

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

**WNT GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN
APOPTOTİK UYARI VERİLMİŞ HÜCRELERDE
ARAŞTIRILMASI**

ILGIN ÖZTÜRK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İZMİR-2011**

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970068

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

**WNT GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN
APOPTOTİK UYARI VERİLMİŞ HÜCRELERDE
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ILGIN ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. H. Ogün Sercan

Bu araştırma DEÜ Rektörlüğü Tarafından 2009KB.SAG027 sayı ile
desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970068

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim
Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Ilgın Öztürk “WNT GEN EKSPRESYON
DÜZEYİNİN APOPTOTİK UYARI VERİLMİŞ HÜCRELERDE
ARAŞTIRILMASI” konulu Yüksek Lisans tezini 28/07/2011 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Doç. Dr. H. Oğün SERCAN
BAŞKAN


Doç. Dr. Kemal S. KORKMAZ

ÜYE


Yard. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN

YAZICIOĞLU

ÜYE

Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM

ÜYE (Yedek)

İçindekiler

İçindekiler.....	i
Tablo Listesi.....	iv
Şekil Listesi.....	v
Kısaltmalar.....	vii
Teşekkür.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanonikal Yolak (β -Katenin Yolağı).....	5
2.2 Kanonikal Olmayan Yolaklar.....	6
2.2.1 Kanonikal Olmayan Wnt/PCP Yolağı.....	7
2.2.2 Kanonikal Olmayan Wnt-cGMP/Ca ²⁺ Sinyal Yolağı.....	8
2.3 Wnt Sinyal İletisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler.....	10
2.3.1 Wnt Proteinleri.....	10
2.3.2 FRIZZLED Proteinleri.....	11
2.3.3 LRP5/6 (Low-density-lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6) proteinleri.....	12
2.3.4 Axin.....	13
2.3.5 β - Katenin.....	14
2.3.6 APC.....	14
2.3.7 TCF/LEF.....	15
2.3.8 Glikojen Sentaz Kinaz 3 (GSK3).....	15

2.3.9 Dishevelled (Dsh/Dvl).....	16
2.4 Programlanmış Hücre Ölümü.....	17
2.5 WNT Sinyali ve Apotoz.....	20
2.6 Bildirici Vektör Deney Sistemi	22
2.6.1 Lusiferaz Bildirici Gen Analizi (Luciferase Reporter Gene Assay).....	22
2.6.2 İkili Lusiferaz Bildirici Gen Deney Sistemi (Dual Luciferase Reporter Gene Assay).....	22
3 YÖNTEMLER.....	24
3.1 Araştırmanın Tipi.....	24
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	25
3.3 Araştırmanın Evreni.....	25
3.4 Çalışma Materyali.....	25
3.5 Araştırmanın değişkenleri	25
3.6 Veri toplama araçları.....	25
3.6.1 Hücre Kültürü.....	26
3.6.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	26
3.6.3 Klonlama Amaçlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
3.6.4 Agaroz Jel Elektroforezi.....	34
3.6.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Kesilip Saflaştırılması	34
3.6.6 PCR Ürünlerinin ve pGL4.12 Vektörünün Restriksiyon Enzimi Kesimi	35
3.6.6.1 Klonlama Amaçlı PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi	36
3.6.7 Klonlama	39
3.6.8 Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu	41

3.6.9	Maxiprep Plasmid İzolasyonu.....	43
3.6.10	Transfeksiyon.....	46
3.6.11	Apoptotik Uyarının Oluşturulması	47
3.6.12	Apoptotik Uyarının Ölçülmesi.....	47
3.6.13	Dual Luciferaz Reporter Assay.....	50
3.7	Araştırma Planı Ve Takvim.....	52
3.8	Verilerin Değerlendirilmesi.....	53
3.9	Araştırmanın Sınırlılıkları	53
3.10	Etik Kurul Onayı.....	53
4	BULGULAR	54
4.1	Genomik DNA İzolasyonu.....	54
4.2	PCR.....	54
4.2.1	Klonlama amaçlı PCR ürünlerinin ve pGL4.12 vektörünün agaroz jelden restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jelden ekstraksiyonu	56
4.3	Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu	57
4.4	Apoptotik Uyarının Ölçülmesi	59
4.5	Dual Lusiferaz Bildirici Deney sistemi.....	61
5	TARTIŞMA	63
6	KAYNAKÇA	65

Tablo Listesi

Tablo.1	Promotör klonlama için kullanılacak PCR primerleri ve restriksiyon enzimleri.....	29
Tablo.2	Promotör Wnt7b için polimeraz zincir reaksiyonu içeriği	31
Tablo.3	Promotör Wnt7b için PCR ısı profili.....	32
Tablo.4	Promotör Wnt7b için PCR ısı profili.....	32
Tablo.5	Promotör Wnt8a için PCR ısı profili	33
Tablo.6	Promotör Wnt10a için polimeraz zincir reaksiyonu içeriği.....	33
Tablo.7	Promotör Wnt10a için PCR ısı profili	33
Tablo.8	Promotör Wnt7b dizisinin restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı.....	36
Tablo.9	Promotör Wnt8a dizisinin restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı	36
Tablo.10	Promotör Wnt10a dizisinin restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı	37
Tablo.11	Restriksiyon enzim kesimi için kullanılan ısı profili.....	37
Tablo.12	Promotör Wnt7b için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi	37
Tablo.13	Promotör Wnt8a için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi.....	38
Tablo.14	Promotör Wnt10a için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi.....	38
Tablo.15	pGL4.12 vektör DNA'larının 5' fosfat grubunun uzaklaştırılması.....	38
Tablo.16	pGL4.12 vektörü ile Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a promotör dizilerinin ligasyonu	40
Tablo.17	AMC standart eğrisi için örnek hazırlama.....	49
Tablo.18	Kaspaz 3 ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	50
Tablo.19	Araştırma zaman çizelgesi	53

Şekil Listesi

Şekil.1 Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	6
Şekil.2 Kanonikal olmayan Wnt/PCP sinyal iletimi	8
Şekil.3 Kanonikal olmayan Wnt/ Ca^{2+} sinyal iletimi	10
Şekil.4 Frizzled protein yapısı.....	12
Şekil.5 Axinin yapısı ve axine bağlanan proteinler	13
Şekil.6 Dishevelled proteininin korunmuş birimleri	16
Şekil.7 Apoptozun tetiklenmesi	19
Şekil.8 Firefly ve Renilla lusiferazı tarafından gerçekleştirilen bioluminesans reaksiyonu....	23
Şekil.9 Deney akış şeması.....	24
Şekil.10 pGL4.12 Bildirici vektörü	51
Şekil.11 pGL4.74 Bildirici vektörü	51
Şekil.12 Wnt7b promotör dizisi için PCR sonucu.....	54
Şekil.13 Wnt8a promotör dizisi için PCR sonucu.....	55
Şekil.14 Wnt10a promotör dizisi için PCR sonucu.....	55
Şekil.15 Saflaştırılmış Wnt7b promotör dizisi ve pGL4.12 vektörü.....	56
Şekil.16 Saflaştırılmış Wnt8a promotör dizisi ve pGL4.12 vektörü	56
Şekil.17 saflaştırılmış Wnt10a promotör dizis ve pGL4.12 vektörü.....	57
Şekil.18 Promotör Wnt7b-pGL4.12 plasmid DNA'sının miniprep izolasyonu.....	57
Şekil.19 Promotör Wnt8a-pGL4.12 plasmid DNA'sının miniprep izolasyonu	58
Şekil.20 Promotör Wnt10a-pGL4.12 plasmid DNA'sının miniprep izolasyonu	58
Şekil.21 AMC standart grafiği	59
Şekil.22 Kaspaz 3 aktivitesi 1. Deneme.....	60
Şekil.23 Kaspaz 3 aktivitesi 2. deneme	60
Şekil.24 Wnt7b promotör dizisi lusiferaz aktivitesi	61
Şekil.25 Wnt8a promotör dizisi lusiferaz aktivitesi	62

Şekil.26 Wnt10a promotör dizisi lusiferaz aktivitesi	62
---	----

Kısaltmalar

Fzd: Frizzled

APC: Adenamatöz Polipozis koli

TCF/LEF: T hücre spesifik transkripsiyon faktör / lenfoid enhancer bağlayıcı faktör

LRP: Lipoprotein-ilişkili reseptör proteinleri

CaMKII: Ca^{2+} /Kalmodulin bağımlı protein kinaz II

PKC: Protein kinaz C

JNK: Jun NH₂-terminal kinaz

GSK3 β : Glikojen sentez kinaz 3 β

NF-AT: Aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü

Dvl: Dishevelled (memelilerde)

Dsh: Dishevelled (meyve sineğinde)

PCP: Düzlemsel hücre kutuplaşması

CRD: Sisteince zengin birim

NF- κ B: Nükleer faktör kapa B

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

FBS: Fetal sığır serumu

μ l: mikro litre

ml: mili litre

mM: mili molar

nmol: nano mol

rpm: Bir dakikadaki devir sayısı

Teşekkür

Yüksek Lisans eğitimim sürecince yaptığı her türlü katkı ve yardımlarından dolayı öncelikle danışmanım Doç.Dr. H.Ogün Sercan'a teşekkür ederim. Hiçbir zaman yardımını ve bilgisini esirgemeyen Doktora öğrencisi Melek Pehlivan'a, maddi ve manevi her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

WNT GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN APOPTOTİK UYARI VERİLMİŞ HÜCRELERDE ARAŞTIRILMASI

İlgın Öztürk, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Temel Tıp
Bilimleri Binası 3. Kat 35340 Balçova-İzmir

ÖZET

Birçok çalışma Wnt sinyal yolağının programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) çeşitli mekanizmalar üzerinden regüle ettiğini göstermektedir. Apoptotik uyarı verilmiş bazı hücre hatlarında ‘PCR Array’ yöntemi ile yapılan çalışmalarda Wnt sinyal yolağında yer alan birçok genin ekspresyon düzeylerinde değişiklikler gözlenmiştir (yayınlanmamış veri).

Bu çalışmalardan yola çıkılarak, Wnt1, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a genleri tez çalışmamız için seçildi. Bu genlerin apoptotik uyarı altında ki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesinde, İkili Lusiferaz Bildirici Deneyi (Dual Luciferase Reporter Assay), hücrelerin apoptotik süreçlerinin incelenmesinde (apoptotik uyarının ölçülmesinde) ise Kaspaz 3 aktivitesi ölçümü kullanıldı. Seçilen genlerden sadece Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a promotör dizileri bildirici vektörlere klonlandı. Bu vektörler Kelly hücre hattına transfekte edildi ve transfekte hücrelerde apoptoz tetiklendi. Apoptotik uyarının ardından bildirici vektörlerin lusiferaz ölçümleri yapılarak veriler toplandı.

Yapılan deneylerde, apoptozun tetiklendiği transfekte hücrelerde Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a genlerinin promotörlerinde normale göre 1,5 katlık bir artış izlendi.

Anahtar sözcük: Wnt Sinyal Yolağı, Lusiferaz Bildirici Deney Sistemi, Apoptoz

INVESTIGATION OF WNT GENE EXPRESSION LEVEL IN INDUCED APOPTOSIS CELL

İlgin Öztürk, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Temel Tıp
Bilimleri Binası 3. Kat 35340 Balçova-İzmir

ABSTRACT

There are many studies reporting that Wnt signaling pathways regulate programmed cell death through different molecular mechanisms. In one of our previous studies we observed striking differences in genes of the Wnt signaling pathway by using a PCR array methodology (unpublished data). Based on these data we chose to study differences in the levels of Wnt1, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a and Wnt10a genes after before and after apoptotic stimuli. A dual luciferase reporter assay was used to evaluate gene expression and caspase 3 activation was used for the evaluation of apoptosis. Only Wnt7b, Wnt8a and Wnt10a promoters were cloned in to reporter vectors. These vectors were transfected in to Kelly cells which were subsequently induced to undergo apoptosis. Luciferase measurements of each promoter were evaluated. An 1.5 fold increase in activity was observed for the Wnt7b, Wnt8a and Wnt10a gene promoters after apoptotic induction.

Keywords: Wnt Signaling, Dual Luciferase Reporter Assay, Apoptosis

1 GİRİŞ VE AMAC

Omurgalıların gelişimi, hücre davranışını etkileyen birçok sinyal yolağının birleşimi ile kontrol edilmektedir. Wnt sinyal iletimi, embriyo gelişimi ve doku oluşumu için gerekli olan başlıca sinyal yollarından birisidir. Wnt sinyali ayrıca omurgalı ve yetişkin kök hücre gelişiminin regülasyonundan da sorumludur. Yapılan çalışmalar bu sinyal yolağındaki sorunların kusurlu embriyo ve dokuların oluşumuna neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Wnt sinyalinin bozulması gelişim bozukluklarına ve kansere neden olmaktadır. Wnt sinyal yolağı iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, ‘canonical’ (kanonikal) ve ‘non-canonical’ (kanonikal olmayan) yollarıdır. Sinyal, her iki yolda da Wnt ligandları ve Frizzled reseptörleri aracılığıyla başlatılır. Kanonikal yolak, hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını regüle eden, β -katenin: T hücre spesifik transkripsiyon faktör/lenfoid enhancer bağlayıcı faktör (TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid factor) aracılı gen ekspresyonunu tetiklemektedir. Kanonikal olmayan Wnt sinyal iletimi hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) ve Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) aracılığıyla kontrol edilmektedir. Bu sinyal yolağı, gen ekspresyonunda anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan Aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü (NF-AT) aracılı gen ekspresyonunu tetiklemektedir.

Hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra, programlanmış hücre ölümünün omurgalı gelişimi süresince doku homeostazı ve morfogenez gibi süreçlerde önemli rol oynadığı iyi bilinmektedir. Programlanmış hücre ölümü ve Wnt sinyali arasındaki ilişki son zamanlarda yapılan çalışmalar ile oldukça kabul görmüştür. Çeşitli organizmalarda yapılan birçok çalışma Wnt sinyal iletiminin programlanmış hücre ölümünü birçok farklı mekanizma üzerinden regüle ettiğini göstermiştir.

Bu çalışmada Wnt sinyal iletiminde yer alan Wnt proteinleri ile programlanmış hücre ölümü arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla apoptotik uyarı verilmiş hücre hattında Wnt genlerinin promotör dizilerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

Omurgalıların gelişim sürecinde, hücreler geniş ölçüde birbirleriyle iletişim halindedirler. Bu hücresel etkileşimler; doğru konumlanma (right positions), hücre akıbeti (fate), yönelme (orientation),büyüme ve biçimlendirmenin(patterning) diğer yanları (aspects) için önemlidir. Embriyogenez süresince hücreler arası sinyal iletimi, Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Tümör büyüme faktörü-beta (TGF- β), Hedgehogs ve Wnt gibi salgılanan faktörlerin birçok ailesi ile ilişkilidir. Salgılanan proteinlerin geniş bir ailesi olan Wnt proteinleri sistein amino asidince zengin proteinlerdir. *Drosophila* ve *Caenorhabditis elegans* ile yapılan genetik çalışmalar, *Xenopus* ve gen knockout farelerde yapılan axis oluşum deneyleri Wnt proteinlerinin hayvan gelişiminde büyük ölçüde yer aldığını göstermiştir(1).

Wnt sinyal yolağı ile ilgili çalışmalar, 1980'lerde ve 1990'larda *Int1* geninin, meme bezi tümörlerinin oluşumuna katkısının belirlenmesi sonucunda onkogen olarak tanımlanmasıyla başlamıştır (2). Bunun ardından *wingless* (*wg*), Baker tarafından "*Drosophila melanogaster segment polarite geni*" olarak tanımlanmıştır. *Wg*, metamorfozda erişkin eklem oluşumu ve embriyogenez sürecinde işlev göstermektedir. Segment polarite geni olan *wg*'nin fare *Int1* homoloğu olduğu keşfedilmiştir (3). *Wg* kelimesinin *Int1* kelimesiyle birleştirilmesi ile 'Wnt' adı ortaya çıkmıştır.

Wnt'ler ilk olarak memeli onkogenleri, daha sonra da embriyogenez boyunca hücre-hücre etkileşimlerini düzenleyen genler olarak tanımlanmışlardır. Wnt proteinleri; evrim süresince yüksek düzeyde korunmuş, hücre çoğalması, farklılaşması, hücre göçü ve programlanmış hücre ölümü gibi bir çok hücresel süreçte anahtar rol oynayan sistein amino asidince zengin glikoproteinlerdir (4). Wnt'ler hücre yüzey reseptör proteinlerine bağlanırlar. Bu reseptörler; membranı yedi kez geçen Frizzled reseptör ailesi ve Lipoprotein-ilişkili reseptör proteinleridir (LRP5/6)(5).

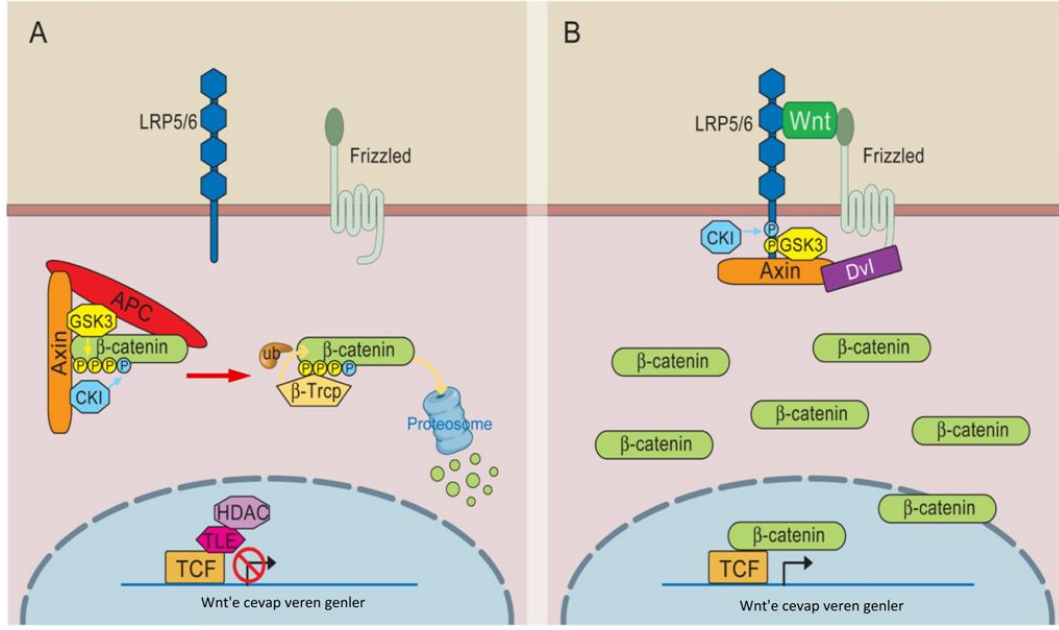
Wnt- Frizzled sinyal iletim yolağı , 'kanonikal Wnt sinyal iletimi' ve 'kanonikal olmayan Wnt sinyal iletimi' yolağı olmak üzere temelde ikiye ayrılmaktadır. Kanonikal yolak β -katenin bağımlı olduğundan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı olarak da bilinmektedir. Wnt proteinlerinin Frizzled reseptörlerine ya da Frizzled/ LRP5-6 reseptör komplekslerine bağlanmaları üç farklı sinyal kaskadından birini aktive eder(6). Bu kaskadlar; kanonikal Wnt sinyal yolağı (7), kanonikal olmayan Wnt/PCP yolağı(7,8) veya kanonikal olmayan Wnt/ Ca^{2+} (8-10) yolağıdır.

2.1 Kanonikal Yolak (β -Katenin Yolağı)

Kanonikal yolak, yukarıda belirtilen yolaklar arasında en iyi anlaşılmış olan yolaştır. Kanonikal Wnt yolağının, programlı hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarını, hücre farklılaşmasını ve hücre-akıbetini, gelişim ve neoplazinin başlama ve devamındaki (perpetuation) programlanmamış olayları da regüle ettiği bilinmektedir (11,12). Yakın zamanda, kemik iliğindeki ve derideki kök hücrelerin Wnt kanonikal sinyal yolağı tarafından regüle edildiğine dair deliller, Wnt yolağının doku yenilenmesinde önemli rol oynadığını önermektedir (11).

Kanonikal Wnt sinyal iletimi, β -kateninin sitoplazmik stabilitesini kontrol eder. Wnt yokluğunda, β -katenin; yapı proteini Axin, APC (Adenomatous Polyposis Coli), kazein kinaz 1 (CK-1) ve glikojen sentez kinaz 3β (GSK3) proteinlerinden oluşan komplekse bağlanır. CK-1 ve GSK3 sırasıyla β -katenini N-terminal ucundan fosforiller. Fosforile β -katenin, E3 ubiquitin ligaz β -Trop tarafından tanınır ve proteozomal yıkıma uğrar. Wnt sinyalinin yokluğunda, TCF/LEF transkripsiyon faktörü, Groucho transkripsiyonel korepresör proteine bağlanır. Bu şekilde, TCF, Wnt sinyali yokluğunda β -kateninin hedef genlerinin aktif transkripsiyonel represörü olarak davranır (Şekil.1A) (13).

Wnt ligandı, LRP5/6 (koreseptör) beraberinde bulunan Frizzled reseptörüne bağlandığında Dvl proteini plazma membranında tutulur (14). Kazein kinaz 1 ve PKC α tarafından Dishevelled (Dvl) proteinlerinin fosforilasyonu tetiklenir. Fosforillenmiş olan Dvl, Axinin, Axin-APC-GSK3 β kompleksinden ayrılmasına neden olur ve β -katenin'in GSK3 β tarafından fosforillenmesini engeller. Fosforile olmayan β -katenin proteozomal yıkıma uğramaz, β -katenin sitoplazmada birikir ve hücre nükleusuna geçer. Burada TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörleri ile bağlanarak, aralarında c-myc ve siklin D, VEGF'nin de bulunduğu birçok hedef genin transkripsiyonunu değiştirir (Şekil.1B) (15).



Şekil.1 Wnt/β-katenin sinyal yolağı (16)

2.2 Kanonikal Olmayan Yolaklar

Drosophila ve omurgalılarıdaki kanonikal olmayan Wnt sinyal yolları henüz çok iyi karakterize edilememiştir. Buna karşın sinyal yolağının; omurgalı gastrulasyonu sırasında yakınsal uzanım (convergent extension) ve *Drosophila*'da tüylerin polarizasyonu gibi süreçlerin β-katenin bağımsız regülasyonunda fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir (16,17).

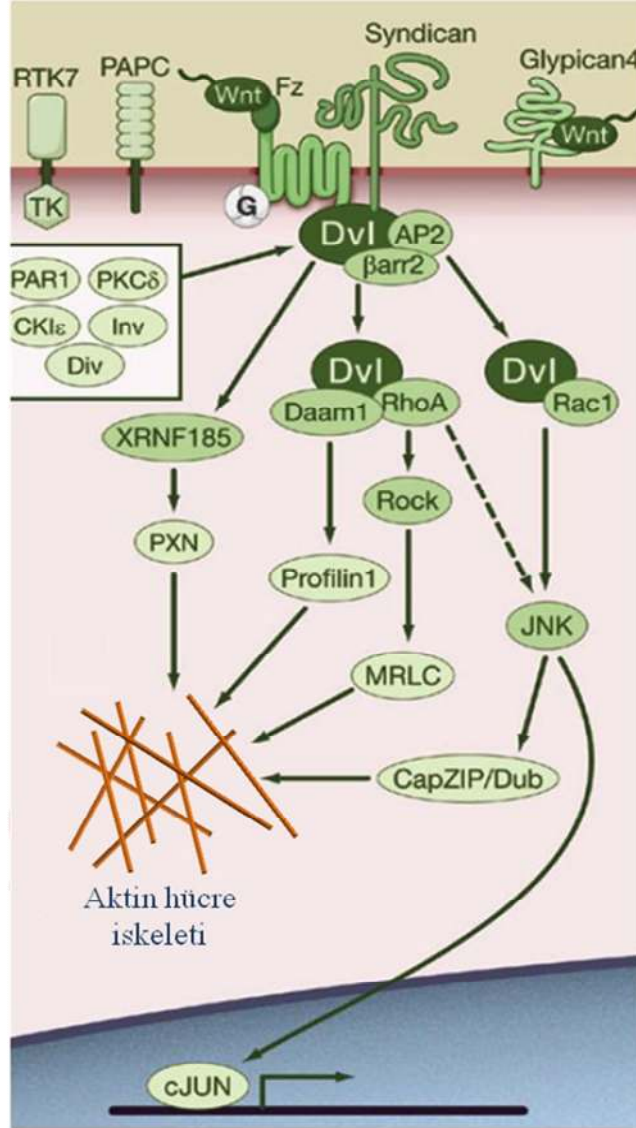
Kanonikal olmayan yolak, başlıca Wnt4, Wnt5a ve Wnt11 sinyal molekülleri ile sinyal iletimini gerçekleştirmektedir (8). Bu moleküllerden Wnt11 böbrek oluşumu için gereklidir ve yokluğu yeni doğan farede böbrek hipoplazisi ile sonuçlanır (18). Wnt11 ayrıca nöronların, glial hücrelerin ve melanositlerin uygun mikro çevrelerine ulaşmaları için hücre göçüne rehberlik etmektedir (19). Bir diğer ligand Wnt4, gonadal androjenin dişi embriyolarında sentezini inhibe ederek dişi gonadal gelişimini destekler(20).

Kanonikal olmayan yolak β-kateninden bağımsızdır ve düzlemsel hücre kutuplaşması (Planar cell polarity-PCP) ve Wnt/Ca²⁺ sinyal yollarını kapsamaktadır. Kanonikal olmayan yolakta Wnt sinyalinin, LRP5/6 yardımcı reseptöründen (coreceptor) bağımsız olarak sadece Fzd aracılığıyla iletiliği düşünülmektedir(21). Ancak yapılan çalışmalar LRP6' nın yakınsal uzanım mekanizmasını regüle ettiğini göstermiştir (22).

2.2.1 Kanonikal Olmayan Wnt/PCP Yolağı

İlk olarak *Drosophila*' da tanımlanan Fzd ve Dvl aracılıklı PCP yolağı, c-Jun-N-terminal kinaz (JNK) ve Rho-ilişkili kinaz (Rho-kinaz) proteinlerini aktive eder. Bu proteinlerin aktivasyonu sineğin kıllarının, kanat tüylerinin ve gözü oluşturan birimlerin (ommatidium) yönelimini kontrol eder (23). Wnt/PCP yolağı da Wnt/Ca²⁺ yolağı gibi heterotrimerik G proteinine bağımlı bir yoldur (17).

Dishevelled, GTPaz' ların Rho ailesi üyelerinden RhoA ve Rac1 aktivasyonuna yol açan birbirinden bağımsız ve birbirine paralel iki yolağı aktive eder. İlk yolak Dvl ilişkili morfogenez 1 aktivatörü (Daam1) aracılığıyla Rho' ya sinyal iletir (24). Bu Rho yolağı, sito iskelet yeniden düzenlenmesine aracılık eden Rho-ilişkili kinaz Rock'ın aktivasyonuna yol açar (17). İkinci yolak JNK aktivitesini uyaran Rac proteinini aktive eder (Şekil.2) (25). Memelilerde JNK1, JNK2 ve JNK3 olmak üzere 3 tip JNK bulunmaktadır. JNK1 embriyonik göz kapağı açıklığının kapanması için gereklidir. Farede JNK1 ve JNK2' nin yokluğu nöral tüp açıklığının kapanmasında kusura yol açtığından farenin ölümüne neden olmaktadır. Bu gözlemler JNK yolağının epitelyal ve nöroepitelyal hücrelerin göçünü regüle ettiğini göstermektedir (26,27). Özetle, PCP sinyal iletimi aktin sito-iskeletinin kontrolü ile sonuçlanır ve Dvl iyi bilinene aktin regülatörleri olan Rho ve Rac proteinlerini aktive eder (28).



Şekil. 2 Kanonikal olmayan Wnt/PCP sinyal iletimi (29)

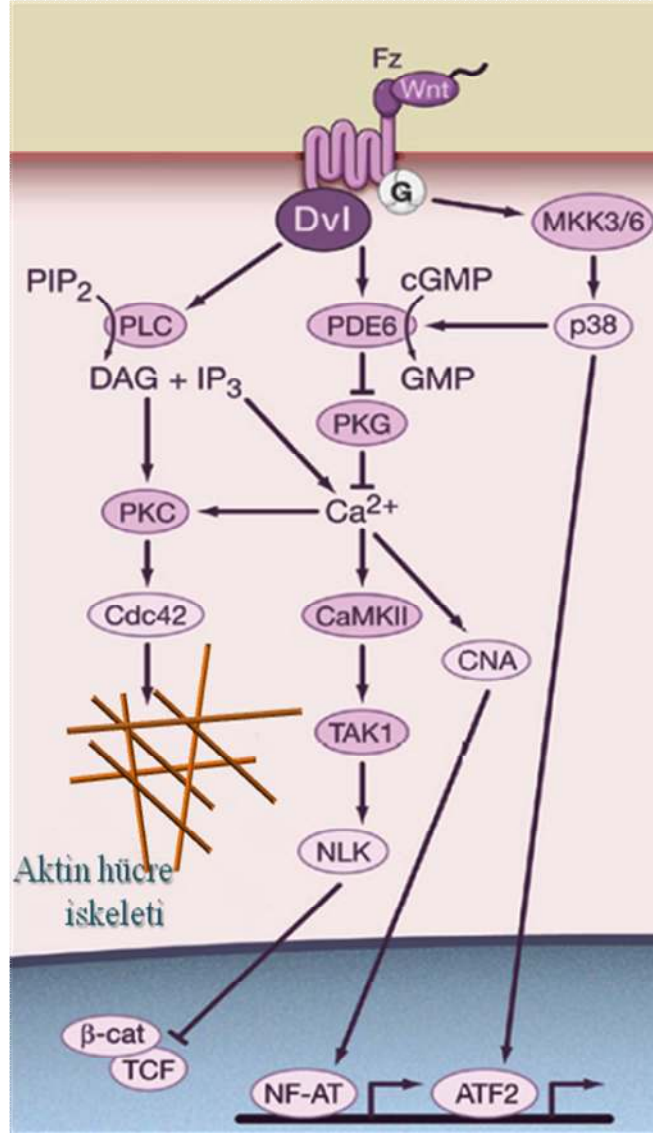
2.2.2 Kanonikal Olmayan Wnt-cGMP/Ca²⁺ Sinyal Yolağı

Kanonikal olmayan Wnt ligandlarının Fzd reseptörlerine bağlanması hücre içi Ca²⁺ seviyesinin artışına neden olur. Kalsiyum salınımı ve hücre içi kalsiyumun birikmesi, Ca²⁺/Kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) ve protein kinaz C (PKC) gibi kalsiyuma duyarlı proteinlerin aktivasyonu neden olur. Önemli olarak, Wnt/Ca²⁺ yolağının β-katenin yolağının antagonisti olduğu ve hücre göçünü uyardığı gösterilmiştir (23).

Wnt/ Ca^{2+} yolağı, bazı Wnt'lerin ve Fzd reseptörlerinin endoplazmik retikulumdan hücre içine Ca^{2+} salınımını uyardığı ve bu yolağın G-proteinlerine bağımlı olduğu bulguları ile ortaya çıkmıştır(30). Zebra balığı ve *Xenopus* embriyolarında gastrulasyon sürecinde Ca^{2+} dalgalanmaları görüntülenmiştir (31). Wnt5a, Wnt11 ve sıçan Fz2 (RFz-2) proteinleri hücre içine Ca^{2+} salınımını sağlayabilme kapasiteleri vardır. Zebra balığı embriyosunda Wnt5a ve RFz-2 aşırı ekspresyonu zebra balığının dış yüzey hücrelerinde (enveloping layer cells) kalsiyum akışının sıklığını uyarmaktadır. Yine, *Xenopus* embriyosunda wnt5a veya Wnt11' in aşırı ekspresyonu PKC ve CaMKII' yi aktive etmektedir (17).

Wnt/Fzd etkileşimi, trimerik G proteini aktivasyonu ile Dvl aktivasyonuna aracılık eder. Bu fosfolipaz C'yi aktive eder. PLC, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat' ı (PIP2) diaçil gliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3) moleküllerini oluşturur. Bu moleküllerden IP3 hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır. Ca^{2+} ve DAG, omurgalı gastrulasyonu boyunca hücre adhezyonu ve doku ayrılmasını regüle etmek için Cdc42'yi aktive eden PKC α ' yı aktive eder (şekil. 3).

Wnt/Fzd ayrıca cGMP-özellik fosfodiesteraz PDE6'yı aktive eder. Böylece azalmış hücresel cGMP ve protein kinaz G (PKG) inaktivasyonu hücresel Ca^{2+} konsantrasyonunun artışına yol açar. Artmış Ca^{2+} , CaMKII ve fosfataz CNA' yı aktive eder. CNA ventral hücre akıbetini düzenleyen NF-AT transkripsiyon faktörünü aktive eder. CaMKII, TGF β aktive edilmiş kinaz (TAKI) ve Nemo-benzeri kinaz (NLK) gibi β -katenin/TCF sinyal iletimi antagonistlerini aktive eder. TAKI ve NLK aktivitesi, β -katenin/TCF' i inhibe ederek dorsal aksis oluşumunu destekler (şekil.3) (32).



Şekil.3 Kanonikal olmayan Wnt/Ca²⁺ sinyal iletimi (29)

2.3 Wnt Sinyal İletisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler

2.3.1 Wnt Proteinleri

Wnt1'in tanımlanmasından itibaren, genom analizi memelilerde diğer 18 Wnt geninin varlığını meydana çıkardı. Tüm Wnt proteinleri, sekresyon için sinyal peptidi, doğru katlanmayı ve sekresyonu sağlamak için birçok asparagin-bağlı (linked) glikozilasyon bölgesi ve oldukça korunmuş 23-24 sistein kalıntısı (rezidü) gibi temel ortak özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri göz önüne alındığında Wnt prorenleri; lipid modifiye salgı glikoproteinleridir. Wnt proteinleri genellikle 350-400 amino asit uzunluğundadır ve 36-40 kDa molekül

ağırlığına sahiptir. *Drosophila* Wg gibi bazı Wnt proteinleri, protein merkezinin yakınlarında 85 amino asitlik bir birim içermektedir (33).

Wnt ailesi üyeleri; doku homeostazını, kök hücre idamesini, hücrel proliferasyonu, neoplastik transformasyonu ve tümör baskılamayı kapsayan çok çeşitli biyolojik süreçleri kontrol eden farklı reseptör kombinasyonları aracılığıyla hücre-hücre sinyallerinin medyatörü olan salgılanmış proteinlerdir (34). Wnt araştırmalarının başlamasından itibaren insanda ve farede 19 farklı izoform tanımlanmıştır. Bu izoformlardan 17'si *Xenopus*, 7'si *Drosophila* ve 5'i *C. Elegans*'da da tanımlanmıştır (12).

Xenopus embriyosunda yapılan çalışmalar özgül Wnt genlerinin ektopik ekspresyonlarının farklı fenotipik sonuçların ortaya çıktığını göstermektedir. C57MG faresinde, memeli epitelyal hücrelerinde Wnt1, Wnt2 ve Wnt3a'nın geçici ekspresyonu morfolojik transformasyonlara neden olurken diğer Wnt proteinleri hücre morfolojisi üzerine çok az etki etmektedirler (35). Buna ek olarak, *Xenopus* embriyosunda, Wnt1, Wnt3a ve Wnt8' in dört hücreli embriyonun ventral blastomerine enjeksiyonu body aksisinin duplikasyonuna sebep olmaktadır, ancak Wnt4, Wnt5a ve Wnt11 genlerinin aşırı ekspresyonu ise aksis duplikasyonunu tetiklemeden morfogenetik hareket ile ilişkilendirilmektedir (36).

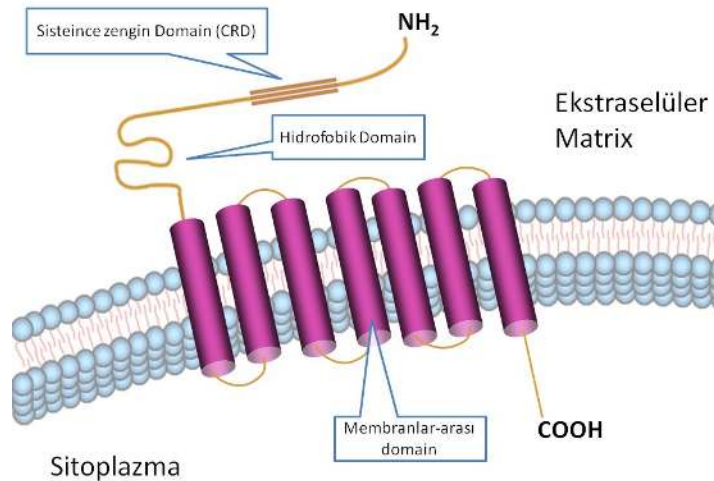
Sonuç olarak, Wnt proteinleri genellikle, *Xenopus* embriyosunda ikincil body aksis oluşumunu tetikleyebilme ve belirli sinyal kaskatlarını aktive edebilme kapasitelerini temel alarak, Wnt1 ve Wnt5 olmak üzere iki temel sınıfa ayrılırlar. Wnt1 sınıfı, Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 ve Wnt8a proteinlerinden oluşmaktadır ve *Xenopus*' da ikincil body aksis oluşumunu tetiklemektedirler. Wnt1 sınıfı Wnt proteinleri, Frizzled membran reseptörü ve LRP5/6 yardımcı reseptörünün aktivasyonunu kolaylaştırır. Sonuç olarak bu aktivasyon Kanonikal Wnt/ β -katenin yolağını harekete geçirir. Wnt5a sınıfı, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a ve Wnt11 proteinlerinden oluşmaktadır ve ikincil aksis oluşumunu tetiklemeyiz. Bu sınıfa ait Wnt proteinleri Frizzled membran reseptörüne bağlanarak Kanonikal olmayan sinyal yolaklarını aktive ederler. Wnt proteinleri üzerine yapılan çalışmalar bu proteinlerin çok çeşitli hücre içi yolakları tetikleyerek fizyolojik değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir (37).

2.3.2 FRIZZLED Proteinleri

Frizzled genleri birden fazla sinyal ileti yolağında görev alan integral membran proteinlerini kodlar. Frizzled proteinleri, diğer bazı ligandlarla birlikte, salgılanan Wnt

proteinlerinin reseptörleridir. Frizzled, Wnt sinyalinde ve diğer sinyal yollarında reseptör görevi yapan, G-protein aracılı (coupled) reseptör proteini ailesidir. Hücre polarizasyonunun düzenlenmesinde kritik öneme sahiptirler. Bunun yanı sıra embriyonik gelişim, doku ve hücre polarizasyonu, nöronal sinapsların oluşumu, hücre proliferasyonunun regülasyonu için gereklidir. Bu proteinler süngerden insana kadar çok çeşitli canlıda tanımlanmıştır (38).

Frizzled proteinlerinin boyutları 500-700 amino asit arasında değişmektedir. Proteinin; sisteince zengin birimi (Cystein Rich Domain) ve 40-100 amino asitlik hidrofobik bağlama bölgesi içeren amino ucunun hücre dışında olduğu tahmin edilmektedir. Fzd proteinleri hücre membranını yedi kez geçen ve α -heliks yapısında olan hidrofobik birim içermektedir. Hücre içi karboksil ucu değişken uzunluktadır ve farklı aile üyeleri arasında korunmamıştır (38). Wnt'lerin Fzd reseptörlerine bağlanması için gerekli ve yeterli olan CRD, 120-155 amino asit kalıntısı içermektedir. Bu kalıntılardan on tanesi aralarında disülfid bağı oluşturan korunmuş sistein amino asitleridir (şekil.4) (39,40).



Şekil.4 Frizzled protein yapısı

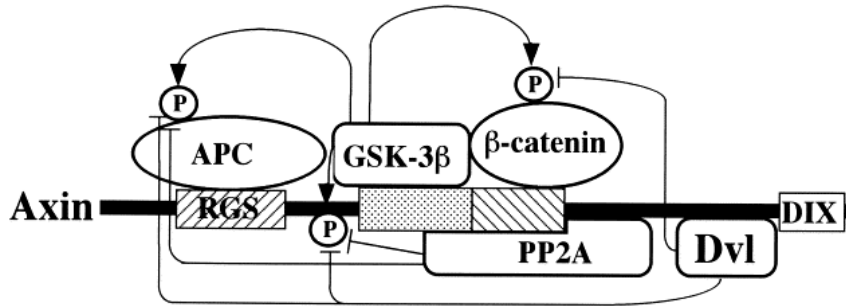
2.3.3 LRP5/6 (Low-density-lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6) proteinleri

Düşük yoğunluklu lipoprotein ilişkili proteinler 5 ve 6 (LRP5/6) ve onların *Drosophila* homologu 'arrow' membranı tek sefer geçen, Wnt koreseptörü olarak davranan ve Wnt/ β -katenin sinyal iletimi için zorunlu olan proteinlerdir (5,(41)). LRP reseptörünün sitoplazmik uzantısı (tail), Wnt sinyal yolağının uyarılması ile fosforillenebilen birçok Pro-Pro-Pro-

(SerTrp)Pro [PPP(S/T)P] motifi içerir (42). Bu LRP5/6 proteinlerinin hücre içi biriminde beş kez tekrarlayan PPPSP motifi Wnt/ β -katenin sinyal iletimini başlatmak için gerekli ve yeterlidir (42). LRP'nin PPP(S/T)P motifi üzerinden fosforilasyonu, Axin için kenetlenme (docking) bölgesi sağlar (43,44). LRP kuyruğunun fosforilasyonu GSK3 ve CK1gamma olmak üzere iki protein kinaz tarafından düzenlenmektedir (12).

2.3.4 Axin

Axin, ilk olarak *Xenopus* embriyolarında Wnt sinyal yolağının bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. İlerleyen çalışmalarda axinin APC, β -katenin ve GSK-3 β 'ya doğrudan bağlandığı gösterilmiştir (16). *Xenopus*, *Drosophila* ve memeli kültürü hücreleri üzerinde yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda axinin, β -kateninin down-regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (45, 46). Axin, N-terminal bölgesinde G protein sinyal iletim regülatör birimi (Regulatory of G protein signaling- RGS domain) içermektedir. RGS birimi Adenomatous polyposis coli (APC) proteini için bağlanma bölgesidir(47). Ayrıca axin, GSK-3 β , β -katenin, Dvl ve protein fosfataz 2A (PP2A) için bağlanma bölgelerine sahiptir (Şekil.5).



Şekil.5 Axinin yapısı ve axine bağlanan proteinler (53)

Şekil. 5' de gösterilen kompleksin varlığında axin, GSK-3 β tarafından β -kateninin fosforilasyonunu arttırmaktadır (45). Axin GSK-3 β 'yı aktive ederek β -kateninin fosforilasyonunu arttırmaz. Axin, β -katenini GSK-3 β çevresine yerleştirerek ve etrafında tutarak β -kateninin fosforilasyonunu kolaylaştırır(48). Axin ayrıca APC' nin GSK-3 β tarafından fosforilasyonunu da kolaylaştırmaktadır (46).

2.3.5 β - Katenin

Beta-katenin (β -katenin), insanlarda *CTNNB1* geni tarafından kodlanan bir proteindir (49). *Drosophila*'da homolog proteini *armadillo* olarak adlandırılır. β -kateninin, dizi analizi yapıldığında bu proteinlerin *armadillo* ailesine üye olduğu bulunmuştur. Bu proteinler, protein-protein bağlanmaları için özelleşmiş 'armadillo tekrar birimi' adlı çoklu kopyalara sahiptir. β - katenin, adheran bağlantıları oluşturan kadherin protein kompleksinin bir alt birimidir ve Wnt sinyal iletiminin temel bileşeni olduğu gösterilmiştir. Adheran bağlantılar, hücre gelişimini ve hücreler arası adhezyonu regüle ederek epitel hücre tabakalarının oluşturulmasını ve devamlılığını sağlar. β -katenin, kadherinlerle ve alfa-kateninle eşleşmediğinde, Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan ICAT (Beta-catenin-interacting protein 1) ve APC gibi diğer proteinlerle etkileşir (50).

Wnt proteininin yokluğunda, GSK3 β β -katenin proteinini fosforiller. β -katenin, GSK3 ve APC ile kompleks olan axin (scaffolding protein) ile ilişkilidir. kompleksin oluşumu GSK3'ün etki etmesini kolaylaştırarak β -kateninin fosforilasyonunun artmasına neden olur. β -katenin fosforillendiğinde hücre içinde yıkıma uğrar ve sitoplazmada birikmez. Wnt ligandı, frizzled reseptörüne bağlandığında, dishevelled membranda alıkonur. Dvl, Axinin, Axin-APC-GSK3 β kompleksinden ayrılmasına neden olur ve β -katenin'in GSK3 β tarafından fosforillenmesini engeller. Böylece sitoplazmadaki β -katenin seviyesinin artışına izin verilir ve sonuç olarak β -katenin nukleusa geçer. TCF/LEF transkripsiyon faktörü ile etkileşerek c-myc, siklin D gibi belirli hedef genleri aktive etmek için TCF ve LEF ile etkileşir (13).

β -katenin onkogen olarak etki gösterebilir (51). Bazal hücre karsinomu olan insanlarda artmış β -katenin üretimi kaydedilmiştir. Ayrıca artmış β -katenin üretimi, ilgili tümörün hücre çoğalmasında artışa yol açar (52).

2.3.6 APC

APC geni, çeşitli fetal ve yetişkin insan dokusunda ekprese edilen, çoklu domain içeren 2843 amino asitlik büyük bir proteini kodlamaktadır. Wild-type protein yaklaşık 310 kDa büyüklüğündedir ve farklı fonksiyonel domainler içermektedir(53).

Adenomatous polyposis coli (APC) proteini, ilk başta insan kolon kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak keşfedilmiştir. Bunun ardından proteinin, Wnt sinyalinde β -katenin'in kararlılığını artırdığı keşfedilmiştir(54).

2.3.7 TCF/LEF

TCF/LEF, DNA bağlayan transkripsiyon faktör ailesidir ve β -katenin aracılı gen regülasyonunun önemli bir bileşenidir. *Drosophila*' da ve *C. Elegans*' da tek TCF geni bulunurken memelilerde Tcf-1, Tcf-3, Tcf-4 ve Lef-1 olmak üzere dört aile üyesi vardır. TCF/LEF ailesi proteinleri DNA' ya 'High mobility group (HMG)' birimi aracılığıyla bağlanırlar. Bu HMG birimi, TCF proteinlerinin DNA' da AGA/TA/TCAAAG olarak tanımlanan korunmuş motife özgül bir şekilde bağlanmalarına olanak sağlar(55).

Wnt sinyali yokluğunda, Tcf proteinleri, hedef genlerin promotör ve kuvvetlendirici (enhancer) dizilerindeki AGA/TA/TCAAAG motifi ile etkileşir ve DNA'nın çarpıcı biçimde 90 dereceden fazla eğilip, katlanmasına neden olur. β -katenin yokluğunda TCF, histon deasetilasyonunu ve kromatin yoğunlaşmasını teşvik eden represör protein Groucho (insanda TLE1) ile etkileşerek gen ekspresyonunu baskılar (56).

β -katenin nukleusa girdikten sonra, TCF' nin N-terminal ucuna bağlanır ve TCF' yi transkripsiyonel aktivatöre dönüştürür (57). β -katenin bunu, Groucho eş-baskılayıcısını (co-repressor) Tcf'den ayırarak ve Wnt hedef genlerinde bölgesel kromatin yapısında değişiklikler yapabilecek çeşitli proteinleri bir araya getirerek başarır (58).

2.3.8 Glikojen Sentaz Kinaz 3 (GSK3)

Glikojen Sentez Kinaz 3 (GSK3) ilk olarak 1980'de Embi ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (59). GSK3, mayadan insana kadar uzanan geniş bir canlı aralığında oldukça korunmuş bir proteindir. GSK3 proteinleri glukoz metabolizmasında anahtar düzenleyici enzimler olarak tanımlanmış serin/treonin kinazlardır. Memeliler GSK3 α (51kDa) ve GSK3 β (47kDa) olmak üzere farklı genlerden iki izoform eksprese etmektedirler. Bu izoformların katalitik birimleri %97 aminoasit dizi benzerliği içermektedir (60). Keşiflerinden bu yana GSK3'lerin, aralarında Wnt sinyal yolağının da bulunduğu çeşitli sinyal yolaklarında, önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir (61). Bir çok çalışma GSK3 regülasyon bozukluğunun, özellikle yüksek aktivasyonunun (hyperactivation), obezite, diyabet, enflamasyon, nörolojik bozukluklar ve tümör oluşumu gibi patolojik durumlara neden olduğu bilinmektedir (60).

Yeni kanıtlar GSK3'ün nörogenez, nöronal migrasyon, nöronal polarizasyon ve akson büyümesi gibi süreçlerde anahtar düzenleyici enzim olduğunu ortaya koymaktadır (62). GSK3'ün substratları; cyclic AMP response element (CREB), Nucleer Factor activated T

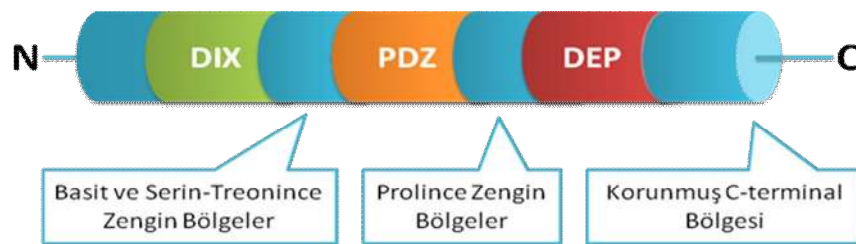
cells (Nfat) protein ailesi, neurogenin 2, SMAD1, c-Jun ve β -katenin gibi birçok transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörlerinin hepsi sinirsel gelişim sürecinde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (63). GSK3, yukarıda sayılan transkripsiyon faktörlerini, onların protein seviyelerini, DNA bağlama aktivitelerini ve nükleer lokalizasyonlarını değiştirerek kontrol eder. Bu faktörlerden birçoğu GSK3 ile fosforile edildikten sonra (β -kateninde olduğu gibi) proteozomal yıkıma uğrar (73).

2.3.9 Dishevelled (Dsh/Dvl)

Dishevelled (Dsh) ilk olarak *Drosophila*'da, kanat kılları ve gövdede yönelim bozukluğu fenotipine dayanılarak tanımlanmıştır (64). Dishevelled proteini *Hydra*'dan insana kadar birçok canlının gelişimsel sürecinde yer almaktadır.

İnsanda ve farede üç Dsh homologu (Dvl 1, 2 ve 3) tanımlanmıştır. Bu proteinler yaklaşık 750 amino asitten oluşmaktadır ve yüksek dizi homolojisine sahiptirler (64). Dvl proteinlerinin; amino terminal DIX (80 amino asit), merkez PDZ (90 amino asit) ve karboksil terminal DEP (80 amino asit) olmak üzere üç korunmuş birimi vardır. Ayrıca, temel bölge ve prolin zengin bölge olmak üzere diğer iki korunmuş bölgelerin protein-protein etkileşiminde ve/veya fosforilasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (şekil.6) (25).

Wnt sinyal iletiminin anahtar bileşeni olan Dishevelled (Dsh/Dvl) proteini, Wnt sinyalini, reseptörlerden alt akım proteinlerine (effector) aktarır. Dvl'in Wnt sinyal iletimi ve embriyogenezdeki önemi fazlasıyla kabul görmüştür. Kanonikal Wnt yolağında, Dvl Frizzled reseptör tarafından alıkonur ve sitozolik β -katenin yıkılımını önler.(24)



Şekil. 6 Dishevelled proteininin korunmuş birimleri

2.4 Programlanmış Hücre Ölümü

Programlanmış hücre ölümü çok hücreli canlılarda istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için evrimleşmiş kontrollü, programlı ve fizyolojik bir hücre ölüm sürecidir(65). Bir hücre ölüm mekanizması olarak apoptozun en ilginç özelliği apoptotik süreçte çevresel dokunun bu yıkımdan etkilenmesinin tamamen engellenmesidir. Apoptotik hücre ölümünü nekrotik hücre ölümünden ayıran bu durum, hücre ölümü sırasında ortaya çıkan hücresel bileşenlerin membran ile çevrili apoptotik cisimcikler adı verilen veziküller halinde komşu hücreler (fagositler) tarafından yutularak (fagositoz) enflamasyona neden olmadan ortadan kaldırılması ile karakterize edilmektedir (66, 67). Apoptotik süreç sırasında hücrelere dışarıdan bakıldığında hücrenin büzülerek tomurcuklandığı (*blebbing*) ve nihayetinde bu tomurcukların ayrı apoptotik parçacıklar halinde çevreye yayıldığı gözlemlenir. Hücrelerin içerisinde ise pek çok karakteristik değişim meydana gelmektedir. Bu hücresel değişimlerden ilk dikkat çeken nükleusun yoğunlaşması ve DNA'nın her biri yaklaşık 200 baz çiftinden oluşan nükleik asit kalıntılarına parçalanmasıdır (fragmentasyon) (65, 68). Diğer organellerde de benzer dramatik değişimler görülmektedir. Mitokondride dış membran geçirgenleşmektedir ve bu süreç apoptoz sırasında gerçekleşebileceği gibi başlı başına apoptozu tetikleyebilme kabiliyetine de sahiptir (69). Hücre iskelet elemanlarının spesifik kesimi ve protein sentezinin inhibisyonu da hücresel değişimler arasındadır (70). Hücre membranında da hem tomurcuklanmanın gerçekleşebilmesi için hem de fagositik sinyallerin membranın ekstrasellüler yüzüne çıkabilmesi için çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir (84,85). Bir arada düşünüldüğünde bu değişimler hücresel yaşam destek sistemlerinin birer birer kapatılması ve hücrenin fizyolojik ölüm sürecine hazırlanmasıdır (86).

Programlanmış hücre ölümü sürecinde yüzlerce proteinin proteolitik kesimi hem yukarıda sayılan organel düzeyindeki değişimleri organize etmektedir hem de apoptotik sinyalin hücresel yayılımını sağlamaktadır. Bu proteolitik kaskad, kaspazlar adı verilen bir grup sistein-aspartat proteaz tarafından başlatılmakta ve yürütülmektedir (71). Kaspazlar sağlıklı hücrelerde inaktif enzim öncülleri (zimojen) olarak bulunmaktadır ve proteolitik aktiviteleri çok azdır ya da hiç yoktur (pro-kaspaz) (72). Buna karşın apoptozun tetiklendiği yolların tamamında kaspaz aktivasyonu gözlemlenmektedir. Kaspazlar apoptozun görev aldıkları aşamasına göre isimlendirilmektedir. Apoptotik sürecin tetiklenmesinde görev alan kaspazlar başlatıcı (kaspaz-8,-9), yürütülmesinde görev alan kaspazlar ise efektör (kaspaz-3,-

6,-7) olarak adlandırılır. Apoptozun tetiklenmesi iki temel yolak üzerinden gerçekleşmektedir. Hücre dışı sinyaller ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 gibi) ekstresek yolağı, hücre içi sinyaller aracılığıyla aktifleşen başlatıcı kaspazlar ise (kaspaz-9 gibi) intrinsek yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Başlatıcı kaspazlar aracılığıyla aktifleşen efektör kaspazlar hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak keserek apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir (73)

Ekstresek yolak ya da ölüm-reseptörü yolağı, FasL (Fas ligandı) ya da TNF α (*tumor necrosis factor*) gibi ekstrasellüler bir ölüm ligandının hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanması ile aktifleşir (70). Ligandın ölüm reseptörüne bağlanması, reseptörün sitoplazmik kısmına sırasıyla FADD ve pro-kaspaz-9 proteinlerinin bağlanmasını tetikler (74). Oluşan ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (*death-inducing signaling complex*-DISC) kaspaz-8'i aktifleştirir (75). Aktif kaspaz-8 başta pro-kaspaz-3 olmak üzere efektör kaspazları keserek aktifleştirmeye başlar. Sinyalin efektör kaspazlara iletimi proteolitik bir yıkım kaskadını ve nihayetinde apoptotik hücre ölümünü tetikler (Şekil.7).

Intrinsek yolak ya da mitokondriyal yolak ise çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dışı membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda aktifleşir (70). Böylece membranlar arası alanda bulunan çeşitli proteinler ve özellikle de sitokrom c sitoplazmaya salınır. Sitoplazmik sitokrom c, sitoplazmada bulunan Apaf-1 ve pro-kaspaz-9 proteinleri ile apoptozom adı verilen bir kompleksi oluşturur. Apoptozom kompleksi kaspaz-9'u aktifleştirir ve apoptotik sinyal efektör kaspazlara iletilir (Şekil.7) (76).

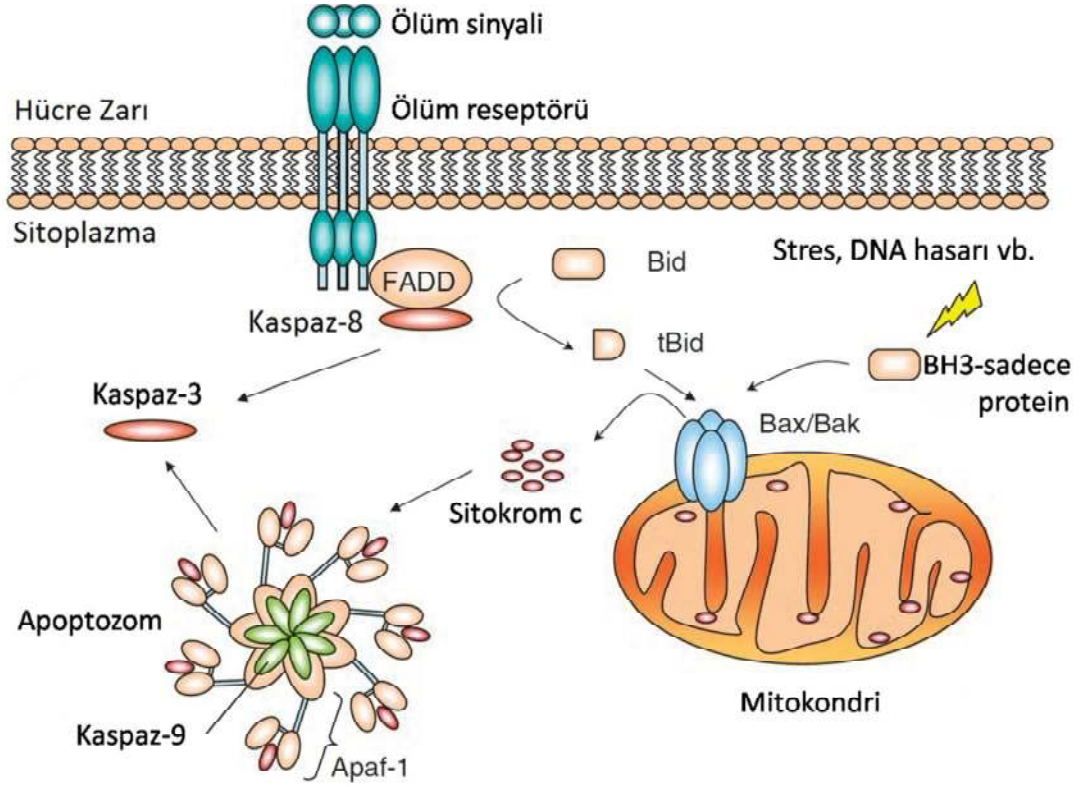
Apoptoz hangi yolak üzerinden tetiklenirse tetiklensin efektör kaspazların aktivitesi ile sonuçlanmaktadır. Efektör kaspazların aktiviteleri apoptozun karakteristik moleküler ve morfolojik sonuçlarının tamamını kapsamaktadır. Özellikle kaspaz-3 aktivitesi tüm bu değişimler için gereklidir. Bu nedenle kaspaz-3 proteini sıklıkla apoptozun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Efektör kaspazların çeşitli aktiviteleri aşağıda listelenmiştir (77).

- ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) proteinin kaspaz-3 aracılı proteolitik yıkımı CAD (*caspase-activated DNase*) proteininin DNA fragmentasyonunu gerçekleştirmesini sağlamaktadır. Kaspazlar bu süreçte nükleer laminleri de hedefleyerek nükleusun kondenzasyonunu sağlamaktadır (78).

- Apoptozun bir başka göstergesi olan tomurcuklanma da ROCK1 proteininin kaspaz-aracılı aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (79). Tomurcuklanma sürecinde diğer

organellerin ve sitoiskelet elemanlarının kaspazlar tarafından doğrudan hedeflenerek yıkılması söz konusudur (70).

- Hücrenin kendi kendini kapatma sürecinin bir parçası olan protein sentezinin inhibisyonu da kaspazların başta eIF (*eukaryotic initiation factor*) proteinleri olmak üzere protein sentezi ile ilişkili pek çok protein kaspazlar tarafından hedeflenmektedir (80).



Şekil. 7 Apoptozun tetiklenmesi (98)

2.5 WNT Sinyali ve Apoptoz

Wnt-Frizzled sinyal yolağı nöron, endotel, vasküler düz kas ve kardiyomiyosit gibi çeşitli hücre populasyonlarında hem gelişim hem de hasar (injury) süreçlerinde apoptozu kontrol etmektedir (6). Hücrelerin büyümesi sürecinde, Wnt sinyal iletimi var olan çevresel uyaranlara bağlı olarak apoptozu kolaylaştırır veya engeller (81).

Farklı organizmalarda yapılan birçok çalışma Wnt-Frizzled sinyal yolağının apoptozu, Wnt-BMP, Wnt- β -katenin, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), GSK3 β -NF- κ B sinyal yollarını, salgılanmış Frizzled-ilişkili protein-2 (Secreted frizzled-related protein2-SF) ekspresyonunu ve insan 'Dickkopf-1'(hDkk-1), nemo, sox 10 ve tau gibi gen ifadelerini içeren çeşitli mekanizmalar (gen ifadeleri ve moleküller) üzerinden düzenlediğini göstermektedir (6).

Wnt 1 iyi araştırılmış bir wnt ailesi üyesidir ve apoptoz sürecinin kontrolü ile ilişkilendirilmektedir (82). Wnt1 ekspresyonundaki artış hücreleri c-myc ile tetiklenen apoptozdan, β -katenin, siklooksijenaz ve 'Wnt1 induced secreted protein' (WISP-1) sinyalinin tetiklenmesi aracılığıyla korur (83). Wnt1, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını engelleyerek ve kaspaz-9 aktivitesini inhibe ederek apoptozu baskılayabilmektedir(82). APC geni de apoptozu regüle etmek için bir başka mekanizma sunmaktadır. APC' nin β -katenin seviyesini düşürmesi Tcf/Lef transkripsiyon faktörlerinin down regülasyonuna yol açar (84). Tcf/Lef aktivitesi olmadan, APC kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 aktivasyonuna neden olur ve bu proteinler aracılığıyla poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP) kesimi ve sonuç olarak apoptoz gerçekleşir (85).

sFRP2, 'secreted Frizzled-related proteins' ailesi üyelerinden biridir ve 'secreted apoptosis-related protein 1' (SARP1) olarak da bilinmektedir (86). Wnt sisteminde çevresel etkenlerin apoptozun regülasyonuna etkisine örnek olarak, dejeneratif hastalık süreçlerinde sFRP2'nin artan apoptoz ile ilişkili olması gösterilebilir. Fotoreseptörlerin apoptoz aracılı ölümü ile karakterize edilen retinitis pigmentosa hastalığında sFRP2 ekspresyonunun retinal dejenerasyon bölgelerinde arttığı belirlenmiştir. Bu veri nörodejeneratif hastalıklarda Wnt sinyalinin nörodejeneratif hastalıklar sırasında baskılanmasının hücre hasarına neden olduğunu göstermektedir (87). Benzer şekilde Dkk-1 ve Nemo da sFRPler gibi Wnt antagonistleridir ve Wnt-Frizzled sinyal yolağının baskılanması aracılığıyla apoptozu

tetiklemektedir (88). Dkk-1'in dışarıdan hücelere verilmesinin Wnt-Frizzled sinyalinin engellenmesi aracılığıyla apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (89).

Ek çalışmalar, wnt sinyal yolağının, NF- κ B sinyalinin aktifleştirip GSK3- β proteinini inhibe ederek apoptoz sürecini kısıtladığını ve sağ kalımı artırdığını göstermektedir (90). GSK3- β knock-out farelerin hepatosit apoptozundan dolayı rahim içi (*in-utero*) öldükleri ve GSK3- β geni olmayan hücelerde NF- κ B seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Buna göre, GSK3- β fonksiyonu, NF- κ B aracılı sağ kalım için gereklidir(53).

2.6 Bildirici Vektör Deney Sistemi

Reporter vektörler (bildirici vektör) gen ekspresyon çalışmalarının vazgeçilmez araçlarıdır. Moleküler biyoloji alanında ve biyokimyada ayrıca biyomedikal ve farmasötik araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bildirici deney sistemleri; promotör ve enhancer dizileri, transkripsiyon faktörleri, mRNA işlenmesi ve translasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte transfeksiyon veriminin belirlenmesinde ve protein-protein etkileşimlerinin incelenmesinde de kullanılmaktadır.

Bir gen temel olarak iki fonksiyonel kısımdan oluşmaktadır: Biri üretilen protein hakkında bilgi verecek olan DNA dizisidir (kodlayan bölge). Diğer kısım ise kodlayan bölgeye bağlı ve genin transkripsiyonunu düzenleyen spesifik DNA dizisidir (promotör).

Yaygın kullanılan bildirici genler β -galaktozidaz, β -glukuronidaz ve lusiferazdır. İfade edilen bildirici gen proteinini ölçmek için birçok saptama metodu kullanılmaktadır. Bunlar luminesans, flouresans ve absorbans ölçümüne dayalı saptama teknikleridir.

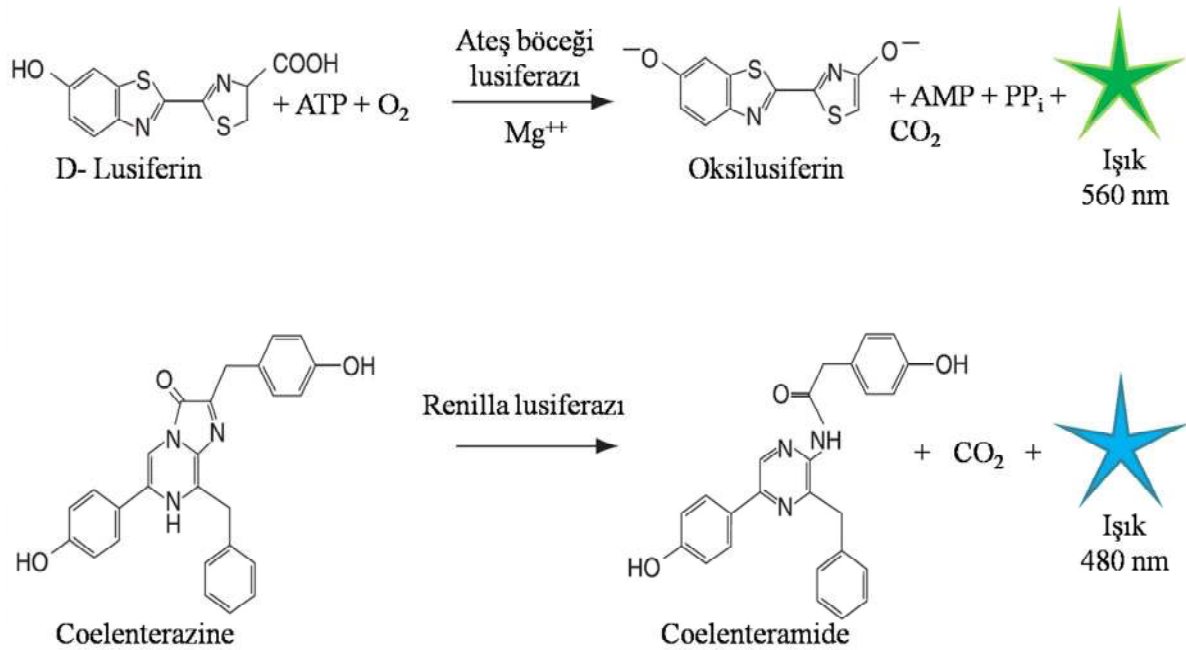
2.6.1 Lusiferaz Bildirici Gen Analizi (Luciferase Reporter Gene Assay)

Lusiferaz analizinin avantajları yüksek duyarlılık, lusiferaz aktivitesinin hücre tiplerinin büyük çoğunluğunda olmayışı, hızlı ve düşük maliyetli olmasıdır. Kuzey Amerika’da yaşayan bir tür olan *Photinus pyralis* (ateş böceği) lusiferazı en yaygın kullanılan bildirici gendir(91). Lusiferaz proteini enzim aktivitesi için translasyon sonrası modifikasyonlar gerektirmez, toksik değildir, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde kullanılabilir. Ateş böceği lusiferazı; ATP, Mg^{++} ve oksijen varlığında lusiferinin yükseltgenme reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon sonucu biyolojik bir ışık yayımı (bioluminesans) gerçekleşir (şekil.8) (92).

2.6.2 İkili Lusiferaz Bildirici Gen Deney Sistemi (Dual Luciferase Reporter Gene Assay)

İkili Lusiferaz Bildirici gen analizi her bir hücrede eş zamanlı ifade edilen iki farklı lusiferaz bildirici enzimlerini içeren sistemlerdir. Ateş böceği lusiferazı ve *Renilla* (deniztavşanı) lusiferazı görece biyoluminesans substratlarından ayırt edilebilir ve cross-aktiviteleri yoktur.

