control During qPCR Data Analysis*. 2010.
97. Randy Rasmussen, T.M., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. biochemica, 1998.

98. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. Biotechniques, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.
99. Svec, D., et al., *How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments*. Biomol Detect Quantif, 2015. **3**: p. 9-16.
100. Yang, Z., T. Cappello, and L. Wang, *Emerging role of microRNAs in lipid metabolism*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 145-50.
101. Ng, R., et al., *Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia*. Hepatology, 2014. **60**(2): p. 554-64.



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FARKLILAŞMIŞ PANC-1 HÜCRELERİNDE INSIG1 GENİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 1	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNT ERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	% 1
2	batem.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.ozdaglab.com İnternet Kaynağı	% 1
4	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	biyokure.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Meryem Sema	Soyadı	AYAZ
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	14.01.1991
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	20630491320
Email	m.semaayaz@hotmail.com	Tel	05536202497

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2018
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Yenilevent Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi