

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAF7-CIITA ETKİLEŞİMİNİN
PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DİLEK GÖKTÜRK

İZMİR 2012

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2007970135

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAF7-CI İTİ ETKİLEŞİMİNİN
PROGRAMLANMIŞ
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TİBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DİLEK GÖKTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr ZEYNEP SERCAN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma projeleri Şube Müdürlüğü 2007.KB.SAG.024 ile
No.lu ve TÜBİTAK 109T937 No.'lu projeler ile desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU.HSI.PHD-2007970135

T.C.
DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

**INVESTIGATING THE EFFECTS OF CIITA –
TAF7 INTERACTION ON PROGRAMMED CELL
DEATH**

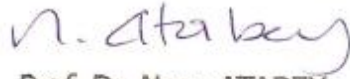
MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS DEPARTMENT
PHYLOSOPHY OF DOCTORATE THESIS

DİLEK GÖKTÜRK

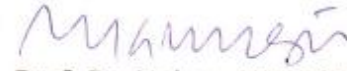
Coordinator of Thesis: Assoc. Prof. ZEYNEP SERCAN MD. PhD

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Dilek
Göktürk '**TAF7 – CIITA Etkileşiminin Programlanmış Hücre Ölümü**
Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması' konulu Doktora tezini
24/07/2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. Zeynep SERCAN
BAŞKAN


Prof. Dr. Neşe ATABEY

ÜYE


Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

ÜYE


Doç. Dr. Gülperi ÖKTEM

ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU

ÜYE

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLO DİZİNİ.....	VI
ŞEKİL DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR.....	XI
TEŞEKKÜR.....	XIII
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1 HIV Enfeksiyonu ve Virusü	10
2.2 HIV – Tat Geni ve İşlevleri	12
2.3. HIV – Tat Geni ve Apoptoz.....	13
2.4. HIV – Tat Geninin Ökaryotik Homoloğu Olarak TAF7.....	14
2.5. Transkripsiyon	16
2.6. Ökaryotlarda Transkripsiyon Başlama (İnisiyasyon) Kompleksinin Oluşturulması ..	16
2.7 TFIID’ nin Yapısı	19
2.8.TAF7 ve İşlevleri	21
2.9. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz).....	22
2.9.1 Kaspazlar	23
2.9.2 Apoptoz Mekanizmasının Kontrolü	24
2.9.3 Mitokondriyal Düzenleme.....	25
2.9.4 Ekstrinsik Yolak	26
2.9.5 Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu	27
2.9.6 Hücre Yaşam Sinyalleri	27
2.10 Hücre Döngüsü	28
2.10.1.Hücre Döngüsü Fazları.....	28
2.10.2.Hücre Döngüsünün Kontrol Edilmesi	29
2.10.3.Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	30
2.10.4. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar	34
2.11.MHC Sınıf II Molekülleri Ve Sınıf II Transaktivator (CIITA)	36

2.11.1. MHC Sınıf II Molekülleri	36
2.11.2 Sınıf II Transaktivatör (CIITA)	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1 Hücre Hatları Ve Hücre Kültürü	43
3.2. Tripan Mavisi Canlılık Testi	44
3.3. Transfeksiyon Yöntemi Optimizasyonu	45
3.4. Lüsüferaz Takılı Plasmid Kullanılarak Transfeksiyonda Kullanılabilecek Optimum Plasmid Konsantrasyonunun Belirlenmesi	47
3.5. Trex Sistemine TAF7 Nin Klonlanması Ve Stabil .Transfeksiyon	48
3.5.1. Plasmidlerin Maxi Prep İle Çoğaltılması	51
3.5.2. pcDNA 4 TO' ya TAF7 Klonlanması	52
3.5.3 pcDNA 4 TO Lacz Transfeksiyonu Sonrası Beta Gal Assay İle Doksisiklin Doz ve İnkübasyon Süresi Optimizasyonu	58
3.5.4. pcDNA 4 TO TAF7 Plasmidinin TREX Hela Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu ...	59
3.6. Site Directed Mutagenesis İle pcDNA 4 To TAF7'nin Serin 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi Ve Bu Plasmidin Trex Hela Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu	60
3.6.1. Site Directed Mutagenesis İle Pcdna 4 To TAF7 nin Serin 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi	61
3.6.2 pcDNA 4to TAF7 Mutant (Ala Substitution) Plasmidinin Trex Hela Hücrelerine Stabil Olarak Transfekte Edilmesi	63
3.7. Pcdna 4to TAF7 Trex Hela Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması İle TAF7 Ekspresyon Düzeyi Değişikliğinin Western Blot Yöntemi İle Araştırılması	63
3.8. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem ile TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	64
3.9. CIITA'in TAF7 nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	65
3.9.1 CIITA'in TAF7 nin Geçici Transfeksiyonu İle Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	65
3.9.2 Stabil pcDNA 4 TO TAF7 Ve Boş Transfekte Trex Hela Hücreleri ile Cıta'in TAF7'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	67
3.10. CIITA'İN Mutant Formlarının TAF7'NİN Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	68

3.11. TAF7’NİN Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması	68
3.11.1 TAF7 nin Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	70
3.11.2 TAF7’nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	71
3.11.3 TAF7’nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı proteinler (TBP, BSA ve HIV TAT) ile Kontrol Edilmesi	71
3.11.3.a TAF7’nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (TBP) ile Kontrol Edilmesi	71
3.11.3.b TAF7’nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (BSA) ile Kontrol Edilmesi.....	72
3.11.3.c HIV TAT’ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması	72
3.12. TAF7 nin Beta Tubulin İle İlişkisinin İmmün Presipitasyon Deneyi (in vivo) İle Belirlenmesi	72
3.13. TAF7’nin Tubulin Proteinleri İle İlişkisinin In Vitro İmmün Presipitasyon Deneyi İle Araştırılması	73
3.14. TAF7 İle Beta Tubulin İlişkisinin Konfokal Mikroskopî İle Araştırılması	75
3.15. TAF7 VE Beta Tubulin Floresan Mikroskopide Görüntüleme	77
3.16. TAF7 Over Ekspresyonunun Bcl 2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot İle Araştırılması.....	78
3.17. İmmün Presipitasyon Deneyi İle TAF7 – Caspase 2L Arasındaki İlişkinin Araştırılması.....	79
3.18. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 Ve Ser 159 Mutant TAF7’nin Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 Ve Ser 159 Mutant TAF7’nin Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	80
3.19. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem (TREX) Hela Hücreleri ile Senkronizasyon Çalışmaları.....	81
4.BULGULAR	82
4.1. Transfeksiyon Yöntemi Optimizasyonu	82
4.1.1 Fugene ve Lipofektamin ajanları ile transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması	82
4.1.2 Fugene ve CaCl ₂ ile transfeksiyon denemesi	83

4.2 Lüsüferaz Takılı Plasmid Kullanılarak Transfeksiyonda Kullanılabilecek Optimum Plasmid Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	84
4.3 TREX Sistemine TAF7' nin Klonlanması Ve Stabil Transfeksiyon	85
4.4 .Site Directed Mutagenesis İle Pcdna 4 To TAF7 nin Serin 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi Ve Bu Plasmidin Trex Hela Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu	89
4.5 pcDNA4TO TAF7 TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması İle TAF7 Ekspresyon Düzeyi Değişikliğinin Western Blot Yöntemi İle Araştırılması	91
4.6 Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem ile TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	92
4.7 TAF7'nin Apoptozu Tetiklemesi Üzerine Cıta'in Etkisinin Araştırılması	93
4.8 CIITA'in Mutant Formlarının TAF7'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması.....	95
4.9 TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması	98
4.9.1 Pozitif Kontrol Olarak Kullanılabilecek Paclitaxel Dozunun Optimizasyonu.....	98
4.9.2 TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu ve Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	99
4.9.3 TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	99
4.9.4 TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu ve Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	101
4.9.5. TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (TBP) ile Kontrol Edilmesi.....	103
4.9.6 BSA 'nın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisi.....	104
4.9.7 HIV TAT'ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi ile Araştırılması	105
4.10 TAF7 nin BETA Tubulin ile İlişkisinin İmmün Presipitasyon Deneyi İle Belirlenmesi	106
4.11 TAF7'nin Tubulin Proteinleri İle İlişkisinin In Vitro İmmün Presipitasyon Deneyi İle Araştırılması	106
4.12 TAF7 ile BETA TUBULİN İlişkisinin Mikroskopi ile Araştırılması.....	107

4.13. TAF7 Over Ekspresyonunun BCL 2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot İle Araştırılması	109
4.14 İmmün Presipitasyon Deneyi İle TAF7 – Caspase 2L Arasındaki İlişkinin Araştırılması	110
4.15 Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 ve Ser159 Mutant TAF7'nin Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	111
5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	112
6.KAYNAKLAR	119
7.EKLER.....	125

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1 Cdk İnhibitörleri	36
Tablo 2: TAF7 Klonlama PCR reaksiyonu optimizasyonunda denenilen koşullar.....	55
Tablo 3: Klonlama TAF7 PCR Reaksiyonu Koşulları	56
Tablo 4: Enzim kesim reaksiyonu koşulları.....	57
Tablo 5: Ligasyon reaksiyonu koşulları.....	58
Tablo 6.a: TAF7 Sekansı Üzerinde Mutagenез Bölgesi.....	61
Tablo 6.b : Mutagenез PCR primer sekansları.....	62
Tablo 7: Mutagenез PCR profili	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan HeLa Hücre Hattında TAF7 Proteininin western blot ile gösterilmesi.....	6
Şekil 2. HeLa Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisi	7
Şekil 3. HeLa Hücrelerinde TAF7' nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi	7
Şekil 4. pEGFP TAF7 transfekte edilen Kelly hücrelerinin α -tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüleri	8
Şekil 5. RNA polimeraz II' den izole edilen transkripsiyon inisiyasyon kompleksine bağlanma basamakları.....	19
Şekil 6. Apoptotik sinyal iletimi	25
Şekil 7. Hücresel DNA içeriğinin Belirlenmesi	29
Şekil 8. DNA hasarına yanıt olarak p53 ile indüklenen hücre döngüsü duraksaması.....	31
Şekil 9. Replikasyonunun kısıtlanması.....	32
Şekil 10. MPF düzenlenmesi	33
Şekil 11. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Kompleksleri	34
Şekil 12. pcDNA 6 /TR plasmidi	49
Şekil 13. pcDNA 4 TO plasmidi	50
Şekil 14. Tetrasiklinle Regüle Edilen Ekspresyon Sistemi.....	51
Şekil 15. Hücre ekim planı.....	66
Şekil 16. Transfeksiyon karışımları hazırlama planı	66
Şekil 17. Fugene ve Lipofektamin ajanları ile transfeksiyon etkinliğinin Karşılaştırılması.....	82
Şekil 18.a: Kelly Hücrelerinde Fugene ve CaCl_2 ile transfeksiyon verimliliklerinin Karşılaştırılması	83
Şekil 18.b: Kelly Hücrelerinde Fugene ve CaCl_2 ile transfeksiyon verimliliklerinin Karşılaştırılması	83
Şekil 19: Kelly Hücrelerinde Fugene'in Farklı Konsantrasyonları ile Transfeksiyon.....	84
Şekil 20: Optimum plasmid konsantrasyonu.....	85

Şekil 21. TREX TAF7 Primerleri İle Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları Optimizasyonu.....	85
Şekil 22. Maxi prep ile çoğaltılan pcDNA 4 TO TAF7 plazmidinin PCR ve enzim kesim ürünlerinin agaroz jel görünütüsü.....	86
Şekil 23. Beta galaktosidoz optimizasyonu (optimum pcDNA4TO/LacZ kontrol plasmid konsantrasyonunun belirlenmesi).....	87
Şekil 24: Beta galaktosidoz optimizasyonu (doksisiklin dozunun belirlenmesi).....	88
Şekil 25: Belirlenen doksisiklin dozunun stabil transfekte hücrelerde TAF7 ekspresyonu üzerindeki etkisinin western blot ile gösterilmesi.....	88
Şekil 26. Mutagenez PCR Ürünleri.....	89
Şekil 27. Mutagenез mini prep ürünleri.....	90
Şekil 28. Stabil pcDNA 4 TO TAF7 Klonu Seçilmesi.....	90
Şekil 29. TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulamasının TAF7 Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin TAF7 Western Blot ile Araştırılması.....	91
Şekil 30. Yükleme kontrolü TBP western blot.....	91
Şekil 31. TAF7 ve mutant TAF7 over-ekspresyonunun apoptotik etkisinin Geçici Transfeksiyon yöntemi ile araştırılması.....	92
Şekil 32. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem İle TAF7 ve Mutant TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	92
Şekil 33. Kelly Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi.....	93
Şekil 34. Hela Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi.....	94
Şekil 35. Hela Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi	94
Şekil 36. Mutant CIITA plasmidlerinin miniprep sonuçları.....	95
Şekil 37. Mutant CIITA plasmidlerinin maxi prep sonuçları.....	96
Şekil 38. Maxi prep enzim kesim ürünleri.....	96
Şekil 39. CIITA mutant formlarının yabancı TAF7 ve mutant TAF7 tarafından tetiklenen hücre ölümü üzerine etkisi 4.9 TAF7'NİN Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi ile Araştırılması.....	97

Şekil 40. Tubulin polimerizasyon deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılacak paclitaxel konsantrasyonunun optimizasyonu.....	98
Şekil 41. Tubulin polimerizasyonu üzerinde TAF7 nin farklı konsantrasyonun etkisinin araştırılması.....	99
Şekil 42. 10 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TAF7'nin etkisinin araştırılması.....	99
Şekil 43. 30 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TAF7 nin etkisinin araştırılması.....	100
Şekil 44. Polimerize tubulinin depolimerizasyonunda TAF7 nin etkisi (ilk 1600 saniye).	101
Şekil 45. Polimerize tubulinin depolimerizasyonunda TAF7 nin etkisi (son 1 saat).....	101
Şekil 46. Tubulin Polimerizasyonu Üzerinde 1600 s. önce eklenmiş olan TAF7'nin etkisi	102
Şekil 47. Tubulin Polimerizasyonu Üzerinde TAF7 nin etkisi (Son 1 saat).....	102
Şekil 48. 30 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP nin etkisinin araştırılması	103
Şekil 49. 30 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP'nin etkisinin araştırılması.....	103
Şekil 50. 30 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP'nin etkisinin araştırılması.....	104
Şekil 51. 30 µM Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde BSA'nın Etkisinin araştırılması.....	104
Şekil 52. HIV TAT'ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması.....	105
Şekil 53. Beta Tübilin antikoru ile HeLa hücre lizatlarında immün presipitasyon, TAF7 antikoru ile western blot deneyi	106
Şekil 54. TAF7 antikoru ile <i>in vitro</i> immün presipitasyon, Beta Tübilin antikoru ile western blot deneyi.....	107
Şekil 55. Doksisiklinsiz TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü.....	108

Şekil 56. Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü.....	108
Şekil 57. Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü.	109
Şekil 58. Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü. Sitokinez aşamasında hücre görülmektedir.....	109
Şekil 59. TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması ile TAF7 Over Ekspresyonunun BCL2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot ile Araştırılması.....	110
Şekil 60. Caspase 2 L IP, TAF7 western blot görüntüsü.....	110
Şekil 61. etrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 ve Mutant TAF7 Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	111

KISALTMALAR

Rpm : Rotation per minute (Bir dakikadaki devir sayısı)

Dak. : Dakika

H: Hour (saat)

DNA: Deoksiribo nükleik asit

RNA: Ribo nükleik asit

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)

AT: Asetil transferaz

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)

BCA: Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)

PVDF: Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene floride)

NaCl: Sodyum Klorid (Sodium Chloride)

PMSF: Fenil-metil-sülfonil (Phenyl-methyl-sulphonyl)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

M-MuLV: Moleney Murine Leukemia Virus

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)

FBS: Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Ortamı (Dulbecco's Modified Eagles Medium)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

nm: Nanometre

MGBG: methylglyoxal bis-(guanyldrazone)

siRNA: small interfering RNA

CIITA: class II transactivator

TEŞEKKÜR

Doktora ve yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek bilimle ilgili gerekse diğer konularda her türlü öneri, katkı ve yardımlarından dolayı danışmanım Doç. Dr. Zeynep SERCAN başta olmak üzere, gerek tez izleme toplantılarında ve gerekse diğer zamanlarda öneri ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım DEU Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Neşe ATABEY ve DEU Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr. Hakan ABACIOĞLU'na, Hela hücre hattı, antikör ve nokadazol desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a, Klonlama deneylerindeki yardımlarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. H. Ogün SERCAN'a, Konfokal mikroskopi deneylerindeki desteklerinden dolayı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof Dr. Serdar ÖZÇELİK'e ve Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Batu ERMAN'a bakteriyel transformasyon deneylerimizde malzememiz bittiğinde imdadımıza yetişen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Mehmet Ali ÖKTEM'e, Akım Sitometrisi deneylerindeki katkı ve yardımlarından dolayı Dr. Halil Ateş'e Floresan Mikroskobu kullanma konusunda desteklerinden dolayı doktora öğrencisi Ceyda Çalışkan'a, immün floresan deneylerindeki desteklerinden dolayı doktora öğrencisi İmge Kunter'e, pEGFP TAF7 vektörünü hazırlayıp hediye eden doktora öğrencisi Melek PEHLİVAN'a, teknik desteklerinden dolayı AR-GE Merkezi Uydu laboratuvarına, ARLAB'a ve Dr. Memduh BÜLBÜL'e, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem ve canım babama teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Dilek Göktürk

TAF7-CIITA ETKİLEŞİMİNİN PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek GÖKTÜRK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, 35340, Balçova-İzmir, Türkiye.

ÖZET

Genel transkripsiyon faktörü TFIID'nin yapısında yer alan TAF7'nin, HIV genomundaki 9 genden biri olan Tat'ın ökaryotik işlevsel homoloğu olduğu ileri sürülmüştür. TAF7, HIV-Tat'a benzer şekilde transkripsiyonel elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Daha önceki çalışmalarımızda TAF7'nin HIV-Tat'a benzer şekilde hücre ölümünü tetiklediğini destekleyen bulgular elde ettik. Tat proteininin önemli bir özelliği CIITA ile olan etkileşimidir. CIITA MHC sınıf II genleri için transkripsiyonel bir aktivatör işlevi görür ve yokluğunda MHC sınıf II proteinleri ifade edilmez. Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV transkripsiyonunu baskılayabilmektedir. Buradan yola çıkarak TAF7 ile CIITA arasında da benzer bir etkileşim olup olmadığını araştırmak hedeflenmiştir. HeLa ve Kelly hücrelerine tek tek ve ko-transfeksiyonla TAF7 ve CIITA genlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu sağlanarak hücre ölümü kaspaz aktivasyonları, hücre döngüsü davranışları ölçülerek değerlendirildi. Geçici transfeksiyon deneylerinin yanı sıra TAF7 over-ekspresyonu için tetrasiklin ile regüle edilen ekspresyon sistemi kullanıldı. Ayrıca TAF7'nin tubulin polimerizasyonu üzerindeki etkisi invitro tubulin polimerizasyon deneyi ile araştırıldı. TAF7'nin Beta Tubulin proteini ile ilişkisi in vitro immün presipitasyon ve floresan mikroskopi deneyleri ile gösterildi. Bu proje kapsamında yapmış olduğumuz deneyler CIITA'nın TAF7'nin apoptotik etkisini baskılayabildiğini (önceki çalışmalarımız ve bu proje ile elde edilmiş veriler) ve buna ek olarak TAF7'nin BCL-2, kaspaz2 gibi apoptotik proteinlerle doğrudan etkileştiğini gösterdik. Proje kapsamında site-directed mutagenез ile TAF7'nin fosforilasyon mutantını oluşturduk ve mutant formun hücre ölümünü indüklemeye yabancı TAF7 kadar etkili olmadığını gösterdik. Bu bulgular son 1-2 yıla kadar bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIID'ın yapısal bir komponenti olarak kabul edilen TAF7'nin hücre döngüsüne bağlı olarak bir regülasyona tabi olduğunu;

modifiye olup olmamasına baēlı olarak farklı etkinliēe sahip olduēunu dūşündürmektedir.

Bunlara ek olarak TAF7 ekspresyonunun indüklediēi apoptozun CIITA varlıēında baskılanabileceēini ve CIITA mutantları kullanarak bu etkinin oldukça spesifik olduēunu gösterdik. Bu gözlem baēıřıklık sistemi için önemlidir. Baēıřıklık sisteminin bu önemli molekülünün, TAF7 ile olan etkileşiminin niteliēi ve bu etkileşiminin hücre ölümüne olan etkisinin aēıēa kavuşturulması, immun sistem biyolojisi aēısından önem kazanmaktadır. Bu yönde elde edilecek tüm verilerin baēıřık yanıtın oluşması, immun hücrelerin gelişimi (pozitif ve negatif seleksiyon), HIV biyolojisi gibi çok geniş alanlarda etkisi olabilir.

Anahtar kelimeler : TAF7, CIITA, HIV, Tat, Apoptoz

INVESTIGATING THE EFFECTS OF CIITA-TAF7 INTERACTION ON PROGRAMMED CELL DEATH

Dilek GÖKTÜRK, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of
Medical Biology and Genetics, 35340, Balçova-Izmir, Turkey.

ABSTRACT

It has been proposed that TAF7 could be a eukaryotic analogue of HIV Tat. HIV-Tat functions can be summarized as: 1) transcriptional transactivation of the provirus 2) transcriptional inhibition of host genes and 3) induction of apoptosis in host cells. TAF7 has been shown to both support transcriptional elongation and to inhibit transcription by mechanisms very similar to HIV Tat; and we have also previously reported that TAF7 over-expression induces cell death. An important feature of the Tat protein is its interaction with CIITA, the transcriptional activator for MHC class II genes. While Tat can suppress MHC class II expression through its interaction with CIITA; CIITA over-expression can suppress Tat and thereby inhibit HIV transcription and host cell death. Given the functional similarities between HIV-Tat and TAF7 we aimed to investigate the effects of CIITA-TAF7 interactions on programmed cell death. Another important feature of the Tat protein is its ability to bind tubulin proteins during apoptosis. We also aimed to investigate whether TAF7 also binds to tubulin proteins.

TAF7 gene was cloned in to expression vectors which were transfected in to HeLa and Kelly cells. In addition to transient transfection, a tetracycline regulated expression system (TREX) was used for TAF7 over-expression. TAF7 was cloned to TREX system's plasmid and was stable transfected into a Tet-repressor expressing Hela cell line.

TAF7 – Beta Tubulin interaction was shown by immune precipitation experiments performed using both pure isolated proteins and cell lysates. Functional outcome of the interaction was analyzed by invitro tubulin polymerization assays. We've shown that TAF7 over-expression induced cell death and CIITA expression suppressed TAF7's apoptotic effect . Our data supports a model in which TAF7 causes stabilization of tubulin polymerization. I the presence of an apoptotic signal, TAF7 remains bound to tubulin proteins and the cell cycle halts. In the absence of an apoptotic signal, the chromosomes attach to the mitotic spindle properly and cell cycle continues with the termination of mitosis. We also showed that the

phosphorylation mutant of TAF7 did not induce apoptosis as its wild type form. In addition by using CIITA mutants we were able to show that the inhibition of apoptosis is specific to the presence of a functional CIITA molecule. When taking the role TAF7 plays in apoptosis under consideration, its interactions with CIITA during this process has very important implications for the field of immunology. Furthermore when one considers CIITA and Tat interactions during HIV infection; the importance to elucidating molecular interactions between CIITA and TAF7 is evident.

Keywords: TAF7, CIITA, HIV, Tat, Apoptosis

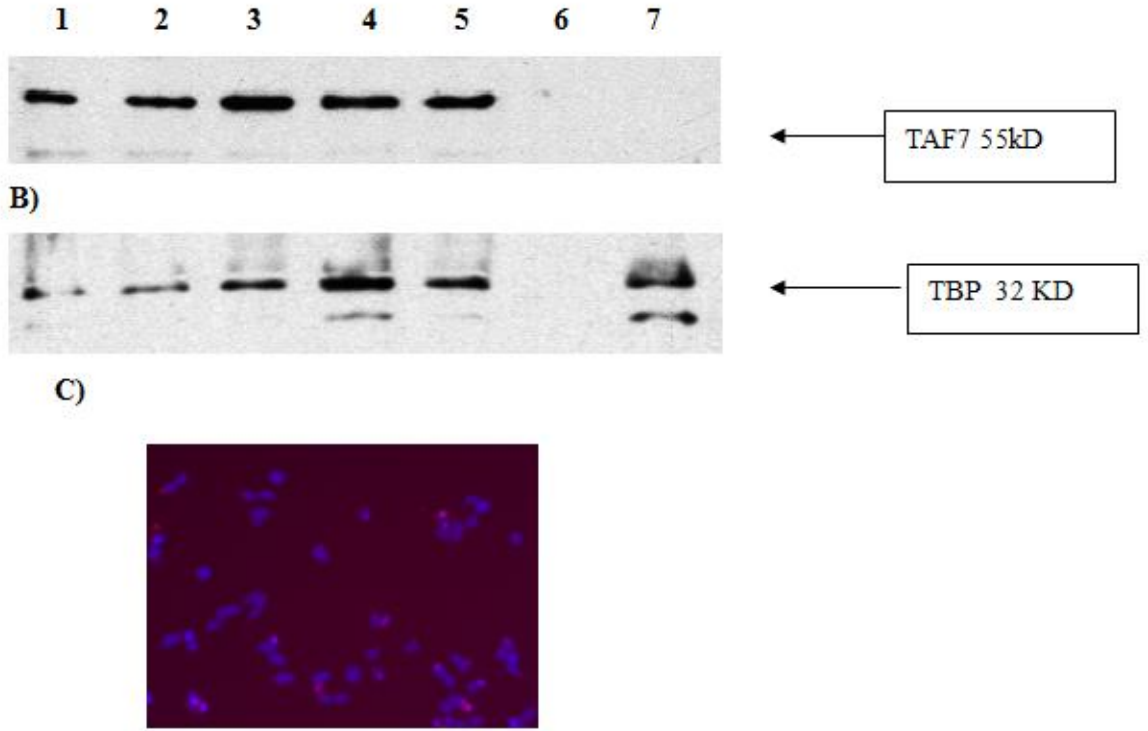
1.GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde pek çok viral genin ökaryotik homologları bilinmektedir. HIV-Tat geni için ise protein düzeyinde bir ökaryotik homolog gen bulunamamıştır. Buna karşın Ökaryotik TAF7 proteininin, HIV-Tat'ın işlevsel bir analog olabileceği ileri sürülmüştür. HIV-Tat ile benzer özellikler gösterebilen; elongasyonda HIV-Tat ile aynı faktörlerle etkileşerek rol oynayan; preinisiyasyon kompleksinde bulunan proteinler ile yine Tat'a benzer şekilde ilişki kurabilen tek ökaryotik gen ürünü TAF7'dir (eski adıyla TAFII55).

Gen transkripsiyonu, büyük ölçüde kendilerine özgü sekans motiflerini tanıyan transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere bağlanması, transkripsiyonda görev alan kompleksleri kendisine çekmesi ve aktive etmesi ile gerçekleşir. Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için öncelikle RNA polimeraz II'nin genel transkripsiyon faktörleri (GTF) ile bir kompleks oluşturarak promotöre bağlanması gerekmektedir. GTF'ler olan TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH bir araya gelerek promotör üzerinde bir karmaşık yapı oluşturur ve RNA polimeraz II'nin karboksil terminalini fosforilleyerek transkripsiyonun başlamasını sağlar. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. Promotörün TATA kutusu bölgesine bağlanan TFIID, TBP'den (TATA bağlayan protein/TATA binding protein) ve TAF'lerden (TBP asosiye faktör/TBP associated factor) oluşmaktadır. Pek çok farklı TAF'lerden biri de TAF7'dir. Yapılmış çalışmalar TAF7'in transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev alabileceğini ileri sürmektedir. Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, transkripsiyon üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermekte, elongasyonda mRNA uzamasını desteklemektedir. Özetle TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu inisiyasyon aşamasında baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat'ın aksine programlanmış hücre ölümünde bir rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

Programlanmış hücre ölümü, hücre dışarıdan yaşamına devam etmesi için gerekli sinyalleri alamadığı veya hücre hasarı olduğu zaman gerçekleşir. Apoptoz yollarının aydınlatılması ve farklı patolojilerde apoptozun rolü konusunda sayısız araştırma yapılmış olmasına rağmen halen ölüme giden hücrede transkripsiyonun nasıl bloke edildiğine dair fazla bir veri bulunmamaktadır. Bir apoptoz bulgusu olan transkripsiyon blokajının TAF7 üzerinden gerçekleşebileceğini (HIV Tat'ın kullandığı transkripsiyonel baskılama mekanizmalarını kullanarak) ve HIV Tat ile arasındaki işlevsel benzerliklere dayanarak

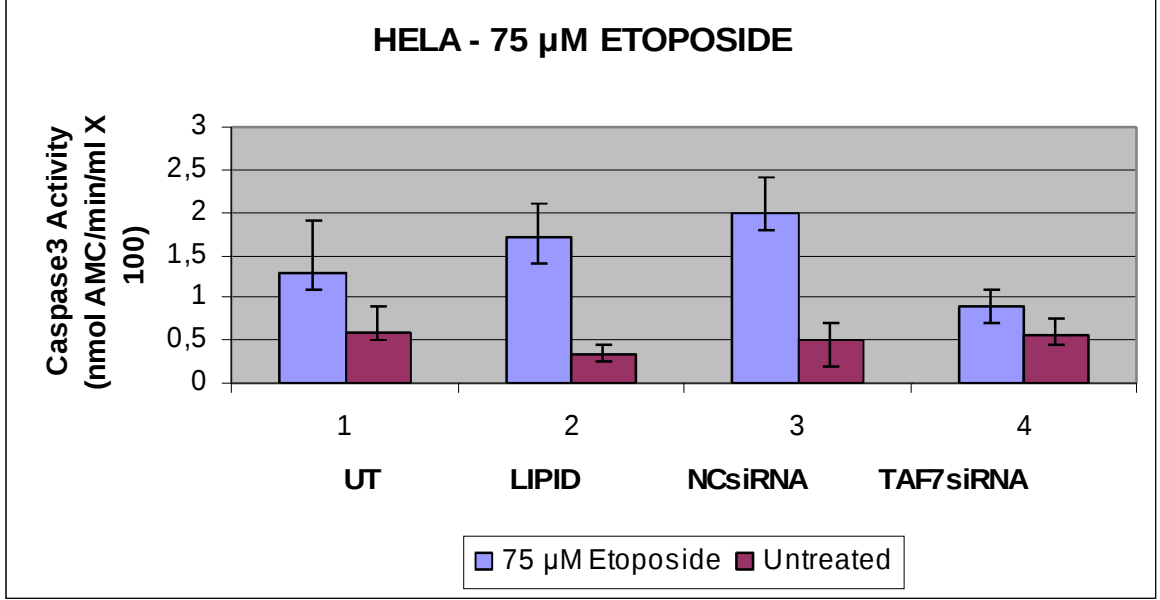
TAF7'nin apoptotik sinyal iletiminde yer alarak programlanmış hücre ölümünün geç evrelerinde rol oynayabileceğini düşündük. Önceki çalışmalarımızda farklı apoptotik uyarılar alan hücre kültürlerinde siRNA (small interfering RNA) kullanılarak TAF7'nin ekspresyonu baskılandı ve apoptotik cevap ölçüldü. Hipotezimize göre TAF7 yokluğunda transkripsiyon bloğu oluşmayacağından kullanılacak hücre hatlarında belli uyarılarda apoptoza direnç gelişecektir. Yüksek düzeyde TAF7 ekspresyonunun (over-ekspresyon) olduğu durumlar da ise HIV-Tat'a benzer şekilde artmış apoptoz izlenecektir. Yapılmış olan deneyler sonucunda TAF7 ekspresyonunun baskılanması sonrasında apoptoza direnç geliştiği ve TAF7'nin over-ekspresyonunda spontan hücre ölümünün arttığını gösterdik. Buna ek olarak TAF7 over-ekspresyonunda tetiklenen apoptozun HIV-Tat proteinine benzer şekilde mikrotübül polimerizasyonundan kaynaklanabileceğini destekleyen floresan mikroskopi görüntüleri elde ettik. Daha önceki çalışmalarımızda elde etmiş olduğumuz bu veriler Şekil 1, 2, 3 ve 4'de gösterilmiştir.



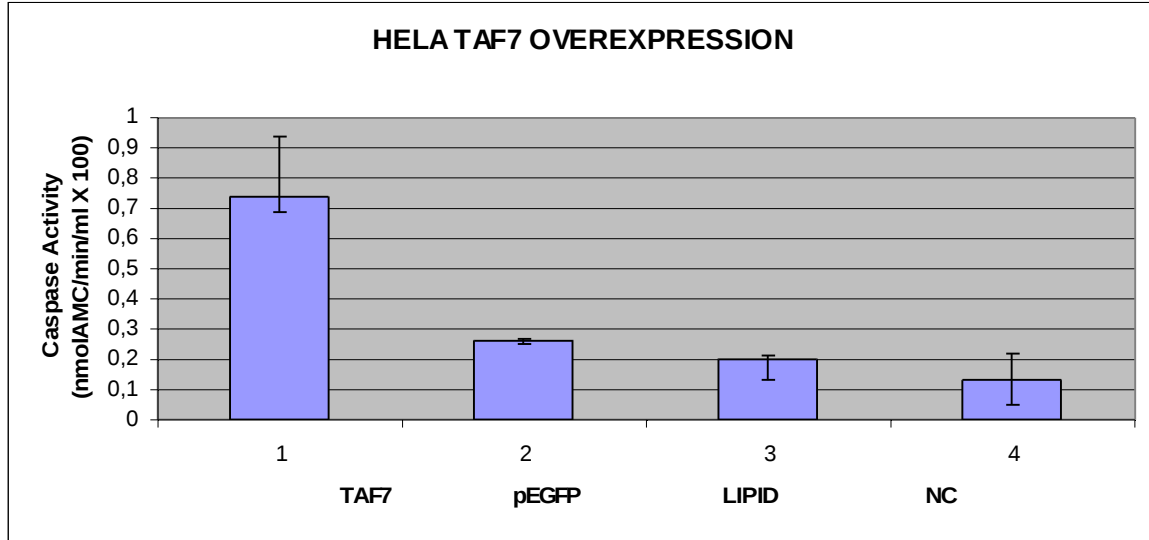
Şekil 1. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan HeLa Hücre Hattında TAF7 proteininin western blot ile gösterilmesi.

A) Kuyu 1, HeLa normal hücre lizati; 2, lipid (boş lipozom) transfeksiyonu uygulanan HeLa hücre lizati; 3, lamin A/C siRNA transfekte HeLa hücre lizati; 4, non-targetting siRNA transfekte HeLa hücre lizati; 5, RISC Free siRNA transfekte HeLa hücre lizati;

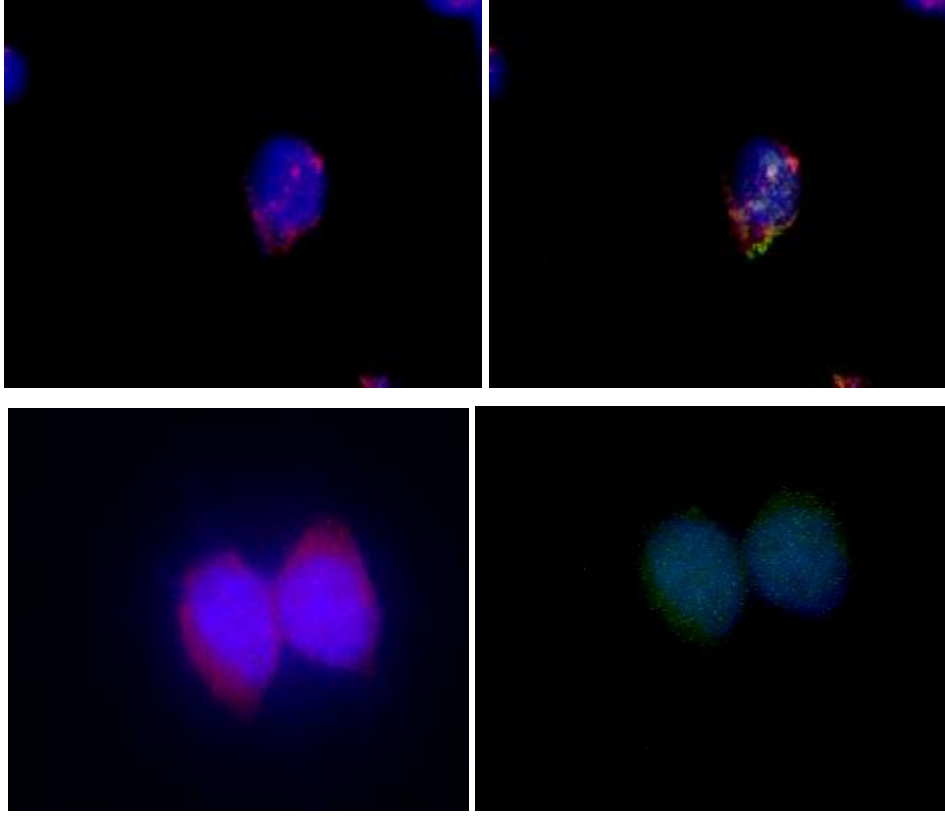
6, boş kuyu; 7, TAF7 siRNA transfekte HeLa hücre lizatı B) Aynı membran “strip” edillip antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra kuyu yükleme kontrolü olarak TBP antikorı ile tekrar blotlandı. C)Transfeksiyon verimliliği siGLO ile %75 olarak izlenmiştir.



Şekil 2. HeLa Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisi (UT, işlem görmemiş kontrol; LIPID, sadece lipid kontrol; NCsiRNA, negatif kontrol siRNA)



Şekil 3. HeLa Hücrelerinde TAF7’ nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi (pEGFP, vektör kontrol; LIPID, lipid kontrol; NC, transfecte edilmemiş normal hücre kontrol)



Şekil 4. pEGFP TAF7 transfekte edilen Kelly hücrelerinin a-tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüleri. TAF7-GFP yeşil, a-tubulin kırmızı ve DAPI mavi renk olarak görülmektedir (sağdaki resimler, soldaki hücrelerin TAF7-GFP ile transfekte olduğunu doğrulama amacıyla filtre değişimi ile GFP floresansının varlığını göstermektedir).

Genel transkripsiyon düzeneğinde yer alan nükleer bir proteinin sitoplazmada mikrotübüllerle ilişkili olduğu ve nükleer proteinlerin apoptoz sürecinde bilinmeyen olası işlevsel bir rolü olabileceğini gösteren bulgularımız önemli ve dikkat çekicidir. Ancak araştırmamızın tamamlanması için HIV Tat proteininin diğer özellikleri üzerinde de durmak ve TAF7'nin benzer özellikler gösterip göstermediğini bulgulamak gerekmektedir. Bu özelliklerden biri de HIV Tat proteininin CIITA (class II transactivator) ile olan etkileşimidir. CIITA bağışıklık sistemi açısından çok önemli bir proteindir. MHC sınıf II genleri için transkripsiyonel bir aktivatör işlevi görür ve yokluğunda MHC sınıf II proteinleri ifade edilmez; dolayısıyla CD4 T lenfositleri timusta gelişemez. HIV Tat ile CIITA arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir. Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV replikasyonunu ve enfekte hücre apoptozunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak HIV enfeksiyon gelişiminde bu

iki protein arasındaki denge önem kazanmaktadır. TAF7'nin, HIV Tat'la benzer şekilde CIITA ile etkileşip etkileşmediğinin gösterilmesi, CIITA varlığının TAF7 over-ekspresyonu tarafından indüklenen hücre ölümü üzerindeki etkisinin incelenmesi buradasunulan doktora tez çalışmasının temelini oluşturmuştur. Deneylerimiz sonucunda elde ettiğimiz bulgular TAF7'nin transkripsiyon dışı hücresel süreçlerde rol aldığını ilk kez göstermiş, immun sistem hücrelerinin programlanmış ölüm süreçlerinde TAF7 ve CIITA etkileşiminin rol oynayabileceğini ortaya koynuştur. Doktora tezi kapsamında yapılanlar ve aşağıda sunulmuştur.

2.GENEL BİLGİLER:

2.1 HIV Enfeksiyonu ve Virüsü:

İnsan immun yetmezlik virüsü tip 1'in (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) 1983'de (1, 2, 3) ve HIV-2'in 1986'da (4) tanımlanmasından sonra bu iki virüs, edinsel immun yetmezlik sendromunun (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) başlıca iki etkeni olarak kabul edilmektedir. Dünyada AIDS'den öncelikle sorumlu olan etken HIV-1'dir. Bugün dünyada HIV ile enfekte birey sayısının çoğunluğu Asya, Afrika ve Güney Amerika'da olmak üzere 40 milyonu geçmektedir. HIV enfeksiyonunun immunopatogenezini anlamak terapötik stratejilerin, immunoterapilerin ve profilaktik aşılarda geliştirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. Diğer tüm viral enfeksiyonlar gibi HIV enfeksiyonunun bireylerdeki seyri hem viral hem de konak faktörlerine bağlıdır. Primer enfeksiyon kaynağı aynı olsa dahi HIV ile enfekte bireylerde enfeksiyonu seyri çok büyük farklılıklar sergileyebilmektedir. Konak ve viral faktörlere bağlı olarak bireyde klinik düzeyde hızlı bir immun yetmezlik gelişebileceği gibi birey uzun dönem gelişim göstermeyen hasta grubunda (long-term non-progressors) da olabilir (5).

HIV-1 lentivirus ailesine ait bir retrovirüstür. HIV virüsü hücre içine almaç bağımlı endositoz yoluyla girmektedir. Birincil almaç, immun sistemin T hücrelerinde bulunan CD4 hücre yüzey almaçtır. CD4 T hücrelerinin % 60'ının yüzeyinde ifade edilen 58 kD'luk monomerik bir glikoproteindir (5). CD4'ün HIV-1, HIV-2 ve SIV (simian immunodeficiency virus) için birincil almaç olduğu 1984 yılında karakterize edilmiştir (7). Ancak insandan türetilmemiş hücre hatlarında CD4 transfekte edilerek yapılan deneyler CD4'ün tek başına virüsün girişi için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar monositotrofik virüsler için CCR5; T-hücre tropik virüsler için CXCR4 kemokin reseptörlerinin CD4'e ek olarak eş-almaç (koreseptör) olarak gerekliliğini ortaya koymuştur (7, 9, 10, 11). Hücreye girişinden sonra HIV virüsü, revers-transkriptaz enzimi ile RNA nükleik asidini DNA'ya çevirir. Viral DNA nükleusa geçerek integras enzimi sayesinde hücre DNA'sına entegre olur. Bu aşamada provirüs adını alır. Enfekte hücrenin transkripsiyon düzeneğini kullanarak genomunu tekrar RNA'ya çeviren provirüs bu şekilde kor nükleik asidinin replikasyonunu ve hücrenin translasyon düzeneklerini kullanarak yapısal proteinlerini oluşturur. Yapısal viral parçalar ve RNA nükleik asit yine hücresel mekanizmalar kullanılarak bir araya getirilir ve yeni oluşan virüsler tomurcuklanma yoluyla hücreden ayrılarak başka hücreleri enfekte eder.

HIV genomunda sadece 9 adet gen bulunur. Bunlardan üçü –gag, pol ve env- yeni viral partiküllerin oluşumu için gerekli yapısal bilgiyi barındırır. Diğer 6 gen tat, rev, ref, vrf, vpr ve vpu HIV'in hücreyi enfekte etmesi, hücresel düzenekleri kullanabilmesi, kendini kopyalayabilmesi ve hastalığın oluşmasına neden olan protein ürünlerini kodlar. HIV genlerinin işlevlerini kısaca özetlersek:

GAG: Kapsid proteinlerini kodlayan genomik bölgedir. P55 miristile bir prekürsör olarak ifade edildikten sonra viral proteaz tarafından p17 (MA), p24 (CA), p7 (nükleokapsid) ve p6 proteinlerini oluşturacak şekilde kesilerek işlenir.

POL: Revers transkriptaz, proteaz ve integras viral enzimlerinin kodlandığı bölgedir.

ENV: Viral proteaz tarafından transmembran gp41 ve yüzey gp120 zarf proteinlerini oluşturacak şekilde işlenecek gp60 prekürsörünü kodlar

REV: Lentivirüsler arasında işlevsel düzeyde en iyi korunmuş regülatuar bir proteindir. Nükleusta yerleşik 79kD'luk bir fosfoproteindir. Viral mRNA'ların nükleer eksportu ve stabilizasyonundan sorumludur.

VIF: 26 kD'luk bazik bir proteindir. Enfektivite faktörü olarak da anılır. Viral partiküllerin üretiminden değil ama enfekte etme özelliğinden sorumludur. Vif yokluğunda hücre-hücre bulaşı olmasına rağmen hücreyi enfekte etme ve provirüs oluşumu defektiftir.

VPR: Viral protein R olarak da bilinir. Öne sürülen işlevleri arasında preintegrasyon komplekslerinin nükleusa hedeflenmesi, hücre döngü aresti, bazı hücresel genlerin transaktivasyonu bulunmaktadır.

VPU: Viral protein U olarak da isimlendirilir. En az iki önemli işlevi keşfedilmiştir. Birincisi CD4'ün endoplazmik retikulumda degradasyonuna neden olmakta; ikincisi HIV ile enfekte hücrelerin plazma membranından virüs tomurcuklanmasını uyarmaktadır.

NEF: Enfekte hücrelerde üretilen ilk viral proteinlerden biri olup tüm HIV proteinleri arasında en immunojenik olandır. Konak hücre sinyal ileti yollarıyla etkileşerek CD4 ve MHC sınıf I gibi pek çok genin ekspresyonunun baskılanmasına; öte yandan da HIV replikasyonunu destekleyecek genlerin yüksek düzeyde ifade edilmelerini sağlar

HIV genomunda bulunan dokuzuncu gen olan TAT geni araştırma konumuz ile ilgili olduğundan daha geniş olarak ayrı bir bölümde anlatılacaktır.

2.2 HIV – Tat Geni ve İşlevleri:

Tat proteini HIV gen ekspresyonu için gerekli iki faktörden (tat ve rev) biri olup, temel olarak gen ekspresyonu için transaktivatör işlevi bulunmaktadır (12). İki formu bulunmaktadır: 72 amino asit uzunluğundaki Tat-1 ekzon (minör form) ve 86 amino asit uzunluğundaki Tat-2 ekzon (majör form). Enfekte hücrelerde her iki form da saptanabilmektedir (12). İmmunofloresans ve immunohistokimyasal boyamalarda temel olarak nükleus ve nukleolusda lokalize olduğu gösterilmiştir. HIV nükleik asidi proviral formda hücre DNA'sına entegre olduktan sonra, provirüsün LTR promotöründe bulunan TAR (transactivation responsive region) elementine bağlanarak transkripsiyonel inisiyasyon ve elongasyonu etkinleştirdiği gösterilmiştir (13, 14). TAR'ın, tanımlanmış ilk cis-etkili RNA enhancer olması, Tat'ın da bir RNA enhancer'ı ile etkileşebilen tanımlanmış ilk transkripsiyon faktörü olması ilgi çekicidir. Tat varlığında LTR'den provirüs transkripsiyon verimliliğinin birkaç yüz kat arttığı deneylerle bulgulanmış ve günümüze kadar yapılmış tüm in vitro hücre kültür sistemlerinde viral replikasyon için gerekliliği gösterilmiştir (5).

Tat transkripsiyonel etkilerini TAR elementine bağlandıktan sonra inisiyasyon ve elongasyonu uyararak gerçekleştirir. Bu işlemleri gerçekleştirebilmek için hücrel proteinlerle etkileşime girer ve konak hücrenin transkripsiyonel düzeneğini kullanır. Tat'ın elongasyon uyarımı ile ilgili daha fazla bilgiye sahibiz. Tat'ın siklin T ve cdk9'dan oluşmuş bir elongasyon faktörü olan P-TEFb, TAR ve yine elongasyonda rol oynayan Brd4 proteinleriyle doğrudan etkileşime girerek RNA polimeraz II'in C-terminal bölgesinin hiperforilasyonunu tetikleyerek transkripsiyon inisiyasyonunu ve elongasyon devamını uyardığı gösterilmiştir (15, 16) (ökaryotlarda transkripsiyon düzeneği ve regülasyonu ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılacaktır). Elongasyonun yanı sıra Tat'ın preinisiyasyon kompleksinin (PIC) oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir. Tat'ın PIC yapısında yer alan TBP (TATA bağlayan protein), TATA kutusu, Sp1, TFIIF gibi moleküllerle; siklin E/cdk2'ler ve CBP/p300, p/CAF gibi koaktivatör ve kromatin modelleme kompleksleriyle doğrudan etkileştiği gösterilmiştir (17, 18, 19, 20, 21,22). Ayrıca Tat histon asetilazları da PIC'e çağırarak, transkripsiyon daha başlamadan özel nükleozomal bölgelerde H3 ve H4 lizin asetilasyonunun gerçekleşmesinden de sorumludur (22).

Transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra Tat'ın çeşitli hücrel genleri transkripsiyonel düzeyde baskılama (represyon) işlevi de olduğu bugün bilinmektedir

(12). Bu işlevi, ilgili genlerin PIC yapı ve kompozisyonlarını bozarak gerçekleştirmektedir. Örneğin MHC sınıf I genlerinin bazal ekspresyonu PIC yapısında işlevsel bir TAF1 (TBP asosiye faktör 1) molekülünün varlığına bağlıdır. Tat TAF1'e bağlanarak asetiltransferaz aktivitesini ortadan kaldırabilmekte ve bu yolla MHC sınıf I ekspresyonunu baskılayabilmektedir (23, 24).

HIV Tat proteininin üzerinde durmak istediğimiz bir diğer özelliği de CTIIA (class II transactivator) ile olan etkileşimidir. CTIIA bağışıklık sistemi açısından çok önemli bir proteindir. MHC sınıf II genleri için transkripsiyonel bir aktivatör işlevi görür ve yokluğunda MHC sınıf II proteinleri ekprese olmaz; dolayısıyla CD4 T lenfositleri timusta gelişemez. HIV Tat ile CIITA arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir (38). Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV replikasyonunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak HIV enfeksiyon gelişiminde bu iki protein arasındaki denge önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak Tat proteini gerek proviral gerekse hücrel genlerin, kromatin modifikasyonları, transkripsiyonel inisiyasyon, elongasyon, transkripsiyonel baskılanma dahil neredeyse genetik regülasyonun tüm süreçlerinde etkili olmaktadır. Ancak Tat proteininin etkileri sadece transkripsiyonel transaktivasyon ile sınırlı değildir. HIV enfeksiyonunun çok belirgin bir özelliği olan hücre ölümünde Tat proteinin rolü bir sonraki bölümde tartışılmıştır.

2.3. HIV – Tat Geni ve Apoptoz:

HIV enfeksiyonu CD4 T hücrelerinin apoptoz yoluyla progresif kaybı ile karakterizedir. Bu progresif kayıp sadece virüs ile enfekte hücrelerde değil, enfekte olmayan hücreler içinde geçerlidir (25). Özellikle virüs ile enfekte olmayan hücrelerin apoptoz yoluyla kaybindan HIV Tat proteininin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tat proteininin bir diğer özelliği de hücre dışına sekrete olası ve komşu hücreler tarafından içe alınabilmesidir. Virüsle enfekte olmayan hücrelerin bu ekstraselüler Tat proteinini kendi içlerine almaları pek çok farklı yolla apoptoz sürecinin uyarılmasına neden olur (26). Tat proteininin apoptotik süreçleri uyarabildiği bilinen mekanizmalar arasında, Fas ligandının artmış ekspresyonunu uyarmak (27), çeşitli sitokinleri kodlayan genlerin uyarılması veya baskılanması (28), Bcl-2 gibi hücre yaşam faktörlerinin ifadesinin uyarılması (29), manganez bağımlı süperoksit dismutaz (30) ve p53 ekspresyonunun

baskılanması (31) ve CDK aktivasyonu (32) sayılabilir.

Araştırmamıza konu olması nedeniyle özellikle üzerinde durmak istediğimiz bir mekanizma da Tat proteininin hücre mikrotübül polimerizasyonunu etkileyerek apoptozu tetiklemesidir (33). Mikrotübüller tubulin polimerlerinden oluşmuş, hücre morfoloji, hücre içi organel yapı ve yerleşimi, mitoz sırasında kromozom göçü, hücre farklılaşması ve hücre içi transportta rol oynayan hücre iskelet yapılarıdır. Bu denli çok ve önemli işlevleri olan mikrotübül yapısının bozulması, hücrede apoptozu tetiklemektedir (33). Mikrotübül yapısını bozan ajanlar (MDA-microtubul damaging agents) etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılmaktadır: taxanlar gibi mikrotübül stabilizasyon ajanları ve vinca alkaloidleri gibi mikrotübül depolarizasyon ajanları. MDA'lar hücre içi mikrotübül dinamiklerini bozduklarından programlanmış hücre ölümüne yol açarlar ve bu özellikleri nedeniyle de çeşitli kanserlerde tedavi amaçlı kullanım alanları bulunmaktadır.

HIV Tat proteininin hücre mikrotübüllerine bağlandığı ve stabilize edici MDA'lar benzeri bir etki göstererek hücre mikrotübül dinamiğini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikrotübüllere bağlandıktan sonra pro-apoptotik Bcl-2 aile üyesi olan Bim ile de doğrudan etkileştiği ve intrinsik mitokondrial apoptoz yolağını uyardığı bulgulanmıştır (CHEN ve ark., 2002). Yine bir diğer çalışma Tat'ın, bir mikrotübül ilişkili (asosiye) protein (MAP) olan ve mikrotübül dinamiklerinde düzenleyici protein kabul edilen, mutasyonlarının lisensefaliye yol açtığı bilinen LIS1 fosfoproteini ile hücre içinde doğrudan etkileşebildiği bildirilmiştir (35). Tüm bu çalışmalar HIV enfeksiyonunda özellikle enfekte olmamış hücrelerde gözlenen artmış hücre ölümünün bir nedeninin de ekstrasellüler ortama salgılanan Tat proteini olduğunu ortaya koymaktadır.

2.4. HIV – Tat Geninin Ökaryotik Homoloğu Olarak TAF7

Yukarıda HIV Tat'ın bazı genlerin transkripsiyonel düzeyde baskılanmasından sorumlu olduğunu bahsetmiştik. HIV Tat'ın bu baskılayıcı etkisinin en detaylı tanımlandığı gen MHC sınıf I genidir. MHC sınıf I geninin bazal ekspresyonu PIC'de TAF1'in (eski adıyla TAFII250) bulunmasını gerektirmektedir. TAF1 asetiltransferaz ve kinaz işlevlerine sahip bir moleküldür. Kinaz işlevinin substratı halen bilinmemekle beraber asetilaz özelliğiyle histon ve PIC'de bulunan diğer proteinlerin asetilasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. HIV Tat TAF1'e doğrudan bağlanarak asetilaz özelliğini baskıladığı ve MHC sınıf I geninin TAF1'e bağımlı bazal transkripsiyonunu engellediği gösterilmiştir. Buna ek olarak P-TEFb ile etkileşerek proviral elongasyonu tetiklediği bildirilmiştir. Benzer özellikler gösterebilen,

TAF1'e bağlanarak asetiltransferaz özelliğini baskılayabilen (36), P-TEF ile etkileşerek elongasyonda rol oynayan (37) ve PIC'de bulunan proteinler ile Tat'a benzer şekilde ilişki kuran tek bir ökaryotik gen bilinmektedir: TAF7 (eski adıyla TAFII55)

Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için GTF'lerin promotöre bağlanması gerekmektedir. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. TFIID, TBP'den (TATA binding protein) ve TAF'lerden (TBP associated faktör) oluşmaktadır. İnsan genomundaki genlerin sadece %30'unun promotöründe "TATA" kutusu bulunmaktadır. "TATA" kutusu bulunmayan promotör bölgelerinde önemli başka bir sekans elementi olan initiator (Inr) sekansı bulunur. TATA kutusu içermeyen fakat Inr dizisi bulunan promotörlerin çoğunda ayrıca DPE (downstream promoter element) elementi de bulunmaktadır. DPE yaklaşık olarak transkripsiyon başlama bölgesinden 30 bp aşağıda yer alır. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFTC'in (TBP free TAF containing complex) TFIID'in yerini aldığı invitro koşullarda gösterilmiştir. TBP olsun veya olmasın her promotörün kendine has bir TAF kompleksi oluşturduğu, gene özgü olan bu kompleks oluşumunun transkripsiyonun ön koşulu olduğu bugün bilinmektedir. Pek çok farklı TAF'lerden biri de TAF7'dir.

Literatürde TAF7 ile ilgili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bir tarama yapıldığı takdirde içinde TAF7 geçen toplam 19 makale çıkmaktadır. Bunların çoğu TFIID kompleksinin farklı ökaryotlardaki yapısını ve diğer TAF'ler ile olan ilişkileri kapsayan çalışmalardır. İki TAF7 promotörü ve ekspresyonu ile ilgili olup protein fonksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili ancak 4 makale bulunmaktadır. Bunlardan biri TAF7'nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde TAFII250'yi bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürmektedir (36). Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAFII250 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir. Ayrıca HIV Tat proteini gibi elongasyon faktörü P-TEFb ile etkileşerek elongasyonu desteklemektedir (37). Özetle TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat'ın aksine programlanmış hücre ölümünde bir rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

TAF7'nin apoptoz sürecinde bir rolü olabileceğine ait tek bir yayın bulunmaktadır. 2004 yılında Fukuchi ve arkadaşları TAF7'nin poliamin transport aktivitesini düzenleyerek poliamin analogları ile indüklenen apoptozda rol oynadığını ileri süren bir çalışma yayınladılar. Bu çalışma kapsamında poliamin transport aktivitesinde rol oynayan genleri tanımlayabilmek amacıyla öncelikle MGBG (methylglyoxal bisguanylhidrazone) dirençli

CHO hücreleri oluşturulmuştur. MGBG, bir poliamin transport inhibitörü ve hücrelere eklenmesi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. MGBG dirençli hücrelerde retroviral gen tuzağı (retroviral gene trap) metoduyla direncin oluşumunu sağlayan gen, bu çalışmada TAF7 olarak tanımlanmıştır. Yazarlar verilerini TAF7'nin poliamin transportunda düzenleyici olarak rol aldığı ve bu yolla indüklenen programlanmış hücre ölümünde işlevi olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ancak bu çalışmadaki verileri farklı yorumlamak mümkündür ve TAF7'nin apoptozda rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kullanılan yöntem, hangi genin ekspresyon kaybında MGBG'ye karşı direnç geliştiğini saptamaya yöneliktir. Sonuç olarak da TAF7 ekspresyon kaybında MGBG ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Eğer TAF7, transkripsiyonu durdurma işlevi ile apoptoz yolağında görev alıyorsa, yokluğu bu yolaktaki ardışık sinyal iletiminde bir duraklamaya yol açarak direnç gelişimine neden olacaktır. Diğer bir ifadeyle gözlenmiş olan apoptoza karşı direnç, TAF7 poliamin transport yolunda rol oynadığı için değil, genel olarak programlanmış hücre ölümünde bir fonksiyonu varsa da gözlenebilir.

TAF7'in işlevlerini daha iyi anlamak için parçası olduğu genel transkripsiyon mekanizması üzerinde kısaca durmak gerekmektedir.

2.5. Transkripsiyon:

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi hücrenin çevresel koşullardaki değişikliklere adaptasyonunu ve farklılaşmış hücrelerin farklı görevleri yerine getirmelerini sağlamaktadır. Örneğin kas ve karaciğer hücreleri aynı genleri taşımalarına rağmen işlevleri farklıdır. Hücre işlev ve özellikleri, genomlarındaki farklılıklar ile değil, gen ekspresyonu paternlerindeki farklılıklar ile belirlenmektedir.

Bir genin ekspresyonundaki ilk aşama DNA'nın RNA'ya transkripsiyonudur. Ökaryotik hücrelerde RNA sentezlendikten sonra değişik yollarla modifiye edilir. Örneğin intronlar "splicing" ile çıkarılır. Farklı tipte RNA'lar farklı görevler üstlenmiştir. Mesajcı RNA (mRNA)'ların protein sentezi için kalıp görevi, ribozomal RNA'ların (rRNA) ve transfer RNA'ların ise protein translasyonunda görevleri vardır (41).

2.6. Ökaryotlarda Transkripsiyon Başlama (İnisiyasyon) Kompleksinin Oluşturulması:

Her ne kadar yukarıda tarif edilen transkripsiyon inisiyasyonu genel olarak ökaryotik RNA polimerazlar için de geçerliyse de, her bir ökaryotik RNA polimerazlar için detaylar farklıdır. Esas konumuz olan protein sentezi için gerekli mRNA'ların RNA polimeraz II ile

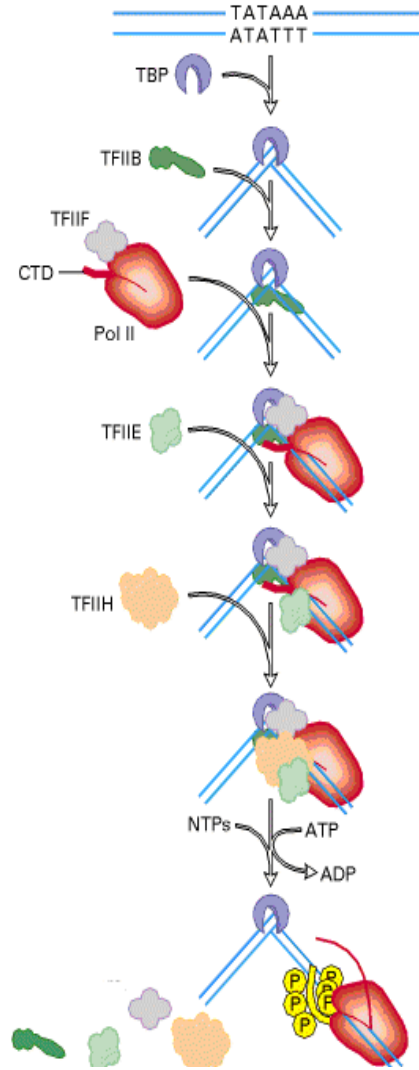
transkripsiyonuna geçmeden önce RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyondan kısaca bahsedelim. RNA polimeraz I ve III promotörlerinden transkripsiyonun başlaması RNA polimeraz II’de görülen benzer olayları içermektedir, fakat detaylar farklıdır. En dikkat çekici benzerliklerden biri TBP’nin RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyon inisiyasyonunda da rol oynamasıdır.

RNA polimeraz II ile transkripsiyon inisiyasyonunda bakteri ve ökaryotlar arasındaki en önemli farklılık ökaryotik polimerazların direkt olarak çekirdek promotör sekanslarını tanımamalarıdır (42). Protein kodlayan genlerin transkripsiyonundan sorumlu olduğu için ökaryotlarda transkripsiyonun mekanizmasının anlaşılması amacıyla RNA polimeraz II’ye çok önem verilmiştir. 1979 yılında Robert Roeder tarafından RNA polimeraz II’nin bazı yardımcı proteinler eklendiğinde transkripsiyonu başlatabildiğini rapor etmiştir. Bu nedenle ökaryotik transkripsiyon sisteminin bir takım başlatıcı faktörlere ihtiyaç duyduğu (bakteriyel sistemlerdeki “ro” faktörüne karşılık) anlaşılmıştır.

Nükleer ekstraktların biyokimyasal ayrıştırılması yapılarak RNA polimeraz II’nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan (transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan) bir takım özgül proteinler tanımlanmıştır. Genel ve gene özgül olmak üzere iki tip transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Genel transkripsiyon faktörleri tüm polimeraz II promotörlerinin transkripsiyonunda yer alır. Bu nedenle temel transkripsiyon makinesinin bir parçasıdır. Gene özgül transkripsiyon faktörleri ise ekspresyon kontrolü için kendilerine özgü cis-etkili dizilere bağlanırlar. Yaklaşık olarak insan genomunun %5’i transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (41).

Genel olarak bakıldığında RNA polimeraz II ile transkripsiyonun başlaması için beş genel transkripsiyon faktörü gereklidir. Polimeraz II ile transkribe edilen pek çok genin promotöründe transkripsiyonun başlangıcından yaklaşık 25 – 30 nükleotid aşağıda TATAA benzeri DNA dizisi bulunur. Bu dizi “TATA kutusu” olarak isimlendirilir. TATA kutusunda mutasyon oluşturulması bazı genlerin transkripsiyonunun sonlanmasına neden olur. Bu durum TATA kutusunun transkripsiyonun başlamasında görevli olduğunu düşündürmektedir. Transkripsiyon kompleksinin oluşturulmasındaki ilk basamak TATA kutusuna genel transkripsiyon faktörlerinden TFIID’nin bağlanmasıdır. TFIID, TATA bağlayan protein (TBP) ve bilinen 12 TBP-asosiyasyon faktörünün (TAF), transkribe olacak gene özgü birleşiminden oluşmaktadır. TBP, DNA’ya bağlanan bir sekans-özgül proteindir. TATA kutusunda DNA çift ipliğinde minör oluğa bağlanır. TBP, DNA sarmalının çevresini kısmen sararak inisiyasyon kompleksindeki diğer proteinlerin bağlanabileceği eyer biçimli bir proteindir (42). TFIID’nin

bağlanmasından sonra diğer genel transkripsiyon faktörleri de bağlanarak pre-inisiasyon kompleksini (PIC) oluşturulur. TFIID'den sonra ikinci bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIIB komplekse katılır. TFIIB, TBP ye ve TATA kutusunun yukarı yönünde kendine özgü DNA dizisine (BRE kutusu) bağlanır. TFIIB, RNA polimeraz II için bir köprü görevi görür ve 3' UTR bölgesindeki (UTR- untranslated region) transkripsiyon başlama bazını tayin eder. Üçüncü faktör TFIIIF ile birlikte RNA polimeraz II TBP-TFIIB kompleksine bağlanır. RNA polimeraz II'nin promotöre bağlanmasından sonra transkripsiyonun başlaması için TFIIIE ve TFIIH transkripsiyon faktörleri de gereklidir. TFIIH, iki önemli görevi olan çoklu alt birimli bir proteindir. Görevlerinden birincisi transkripsiyonun başlangıç noktasında DNA'nın çift sarmal yapısının açılmasını sağlamaktır. Bu görevi yerine getirmek için TFIIH'nin iki alt biriminin helikaz aktivitesi vardır. İkinci görevi ise RNA polimeraz II'nin en büyük birimi olan C-terminalinin fosforilasyonudur. Bu görevi yerine getirmek için TFIIH'nin bir diğer alt biriminin protein kinaz aktivitesi vardır. RNA polimeraz II, C-terminalinin fosforilasyonundan sonra preinisiasyon kompleksinden ayrılır, uzama (elongasyon) faktörleri ile etkileşerek transkripsiyona başlar. Geride kalan preinisiasyon kompleksinde yer alan proteinler tekrar kullanılmak üzere serbestleşir (bknz Şekil 5) (41).



Şekil 5. RNA polimeraz II' den izole edilen transkripsiyon inisiyasyon kompleksine bağlanma basamakları: Transkripsiyon inisiyasyonu kompleksi oluşturulduktan sonra açık kompleks oluşturulması için ATP hidrolizi gereklidir. Transkripsiyon başlayınca ve polimeraz promotörden uzaklaşınca, CTD fosforile hale gelir ve genel transkripsiyon faktörleri TBP – promotör kompleksinden ayrılır (“Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. Molecular Cell Biology, 4th Edition, New York, W. H. Freeman & Co., 2000.” Kitabından alınmıştır).

2.7 TFIID' nin Yapısı:

İlk promotöre bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. Promotörün TATA kutusu bölgesine bağlanan TFIID, TBP (TATA binding protein)'den ve TAF'lerden (TBP

associated faktörlerden) oluşmaktadır. “TATA kutulu” promotörlere ek olarak RNA polimeraz II ile transkribe edilen pek çok gen ikinci önemli bir sekans elementi olan “Inr” taşır. Bazı “RNA pol II” promotörleri ise sadece “Inr” elementi içerip, “TATA kutusu” içermez. “TATA kutusu” içermeyip de “Inr” elementi içeren promotörler, transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 30 baz çifti aşağıda yer alan ve “Inr” elementi ile kooperatif olarak görev yapan, “downstream promotor element” (DPE) de içerir. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFTC’ in (TBP free TAF containing complex)’in TFIID’ in yerini aldığı *in vitro* koşullarda gösterilmiştir.

TBP ve TFIID, TATA sekansına direkt olarak bağlanarak promotörleri tanıyamazlar. TFIID’nin diğer alt birimleri olan TAF’lar “Inr” ve “DPE” elementlerini tanıyarak onlara bağlanırlar. TAF’lerin “Inr” ve “DPE” elementlerine bağlanması TBP’yi, TFIIB’ yi, polimeraz II’yi ve diğer transkripsiyon faktörlerini promotöre çağırmaktadır. TBP bu nedenle hem “TATA” kutusu içeren ve hem de içermeyen promotörlerde polimeraz II transkripsiyonunu başlatmak için merkezi rol oynamaktadır (41).

TAF’ler transkripsiyon inisiyasyonu ve çoklu protein komplekslerinin genoma bağlanmasında değişik roller oynayan ilgi çekici proteinlerdir. **TAF’lerin, transkripsiyon inisiyasyonunda TBP’den daha önemli rol üstlendiğini destekleyen bulgular bulunmaktadır.** Ayrıca ökaryotlarda, hücre döngüsü kontrolünde ve hayvanlarda gamet oluşumu ile sonlanan gelişimsel değişikliklerin düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Transkripsiyon sırasında TAF’ler TFIID ile TATA kutusuna bağlı durumdadır ve TATA kutusu olmayan promotörlerde “Inr” sekansını tanıma rol oynayan **“TAF- and initiator-dependent cofactors (TICs)”** olarak isimlendirilen diğer proteinler ile ilişkilidir (42).

TAF’ler için dört önemli göreve sahip oldukları söylenebilir. Birincisi gen ekspresyonu için diğer faktörler ile işbirliği yaparak spesifik ko-aktivatör olmalarıdır. İkincisi, TFIID’nin kararlılığını sağlamaktır (Örneğin TAF10’ un histon katlama motifi bulunmaktadır). Üçüncüsü, bazı TAF’ların farklı promotör elementleri ile direkt ilişkiye girerek, onları tanımlarıdır. Sonuncusu ise TAF’ların seçici olarak gen ekspresyonunda görevli olmalarıdır. Örneğin TAF 1 memeli genlerinin %18’ inin ekspresyondan sorumludur. MHC Sınıf I genlerinin ekspresyonu için gerekli olduğu bilinen TAF1’ in kinaz ve asetiltransferaz aktivitesi bulunmaktadır, fakat bu aktivitelerin rolleri ve TAF1’in fonksiyonu hala anlaşılamamıştır (44). TAF6 ve TAF9’ un direkt olarak DPE (downstream promotor element) ile etkileşime girdiği bilinmektedir. TAF’lerin fonksiyonları hakkında çok az şey bilinmekle birlikte, TFIID yapısı ve kompozisyonunun promotörde transkripsiyonun

başlaması için gerekli olan “pre inisiation complex” (PIC) adı verilen genel transkripsiyon faktörleri ve polimeraz II’ den oluşan kompleksin oluşturulması için önemli olduğu bilinmektedir (44).

2.8.TAF7 ve İşlevleri:

HIV Tat proteini TAF 1’in asetil transferaz aktivitesi gösteren (AT) domainine bağlanarak enzimatik aktivitesini inhibe etmektedir. Bir TFIID elemanı olan TAF7’ nin de TAF1’e bağlanarak onun AT aktivitesini inhibe ediyor olması ve MHC Sınıf I transkripsiyonunun represyonuna yol açması oldukça ilginçtir. Bu nedenle, TAF7 MHC Sınıf I transkripsiyonunun bir düzenleyicisidir denilebilmektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak TAF7’ nin PIC oluşumu tamamlanmadan transkripsiyonun başlamasına izin vermediği ve dolayısıyla transkripsiyonunun başlamasında bir kontrol noktası düzenleyicisi olduğu hipotezi öne sürülebilir. TAF7’ nin PIC’ de TFIID ile etkileşimde olduğu ve transkripsiyondan önce PIC’ den ayrıldığı rapor edilmiştir. TAF7’ nin kompleksten ayrılmasından sonra TAF1 fosforillenir. Böylece tekrar TAF7’nin bağlanması olasılığı azaltılır (45).

Literatürde TAF7 ile ilgili az sayıda yayın bulunmaktadır. Bunların çoğu TFIID kompleksinin farklı ökaryotlardaki yapısını ve diğer TAF’ler ile olan ilişkileri kapsayan çalışmalardır. İki TAF7 promotörü ve ekspresyonu ile ilgili olup protein fonksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili ancak 4 makale bulunmaktadır. Bunlardan biri TAF7’nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde TAFII250’yi bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürmektedir (2). Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAFII250 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir. Ayrıca HIV Tat proteini gibi elongasyon faktörü P-TEFb ile etkileşerek elongasyonu desteklemektedir (3). Sonuç olarak TAF7’nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırdığı söylenebilir.

TAF7’nin apoptoz sürecinde bir rolü olabileceğine ait bir yayın bulunmaktadır. 2004 yılında Fukuchi ve arkadaşları TAF7’nin poliamin transport aktivitesini düzenleyerek poliamin analogları ile indüklenen apoptozda rol oynadığını ileri süren bir çalışma yayınladılar. Bu çalışma kapsamında poliamin transport aktivitesinde rol oynayan genleri tanımlayabilmek amacıyla öncelikle MGBG (methylglyoxal bisguanylhyazone) dirençli

CHO hücreleri oluşturulmuştur. MGBG, bir poliamin transport inhibitörü ve hücrelere eklenmesi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. MGBG dirençli hücrelerde retroviral gen tuzağı (retroviral gene trap) metoduyla direncin oluşumunu sağlayan gen, bu çalışmada TAF7 olarak tanımlanmıştır. Yazarlar verilerini TAF7'nin poliamin transportunda düzenleyici olarak rol aldığı ve bu yolla indüklenen programlanmış hücre ölümünde işlevi olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ancak bu çalışmadaki verileri farklı yorumlamak mümkündür ve TAF7'nin apoptozda rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kullanılan yöntem, hangi genin ekspresyon kaybında MGBG'ye karşı direnç geliştiğini saptamaya yöneliktir. Sonuç olarak da TAF7 ekspresyon kaybında MGBG ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Eğer TAF7, transkripsiyonu durdurma işlevi ile apoptoz yolağında görev alıyorsa, yokluğu bu yolaktaki ardışık sinyal iletiminde bir duraklamaya yol açarak direnç gelişimine neden olacaktır. Diğer bir ifadeyle gözlenmiş olan apoptoza karşı direnç, TAF7 poliamin transport yolunda rol oynadığı için değil, genel olarak programlanmış hücre ölümünde bir fonksiyonu varsa da gözlenebilir.

TAF1' in kinaz ve histon asetil transferaz (HAT) aktiviteleri belirli genlerin transkripsiyonu için ve memeli hücrelerinde G1 progresyonu için gereklidir. Bir diğer TFIID alt ünitesi olan TAF7, TAF1'e bağlanır ve TAF1 HAT aktivitesini inhibe eder. TFIID'deki TAF1/TAF7 interaksiyonunun bozulmasının TAF1 HAT aktivitesine ve siklin D1 ve A transkripsiyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Over ekspresyon ve siRNA deneyleri ile TAF7 nin bu promotorlarda fonksiyonel transkripsiyonal represör olduğunu doğrulamıştır (46,47)

Araştırmamızda TAF7'nin apoptoz sürecine ve hücre döngüsüne olan etkisini incelenmiştir. Apoptoz ve hücre döngüsü ile ilgili genel bilgi aşağıda verilmiştir.

2.9. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz):

Programlanmış hücre ölümü dokularda ve embriyonik gelişim sırasında yer alan normal fizyolojik bir hücre ölümü formudur. Yetişkinlerde programlanmış hücre ölümü, hücre çoğalmasının kontrolünden ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Ayrıca programlanmış hücre ölümü DNA'sı hasar görmüş veya virüs ile enfekte, dolayısıyla potansiyel zararlı hücrelere karşı bir korunma mekanizmasıdır. Böylece programlanmış hücre ölümü, kansere yol açabilecek potansiyel zararlı mutasyonları taşıyan hücrelerin eliminasyonunu sağlamaktadır .

Embriyonik gelişim sırasında, programlanmış hücre ölümü, bir dokuda istenmeyen

hücrelerin eliminasyonunda rol oynamaktadır. Örneğin programlanmış hücre ölümü larval dokularda parmak aralarındaki hücrelerin elimine edilmesinde ve dolayısıyla parmakların oluşmasında görevlidir.

Programlanmış hücre ölümü pek çok sinyal yollarının entegre işbirliği ile düzenlenmektedir. Bazı sinyal yolları hücre ölümünde rol oynarken bazıları ise hücrelerin yaşama devam etmesinde görev almaktadır (41, 43).

2.9.1 Kaspazlar:

Kaza sonucu meydana gelen hücre ölümüne karşılık programlanmış hücre ölümü “apoptoz” olarak bilinen, morfolojik bir değişiklik olarak karakterize edilen aktif bir süreçtir. Apoptoz sırasında genellikle kromozomal DNA “nükleozomlar” arasından kesilerek küçük parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır ve nükleus küçük parçalara bölünür. Son olarak hücre, membran kaplı küçük parçalara bölünür. Apoptotik hücreler ve hücre parçacıkları hem makrofajlar, hem de komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagosite edilirler. Böylece apoptoz sonucu ölen hücreler dokudan uzaklaştırılır. Akut yaralanma sonucu ölen hücreler ise içeriklerine ekstrasellüler boşluğa verirler ve yangıya neden olurlar.

C. Elegans’ da programlanmış hücre ölümü çalışmalarında apoptozda görevli üç önemli gen tanımlanmıştır. Nemotod gelişimi sırasında toplam 1090 somatik hücreden 131’ i programlanmış hücre ölümü ile elimine edilmektedir. *C. Elegans*’ da apoptozun oluşması için iki gen, ced-3 ve ced-4 gereklidir. Üçüncü gen, ced-9, ise apoptozun negatif kontrolünde rol oynamaktadır. Eğer ced-9 mutasyon ile inaktive edilirse, normal olarak yaşamaya devam eden hücreler apoptoza gider. Eğer “ced-9” anormal yüksek seviyede eksprese edilirse, normal programlanmış hücre ölümü meydana gelemez.

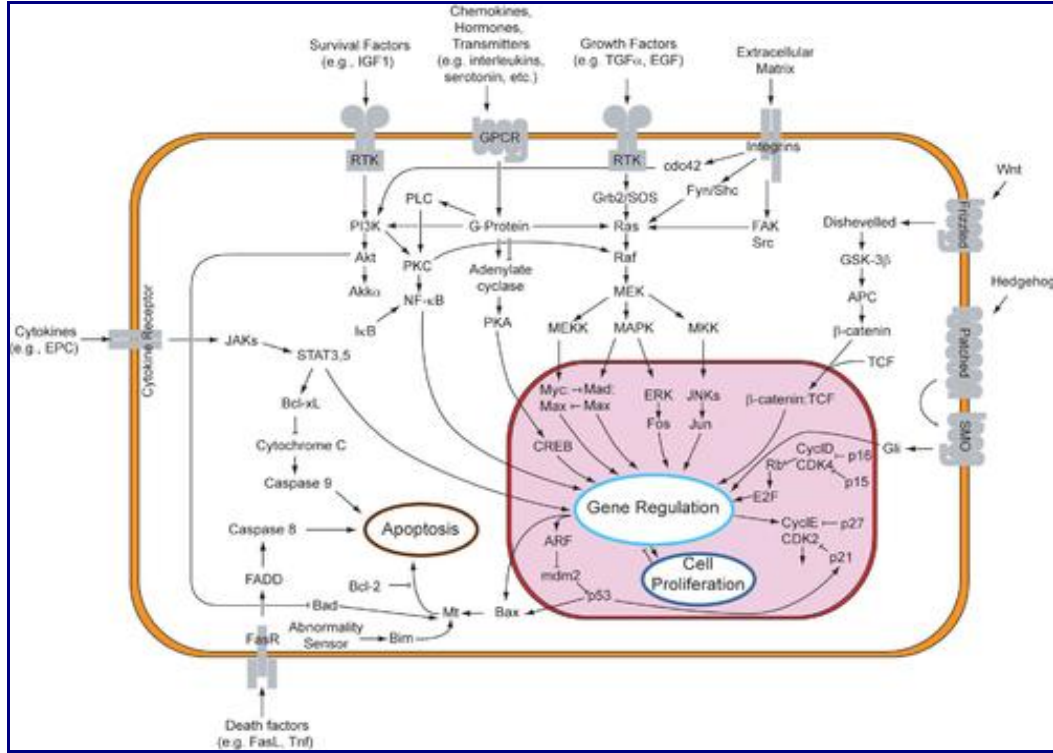
“Ced-3”, “ced-4” ve “ced-9” genleri ile benzer olarak memelilerde de korunmuş efektör ve düzenleyici proteinler tanımlanmıştır. “Ced-3” memelilerde “kaspazlar” olarak bilinen bir proteaz ailesinin prototipidir. Çünkü her ikisinin de aktif bölgelerinde “sistein” ©, kestikleri bölgelerde de “aspartik asit” (Asp) amino asitleri bulunmaktadır. Kaspazlar yaklaşık olarak 100 farklı hedef proteini olan, apoptozda görevli bir proteaz ailesidir. Kaspazların anahtar hedefleri, nükleer DNA’nın fragmentasyonudur. Bu nedenle kaspaz ailesi nükleer DNA’nın fragmentasyonundan sorumlu bir Dnase’ı da içermektedir. Ek olarak kaspazlar nükleer laminleri de parçalayarak nükleus ve hücre iskeleti proteinlerin fragmentasyonuna ve hücrenin membran kaplı küçük parçalara fragmentasyonuna da neden olmaktadır.

Kaspazlar, aktif forma proteolitik bir kesim sonucu dönüşebilecek olan inaktif prekürsörler olarak sentezlenirler. Bir başlangıç kaspazının aktivasyonu, diğer kaspazların aktivasyonuna da yol açan zincir reaksiyonunu başlatır ve hücrenin ölümüne yol açar. Kaspazların düzenlenmesi hücrenin yaşamına devam etmesi için çok önemlidir. “Ced-4” ün memeli homoloğu olan “Apaf-1” kaspazlara bağlanır ve onların aktivasyonunu sağlar. “Ced-9” un memeli homoloğu olan “Bcl-2” ailesi ise kaspaz aktivasyonunu ve dolayısıyla programlanmış hücre ölümünü inhibe eder. Ayrıca kaspazlar, apoptoz proteinlerinin inhibitörleri olan “IAP” ler olarak isimlendirilen protein ailesi ile de düzenlenirler. “IAP” ler kaspaz aktivitesini direkt olarak inhibe ederler (41, 43).

2.9.2 Apoptoz Mekanizmasının Kontrolü:

Programlanmış hücre ölümü süreci ekstrasellüler veya intrasellüler hücre sinyallerince kontrol edilir. Ekstrasellüler sinyaller bir uyarana yanıt olarak hücre membranını geçen toksinleri, hormonları, büyüme faktörlerini, nitrik oksidi veya sitokinleri içerir. Bu sinyaller pozitif ya da negatif olarak apoptozu etkiler. İntrasellüler apoptotik sinyal bir strese yanıt olarak başlatılır, bu da hücrenin intiharına neden olabilir. Nüklear reseptörlerin glukokortikoidlere, ısı, radyasyon, besin eksikliği, viral enfeksiyon, hipoksi ve intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artması nedeni ile bağlanması, intrasellüler apoptoz sinyallerinin salgılanmasına neden olur. Poly ADP riboz polimerler gibi pek çok hücrenel komponent apoptoz reglasyonuna yardım etmektedir.

Hücre ölümünün gerçek prosesinden önce düzenleyici proteinler ile apoptoz yolağı başlatılır. Bu basamak apoptotik sinyallerin hücre ölümüne neden olmasına veya prosesin durdurulması ile sonlanabilir. İki temel ana regülasyon metodu tanımlanmıştır. Bunlardan biri mitokondri fonksiyoneliyesini hedef alır, diğeri ise ekstrinsik adaptör proteinler ile sinyalin apoptoz mekanizmasına aktarılmasına neden olur. Bir diğeri apoptoz başlaması için gerekli olan ekstrinsik yolak toksinlerle yapılan çalışmalarda hücre içinde kalsiyum konsantrasyonunun artması ve kalsiyum bağlanan proteaz olan kalpain aracılığıyla apoptozla neden olması olarak tanımlanmıştır. Hücre ölümü regülasyonunda tanımlanmış olan pek çok sinyal ileti yolağı şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6: Apoptotik sinyal iletimi (<http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>' den alınmıştır.)

2.9.3 Mitokondriyal Düzenleme:

Mitokondri çok hücreli yaşam için olmazsa olmazdır. Mitokondrisiz bir hücre aerobik solunum yapamaz ve hemen ölür. Mitokondriyi hedef alan apoptotik proteinler farklı yollarla etki eder. Mitokondriyal hacim artışına ve dolayısıyla membranda por oluşmasına ya da mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırarak apoptotik efektörlerin salınmasına neden olurlar. Bunlar intrinsik yolak ile çok yakın ilgilidir. Nitrik oksit mitokondrinin membran potansiyelini artırarak daha geçirgen hale getirdiği ve apoptozu indüklediğine dair bulgular vardır.

SMAC (small mitochondria-derived activator of caspases)'lar olarak bilinen mitokondriyal proteinler sitozole salınır ve mitokondri membran geçirgenliğinde artışa neden olur. SMAC apoptoz inhibitör proteinlerine (IAP) bağlanır ve onları deaktive eder. IAP'ler normalde bir grup sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesini baskılar. Bunlar hücrenin degradasyonuna neden olur .

Memeli hücrelerinde programlanmış hücre ölümü kontrolünde merkezi rol oynayan “Bcl-2” ailesi üyeleri, mitokondriye etki eder. Memeli hücrelerinde anahtar kaspazlardan biri

“Kaspaz-9” dur. Kaspaz-9, “Apaf 1” ile kompleks oluşturarak aktive olur. Memelilerde bu kompleksin oluşması için mitokondriden “sitokrom c” nin salınması gereklidir. “Sitokrom c” mitokondriden sitozole apoptotik bir sinyal alınması sonucu salınır. Normal koşullarda “sitokrom c”, “apaf-1” ve “kaspaz-9” sitozolde bulunurken, mitokondride intermembran boşlukta lokalizedir. Yani normal koşullarda kaspaz-9 inaktiftir. Herhangi bir DNA hasarı veya büyüme faktörü azlığı gibi apoptotik uyarı nedeniyle mitokondri zarar görür ve sitozole “sitokrom c” salınır. Sitozolde, “sitokrom c” “Apaf-1” e bağlanır ve “apoptozom” olarak adlandırılan “Apaf-1 / kaspaz-9” kompleksinin oluşmasına neden olur. Böylece “kaspaz-9” aktive olur ve “kaspaz-3” gibi diğer efektör kaspazları da aktive eder ve hücre ölümü gerçekleşir. “Bcl-2” ailesi üyeleri mitokondri membranına etki ederek mitokondriyal bütünlüğü yani MAC (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization Pore) oluşumunu ve “sitokrom c” salınımını düzenler. Bcl-2 proteinleri apoptozu indüklemeye veya inhibe etmeye özelliklerine sahiptir. MAC/MOMP, Bax ve/veya Bak ile por oluşturulurken, Bcl-2, Bcl-xL veya Mcl-1 ile por oluşumu engellenir. İlginç olarak mitokondriyal hasar sadece “sitokrom c” salınımına değil, bununla birlikte apoptozu neden olan başka proteinlerin de salınımına neden olmaktadır. Bunlara örnek olarak “Smac/Diablo” proteini verilebilir. Bu protein kaspaz aktivitesini “IAP” ler ile yarışarak gerçekleştirebilir (41, 43).

2.9.4 Ekstrinsik Yolak:

Memeli hücrelerinde apoptoz mekanizmasının direkt olarak başlaması ile ilgili olarak tumour necrosis factor (TNF) ile indüklenen ve Fas-Fas ligand ile düzenlenen modeller ileri sürülmüştür. Her iki model de TNF reseptör (TNFR) ailesi reseptörleri ile ekstrinsik sinyaller ile ilişkilendirilmiştir.

TNF yolağı:

TNF aktive makrofajlarla oluşturulan bir sitokindir ve apoptozun major ekstrinsik mediatörüdür. İnsan vücudundaki pek çok hücre TNF: *TNF-R1* ve *TNF-R2* reseptörlerini bulundurur. TNF’in TNF-R1’e TNF reseptör asosiyasyon domainleri (TRADD) ve Fas ile asosiyasyon domain proteinleri (FADD) aracılığıyla bağlanması kaspaz aktivasyonuna neden olan yolağı başlatır. Bu reseptöre ligandının bağlanması hücre yaşamı ve enflamatuvar cevaplarda yer alan transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna indirekt olarak neden olur.

Fas volağı:

Fas reseptörü (*Apo-1* veya *CD95* olarak da bilinir) TNF ailesinin transmembran protein parçası olan Fas ligandına (FasL) bağlanır. Fas ve FasL arasındaki etkileşim ölüm indükleyen sinyal kompleksi FADD, caspase-8 ve caspase-10 dan oluşan (DISC) oluşmasına neden olur. Bazı hücrelerde (tip I) işlenmiş kaspaz-8 direkt olarak kaspaz ailesini aktive eder ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Diğer hücre tiplerinde ise (Tip II) Fas-DISC kompleksi bir geri basleme halkası oluşturur ve proapoptotik faktörlerin mitokondriden salınmasını ve kaspaz-8 in aktivasyonunu artırır.

2.9.5 Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu

Programlanmış hücre ölümünü birtakım salgılanan polipeptidlerin hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanması ile direkt olarak aktive olur. Bu hücre ölümü sinyal polipeptidleri **“tümör nekroz faktör (TNF)”** olarak isimlendirilen bir protein ailesine aittir. TNF ailesi üyelerinden en iyi tanımlanmış olanlarından biri “Fas” olarak isimlendirilen bir hücre yüzey reseptörüdür. “Fas” reseptörünün immün sistemde hücre ölümünün kontrolünde önemli görevleri bulunmaktadır. Örneğin “Fas” reseptörünün indüklenmesi ile aktive edilen apoptoz immün sistemin, kanser ya da virüs ile enfekte olan, hedef hücrelerinin öldürülmesinden sorumludur. Ayrıca “fas” ligandı immün cevap sonunda fazla lenfositlerin eliminasyonunda da görevlidir.

Hücre ölüm reseptörleri kaspazları direkt olarak aktive ederek apoptoza yol açarlar. TNF ve diğer benzer aile üyeleri üç polipeptid zincirinden oluşur. Reseptöre adaptör bir proteinin bağlanması sonucu reseptörün sitoplazmik kısmına “kaspaz-8” bağlanarak aktive olur. Aktive “kaspaz-8” molekülleri diğer kaspazları da aktive ederek hücrenin ölümü ile sonuçlanan bir kaspaz kaskatını başlatır.

Kaspaz-8 sadece diğer kaspazları değil “Bcl-2” ailesi üyelerinden biri olan Bid” i de aktive etmektedir. Normal olarak “bid” inaktif formda sitozolde bulunur. Bununla birlikte “kaspaz 8” ile aktive edilmesi sonucu mitokondriye geçer ve membran bütünlüğünü bozarak “sitokrom c” nin sitozole geçmesini sağlar. Bu durum “kaspaz 9” un aktivasyonuna neden olur (43).

2.9.6 Hücre Yaşam Sinyalleri:

TNF ve diğer benzer polipeptidler ile sinyal iletimi hücre ölüm reseptörleri ile

indüklenen apoptozda aktif rol almaktadırlar. Hücrenin yaşamına devam etmesinde görevli sinyal yolları ise ekstrasellüler büyüme faktörleri ve hücre-hücre etkileşimleri sayesinde apoptoza karşı savaş vermektedir. Pek çok memeli hücresinde hücreler yaşama devam etme sinyalleri diğer hücreler tarafından baskılandığı zaman apoptoza gitmektedir.

Bir önemli intrasellüler yaşam sinyal yolağı, protein tirozin kinazlar ya da G protein kaplı reseptörler ile aktive edilen enzim PI 3-kinaz ile başlatılmaktadır. PI 3-kinaz membran fosfolipid PIP₂'yi PIP₃'e fosforiller. PIP₃ "protein-serin/treonin kinaz" "Akt" ı aktive eder. Sonra "Akt" apoptozu düzenleyen pek çok proteini aktive eder. "Akt" ın bir substratı bir "Bcl-2" ailesi üyesi olan "Bad" dır. Bad (Bid'e benzer olarak) mitokondriden sitokrom c' nin salınmasını sağlayarak hücre ölümünü indükler. Akt tarafından Bad'ın fosforilasyonu sitozolde proteinlerin bağlanma bölgelerini oluşturur. Böylece "Bad" ın mitokondri membranına translokasyonu önlenir. Akt ayrıca hücrenin yaşamının devam etmesi sırasında hedef genlerin ekspresyonunun kontrolünde görevli pek çok transkripsiyon faktörünü de fosforile eder. Ayrıca Akt başka bir protein kinaz olan GSK-3' ü de fosforiller. GSK-3 hedef genlerin transkripsiyon ve translasyonunu düzenleyerek apoptoza etki eder. PI 3- kinaz / Akt yolağı, IAP'ler ve düzenleyicileri sayesinde hücre yaşamı düzenlenir (41, 43).

Hücre yaşamı sadece PI 3-kinaz/Akt yolağı sayesinde değil, Ras/Raf/ERK yolağı gibi diğer sinyal yolları ile de düzenlenmektedir. RSK olarak isimlendirilen bir protein kinazın ERK tarafından fosforillenmesi ile de apoptoz inhibe edilmektedir. Akt'a benzer olarak RSK Bcl-2 ailesi üyesi Bad'ı fosforiller. Böylece hücrenin yaşamına devam etmesi için gerekli yaşam sinyalleri PI 3-kinaz / Akt ve ERK yolağı ile sağlanır. Ayrıca ERK ve RSK apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunu etkileyen transkripsiyon faktörlerini de fosforiller (41, 43).

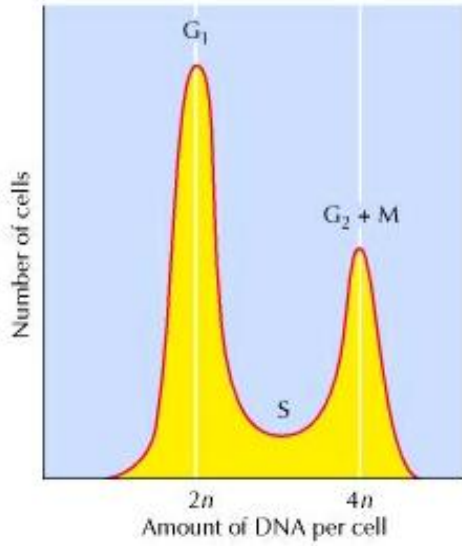
2.10 Hücre Döngüsü

Hücre Döngüsü bir hücrede bölünme ve replikasyon sürecinde yer alan olaylar serisinden oluşmaktadır. Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü interfaz (hücrenin büyüme, nutrientlerin akümüasyonu ve DNA nın replikasyonu) ve mitoz (M) safhalarından oluşmaktadır.

2.10.1.Hücre Döngüsü Fazları:

Hücre döngüsü ökaryotik hücrelerde M, G1, S ve G2 fazlarından oluşmaktadır. M (mitoz) fazı genellikle sitokinez sonrası başlar. S (sentez) fazı DNA replikasyonunun

oluştugu fazdır. Hücre interfaz (G1, S ve G2 safhalarından oluşur) boyunca büyür Farklı tip hücrelerde hücre döngüsü fazlarının süreleri farklılık gösterir. Tipik bir insan hücresinde toplam hücre döngüsü süresi 24 saattir. G1 fazı yaklaşık 11, S fazı yaklaşık 8, G2 yaklaşık 4 ve M fazı ise yaklaşık 1 saat sürmektedir. Bazı hücreler daha hızlı bölünebilir. Örneğin mayalar sadece 90 dakikada hücre döngüsünün tüm safhalarını gerçekleştirebilir. Ayrıca embriyo hücrelerinde daha kısa hücre döngüleri (30 dakika veya daha az) gerçekleşir. Hızlı çoğalan embriyo hücrelerinin yanı sıra bazı deri fibroblastları, iç organ hücreleri gibi somatik hücreler sadece hücre ölümü veya yaralanması ile kaybolanların yerine geçmek için bölünürler. Bu hücreler G1 den hücre döngüsünün dinlenme safhası olan G0 a geçerler. G0 da metabolik olarak aktif olmakla birlikte dışarıdan uygun sinyal almadıkça uzun süre proliferasyon olmazlar.



Farklı hücre döngüsü fazlarındaki hücreler DNA içeriklerine göre ayrımlanabilirler (Şekil 7). Örneğin G1 deki hayvan hücreleri diploidtir yani $2n$ 'dir (her kromozomdan iki kopya barındırır). S fazında replikasyon nedeniyle DNA içeriği $2n$ 'den $4n$ 'ye çıkar. G2 ve M deki hücrelerde DNA içeriği $4n$ kalır. Sitokinezden sonra $2n$ 'ye düşer. Deneysel olarak DNA içeriği hücrelerin floresan bir boya ile inkübasyonu sonrası DNA'sının işaretlenmesi ve tek tek hücrelerin floresans intensitesinin akım sitometresi ile belirlenmesi ile ölçülür.

Şekil 7: Hücresel DNA içeriğinin Belirlenmesi

Hücreler tek tek floresan intensitesi ölçülmesi ile elde edilen verilere karşılık hücre sayısı grafiği çizilerek iki pik elde edilir. Bu pikler $2n$ ve $4n$ 'e karşılık gelir. $2n$ hücreler G1, $4n$ hücreler G2/M ve S fazı hücrelerinin DNA içeriği $2n$ ve $4n$ aralığındadır.

The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000, Geoffrey M Cooper'dan alınmıştır.

2.10.2. Hücre Döngüsünün Kontrol Edilmesi:

Hücrenin bölünme döngüsüne girip girmeyeceği çevreden gelen ekstrasellüler sinyallerle (büyüme faktörleri gibi) regüle edilir. Buna ek olarak hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve mitoz gibi hücresel prosesler de hücre döngüsü ilerlemesi süresince koordine edilmelidir. Bu da hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki kontrol noktaları ile

gerçekleştirilir.

Önemli bir hücre döngüsü kontrol noktası geç G1 de gerçekleşir. G1 den S'ye geçişi kararını kontrol eder. Bu kontrol noktası mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) START olarak tanımlanmıştır. S fazına geçişi ve dolyısıyla hücre döngüsüne girilip girilmeyeceğine bu noktada karar verilir. START maya hücre döngüsünde nutrientlerin ulaşılabilirliği gibi eksternal faktörlerle çok iyi regüle edilen bir olaydır.

Pek çok hayvan hücresi benzer şekilde G1 fazında regüle edilir. Geç G1'deki bu karar noktasına hayvan hücrelerinde “restrisyon noktası” denir. Mayadaki START ile fonksiyonları analog olmakla birlikte primer olarak hücre döngüsüne girilip girilmeyeceğine nutrientlerin ulaşılabilirliğinden çok ekstrasellüler büyüme faktörleri ile karar verilir. Uygun büyüme faktörlerinin mevcutluğunda hücre restriksiyon noktasını geçer ve S fazına girer. Bir kere restriksiyon noktasından geçildiğinde daha sonraki büyüme faktörleri ve sitümülasyonlar olmasa bile hücre hücre döngüsünü tamamlamak zorundadır. S fazına geçemeyen hücreler ise hücre döngüsünün sessiz fazı olan G0 a girerler. Burada uzun periyotlar boyunca çoğalmadan kalabilirler. G0 hücreleri metabolik olarak aktif olmakla birlikte büyümeleri durmuştur ve protein sentez hızları azalmıştır. Pek çok hayvan hücresi uygun büyüme faktörleri veya diğer ekstrasellüler sinyallerle prolifer olmaya çağırılmadıkça G0 da kalır. Örneğin deri fibroblastlarının hasarı durumunda trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ile çoğalması sitümüle edilir (41).

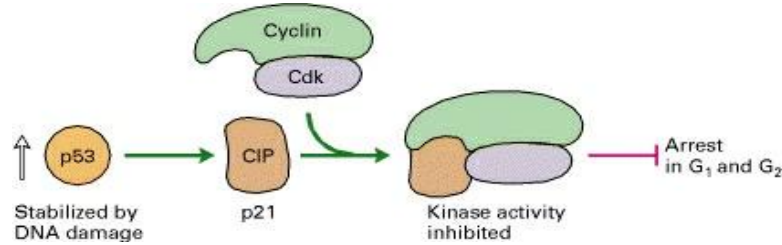
2.10.3.Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları:

Hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki düzen bir seri hücre döngüsü kontrol noktaları ile sağlanır. Bu noktalar hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engeller.

Daha önce de belirtildiği gibi hücre döngüsünde G1, S, G2 ve M kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları kromozomların eksik kopyalanması, DNA replikasyonum tamamlanmamış olması, replike olmamış ya da hasarlı DNA'ya duyarlıdır. G2 deki kontrol noktası replike olmamış DNA'yı algılar ve böylece DNA replikasyonu tamamlanmadan mitozun başlamasına engel olur. Ayrıca hasarlı DNA varlığında da G2 noktasında duraklama gerçekleşir ve bu da hasarın onarılması için gerekli zamanı sağlar. DNA hasarı varlığında G1 ve S kontrol noktalarında da duraklama gerçekleşir. S deki kontrol noktasında sadece DNA hasarı değil, replikasyon sırasında yanlış

baz eşleşmesi gibi ya da eksik replikasyon gibi oluşabilecek hataları bulma ve onarma şeklinde kalite kontrol gerçekleştirilir.

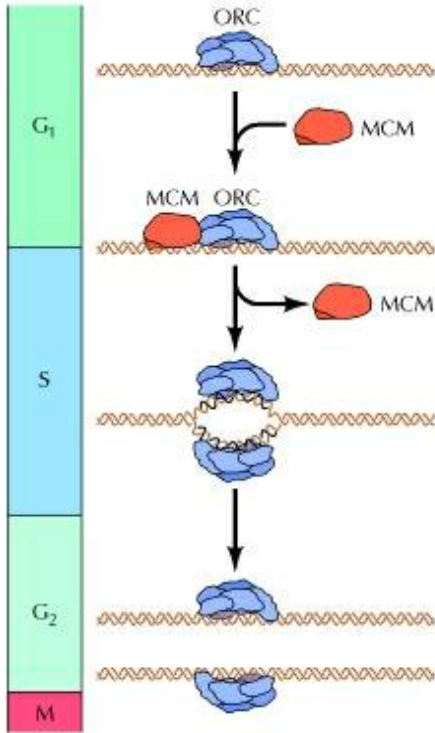
G1, S, G2 kontrol noktalarında hasar görmüş DNA'ya bağlanan proteinler sayesinde hücre döngüsü durdurulur. Henüz tam olarak tanımlanmamış olan bu proteinler sadece döngüyü durdurmakla kalmaz, DNA hasarı onarımını ve gerekli durumlarda programlanmış hücre ölümünü aktive eder. DNA hasarını algılayan proteinlerin doğrudan hedefleri ATM ve ATR adı verilen protein kinazlardır. ATM ilk kez “Ataxia Talangiectasia” hastalığında tanımlanmıştır. Bu hastalıktan etkilenen bireylerde ATM geninde mutasyonlar mevcuttur, sinir ve immün sistem hataları ve kanser görülme oranı yüksektir. ATM ve ATR aktifleştikten sonra sırasıyla Chk2 ve Chk1 kinazları fosfatlayarak aktive eder. Bu kinazlar da hücre döngüsünü düzenleyen sistemin bileşenlerini fosfatlayarak hücre döngüsünü duraksatır. Memeli hücrelerinde Chk2 ve ATM tarafından p53 fosforillenerek G1 kontrol noktasında duraksama gerçekleşir. Fosforillenen p53 daha kararlı hale gelerek süratle yıkılmadan korunur. Böylece herhangi bir DNA hasarı durumunda p53 miktarında hızlı bir artış olur. Bu da hücre döngüsünü duruduracak hedef genlerin uyarılmasına yol açar. İnsan kanser hücrelerinde sıklıkla p53 mutasyonuna rastlanır. Bu da DNA hasarı varlığında G1 de duraklamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak yavru hücreler geçer. Böylece mutasyon sıklığı artar ve genom kararsızlığı kanserleşme sürecine katkıda bulunur (41) (Şekil 8).



Şekil 8. DNA hasarına yanıt olarak p53 ile indüklenen hücre döngüsü duraksaması. Stabil olmayan p53 proteini DNA hasar ile stabilize olur. Bu nedenle konsantrasyonu artar. Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53 bir siklin kinaz inhibitörü olan (Cdk1, Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 siklin komplekslerini inhibe ederek G1 ve G2'deki hücre döngüsü duraksamasına neden olan) p21CIP ekspresyonunu indükler. Molecular Cell Biology. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman; 2000'dan alınmıştır.

G2 kontrol noktası mitozun S fazı tamamlanmadan yani DNA tam olarak replike olmadan başlamasını engeller. Ayrıca genomun bir hücre döngüsünde bir kez replike olması da önemlidir. Bu nedenle DNA bir kere replike olunca kontrol mekanizması ile mitozdan

önce yeni bir S fazının başlaması önlenmelidir. Bu kontroller G2'deki hücrelerin S faza tekrar girmesini engeller ve mitozdan sonra yeni bir set DNA replikasyonunun başlamasını bloklayar. Bu noktada hücre yeni döngünün G1 fazına girer. 1970 yılında Potu Rao ve Rober Johnsan füzyon deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücreleri izole edip ve hücre hibritleri oluşturmuşlardır. G1 hücreleri S faz hücreleri ile füzyon yapılırken G1 nükleusu DNA sentezlemeye başlamıştır. G2 hücrelerin S hücreleri ile füzyon yapılması farklı sonuçlara neden olmuştur. G2 nükleusu S faz stoplazmasını barındırsa bile DNA sentezini başlatamamıştır. Bu da G2 nükleusunda DNA'nın rereplikasyonunun mitoz sonuna kadar bir bloklandığını göstermektedir (58). DNA replikasyonunun hücre döngüsü başına bir kere ile sınırlandırılması MCM (mini-chromosome maintenance) proteinleri olarak isimlendirilen bir grup protein ile gerçekleştirilir. Bu proteinler replikasyon orjinine replikasyon orjin kompleksi proteinleri ile birlikte bağlanır. MCM proteinleri replikasyonun başlamasını sağlayan lisans faktörleri olarak işlev görür (şekil 9). DNA'ya bağlanmaları sadece G1 fazındaki replikasyon orjinine



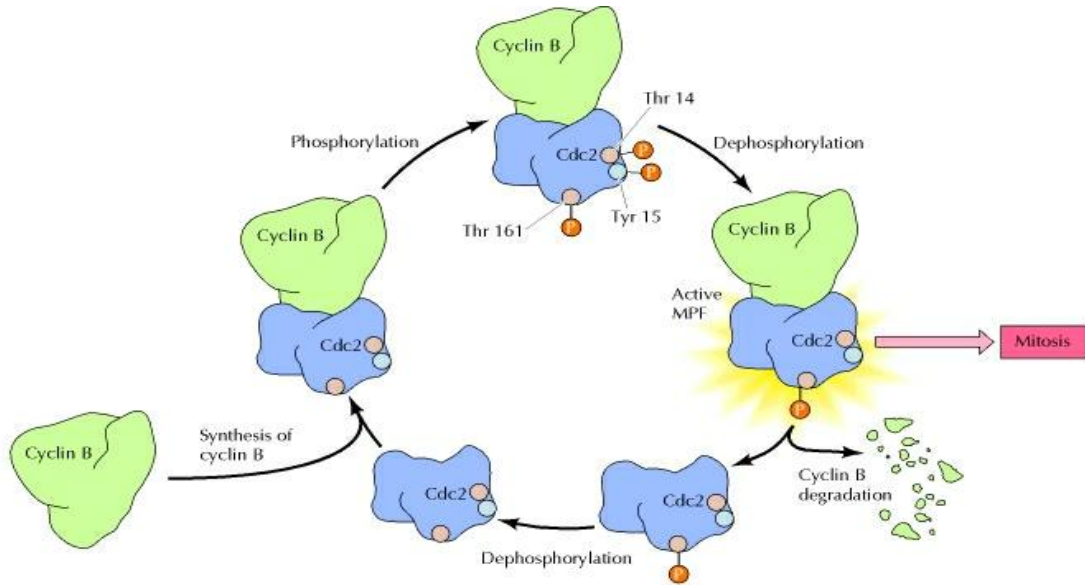
bağlanmaları ile gerçekleşir. Bu da DNA replikasyonunun sadece S fazına giren hücrelerde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bir kere replikasyon başlayınca MCM proteinleri replikasyon orjininden uzaklaşır. Böylece replikasyon hücre mitozdan geçmeden ve tekrar G1 fazına girmeden başlayamaz (41).

G2 kontrol noktasının işlemesi replike olmayan DNA'nın tanınması ve MPF (metaphase promoting factor)'ün aktivasyonunun inhibe edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu kontrol noktasında mutasyona sahip mayalarla yapılan çalışmalar replike olmayan DNA'nın nasıl tanındığı ve MPF aktivasyonunun nasıl önlendiğine ışık tutmuştur (58).

Şekil 9. Replikasyonunun kısıtlanması: DNA replikasyonu döngü başına bir kere ile ORC (origin replication complex) proteinleri ile birlikte MCM (mini-chromosome maintenance) proteinleri ile sınırlandırılır. MCM proteinleri sadece G1 de S fazını başlatabilmek için DNA ya bağlanabilir. Bir kere başlayınca MCM proteinleri uzaklaşır ve mitozdan sonraya kadar replikasyon tekrar başlayamaz. The Cell: A Molecular

Approach. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000, Geoffrey M Cooper'dan alınmıştır.

MPF G2'den M'ye geçişte genel düzenleyici olarak davranmaktadır. Bu 1971 yılında iki bağımsız araştırma grubunun (Yoshio Masui Clement Markert ve Dennis Smith, Rober Eckert) yaptığı çalışmalar ile ortaya konmuştur. G2'de durudurulmuş olan kurbağa oositlerine G2'den M'ye geçmiş olan hücre stoplazması mikroyenjeksiyon ile verildi. Bu da hücrelerin G2'den M'ye geçişini indükledi. Böylece mayozun M evresine geçiş için stoplazmadaki bir faktörün gerekli olduğu gösterildi. Bu faktör olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF) olarak isimlendirildi. Sonraki çalışmalar MPF' nin sadece mayozda değil, somatik hücrelerde de mitotik döngünün G2'den M evresine girişte indükleyici olduğunu göstermiştir. MPF siklin B ve Cdc2 protein kinazdan oluşan bir dimerdir. Cdc2, S ve G2 süresince siklin B ile kompleksler oluşturur. Cdc2 daha sonra aktivitesi için gerekli olan treonin-161 den fosfosillenir. S ve G2 süresince Cdc2/Siklin B kompleksinin inaktif olması için Wee 1 kinaz ile tirozin 15 komşusu treonin 14' den fosforillenir. G2 den M'ye geçişte ise Cdc25 olarak isimlendirilen fosfataz ile tirozin 15 ve treonin 14'den defosforile edilerek Cdc2/Siklin B kompleksi aktive edilir (şekil 10).

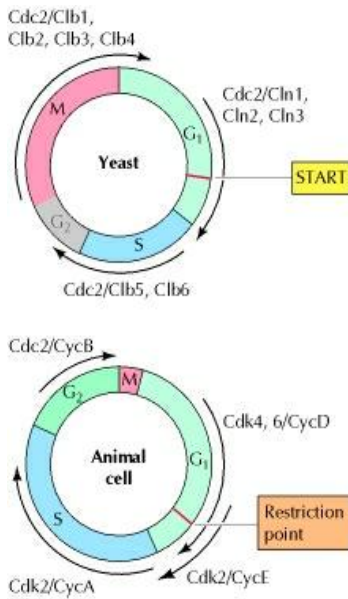


Şekil 10. MPF düzenlenmesi. S ve G2 boyunca Cdc2 siklin B ile kompleks oluşturur. Threonin-161'den fosforillenerek aktive ve tirozin 15, treonin 14'den fosforile edilerek deaktif olur. Bu da M faz olaylarını başlatır. Bir kere aktive olunca Cdc2 protein kinaz pek çok hedef proteini fosforile eder. Bu da M faz olaylarını başlatır. Ek olarak Cdc2 aktivitesi ubiquitin ile proteolitik yıkım siklin B degradasyonunu da sağlar. Siklin B'nin proteolitik yıkımı hücrenin mitozdan çıkıp sitokineze girmesine ve ardından interfaza geri dönmesine neden olur. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM.

Sunderland (MA):Sinauer Associates; 2000, Geoffrey M Cooper'dan alınmıştır.

Genom bütünlüğünü korumada önemli bir başka kontrol noktası da mitoz sonunda yer alır. İğ kontrol noktası olarak bilinen bu nokta iğ ipliklerine kromozomların tam ve doğru bağlanıp bağlanmadığını kontrol eder (57). Mitozda da kontrol noktası olduğu mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek mitotik iğ ipliklerinin oluşmasını engelleyen kolçisin ile yapılan deneyler ile ileriye sürülmüştür. Kültürdeki hücrelere kolçisin eklendiği zaman mitoz giden hücrelerin kondense olmuş kromozomları ile birlikte döngülerinin durduğu görülmüştür. Zaman geçtikçe mitotik kromozomları (karyotipi) belirlenebilen, döngüsü duran hücrelerin sayısı artmıştır. Mitotik kontrol noktası mitotik iğ ipliklerin düzgün ve doğru oluşup oluşmadığını kontrol eder ve oluşmadıysa APC poliübikütün sisteminin aktivasyonunu önler. APC übikütün sistemi normalde anafaz inhibitörünü inhibe eder, anafazın gerçekleşmesi için gereklidir ve mitozdan çıkış için gerekli mitotik siklinlerin degradasyonunu erteler. Sonuç olarak MPF aktivitesi yüksek, kromozomlar yoğunlaşmış kalır ve nükleer zarf tekrar oluşmaz (41).

2.10.4. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar



MPF (Cdc2/Siklin B kompleksi) tanımlandıktan sonra yapılan çalışmalar hücre döngüsünün denetiminin aydınlatılmasını ve benzer protein ailelerinin tanımlanmasını sağlamıştır. Cdc2 mayada hem START'dan geçişi, hem de mitoz girdişi kontrol etmektedir. Fakat bunu farklı siklinlerle bir araya gelerek gerçekleştirir. G2'den M'ye geçiş B tipi siklinlerle (Clb1, Clb2, Clb3 ve Clb4), START'dan geçiş ise G1 siklinler ya da Cln olarak isimlendirilen farklı bir sınıf siklinlerle Cdc2'nin bir araya gelmesi ile gerçekleştirilir. S evresinde ilerlemek için ise Cdc2 farklı B tipi siklinlerle (Clb5 ve Clb6) bağlanır.

Şekil 11. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Kompleksleri. Mayada START'dan geçiş G1 siklinleri (Cln1, Cln2 ve Cln3) ile birlikte Cdc2 ile kontrol edilmektedir. Cdc2 ile farklı B tipi siklinler (Clb'ler) kompleks oluşturup S fazdan geçişi ve Mitoza girdişi regüle etmektedir. Hayvan hücrelerinde Cdk4 ve Cdk6 kompleksleri D tipi siklinler ile birlikte G1 restriksiyon noktasında kontrolü sağlar. Cdk2/siklin E kompleksleri G1'in geç aşamalarında rol oynar ve G1'den S fazına geçiş için gereklidir. Cdk2/cyclin A kompleksleri S fazdan geçiş için ve Cdc2/cyclin B kompleksleri G2'den M faza geçiş

için gereklidir. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000, Geoffrey M Cooper'dan alınmıştır.

Yüksek ökaryotların hücre döngüleri sadece çeşitli siklinler tarafından değil, aynı zamanda çeşitli Cdc2 bağlantılı protein kinazlarla da kontrol edilmektedir. Cdc2 bağlantılı kinazlar, Cdk (Siklin bağımlı kinazlar) olarak bilinir. Cdc2 aynı zamanda Cdk1 olarak da bilinir. Cdk ailesi üyeleri hücre döngüsünün farklı aşamalarında ilerlemeyi yönlendirmek için spesifik siklinlerle bağlanır (bkz şekil. 11).

G1'den S'ye geçiş temel olarak siklin D ve E ile Cdk2, 4 ve 6'nın bağlanması ile gerçekleştirilir. Cdk 4 ve 6'nın D tipi siklinlerle (siklin D1, D2, D3) oluşturduğu kompleksler ise G1'den restriksiyon noktasına geçişte kritik bir öneme sahiptir. G1 in ilerleyen evresinde siklin E eksprese edilir. Cdk2/Siklin E kompleksi G1'den S'ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. S evresi sürecinde hücre döngüsünün ilerlemesi için Cdk2/Siklin A kompleksi gereklidir. G2'den M'ye geçiş ise Cdk1/Siklin B kompleksi ile gerçekleştirilir.

Hücre döngüsünde Cdk'ların aktivitesi dört moleküler mekanizma ile düzenlenir. Bu mekanizmalardan birincisi olan Cdk'ların siklinler ile yaptıkları komplekslerin oluşumu, siklin sentezi ve degradasyonu şeklinde gerçekleştirilir. İkincisi olan Cdk/siklin komplekslerinin aktivasyonu ise Cdk üzerindeki treonin 160 amino asitinin fosforilasyonu ile gerçekleştirilir. Bu fosforilasyon CAK (Cdk-aktifleştiren kinaz) olarak isimlendirilen Cdk7'nin siklin H ile kompleks oluşturması ile meydana gelen bir enzim tarafından katalizlenir. Üçüncü mekanizma ise Wee1 protein kinaz tarafından Cdk'nın amino ucuna yakın tirozinlerin inhibe edici fosforillenmesini kapsar. Örneğin Cdk1 ve 2 tirozin 15 ve komşu treonin 14'ün fosforillenmesi ile inhibe edilir. Bu Cdk'lar cdc25 protein fosfataz ile defosforile edilerek aktifleştirilirler. Dördüncü mekanizma ise Cdk/siklin komplekslerine (cdk inhibitörleri ya da CKI olarak adlandırılan) inhibitör proteinlerin bağlanması ile gerçekleştirilir. Memeli hücrelerinde Ink4 ve Cip/Kip olarak isimlendirilen iki CKI ailesi farklı Cdk/Siklin komplekslerinin düzenlenmesinden sorumludur (Tablo 1). Ink4 CKI'lar G1'deki restriksiyon noktasından geçişi inhibe ederler. Cip/Kip ailesi üyeleri ise hücre döngüsünün farklı aşamalarında aktivatör ve inhibitör olarak davranırlar. Cdk2'nin siklin A ve E ile yaptığı kompleksi baskımlarken, Cdk 4 ve 6'nın siklin D ile yaptığı kompleksleri aktive eder.

Tablo 1: Cdk İnhibitörleri. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Cooper GM. Sunderland (MA): Sinauer Associates;2000, Geoffrey M Cooper'dan alınmıştır.

Inhibitör	Cdk/siklin kompleksi	Etkilenen Hücre Döngüsü Fazı
Hayvan Hücreleri		
Cip/Kip ailesi (p21, p27, p57)	Cdk4/siklin D	G1
	Cdk6/siklin D	G1
	Cdk2/siklin E	G1/S
	Cdk2/ siklin A	S
Ink4 ailesi (p15, p16, p18, p19)	Cdk4/ siklin D	G1
	Cdk6/ siklin D	G1
Maya (<i>S. cerevisiae</i>)		
Far1	Cdc2/Cln	G1
Sic1	Cdc2/Cln5	S
	Cdc2/Cln6	S

2.11.MHC Sınıf II Molekülleri ve Sınıf II Transaktivatörü (CIITA)

T hücrelerinin aktivasyonu için antijenin, doku uyumluluk molekülleri tarafından kendilerine sunulması gerekmektedir. Özellikle viral enfeksiyonlarda aktive olan interferon salgısı CIITA ekspresyonunu tetiklemekte; kendisi de bir transkripsiyonel trans-aktivatör olan CIITA de enfekte hücrenin sınıf I ve sınıf II doku uyumluluk (MHC) moleküllerinin ifadesini arttırmaktadır. Özellikle sınıf II moleküllerinin ekspresyonu için CIITA gereklidir. Bağışıklık sisteminin bu önemli molekülünün, TAF7 ile olan etkileşiminin niteliği ve bu etkileşiminin hücre ölümüne olan etkisinin açığa kavuşturulması, immün sistem biyolojisi açısından önem kazanmaktadır. Bu yönde elde edilecek tüm veriler yeni olup; bağışık yanıtın oluşması, immün hücrelerin gelişimi (pozitif ve negatif seleksiyon), HIV biyolojisi gibi çok geniş alanlarda yeni açılımlar sağlayacaktır.

MHC II molekülleri ve CIITA ile ilgili ayrıntılı genel bilgi aşağıda verilmiştir.

2.11.1. MHC Sınıf II Molekülleri

MHC (major histocompatibility complex) Sınıf II molekülleri sadece antijen sunan hücreler ve lenfositlerde bulunur. Sınıf II molekülleri ile sunulan antijenler (sınıf I gibi sitozolik olmayanlar) ekstrasellüler proteinlerden elde edilir. Bu nedenle MHC sınıf II bağımlı

antijen sunumu *endositik* veya *ekzojen* olarak isimlendirilir (59).

İnsanlarda üç klasik sınıf II molekülü mevcuttur: HLA-DP, DQ ve DR. Farede ise son ikisinin ortoloğu olan A ve E mevcuttur. Bunlara ek olarak her iki türde klasik olmayan moleküller olan insanda HLA-DM ve-DO, farede M ve O olarak isimlendirilen moleküller de söz konusudur. Her Sınıf II molekülü iki zincir (alfa ve beta zincirleri) den oluşan bir heterodimerdir. Her Sınıf II molekülünün α ve β zinciri MHC nin sınıf II bölgesindeki farklı genler tarafından kodlanır. HLA-DO haricinde tüm durumlarda gen çiftleri ayrı ayrı kodlanır.

MHC-II proteinlerinin sürekli ekspresyonu doku spesifik ve makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreler gibi antijen sunan sunan (MHC II pozitif) hücrelerle sınırlıdır. Fakat diğer hücre tiplerinde IFN- γ gibi sitokinlerle stimülasyon sonrasında indüklenebilir.

Bu gen ailesinin transkripsiyonel kontrolünde pek çok DNA ya bağlanan transkripsiyon faktörü ve bir ana koaktivatör olan CIITA (class II cotransactivator) tanımlanmıştır.

2.11.2 Sınıf II Transaktivatörü (CIITA):

MHC class II (MHC-II) molekülleri spesifik immün cevapların gelişmesinde ekstrasellüler patojenlerden türettiği peptitleri CD4⁺ T lenfositlere sunarak önemli bir rol oynar. İmmün sistem için antijen sunumu, T hücre seçimi ve aktivasyonunu içeren pek çok kritik rolü olması nedeniyle yabancı patojenlere cevap olarak MHC-II ekspresyonu ekspresyon kontrolü de konak dokulara zararı minimize etmek için oldukça önemlidir. Sınıf II genlerin promotorları ile geniş bir set protein etkileşir. Bunlardan en önemlisi CIITA dir. CIITA ekspresyonun ana kontrolcüsüdür. Fakat direkt olarak promotora bağlanmaz. Transkripsiyon faktörü RFX (regulatory factor X) ile birlikte çalışır. RFX bir multiprotein "enhanceosome" kompleksin MHC II promotorlarında bir araya gelmesini koordine eder. Bu enhanceosome CIITA bağlanması için bir bölge oluşturur . Bu kontrol Sınıf II transaktivatör (CIITA) ile transkripsiyon seviyesinde ve kromatinin yeniden şekillendirilmesi ve epigenetik modifikasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenlen CIITA transkripsiyonel koativatör olarak sınıflandırılır (60). CIITA geni ekspresyonunun trofoblastlar, transforme kanser hücreleri veya sitokin uygulanan hücrelerde DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu gibi epigenetik bir takım olaylar sonucunda baskıldığı rapor edilmiştir. CIITA “sınıf II, major doku uyumluluk kompleksi, transaktivatör (class II, major histocompatibility complex, transaktivator)” proteini CIITA geni tarafından kodlanır. Bu gendeki mutasyonlar immün

sistemin ciddi düzeyde baskılandığı ve enfeksiyonla etkili bir şekilde savaşmadığı “çıplak lenfosit sendromu” ndan sorumludur. CIITA genini içine alan kromozomal anomaliler “Hodgkin Lenfoma” nın patogenezinde sorumludur.

CIITA in major hedef genlerinin MHC II molekül prezentasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte birtakım farklı hedef genler de rapor edilmiştir. CIITA in onların ekspresyonuna katkısı ise indirektir. MHCII ekspresyonuna CIITA geninin ekspresyon paterninin katkısı büyüktür. Çevresel ve hücresel sinyaller MHCII ekspresyonunu fizyolojik ve patolojik durumlarda aktive ya da represe eder. Kısaca spesifitesi ve çok kontrollü ekspresyon paterni CIITA'ı MHCII ile antijen sunumunda gerekli genlerin regülasyonunda önemli bir transkripsiyon faktörü yapmaktadır (61).

Major doku uyumluluk kompleks II nin master transkripsiyon regülatörü, sınıf II transaktivatör (CIITA) ilk tanımlandığında patolojik durumlarda pek çok farklı genin transkripsiyonunu nasıl modüle ettiği bilinmiyordu. CIITA'ın nasıl hücre ve doku spesifik transkripsiyonu gerçekleştirdiği çokça tartışıldı ve araştırıldı. Olası bir mekanizmanın CIITA transkripsiyonel aktivitesinin zaman uzamsal post translasyonel (PTM) kontrolü olabileceği ileri sürülmüştür. Yani CIITA'ın belirli amino asitleri hücre ve çevre koşullarına bağlı olarak modifiye edilmektedir (62).

CIITA mRNA'sı sadece insan MHC sınıf II pozitif hücre hatlarından ve dokularından elde edilebilir. CIITA proteini asidik bir transkripsiyonel aktivasyon domaini, 4 LRR (lösin zengin tekrar) ve bir GTP bağlama domaini içerir. Bu protein GTP bağlama özelliğini nükleusa transpotunda kullanır (60).

CIITA'ın MHC -II'nin transkripsiyonel regülasyonunda görevli olduğu bilindiği gibi MHC-II aksesuar genlerin (HLADM, HLA-DO ve varyant olmayan zincir ve b2-mikroglobulin) transkripsiyonel regülasyonunda da rol oynadığı bilinmektedir. CIITA immün sistemin antijen sunan hücrelerinde konstitütif olarak eksprese edilmekte iken, IFN gamma gibi enflamatuvar sitokinlerce zengin bir çevrede bulunan diğer hücre tiplerinde de eksprese edilir (63).

CIITA proteinini kodlayan MHC2TA geninin transkripsiyonel regülasyonu bağımsız promotor üniteleri (CIITA-PI – CIITA-PIV)'nin aktivitesi ile gerçekleştirilir. Bu promotor üniteleri hücre tipi ve aktivasyon spesifik olarak görevlendirilmiştir. CIITAPI ve CIITA-PIII dendritik ve B hücrelerinde konstitütif aktiftir. CIITA-PIII insan T hücrelerinde aktivasyon ile görevlendirildiği bilinmektedir. CIITA-PIV IFN-g ile indüklenen ekspresyonda yer alır.

Bunlara ek olarak insan non B hücrelerinde CIITA-PIII IFN-g ile aktive edilebilir (65)

İmmün sistem için çok önemli bir transaktivatör olan CIITA ile HIV Tat arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir (OKAMOTO et al, 2000). Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV replikasyonunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak HIV enfeksiyon gelişiminde bu iki protein arasındaki denge önem kazanmaktadır.

CIITA'in immün sistem hücrelerindeki transkripsiyonel transaktivasyon işlevi nedeniyle TAF7 ile etkileştiği gösterilmiştir (DEVAIAH BN et al, 2010). HIV ile enfekte hücrelerde, CIITA ve Tat etkileşimleri göz önünde tutulduğunda CIITA ve TAF7 etkileşimleri önem kazanmaktadır. TAF7'nin apoptoz sürecindeki rolünü göstermiş olmamız CIITA-TAF7 ilişkisinin önemini arttırmıştır. TAF7'nin apoptozda oynadığı rol göz önünde tutulduğunda, CIITA ile olan ilişkisinin doğrulanması immünoloji alanında çok farklı açılımlara neden olacaktır. Bir virüs ile enfekte bir hücrede interferon tarafından indüklenenecek CIITA ekspresyonu sonucunda, CIITA'in TAF7'yi bağlayarak hücrenin hemen apoptoza girmesini önlediği böylece gereken immün yanıt (MHC sınıf I ve II'de antijen sunumu) zaman kazandırdığı öne sürülebilir. Bu hipotezin denenmesi için CIITA varlığında TAF7'in apoptotik etkisinin ortadan kalkıp kalkmadığının gösterilmesi gerekmektedir. Bağışıklık sistemi için bu çok önemli molekülün TAF7 ile etkileşiminin moleküler temellerini ve bunun apoptoz sürecine olan etkisi ile ilgili bulgularımız ileriki bölümlerde verilecektir.

3.GEREÇLER VE YÖNTEM:

Araştırmanın Tipi:

Araştırmamız deneysel niteliktedir.

Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırmamız Aralık 2007-Mart 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Zeynep Sercan'ın laboratuvarı başta olmak üzere, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda, ARLAB'da, İzmir İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Serdar Özçelik'in ve Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Biyomühendislik Bölümü'nde Doç. Dr. Batu Erman'ın mikroskopi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları:

Çalışmamız insan üzerinde gerçekleştirilmemiştir. Hücre kültüründe çalışılmış olup deney ve kontrol grupları kullanılmıştır.

Çalışma Materyali:

Çalışmalarımızda HeLa, Kelly ve TREX (Tetrasiklinle regüle edilen ekspresyon sistemi) HeLa hücre hattı kullanılmıştır.

HeLa hücre Hattı Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Kemal Sami Korkmaz Laboratuvarı'ndan 2006 yılında

Kelly Hücre Hattı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Oğuz Altungöz Laboratuvarı'ndan 2006 yılında,

TREX HeLa Hücre Hattı ise İnvitrogen firmasından 2007 yılında satın alınmıştır.

Veri Toplama Aracı:

Araştırmamızda veri toplama aracı olarak kantitatif ve kalitatif deneyler kullanılmıştır. Çalışmalarımızda elde edilen veri tipi deney gruplarına göre aşağıdaki gibidir:

Kaspaz Deneyleri: Yüz de kaspaz aktivasyonu (sayısal değer)

Tubulin Polimerizasyon deneyleri: floresan şiddeti (sayısal değer)

İmmün Presipitasyon ve western blot verileri: Kalitatif değerlendirme

İmmün floresan görüntüleme verileri: Kalitatif veri

Kullanılan cihazlar:

- Hücre Kültürü Biyogüvenlik Kabini
- CO₂'li inkübatör (Thermo-Scientific Forma 310 Direct Heat)
- Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)
- İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)
- Thermal cycler cihazı (Eppendorf – Katalog No: 9776562)
- Agaroze jel elektroforez tankı (RunOne™ System Versn 021704)
- Biorad - Mini protean 3 Cell SDS Page jel elektroforez tankı (Katalog Numarası: 165-3301)
- Biorad - Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Katalog numarası: 170–3940)
- Plate okuyucu (BioTek Synergy HT)
- Neubauer lamı (Marienfeld – Ref 0610110, Lot 409104)

Kullanılan Sarf Malzemeleri:

- Roche - Eugene HD transfeksiyon ajanı (Katalog No: 04 709 705 001)
- Promega - One Glo Lusiferase Assay (Katalog No: E 610)
- Sigma - Caspase 3 Assay Kit (Katalog No: CASP3F)
- Cytoskeleton - Tubulin Polymerisation Assay Kit (Katalog No: BK006P)
- BD - Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (Katalog No: 340242)
- Invitrogen - Zeosin (Katalog No: R250-05)
- Invitrogen - GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Katalog No: 12397014)
- DMEM (Biochrom AG - FG 1385) ve RPMI (Biochrom AG - FG 1385) besi ortamları
- FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125)
- Hyclone – Tetracycline reduced FBS (Katalog No: SH30070.03T)

Veri toplamada kullandığımız yöntemlerden biri olan kaspaz aktivasyonu ölçümü kısa sürede sonuç alımı sağlayan bir yöntemdir. Bununla birlikte hücre sayısında etkilendiği için eşit hücre ekilmesi için deneyim gerektiren bir yöntemdir. İmmün floresan görüntüleme yöntemi kantitatif değil kalitatif bir yöntemdir. Hücre döngüsü analizi yöntemi hücre döngüsünün hangi safhasında ne kadar hücre olduğunu gösteren son derece güvenilir bir yöntemdir. Bununla birlikte hücreleri senkronize edememe veya pek çoğunun G0 da kalması nedeniyle gibi problemler yaşanmıştır.

Araştırma Planı ve Takvimi:

Laboratuvar Malzemelerinin temin edilmesi: Aralık 2007- Ekim 2007

TAF7'nin Tetrasiklinle Regüle Edilen Ekspresyon Sistemi'ne Klonlanması Ekim 2007- Ocak 2008

pcDNA 4TO TAF7 Plasmidinin TREX HeLa Hücrelerine Stabil Transfekte Edilmesi: Ocak 2008-Temmuz 2008

Tubulin Polimerizasyon Deneylerinin Yapılması: Kasım 2009

PFLAG TAF7 ve pcDNA 4TO TAF7'nin ser 159 amino asitlerinin alenine dönüştürülmesi Şubat 2010 – Nisan 2010

pcDNA 4TO TAF7 mutant plasmidinin TREX HeLa hücrelerine stabil transfekte edilmesi Nisan 2010 – Eylül - 2010

Kaspaz deneylerinin yapılması Ekim 2010 – Eylül 2011

Hücre Döngüsü Deneylerinin Yapılması Eylül 2011-Aralık 2011

Floresan Mikroskopi Deneylerinin Yapılması Ocak 2012

Verilerin Değerlendirilmesi:

Kantitatif veriler grafik ve hata barları eklenerek karşılaştırılmış ve verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Graphpad software'ı, student's t test yöntemi ile analiz edilmiştir.

Araştırmanın Sınırlılıkları:

Çalışmamızın güçsüz yanı hücrelerin hücre döngüsü deneylerinde senkronize edilememesidir.

Etik Kurul Onayı:

“TAF7 CIITA etkileşiminin Programlanmış Hücre Ölümü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” isimli projenin uygulanmasında etik açıdan bir sakınca olmadığına “Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu” tarafından 21.06.2007 tarihinde ve 11/06/2007 nolu toplantıda karar verilmiştir.

Etik kurul onay tarihi: 25.06.2007

Etik Kurul numarası:229

3.1 Hücre Hatları Ve Hücre Kültürü

Projede Kelly ve HeLa hücre hatları kullanılmıştır.

Gereçler:

- Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)
- İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)
- 10 ml. lik ve 5 ml. lik steril pipetler.
- 25 cm², 75 cm², 125 cm² lik filtreli flasklar
- CO₂’li inkübatör.
- DMEM ve RPMI 1640 besi ortamları.
- L glutamin
- FBS (Fetal bovine serum)
- Penisilin/streptomisin

Yöntem:**Besi Ortamı Hazırlanması:**

500 ml.’lik DMEM ya da RPMI besi ortamı içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml. konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 15 oranında FBS eklenir.

Kelly Hücre Hattı:

Kelly, insan nöroblastom hücrelerinden elde edilmiş hücre hattıdır. Yüzeye tutunarak monolayer halde üreyen hücrelerdir. İnkübe süreleri 30 – 40 saattir. Hücre kültüründe %5 CO₂’li ve 37 °C’lik ortamda RPMI 1640 besi ortamı (Biochrom AG - FG 1385) + % 15 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), ile üretilir. Hücreler kültür kabının yüzeyini % 70 oranında kapladıkça pasajları yapılır.

HeLa Hücre Hattı:

HeLa, insan serviks karsinoma hücrelerinden elde edilmiş bir hücre hattıdır. Yüzeye tutunarak monolayer halde üreyen hücrelerdir. Hücre kültüründe %5 CO₂'li ve 37 °C'lik ortamda DMEM besi ortamı (Biochrom AG - FG 0415) + %15 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), ile üretildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini %70 oranında kapladıkça pasajlandılar.

3.2.Tripan Mavisi Canlılık Testi

Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisi boyasını geçirmezler. Fakat ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulduğu için boyayı geçirir. Bu testte bir hücre süspansiyonu tripan mavisi ile karıştırılır ve hücrelerin boyayı alıp almadığı mikroskopta kontrol edilir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplazmaya sahip olarak görülürken, ölü hücreler ise mavi sitoplazmalı olarak görülür.

Gereçler:

Tripan mavisi %0,5

0,5 ml hücre süspansiyonu

Neubauer lamı

20'lik ve 1000'lik pipet ve pipet ucu

Mikrosantrifüj tüpü

İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)

Yöntem:

1. Süspanse hücre kültüründen 0,5 ml örnek alındı.
2. 1:1 Oranında tripan mavisi ve PBS bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
3. Tripan mavisi + PBS karışımından 0,5 ml alınıp 0,5 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı.
4. Neubauer lamının kenarlarına 1'er damla su damlatılıp üzerine lamel kapatıldı.
5. Lamel ile lam arasındaki boşluktan 10 µl tripan mavisi + hücre karışımından eklendi.
6. Işık mikroskobunda 10 X objektifte sayım yapıldı.
7. Mavi boyayı almamış olan hücreler canlı, almış olanlar ise ölü olarak değerlendirildi.
8. Canlı hücre sayısı = 1 büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x 10⁴ formülü ile belirlendi.

3.3. Transfeksiyon Yöntemi Optimizasyonu:

Optimum transfeksiyon koşullarının belirlenebilmesi için lüsiferaz takılı plazmid ve Lusiferaz test sistemi kullanılarak denemeler yapılmıştır.

96 kuyulu hücre kültürü plaklarının her kuyusuna 10000' er adet Kelly ve HeLa hücresi ekilip lüsiferaz plasmidi farklı transfeksiyon ajanları kullanılarak transfekte edilmiştir.

Fugene ve Lipofektamin ajanları ile transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması:

Transfeksiyon işleminden bir gün önce 96 kuyulu hücre kültürü plaklarına kuyu başına onar bin hücre düşecek şekilde HeLa ve Kelly hücreleri ekildi. Bir sonraki gün aşağıda hesaplamaları verildiği gibi transfeksiyonlar yapıldı.

Lipofektamin ile transfeksiyon:

Gereçler:

- Invitrogene - Lipofectamine transfeksiyon sistemi
- Promega One Glo Lusiferase Assay (Cat No: E 610)
- Lüsiferaz takılı plazmid
- Serumsuz besi ortamı
- 96 kuyulu hücre kültürü plakları
- %15 FBS oranında FBS (fetal bovine serum) içeren besi ortamı

Yöntem:

- Transfeksiyondan bir saat önce kuyulardaki ortamlar çekildi ve 100' er µl yeni ortam eklendi.
- Bir tüpe 200 µl serumsuz ortam eklendi, içerisine 500 ng lüsiferaz takılı plazmid ve 1 µl "plus reagent" eklendi.
- 5 dak oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2,5 µl lipofektamin LTX eklendi.
- 30 dak. Oda sıcaklığında bekletildi.
- Her kuyuya 20 şer µl eklendi.
- 24 saat CO₂' li inkübatörde inkübe edildi.
- Sonraki gün ortamları yenilendi.
- 24 ve 48 saat sonra lüsiferaz aktiviteleri lüminometrik olarak, Promega'nın One Glo lüsiferaz test sistemi kullanılarak ölçüldü.

Fugene ile Transfeksiyon:

Gereçler:

- Roche - Fugene HD transfeksiyon ajanı
- Promega One Glo Lusiferase Assay (Cat No: E 610)
- Lüsiferaz takılı plasmid
- Serumsuz besi ortamı
- 96 kuyulu hücre kültürü plakları
- %15 FBS oranında FBS (fetal bovine serum) içeren besi ortamı

Yöntem:

- Transfeksiyondan bir saat önce kuyulardaki ortamlar çekildi ve 90' ar µl yeni ortam eklendi.
- Bir tüpe 485 µl serumsuz besi ortamı ve 15 µl fugene eklendi. 5 dak. Oda sıcaklığında bekletildi.
- 5 µg lüsiferaz geni takılı plasmid eklendi.
- 20 dak. Oda sıcaklığında bekletildi.
- 96 kuyulu plak gözlerine 10 ar µl eklendi.
- 24 saat CO₂ li inkübatörde inkübe edildi.
- Sonraki gün ortamları yenilendi.
- 24 ve 48 saat sonra lüsiferaz aktiviteleri lüminometrik olarak, Promega nın One Glo (Cat No: E 610) lüsiferaz test sistemi kullanılarak ölçüldü.

Optimum transfeksiyon koşullarının belirlenebilmesi için lüsiferaz takılı plasmid ve Lusiferaz test sistemi kullanılarak denemeler yapılmıştır.

Fugene ve CaCl₂ ile transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması:

Dört adet 96 kuyulu hücre kültürü plağına kuyu başına 10 ar bin adet düşecek şekilde Kelly hücresi ekildi. İki adet 96 gözlü plaklardaki, ikişer kuyuya pH 7.10, ikişer kuyuya pH 7.17, İkişer kuyuya pH 7.21 lik 2X HBSS solüsyonları kullanılarak ve ikişer kuyuya da fugene kullanılarak transfeksiyon yapıldı.

CaCl₂ ile Transfeksiyon:

Gereçler:

- pH: 7.10 2X HBSS solüsyonu
- pH: 7.17 2X HBSS solüsyonu

- pH: 7.21 2X HBSS solüsyonu
- 0.5 M CaCl₂
- Promega One Glo Lüsiferase Assay (Cat No: E 610)
- Lüsiferaz takılı plasmid
- Steril distile su

Yöntem:

- İki adet 96 gözlü plaklardaki, ikişer kuyuya pH 7.10, İkişer kuyuya pH 7.17, İkişer kuyuya pH 7.21 lik 2X HBSS solüsyonları kullanılarak transfeksiyon aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.
- Kuyulardaki ortam çekilip 80 er µl yeni ortam eklendi.
- Karışım 1 aşağıdaki miktarlardaki bileşenler ile hazırlandı.

DNA	1 µg (yaklaşık 0,5 µl)
0,5 M CaCl ₂	500 µL
H ₂ O	499 µL karıştır. 5 dak beklet.

- Transfeksiyon karışımı 1 aşağıdaki miktarlardaki bileşenler ile hazırlandı:

250 µl 2X HBSS (pH : 7,10) + Karışım I

- Transfeksiyon karışımı 2 aşağıdaki miktarlardaki bileşenler ile hazırlandı:

250 µl 2X HBSS (pH : 7,17) + Karışım I

- Transfeksiyon karışımı 3 aşağıdaki miktarlardaki bileşenler ile hazırlandı:

250 µl 2X HBSS (pH : 7,21) + Karışım I

- Karışımlar 30 dak. oda sıcaklığında bekletildi. Kuyulara 20 şer µl eklendi.

Fugene' in farklı konsantrasyonları ile transfeksiyon denemesi:

Dört adet 96 kuyulu hücre kültürü plağına kuyu başına 10 ar bin adet düşecek şekilde Kelly hücresi ekildi. 100 µl transfeksiyon karışımı başına 3, 5, 7 ve 8 er µl fugene eklenecek şekilde dört farklı transfeksiyon karışımı hazırlandı. Kuyu başına 10 ar µl eklendi. 24 saat sonra ortamları değiştirildi. 24 ve 48 saat sonra lüsiferaz aktiviteleri ölçüldü.

3.4. Lüsiferaz Takılı Plasmid Kullanılarak Transfeksiyonda Kullanılabilecek Optimum Plasmid Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Deneylerimizde kullanılabileceğimiz optimum plasmid konsantrasyonunu belirlemek için bu çalışma yapılmıştır.

Gereçler:

Lüsiferaz geni takılı plasmid

“Fugene” transfeksiyon ajanı

Lüsiferaz ölçüm kiti

Yöntem:

Farklı konsantrasyonlarda (1, 2,5, 5, 7,5 ve 10 µg plasmid/100 µl transfeksiyon karışımı konsantrasyonlarında) lüsiferaz takılı plasmidlerle transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra lüsiferaz aktiviteleri ölçülmüştür.

3.5. TREX Sistemine TAF7’nin Klonlanması ve Stabil Transfeksiyon:**Tetrasiklinle Regüle Edilen Ekspresyon Sistemi:**

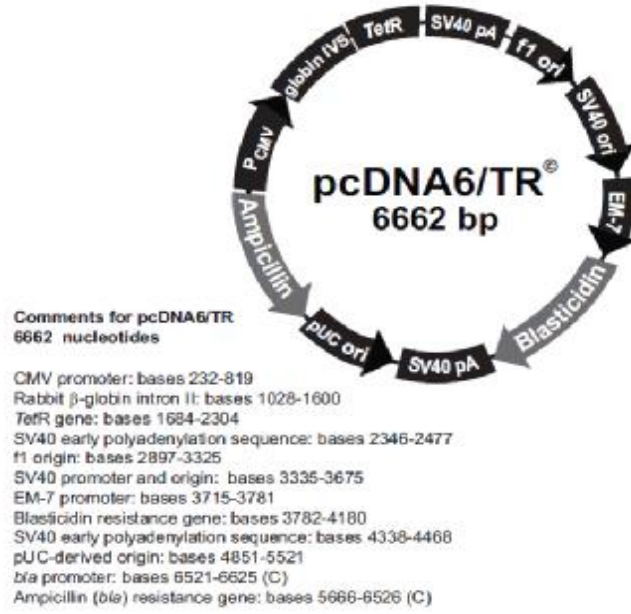
T-REx™ Sistemi tetrasiklinle regüle edilen memeli bir ekspresyon sistemidir. Düzenleyici elemanlarını E.coli Tn10 da kodlanan tetrasiklin (Tet) rezistant operondan kullanır (Hillen and Berens, 1994; Hillen et al., 1983). T-REx Sistemindeki tetrasiklin regulasyonu tetrasiklinin Tet represörüne bağlanmasına ve ilgili genin ekspresyonunu kontrol eden promotora bağlı olan tet represörünün uzaklaştırılmasına dayanır.

T-REx sisteminin major komponentleri şunlardır:

- İndüklenebilir insan cytomegalovirus immediate-early (CMV) promotorunun ve iki tetrasiklin operatörünün (TetO2) kontrol ettiği ekspresyon plasmidi.
- Tet represörünü kodlayan pcDNA6/TR© bir regülatör plasmid.
- Ekspresyonun indüklenmesi için Tetrasiklin.
- pcDNA6/TR© ile birlikte kotransfekte edildiğinde ve tetrasiklin ile indüklendiğinde beta galaktozidoz ekprese eden Lac Z geninin içeren kontrol ekspresyon plasmidi.

pcDNA 6 / TR:

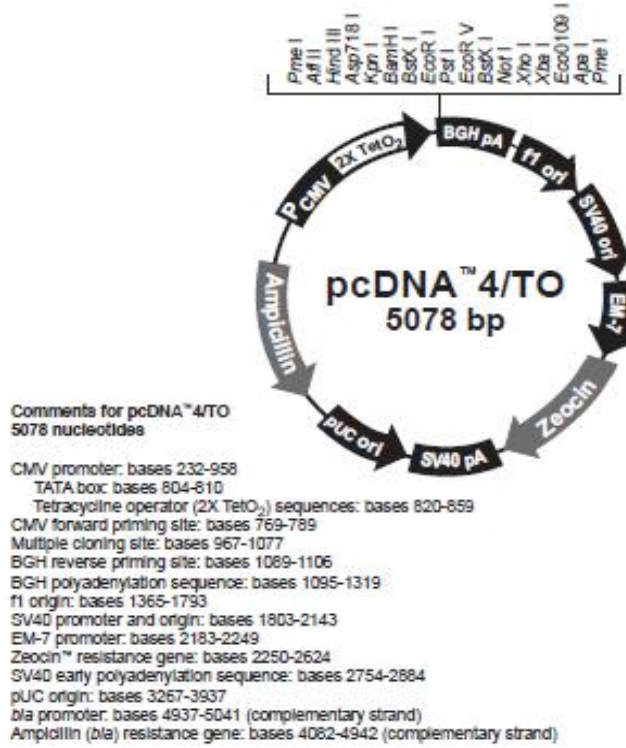
TetR kodlayan sekans takılı olan plasmididir. Normal bir hücre hattında tetrasiklinli sisteme geçilmeden önce bu plasmid stabil olarak transfekte edilir. Çünkü TetR yokluğunda pcDNA 4 TO ya takılı olan gen sürekli ekprese olacaktır (Şekil 12).



Şekil 12: pcDNA 6 /TR plasmidi

pcDNA 4 TO:

TAF7 geni takılacak olan plasmiddir. Promotor bölgesinde iki adet TetO₂ dizisi mevcuttur. Bu bölgeye normal koşullarda hücre hattında stabil olarak pcDNA 6/TR den eksprese edilen iki adet Tet represör (TetR) homodimeri bağlanarak genin ekspresyonu engellenmektedir. Fakat ortama tetrasiklin (Tet) eklenmesi Tet' in TetR homodimerlerine bağlanıp, onların konformasyonel değişikliğe uğramasına, promotordan ayrılmasına ve böylece ekspresyonun gerçekleşmesine neden olur (Şekil 13).

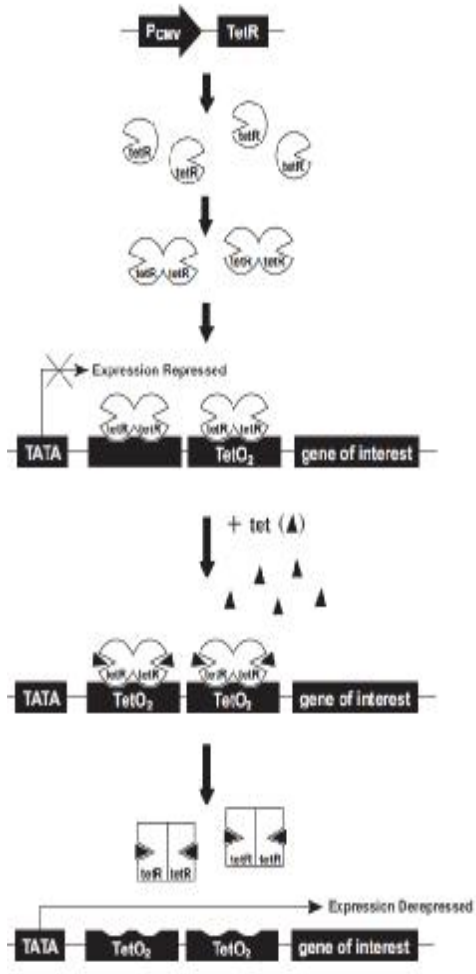


Şekil 13: pcDNA 4 TO plasmidi

pcDNA 4 TO / Lac Z:

Kontrol plasmididir. Tetrasiklin varlığında beta galaktosidoz eksprese eden plasmidir. pcDNA 4 TO/TAF7 Transfeksiyonuna paralel olarak başka bir plakda bu plasmid de transfeke edilmelidir. Tetrasiklin eklendiği durumda beta galaktosidoz ekspresyonu gerçekleşiyorsa diğer plaklarda de transfeksiyonun da gerçekleştiği düşünülecektir.

Tetrasiklin yokluğunda Tet represöü bir heterodimer (4 moleküllü, iki homodimer) oluşturarak indüklenabilir ekspresyon vektörünün promotorundaki 2 TetO₂ sekansına yüksek afinite ile bağlanır. Tet opertörü için Tet represör afinitesi $KB = 2 \times 10^{11} M^{-1}$ dir. Tet represörü homodimerlerinin TetO₂ sekansına bağlanması ilgili genin ekspresyonunu baskılar. Tetrasiklin eklenmesi ile tet represörü konformasyonel değişikliğe uğrar ve Tet operatörüne bağlanamaz hale gelir. Tetrasiklinin tet represör ile birleşme sabiti, $KA, 3 \times 10^9 M^{-1}$ dir. Tet repressör tetrasiklin kompleksi Tet operatöründen ayrılır ve ilgili genin transkripsiyonunun başlamasına izin verir (şekil 14) (63).



1. pcDNA6/TR'den Tet represörü (tetR) eksprese edilir.
2. TetR homodimerleri TetO2'ye bağlanır ve gen ekspresyonunu baskılar.
3. Tetrasiklin ekleyince TetR bağlanıp, konformasyonel değişikliğe uğramasına neden olur.
4. TetR promotordan ayrılır ve genin ekspresyonuna izin verir.

Geçici transfeksiyon yönteminde deneyler arasındaki transfeksiyon etkinliği problemini minimuma indirmek için tetrasiklin ile regüle edilen ekspresyon sisteminin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla sistemin plasmidi olan pcDNA 4 TO ya TAF7 klonlandı ve stabil olarak T-REX HeLa hücre hattına transfekte edildi.

Şekil 14: Tetrasiklinle Regüle Edilen Ekspresyon Sistemi

3.5.1. Plasmidlerin Maxi Prep ile Çoğaltılması

TREX (Tetrasiklin ile Regüle Edilen Ekspresyon sistemi) plasmidleri olan pcDNA 4 TO, pcDNA 6 TR ve pcDNA 4 TO LACZ plasmidleri maxi prep ile çoğaltıldı.

Gereçler:

- Kompetan bakteri
- Qiagen Endo Free Plasmid Maxi Purification Kit (Kat. No: 12362)
- 50 ml.lik Falcon tüpler
- 1.5 ml.lik eppendorf tüpler.
- Soğutmalı santrifüj
- 10 ml.lik pipetler

Yöntem:

Transformasyon:

- -20 °C’de saklanmakta olan pFLAG CIITA, pFLAG TAF7 ve peGFPC3 boş plasmidlerden 1 er µl alınıp 100 µl kompetan hücre içeren ependorflara aktarıldı.
- Buz üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- 42 °C’ lik su banyosunda 45 saniye ısı şoka maruz bırakıldı.
- 500’er µl SOB ortamı eklendi.
- 1 saat 37 °C’de 150 rpm hızla çevrilerek inkübe edildi.
- pFLAG lar, 100 µg/µl ampicilin ve pEGFP C3, 30 µg/µl kanamisin içeren LB agar ortamlarına ekildi.
 - o 200, 100, 50, 10 ve 5’ er µl plate’ lere ekim yapıldı.
- Bir gece 37 °C’de inkübe edildi.
- Klonilerden 5’er adet seçilip 5’er ml seçici antibiyotik içeren LB ortamlara ekildi.
- Ertesi gün her koloniden 1’er adet gliserol stoğu hazırlanıp - 80°C’ ye kaldırıldı.

Maxi Prep:

- 200’er ml seçici antibiyotik içeren LB’ lere 3’er ml ekildi.
- Bir gece 37 °C’ de 100 rpm hızla çevrilerek inkübe edildi.
- Ertesi gün “Qiagen - Endo Free Plasmid Maxi Purification Kit” ile maxi prep yapıldı.
- DNA konsantrasyonu ölçüldü.

Spektrofotometrik DNA konsantrasyonu ölçüm yöntemi:

- TE içerisinde plasmid örnekleri 1/10 oranında seyreltildi.
- Spektrofotometrede TE ile cihaz sıfırlandı.
- OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ değerleri ölçüldü.
- **Konsantrasyon:** 50 µg/ml x OD₂₆₀ x Dilüsyon faktörü formülü ile plasmid konsantrasyonları hesaplandı.

NOT: OD₂₆₀ / OD₂₈₀ oranları hesaplandı. OD₂₆₀ / OD₂₈₀ oranının 1,8 – 2,0 arasında olması beklenir. Oran 1,8 den düşükse protein kontaminasyonu, 2,0’dan büyükse RNA kontaminasyonu vardır.

3.5.2. pcDNA 4 TO’ ya TAF7 Klonlanması:

pcDNA 4 TO’ ya TAF7 klonlanması için Pst I ve XbaI restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren ileri (5’)ve geri (3’) yönlü PCR primerleri dizayn edilmiştir. Dizayn edilen

primerler ve gen üzerindeki konumları aşağıda verilmiştir.

5' Primer :

5'CTATCTGCAGTAGCTGGAAC TTTT TAG3'

Baz sayısı: 27 Tm: 58,2

Hedef Bölge:

5' CTATcTGCAGTAGCTGGAAC TTTT TAG 3'

Pst I

3' Primer: 5' CCAGTCTAGAAGACTGAAATTAAATATC 3'

Hedef Bölge:

5' GATATTTAATTT CAGTCTTcT AGACTGG 3'

XbaI

Baz sayısı: 28 Tm: 55,6

ANTISENSE:

3' ATAAATTAAAGTCAGAAGATCTGACC 5'

ANTISENSE REVERSE:

5' CCAGTCTAGAAGACTGAAATTAAATATC 3'

ACTTCCGTTTTTGTCTGGGTAGGCGACCCGGACGGAGGGCCGGCGAGGTGCGGGTCTGGTGATGCGAGCT
GCGCCTCTCGGCAAGATTTTCGCGTGCCCATCCCGGGCCCTTTCATCAGTAATCGGTAGTGATCACTCT
GCCAAGCGGCAGGAAGAATTAAGGAAACGACAAGGAGACGCTCGGCTCTCTCCCGCTTGGCTCCTTGCGG
CCTCCTCTTCCCTTCGCTCCGGCCCGGTGAACTGAACTTATAATCGTCACTGGATTGTAAGTACCCGAG
GCGAAGAGAGCTCGCTGAGCCCTGATTTTTTGTAGTGTCTTTGTTCCGGGAGAGTTTGTGAGTTGAAAGTA
TCTCTGCTGGGCTTTCTGGGCCGAAAACCGTTCCGGGGGAGCCGCCATTTGCTTTCCTGTTCCCTAGCTA
GCTAGCTAGCTCTCTCCGCGTTGTCCGGCAGCGGCACCTAGAGTTGGGACTTGGCATTGCATCTGATTT
AATGAACTTAAGTCTGTGAATAAGCCTTTGTGTTAACGACTGGTATTCGGTCACAGCATATTTAGAGAAA
AGACTTGAGCTTAAATAAAAACTAAGGCAAAATAGACGCTTAGCTGCTGATCTACAGAGAACTTCTTGT
AATTAAGATTTCAATTCATAGCAAAC TGGTGT TTTAAAC TATcTGCAGTAGCTGGAAC TTTT TAGTGTA

Pst I

ACCAGCATTTATTGGAGAAGTGAATCACAAGGAAATAAAGATGAGTAAAAGCAAAGATGATGCTCCTCAC
GAACTGGAGAGCCAGTTTATCTTACGTCTGCCTCCAGAATATGCCTCTACTGTGAGAAGGGCAGTACAGT
CTGGTCATGTCAACCTCAAGGACAGACTGACAATTGAGTTACATCCTGATGGGCGTCATGGAATCGTCAG
AGTGGACCGTGTTCCATTGGCCTCAAAATTAGTAGACCTGCCCTGTGTTATGGAAAGCTTGAAAACCAT

GATAAAAAAAGCTTTTACAAGACAGCTGATATCTGTCAGATGCTTGTATCCACAGTTGATGGTGATCTCT
ATCCTCCTGTGGAGGAGCCAGTTGCTAGCACTGATCCTAAAGCAAGCAAGAAAAAGGATAAGGACAAAGA
GAAAAAGTTTATCTGGAACACGGAATTACTCTGCCTCTAAAGAATGTCAGGAAGAGAAGGTTCCGGAAG
ACAGCAAAGAAGAAATATATTGAATCTCCAGATGTTGAAAAAGAAGTGAAACGATTGCTGAGTACAGATG
CTGAAGCTGTTAGTACTCGGTGGGAAATAATTGCCGAAGATGAAACAAAGGAGGCAGAAAAATCAAGGCCT
GGATATCTCTTCTCCAGGAATGTCTGGTCACAGGCAGGGCCATGACTCATTAGAACATGATGAGCTTCGG
GAGATATTCAATGACCTCAGCAGCAGCAGTGAGGATGAAGATGAGACCCAGCATCAAGATGAAGAAGATA
TAAACATCATTGACACGGAGGAAGATCTGGAGAGACAGCTACAGGACAAGCTAAATGAATCAGATGAACA
GCACCAGGAAAAATGAAGGAACCAATCAGCTGGTTATGGGAATTCAGAAGCAGATTGACAACATGAAAGGC
AAGCTCCAAGAGACCCAGGACAGGGCAAAACGACAAGAGGATCTCATCATGAAAGTGAAAAATCTGGCTC
TCAAGAACAGATTTTCAGGCTGTACTGGATGAGCTCAAACAAAAGGAAGACCGAGAAAAGGAGCAACTCAG
CTCTTTGCAAGAGGAGCTAGAATCACTCCTAGAGAAGTAA

XbaI

ACTGGTCAGCATTAGAAAATTCTTGGCTTTATTGTACTGGGTATTAAGACCTTGCTCTTCCTAGTCCTTT
TAATGCTGTGTGTTCTGTTAAGTTCTTTTCAATTTGTTTGTAAATTTTGTTCAGCAAATTTATATTGTTT
TGCTAGGTGTTTCATCCTATAAGAAGCAGGATTGTATAGGCAGAAAAATGATTGTAGGAAAGTTGCAGGAT
TAGCGGAATGTATGGTTCAACCTTAATTATAGCTTCATTGCAGGACTTTACTGTTTCTCCATTTTCTAGA
AGCTGCTGTTGCTGCTTTGTGATGACGTGAGATCAATAAGAAGAACCTAGTCTAGAGACAATGATGCTAG
TTTGCATATGTTTTCTATGCAATAATTGTTTTCCAGTTATTCAAAGCAGCTTTCTATATGTAGAGATG
CAAATTATTAAGTTGTTTCCAATACAATAAATAAAGCATCTGTTTTTCACTTTA

ÜRÜN: 1157 BP

Plasmide Takılacak TAF7 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonu:

Gereçler:

- Thermal cycler cihazı
- 200 µl lik PCR tüpleri
- Enjeksiyonluk su
- Fermentas 10 mM DNTP
- Fermentas High Fidelity Taq DNA polimeraz
- Fermentas 10 X High Fidelity Buffer
- Fermentas 25 mM MgCl₂
- 10 pmol/µl TREX TAF7 primerleri

Yöntem:

Tablo 2'deki koşullarda PCR reaksiyonları kurulmuştur:

Tablo 2:TAF7 Klonlama PCR reaksiyonu optimizasyonunda denenen koşullar

	1	2	3	4
Su	18,75	17,75	16,75	15,75
10 X Buffer	2,5	2,5	2,5	2,5
25 mM MgCl₂	1	2	3	4
10 mM DNTP	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer F	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer R	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA	1	1	1	1
Taq	0,25	0,25	0,25	0,25
Toplam Hacim	25	25	25	25

Termal profil:

94 °C 3 dak
95 °C 40 s. }
60 °C 40 s. } 35
72 °C 1 dak. 15 s.
72 °C 10 dak.
4 °C Hold

Plasmide Takılacak TAF7 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Gereçler:

- Thermal cycler cihazı
- 200 µl' lik PCR tüpleri
- Enjeksiyonluk su
- Fermentas 10 mM DNTP
- Fermentas High Fidelity Taq DNA polimeraz
- Fermentas 10 X High Fidelity Buffer
- Fermentas 25 mM MgCl₂
- 10 pmol/µl TREX TAF7 primerleri

Yöntem:

Tablo 3'deki koşullarda 200 µl PCR reaksiyonu 50 şer µl lik hacimlerde kurulmuştur:

Tablo 3:Klonlama TAF7 PCR Reaksiyonu Koşulları

	μl	μl
Su	31,5 X 4	126
10 X Buffer	5 X 4	20
25 mM MgCl₂	8 X 4	32
10 mM DNTP	1 X 4	4
Primer F	1 X 4	4
Primer R	1 X 4	4
DNA	2 X 4	8
Taq	0,5 X 4	2
Toplam Hacim	50 X 4	200

pcDNA 4 TO plasmidine TAF7 klonlandı. Klonlamanın kontrol edilmesi için klonlardan restriksiyon enzim kesim reaksiyonları ve PCR kurulup agaroz jelde yürütüldü ve insert almış olan koloniler tespit edildi.

Sonuç olarak 5 ve 6 numaralı kolonilerde klonlamanın başarılı olduğu görüldü. 5 Numaralı koloni 400 ml LB (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampisilin içeren) ortamında bir gece çoğaltıldı. “QIAGEN Endo Fee Plasmid Purification Maxi Kit (Cat. No: 12362)” ile maxiprep plasmid izolasyonu yapıldı.

pcDNA 4 TO Plasmidi ve TREX TAF7 PCR Ürününün Enzim Kesimi:

Gereçler:

- Thermal cyclers cihazı
- 200 μl ' lik PCR tüpleri
- Enjeksiyonluk su
- Fermentas Xba I ve Pst I restriksiyon enzimleri
- Fermentas 10 X Tango Buffer
- PcDNA 4 TO
- TAF7 PCR ürünü

Yöntem:

Tablo 4'deki koşullarda enzim kesim reaksiyonu kuruldu.

Tablo 4: Enzim kesim reaksiyonu koşulları

	PLASMİD (µl)	PCR ÜRÜNÜ KESİMİ (µl)		
Su	41	-	-	-
10 X Tango Buffer	5	5	5	5
Xba 1	1	1	1	1
Pst 1	2	2	2	2
TAF7 PCR ürünü	-	42	42	42
PcDNA 4 TO	1	-	-	-
Toplam Hacim	50	50	50	50

Termal Profil:

37 °C 10 saat

80 °C 20 dak

4 °C Hold

- Plasmid enzim kesim ürünleri %1 lik agaroz jel DNA elektroforezinde yürütüldü.
- Roche jelden DNA ekstraksiyon kiti ile saflaştırıldı.
- PCR ürünü de elutip ile saflaştırıldı.
- Saflaştırılan ürünler agaroz jelde yürütüldü.

Ligasyon:

Gereçler:

- Thermal cycler cihazı
- 200 µl lik PCR tüpleri
- Enjeksiyonluk su
- Fermentas fast ligaz
- Fermentas 5X ligasyon buffer
- PcDNA 4 TO (jelden saflaştırılmış)
- TAF7 PCR ürünü (elutip ile saflaştırılmış)

Yöntem:

Tablo 5'deki koşullarda ligasyon reaksiyonu kuruldu:

Tablo 5: Ligasyon reaksiyonu koşulları

	1:1	1:2	1:3
Su	17	17	17
5 X Buffer	5	5	5
Ligaz	1	1	1
PcDNA 4 TO	1	2	3
TAF7	1	1	1
Toplam hacim	25	25	25

Termal Profil

22 °C 5 dak., 4 °C Hold

- Ligasyon ürününden 5 µl alınıp, kompedan bakterilere transformasyonda kullanıldı
- 2 gün 37 °C de inkübe edildi.
- 25 Ug / ml konsantrasyonunda zeosin içeren 3 adet 5 ml lik “low salt” LB ortamına birer adet koloni alınıp ekildi.
- 2 gün 37 °C de inkübe edildi.
- Fakat LB çok bulanıklaşmadı.
- Fermentas miniprep kiti ile miniprep yapıldı.
- Pst 1 ve Xba1 ile enzim kesimi yapıldı.
- Kesilmiş ve kesilmemiş ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

3.5.3 pcDNA 4 TO LACZ Transfeksiyonu Sonrası Beta Gal Assay İle Doksisisiklin Doz Ve İnkübasyon Süresi Optimizasyonu:

Daha önceki çalışmalarımızda İnvitrogen’in V1020-20 katalog numaralı T-REX sistemine TAF7 genini klonladık. Bu sistem tetrasiklin yokluğunda stabil transfeksiyonu yapılmış olan plazmitten ekspresyonun gerçekleşmesine izin vermeyen, ancak tetrasiklin varlığında ekspresyon gerçekleşmesine izin veren bir sistemdir. Sistemde üç farklı plazmid bulunmaktadır. Bunlar:

pcDNA 4 TO

pcDNA 4 TO / Lac Z

pcDNA 6 / TR dir.

pcDNA4TO plasmidine TAF7 genini proje öncesinde klonladık ancak çalışmalarımızda kullanılacak doksiasiklin dozunun tekrar optimize edilmesi gerektiğinden pcDNA4TO/LacZ kontrol plazmitidini kullandığımız deneyleri gerçekleştirdik. Bu plazmid tetrasiklin varlığında beta galaktosidoz eksprese eder. pcDNA4TO/TAF7 transfeksiyonuna paralel olarak başka bir plakda bu plazmit de transfekte edilmelidir. Tetrasiklin eklendiği durumda beta galaktosidoz ekspresyonu gerçekleşiyorsa diğer plaklarda da transfeksiyonun da gerçekleştiği düşünülür. PCDNA 4TO TAF7 Plasmidi ile yapılacak deneylerimizde kullanacağımız doksiasiklin dozunu belirlemek için bu deney yapılmıştır.

Gereçler:

TREX HeLa Hücre hattı

pcDNA 4 TO LACZ plasmidi

Fugene transfeksiyon ajanı

Beta Gal Assay (invitrogen)

Doksiasiklin

Yöntem:

6 well ve 96 plate in gözlerine ekilmiş olan (250 bin hücre /well) TREX HeLa hücre hattına fugene transfeksiyon ajanı ile pcDNA 4 TO LACZ plasmidi transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra ortamları değiştirilmiş ve farklı konsantrasyonlarda doksiasiklin eklendi. 24 saat sonra da Beta Gal assay ile Beta Gal aktiviteleri ölçüldü.

3.5.4. pcDNA 4TO TAF7 Plasmidinin TREX HeLa Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu:

TAF7 takılmış olan pcDNA 4 TO plasmidi T-REX HeLa hücre hattına transfekte edildi. Transfeksiyondan bir gün sonra ortamı değiştirilip, daha önceden optimum konsantrasyonu belirlenmiş olan zeosinli ortamda idame ettirildi. Böylece plasmidi almamış olan hücrelerin elimine olması ve plasmid, genomuna katılmış olan hücrelerin seçilmesi sağlanmıştır.

Gereçler:

Fugene transfeksiyon ajanı

pcDNA 4TO TAF7 plasmidi

Zeosin

Doksiasiklin (tetrasiklin analogu)

Yöntem:

pcDNA 4 TO TAF7 plasmidi T-REx HeLa hücre hattına Fugene transfeksiyon ajanı ile transfekte edildi. Transfeksiyondan bir gün sonra ortamı değiştirilip, daha önceden optimum konsantrasyonu belirlenmiş olan (750 µg/ml) zeosinli ortamda idame ettirilmiştir. Böylece plasmidi almamış olan hücrelerin elimine olması ve plasmid genomuna katılmış olan hücrelerin seçilmesi sağlandı. Zeosine dirençli (plasmidin genomuna katılmış olduğu düşünülen) hücreler gözle görülür koloniler oluşturduktan sonra, 50 tanesi seçilip 24 kuyulu plakların gözlerine ekildi. 24 kuyulu plak gözünde konfluent olduktan sonra her bir göz daha büyük ölçeğe geçirilip donduruldu. Ayrıca ikişer adet 6 kuyulu plak gözüne ekildi. Onlar da konfluent olduktan sonra bir kuyuya 1000 µg/ml doksisisiklin eklenip, diğer kuyuya hiçbir işlem yapılmadı. 24 saat sonra hücre lizatları hazırlanıp, protein konsantrasyonları ölçüldü. Western blotları yapıldı.

3.6. Site Directed Mutagenesis ile pcDNA 4 TO TAF7'nin Serin 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi ve Bu Plasmidin TREX HeLa Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu:

Pim Pijnappel ve ark. tarafından 24.12.10 tarihinde yayınlanan “Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle” başlıklı makalede TAF7 nin G2/M ve G1/S geçişinde ser 159 amino asitinden fosforillendiği bildirilmiştir. Ayrıca bu fosforilasyon bölgesinin TAF7 nin transkripsiyon aktivatörleri ile etkileştiği bölgesinde (TAF1 interacting domain) yer alması nedeniyle TAF7 nin G2/M geçişinde transkripsiyon blokajında görevli olabileceği de öne sürülmüştür.

Biz de bu amino asiti kodlayan kodonu alanine dönüştürerek TAF7 nin fosforillenmemesinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmaya karar verdik. InvitroGene'in “GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System”i kullanılarak pFLAG TAF7 ve pcDNA 4 TO TAF7 plasmidlerindeki TAF7 geninin serin 159 amino asiti (bkz tablo 6.a), alanin amino asitine dönüştürüldü.

“GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System” inin prensibi yöntemdeki akış şemasında gösterilen DNA metilaz ve *McrBC* endonükleaz enzimlerinin özelliklerine dayanır.

3.6.1. Site Directed Mutagenesis ile pcDNA 4 To TAF7 nin Sern 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi:

Gereçler:

- GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogene, Catalog no. 12397-014)
- DH5 α ™-T1^R Kompotent bakteri
- SOC Ortamı

Yöntem:

1. Plasmid DNA, DNA metilaz ile 37°C de 1 saat boyunca metile edildi.
2. İki adet birbiriyle overlap eden primer (bkz Tablo 6.b) (primerlerden biri hedef mutasyonu taşıyır) ile plasmid, mutagenез PCR ı kurularak çoğaltıldı (bkz Şekil 26). PCR profili tablo 7’de verilmiştir. Sonuçta oluşan ürün linear ve çift ipliklidir .
3. Mutagenез reaksiyon ürünü *E. coli.* ye aktarıldı ve konak hücrede sirküler hale geldi. *E coli* deki *McrBC* endonükleazı metile kalıbı degrades ederek sadece metile olmayan mutasyon ürününün kalmasını sağlamaktadır.
4. *E.coli*’ ye transformasyon sonrasında oluşan kolonilerden 4 tanesi seçilerek mini preleri yapıldı (Bknz Şekil 27).
5. Elde edilen mutasyonlu plasmidin maxi prebi yapıldı.

Tablo 6.a: TAF7 Sekansı Üzerinde Mutagenез Bölgesi

1 ATG.AGT.AAA.AGC.AAA.GAT.GAT.GCT.CCT.CAC.GAA.CTG.GAG.AGC.CAG.TTT.AT 50

51 C.TTA.CGT.CTG.CCT.CCA.GAA.TAT.GCC.TCT.ACT.GTG.AGA.AGG.GCA.GTA.CAG.T 100

101 CT.GGT.CAT.GTC.AAC.CTC.AAG.GAC.AGA.CTG.ACA.ATT.GAG.TTA.CAT.CCT.GAT. 150

151 GGG.CGT.CAT.GGA.ATC.GTC.AGA.GTG.GAC.CGT.GTT.CCA.TTG.GCC.TCA.AAA.TT 200

201 A.GTA.GAC.CTG.CCC.TGT.GTT.ATG.GAA.AGC.TTG.AAA.ACC.ATT.GAT.AAA.AAA.A 250

251 CT.TTT.TAC.AAG.ACA.GCT.GAT.ATC.TGT.CAG.ATG.CTT.GTA.TCC.ACA.GTT.GAT. 300

301 GGT.GAT.CTC.TAT.CCT.CCT.GTG.GAG.GAG.CCA.GTT.GCT.AGC.ACT.GAT.CCT.AA 350

351 A.GCA.AGC.AAG.AAA.AAG.GAT.AAG.GAC.AAA.GAG.AAA.AAG.TTT.ATC.TGG.AAC.C 400

401 AC.GGA.ATT.ACT.CTG.CCT.CTA.AAG.AAT.GTC.AGG.AAG.AGA.AGG.TTC.CGG.AAG. 450

451 ACA.GCA.AAG.AAG.AAA.TAT.ATT.GAA.TCT.CCA.GAT.GTT.GAA.AAA.GAA.GTG.AA 500

(Hedef serin aminoasiti)

501 ACGATTGCTGAGTACAGATGCTGAAGCTGTTAGTACTCGGTGGGAAATAA 550
551 TTGCCGAAGATGAAACAAAGGAGGCAGAAAATCAAGGCCTGGATATCTCT 600
601 TCTCCAGGAATGTCTGGTCACAGGCAGGGCCATGACTCATTAGAACATGA 650
651 TGAGCTTCGGGAGATATTCAATGACCTCAGCAGCAGCAGTGAGGATGAAG 700
701 ATGAGACCCAGCATCAAGATGAAGAAGATATAAACATCATTGACACGGAG 750
751 GAAGATCTGGAGAGACAGCTACAGGACAAGCTAAATGAATCAGATGAACA 800
801 GCACCAGGAAAATGAAGGAACCAATCAGCTGGTTATGGGAATTCAGAAGC 850
851 AGATTGACAACATGAAAGGCAAGCTCCAAGAGACCCAGGACAGGGCAAAA 900
901 CGACAAGAGGATCTCATCATGAAAGTGGAAAATCTGGCTCTCAAGAACAG 950
951 ATTTCAAGGCTGTACTGGATGAGCTCAAACAAAAGGAAGACCGAGAAAAGG 1000
1001 AGCAACTCAGCTCTTTGCAAGAGGAGCTAGAATCACTCCTAGAGAAGTAA 1050

Tablo 6.b : Mutagenez PCR primer sekansları

S1) Forward: 5'CAAAGAAGAAATATATTGAAGCTCCAGATGTTG 3' (ala substitution)
S2) Reverse: 5' TTCAATATATTTCTTCTTTGCTGTCTTCCG 3'

Tablo 7: Mutagenez PCR profili

	1	2	3	4
Su	18,25	17,75	18,25	17,75
10 X Buffer	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂	0,5	1	0,5	1
F. primer	1	1	1	1
R. primer	1	1	1	1
DNTP	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA	1	1	2	2
Taq (High Fidelity)	0,25	0,25	0,25	0,25

Termal Profil:

94 °C 3 dak

94 °C 30 s.

60 °C 30 s.

68 °C 10 dak + 0,1 °C/döngü } 30 döngü

68 °C 10 dak.

Hold 4 °C

3.6.2 pcDNA 4TO TAF7 Mutant (Ala Substitution) Plasmidinin TREX Hela Hücrelerine Stabil Olarak Transfekte Edilmesi:**Gereçler:**

Fugene transfeksiyon ajanı

PcDNA 4TO TAF7 plasmidi

Zeocine

Doksisiklin (tetrasiklin analogu)

Yöntem:

PCDNA 4TO TAF7 mutant plasmidi TREX HeLa hücre hattına “Fugene transfeksiyon ajanı” kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan bir gün sonra ortamı değiştirilip, daha önceden optimum konsantrasyonu belirlenmiş olan (750 µg/ml) zeosinli ortamda idame ettirilmiştir. Böylece plasmidi almamış olan hücrelerin elimine olması ve plasmid genomuna katılmış olan hücrelerin seçilmesi sağlanmıştır. İkişer adet 6 kuyulu plak gözüne ekilmiştir. Onlar da konfluent olduktan sonra birer welle 1000 µg/ml doksisiklin eklenip, diğer welle hiçbir işlem yapılmamıştır. 24 saat sonra Zeosine dirençli (plasmidin genomuna katılmış olduğu düşünülen) hücreler gözle görülür koloniler oluşturduktan sonra, 30 tanesi seçilip 24 kuyulu plaklerin gözlerine ekilmiştir. 24 kuyulu plak gözünde konfluent olan koloniler daha büyük ölçeğe geçirilip dondurulmuştur. Ayrıca hücre lizatları hazırlanıp, protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Western blotları yapılmıştır.

3.7. pcDNA 4TO TAF7 TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması ile TAF7 Ekspresyon Düzeyi Değişikliğinin Western Blot Yöntemi İle Araştırılması**Gereçler:**

pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa Hücre Hattı

pcDNA 4 TO TAF7 (Mutant) stabil transfekte TREX HeLa Hücre Hattı

Doksisiklin

DMEM

Tetrasiklin azaltılmış FBS

Lizis Tamponu

SDS page jeli

Yürütme tamponu

Transfer tamponu

TAF7 (rabbit) primer antikoru

Anti rabbit sekonder antikoru (Santa Cruze)

Yöntem:

pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa Hücrelerinden ve pcDNA 4 TO boş stabil transfekte TREX HeLa Hücrelerinden ikişer adet petri kabına ekim yapıldı.

Sırasıyla birer tanesine 500 µg/ml doksisiklin eklendi.

24 saat sonra hücre lizatları hazırlandı.

SDS page jeline yüklenip yürütüldü.

Yarı kuru yöntem ile PVDF membrana transfer edildi.

TAF7 (rabbit) primer antikoru ve anti rabbit sekonder antikoru (Santa Cruze) ile blotlandı.

Yükleme kontrolü yapılması için TBP antikoru ile blotlandı.

3.8. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem ile TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

Gereçler:

pcDNA 4 TO TAF7 ve mutant TAF7 stabil transfekte TREX HeLa hücre hattı

DMEM + %10 FBS besi ortamı

Caspase Assay (Sigma)

Yöntem:

96 well plate in gözlerine pcDNA 4 TO boş, pcDNA 4 TO TAF7 ve mutant TAF7 stabil transfekte TREX HeLa hücrelerinden 5000'er adet ekildi. 500 µg/ml doksisiklin eklendi. Bir gece (18 saat) inkübe edilip kaspaz aktivasyonları ölçüldü.

3.9. CIITA'in TAF7'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması:

CIITA in HIV TAT geninin apoptotik etkisi üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu bilinmektedir. TAF7, HIV TAT' ın ökaryotik fonksiyonel analogu olduğu hipotezinden yola çıkılarak TAF7 nin apoptotik etkisi üzerinde baskılayıcı etkisi olup olmadığının araştırılması için geçici ve stabil transfekte, TAF7 yi yüksek miktarda eksprese eden hücrelere CIITA transfeksiyonunu yapıldı. Sonrasında kaspaz aktivasyonları ölçüldü.

3.9.1 CIITA'in TAF7'nin Geçici Transfeksiyonu ile Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması:

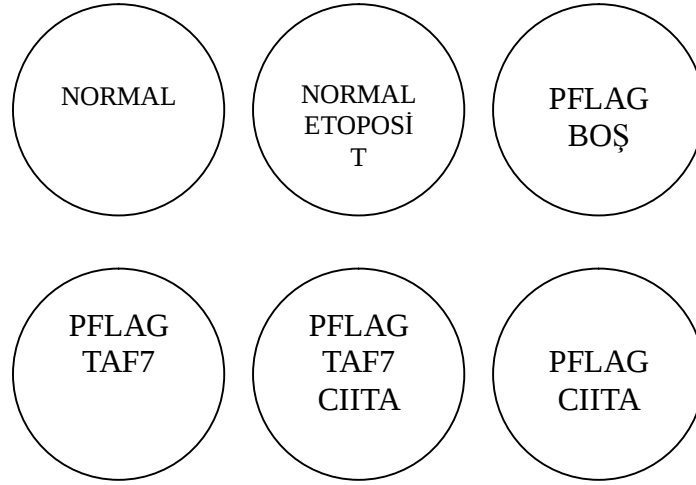
TAF7' nin apoptotik etkisi üzerinde CIITA in etkisinin araştırılması için pFLAG TAF7 ve pFLAG CIITA plasmidleri HeLa ve Kelly hücrelerine birlikte transfekte edildi. Kontrol amacıyla da pFLAG TAF7, PFLAG CIITA ve boş pFLAG plasmidi transfekte edilmiş, hiç transfeksiyon yapılmamış hücre hatları ve etopositol ile apoptoz indüklenmiş hücre hatları kullanıldı. Floresan temelli Sigma Caspase 3 Assay kit ile kaspaz 3 aktivasyonları ölçüldü.

Gereçler:

- pFLAG Boş, pFLAG TAF7 ve pFLAG CIITA plasmidleri
- HeLa ve Kelly hücre kültürleri
- RPMI + %15 FBS ve DMEM + %15 FBS besi ortamları
- 5 – 10 ml. lik pipetler
- Pipetör
- 14 cm²' lik hücre kültürü petrileri
- Lipit temelli transfeksiyon kiti (Roche – Eugene)
- Flüoresan temelli Sigma Caspase 3 Assay Kit
- 96 kuyulu hücre kültürü plağı
- Mikro santrifüj tüpleri
- Soğutmalı santrifüj

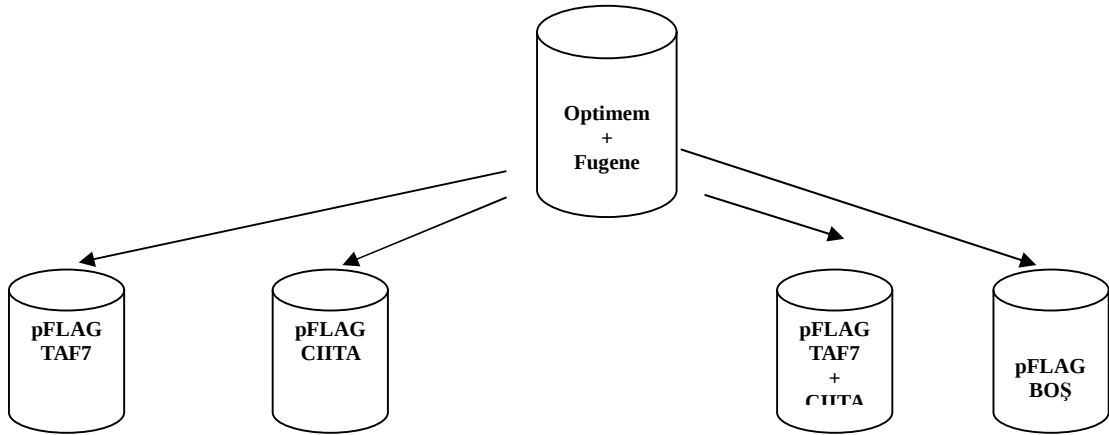
Yöntem:

- 6' şar adet 14 cm² lik hücre kültürü petri kaplarına birer milyon Kelly ve HeLa hücreleri ekildi (Bknz Şekil 15).



Şekil 15: Hücre ekim planı

- Ertesi günü aşağıda şema ve hesapları verildiği gibi transfeksiyon yapıldı (Bknz Şekil 16).



Şekil 16: Transfeksiyon karışımları hazırlama planı

- Transfeksiyondan 1 saat önce plaklardaki ortamlar çekilip, 9 ar ml ortam eklendi

Transfeksiyon Karışımı Hazırlanması:

Her 100 µl. Transfeksiyon karışımına 3 µl fugene orantısına göre toplam 4000 µL Transfeksiyon karışımı hazırlandı. 1 cm² lik flask alanı başına 1 µg plasmid orantısına göre plasmid karışımları hazırlandı.

- 3880 mikrolitre serumsuz ve antibiyotiksiz besi ortamı üzerine üzerine 120 µl fugene

eklendi.

- **PFLAG boş karışımı hazırlanması:** Bir tüpe 8 µl (14,6 µg) PFLAG boş ve 990 µl transfeksiyon karışımı eklendi.
- **PFLAG CIITA karışımı hazırlanması:** 10,2 µl (14,535 µg) PFLAG CIITA ve 990 µl transfeksiyon karışımı eklendi.
- **PFLAG TAF7 Karışımı hazırlanması:** 8,72 µl (15 µg) PFLAG TAF7 ve 990 µl transfeksiyon karışımı eklendi.
- **PFLAG TAF7 ve CIITA Karışımı hazırlanması:** 10,2 µl PFLAG CIITA ve 8,1 µl PFLAG TAF7 üzerine 1000 µl transfeksiyon karışımı eklendi.

Tüm karışımlar pipetajla karıştırıldı ve 20 dak. Oda sıcaklığında inkübe edildi.

Karışımlardan 990 ar µl plaklara eklendi.

24 saat sonra ortamları yenilendi.

24 saat sonra Kaspaz 3 aktiviteleri ölçüldü.

3.9.2 Stabil pcDNA 4 TO TAF7 ve Boş Transfekte TREX HeLa Hücreleri ile CIITA'in TAF7'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması:

TAF7' nin apoptotik etkisi üzerinde CIITA in etkisinin araştırılması için pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa hücre hattına, pFLAG CIITA plasmidi transfekte edildi. Kontrol amacıyla pcDNA 4 TO boş stabil transfekte TREX HeLa hücre hattı kullanıldı. Floresan temelli Sigma Caspase 3 Assay kit ile kaspaz 3 aktivasyonları ölçüldü.

Gereçler:

- pFLAG CIITA plasmidi
- pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa hücre hattı
- pcDNA 4 TO boş stabil transfekte TREX HeLa hücre hattı
- DMEM + %10 FBS (Tetrasiklin azaltılmış) besi ortamı
- Doksisiklin
- 5 – 10 ml. lik pipetler
- Pipetör
- Lipit temelli transfeksiyon kiti (Roche – Fugene)
- Flüoresan temelli Sigma Caspase 3 Assay Kit
- 96 kuyulu hücre kültürü plağı
- Mikro santrifüj tüpleri

- Soğutmalı santrifüj

Yöntem:

- Kontrol amacıyla pcDNA 4 TO TAF7 ve boş stabil transfekte TREX HeLa hücrelerinden 96 gözlü plağın gözlerine 5000'er adet ekildi.
- pFLAG CIITA plasmidi transfeksiyonu yapıldı.
- 24 saat sonra kontrol grubuna doksisisiklin eklenmezken, deney grubuna 500 µg/ml doksisisiklin eklendi.
- 18 saat sonra kaspaz aktivasyonları ölçüldü.

3.10. CIITA'in Mutant Formlarının TAF7'nin Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin

Araştırılması:

CIITA in TAF7 nin apoptotik etkisi üzerinde baskılayıcı etkisi olmasını destekleyen bulgular elde edilmesinden sonra CIITA in nükleusa transferi ile ilgili olarak mutant formlarının TAF7 nin apoptotik etkisi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. CIITA in GTP bağlayan bölgesi mutant olan ve böylece nükleusa transfer olamayan D SKAD ve TAF7 ile interaksyona girememesine neden olan D 22 – 227 mutant formları pFLAG plasmidine klonlanmış olarak ABD, NCI Dinah Singer Laboratuvarından temin edilmiştir. İlk önce bu plasmidlerin mini ve maxi prepleri yapılmıştır. TREX sisteminde TAF7 ve mutant TAF7 over eksprese HeLa hücrelerine geçici transfeksiyonları yapıp kaspaz aktivasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3.11. TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin in Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması:

TAF7 nin tubulin polimerizasyonu üzerinde direkt olarak etkisinin bulunup bulunmadığı flüoresans temelli, Cytoskeleton marka “Tubulin Polymerization Assay Kit (Cat. No: BK011)” kullanılarak araştırıldı. Kit, ilaç ya da proteinlerin tubulin polimerizasyonu üzerindeki etkilerini tek basamakta belirlemek için geliştirilmiştir. Tubulin polimerizasyonu oluşurken bir bildirgecin mikrotübüllere katılması sonucunda oluşan flüoresans sinyalin ölçülmesi esasına dayanır. Deneylerde nükleasyon (faz 1), büyüme (faz 2) ve durağan durum dengesi (faz 3) olmak üzere üç fazlı bir polimerizasyon grafiği oluşturan nöronal tubulin (Cat. No: TL238-DX) kullanıldı.

Tubulin iki adet birbirine benzer 55 kDa molekül ağırlığına sahip alfa ve beta

tubulinleri içerir. Tubulin proteinleri polimerize olarak mikrotübül olarak isimlendirilen yapıları oluşturmaktadır. Tubulin polimerizasyonu sıcaklık ile kontrol edilmektedir. 37 °C de tubulin polimerize olarak mikrotübülleri oluşturmakta ve 4 °C de mikrotübüller depolimerize olarak tubulin alt birimlerine dönüşmektedir. Her bir derece sıcaklık düşüşünde polimerizasyon seviyesinde %5 oranında kayıp oluşmaktadır.

Deneylerde 2 mg/ml konsantrasyonunda tubulin ve 1 mM GTP içeren Tampon 1 ile hazırlanan reaksiyon karışımı kullanıldı.

Gereçler:

- Flüorometre
- Mikro pipet (100 ve 1000 µl. lik)
- Mikropipet ucu (100 ve 1000 µl. lik)
- Siyah, “yarım alan düz tabanlı, 96 kuyulu plak” (Corning Costar Cat.3686)
- Saf “TAF7” proteini (300 ng/ µl)
- 30 mM Tris Tamponu
- Tubulin Polymerization Assay Kit (Cytoskeleton, Cat. No: BK011)

Yöntem:

Kit İçeriğinin Hazırlanması:

Tampon 1: 20 ml 18 ohm luk distile su içerisinde çözöldü ve 1,5 ml lik hacimlerde alikatlandı (Toplam 13 adet). -70 °C ye kaldırıldı.

Tubulin Gliserol Tamponu: Direkt olarak +4 °C ye kaldırıldı.

GTP Stok: 300 µl buzda soğutulmuş 18 ohm luk distile su ile çözöldü. Buz üzerinde bekletilerek, 20 şer µl lik hacimlerde 13 adet alikat hazırlandı. -70 °C ye kaldırıldı.

Tubulin Protein: Bir adet 20 µl lik 100 mM GTP eritilmişştir. 1,5 ml Tampon 1 içersine 15 µl 100 mM GTP stoğundan eklendi. Karıştırlıp ve bu karışımđan tubulin tozu üzerine 1,1 ml eklendi. Karışımın çözünmesi için buz üzerinde 2 dak. bekletilip, 12 x 88 µl lik hacimlerde (100 mg/ml konsantrasyonunda) alikatlandı. Kuru buz içersinde dondurulup -70 °C ye kaldırıldı.

Paclitaxel: 100 µl DMSO içersinde çözölerek 2 mM stok paclitaxel solüsyonu hazırlanıp, direkt olarak -20 °C ye kaldırıldı.

Polimerizasyon Deneyi:

- Flüorometre aşğıdaki koşullarda ayarlandı;

Ölçüm tipi: Kinetik

Dalga boyu: Eksitasyon: 360 nm.

Emisyon: 460 nm.

Her bir kuyu başına okuma:10

Okuma yönü: Yukarıdan okuma

Çalkalama süresi: 5s., Şiddeti:1 (sadece ilk okumada)

Plate tipi: 96 kuyulu plak

- 96 kuyulu plak flüorometreye yerleştirilip, 37 °C ye ısıtıldı.
- Paclitaxel stok solüsyonu eritilip ve oda sıcaklığındaki steril distile su ile seyreltilerek deneyde arzu edilenin 10 katı konsantrasyonunda (60, 30, 10, 5 µM gibi) 10 X paclitaxel solüsyonu hazırlandı.
- 1,5 ml Tampon 1 ile 20 µl GTP stoğu eritilip buz üzerine alındı.
- 88 µl (880 µg) tubulin oda sıcaklığındaki su banyosu içerisinde eritilip hemen buz üzerine alındı.
- TAF7 proteini deney setinde arzu edilen konsantrasyona 30 mM Tris tamponu (pH:7,0) kullanılarak seyreltildi.
- Aşağıdaki gibi reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tampon 1: 355 µl

GTP Stok (100mM): 4,4 µl

Tubulin Stok (10 mg/ml): 85 µl

Karıştırılıp, buz üzerine alındı.

Kontrol kuyularından birine 5 µl Tris Tampon, diğerine ise 81 nM CIITA, negatif kontrol kuyusuna 5 µl 27 mM konsantrasyonda kolsemid, pozitif kontrol kuyusuna 5 µl 10X paclitaxel ve test kuyularına da 5 µl TAF7 solüsyonları (272, 136, 68 nM konsantrasyonlarında), kör kuyusuna ise tubulin eklenmeden hazırlanan reaksiyon karışımından 55 µl eklendi.

- Kontrol ve test kuyularına 50 µl reaksiyon karışımı eklendi.
- Plate hemen flüometreye konulup okuma başlatıldı.

1 saat boyunca 37 °C de kinetik modda, dakikada bir olmak üzere okuma yapıldı.

3.11.1 TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

TAF7'nin tubulin polimerizasyonundaki etkisinin araştırılması için farklı konsantrasyonlarda (272, 136 nM) TAF7 ile polimerizasyon deneyi yapıldı. Negatif kontrol olarak CIITA ve kolsemid, pozitif kontrol olarak da 30 µM paclitaxel kullanıldı. Bir saatlik okuma sonunda “şekil 41” de görülen polimerizasyon grafiği elde edildi.

3.11.2 TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

Paclitaxel uygulanarak polimerize edilen tubulin üzerinde TAF7'nin etkisi bulunup bulunmadığını araştırmak için paclitaxel uygulanan tubulin kuyusuna TAF7 eklenip, bir saatlik flüoresans okuma yapılmıştır. Kontrol olarak kolsemid kullanılmıştır. Bir saatlik okuma sonunda “Şekil 42 ve 43” de görülen polimerizasyon deseni elde edildi.

Verilerimiz 10 μ M ve 30 μ M paclitaxel eklenen kuyularda, polimerizasyon üzerinde TAF7'nin azaltıcı etkisi olabileceğini desteklemektedir. Bu durum da TAF7 nin polimerize olmayan tubuline bağlanarak polimerize olmasını engellediğini düşündürmektedir. Ancak izlenen bulguların TAF7'ye özgü olduğunu söyleyebilmek için deneyin farklı bir protein varlığında tekrarlanması gerekmektedir. Flüoresan mikroskobu deneylerimizde TAF7'nin over-ekspresyonunun polimerize mikrotubulleri stabilize ettiğini destekleyen veriler elde etmiştik. Bunu da göz önünde bulundurarak TAF7'nin polimerize tubuline de bağlanarak depolimerize olmasını engelleyebileceği düşünüldü.

3.11.3 TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı proteinler (TBP, BSA ve HIV TAT) ile Kontrol Edilmesi:

30 μ M Paclitaxel uygulanarak polimerize edilen tubulin üzerinde TAF7'ye benzer şekilde TBP'nin etkisi bulunup bulunmadığını araştırmak için paclitaxel uygulanan tubulin kuyusuna TAF7 eklenip, bir saat 45 dakikalık flüoresans okuma yapılmıştır. Kontrol olarak TBP, BSA, pozitif kontrol olarak ise HIV TAT kullanılmıştır.

3.11.3.a TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (TBP) ile Kontrol Edilmesi:

TAF7'nin tubulin depolimerizasyonu üzerindeki etkisinin spesifik olup olmadığının farklı bir protein (TBP) ile kontrol edilmesi için aynı deney TBP ile tekrar edildi. Aşağıdaki deney grupları oluşturuldu.

Taxol+ Kolsemid+TBP

Taxol + Kolsemid

TBP

Kolsemid

Kolsemid + TBP

Taxol

Taxol + TBP

Tampon

3.11.3.b TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (BSA) ile Kontrol Edilmesi:

TAF7'nin tubulin depolimerizasyonu üzerindeki etkisinin spesifik olup olmadığının farklı bir protein (BSA) ile kontrol edilmesi için aynı deney TBP ile tekrar edildi. Aşağıdaki deney grupları oluşturuldu.

Taxol+ Kolsemid+BSA

Taxol + Kolsemid

BSA

Kolsemid

Kolsemid + BSA

Taxol

Taxol + BSA

Tampon

3.11.3.c HIV TAT'ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması:

HIV TAT'ın tubulin depolimerizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için aşağıdaki deney grupları oluşturuldu.

Taxol+ Kolsemid+HIV TAT

Taxol + Kolsemid

HIV TAT

Kolsemid

Kolsemid + HIV TAT

Taxol

Taxol + HIV TAT

Tampon

3.12. TAF7'nin Beta Tubulin ile İlişkisinin İmmün Presipitasyon Deneyi (In Vivo) İle Belirlenmesi:

TAF7 ile β -tubulin arasında doğrudan bir bağlanma olup olmadığı önceki çalışmalarımızda immün presipitasyon yöntemi ile araştırılmıştı. Öncelikle HeLa hücrelerine lipozomal transfeksiyon ile FLAG-TAF7 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş, sonrasında bu hücreler apoptozu tetiklemek amacıyla etoposid ile muamele edilmişti. HeLa lizatlarında,

immün presipitasyon β -tubulin antikoru ile, western blot ise FLAG antikoru ile yapıldı (bkzn. şekil 53).

3.13. TAF7'nin Tubulin Proteinleri ile İlişkisinin in Vitro İmmün Presipitasyon Deneyi ile Araştırılması:

In vitro immün presipitasyon saf proteinler kullanılarak, bir protein ile ilişkili olan diğer proteinlerin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Protein A boncuklarına antikor – antijen kompleksinin bağlanabilmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Tubulin polimerizasyon deneyi yapıldıktan sonra Saf TAF7, polimerize ve polimerize olmayan tubulin proteinleri içeren kuyulardaki karışımlar alınıp 100 μ l lizis tamponu içerisine eklenmiştir. İki saat boyunca immün presipitasyon antikoru olan TAF7 ile inkübe edilip, protein a boncukları üzerine eklenmiştir. Gece boyunca 4 °C de dönmeye bırakılmıştır. Daha sonra Beta tubulin antikoru ile western blot yapılmıştır.

Gereçler:

1. Protein A boncukları
2. Lizis tamponu
3. Mikrosantrifüj tüpleri
4. Soğutmalı santrifüj
5. +4 °C' li soğuk oda.
6. Mini protean 3 Cell SDS Page jel elektroforez tankı
7. Güç kaynağı
8. Nitroselüloz membran
9. Protein markeri
10. Yarı kuru transfer cihazı
11. Süt tozu
12. TBST
13. TBS
14. Towbin transfer tamponu
15. Otomatik pipet ve pipet uçları
16. Saf TAF7 proteini
17. Saf tubulin ve polimerize tubulin
18. Kemilüminesans substrat

Yöntem:

- Tubulin polimerizasyon deneyinden sonra “Tubulin + Taxol + TAF7 + 1600 s. sonra nokadazol” içeren ve “Tubulin + TAF7 + 1600 s. sonra taxol “ içeren wellerdeki karışımlar çekilip bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerlerine 100’ er µl lizis tamponu eklendi.
- Bu karışımlara 15’er µl TAF7 antikoru eklendi ve 2 saat 4 °C’ de döndürülerek inkübe edildi.
- Bir mikrosantrifüj tüpüne 60 µl protein A boncuğu eklendi.
- Dört kez lizis tamponu ile yıkandı.
- Üzerine 100 µl lizis tamponu içerisinde 1/10 dilüsyon oranında BSA eklenmiştir. 2 saat 4 °C’ de döndürülerek inkübe edildi.
- 2 saat sonra protein boncuklar spinlenerek çöktürölüp üst faz atıldı.
- Bir kez lizis tamponu ile yıkandı.
- “Tubulin + Taxol + TAF7 + nokadazol” içeren ve “Tubulin + TAF7 + taxol “ içeren mikrosantrifüj tüplerine BSA ile blotlanmış olan 20 şer µl protein A boncuğu eklendi. “Bead only control” olması için geriye kalan 20 µl protein A boncuğu üzerine de 150 µl lizis tamponu eklendi.
- Üç karışım da gece boyunca +4 °C’ de dönmeye bırakıldı.
- Ertesi gün protein boncuklar soğutmalı santrifüjde spinlenerek çöktürölüp, bir kez 1 er ml lizis tamponu ile yıkandı.
- Boncuklar üzerine 2X yükleme tamponundan eşit hacimde eklenip 95 °C’ de 5 dakika inkübe edilerek proteinlerin boncuklardan ayrılması ve denatüre edilmesi sağlandı.
- Soğutmalı santrifüjde spinlenerek boncuklar çöktüröldü.
- Üst faz SDS page jeline yüklenip yürütölmüştür.
- SDS jelinden nitroselölöz membrana yarı kuru yöntem ile transfer edildi.
- Membran 1 saat %5 süt tozu + TBST içerisinde blotlandı.
- Bir gece +4 °C de “Beta Tubulin” antikoru ile %5 süttozu + TBST içerisinde blotlandı.
- Membran 2 kez TBST ve bir kez TBS solüsyonları ile yıkanmıştır.
- Ertesi gün 2 saat boyunca anti fare antikoru ile %3 süttozu + TBST içerisinde blotlandı.

- Membran 2 kez TBST ve bir kez TBS solüsyonları ile yıkandı.
- Membran kemilüminesans substrat ile 5 dak. inkübe edildi ve lüminesans görüntü filme çekildi.

3.14. TAF7 ile Beta Tubulin İlişkisinin Mikroskopi İle Araştırılması:

İn vitro tubulin polimerizasyon ve immün presipitasyon deneylerimizde elde ettiğimiz bulgular TAF7 ile tubulin proteinlerinin direkt olarak birbiriyle etkileştiğini desteklemekteydi. Bu bulguların yanı sıra TAF7 ile tubulin proteinlerinin direkt olarak birbiriyle ilişkili olduğunu konfokal mikroskopi deneyi ile de araştırmayı planladık.

Konfokal mikroskopi deneylerimiz İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Serdar Özçelik'in laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Farklı fiksasyon yöntemleri denenerek görüntüler elde edilmeye çalışılmıştır.

Paraformaldehit Fiksasyonu:

Gereçler:

- PEGFP TAF7 transfekte HeLa Hücre hattı
- %4 Paraformaldehit, asetik asit, asetik asit/metanol (v/v) karışımı.
- Triton X
- PBS
- PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren)
- Birincil antikör (Beta Tubulin)
- Texas red işaretli ikincil antikör.

Yöntem:

- PEGFP TAF7 transfekte HeLa Hücreleri (yirmibin hücre/göz) bulunan 8 gözlü slayt flaskın iki gözü paraformaldehit fiksasyonuna maruz bırakıldı.
- %4 Paraformaldehit ile 10 dak oda sıcaklığında inkübe edildi
- Önce distile su ile 1 kez yıkandı
- Sonra PBS ile üç kez yıkandı
- 1X PBS %10 FBS + %0,3 Triton X koy 37 °C de 1 h inkübe edildi
- Sonra 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X içerisinde birincil antikorda 1/100 dilüsyon oranında 1 h 37 °C de inkübe edildi.
- 1X PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren) ile yıkandı.
- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X ile 3 x 5 dak yıkandı.

- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X içerisinde ikincil antikorda 1:1000 dilüsyonda 1 h RT da inkübe edildi.
- 1X PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren) ile yıkandı.
- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X ile 3 x 5 dak yıkandı.
- Kurumaya bırakıldı.

Fikse Etmeden Tubulin Boyama:

Gereçler:

- PEGFP TAF7 transfekte HeLa Hücre hattı
- Triton X
- PBS
- PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren)
- Birincil antikor (Beta Tubulin)
- “Texas red” işaretli ikincil antikor.

Yöntem:

- PEGFP TAF7 transfekte HeLa Hücreleri (yirmi bin hücre/göz) bulunan 8 gözlü slayt flaskın iki gözündeki hücreler fikse edilmeden boyandı
- Gözler PBS ile yıkandı
- 1X PBS %10 FBS + %0,3 Triton X koy 37 °C de 1 h inkübe edildi
- Sonra 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X içerisinde birincil antikorda 1/100 dilüsyon oranında 1 h 37 °C de inkübe edildi.
- 1X PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren) ile yıkandı.
- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X ile 3 x 5 dak. yıkandı.
- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X içerisinde ikincil antikorda 1:1000 dilüsyonda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 1X PBST (%0,05 lik Tween 20 içeren) ile yıkandı.
- 1 X PBS + %2 FBS + %0,3 Triton X ile 3 x 5 dak yıkandı.
- Kurumaya bırakıldı.

Fiksasyon ve boyama işlemlerinden sonra kuyular kurumaya bırakıldı.

Kuruduktan sonra slayt flaskın flask kısmı çıkarılıp slayt haline getirildi.

0,1 µg/ml konsantrasyonda DAPI den her göz üzerine 10 µl eklenip, lamel kapatıldı.

Slayt alüminyum folyaya sarıldı ve 1 gece +4 °C de bekletildi.

Ertesi gün IYTE Kimya Bölümü'nde Prof. Dr. Serdar Özçelik'in laboratuvarında "ANDOR Revolution" marka konfokal mikroskopta incelendi.

3.15. TAF7 ve Beta Tubulin Floresan Mikroskopide Görüntüleme:

Konfokal Mikroskopi ile kaliteli görüntülerin elde edilememiş olması nedeni ile bölümümüzde bulunan floresan mikroskopi ve farklı sekonder antikorlar kullanılarak yeni görüntüleme denemeleri yapılmıştır.

Gereçler:

- PEGFP TAF7 transfeke HeLa Hücre hattı
- %4 Paraformaldehit
- Triton X
- BSA
- FBS
- PBS
- **Primer antikorlar:**

TAF7 (mouse) (santacruz sc10167)

Beta tubulin (rabbid) (santa cruze sc 9104)

- **Sekonder antikorlar:** (Doç Dr. Esra Erdal'dan temin edilmiştir.)

İnvitrogen Alexa 555 (A-31570) (donkey anti mouse) (TRITC turuncu)

İnvitrogen Alexa 488 (A-21206) (donkey anti rabbid) (FITC yeşil)

- Gliserol bazlı kaplama ortamı

Yöntem:

Paraformaldehit Fiksasyonu:

- Hücrelerin üzerindeki besi ortamı çekilir ve bir kez PBS ile yıkanır.
- Hücrelerin yüzeyini örtecek kadar %4 paraformaldehit eklenir
- Oda sıcaklığında 15 dak. beklenir.
- 3 kez PBS ile yıkanır.

Aşağıdaki koşullarda immün floresan boyama yapılmıştır:

- Fiksasyondan sonra hücreler 10 dak. PBS + %0,5 Triton X ile inkübe edilir. 3 kez PBS ile yıkanır.
- 15 dak. Oda sıcaklığında PBS + 0,1 M Glisin de inkübe edilir.
- 1 kez PBS ile yıkanır.

- 1 saat oda sıcaklığında PBS + %1 BSA + %5 FBS içerisinde 1/75 dilüsyon oranında primer antikorlarla (aktivitesi azalmış olma olasılığı nedeni ile konsantre kullanılmaktadır) inkübe edilir.
- 4 kez PBS + %1 BSA ile 5 er dakika yıkanır.
- 1 saat oda sıcaklığında PBS + %1 BSA + %5 FBS içerisinde 1/5000 dilüsyon oranında sekonder antikoralarla inkübe edilir.
- 4 kez PBS + %1 BSA ile 5 er dakika yıkanır.
- Slayt flask bölmeleri çıkartılır. Lam karanlıkta kurutulur.Slayt üzerine DAPI içeren gliserol bazlı kaplama ortamı damlatılıp üzerine lamel kapatılır.

SLAYT FLASK 1 KONTROL (HEPSİ DOKSİSİKLİNLİDİR)

1 SADECE TAF7 PRIMER	2 SADECE BETA TUBULIN PRIMER	3 TRITC SEKONDER	4 FITC SEKONDER
5 BETA TUBULIN PRIMER VE TRITC SEKONDER (ANTI MOUSE)	6 TRITC (ANTI MOUSE) VE FITC (ANTI RABBID) SEKONDERLER	7 TAF7 VE BETA TUBULIN PRIMER	8 DAPI

SLAYT FLASK 2 DENEY

1 TAF7 DOKSİSİKLİNSİZ	2 BETA TUBULİN DOKSİSİKLİNSİZ	3 TAF7 VE BETA TUBULIN DOKSİSİKLİNSİZ	4 DAPI DOKSİSİKLİNSİZ
5 TAF7 DOKSİSİKLİNLİ	6 BETA TUBULİN DOKSİSİKLİNLİ	7 TAF7 VE BETA TUBULIN DOKSİSİKLİNLİ	8 DAPI DOKSİSİKLİNLİ

3.16. TAF7 Over Ekspresyonunun BCL 2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot İle Araştırılması:

Gereçler:

- pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa Hücre Hattı
- Doksisisiklin
- DMEM

- Tetrasiklin azaltılmış FBS
- Lizis Tamponu
- SDS page jeli
- Yürütme tamponu
- Transfer tamponu
- BCL 2 (Santa Cruze) primer antikoru
- Anti rabbit sekonder antikoru (Santa Cruze)

Yöntem:

- pcDNA 4 TO TAF7 stabil transfekte TREX HeLa Hücrelerinden 8 adet petri kabına ekim yapıldı.
- Sırasıyla 2 şer tanesine 0, 100, 500 ve 1000 er nM’ar doksisisiklin eklendi.
- 24 ve 48 saat sonra hücre lizatları hazırlandı.
- SDS page jeline yüklenip yürütüldü.
- Yarı kuru yöntem ile PVDF membrana transfer edildi.
- BCL2 (rabbit) primer antikoru ve anti rabbit sekonder antikoru (Santa Cruze) ile blotlandı.

3.17. İmmün Presipitasyon Deneyi ile TAF7 – CASPASE 2L Arasındaki İlişkinin Araştırılması:

TAF7 nin apoptotik yolaktaki proteinler ile ilişkisinin araştırılması için bu deney yapılmıştır.

Gereçler:

- Hücre lizatı
- Lizis tamponu
- Soğutmalı santrifüj
- +4 °C’ li soğuk oda.
- Mini protean 3 Cell SDS Page jel elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- Nitroselüloz membran
- Protein markeri
- Semi dry transfer cihazı

- Süt tozu
- TBST (içeriği için eke bakınız)
- TBS (içeriği için eke bakınız)
- Towbin transfer tamponu
- Protein A boncukları
- Caspase 2 L antikoru
- TAF7 antikoru
- Boncuklar üzerine 100 µl lizat eklenip gece boyunca +4 °C’ de dönmeye bırakılır.
- Ertesi gün protein boncuklar soğutmalı santrifüjde spinlenerek çöktürüldü.
- Bir kez 1 ml lizis tamponu ile yıkandı.
- Boncuklar üzerine 4X yükleme tamponundan 1/3 hacimde yani 150 µl boncuk için 50 µl olacak şekilde eklendi.
- 95 – 100 °C’ de 5 – 10 dakika inkübe edilerek proteinler boncuklardan ayrıldı.
- Soğutmalı santrifüjde spinlenerek boncuklar çöktürüldü.
- Üst faz SDS page jeline yüklenerek western blot protokolü uygulandı.
- TAF7 ile blotlandı.

3.18. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 ve Ser 159 Mutant TAF7'nin Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

Pim Pijnappel ve ark. tarafından 24.12.10 tarihinde yayınlanan “Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle” başlıklı makalede TAF7 nin G2/M ve G1/S geçişinde ser 159 amino asitinden fosforillendeği bildirilmiştir. Ayrıca bu fosforilasyon bölgesinin TAF7 nin transkripsiyon aktivatörleri ile etkileştiği bölgesinde (TAF1 interacting domain) yer alması nedeniyle TAF7 nin G2/M geçişinde transkripsiyon blokajında görevli olabileceği de öne sürülmüştür.

Biz de bu amino asiti kodlayan kodonu alanine dönüştürerek TAF7 nin ve fosforillenemeyen ser 159 mutant formunun hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmaya karar vermiştik. Bu amaçla TAF7 ve ser 159 mutant TAF7 yi tetrasiklinle regüle edilen sistemde over eksprese ettirip, hücre döngüsü analiz kiti ile etkilerini araştırdık.

Gereçler:

- BD cell cycle analiz kiti
- pcDNA 4TO boş, TAF7 ve Mutant TAF7 stabil TREX HeLa hücre hatları
- Doksisisiklin
- DMEM + %20 FBS (Tetrasikin azaltılmış)+5µg/ml Blastisidin
- Flow sitometre

Yöntem:

- 6 gözlü bir plağın ikişer gözüne 250 şer bin adet pcDNA 4TO boş, TAF7 ve Mutant TAF7 stabil TREX HeLa hücre hatlarından ekildi.
- 2 gün %0 FBS içeren ortamda senkronize edildi.
- 200 ng/ml doksisisiklin eklendi.
- 2 gün sonra BD cell cycle analiz kiti ile hücre döngüsü analizleri yapıldı.

3.19. Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem (TREX) HeLa Hücreleri İle Senkronizasyon Çalışmaları:**Gereçler:**

- BD cell cycle analiz kiti
- pcDNA 4TO boş, TAF7 ve Mutant TAF7 stabil TREX HeLa hücre hatları
- Doksisisiklin
- DMEM + %20 FBS (Tetrasikin azaltılmış)+5µg/ml Blastisidin
- Flow sitometre

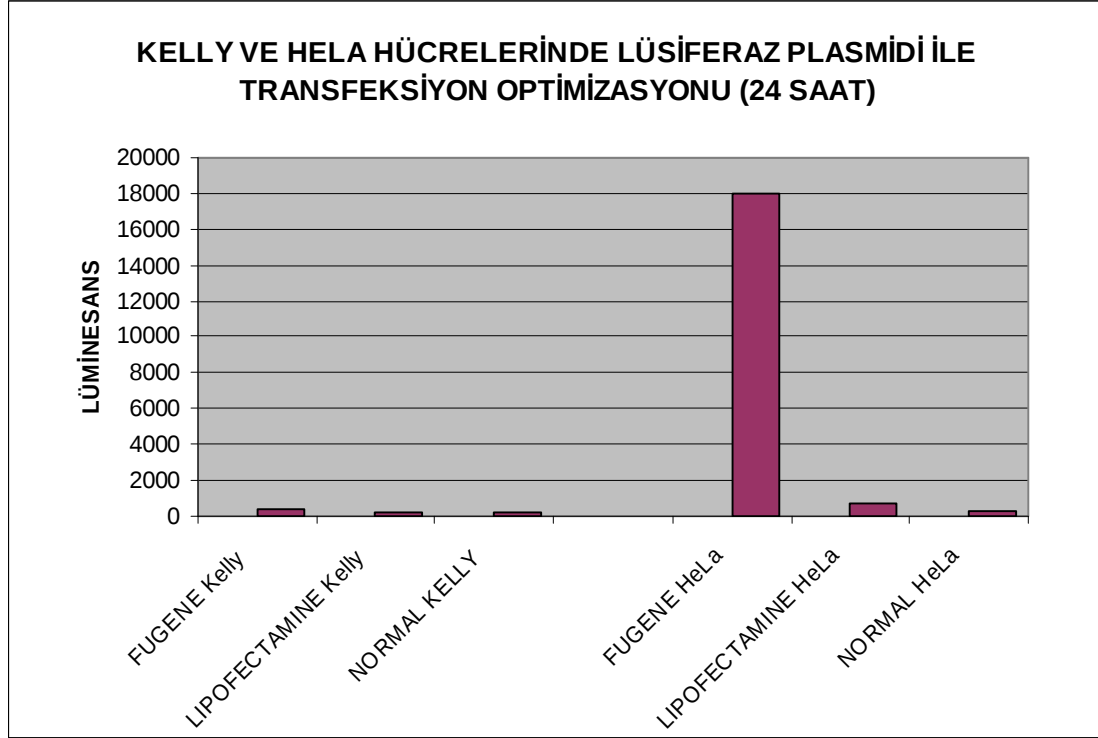
Yöntem:

- 6 gözlü bir plağın ikişer gözüne 250 şer bin adet pcDNA 4TO boş stabil TREX HeLa hücre hatlarından ekildi.
- 48 ve 72 saat %0 FBS içeren ortamda senkronize edildi.
- Senkronizasyon sonrasında BD cell cycle analiz kiti ile hücre döngüsü analizleri yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. Transfeksiyon Yöntemi Optimizasyonu:

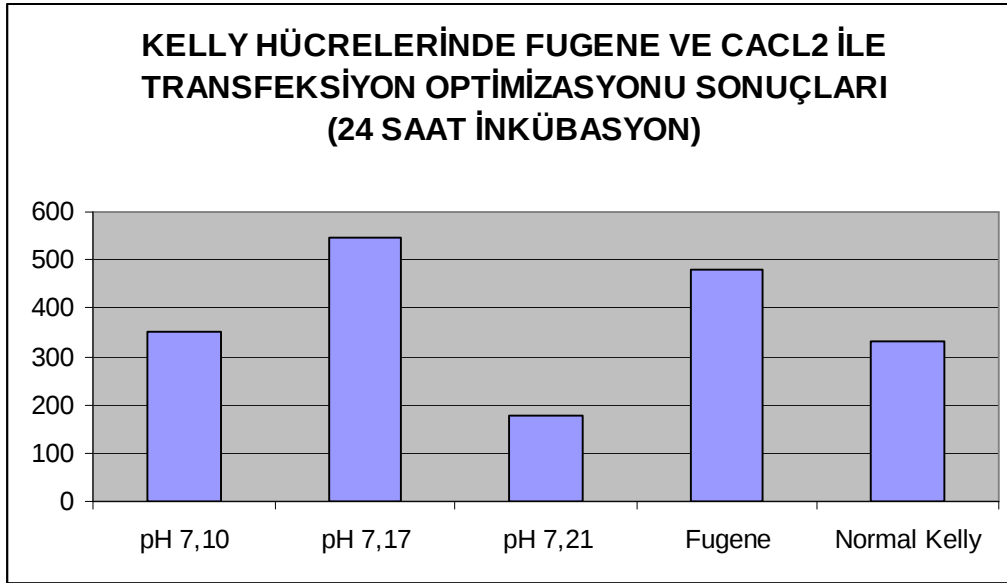
4.1.1 Fugene ve Lipofektamin ajanları ile transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması:



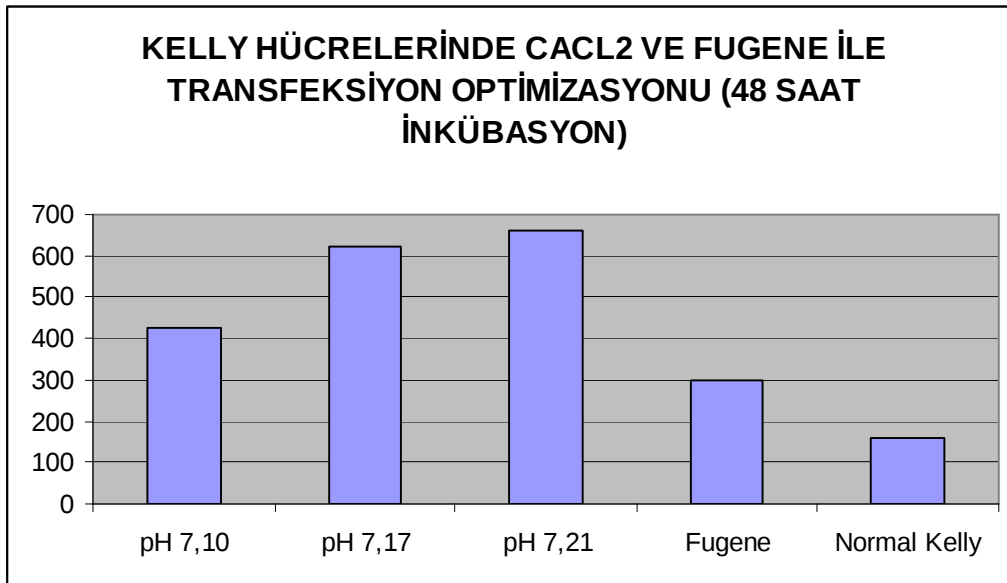
Şekil 17: Fugene ve Lipofektamin ajanları ile transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması

HeLa hücrelerinde fugene ile denenen konsantrasyonda transfeksiyon yapılmasına ve Kelly hücrelerinde CaCl_2 ve fugene in farklı konsantrasyonları ile denemeler yapılmasına karar verildi.

4.1.2 Fugene ve CaCl₂ ile transfeksiyon denemesi:



Şekil 18.a: Kelly Hücrelerinde Fugene ve CaCl₂ ile transfeksiyon verimliliklerinin Karşılaştırılması (24 saat)

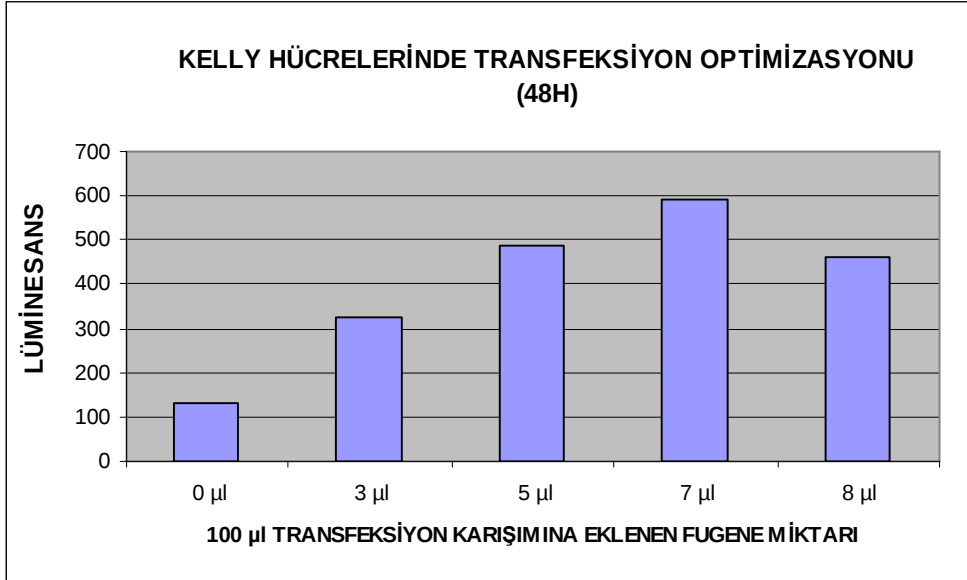


Şekil 18.b: Kelly Hücrelerinde Fugene ve CaCl₂ ile transfeksiyon verimliliklerinin Karşılaştırılması (48 saat)

24 saatlik transfeksiyon denemelerinin hiçbirinde anlamlı düzeyde artış yok iken 48 saatlik denemelerde maksimum pH:7,21 2X HBSS solüsyonu ve CaCl₂ ile yapılan denemede artış görülmüştür.

Fugene’ in Farklı Konsantrasyonları İle Transfeksiyon Denemesi:

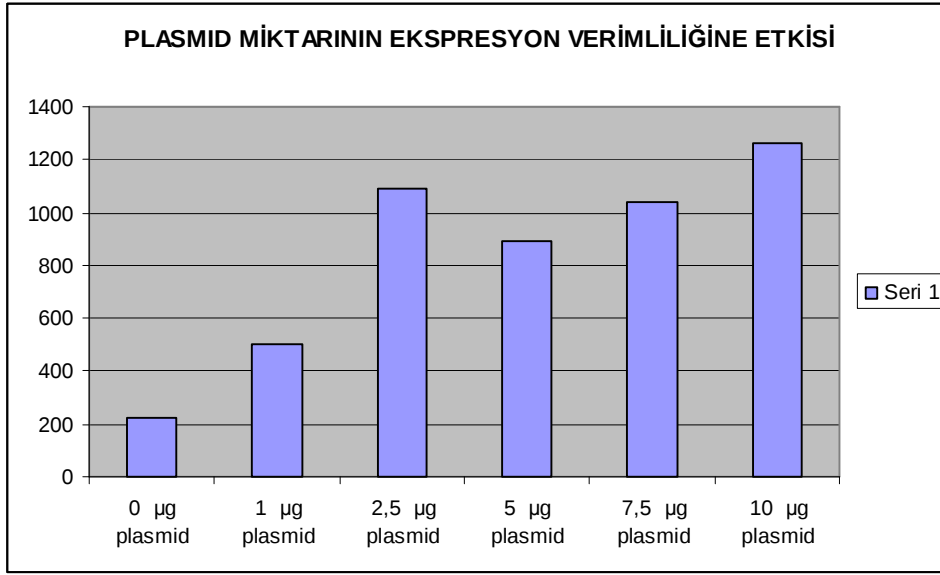
Sonuç olarak Kelly Hücrelerinde 7µl/100 µl, HeLa Hücrelerinde 3 µl/100 µl konsantrasyonlarında “Fugene” ile transfeksiyon yapılmasına karar verildi.



Şekil 19: Kelly Hücrelerinde Fugene'in Farklı Konsantrasyonları ile Transfeksiyon

4.2 Lüsiferaz Takılı Plasmid Kullanılarak Transfeksiyonda Kullanılabilecek Optimum Plasmid Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Deneylerimizde kullanılabileceğimiz optimum plasmid konsantrasyonunu belirlemek için lüsiferaz geni takılı plasmis “Fugene” transfeksiyon ajanı kullanılarak 1, 2,5, 5, 7,5 ve 10 µg plasmid/100 µl transfeksiyon karışımı konsantrasyonlarında transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra lüsiferaz aktiviteleri ölçülmüştür.



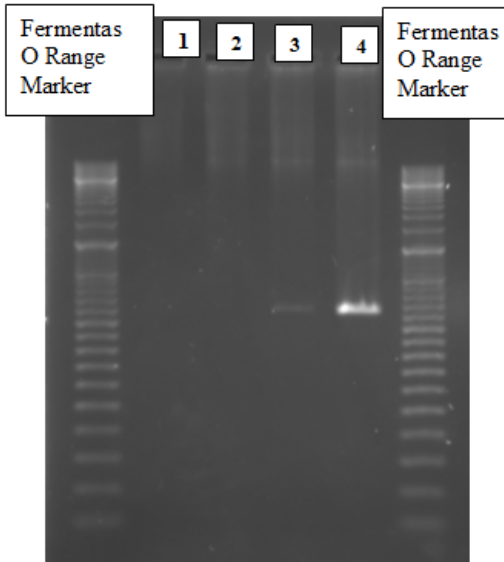
Şekil 20: Optimum plasmid konsantrasyonu

Sonuç olarak transfeksiyonlarda 2,5 µg plasmid/100 µl transfeksiyon karışımı oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3 TREX Sistemine TAF7' nin Klonlanması ve Stabil Transfeksiyon:

4.3.1 Klonlama:

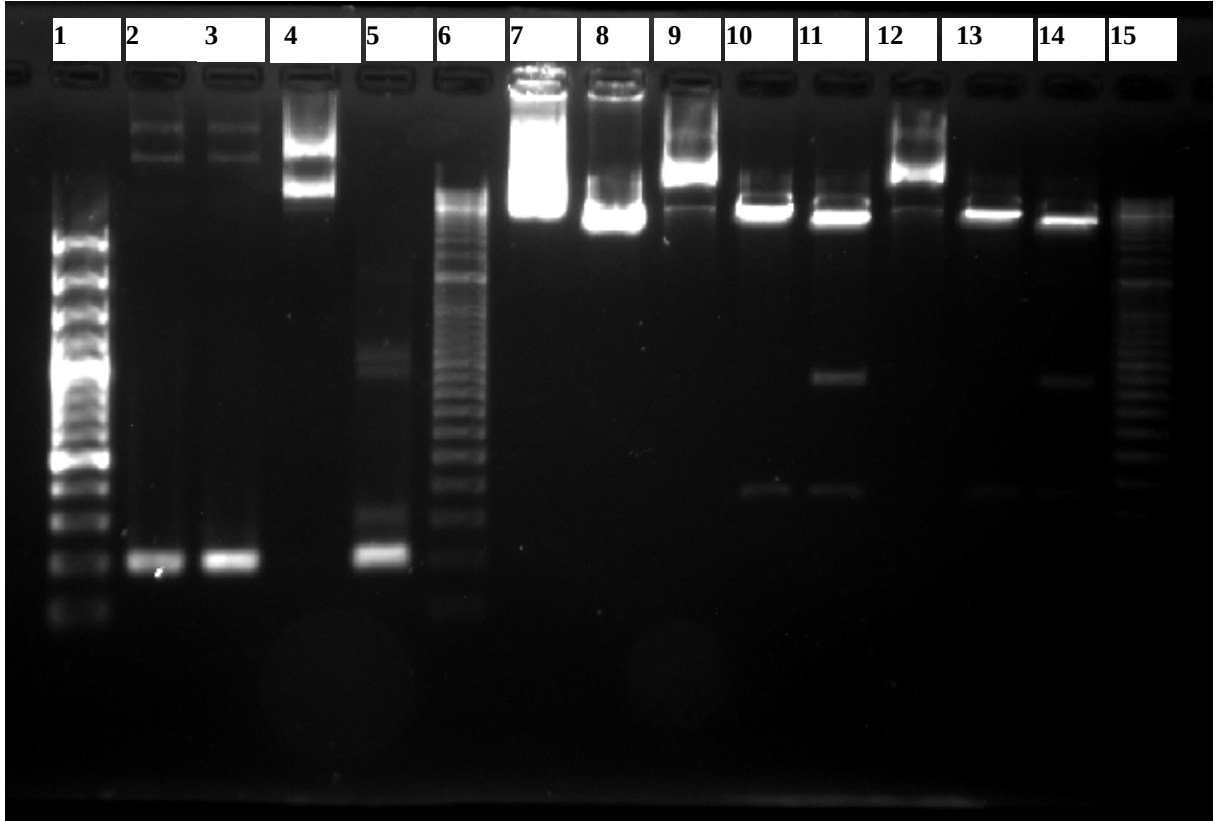
4 numaralı koşulda PCR reaksiyonları kurulmasına karar verildi.



Şekil 21: TREX TAF7 Primerleri İle Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları Optimizasyonu

4.3.2 Plasmidlerinin Maxi Prep İle Çoğaltılması

pcDNA 4 TO plasmidine TAF7 klonlandı. Klonlamanın kontrol edilmesi için klonlardan restriksiyon enzim kesim reaksiyonları ve PCR kurulup agaroz jelde yürütüldü ve insert almış olan koloniler tespit edildi (bkz şekil 22).



Şekil 22: Maxi prep ile çoğaltılan pcDNA 4 TO TAF7plazmidinin PCR ve enzim kesim ürünlerinin agaroz jel görünütüsü

1. Roche MWM XIV 100 Base pair ladder (Cat No:1272832)
2. 5 NUMARLI Koloni den TAF7 PCR
3. 6 NUMARLI Koloni den TAF7 PCR
4. Boş plasmid TAF7 PCR
5. TAF7 insertden TAF7 PCR
6. Fermentas O Range Ruler 100 bp + 500 bp ladder (Cat. No # SM0653)
7. Boş plasmid
8. Boş plasmid Hind III EK
9. 5 Numarlı Koloni miniprep
10. 5 Numarlı koloni Hind III EK
11. 5 Numarlı koloni Hind III ve Apa 1 EK
12. 6 Numarlı Koloni miniprep

13. 6 Numarlı koloni Hind III EK

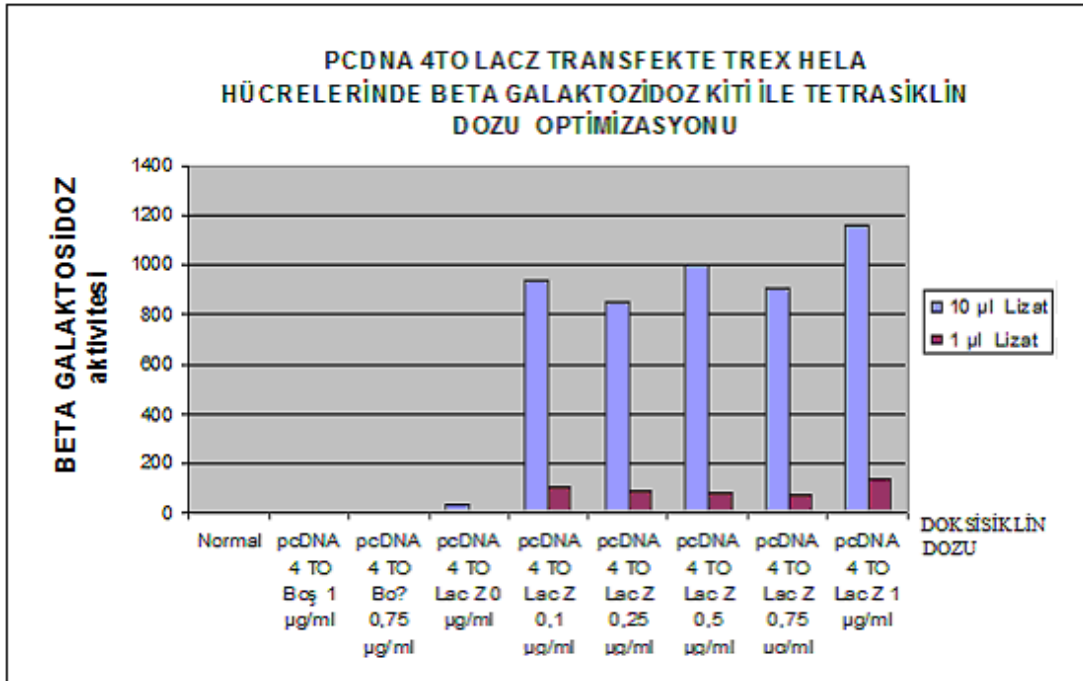
14. 6 Numarlı koloni Hind III ve Apa 1 EK

15. Fermentas O Range Ruler 100 bp + 500 bp ladder (Cat. No # SM0653)

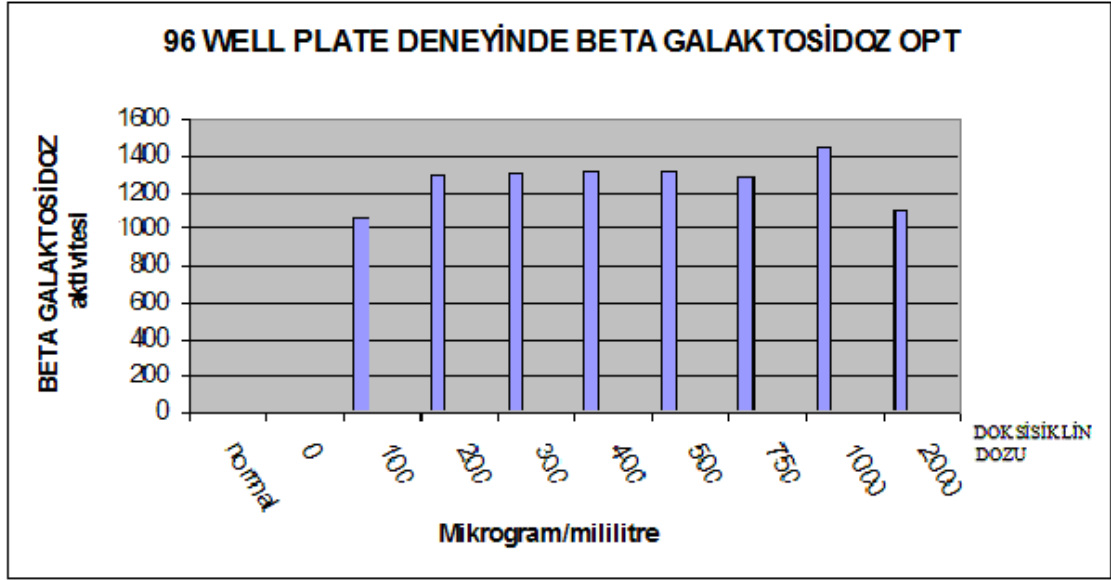
Sonuç olarak 5 ve 6 numaralı kolonilerde klonlamanın başarılı olduğu görüldü.

4.3.4 pcDNA 4 TO LACZ Transfeksiyonu Sonrası Beta Gal Assay İle Doksisisiklin Doz ve İnkübasyon Süresi Optimizasyonu:

pcDNA4TO plasmidine TAF7 genini proje öncesinde klonladık ancak çalışmalarımızda kullanılacak doksiasiklin dozunun tekrar optimize edilmesi gerektiğinden pcDNA4TO/LacZ kontrol plasmidini kullandığımız deneyleri gerçekleştirdik. Öncelikle Transfekte edilecek optimum pcDNA4TO/LacZ kontrol plazmid konsantrasyonu belirlendi; sonraysa doksisisiklin optimizasyonu beta gal deney kiti ile 6 gözlü ve 96 gözlü plak yöntemleri ile yapıldı (bkz şekil 23 ve 24). Sonuç olarak 1000 µg/ml doksisisiklin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi (bkz şekil 25).

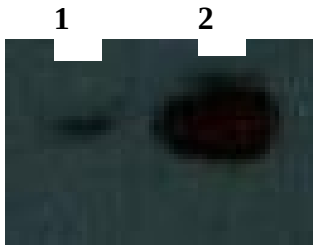


Şekil 23: Beta galaktosidoz optimizasyonu (optimum pcDNA4TO/LacZ kontrol plasmid konsantrasyonunun belirlenmesi)



Şekil 24: Beta galaktosidaz optimizasyonu (doksisisiklin dozunun belirlenmesi)

TAF7 western Blot



- 1) Doksisisiklin eklenmemiş
- 2) Doksisisiklinli

TBP western blot

(aynı membran “strip” edildikten sonra)

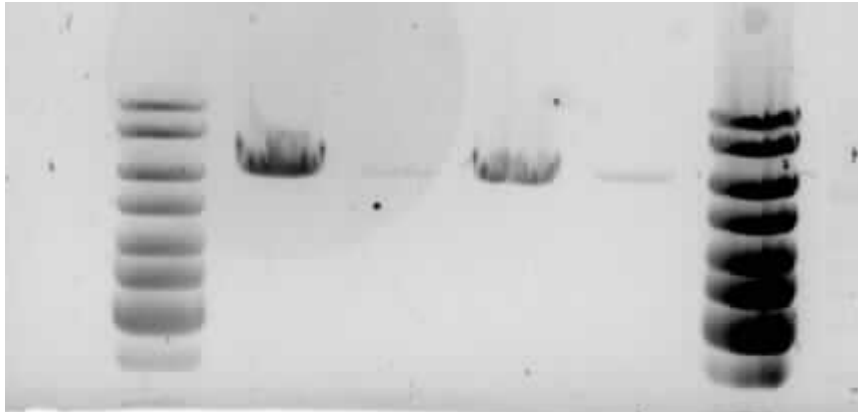


Şekil 25: Belirlenen doksisisiklin dozunun stabil transfekte hücrelerde TAF7 ekspresyonu üzerindeki etkisinin western blot ile gösterilmesi

4.4 .Site Directed Mutagenesz ile pcDNA 4 TO TAF7’nin Serin 159 Amino Asitinin Alanin Amino Asitine Dönüştürülmesi ve Bu Plasmidinin TREX Hela Hücrelerine Stabil Transfeksiyonu:

Site directed mutagenesz ile pcDNA4TO/TAF7’nin serin 159 amino asitinin alanin amino asitine dönüştürülmesi:

InvitroGene’in “GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System”i kullanılarak pFLAG TAF7 ve pcDNA 4 TO TAF7 plasmidlerindeki TAF7 geninin serin 159 amino asiti alanin amino asitine dönüştürüldü. “GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System” in prensibi yöntemdeki akış şemasında gösterilen DNA metilaz ve *Mcr*BC endonükleaz enzimlerinin özelliklerine dayanır. Bir önceki bölümde anlatılmış olan yöntemler bölümündeki protokolün uygulanmasıyla



Şekil 26: Mutagenez PCR Ürünleri

- 1 . kuyu 0 gene ruler 1 kb marker
- 2 . kuyu 1 no lu PCR
3. kuyu 2 no lu PCR
4. kuyu 3 no lu PCR
5. kuyu 4no lu PCR
6. kuyu 0 gene ruler 1 kb marker

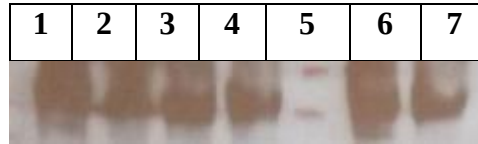
4.5 pcDNA 4TO TAF7 TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması ile TAF7 Ekspresyon Düzeyi Değişikliğinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması :

Deneylerimizde doksisiklin uygulaması sonrasında TAF7 ekspresyonunda artış görmemeye başladık. Bunun üzerine yeni bir doksisiklin preparatı açılarak hazırlandı ve western blot yöntemiyle yeni preparatın doz ayarlaması yapıldı. Sonuç olarak bu yeni doksisiklin preparatıyla deneylere 500 nM konsantrasyonda devam edilmesine karar verildi (bknz şekil 29, şekil 30)



Şekil 29: TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulamasının TAF7 Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin TAF7 Western Blot ile Araştırılması (24 Saat)

- 1: 500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA)
- 2: 0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA)
- 3: 500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO BOŞ TREX HELA)
- 4 0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO BOŞ TREX HELA)
- 5: Marker
- 6:500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 mutant TREX HELA)
- 7:0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 mutant TREX HELA)

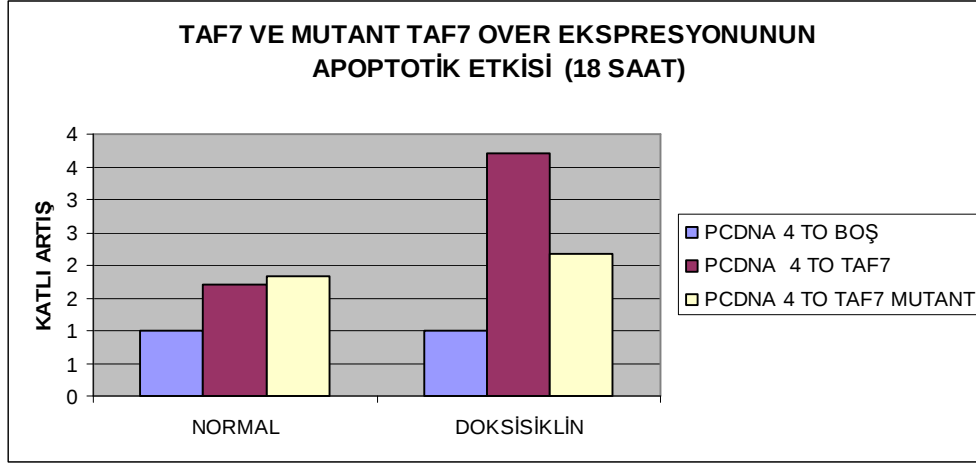


Şekil 30: Yükleme kontrolü TBP western blot

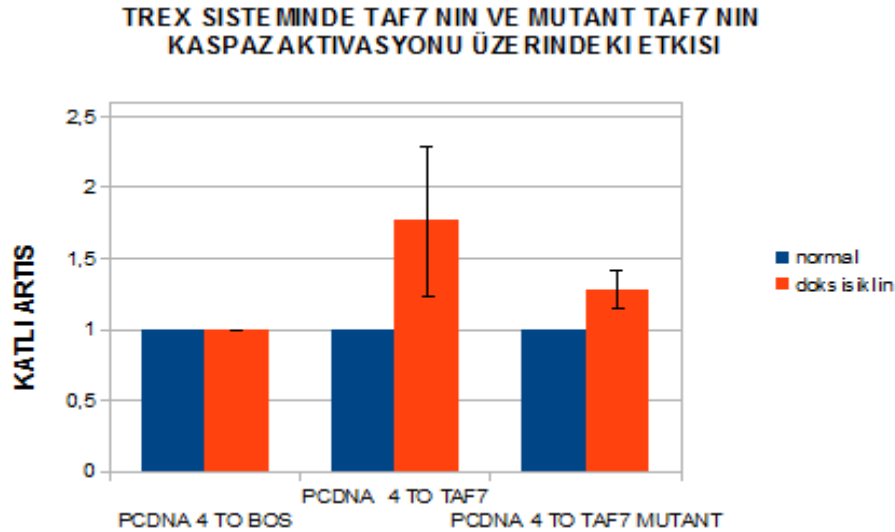
- 1: 500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA)
- 2: 0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA)
- 3: 500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO BOŞ TREX HELA)
- 4 0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO BOŞ TREX HELA)
- 5: Marker
- 6:500 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 mutant TREX HELA)
- 7:0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 mutant TREX HELA)

4.6 Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem ile TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Tetrasiklinle regüle edilen sistem ile yabancı tip ile mutant TAF7 over ekspresyonunun apoptozu indüklenme yetileri, kaspaz aktivasyonu ölçülerek karşılaştırıldı. Sonuç olarak TAF7 mutant formunun TREX sisteminde doksisisiklin uygulandıktan 18 saat sonra kaspaz aktivasyonunu yabancı form kadar arttıramadığı gözlemlendi (bkz şekil 31, şekil 32).



Şekil 31: TAF7 ve mutant TAF7 over-ekspresyonunun apoptotik etkisinin Geçici Transfeksiyon yöntemi ile araştırılması



Şekil 32: Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistem İle TAF7 ve Mutant TAF7 Over Ekspresyonunun Kaspaz Aktivasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

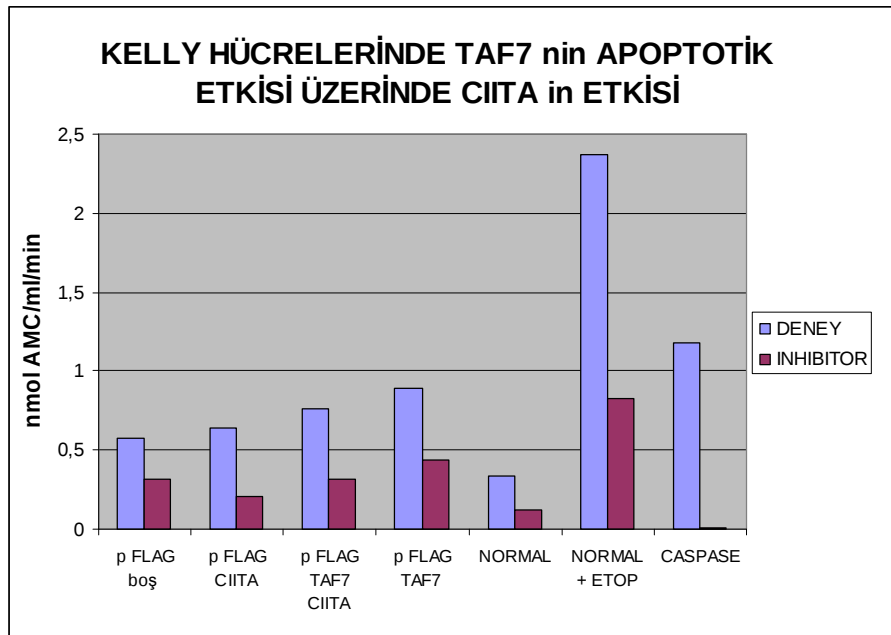
pcDNA 4 TO BOŞ - pcDNA 4 TO MUTANT TAF7 P=0.0239

pcDNA 4 TO BOŞ - pcDNA 4 TO TAF7 P=0.0463

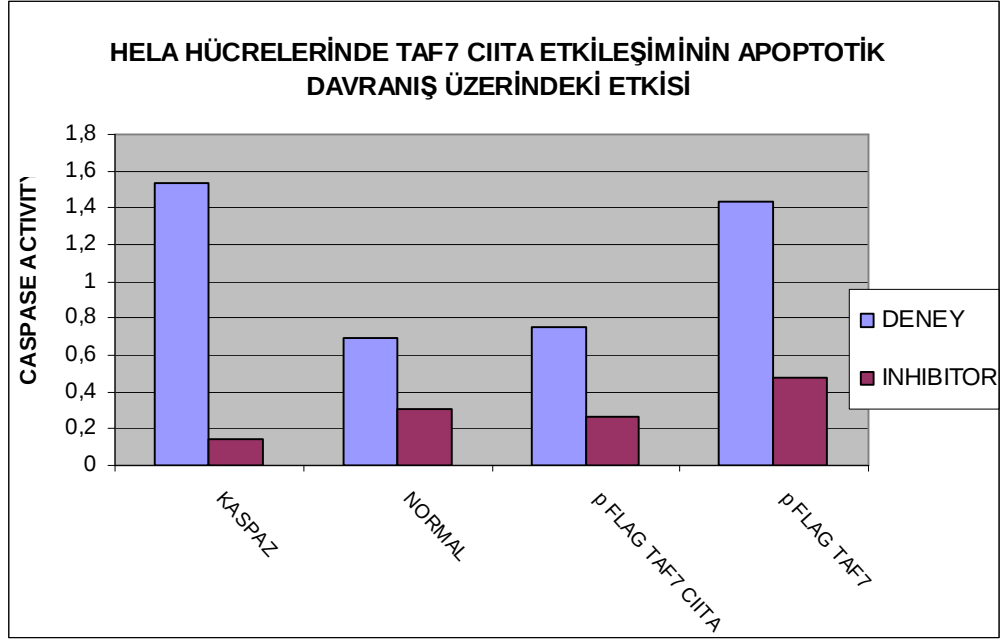
Verilerin anlamlı olup olmadığı Graphpad Student's t test hesaplama aracı ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak p değerleri 0,05'den büyük olduğu için pcDNA 4TO boşa göre pcDNA 4 TO TAF7'nin ve mutant TAF7'nin kaspaz aktivasyonu üzerinde anlamlı düzeyde arttırıcı etkisi olduğu söylenebilir.

4.7 TAF7'nin Apoptozu Tetiklemesi Üzerine CIITA'in Etkisinin Araştırılması:

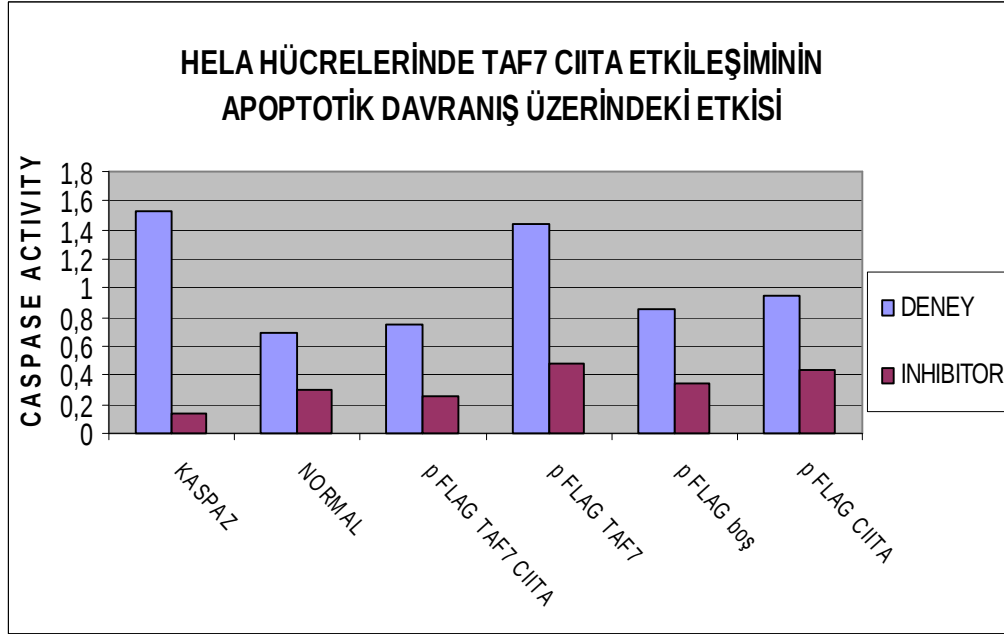
TAF7 overeksprese edildiğinde spontan olarak hücre ölümünü arttırdığını ve TAF7 ile CIITA'in birbirleriyle etkileştiğini (immun presipitasyon deneyleriyle) daha önceki çalışmalarımızda göstermiştik. Bu bulgularımızı göz önünde tutarak, CIITA varlığının TAF7'nin apoptotik etkisini baskılayıp baskılayamayacağını test etmek için kotransfeksiyon deneyleri gerçekleştirdik. Sonuç olarak Kelly hücrelerinde CIITA varlığında TAF7'nin apoptotik etkisinde anlamlı bir azalma izlenmedi (bkz. şekil 33); ancak Hela hücrelerinde -tekrarlayan deneylerde- CIITA varlığında hücrenin TAF7 tarafından tetiklenen ölümden korunabildiği anlamlı olarak gözlemlendi (bkz. şekil 34 ve 35).



Şekil 33: Kelly Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi



Şekil 34: Hela Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi



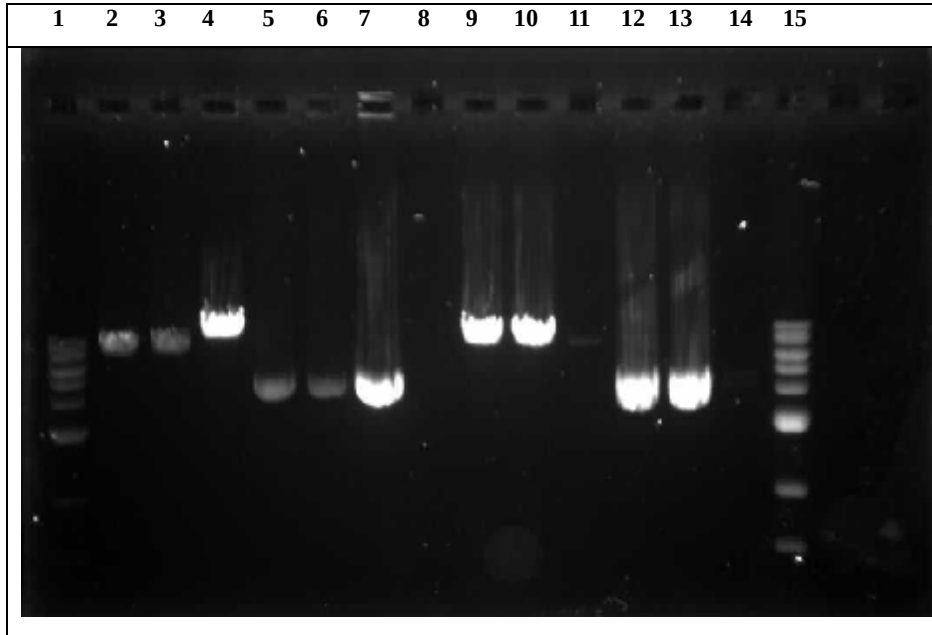
Şekil 35: Hela Hücrelerinde TAF7 CIITA Etkileşiminin Kaspaz 3 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi

4.8 CIITA'IN Mutant Formlarının TAF7'NİN Apoptotik Etkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması:

DSKAD ve D22 - 227 mutant CIITA plazmidlerinin mini-prep ve maxi-prep plazmid izolasyonları:

CIITA in nükleusa tranferi ile ilgili olarak GTP bağlayan domaini mutant olan ve böylece nükleusa transfer olamayan D/SKAD ve daha önce bildirilmiş TAF7 ile bağlanma bölgesi olan ve mutasyonu halinde interaksiyona girmemesine neden olan D22 – 227 mutant plazmidlerinin mini ve maxi prepleri yapıldı.

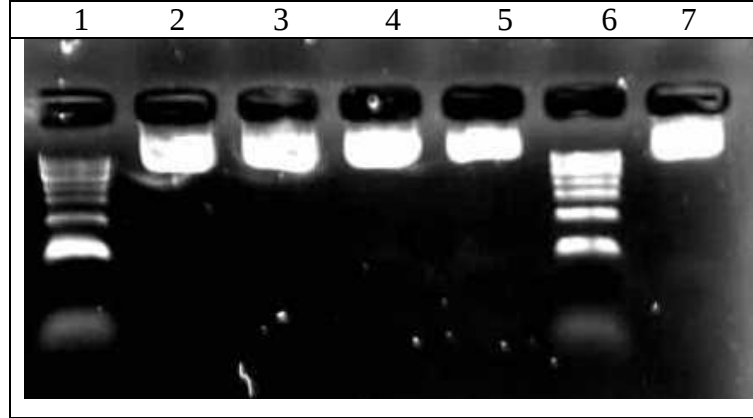
pcDNA plazmid büyüklüğü 5400 bp, DSKAD CIITA insert büyüklüğü 3492 bp, D22-227 insert büyüklüğü 2877 bp, toplam PCDNA D SKAD CIITA plasmidi 8892 bp, pcDNA D22–227 CIITA plasmidi 6369 bp dir (bknz şekil 36, şekil 37).



Şekil 36: Mutant CIITA plazmidlerinin miniprep sonuçları

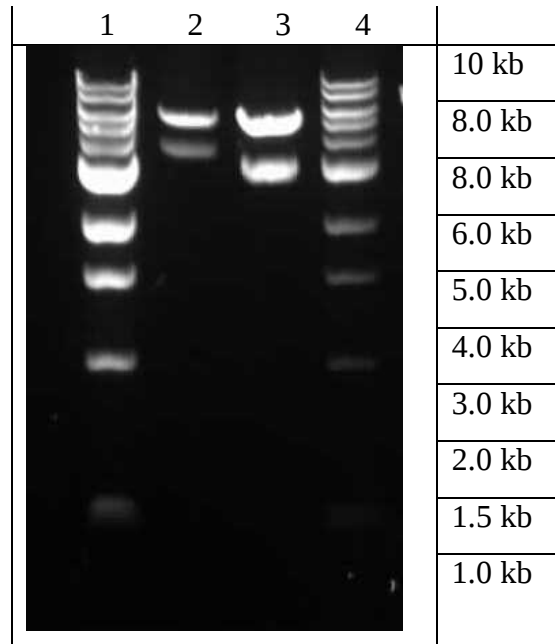
- 1) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S)
- 2) DSKAD 1 CIITA (Xba 1 tek enzim kesimi)
- 3) DSKAD 2 CIITA (Xba 1 tek enzim kesimi)
- 4) DSKAD 4 CIITA (Xba 1 tek enzim kesimi)
- 5) DSKAD 1 CIITA (Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 6) DSKAD 2 CIITA (Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 7) DSKAD 4 CIITA (Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 8) Boş
- 9) D 22 – 227 CIITA 1 (Xba 1 tek enzim kesimi)
- 10) D 22 – 227 CIITA 2(Xba 1 tek enzim kesimi)
- 11) D 22 – 227 CIITA 6 (Xba 1 tek enzim kesimi)

- 12) D 22 – 227 CIITA 1 (Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 13) D 22 – 227 CIITA 2(Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 14) D 22 – 227 CIITA 6 (Xba 1 + Bgl II çift enzim kesimi)
- 15) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S)



Şekil 37: Mutant CIITA plasmidlerinin maxi prep sonuçları

- 1) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S)
- 2) D22 227 CIITA MAXI PREP
- 3) DSKAD CIITA MAX PREP
- 4) D 22 – 227 CIITA MAXI PREP (+4 °C)
- 5) DSKAD CIITA MAX PREP (+4 °C)
- 6) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S)
- 7) PCDNA 4 TO TAF7 MAXI PREP



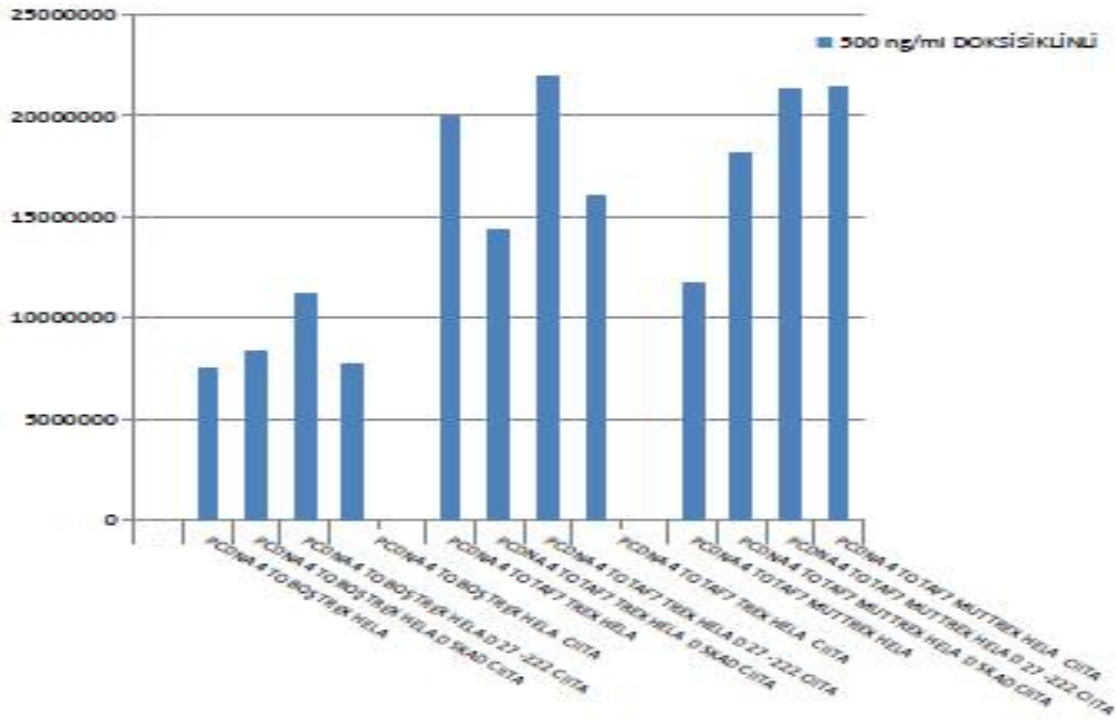
Şekil 38: Maxi prep enzim kesim ürünleri

- 1) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S)

- 2) DSKAD CIITA MAXI PREP ECORI enzim kesimi
- 3) D22 227 CIITA MAX PREP ECORI enzim kesimi (Not 1)
- 4) 1 kb Marker (New England Biolabs - Cat No: #N3232S

TAF7 Over Ekspresyonunun Apoptotik Etkisi Üzerinde CIITA'in Etkisinin Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde Araştırılması:

Bu deneylerde TAF7 transfekte hücrelerde CIITA'in TAF7'ye bağlanmasını engellemeyen DSKAD mutanlığı ve yabancı tip CIITA varlığında, TAF7 over-ekspresyonunun yol açtığı hücre ölümünün baskılandığı izlenirken; TAF7-CIITA etkileşimini engelleyen CIITA D27-222 mutanlığı varlığında hücre ölümünde bir azalma izlenmemektedir. Ayrıca mutant TAF7'nin apoptotik etkisi üzerinde CIITA'in hiçbir formunun baskılayıcı etkisi olmadığı görülmüştür (bkz şekil 39).

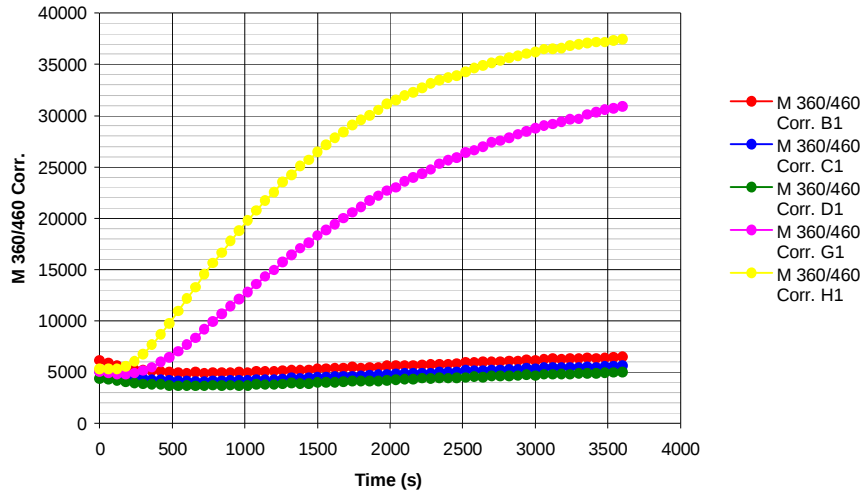


Şekil 39: CIITA mutant formlarının yabancı TAF7 ve mutant TAF7 tarafından tetiklenen hücre ölümü üzerine etkisi. 4.9 TAF7'NİN Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi İle Araştırılması

4.9. TAF7'NİN TUBULİN POLİMERİZASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN IN VITRO TUBULİN POLİMERİZASYON DENEYİ İLE ARAŞTIRILMASI:

4.9.1 Pozitif Kontrol Olarak Kullanılabilecek Paclitaxel Dozunun Optimizasyonu:

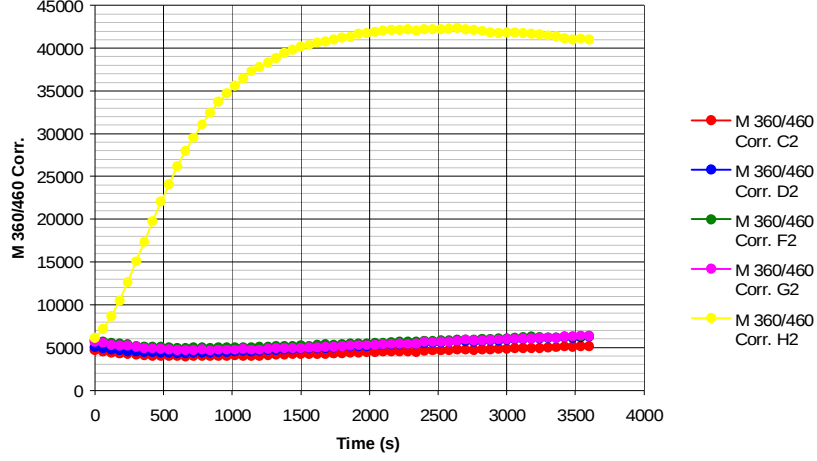
Optimum Paclitaxel dozunun belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda (60, 30, 5 μ M gibi) 10 X paclitaxel solüsyonları hazırlanmıştır. Kontrol olarak kolsemid, DMSO ve Tris tamponu kullanılmıştır. Yöntemde belirtilen şekilde tubulin polimerizasyon deneyi yapılmıştır. Bir saat sonunda şekil 40' da görülen polimerizasyon deseni elde edilmiştir.



Şekil 40: Tubulin polimerizasyon deneyinde pozitif kontrol olarak kullanılacak paclitaxel konsantrasyonunun optimizasyonu. Açıklama: B1: DMSO, C1: 3 mM Tris, D1: 2,7 μ M, E1: 5 μ M Paclitaxel, G1: 30 μ M Paclitaxel, H1: 60 μ M Paclitaxel

Sonuç olarak deneylerde pozitif kontrol olarak 30 μ M konsantrasyonunda paclitaxel kullanılmasına karar verildi.

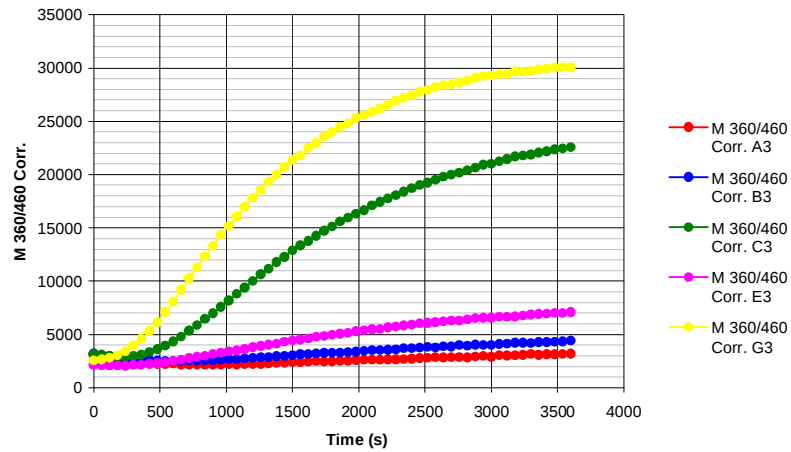
4.9.2 TAF7 nin Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:



Şekil 41: Tubulin polimerizasyonu üzerinde TAF7 nin farklı konsantrasyonun etkisinin Araştırılması. Açıklama: H2 PACLITAXEL - G2 272 NM TAF7 - F2 136 NM TAF7 - D2 81 NM CIITA - C2 2,7 μ M KOLSEMİD

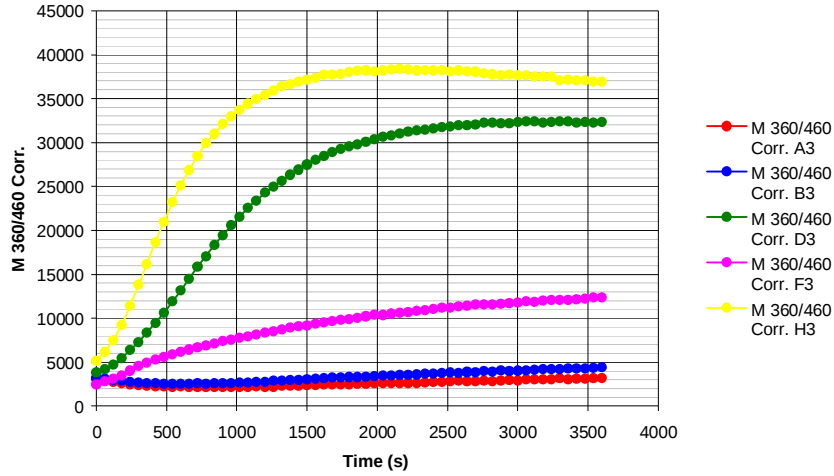
Deney sonucunda TAF7'nin invitro tubulin polimerizasyonu üzerinde bir etkisi olmadığı izlenmektedir (bkz şekil 41).

4.9.3 TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:



Şekil 42: 10 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TAF7'nin etkisinin araştırılması A3 – TRİS TAMPONU, B3 - 10 μ M PACLITAXEL + KOLSEMİD TAF7,

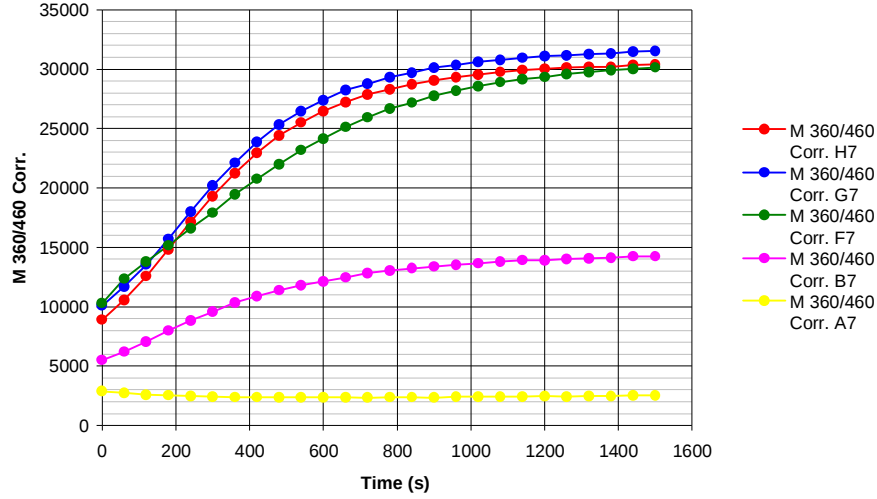
C3 - 10 μ M PACLITAXEL + TAF7, E3 - 10 μ M PACLITAXEL KOLSEMİD, G3 - 10 μ M PACLITAXEL



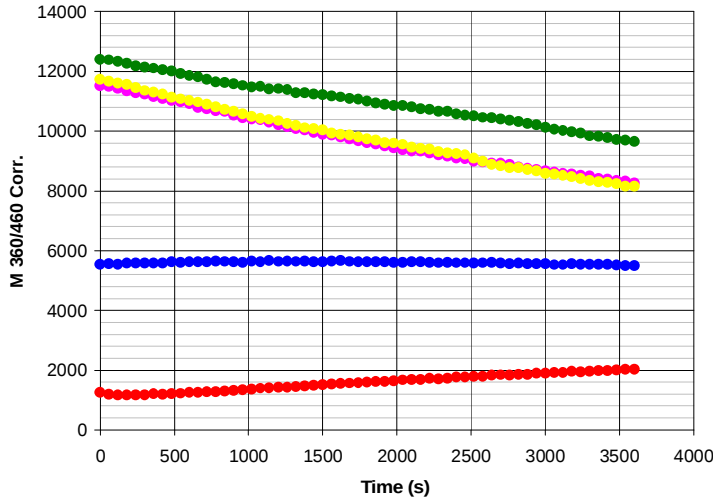
Şekil 43: 30 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TAF7 nin etkisinin araştırılması. A3 – TRİS TAMPONU , B3 - 10 μ M PACLITAXEL + KOLSEMİD TAF7, D3 - 30 μ M PACLITAXEL + TAF7, F3 30 μ M PACLITAXEL KOLSEMİD, H3 30 μ M PACLITAXEL .

Verilerimiz 10 μ M ve 30 μ M paclitaxel eklenen kuyularda, polimerizasyon üzerinde TAF7'nin azaltıcı etkisi olabileceğini desteklemektedir (bkz şekil 43). Bu durum da TAF7 nin polimerize olmayan tubuline bağlanarak polimerize olmasını engellediğini düşündürmektedir. Ancak izlenen bulguların TAF7'ye özgü olduğunu söyleyebilmek için deneyin farklı bir protein varlığında tekrarlanması gerekmektedir. Flüoresan mikroskobu deneylerimizde TAF7'nin over-ekspresyonunun polimerize mikrotubulleri stabilize ettiğini destekleyen veriler elde etmiştik. Bunu da göz önünde bulundurarak TAF7'nin polimerize tubuline de bağlanarak depolimerize olmasını engelleyebileceği düşünüldü.

4.9.4 TAF7'nin Tubulin Polimerizasyonu ve Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

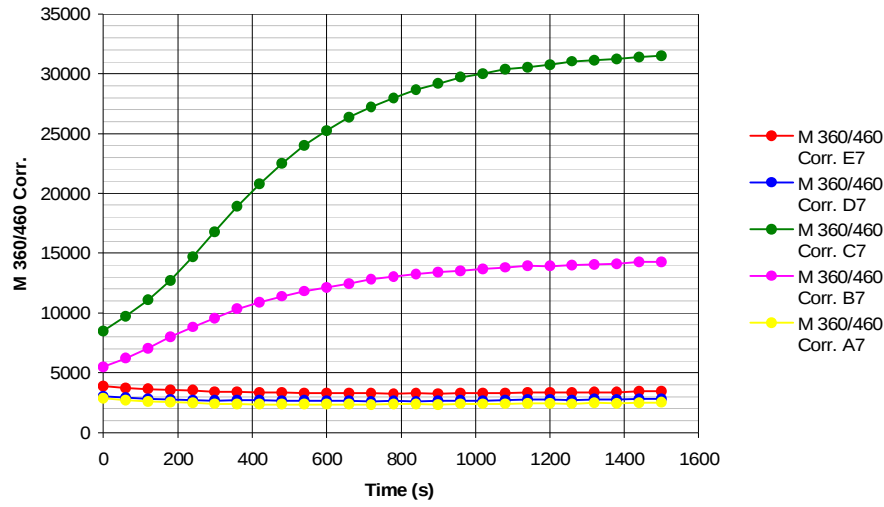


Şekil 44: Polimerize tubulinin depolimerizasyonunda TAF7 nin etkisi (ilk 1600 saniye)

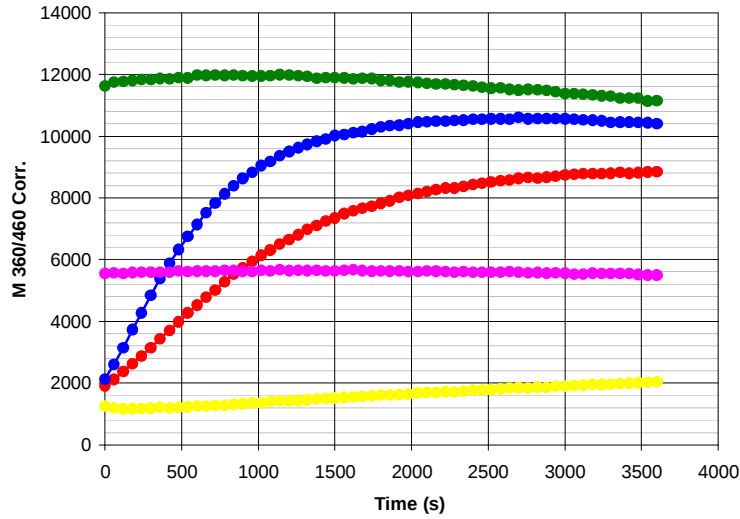


Şekil 45: Polimerize tubulinin depolimerizasyonunda TAF7 nin etkisi (son 1 saat).

H7 Tubulin + Taxol + 1600s. sonra TAF7 + 10 s. sonra Nokadazol; G7 Tubulin + Taxol + 1600 s. sonra Nokadazol; F7 Tubulin Taxol + TAF7 + 1600 s. sonra Nokadazol; B7 Tubulin Taxol +Nokadazol; A7 Tubulin + Tris Tamponu

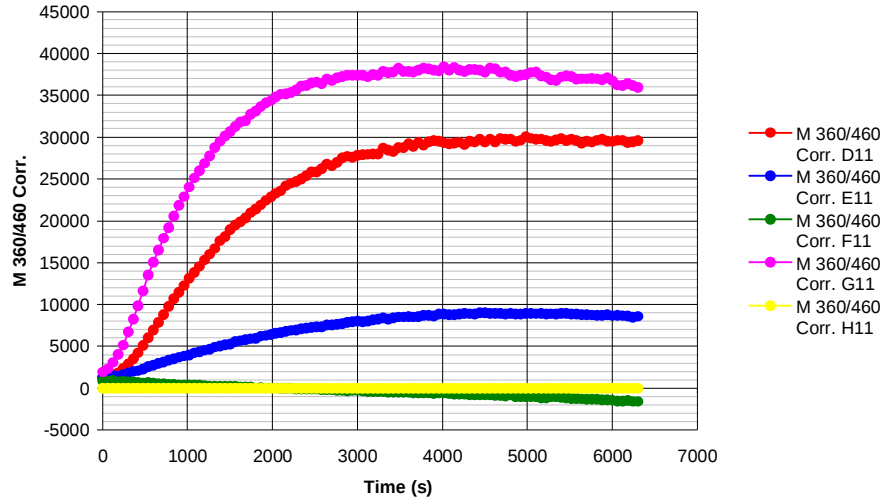


Şekil 46: Tubulin Polimerizasyonu Üzerinde 1600 s. önce eklenmiş olan TAF7 nin etkisi (ilk 1600 s.) E7 Tubulin TAF7 + 1600 s. sonra Taxol; D7 Tubulin + 1600 s. sonra Taxol; C7 Tubulin + Taxol; B7 Tubulin Taxol +Nokadazol; A7 Tubulin + Tris Tamponu

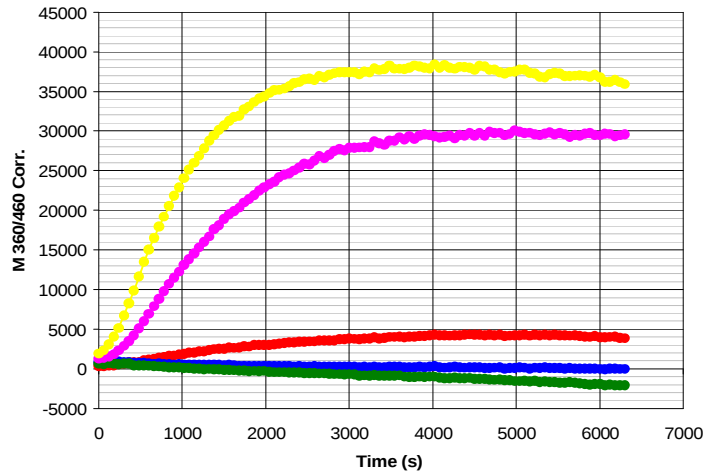


Şekil 47: Tubulin Polimerizasyonu Üzerinde TAF7 nin etkisi (Son 1 saat). E7 Tubulin TAF7 + 1600 s. sonra Taxol; D7 Tubulin + 1600 s. sonra Taxol; C7 Tubulin + Taxol; B7 Tubulin Taxol +Nokadazol; A7 Tubulin + Tris Tamponu

4.9.5 TAF7'nin Tubulin Depolimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin Spesifik Olup Olmadığının Farklı Bir protein (TBP) ile Kontrol Edilmesi:



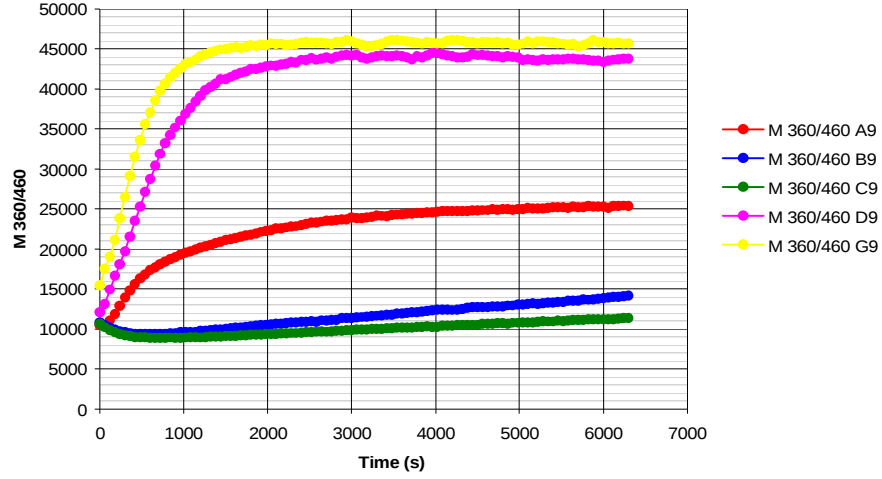
Şekil 48: 30 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP nin etkisinin araştırılması. D 11: TAXOL + TBP ; E11: TAXOL + KOLSEMİD; F11: KOLSEMİD; G11: TAXOL; H 11: TAMPON



Şekil 49: 30 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP nin etkisinin araştırılması A11: TAXOL+ KOLSEMİD+TBP; B11: TBP; C11: KOLSEMİD + TBP; D 11: TAXOL + TBP ; G11: TAXOL

TAF7'nin tubulinin polimerizasyon/depolimerizasyon dinamikleri üzerinde doğrudan bir etkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

4.9.6 BSA 'nın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisi:



Şekil 50: 30 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde TBP'nin etkisinin araştırılması

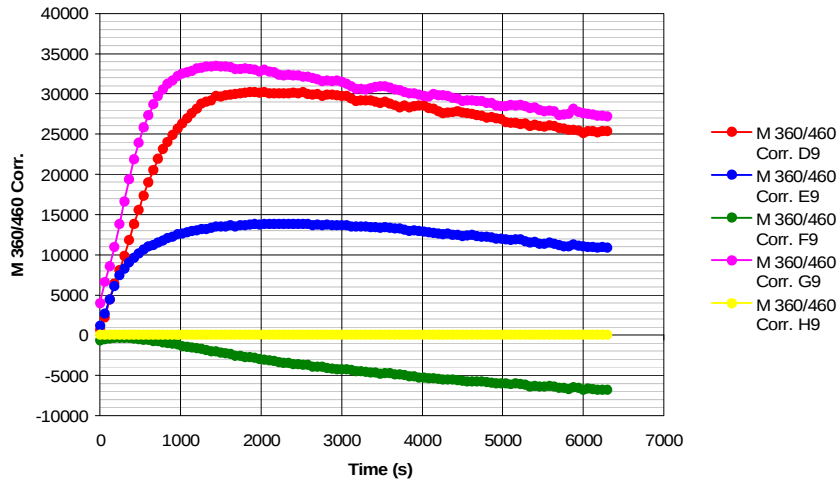
A9: TAXOL+ KOLSEMİD+ BSA

D 9: TAXOL + BSA

B9: BSA

G9: TAXOL

C9: KOLSEMİD + BSA



Şekil 51: 30 μ M Paclitaxel ile polimerize edilen Tubulin üzerinde BSA'nın etkisinin araştırılması

E9: TAXOL + KOLSEMİD

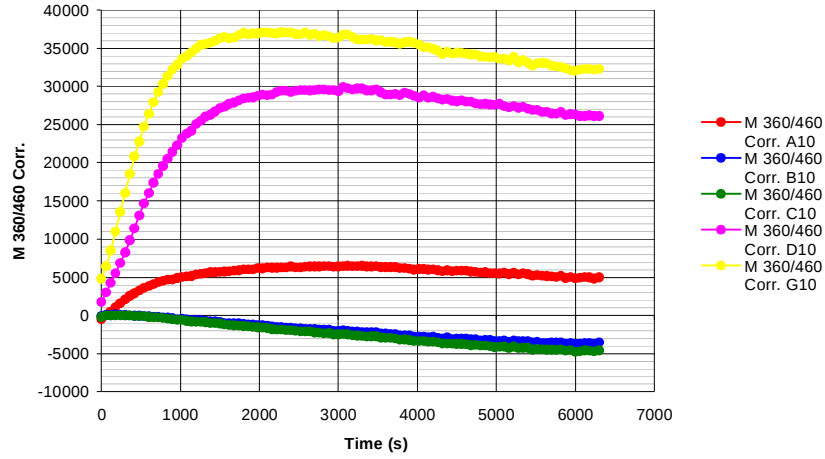
H 9 : TAMPON

F9: KOLSEMİD

G9: TAXOL

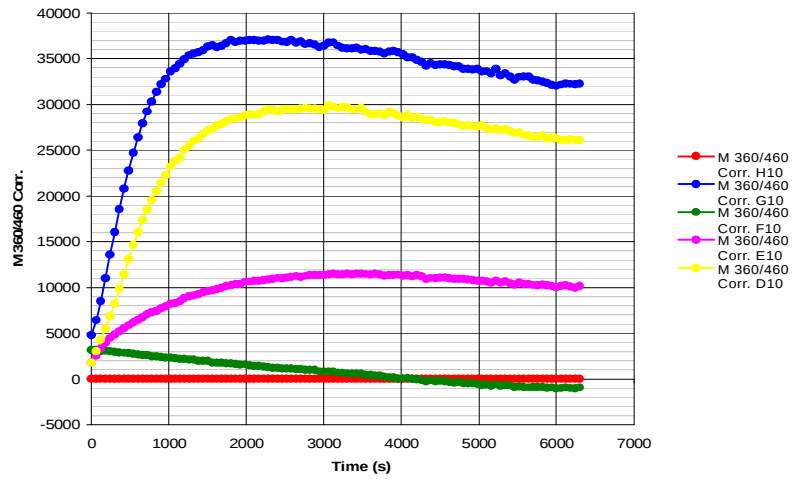
D 9: TAXOL + BSA

4.9.7 HIV TAT'ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin in vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi ile Araştırılması:



A10: TAXOL+ KOLSEMİD+HIV TAT
B10: HIV TAT
C10: KOLSEMİD + HIV TAT
D 10: TAXOL + HIV TAT

E10: TAXOL + KOLSEMİD
F10: KOLSEMİD
G10: TAXOL
H 10: TAMPON

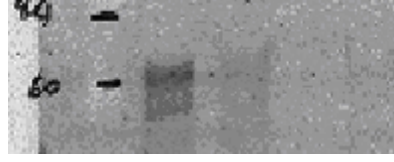


A10: TAXOL+ KOLSEMİD+TBP
B10: HIV TAT
C11: KOLSEMİD + HIV TAT
D 10 : TAXOL + HIV TAT

E10: TAXOL +KOLSEMİD
F10: KOLSEMİD
G10: TAXOL
H 10: TAMPON

Şekil 52: HIV TAT'ın Tubulin Polimerizasyonu Üzerindeki Etkisinin In Vitro Tubulin Polimerizasyon Deneyi ile Araştırılması

4.10 TAF7'nin BETA Tubulin İle İlişkisinin İmmün Presipitasyon Deneyi İle Belirlenmesi



Şekil 53: Beta Tübilin antikoru ile HeLa hücre lizatlarında immün presipitasyon, TAF7 antikoru ile western blot deneyi

Kuyu 1 : Marker

Kuyu 2: PFLAG TAF7 transfecte ve etoposid eklenmiş Hela lizatından Beta tubulin IP

Kuyu 3: PFLAG TAF7 transfecte ve normal Hela lizatından Beta tubulin IP

Kuyu 4:boş;

Kuyu 5: Bead-only control

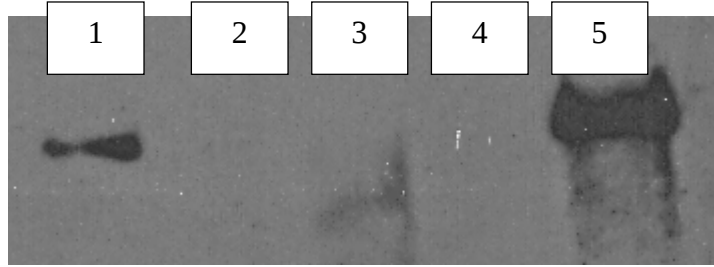
Bu deneyler sonucunda TAF7'nin apoptotik koşullarda hücre içersinde β -tubuline bağlanabildiği gösterilmiştir. Diğer bir ifadeyle nükleer membranın yıkımıyla mikrotubullerle aynı kompartmana geçen TAF7, tubulin ile burada etkileşenilmektedir. TAF7 ile tubulinin direkt olarak etkileşip etkileşmediğinin *in vitro* immün presipitasyon deneyi ile aşağıda gösterilmiştir.

4.11 TAF7'nin Tubulin Proteinleri İle İlişkisinin In Vitro İmmün Presipitasyon Deneyi İle Araştırılması:

In vitro immün presipitasyon saf proteinler kullanılarak, bir protein ile ilişkili olan diğer proteinlerin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Protein A boncuklarına antikor–antijen kompleksinin bağlanabilmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Tubulin polimerizasyon deneyi yapıldıktan sonra Saf TAF7 ve polimerize ve polimerize olmayan tubulin proteinleri içeren welllerdeki karışımlar alınıp 100 μ l lizis tamponu içerisine eklenmiştir. İki saat boyunca immün presipitasyon antikoru olan TAF7 ile inkübe edilip, protein a boncukları üzerine eklenmiştir. Gece boyunca 4 °C de dönmeye bırakılmıştır. Daha sonra Beta tubulin antikoru ile western blot yapılmıştır.

Sonuç olarak “polimerize tubulin + TAF7” ve “monomerik tubulin + TAF7” kuyularında beta tubuline spesifik bant elde edilebilmiştir. Bu da TAF7 ile tubulinin direkt olarak birbiriyle etkileştiğini desteklemektedir. Sadece monomerik tubulin kuyusunda

polimerize tubuline oranla daha güçlü bir sinyal elde edilmiş olması TAF7'nin tubulin monomerlerine bağlanma afinitesinin polimerize tubuline olandan daha fazla olduğunu düşündürmektedir (bkz. şekil 54).

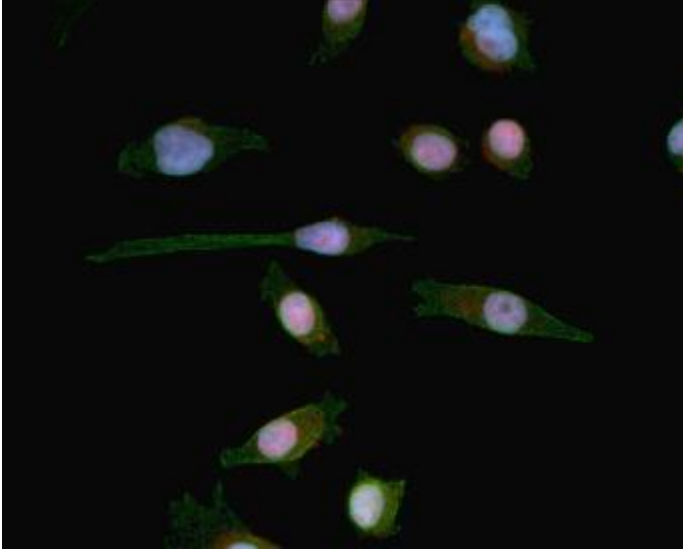


Şekil 54: TAF7 antikoru ile *in vitro* immün presipitasyon, Beta Tübilin antikoru ile wesrern blot deneyi Kuyu 1 : polimerize tubulin + TAF7 ; Kuyu 2: Boş; Kuyu 3: Bead only control; Kuyu 4: Boş; Kuyu 5: monomerik tubulin + TAF7

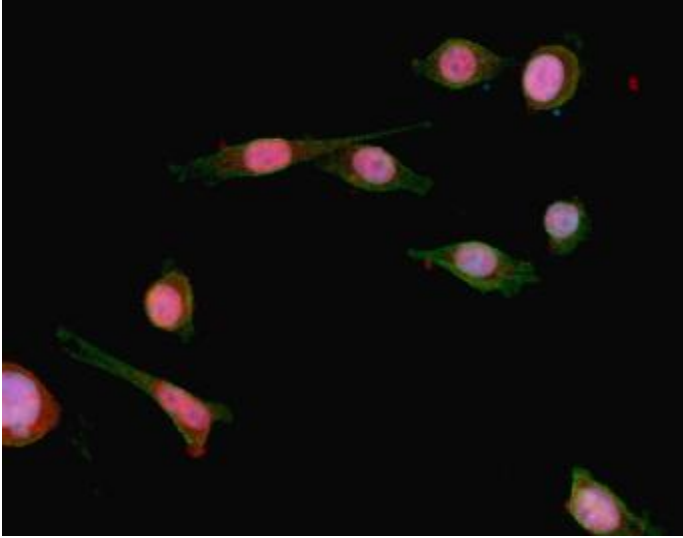
4.12 TAF7 ile Beta Tubulin İlişkisinin Mikroskopi ile Araştırılması

İn vitro tubulin polimerizasyon ve immün presipitasyon deneylerimizde elde ettiğimiz bulgular TAF7 ile tubulin proteinlerinin direkt olarak birbiriyle etkileştiğini desteklemekteydi.

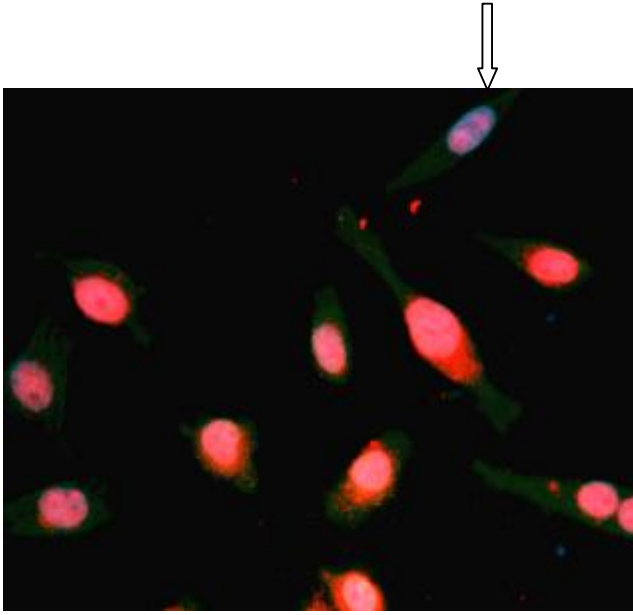
Bu bulguların yanı sıra TAF7 ile tubulin proteinlerinin direkt olarak birbiriyle ilişkili olduğunu bölmümüzde bulunan floresan mikroskopi ile de araştırmayı planladık. Uzun bir süre yöntem optimizasyonu için harcanmakla beraber iyi görüntüler elde etmeye başladık (Şekil 55 ve 56). Bu aşamadan sonra en zorlayıcı çalışma, nükleer bir protein olan TAF7'nin mikrotubullerle etkileşebildiği (aynı hücre kompartmanında bir arada bulunduğu) apoptoz, mitoz gibi süreçlerde hücreleri mikrokopide yakalama ve yüksek kalitede görüntü elde etmedir (şekil 57, 58 ve değerlendirilememektedir). Bu konudaki çalışmalarımız sürmektedir.



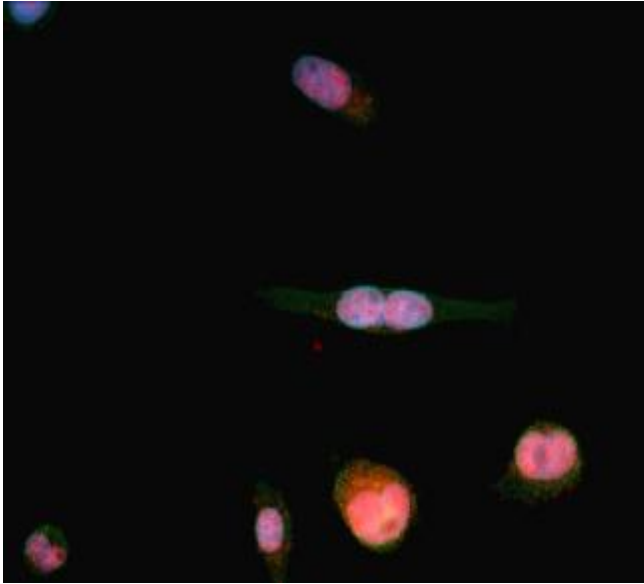
Şekil 55: Doksisiklinsiz TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü



Şekil 56: Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü



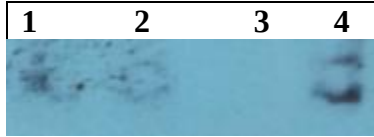
Şekil 57: Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü. Okla mitoz aşamasında hücre gösterilmiştir.



Şekil 58: Doksisiklinli TAF7 (kırmızı) ve Beta Tubulin (yeşil) Boyama Floresan Mikroskopi Görüntüsü. Sitokinez aşamasında hücre görülmektedir.