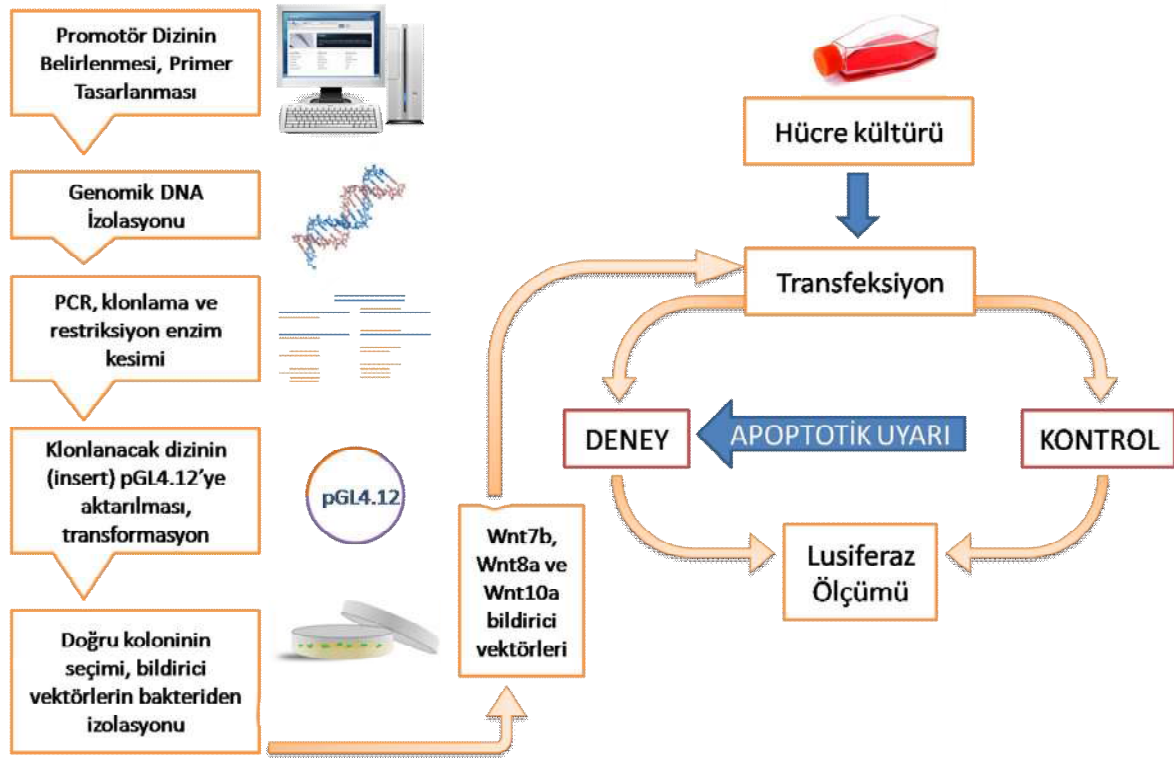
Ateş böceği lusiferazı 61 kD ağırlığında tek alt birimli enzimdir. Lusiferin substratının iki basamakta oksidasyon (yükseltgenme) reaksiyonunu katalizler ve bu reaksiyon 560 nm’de ışık yayımlar. İlk adım reaktif geçiş anhidrit molekülünü oluşturmak için ATP ile proteinin aktivasyonudur. İkinci adım, aktif geçiş molekülü oksijenle birlikte, hızlı bir şekilde yıkılarak oksi-lusiferin ürününü ve karbondioksit ile birlikte ışık demeti veren geçici dioksetan molekülünü oluşturur (93). Renilla lusiferazı 31 kD ağırlığında tek alt birimli bir enzimdir. ‘Coelenterazine’ substratını ‘coelenteramide’ molekülüne yükseltgenme reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyonda karbondioksit çıkışının yanı sıra 480 nm’de mavi ışık yayımı gerçekleşir (Şekil.8) (94).



Şekil.8 Firefly ve Renilla lusiferazı tarafından gerçekleştirilen bioluminesans reaksiyonu

3 YÖNTEMLER

Bu çalışmada istenen verilerin elde edilmesi için yapılan deneyler ve sırası Şekil.9' da verilen şemada yer almaktadır.



Şekil.9 Deney akış şeması

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu araştırmada klinik bir çalışma yer almamaktadır. Bu alışma, ticari Kelly hücre hattında oluşturulan apoptotik uyarı sonucunda bazı genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri ölçmeye yönelik deneysel tekniklerin kullanıldığı bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Deneysel uygulamalar Dokuz Eylül Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında 2009-2010 arasında yapılan çalışmalar ile yürütülmüştür.

3.3 Araştırmanın Evreni

Sentetik olarak sentezlenen PCR primerleri ile ilgili Wnt genlerinin promotör dizileri elde edildi. Bu diziler kullanılarak Kelly hücreleri transfekte edildi ve apoptotik uyarıcı varlığında promotör dizilerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

3.4 Çalışma Materyali

İnsana yada deney hayvanına ait herhangi bir materyal kullanılmamıştır. Denemelerde ticari Kelly hücre hattı ve kompetan *E.coli* dh5 suşu kullanıldı.

3.5 Araştırmanın değişkenleri

Araştırmanın değişkeni bulunmamaktadır.

3.6 Veri toplama araçları

3.6.1 Hücre Kültürü

İlerleyen çalışmalar da kullanılmak üzere, Kelly hücre hattının büyütülmesi ve devamlılığı aşağıda verilen kültür koşulları uygulanarak sağlandı.

Gereçler:

1. Inverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon-Diaphot 200)
2. Pipetör (Greiner Labortechnik 000424NS- 9)
3. 1, 2, 5 ve 10 ml'lik steril pipetler (LP Italiana spa sterile plastic pipette)
4. 25, 75, 125 cm² 'lik hücre kültürüne özel filtreli flasklar (Greiner Bio-one, Ürün kodu: 690175)
5. CO₂ inkübatörü
6. RPMI 1640 besi ortamı (BiochromAG, Ürün kodu: FG 1385)
7. FBS (Fetal Bovine Serum) (Biochrom AG, Ürün kodu: S0115)
8. L-Glutamin (Biochrom AG, Ürün kodu: KO281)
9. Penisilin /Streptomisin (Biochrom AG, Ürün kodu: A 2210)
10. Steril çalışma kabini

Yöntem:

Kelly hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %15 oranında FBS içeren DMEM içerisinde tek tabaka olarak üretilmiştir. Hücreler kültür flasklarının yüzeyini % 70 oranında kapladıkça pasajlanmıştır. Hücre pasajlamalarında, hücreleri kaldırmak için Trypsin /EDTA (%0.05 / %0.02) solüsyonu kullanılmıştır. Tüm işlemler, steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu, 37 °C'de ve % 5 oranında CO₂ bulunan etüvde yapılmıştır.

3.6.2 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA, 'DNeasy Tissue Isolation' (Qiagen #69508) kiti kullanılarak kültürde büyütülen Kelly hücre hattından izole edilmiştir. Yöntem kit içeriğindeki kullanım klavuzunda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Gereçler:

1. Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge, 5417 R)
2. DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL)
3. Fosfat tuz tamponu (PBS) (pH 7,2, 50mM potasyum fosfat; 150 mM NaCl) (Biochrom AG, Ürün kodu:L1825)
4. Etil alkol (%96-100) (Merck, K35815971 610)
5. Su banyosu (Pharmacia Biotech, Multi temp III)
6. Karıştırıcı (VELP scientifica)
7. 'DNeasy Tissue Isolation' kit (Qiagen #69508)

Kit içeriği:

- Filtre tüpleri
- 2 ml'lik toplama tüpleri
- AL Lizis Tamponu
- AW1 Yıkama Tamponu
- AW2 Yıkama Tamponu
- AE Elüsyon Tamponu
- Proteinase K

Yöntem:

i. Çalışma tamponlarının hazırlanması:

Çalışmada kullanılacak tamponlar, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı. Kullanmaya başlamadan önce AW1 yıkama tamponuna 25 ml, AW2 yıkama tamponuna 30 ml saf etil alkol eklendi.

ii. Genomik DNA izolasyonu:

1. 5×10^6 adet hücre içeren kültür, 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücrelerin üzerine 200 µl PBS eklenerek hücre çökeleği süspanse edildi.

2. Birinci basamakta hazırlanan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 20 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi.
3. Üzerine 200 µl AL lizis tamponu eklenmiştir. Karıştırıcı kullanılarak, tüp içeriğinin (hücreler, proteinaz K ve lizis tamponu) iyice karışması saplandı.
4. Bu karışım su banyosunda 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. Üzerine 200 µl saf etil alkol eklendi. Karıştırıcı ile homojenize edildi.
6. Filtre kolonu, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek, beşinci basamaktaki karışım filtre tüpünün içerisine eklendi. 6000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen sıvı ile birlikte atıldı.
7. Filtre kolonu, yeni bir 2 ml 'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl AW1 yıkama tamponu eklendi. 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Filtre tüpünden alta geçen süzüntü atıldı.
8. 500µl AW2 yıkama tamponu eklendi. 20000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen süzüntü ile birlikte atıldı.
9. Filtre kolonu, yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Filtre kolonu membranı üzerine 200 µl AE elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1dakika inkübe edildi. Ardından 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Filtrasyon kolonunda membrana bağlanmış olan DNA, 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne alındı.

iii. *DNA miktar tayini:*

İzole edilen genomik DNA'dan uygun oranlarda dilüsyonlar hazırlanarak, Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 model spektrofotometre kullanılarak 260 ve 280 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

$$\text{DNA konsantrasyonu} = A_{260} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 50\mu\text{g/ml}$$

A_{260} / A_{280} hesaplanarak DNA'nın saflık derecesinin 1.8-2.0 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.6.3 Klonlama Amaçlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlgili genin klonlanacak olası promotör dizileri NCBI veri tabanından yararlanılarak gDNA’ da bulundu. Başlangıç kodonu (ATG) hariç tutularak üst akış yönündeki yaklaşık 1000 bazlık bölge promotör dizi olarak kabul edildi. Belirlenen promotör dizilerinde, restriksiyon enzim kesim yerleri, klonlama için kullanılacak bildirici vektörün ‘çoklu kesim bölgelerindeki’ (multiple cloning site) kesim yerleri göz önüne alınarak oluşturuldu. Bu şekilde, içerisinde restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren olası promotör dizilerine uygun primerler OLIGOS programı kullanılarak tasarlandı.

Buna göre, seçilen Wnt genlerinin promotör bölgelerine spesifik diziler (primerler) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR primerlerinin dizileri ve klonlama için kullanılacak restriksiyon enzimleri Tablo.1 de verilmiştir.

Tablo.1 Promotör klonlama için kullanılacak PCR primerleri ve restriksiyon enzimleri

Gen	Primerler ve PCR ürünü (bç)	Restriksiyon enzimleri
Promotör Wnt7b	5’tgggc tagcg caggt ggcag 3’ 5’gttc taagc ttgat ccagg ga 3’ PCR ürün 985bç	Nhe I (Fermentas, FD0973) Hind III (Fermentas,FD0504)
Promotör Wnt8a	5’-gtgtggtggctagcacctgtagtct-3’ 5’-aggttcagatctccctgectacc-3’ PCR ürünü 961bç	Nhe I Bgl II (Fermentas, FD0074)
Promotör Wnt10a	5’-aggtctccgctagcaggagcagga-3’ 5’-gcgctgctcgaggcgccaggc-3’ PCR ürünü 998bç	Nhe I Xho I (Fermentas, FD0694)
Promotör Wnt1	5’-ccacttgagctcttcttctgg-3’ 5’-ccagagctcgaggcctgcctg-3’ PCR ürünü 880bç	Sac I (Fermentas, FD1133) Xho I
*Promotör Wnt1	5’-agaacaaggagctcctgcacgtacc-3’ 5’-ccagagctcgaggcctgcctg-3’ PCR ürünü 1010bç	Sac I Xho I
Promotör Wnt4	5’-cagactcgagaccctgctgc-3’ 5’-cgagcggggaagcttggtgccgcc-3’ PCR ürünü 970 bç	Hind III Xho I
*Promotör Wnt4	5’-agcgtcttgagctcacttcccga-3’ 5’-agcggggaagcttggtgccgcc-3’ PCR ürünü 1010bç	Sac I Hind III

Promotör Wnt5a	5'-gagagagctctggggagggca-3' 5'-ggaagagatctcactccagccat-3' PCR ürünü 1019bç	Sac I Bgl II
Promotör Wnt7a	5'-cgccgctagcgctctgag-3' 5'-cgggtgatatcccgattgg-3' PCR ürünü 951 bç	Nhe I Eco RV (Fermentas, FD0303)

(*) İkinci kez tasarlanmış primer setleridir.

Gerekli cihazlar ve kimyasallar:

1. Mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin)
2. Thermal Cyclers (Eppendorf mastercycler personal)
3. 0,2 ml'lik tüp
4. Otomatik pipet seti
5. Diziye özgül primerler
6. Fast Start Taq DNA polimeraz PCR seti
7. dNTP mix (Promega, U1511)

Yöntem:

Wnt7b olası promotör dizisi için Tablo.2' deki kimyasallar belirtilen hacimlerde 0,2 ml'lik tüpe konularak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri, reaksiyonun gerçekleşmesi için 'Thermal Cycler' cihazına konuldu ve Tablo.3' de verilen ısı profili kullanılarak cihaz çalıştırıldı.

Tablo.2 Promotör Wnt7b için polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

Kimyasal	Hacim (µL)	Son Derişim
dH ₂ O	13.1	
10X PCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20mM MgCl ₂	2.5	1X
MgCl ₂ çözeltisi (25mM)	-	-
5' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
3' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
dNTP mix, 10 mM	1.0	200 µM
Taq DNA Polimeraz	0.4	2U
DNA	1.0	
5X GC zengin çözelti	5.0	1X
Toplam hacim	25.0	

Tablo.3 Promotör Wnt7b için PCR ısı profili

Denatürasyon	95°C	5 dak	1 döngü
Denatürasyon	95°C	40 sn	35 döngü
Bağlanma	56°C	40 sn	
Uzama	72°C	40 sn	
Son uzama	72°C	5 dak	1 döngü

Wnt8a olası promotör dizisi için Tablo.4'deki kimyasallar belirtilen hacimlerde 0,2 ml'lik tüpe konularak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri reaksiyonun gerçekleşmesi için 'Thermal Cycler' cihazına konuldu ve Tablo. 5'de verilen ısı profili kullanılarak cihaz çalıştırıldı.

Tablo.4 Promotör Wnt7b için PCR ısı profili

Kimyasal	Hacim (µL)	Son Derişim
dH ₂ O	13.1	
10X PCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20mM MgCl ₂	2.5	1X
MgCl ₂ çözeltisi (25mM)	-	-
5' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
3' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
dNTP mix, 10 mM	1.0	200 µM
Taq DNA Polimeraz	0.4	2U
DNA	1.0	
5X GC zengin çözelti	5.0	1X
Toplam hacim	25.0	

Tablo.5 Promotör Wnt8a için PCR ısı profili

Denatürasyon	95°C	5 dak	1 döngü
Denatürasyon	95°C	40 sn	
Bağlanma	56°C	40 sn	35 döngü
Uzama	72°C	40 sn	
Son uzama	72°C	5 dak	1 döngü

Wnt10a olası promotör dizisi için Tablo.6'daki kimyasallar belirtilen hacimlerde 0,2 ml'lik tüpe konularak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri reaksiyonun gerçekleşmesi için 'Thermal Cycler' cihazına konuldu ve Tablo.7'de verilen ısı profili kullanılarak cihaz çalıştırıldı.

Tablo.6 Promotör Wnt10a için polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

Kimyasal	Hacim (µL)	Son Derişim
dH ₂ O	18.0	
10X PCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20mM MgCl ₂	2.5	1X
MgCl ₂ çözeltisi (25mM)	-	-
5' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
3' ileri primer (10pmol)	1.0	0,4 pmol
dNTP mix, 10 mM	1.0	200 µM
Fast Start Taq DNA Polimeraz	0.5	2U
DNA	1.0	
Toplam hacim	25.0	

Tablo.7 Promotör Wnt10a için PCR ısı profili

Denatürasyon	95°C	5 dak	1 döngü
Denatürasyon	95°C	45 sn	
Bağlanma	56°C	30 sn	35 döngü
Uzama	72°C	60 sn	
Son uzama	72°C	7 dak	1 döngü

3.6.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Klonlama amaçlı elde edilen PCR ürünleri büyüklükleri ve özgülükleri açısından değerlendirilmek üzere % 1'lik agaroz jelde 110 volt gerilim altında yürütüldü. 0,3 gr agaroz 30 ml 0,5X tris-borik asit-EDTA (0,5XTBE) tamponuna eklendi. Mikrodalga fırında 2 dakika yüksek ısıda agarozun iyice çözünmesi sağlandı. Agaroz çözeltisine son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Hazırlanan jel, jel döküm tablasına dökülerek ve tarak yerleştirildi. Jel soğuduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Hazırlanan jel, içinde 0,5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

Jelde yürütülecek örnekler, 6X jel yükleme tamponu (6X Orange DNA LOading Dye, Fermentas R0631) ile karıştırılarak birbirlerine sızma olmayacak biçimde kuyulara yüklendi. Genellikle 100 veya 110 votluk sabit gerilim altında elektroforez işlemi başlatıldı. DNA örneklerinin baz çifti uzunluklarının belirlenebilmesi için örnekler ile birlikte jele uygun DNA belirteci de yüklendi(GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas SM0313;O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder, Fermentas SM0643; O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder,Fermentas SM0633). Elektroforez sonucunda jeldeki DNA bantları "Vilber Lourmat INFINITY Bio-1D" sistemi ile görüntülendi.

3.6.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Kesilip Saflaştırılması

Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a olası promotör dizileri olan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden kesildi. MN Nucleospin Extract II (ürün kodu:740 609 50) kiti kullanılarak, kitin protokolüne uyularak jelden kesilen örnekler saflaştırıldı.

Gerekli cihazlar ve kimyasallar:

1. 'MN Nucleospin Extract II' kit(ürün kodu:740 609 50)
2. Steril bisturi
3. 1,5 ml'lik eppendorf tüp
4. 50 ° C'ye ısıtılmış su banyosu
5. Vorteks
6. Mikrosantrifüj

Kit içeriği:

- NT Tamponu
- NT3 Tamponu
- NE Tampon
- 2 ml'lik toplama tüpleri
- Ekstraksiyon kolonları

Yöntem:

i. Çalışma tamponlarının hazırlanması:

Çalışmaya başlamadan önce, kit içeriğinde olan kullanım klavuzu doğrultusunda çalışma tamponları hazırlandı. NT3 tamponuna 24 ml % 96'lık etanol eklendi.

ii. Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu:

1. Steril bistüri ile UV ışık altında görülen bant kesilerek steril tüpe alındı.
2. 200 µL NT tamponu eklendi. Örnek 50 °C'de jel parçası tamamen eriyene kadar yaklaşık 10 dakika inkübe edildi. Her 3 dakikada bir vortekslendi.
3. Ekstraksiyon kolonu 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve örnek kolona yüklendi. 11,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Ekstraksiyon kolonu yeni bir toplama tüpüne alındı.
4. 600 µl NT3 tamponu eklendi. 11,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Ekstraksiyon kolonu yeni bir toplama tüpüne alındı.
5. Kolondaki silika membranın kuruması ve NT3 tamponunun tamamen uzaklaşması amacıyla 11,000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.
6. Ekstraksiyon kolonu steril eppendorf tüpe alındı. 25 µl NE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Örnek 11,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve saf PCR ürünü kolondan geri kazanıldı.

3.6.6 PCR Ürünlerinin ve pGL4.12 Vektörünün Restriksiyon Enzimi Kesimi

Elde edilen saflaştırılmış PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra klonlama yapabilmek amacıyla ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. PCR ürünleri olan

Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a promotör dizileri ve bu dizilerle birleştirilecek olan pGL4.12 bildirici vektörü Tablo.1’ de verilen uygun restriksiyon enzimleri ile kesildi.

3.6.6.1 Klonlama Amaçlı PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi

Tablo.8, 9 ve 10’da verilen kimyasallar belirtilen hacimlerde kullanılarak Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a olası promotör dizileri ‘Fast Digest, Fermentas’ restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Kesim işlemi ısıtıcı blok ve Tablo.11’ de verilen ısı profili kullanılarak yapıldı.

Tablo.8 Promotör Wnt7b dizisinin restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA	20
Fast Digest 10X tampon	3
NheI	0,5
HindIII	0,5
dH ₂ O	6
Toplam hacim	30

Tablo.9 Promotör Wnt8a dizisinin restirksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA	20
Fast Digest 10X tampon	3
NheI	0.5
Bgl II	0.5
dH ₂ O	6
Toplam hacim	30

Tablo.10 Promotör Wnt10a dizisinin restriksiyon enzim kesimi için reaksiyon karışımı

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA	20
Fast Digest 10X tampon	3
NheI	0.5
Xho I	0.5
dH ₂ O	6
Toplam hacim	30

Tablo.11 Restriksiyon enzim kesimi için kullanılan ısı profili

Sıcaklık (°C)	Süre
37 °C	10 dak.
65 °C	5 dak.

Restriksiyon enzim kesimi yapılan örnekler MN Nucleospin Extract II kiti kullanılarak 3.6.5’ de verilen protokolle saflaştırıldı ve %1’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.6.6.2 Klonlama amaçlı pGL4.12 vektörünün enzim kesim reaksiyonu

Klonlama için kullanılacak vektör DNA’sı klonlanacak dizilerin kesildiği aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi. Tablo.12, 13 ve 14’ de verilen restriksiyon enzimleri ve kimyasallar belirtilen hacimlerde kullanılarak 0,2 ml’lik tüpe reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon tüpü 37 ° C de 10 dakika inkübe edildi. Ardından 80 °C de 10 dakika inkübe edilerek restriksiyon enzimlerinin inhibe olmaları sağlandı.

Tablo.12 Promotör Wnt7b için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA (Vektör)	2
Fast Digest 10X tampon	2
NheI	1
Hind III	1
dH ₂ O	14
Toplam hacim	20

Tablo.13 Promotör Wnt8a için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA (Vektör)	2
Fast Digest 10X tampon	2
NheI	1
Bgl II	1
dH ₂ O	14
Toplam hacim	20

Tablo.14 Promotör Wnt10a için pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesimi

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA (Vektör)	2
Fast Digest 10X tampon	2
NheI	1
Xho I	1
dH ₂ O	14
Toplam hacim	20

3.6.6.3 pGL4.12 vektörünün defosforilasyonu

Restriksiyon enzim kesimi yapılmış pGL4.12 vektörünün 5' fosfat grubu 'Calf Intestine Alkaline Phosphatase' (CIAP, EF0341 Fermentas) kullanılarak uzaklaştırıldı. Tablo.15' de verilen kimyasallarla reaksiyon karışımı hazırlandı. 37 ° C de 30 dakika inkübe edildi.

Tablo.15 pGL4.12 vektör DNA'larının 5' fosfat grubunun uzaklaştırılması

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA	20
10X tampon	5
CIAP(Fermentas, FD0973)	1
dH ₂ O	24
Toplam hacim	50

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) enziminin inhibisyonu ve uzaklaştırılması:

Kullanılan CIAP enzimi, ligasyon gibi süreçleri engellediğinden, reaksiyon ortamından tamamen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için en uygun yöntem olan Fenol: Kloroform:izoamil alkol ekstraksiyonu ve etanol çöktürmesi ile vektör saflaştırıldı.

1. 5µL 0,5 M EDTA eklendi.
2. 65 °C de 30 dakika bekletildi.
3. 55 µL olan DNA çözeltisi dH₂O ile 100 µL' ye tamamlandı.
4. 100 µL fenol:kloroform:izoamil alkol karışımı (25:24:1) eklendi. (1/1)
5. 14000xg de 3 dakika santrifüj yapıldı.
6. Üst faz (90 µL) alındı ve üzerine 90 µL kloroform: izoamil alkol (24:1) eklendi.(1/1)
7. 14000xg de 3 dakika santrifüj yapıldı.
8. Üst faz alındı (70 µL) ve 7 µL 3M sodyum asetat (pH 5,2) eklendi. (1/10)
9. 140 µL % 100'lük buzda soğutulmuş etanol eklendi. (2 hacim)
10. -20 °C de bir gece bekletildi. (vektör olduğu için yoksa büyük DNA lar için birkaç saat yeterli)
11. 13,000 g +4 °C de 30 dakika santrifüjlendi.
12. Elde edilen DNA çökeleği üzerine 200 µL soğuk %70'lik etanol eklendi.
13. 13,000 g +4 °C de 5 dakika santrifüjlendi.
14. Etanol atıldıktan sonra örnek, etanolün tamamen uzaklaşması için 30 dakika 37 °C' lik etüvde bekletildi.
15. 25 µL distile suda örnek çözüldü, agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.6.7 Klonlama

3.6.7.1 Ligasyon

Ligasyon işlemi ile olası promotör dizileri ve pGL4.12 bildirici vektörünün bağlanması sağlandı. Ligasyon işlemi için 'Rapid DNA Ligation Kit' (Roche, ürün kodu:11. 635379 001)

kullanıldı. Tablo.16’ da verilen kimyasallar kullanılarak ligasyon işlemi için reaksiyon karışımı hazırlandı. Her kimyasal eklendikten sonra hafif pipetaj yapıldı. Reaksiyon tüpü 25 °C de 10 dakika inkübe edildi.

Tablo.16 pGL4.12 vektörü ile olası Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a promotör dizilerinin ligasyonu

Kimyasal	Eklenen Hacim (µl)
DNA (Vektör pGL4.12)	1
İnsert (ilgili promotör dizisi)	6
1X seyreltme tamponu	3
+	
5X Ligasyon tamponu	10
T4 DNA Ligaz	1
Toplam hacim	21

3.6.7.2 Transformasyon

Ligasyon ile elde edilen promotör diziyi içeren vektörler kompetan hücreye aktarıldı. Bu sayede promotör dizi-pGL4.12 plasmidlerinin bakteri içerisinde kopyalanmaları ve çoğalmaları sağlandı.

Gerekli cihazlar ve kimyasallar:

1. Kimyasal kompetan hücre (One Shot® TOP10 chemically competent E. Coli; Ürün kodu: C404003)
2. Çalkalayıcı inkübatör
3. Buz
4. LB agar ortamı
5. LB Broth sıvı ortam
6. SOC medium
7. Ampisillin
8. 2 ml’lik eppendorf tüp
9. Alev
10. 42 °C ye ayarlanmış su banyosu

Yöntem:

1. 50 µL One Shot® TOP10 kimyasal kompetan *E. Coli* içeren tüp -80 °C den çıkarıldı ve buz üzerine alındı
2. Bakteri çözeltisi hızlıca çözdürülerek içerisine 3 µL ligasyon ürününden eklendi ve 1-2 kez tüpe tüpe vurularak karıştırma işlemi yapıldı
3. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi
4. 30 saniye 42 °C de su banyosunda inkübe edildi
5. 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi
6. Üzerine 250 µL SOC ortamı eklendi
7. 37 °C de 220 rpm' de 1 saat inkübe edildi
8. Çalkalanan bakteri süspansiyonundan 15, 50 ve 100 µL hacimlerde alınarak 50 µg/ml ampisilin içeren LB agarlı 3 petri kabına, karışım tam olarak yayılacak şekil.de ekim yapıldı.
9. 37 °C de yaklaşık 14 saat inkübe edildi
10. Ertesi gün petriden 10 koloni seçilerek (tek düşen ve düzgün şekil.li olmasına dikkat edildi) 5 ml LB Broth içeren 10 ml lik tüplere ekim yapıldı
11. 37 °C de gece boyu 170' rpm de inkübe edildi
12. Ertesi gün üremiş olan 5ml bakteri süspansiyonundan 2 ml alınarak miniprep plasmid DNA izolasyonu yapıldı.

3.6.8 Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu

SDS'li Alkalın Lizis İle Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu:

Bakteri içerisinde çoğaltılan plasmid DNA' ları 'Molecular Cloning' protokol kitabında olan SDS'li Alkalın Lizis İle Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu yöntemi kullanılarak elde edildi.

Gerekli cihazlar ve kimyasallar:

1. Santrifüj
2. 1.5-2 ml'lik DNase mikrosantrifüj tüpleri
3. Çalkayıcılı inkübatör

4. Alkalen lizis çözeltisi I
5. Alkalen lizis çözeltisi II
6. Alkalen lizis çözeltisi III
7. Etanol (%96-100)(Merck, K35815971 610)
8. Fenol:kloroform (1:1, v/v)
9. Tris-EDTA (TE) (pH 8.0) çözeltisi
10. 0,45 µm' lik filtre

Çözeltilerin hazırlanması:

ALS I

1g glukoz 50 ml distile suda çözöldü. 2,5 ml 1M Tris-Cl (pH 8) çözeltisinden eklendi. En son 0,5 M EDTA çözeltisinden 2 ml eklenerek distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Filtreden

ALS II

0,5 g SDS 30 ml distile suda çözöldü. 2 ml 5 M NaOH çözeltisinden eklendi ve distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Filtreden geçirildi. Taze hazırlanıp kullanıldı.

ALS III

49,075 g potasyum asetat 100 ml de çözölerek 5 M potasyum asetat elde edildi. 60 ml 5 M potasyum asetat, 11,5 ml glasiyal asetik asit ve 28,5 ml distile su karıştırıldı. Çözelti + 4° C de saklandı.

TE

1M Tris-Cl (pH 8) çözeltisinden 2,5 ml; 0,5 M EDTA çözeltisinden 0,5 ml alındı ve üzerine 22 ml distile su eklenerek 25 ml TE tamponu hazırlandı.

Yöntem:

1. 37°C de gece boyu kuvvetlice çalkanarak elde edilen transforme bakteri süspansiyonundan 2 ml alınarak 11,000 g +4° C de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
2. 100 µl buzda soğutulmuş ALS I solüsyonu eklendi ve kuvvetli bir şekilde vorteksenerek bakteri pelleti iyice çözöldü.
3. 200 µl taze hazırlanmış ALS II solüsyonu bakteri süspansiyonuna eklendi ve tüp 5 kez alt üst edilerek içeriğin karışması sağlandı. 5 dakika buz üzerinde bekletildi.

4. 150 µl buzda soğutulmuş ALS III eklendi ve tüp birkaç kez alt üst edilerek içerik karıştırıldı. 5 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. 13,000 g +4° C de 5 dakika santrifüjendi ve üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
6. Süpernatant hacmine eşit hacimde fenol:kloroform karışımı eklendi, vortekslendi ve 13,000 g +4° C de 2 dakika santrifüjlendi. Sulu faz yeni bir tüpe alındı.
7. Süpernatanta oda sıcaklığında 2 hacim % 100'lük etanol eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
8. Maksimum hızda +4° C de 5 dakika santrifüjlendi.
9. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüp ağzı açık, ters şekil.de kurutma kağıdına konarak örnek kurutuldu.
10. 1 ml % 70'lik etanol eklendi ve tüp birkaç sefer alt üst edilerek karıştırıldı.
11. Maksimum hızda +4° C de 2 dakika santrifüjlendi.
12. Pellete çok dikkat edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
13. Kapağı açık tüpler oda sıcaklığında etanol tamamen buharlaşana ve tüpte hiç görünür sıvı kalmayıncaya kadar bekletildi.
14. Plasmid DNA 50 µL TE (pH 8.0) içerisinde çözüldü. Miniprep plasmid DNA'lar restriksiyon enzim kesimi ile kontrol edilerek doğru koloninin seçilip seçilmediği test edilmiştir. Bu doğrultuda doğru kolonilerden yüksek oranda plasmid DNA elde etmek için maxiprep plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.6.9 Maxiprep Plasmid İzolasyonu

Maxiprep plasmid izolasyonu ile miniprep plasmid izolasyonuna oranla daha büyük hacimde ve yüksek konsantrasyonda plasmid DNA' ları elde edildi. Bu plasmid DNA' ları bir sonraki adım olan transfeksiyonda kullanıldı.

Gerekli cihazlar ve kimyasallar:

1. LB sıvı (LB Broth) ve katı (LB Agar) besi ortamı
2. 'Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Nucleoband Xtra Midi EF' kit (ürün kodu: 740 420.50)
3. 50 ml' lik falcon tüp
4. Santrifüj

5. Çalkalayıcı inkübatör
6. İzopropanol
7. % 96-100'lük etil alkol

Kit içeriğı:

- RES-EF tamponu
- LYS-EF tamponu
- EQU-EF tamponu
- NEU-EF tamponu
- FIL-EF tamponu
- ENDO-EF tamponu
- WASH-EF tamponu
- ELU-EF tamponu
- H₂O-EF tamponu (örnek çözmek için)
- H₂O-EF tamponu (% 70'lik etil alkol için)
- Liyofilize RNaz A
- NucleoBond Xtra kolon filtrei
- NucleoBond Xtra kolon

Yöntem:

i. Çalışma tampon çözeltilerinin hazırlanması

LYS-EF lizis tamponunun kullanmadan önce içeriğindeki sodyum dodesil sülfatın (SDS) çökmemiş olmasına dikkat edilmelidir. Çökelek varlığında tampon birkaç kez alt üst edilip karıştırılarak oda sıcaklığında çökelek gidene kadar inkübe edilmelidir.

Liyofilize RNaz A enzimi kitin kullanım klavuzunun belirttiğı şekilde, 1ml RES-EF tamponu içerisinde iyice çözüldü. RNaz A solüsyonunun tamamı RES-EF şişesine konularak iyice karıştırıldı. RNaz A eklenen RES-EF tamponu kullanılmadığı sürece +4°C de tutulmalıdır.

Belirtilen hacimde % 96-100'lük etil alkol endotoksinsiz su (H₂O-EF) içerisine eklendi ve % 70'lik etil alkol elde edildi.

ii. Bakteri lizatının hazırlanması

- ✓ LB agarlı platelerde düzgün ve tek olan kolonilerden seçilerek 5 ml' lik 100 mikrogram/ml ampisilin içeren LB broth ortamına ekilerek başlangıç kültürü elde edildi.
- ✓ 8 Saat 37 °C' de 170 rpm' de çalkalayarak inkübe edildi.
- ✓ 1 ml Başlangıç kültüründen alınıp 100 ml ampisilin içeren LB Broth ortamına ekildi. Bir gece 37 °C' de 170 rpm' de çalkalayarak inkübe edildi.
- ✓ Ertesi gün bakteri süspansiyonu 5500 x g de 15 dakika santrifünlendi.
- ✓ Bakteri çökeleği üzerine 16 ml RES-EF + RNase A tamponu eklenerek homojen bir bakteri süspansiyonu elde edilene kadar vortekslendi.
- ✓ 16 ml LYS-EF tamponu eklendi ve tüp 5 kez alt üst edilerek örnek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

iii. Plasmid DNA'nın Kolona Bağlanması, Yıkama ve kolondan geri kazanılması

- ✓ NucleoBond Xtra kolonuna filtre kolonu yerleştirildi ve 15 ml EQU-EF tamponu kolondan yavaşça geçirilerek kolonlar dengelendi.
- ✓ Bakteri lizatına 16 ml NEU-EF tamponu eklendi, tüp 10-15 kez alt üst edilerek lizat ile tampon karıştırıldı. Buz üzerinde 5 dakika bekletildi.
- ✓ 6000 x g de 15 dakika santrifüjlendi. Üst faz filtre kolonuna yüklendi. Kolonun yerçekimi etkisiyle tamamen boşalması beklendi. Süzüntü atıldı.
- ✓ Filtre kolonu ve kolon 5 ml FIL-EF tamponu ile yıkandı (1. Yıkama).
- ✓ Filtre kolonu atıldı. Kolon 35 ml ENDO-EF tamponu ile yıkandı (2. Yıkama).
- ✓ Kolon 15 ml WASH-EF ile yıkandı (3. Yıkama).
- ✓ Kolon 50 ml' lik falcon tüpe yerleştirildi. Kolona önceden 50 ° C' ye ısıtılmış 5 ml ELU-EF eklenerek kolonda tutuklanmış plasmid DNA kolondan geri kazanıldı.

iv. Plasmid DNA'nın çöktürülmesi, yıkanması ve tekrar çözülmesi

✓ Bir önceki basamakta elde edilen plasmid DNA çözeltisine oda sıcaklığındaki 3.5 ml izopropanol eklendi ve 2 dakika vortekslendi. 15,000 x g, 4 ° C de 30 dakika santrifüjlendi. Üst faz dikkatlice uzaklaştırıldı.