4.13. TAF7 Over Ekspresyonunun BCL 2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot İle Araştırılması

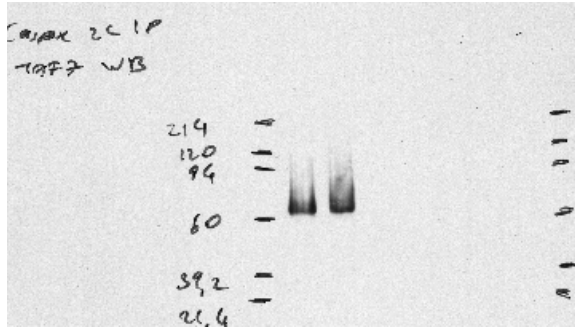
Daha önceki çalışmalarımızda transient transfekte edilen TAF7'nin BCL2 ile etkileşebildiğini göstermiştik. Aynı deneyi tetrasiklinle regüle edilen stabil TAF7 tranfekte hücre hattımızda tekrarladık. Benzer şekilde TAF7'nin BCL2 ile etkileşebildiğini immunpresipitasyon deneyleriyle gösterdik (Şekil 59).



Şekil 59: TREX HeLa Hücrelerinde Doksisiklin Uygulaması ile TAF7 Over Ekspresyonunun BCL2 Üzerindeki Etkisinin Western Blot ile Araştırılması 1: 0 nM Doksisiklin (pcDNA4TO Boş TREX HELA 48); 2: 100 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO Boş TREX HELA); 3: 0 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA); 4: 100 nM Doksisiklin (pcDNA 4 TO TAF7 TREX HELA)

4.14 İmmün Presipitasyon Deneyi İle TAF7 – Caspase 2L Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Hela hücre lizatlarında yapmış olduğumuz immün presipitasyon deneyleri sonucunda, nükleusda (TAF7'nin normal koşullar altında bulunduğu hücresel kompartman) bilinen tek kaspaz olan kaspaz 2 ile TAF7'nin etkileşebildiğini destekleyen bulgular elde ettik (Şekil 60).



Şekil 60: Caspase 2 L IP, TAF7 western blot görüntüsü

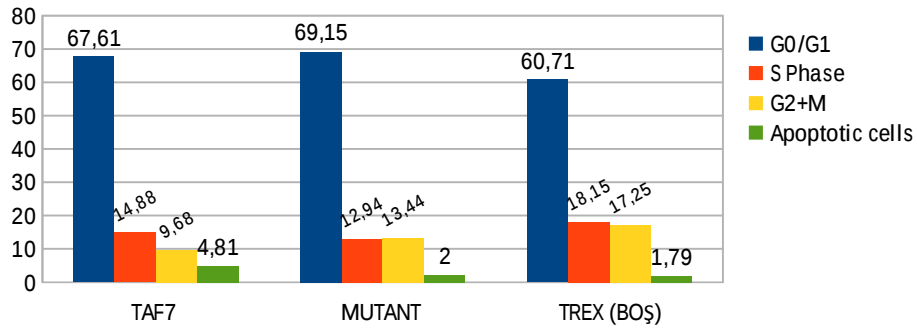
1. Kuyu: Marker
2. Kuyu: Namalwa Normal IP
3. Kuyu: Namalwa Etop. IP
4. Kuyu: Boş
5. Kuyu Bead only control
6. Kuyu: Boş

Sonuç olarak IP bulgumuz (bknz şekil 60) TAF7 ve Kaspaz 2L nin birbiri ile etkileştiğini desteklemektedir.

4.15 Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 ve Ser159 Mutant TAF7'nin Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması:

Pim Pijnappel ve ark. tarafından 24.12.10 tarihinde yayınlanan “Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle” başlıklı makalede TAF7 nin G2/M ve G1/S geçişinde ser 159 amino asitinden fosforillendiği bildirilmiştir. Ayrıca bu fosforilasyon bölgesinin TAF7 nin transkripsiyon aktivatörleri ile etkileştiği bölgesinde (TAF1 interacting domain) yer alması nedeniyle TAF7 nin G2/M geçişinde transkripsiyon blokajında görevli olabileceği de öne sürülmüştür. Biz de bu amino asiti kodlayan kodonu alanine dönüştürerek TAF7 nin ve fosforillenemeyen ser 159 mutant formunun hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmaya karar vermiştik. Bu amaçla TAF7 ve ser 159 mutant TAF7 yi tetrasiklinle regüle edilen sistemde over eksprese ettirip, hücre döngüsü analiz kiti ile etkilerini araştırdık. Ancak yabanıl tip ile mutant TAF7 arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (bknz şekil 61). Burada hücrelerin senkronizasyonunun sorunlu olduğunu belirtmekte fayda vardır. Hela hücreleri senkronizasyonu zor sağlanan bir hücre hattıdır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda 48 ve 72 saatlik senkronizasyon süreleri sonrasında G0 da kalan hücre miktarı %60 den yukarıya çıkartılamamıştır.

TREX HELA HÜCRELERİNDE TAF7 nin VE MUTANT TAF7 nin OVER EKSPRESYONUNUN HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
(24 SAAT SENKRONİZASYON SONRASI 0. SAAT)



Şekil 61: Tetrasiklinle Regüle Edilen Sistemde TAF7 ve Mutant TAF7 Over Ekspresyonunun Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması (24 saat senkronizasyon sonrası)

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan Genom projesi kapsamında insan DNA sekansının belirlenmiş olması, biyoloji ve tıp bilimi için çok büyük öneme sahip olmakla birlikte pek çok probleme tek başına çözüm olmaktan uzaktır. Baz dizilimi artık bilinen genlerin, ekspresyon kontrol mekanizmalarının tanımlanması gerekmektedir. Gen transkripsiyonu büyük ölçüde kendilerine özgü sekans motiflerini tanıyan transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere bağlanması, transkripsiyonda görev alan kompleksleri kendisine çekmesi ve aktive etmesi ile gerçekleşir. Bu transkripsiyon faktörlerinin bazıları proto-onkogen olarak tanımlanan ve onkojenik virüslerde viral homologları bulunan genlerdir. Viral homologları olan genler, hastalık patogenezi ile ilgili araştırmalarda biyolojik açıdan kolaylık sağlamaktadır. Viral homolog incelenerek ökaryotik homologun işlevleri hakkında; ya da tam tersi ökaryotik homolog incelenerek viral homologun enfeksiyon biyolojisindeki olası işlevleri hakkında öngörude bulunulabilir. Ne yazık ki tüm virüs genleri için ökaryotik homologlar bulunmadığından, günümüzde epidemiyolojik açıdan önemli pek çok viral enfeksiyon ile ilgili araştırmalar bu kolaylıktan yararlanamamaktadır. Bu tür enfeksiyonlar arasında HIV enfeksiyonu da bulunmaktadır.

HIV enfeksiyonunun biyoloji ve immunopatogenezi anlamak, terapötik stratejilerin, immunoterapilerin ve profilaktik aşıların geliştirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. Tat proteini HIV gen ekspresyonu için gerekli iki faktörden (tat ve rev) biri olup, temel olarak gen ekspresyonu için transaktivatör işlevi bulunmaktadır. HIV nükleik asidi proviral formda hücre DNA'sına entegre olduktan sonra, provirüsün LTR promotöründe bulunan TAR (transactivation responsive region) elementine bağlanarak transkripsiyonel inisiyasyon ve elongasyonu etkinleştirdiği gösterilmiştir. Bu işlemleri gerçekleştirebilmek için hücre proteinleriyle etkileşime girer ve konak hücrenin transkripsiyonel düzeneğini kullanır. Tat'ın elongasyon uyarımı ile ilgili daha fazla bilgiye sahibiz. Tat'ın siklin T ve cdk9'dan oluşmuş bir elongasyon faktörü olan P-TEFb, TAR ve yine elongasyonda rol oynayan Brd4 proteinleriyle doğrudan etkileşime girerek RNA polimeraz II'in C-terminal bölgesinin hiperforforilasyonunu tetikleyerek transkripsiyon inisiyasyonunu ve elongasyon devamını uyardığı gösterilmiştir. Elongasyonun yanı sıra Tat'ın pre-inisiyasyon kompleksinin (PIC) oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir. Tat'ın PIC yapısında yer alan TBP (TATA bağlayan protein), TATA kutusu, Sp1, TFIIH gibi moleküllerle; siklin E/cdk2 'le ve CBP/p300, p/CAF gibi koaktivatör ve kromatin modelleme kompleksleriyle doğrudan etkileştiği gösterilmiştir.

Ayrıca Tat histon asetilazları da PIC'e çağırarak, transkripsiyon daha başlamadan özel nükleozomal bölgelerde H3 ve H4 lizin asetilasyonunun gerçekleşmesinden de sorumludur.

Transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra Tat'ın çeşitli hücrel genleri transkripsiyonel düzeyde baskılama (represyon) işlevi de olduğu bugün bilinmektedir. Bu işlevi, ilgili genlerin PIC yapı ve kompozisyonlarını bozarak gerçekleştirmektedir. Örneğin MHC sınıf I genlerinin bazal ekspresyonu PIC yapısında işlevsel bir TAF1 (TBP asosiye faktör 1) molekülünün varlığına bağlıdır. Tat TAF1'e bağlanarak bu moleküle ait asetiltransferaz aktivitesini ortadan kaldırabilmekte ve bu yolla MHC sınıf I ekspresyonunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak Tat proteini gerek proviral gerekse hücrel genlerin, kromatin modifikasyonları, transkripsiyonel inisiyasyon, elongasyon ve transkripsiyonel baskılanma dahil neredeyse genetik regülasyonun tüm süreçlerinde etkili olmaktadır. Ancak Tat proteininin etkileri sadece transkripsiyonel transaktivasyon ile sınırlı değildir. HIV enfeksiyonunun çok belirgin bir özelliği olan hücre ölümünde Tat proteinin de rolüne değinmek gerekmektedir.

HIV enfeksiyonu CD4 T hücrelerinin apoptoz yoluyla progresif kaybı ile karakterizedir. Bu progresif kayıp sadece virüs ile enfekte hücrelerde değil, enfekte olmayan hücreler içinde geçerlidir. Özellikle virüs ile enfekte olmayan hücrelerin apoptoz yoluyla kaybindan HIV Tat proteininin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tat proteininin bir diğer özelliği de hücre dışına sekrete olası ve komşu hücreler tarafından içe alınabilmesidir. Virüsle enfekte olmayan hücrelerin bu ekstraselüler Tat proteinini kendi içlerine almaları pek çok farklı yolla apoptoz sürecinin uyarılmasına neden olur. Tat proteininin apoptotik süreçleri uyurabildiği bilinen mekanizmalar arasında, Fas ligandının artmış ekspresyonunu uyarmak, çeşitli sitokinleri kodlayan genlerin uyarılması veya baskılanması, Bcl-2 gibi hücre yaşam faktörlerinin ifadesinin uyarılması, manganez bağımlı süperoksit dismutaz ve p53 ekspresyonunun baskılanması ve CDK aktivasyonu sayılabilir.

Araştırmamıza konu olması nedeniyle özellikle üzerinde durmak istediğimiz bir mekanizma da Tat proteininin hücre mikrotübül polimerizasyonunu etkileyerek apoptozu tetiklemesidir. Mikrotübüller tubulin polimerlerinden oluşmuş, hücrel morfoloji, hücre içi organel yapı ve yerleşimi, mitoz sırasında kromozom göçü, hücre farklılaşması ve hücre içi transportta rol oynayan hücre iskelet yapılarıdır. Bu denli çok ve önemli işlevleri olan mikrotübül yapısının bozulması, hücrede apoptozu tetiklemektedir. Mikrotübül yapısını bozan ajanlar (MDA-microtubul damaging agents) etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılmaktadır: taxanlar gibi mikrotübül stabilizasyon ajanları ve vinca alkaloidleri gibi

mikrotübül depolarizasyon ajanları. MDA'lar hücre içi mikrotübül dinamiklerini bozduklarından programlanmış hücre ölümüne yol açarlar ve bu özellikleri nedeniyle de çeşitli kanserlerde tedavi amaçlı kullanım alanları bulunmaktadır.

HIV Tat proteininin hücre mikrotübüllerine bağlandığı ve stabilize edici MDA'lar benzeri bir etki göstererek hücre mikrotübül dinamiğini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikrotübüllere bağlandıktan sonra pro-apoptotik Bcl-2 aile üyeleriyle doğrudan etkileştiği ve intrinsik mitokondrial apoptoz yolağını uyardığı bulgulanmıştır. Yine bir diğer çalışma Tat'ın, bir mikrotübül ilişkili (asosiye) protein (MAP) olan ve mikrotübül dinamiklerinde düzenleyici protein kabul edilen, mutasyonlarının lisensefaliye yol açtığı bilinen LIS1 fosfoproteini ile hücre içinde doğrudan etkileşebildiği bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalar HIV enfeksiyonunda özellikle enfekte olmamış hücrelerde gözlenen artmış hücre ölümünün bir nedeninin de ekstrasellüler ortama salgılanan Tat proteini olduğunu ortaya koymaktadır.

HIV Tat immun hücrelerde apoptozu indükleyebildiği gibi, baskılanmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. Viral replikasyonun gerçekleşebilmesi için enfekte hücrenin özellikle interferon uyarısının tetiklediği apoptozdan kaçabilmesi gerekmektedir. Bu aşamada da Tat'ın bağışık yanıt sürecinde rol oynayan kimi genleri baskılayarak bunu sağladığı düşünülmektedir. Özellikle CIITA olan etkileşimi, hücre içi miktarlarının dengesi bu konuda önemli rol oynamaktadır.

Yukarıda HIV Tat'ın bazı genlerin transkripsiyonel düzeyde baskılanmasından sorumlu olduğunu bahsetmiştik. HIV Tat'ın bu baskılayıcı etkisinin en detaylı tanımlandığı gen MHC sınıf I genidir. MHC sınıf I geninin bazal ekspresyonu PIC'de TAF1'in (eski adıyla TAFII250) bulunmasını gerektirmektedir. TAF1 asetiltransferaz ve kinaz işlevlerine sahip bir moleküldür. Kinaz işlevinin substratı halen bilinmemekle beraber asetilaz özelliğiyle histon ve PIC'de bulunan diğer proteinlerin asetilasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. HIV Tat TAF1'e doğrudan bağlanarak asetilaz özelliğini baskıladığı ve MHC sınıf I geninin TAF1'e bağımlı bazal transkripsiyonunu engellediği gösterilmiştir. Buna ek olarak P-TEFb ile etkileşerek proviral elongasyonu tetiklediği bildirilmiştir. Benzer özellikler gösterebilen, TAF1'e bağlanarak asetiltransferaz özelliğini baskılayabilen, P-TEF ile etkileşerek elongasyonda rol oynayan ve PIC'de bulunan proteinler ile Tat'a benzer şekilde ilişki kuran tek bir ökaryotik gen bilinmektedir: TAF7 (eski adıyla TAFII55).

Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için GTF'lerin promotöre bağlanması gerekmektedir. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. TFIID,

TBP'den (TATA binding protein) ve TAF'lerden (TBP associated faktör) oluşmaktadır. İnsan genomundaki genlerin sadece %30'unun promotöründe "TATA" kutusu bulunmaktadır. "TATA" kutusu bulunmayan promotör bölgelerinde önemli başka bir sekans elementi olan initiator (Inr) sekansı bulunur. TATA kutusu içermeyen fakat Inr dizisi bulunan promotörlerin çoğunda ayrıca DPE (downstream promoter element) elementi de bulunmaktadır. DPE yaklaşık olarak transkripsiyon başlama bölgesinden 30 bp aşağıda yer alır. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFTC'in (TBP free TAF containing complex) TFIID'in yerini aldığı invitro koşullarda gösterilmiştir. TBP olsun veya olmasın her promotörün kendine has bir TAF kompleksi oluşturduğu, gene özgü olan bu kompleks oluşumunun transkripsiyonun ön koşulu olduğu bugün bilinmektedir. Pek çok farklı TAF'lerden biri de TAF7'dir.

Literatürde TAF7 ile ilgili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bir tarama yapıldığı takdirde içinde TAF7 geçen toplam 20 makale çıkmaktadır (testis-spesifik TAF7L geni ile karıştırılmamalı). Bunların çoğu TFIID kompleksinin farklı ökaryotlardaki yapısını ve diğer TAF'ler ile olan ilişkileri kapsayan çalışmalardır. İki TAF7 promotörü ve ekspresyonu ile ilgili olup protein fonksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili ancak 4 makale bulunmaktadır. Bunlardan biri TAF7'nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde TAF1'i (TAFII250'yi) bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürmektedir. Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAF1 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir. Ayrıca HIV Tat proteini gibi elongasyon faktörü P-TEFb ile etkileşerek elongasyonu desteklemektedir. Özetle TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat'ın aksine programlanmış hücre ölümünde bir rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

TAF7'nin apoptoz sürecinde bir rolü olabileceğine ait tek bir yayın bulunmaktadır. 2004 yılında Fukuchi ve arkadaşları TAF7'nin poliamin transport aktivitesini düzenleyerek poliamin analogları ile indüklenen apoptozda rol oynadığını ileri süren bir çalışma yayınladılar. Bu çalışma kapsamında poliamin transport aktivitesinde rol oynayan genleri tanımlayabilmek amacıyla öncelikle MGBG (methylglyoxal bisguanylhidrazone) dirençli CHO hücreleri oluşturulmuştur. MGBG, bir poliamin transport inhibitörü ve hücrelere eklenmesi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. MGBG dirençli hücrelerde retroviral gen tuzağı (retroviral gene trap) metoduyla direncin oluşumunu sağlayan gen, bu

çalışmada TAF7 olarak tanımlanmıştır. Yazarlar verilerini TAF7'nin poliamin transportunda düzenleyici olarak rol aldığı ve bu yolla indüklenen programlanmış hücre ölümünde işlevi olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ancak bu çalışmadaki verileri farklı yorumlamak mümkündür ve TAF7'nin apoptozda rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kullanılan yöntem, hangi genin ekspresyon kaybında MGBG'ye karşı direnç geliştiğini saptamaya yöneliktir. Sonuç olarak da TAF7 ekspresyon kaybında MGBG ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Eğer TAF7 apoptoz yolağında görev alıyorsa, yokluğu bu yolaktaki ardışık sinyal iletiminde bir duraklamaya yol açarak direnç gelişimine neden olacaktır. Diğer bir ifadeyle gözlenmiş olan apoptoza karşı direnç, TAF7 poliamin transport yolunda rol oynadığı için değil, genel olarak programlanmış hücre ölümünde bir fonksiyonu varsa da gözlenebilir.

Apoptotik süreçte hücre iskelet elemanlarının önemli rol oynadıkları uzun zamandan beri bilinmektedir. Ancak bu süreçte özellikle aktin-miyosin filamanlarının oynadıkları rol üzerinde durulmuş ve mikrotübüllerin önemli bir rol oynamadıkları kabul edilmiştir. Bunun başlıca nedeni pek çok hücre hattında mikrotübül yapılarının apoptozun erken evrelerinde parçalandığının bildirilmiş olmasıdır. Ancak son yıllarda özellikle bazı epitelial ve hematolojik hücre hatlarında yeni ve farklı bir organizasyona sahip mikrotübüllerin apoptozun geç evrelerinde tekrar oluştukları bildirilmiştir. Bu yeni oluşan mikrotübül elemanlarının mitotik iğ yapılanmasından, perisentrioler yapı ve moleküllerinden (perisentrin, γ -tubulin, ninein gibi) bağımsız oldukları ileri sürülmüştür. Bu yapıların apoptozun geç evrelerinde, hücre yüzeyine apoptotik kargo transportunda ve hücre membran "blebbing"inde rol oynadıkları düşünülmektedir. Önceki ve tamamlanmakta olan projelerimizden elde etmiş olduğumuz veriler ışında oluşturmuş olduğumuz modelde: Apoptozun erken evrelerinde gerçekleşen nükleer zarf yıkımından sonra çekirdek içeriğinin sitoplazmaya geçmesiyle, TAF7, burada bulunan tubulin molekülleriyle etkileşerek tubulin polimerizasyonunun tetiklenmesinde ve sentrioler yapıdan bağımsız yeni bir mikrotübül ağının oluşumunda rol oynamaktadır.

Kolaborasyonda bulunduğumuz Singer Laboratuvarının elde ettiği veriler TAF7 ile CIITA proteininin hücre içinde ilişkide olduğunu, TAF7 CIITA transaktivasyonunun negatif düzenleyicisi olduğunu göstermektedir ("TAF7 is a negative regulator of CIITA mediated transcriptional activation" Devaiah N. Ballachanda, Anne Gegonne, Zeynep Sercan, Hanxin Lu and Dinah S. Singer J Biol Chem. 2010 285(50):38772-80). Bu proje kapsamında yapmış

olduğumuz deneyler CIITA'nın TAF7'nin apoptotik etkisini baskılayabildiğini (önceki çalışmalarımız ve bu proje ile elde edilmiş veriler) göstermiştir. Daha önceki çalışmalarımızda TAF7'nin programlanmış hücre ölümünde rol oynayabildiğini düşündüren bulgular elde ettik. Bu proje kapsamında bu bulgularımızı doğruladık ve bunlara ek olarak TAF7'nin BCL-2, kaspaz2 gibi apoptotik proteinlerle doğrudan etkileştiğini gösterdik. Pijnappel ve ark. 2010 makalelerinde TAF7'nin hücre döngüsü kontrol noktalarında (G1/S, G2/M) fosforillendiğini gösterdiler. Proje kapsamında site-directed mutagenез ile TAF7'nin fosforilasyon mutantını oluşturduk ve tetrasiklin regüle sisteme stabil transfekte ettik. Mutant formun hücre ölümünü indüklemeye yabancı TAF7 kadar etkili olmadığını gösterdik. Bu bulgular son 1-2 yıla kadar bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIID'in yapısal bir komponenti olarak kabul edilen TAF7'nin hücre döngüsüne bağlı olarak bir regülasyona tabi olduğunu; modifiye olup olmamasına bağlı olarak farklı etkinliğe sahip olduğunu düşündürmektedir.

Bunlara ek olarak TAF7 ekspresyonunun indüklediği apoptozun CIITA varlığında baskılanabileceğini gösterdik. CIITA mutantlarının kullanıldığı deneylerde bu etkinin oldukça spesifik olduğunu gösterdik. Bu gözlem bağışıklık sistemi için önemlidir. T hücrelerinin aktivasyonu için antijenin, doku uyumluluk molekülü tarafından kendilerine sunulması gerekmektedir. Özellikle viral enfeksiyonlarda aktive olan interferon salgısı CIITA ekspresyonunu tetiklemekte; kendisi de bir transkripsiyonel trans-aktivatör olan CIITA de enfekte hücrenin sınıf I ve sınıf II doku uyumluluk (MHC) moleküllerinin ifadesini arttırmaktadır. Özellikle sınıf II moleküllerinin ekspresyonu için CIITA gereklidir. Bağışıklık sisteminin bu önemli molekülünün, TAF7 ile olan etkileşiminin niteliği ve bu etkileşiminin hücre ölümüne olan etkisinin açığa kavuşturulması, immün sistem biyolojisi açısından önem kazanmaktadır. Bu yönde elde edilecek tüm verilerin bağışık yanıtın oluşması, immün hücrelerin gelişimi (pozitif ve negatif seleksiyon), HIV biyolojisi gibi çok geniş alanlarda etkisi olabilir. Örneğin bir virüs ile enfekte bir hücrede interferon tarafından indüklenecek CIITA ekspresyonu sonucunda, CIITA'nın TAF7'yi bağlayarak hücrenin hemen apoptoza girmesini önlediği böylece gereken immün yanıt (MHC sınıf I ve II'de antijen sunumu) zaman kazandırdığı öne sürülebilir.

Sonuç olarak TAF7'nin HIV-Tat'la benzer şekilde yüksek düzeydeki ekspresyonunun neden olduğu spontan hücre ölümünün CIITA varlığında baskılandığını destekleyen bulgular elde edildi. TAF7'nin çok sıkı regüle edilen ökaryotik bir gen olması, projemiz kapsamında

protein düzeyinde de regülasyonunun olabileceğini destekleyen bulguların varlığı nedeniyle immünolojik süreçlerde özellikle lenfositik klonal genişleme mekanizmalarında rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR:

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. Science 1983, 220: 868-71
2. Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. N Engl J Med 1984, 311:1292- 7.
3. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984, 224: 500-
4. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 1986, 233: 343.
5. HIV Medicine 2006 (www.HIVMedicine.com) ed. C. Hoffmann, JK. Rockstroh, BS Kamps 2006 by Flying Publisher – Paris, Cagliari, Wuppertal
6. Hacettepe Üniversitesi HIV / AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi, <http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/klinik.shtml>
7. Dalgleish AG, Beverly PCL, et al. The CD4 antigen is an essential component of the receptor for HIV. Nature 1984, 312: 763-6.
8. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya S, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP- 1a, and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science 1995, 270:1811-5.
9. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature 1996, 381: 661-6.
10. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. Nature 1996, 381: 667-73.
11. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science 1996, 272: 872-7.

12. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the green light on transcription initiation. *Retrovirology*, 2005;2:69.
13. Pumfery A, Deng L, Maddukuri A et al. Chromatin remodelling and modification during HIV-1 Tat activated transcription. *Curr HIV Res* 2003, 1:261-274
14. Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. Analyses of arginine rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* 1991;5:201-210.
15. Marshall NF, Price DH. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase Ii elongation complexes. *Mol Cell Biol* 1992;12:2078-2090
16. Jang MK, Mochizuki K, Zhou M et al. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II dependent transcription. *Mol Cell* 2005;19:523-534.
17. Jeang KT, Chun R, Lin NH et al. In vitro and in vivo binding of HIV-1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol*, 1994;68:561-565.
18. Majello B, Napolitano G, Lania L. Recruitment of the TATA binding protein to the HIV-1 promoter is a limiting step for Tat transactivation. *AIDS*, 1998;12:1957-1964.
19. Deng L, Ammosova T, Pumfery A et al. HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain and a dynamic association with CDK2 inducedCTD phosphorylation and transcription from the HIV-1 promoter. *J Biol Chem*, 2002;277:33922-33929.
20. Garcia-martinez LF, Mavankal G, Neveu JM et al. Purification of a Tat associated kinase reveals a TFIIHG complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J*, 1997;16:2836-2850.
21. Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. HIV-1 transactivator recruits p300 and CREB binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:13519-13524.
22. Benkirane M, Chun RF, Xiao H et al. Activation of integrated provirus requires histon acetyltransferases p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J boil Chem*

1998;273:24898-24905.

23. Brown JA, Howcroft TK, Singer DS. HIV Tat protein requirements for transactivation and repression of transcription are separable. *J Acquir Immune Defic Syndr hum Retrovirol* 1998;3:127-138.

24. Wiessman JD, Brown JA, Howcroft TK et al. HIV-1 Tat binds TAFII250 and represses TAFII250 dependent transcription of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11601-11606.

25. Weiss RA. How does HIV cause AIDS? *Science* 1993;260:1273-1279.

26. Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 1999;274:28837-28840.

27. Westendrop MO, Frank R, Ochsenbauer C et al. Sensitization of T cells to CD95 mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995;375:497-500.

28. Westendrop MO, Li-Weber M, Frank WR, Krammer KH. HIV-1 Tat upregulates interleukin 2 secretion in activated T cells. *J Virol* 1994;68:4177-4185.

29. Wang Z, Morris GF, Reed JC et al. Activation of Bcl-2 promoter directed gene expression by the HIV-1 Tat protein *Virology* 1999;257:502-510.

30. Flores SC, Marecki JC, Harper KP et al. Tat protein of HIV-1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1993;90:7632-7636.

31. Li CJ, Wang C, Friedman DJ et al. Reciprocal modulations between p53 and Tat of HIV-1. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1995;92:5461-5464.

32. Li CJ, Friedman DJ, Wang C et al. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995;268:429-431.

33. de Mareuil J, Carre M, Barbier P et al. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology* 2005;2:5

34. Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the proapoptotic BCL-2 relative Bim. *EMBO J* 2002;21:6801-6810.
35. Epie N, Ammosova T, Sapir T et al. HIV-1 Tat interacts with LIS1 protein. *Retrovirology* 2005;2:6
36. Gegonne A, Weissman JD, Singer DS. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998;98:12432-12437.
37. Gegonne A, Weissman JD, Zhou M et al. TAF7: A possible transcription initiation checkpoint regulator. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2006;103:602-607.
38. Okamoto H, Asamitu K, Nishimura H et al. Reciprocal modulation of transcriptional activities between HIV-1 Tat and MHC class I transactivator CIITA. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;279:494-499.
39. Raval A, Howcroft TK, Weissman JS et al. Transcriptional coactivator CIITA is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAFII250. *Mol Cell* 2001;7:105-115.
40. Howcroft TK, Raval A, Weissman JS et al. Distinct transcriptional pathways regulate basal and activated MHC class I expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:3377-3391.
41. Cooper G, Hausman R. *The Cell*, Third Edition, Washington DC, ASM Press, 2004; 231, 260.
42. Brown T. A. *Genomes 2*, Second Edition, New York, John Wiley & Sons Inc., 2002;171-195.
43. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts, K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, New York, Garland Science, 2002.
44. Gegonne A, Weissman JD, Singer DS. TAFII55 binding to TAFII250 inhibits its acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12432-7.
45. Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Nishimura K, Igarashi K, Liao S. TATA-binding protein-associated factor 7 regulates polyamine transport activity and polyamine analog-induced

apoptosis. J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):29921-9.

46. Luguan W, Forest YM. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. Bioinformatics, 2004;20:1818-1820.

47. Kloet SL, Whiting JL, Gafken P, Ranish J, Wang EH, Phosphorylation-Dependent Regulation of Cyclin D1 and Cyclin A Gene Transcription by TFIID Subunits TAF1 and TAF7, Mol Cell Biol. 2012 Aug;32(16):3358-69.

48. [https://catalog.invitrogen.com/index.cfm](https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iprotocol.viewunit&ip_wf=mb2601&ip_wsf=sect1.html)
fuseaction=iprotocol.viewunit&ip_wf=mb2601&ip_wsf=sect1.html

49. <http://www.ambion.com/techlib/presentations/ExpVectors.pdf>

50. <http://www.theses.ulaval.ca/2003/21404/ch03.html#d0e2100>

51. Dharmacon, Applications Handbook and Catalog, 2005/2006.

52. Shi, Y. Mammalian RNAi for the masses. TRENDS in Genetics. 2003 Jan 19 (1): 9 – 12.

53. Kim N. RNA Interference in Functional Genomics and Medicine. J Korean Med. Sci 2003; 18: 309-18.

54. Tricia R. Doering C. And Doering L. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. TRENDS in Microbiology. 2003 Jan.; Vol 11: 37 – 43.

55. Diallo M., Arenz C., Schimits K., Sandhoff K. And Schepers , Long Endogenous dsRNAs can induce complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures. OLIGONUCLEOTIDES, 2003; 13:381 – 392.

56. Nawrot B. Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids – a future for Alzheimer's disease therapy. Acta Biochimica Polonica. 2004; Vol 52, No. 2: 431 -444.

57. Molecular Cell Biology. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman; 2000

58.<http://en.wikipedia.org/wiki/MHCClassII#Function>

59.<http://en.wikipedia.org/wiki/CIITA#Function>

60.Pattenden SG, Karaskov E, Bremner R., Interferon-gamma-induced chromatin remodeling at the CIITA locus is BRG1 dependent, EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1978-86.

61. LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM, Krawczyk M, Otten LA, Suter T, Fontana A, Acha-Orbea H, Reith W., Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes, Eur. J Immunol.,2004 Jun;34(6):1513-25.

62. Wu X, Kong X, Luchsinger L, Smith BD, Xu Y., Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities, Mol Cell Biol. 2009 Nov;29(21):5639-44.

63.Van Eggermond MCV, Boom DR, Klous P, Schooten E, Marquez VE, Wierda RJ, Holling TM, van den Elsen PJ., Epigenetic regulation of CIITA expression in human T-cells, BiochemPharmacol. 15;82(10):1430-7. Epub 2011 Jun 2.

EK1

KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER:

WESTERN BLOT ÇÖZELTİLERİ:

LİZİS TAMPONU (50 ml. İçin):

- 1,25 ml 1 M Hepes (pH: 7,6) çözeltisi
- 10 ml. 2M. KCl
- 625 µl 1M. MgCl₂
- 10 µl 500 µM EDTA
- 5 ml. Gliserol
- 500 µl. %20 NP40 solüsyonu
- 500 µl 100 µM PMSF
- 50 µl 1M. DTT
- 50 µl proteaz inhibitör kokteyli.
- Hacim ddH₂O ile 50 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

TBS:

- 10 mM Tris (pH: 8)
- 150 mM NaCl

TBST:

- %0,05 Tween 20 + TBS

4X YÜRÜTME TAMPONU

- 18,17 gr Tris Bazı
- 4 ml %10'luk SDS
- dH₂O ile hacim 100 ml.'ye tamamlanır.
- pH' ı 12 N HCl ile 8,8' e ayarlanır.

4X YÜKLEME TAMPONU (500 ml için) :

- **0,05M Tris** : 25 ml 1 M Tris Buffer (pH: 6.8) alınır.
- **%0,05 SDS**: 20 ml %10'luk SDS alınır.
- Hacim çift distile su ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

STOK SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME TAMPON ÇÖZELTİLERİ:

2X Gliserol (no R) Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

2X R (no Gliserol) Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,5 ml ddH₂O

2X R/G Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

4X Gliserol (no R) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası

- 4,0 ml ddH₂O

4X R (no Gliserol) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R/G Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

Tüm stok örnek tampon stokları oda sıcaklığında saklanır.

SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME ÇÖZELTİLERİ:

Kullanmadan hemen önce aşağıdaki solüsyonlar hazırlanır:

2X Gliserol (no R):

- 900 λ Stok 2XG no R
- 100 λ ddH₂O

2X R (no Gliserol)

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

2X R/G:

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

4X Gliserol (no R) :

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ ddH₂O

4X R (no Gliserol):

- 800 λ Stok 4XG no R

- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

4X R/G:

- 800 λ Stok 4XR/G
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

% 10' LUK AMONYUM PER SÜLFAT ÇÖZELTİSİ:

- 1 gr. Amonyumpersülfat tartılır.
- Son hacmi 10 ml olacak kadar çift distile suda çözülür.
- + 4 °C' de saklanır.

% 10' luk SDS PAGE JELİ :

- 5 ml % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 3,8 ml 4X Running Buffer
- 6 ml çift distile su
- 224 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 10 µl TEMED

% 5' lik YÜKLEME JELİ:

- 900 µl % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 1332 µl 4X Running Buffer
- 3 ml çift distile su
- 84 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 15 µl TEMED

TOWBIN TRANSFER TAMPONU:

- 25 mM Tris: 3,03 g Tris
- 192 mM Glisin: 14,4 g Glisin
- %20 Metanol (pH: 8,3)

- **1 g SDS**
- ddH₂O ile hacim 1 L.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

TRANSFEKSİYON ÇÖZELTİLERİ:

- **2X HBS** (pH:7,1 – 7,2 aralığında 4 farklı solüsyon hazırlanır.):
- **275 mM NaCl:** 16 gr tartılır.
- **10 mM KCl** : 0,74 gr tartılır.
- **1 mM Na₂HPO₄** :0,178 gr Na₂HPO₄.2H₂O tartılır.
- **11 mM Glukoz/Dekstroz:** 2,08 gr C₆H₁₂O₆. H₂O tartılır.
- **42 mM Hepes:** 10 gr tartılır.
- Hacmi 1 lt.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

ELUTİP MINI KOLON ÇÖZELTİLERİ::

Low Salt Buffer:

- 0.2 M NaCl
- 20 mM Tris HCl
- 10 mM EDTA
- pH:7.4'e ayarlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

High Salt Buffer:

- 2.0 M NaCl
- 20 mM Tris HCl
- 1.0 mM EDTA
- pH:7.4'e ayarlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

MINİ PREP ÇÖZELTİLERİ::

ALS 1: 50 mM glukoz, 25 mM Tris Cl (pH:8,0), 10 mM EDTA

ALS 2: 0,2 N NaOH, %1 SDS (Taze hazırlanır.)

ALS 3: 5 M potasyum asetat (17,725 g tartılır). 11,5 ml asetik asit, 28,5 ml distile su.

ENDO FREE PLASMID MAXI PREP ÇÖZELTİLERİ:**TAMPON P1(resüspansiyon tamponu):**

- 50 mM Tris.Cl, pH: 8.0
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNaseA
- 2-4 °C'de saklanır.

TAMPON P2 (Liziz tamponu):

- 200 mM NaOH
- %1 SDS (w/v)
- 15 - 25° C'de saklanır.

TAMPON P3 (Nötralizasyon tamponu):

- 3 M potasyum asetat pH: 5.5
- 15 – 25 veya 2 -8 ° C'de saklanır.

TAMPON QBT (Equilibration tamponu):

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- %0.15 Triton X-100 (v/v)
- 15 – 25° C'de saklanır.

TAMPON QC (Yıkama tamponu):

- 1.0 M NaCl

- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- 15 – 25° C’de saklanır.

TAMPON QN (Elution buffer):

- 1.6 M NaCl
- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- 15 – 25° C’de saklanır.

TE (TRİS EDTA) TAMPONU:

- 10 mM Tris.Cl pH:8.0
- 1 mM EDTA
- 15 – 25° C’de saklanır.

5X TBE (TRİS BORATE EDTA) TAMPONU:

- 54 gr. Tris bazı
- 27,5 gr Borik asit
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)
- 10 Kat dilüe edilerek agaroz jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanılır.

HIGH PURE RNA İZOLASYON KİTİ SOLÜSYONLARI:

LİZİZ/BAĞLAMA TAMPONU :

1. 4.5 M guanidine-HCl
2. 50 mM Tris-HCl
3. %30 Triton X – 100 (w/v)
4. pH:6.8
5. Oda sıcaklığında saklanır.

DNASE İNKÜBASYON TAMPONU:

- 1M NaCl
- 20 mM Tris-HCl
- 10 mM MnCl₂
- pH:7.0
- Oda sıcaklığında saklanır.

YIKAMA TAMPONU I:

- 5 M guanidine-HCl
- 20 mM Tris-HCl
- pH:6.6
- Oda sıcaklığında saklanır.

YIKAMA TAMPONU II:

- 20 mM NaCl
- 2 mM Tris-HCl
- pH:7.5
- Oda sıcaklığında saklanır.

ELÜSYON TAMPONU

- Nükleaz free, steril, çift distile su.

DİĞER ÇÖZELTİLER:

6X BROMOFENOL MAVİSİ SÜKROZ ÇÖZELTİSİ: (Jel elektroforezi için loading dye)

- **% 0,25 (w/v) Bromophenol blue:** 6,25 mg bromophenol blue alınır.
- **% 40 (w/v) sucrose:** 10 gr sükroz tartılır.
- Hacim 25 ml.ye ddH₂O ile tamamlanır.
- +4 °C’de saklanır.

100 μ M PMSF:

- 0,174 gr. PMSF tartılır.
- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- -20 °C'de saklanır.

1 M DTT:

- 1,54 gr DTT tartılır.
- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- +4 °C'de saklanır.

2M KCl:

- 75,56 gr KCl
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

4 M NaCl:

- 116,88 gr NaCl
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

0,5 M CaCl₂:

- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.
- 36,8 gr CaCl₂

0,1 M CaCl₂ : (Competent Hücre yapmak için kullanılır)

- 20 ml 0,5 M CaCl₂ solüsyonundan alınır.
- Hacmi ddH₂O ile 100 ml.'ye tamamlanır.
- Otoklavlanarak sterilize edilir.
- Oda sıcaklığında saklanır.

RNase - Free Su:

- 100 µl DPEC 100 ml suya eklenir.
- Alt üst ederek karıştırılır.
- 12 Saat 37 °C’de bekletilir.
- 10 Dakika 121 °C’de otaklavlanır.

EK2: ETİK KURUL RAPORU

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 25.06.2007/ 229

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 21 Haziran 2007 tarih ve 11/16/2007 no.lu toplantısında 216/2007 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Zeynep SERCAN'ın yöneticisi, Dilek GÖKTÜRK'ü sorumlusu olduğu "TAF7-CHTA etkileşimin programlanmış hücre ölümü üzerindeki etkilerinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İGCI

Tel: 0232 412 22 54

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI. Dilek Göktürk

TC Kimlik No / Pasaport No:	39826627788
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	Cumhuriyet Mah. Doğan Cad. No:27/9 Tire/İzmir
Telefon :	05352520486 / 05439177044
Faks :	
e-posta :	dgokturk82@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Mühendislik Fakültesi	Biyomühendislik	Lisans	2004
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	2007
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Doktora	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	Mart 2009- Ağustos 2012

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji ve Genetik, Biyoteknoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslerle Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
---	--

Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı				
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı				
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden	
	Yüksek Lisans			
	Doktora			
	Uzmanlık			
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)		Katkıda Bulunduğu Kongre ve Kurslar: ORPHEUS (Organisation for PhD Education in Biomedicine and Health Sciences in the European System) Conference, April 2011, Dokuz Eylül University Health Sciences Institute Izmir Turkey (Workshop coordinator olarak katkıda bulundum).		

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Poster Bildiri Üçüncülük Ödülü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği	2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Sercan Z, Pehlivan M, Gokturk D, Sercan H O, "Beta-catenin mutations are not observed in chronic myeloid leukemia", Tumori , 95/836-839/2009, 2009, Araştırma Makale, SCI Expanded Journal .
Göktürk D, Ateş H, Baykal S, Sercan Z, "TAF7nin CIITA ile etkileşiminin apoptotik yolaktaki etkisinin araştırılması", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi , 30/6(Supp.)/76, Ekim 2011, Bildiri özeti.
Baykal S, Ateş H, Göktürk D, Sercan Z, "İmatinib dirençli K562 alt klonunda yeni nesil Tirozin kinaz inhibitörlerinin Etkilerinin araştırılması", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi , 30/6 (Supp.)/105, Ekim 2011, Bildiri özeti.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Göktürk D, Bora K, Öncel S, Özdal Kurt F, Nalbantsoy A., Öngen G, Deliloğlu Gürhan I, "Stem Cell production in Bioreactors" Biomed 2004 11i International Science and Technology Days, ANKARA, Sepetmber 2004, Uluslararası Hakemli organizasyon.

Göktürk D, Pehlivan M, Bilkay Görken İ, Karagüler Z, Sercan Z, "TAFII7 Ekspresyonunun siRNA ile Baskılanması Sonrasında Apoptotik Süreçteki Değişikliklerin Araştırılması", Sanayiye Uygulanabilir Lisansüstü Proje Yarışması, 3-5 Haziran 2008, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji ve Araştırma Merkezi, İzmir.

Göktürk D, Pehlivan M, Bilkay Görken İ, Karagüler Z, Sercan Z, "Over-expression of TATA binding protein associated factor 7 induces cell death by microtubule stabilization similar to the soluble form of HIV-Tat.", **III. International Congress of Molecular Medicine**, İSTANBUL, May 2009, Uluslararası Hakemli organizasyon.

Göktürk D, Pehlivan M, Bilkay Görken İ, Karagüler Z, Sercan Z, "TAF7 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması sonrasında apoptotik süreçteki değişikliklerin araştırılması.", **XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi**, Bodrum, Ekim 2009, Hakemli organizasyon

B. Durmak Isman D. Göktürk, Z. Sercan, Z. Karagüler, H. Ates, I. Bilkay Görken, "Study of the Effect of Concurrent Use of Letrozole with Radiotherapy to the Cell Death Mechanisms in the Breast Cancer Cell Line" 8th European Breast Cancer Conference, , Vienna Austria, 21 - 24 March 2012, Uluslararası Hakemli organizasyon.