✓ Plasmid DNA çökeğine endotoksinsiz % 70' lik etanol eklendi. 15,000 x g, oda sıcaklığında de 5 dakika santrifüjlendi. Etanol ortamdan dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüp, etanolün tamamen uzaklaşması için 20-25 ° C de 15-20 dakika bırakıldı.

✓ Plasmid DNA 500 µl endotoksinsiz H₂O-EF tamponu içerisinde çözüldü.

✓ Konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümle belirlenen plasmid DNA örnekleri 100'er µl olacak şekilde tüplere bölünerek -20 ° C' ye kaldırıldı.

3.6.10 Transfeksiyon

Kelly hücreleri, hazırlanan bildirici vektörler ile transfekte edildi. Transfeksiyon sürecinde internal kontrol olarak renilla lusiferaz geni içeren pGL4.74 kullanıldı. Hücrelerin transfeksiyonu için 'FuGENE®HDTransfectionReagent (Cat.No.04709691001) kullanılmıştır.

Gereçler ve Kimyasallar:

1. Hücre hattı
2. CO₂ inkübatörü
3. 6 kuyucuklu plate
4. RPMI 1640 hücre kültür ortamı
5. PBS
6. Plazmid DNA
7. FuGENE HDTransfection ajanı

Yöntem:

1. Hücreler transfeksiyon işleminin gerçekleştirileceği 6 kuyulu kültür kabına pasajlandı.
2. Kültür kabı yüzeyinin %60-70'ini kaplayıncaya kadar CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
3. Hücre kültür ortamları yenilendi. 2 ml serumlu besiyeri eklendi.
4. Kotransfekte edilecek plazmid DNA'ları hazırlanmıştır. Plazmid DNA'lar her bir kuyu için serumsuz, antibiyotiksiz 100 µl hücre ortamına (RPMI 1640) 2 µg plazmid DNA olacak şekilde 1:1 oranında eklenerek karıştırıldı.
5. Karıştırılan ve dilüe edilen vektör DNA karışımı üzerine 3 µl FuGENE HD Transfection ajanı eklendi. Bu reaktifin örnek üzerine direk bırakılmasına, yani tüpün çeperlerine temas etmemesine dikkat edilmelidir.
6. 1-2 saniye şiddetli vorteks yapıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
7. Kültüre edilmiş hücreler üzerine karışım eklenerek, kültür kabı hafifçe oynatılarak karıştırıldı ve 37°C de CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edildi.

3.6.11 Apoptotik Uyarının Oluşturulması

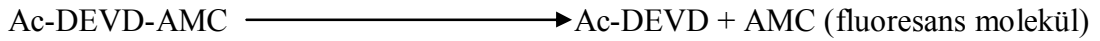
24 saat sonrasında transfekte edilmiş olan hücrelerin ortamları yenilenmiştir. Deney ve kontrol grubu işaretlenerek, deney grubuna 75µM etoposid eklendi. Hücreler 37°C CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. 24. saat sonrasında "Dual Luciferase Reporter Assay System" (Promega #E1910) kullanılarak reporter vektörlerin deney grubu ile kontrol grubu arasındaki farkları değerlendirildi.

3.6.12 Apoptotik Uyarının Ölçülmesi

Olası promotör dizilerini içeren vektörlerle transfekte edilmiş ve apoptozun tetiklenmesi için etoposid verilmiş Kelly hücre hattında oluşan apoptotik yanıt 'Fluorometric Caspase 3 Assay Kit' (SIGMA, CASP-3-F) kullanılarak ölçüldü.

3.6.12.1 Kaspaz 3 Aktivitesinin Florometrik Ölçümü İle Apoptotik Uyarının Belirlenmesi

Kaspaz 3 florometrik deneyinde (assay), Kaspaz 3 enzimi, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) substratının hidroliz reaksiyonunu gerçekleştirir. Ac-DEVD-AMC substratının hidrolizi sonucu floresans özelliğe sahip 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) molekülü açığa çıkar.



AMC hidroliz ürününün emisyon ve eksitasyon dalga boyları sırasıyla 360nm ve 460nm' dir. Bu dalga boylarında floresans ölçüm yapabilen spektrofotometrik cihaz ile açığa AMC konsantrasyonu ve dolaylı olarak Kaspaz-3 aktivitesi, oluşturulan AMC standart grafiği kullanılarak hesaplanır.

Gereçler ve kimyasallar:

1. 'Fluorometric Caspase 3 Assay Kit' (SIGMA, CASP-3-F)
2. Apoptotik uyarı verilmiş hücre
3. 96 kuyucuklu plate (flat bottom)
4. Plate okuyucu

Kit içeriği ve reaktiflerin hazırlanması:

- 5X Lisis tamponu
- 10X Reaksiyon tamponu
- Kaspaz 3
- Ac-DEVD-AMC sustrat
- Ac-DEVD-CHO inhibitör
- 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) standart
- 17 megohm su

Yöntem:

i. AMC standart grafiğinin hazırlanması:

1. 10 mM stok AMC çözeltisinden 10 μM 'lık AMC çözeltisi hazırlandı. Seyreltme için 1X reaksiyon tamponu kullanıldı.
2. Tablo.17' de verilen kimyasallar belirtilen hacimlerde kullanılarak 100 nM – 5 μM konsantrasyon aralığında 5 AMC standart çözeltisi hazırlandı.
3. Her standarttan 200' er μl 96 kuyucuklu plate eklendi.
4. Florometre eksitasyon 360nm, emisyon 460 nm olacak şekilde ayarlandı. Örneklerin floresans şiddetleri ölçüldü.
5. Her bir standart konsantrasyonuna denk gelen floresans şiddetlerine karşılık doğrusal AMC standart grafiği çizildi.

Tablo.17 AMC standart eğrisi için örnek hazırlama

AMC Standart	nmol AMC (200 μl içerisinde)	AMC çözeltisi (10 μM)	1X Reaksiyon Tamponu (μl)
6 μM	1.2	180	120
4 μM	0.8	120	180
2 μM	0.4	60	240
1 μM	0.2	30	270
500 nM	0.1	15	285
100 nM	0.02	3	297

ii. Hücre lizatlarının hazırlanması:

1. Apoptozun tetiklendiği hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldı ve mikro santrifüj tüpüne toplandı
2. 600 x g' de +4°C' de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı
3. PBS içinde hücreler süspanse edildi ve basamak 2 tekrarlandı
4. Hücre peleti 50 μl 1X Lizis tamponu içerisinde süspanse edildi
5. Hücre süspansiyonu 15-20 dakika buz üzerinde inkübe edildi
6. Parçalanmış hücreler 14,000 x g' de +4°C' de 10-15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant yeni bir mikro santrifüj tüpüne alındı

7. Elde edilen hücre lizatı hemen analiz için kullanıldı. Eğer analiz hemen gerçekleştirilmeyecekse hücre lizatları küçük hacimlere bölünerek -70°C' ye kaldırılmalıdır.

iii. 96 kuyucuklu plate'e örneklerin hazırlanması ve ölçülmesi:

1. Hazırlamış olduğumuz hücre lizatı örneklerinden 5' er µl ve kaspaz 3 pozitif kontrol, Tablo. 18' de belirtildiği gibi kuyucuklara eklendi. Bu denemede örnekler 3'erli setler halinde çalışıldı. Kör olarak 5 µl 1X Reaksiyon tamponu kullanıldı.

2. 2 µl Kaspaz 3 inhibitörü Tablo. 18' de belirtildiği şekilde uygun kuyucuklara eklendi.

3. Her kuyucuğa 200 µl Reaksiyon karışımı eklendi.

4. Plate, alüminyum folyo ile sarıldı ve oda sıcaklığında 1-1,5 saat inkübe edildi.

5. Florometre eksitasyon 360nm, emisyon 460 nm olacak şekilde ayarlandı.

Örneklerin floresans şiddetleri ölçüldü.

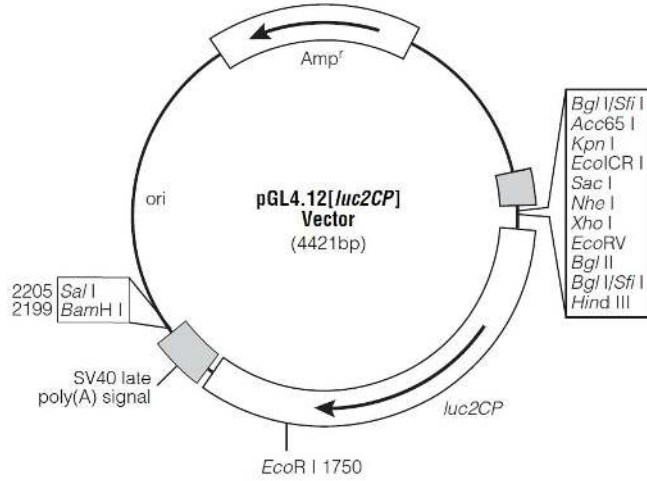
Tablo.18 Kaspaz 3 ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

	1X Reaksiyon tamponu	Kaspaz 3 (0,5µg/ml)	Hücre Lizatı	Kaspaz 3 inhibitör (200 µM)	Reaksiyon karışımı
Kör	5µl	-	-	-	200 µl
Kaspaz-3 pozitif kontrol	-	5 µl	-	-	200 µl
Kaspaz-3 pozitif kontrol+inhibitör	-	5 µl	-	2 µl	200 µl
Apoptoz tetiklenmemiş hücre	-	-	5 µl	-	200 µl
Apoptoz tetiklenmemiş hücre + inhibitör	-	-	5 µl	2 µl	200 µl
Apoptoz tetiklenmiş hücre	-	-	5 µl	-	200 µl
Apoptoz tetiklenmiş hücre + inhibitör	-	-	5 µl	2 µl	200 µl

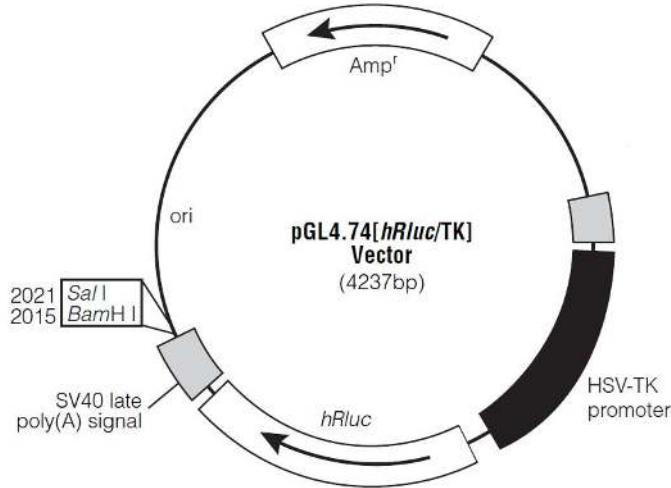
3.6.13 Dual Luciferaz Reporter Assay

Reporter (bildirici) gen deneyi, mRNA artışlarının direk olarak ilgili gen ürünlerinin promotör uyarılmalarının bir sonucu olarak ortaya çıktığının gösterilmesinde güvenilir veriler sağlar. Bu çalışmada ikili reporter deney sistemi kullanarak, biri internal kontrol olan iki

vektörün ko-transfeksiyonu ile transfeksiyon etkinliği gibi değişkenlik yaratabilecek parametreler engellendi. Bu amaçla pGL4.12 ve pGL4.47 (sırasıyla promega #E6671 ve #E6921) bildirici vektörleri kullanıldı. pGL4.12 sentetik olarak *luc2* lusiferaz (*Photinus pyralis*) genini promotörsüz olarak barındırmaktadır (Şekil.10). İnternal kontrol olan pGL4.74 ise hRluc lusiferaz (*Renilla reniformis*) genini ve promotör olarak HSV-TK promotörünü barındırmaktadır (Şekil.11).



Şekil.10 pGL4.12 Bildirici vektörü



Şekil.11 pGL4.74 Bildirici vektörü

Gereçler:

1. PBS tamponu

2. ‘Dual-Luciferase Reporter Assay System’ (Promega, E1910) Kiti
3. GloMax™ 20/20 Luminometre
4. Horizontal çalkalayıcı

Kit içeriği

- ‘Passive Lysis Buffer’(PLB)
- ‘Luciferase assay reagent’ (LAR)
- ‘StopGlo Reagent’
- ‘StopGlo Buffer’

Yöntem:

1. Hücrelerin ortamları uzaklaştırılarak, PBS ile bir kez yıkandı
2. Kit içerisinde bulunan pasif lizis tampon (PLB) hazırlanarak 500µl her kuyuya (6 kuyulu kültür kabı için önerilen miktar 500 µl’ dir) eklendi. Hücreler oda sıcaklığında 15 dakika düşük seviyede yatay çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Kuyulardaki PLB pipetaj yapılarak 1.5 ml’lik tüplere aktarıldı
4. Hücresel membran artıklarından kurtulmak ve hücre lizatını elde etmek için tüpler 12000xg’de 30 saniye santrifüjlendi
5. Kitin klavuzuna uygun olarak hazırlanmış olan LAR reaktifinden 50µl 1,5ml’lik eppendorf tüpüne konuldu. Üzerine 20 µl hücre lizatı eklendi
6. GloMax™ 20/20 Luminometre kullanılarak, hazırlanmış olan reporter vektörlerden elde edilen firefly lusiferaz seviyesi ölçüldü
7. Aynı tüpe 50µl Stop&Glo reagent eklenerek ve tekrar ölçüm alınarak ko-transfekte edilen internal kontrol pGL4.74’den kaynaklanan renilla lusiferaz seviyesi ölçüldü.

3.7 Araştırma Planı Ve Takvim

Tez boyunca gerçekleştirilen konu seçimi, literatür araştırması, optimizasyon, deneyler, sonuçların değerlendirilmesi, tez yazımı Tablo.19’da belirtilen süreler içinde tamamlanmıştır.

Tablo.19 Araştırma zaman çizelgesi

	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6
Konu Seçimi	X												
Literatür Araştırması	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Optimizasyon					X	X	X						
Deneyler							X	X	X	X	X	X	
Sonuçların Değerlendirilmesi									X	X	X	X	
Tez Yazımı										X	X	X	X

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyler araştırma takviminde belirtilen süre içerisinde optimize edilip, tamamlanmıştır. Denemeler sırasında laboratuvar koşullarının (sıcaklık, nem gibi) sabit olmasına dikkat edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz Wnt genlerine spesifik antikorların olmayışı gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde incelenememesine neden olmuştur. Kullanılan kimyasalların bittiğinde geliş süreçlerinin uzun olması planlanan deneme sayısını kısıtlamaktadır.

3.10 Etik Kurul Onayı

Ektedir

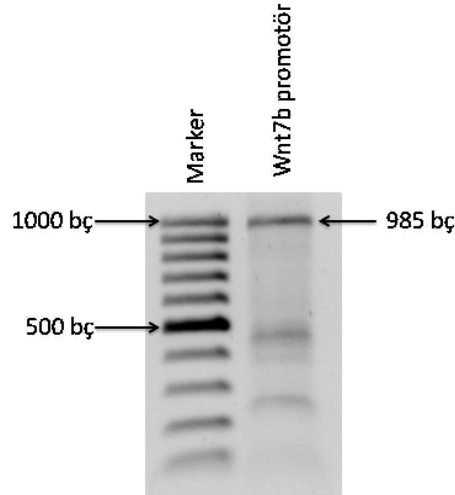
4 BULGULAR

4.1 Genomik DNA İzolasyonu

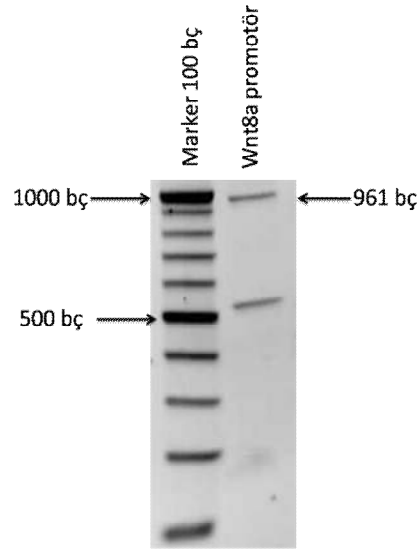
Kelly hücre hattından izole edilen genomik DNA agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve DNA' nın bütünlüğü kontrol edildi. DNA tek bant olarak görüntülendi.

4.2 PCR

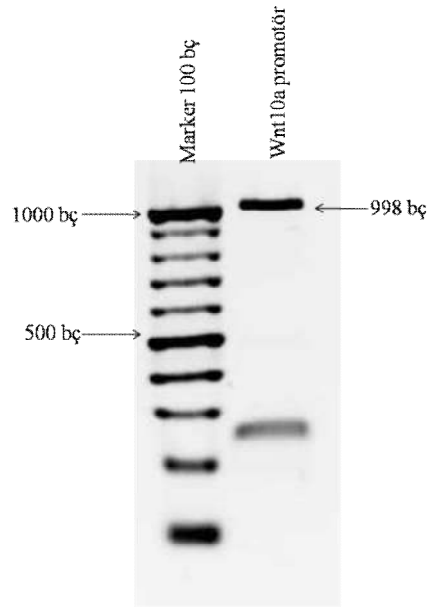
Wnt1, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a olası promotör dizilerinin çoğaltılması amacı ile Tablo.1'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonları kuruldu. Wnt1, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a promotör bölgelerini çoğaltmak amacıyla yaptığımız denemeler sonrasında bu genlerin promotörlerine ait bölgeleri çoğaltamadık. Farklı PCR koşulları ve primerler denenmesine rağmen PCR sonuçları elde edilememiş ve bu nedenle çalışmamızda bu promotörler ileriki aşamalarda değerlendirilememiştir. Reaksiyon sonrasında elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyonunu varlığı ve dizilerin büyüklükleri açısından kontrolü için % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Şekil.12,13 ve 14 de elde edilen PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil.12 Wnt7b promotör dizisi için PCR sonucu



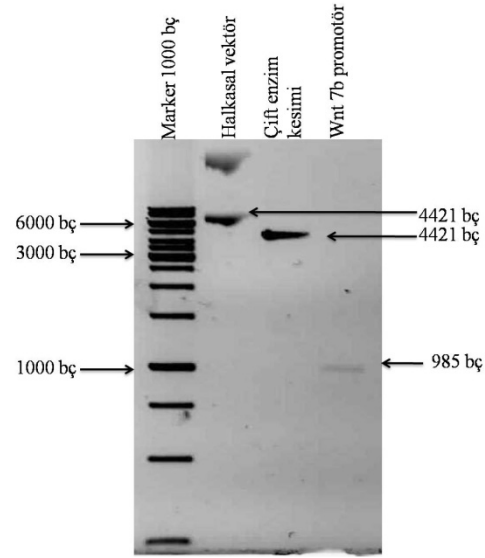
Şekil.13 Wnt8a promotör dizisi için PCR sonucu



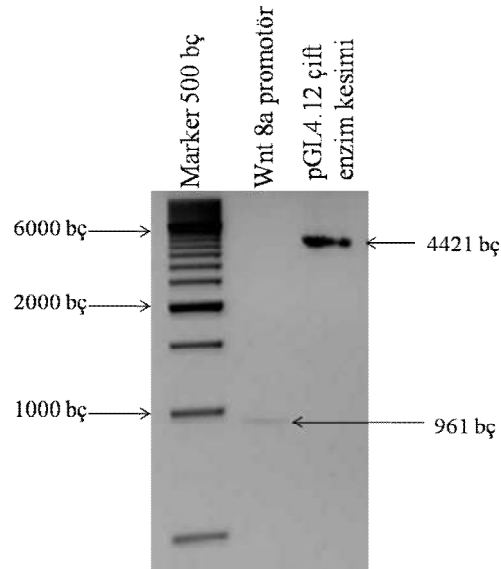
Şekil.14 Wnt10a promotör dizisi için PCR sonucu

4.2.1 Klonlama amaçlı PCR ürünlerinin ve pGL4.12 vektörünün agaroz jelden restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jelden ekstraksiyonu

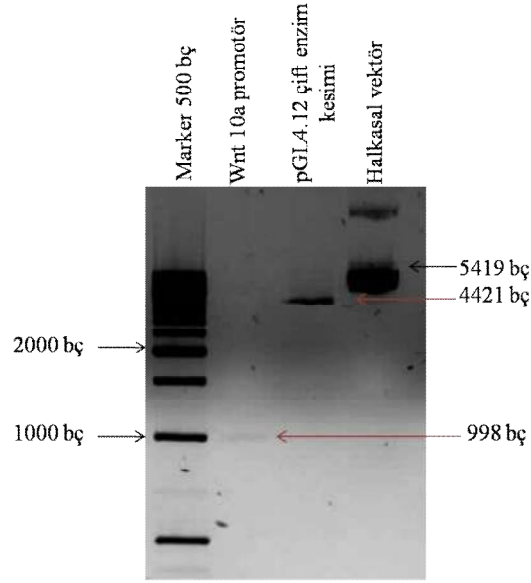
Elde edilen PCR ürünleri ve pGL4.12 vektörü restriksiyon enzim kesimi sonrasında agaroz jelde yürütüldü. Ardından jelden kesilerek saflaştırıldı. Şekil 13,15 ve 16' de saflaştırılmış PCR ürünlerinin ve pGL4.12 vektörünün agaroz jel görüntüleri verilmektedir.



Şekil.15 Saflaştırılmış Wnt7b promotör dizisi ve pGL4.12 vektörü



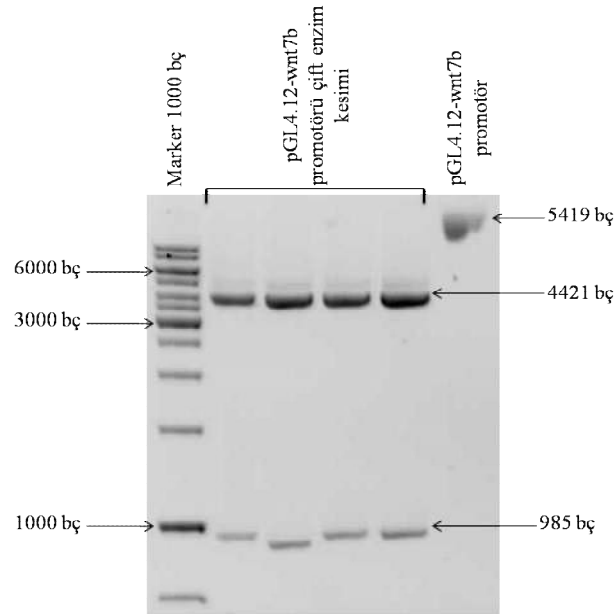
Şekil.16 Saflaştırılmış Wnt8a promotör dizisi ve pGL4.12 vektörü



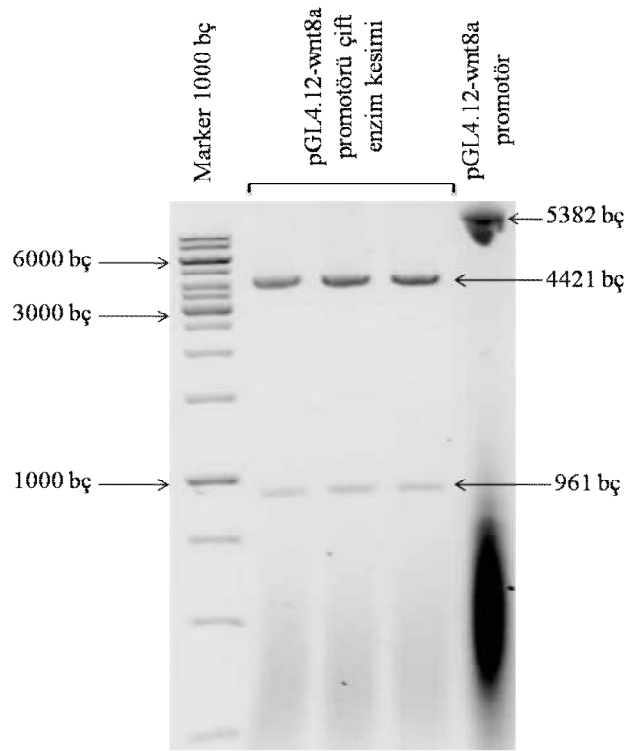
Şekil.17 saflaştırılmış Wnt10a promotör dizisi ve pGL4.12 vektörü

4.3 Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu

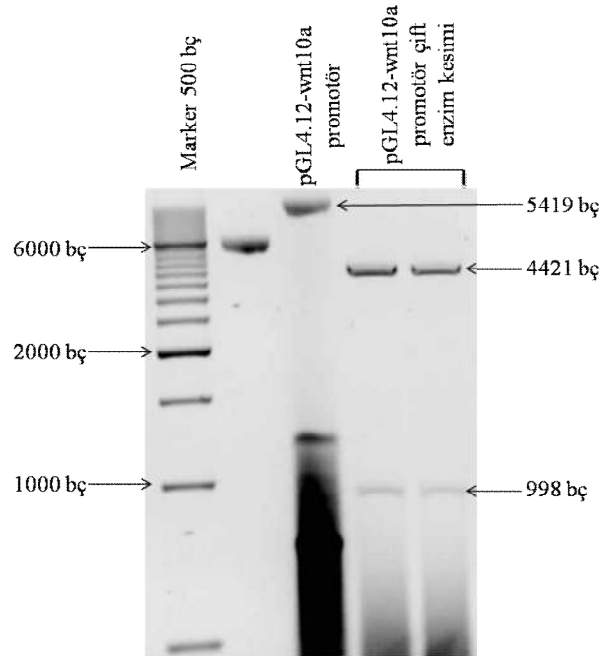
Miniprep plasmid izolasyonu sonucu elde edilen ve uygun restriksiyon enzimleri ile çift enzim kesimi yapılmış promotör dizi-pGL4.12 plasmidleri Şekil.18,19 ve 20’ de verilmiştir.



Şekil.18 Promotör Wnt7b-pGL4.12 plasmid DNA’sının miniprep izolasyonu



Şekil.19 Promotör Wnt8a-pGL4.12 plasmid DNA'sının miniprep izolasyonu

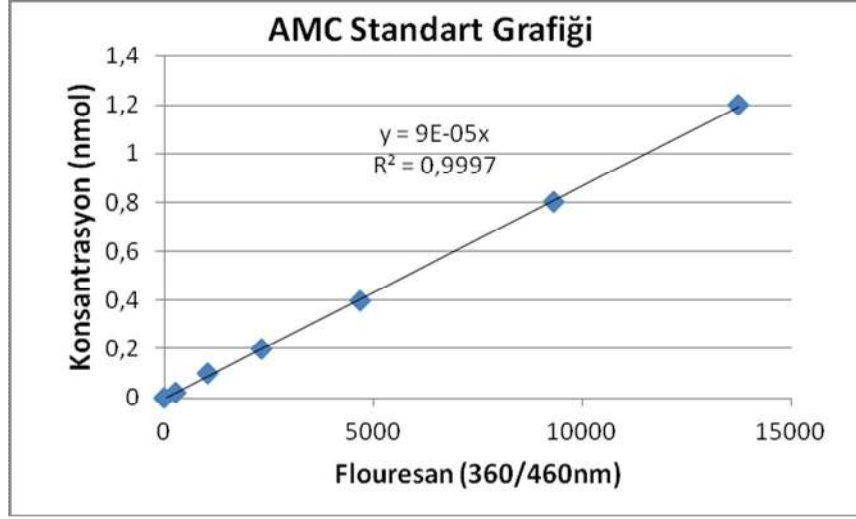


Şekil.20 Promotör Wnt10a-pGL4.12 plasmid DNA'sının miniprep izolasyonu

4.4 Apoptotik Uyarının Ölçülmesi

AMC standart grafiğinin oluşturulması:

AMC'nin bilinen nmol miktarlarına karşılık okunan fluoresans değerleri ile doğrusal AMC standart grafiği Şekil.21' de görüldüğü gibi çizildi.



Şekil.21 AMC standart grafiği

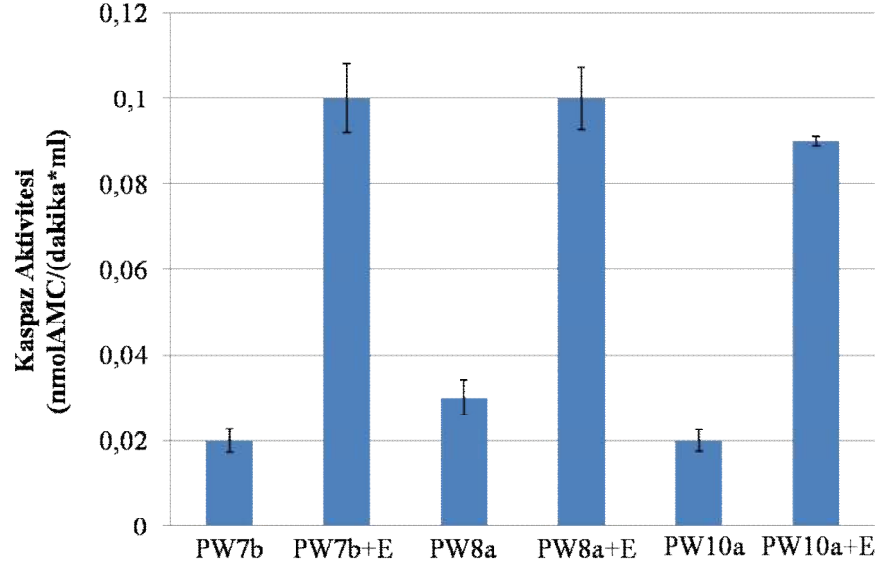
Kaspaz 3 aktivitesinin hesaplanması:

Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10 olası promotör dizilerinin bildirici vektör pGL4.12 ile transfekte edildiği, ardından apoptozun tetiklendiği ve tetiklenmediği hücre örneklerinin kaspaz 3 aktiviteleri hesaplandı. Bunun için fluoresans ölçümü yapılan bu örneklerin AMC konsantrasyonları nmol cinsinden AMC standart grafiğinin doğrusal denklemi kullanılarak hesaplandı. Buna göre aşağıdaki denklem kullanılarak örneklerin kaspaz 3 aktiviteleri, nmol/ (dak. x ml) cinsinden bulundu.

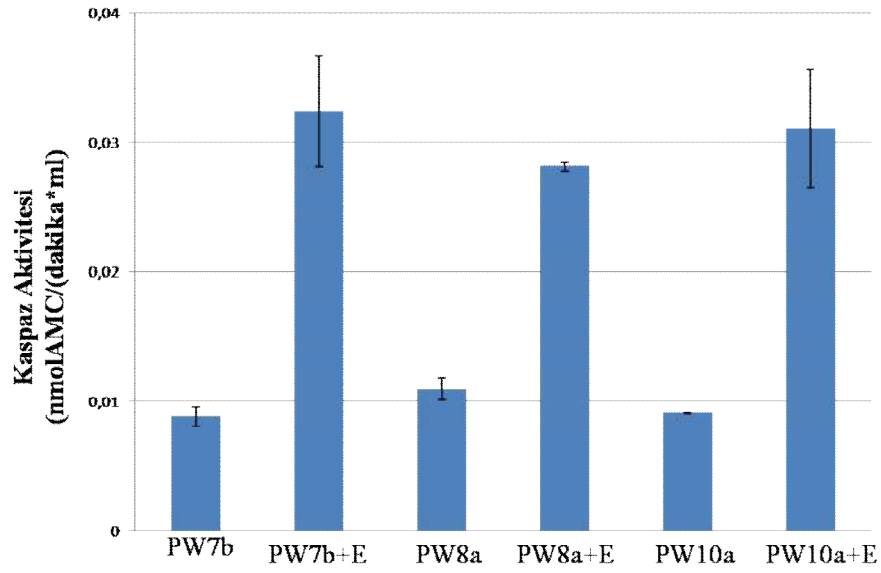
$$\text{Aktivite; nmol AMC/ (dakika/ml)} = \frac{\text{nmol AMC x dilüsyon faktörü}}{t(\text{dakika}) \times V (\text{ml})}$$

Şekil.22 ve Şekil.23, etoposit varlığında ve yokluğunda, Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10 promotör dizileriyle transfekte Kelly hücrelerinin kaspaz 3 aktivitelerini göstermektedir. Grafiklerde; PW7b: Wnt7b promotörü ile transfekte hücre; PW7b+E: Wnt7b promotörü ile transfekte ve etoposit verilmiş hücre; PW8a: Wnt8a promotörü ile transfekte hücre; PW8a+E: Wnt8a promotörü ile transfekte ve etoposit verilmiş hücre; PW10a: Wnt10a promotörü ile

transfekte hücre; PW10a+E: Wnt10a promotörü ile transfekte ve etoposid verilmiş hücre anlamlarına gelmektedir.



Şekil.22 Kaspaz 3 aktivitesi 1. Deneme

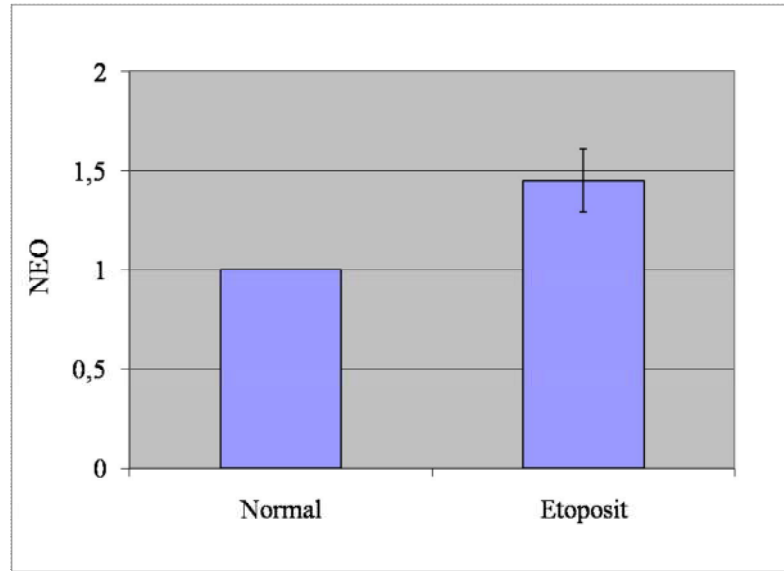


Şekil.23 Kaspaz 3 aktivitesi 2. deneme

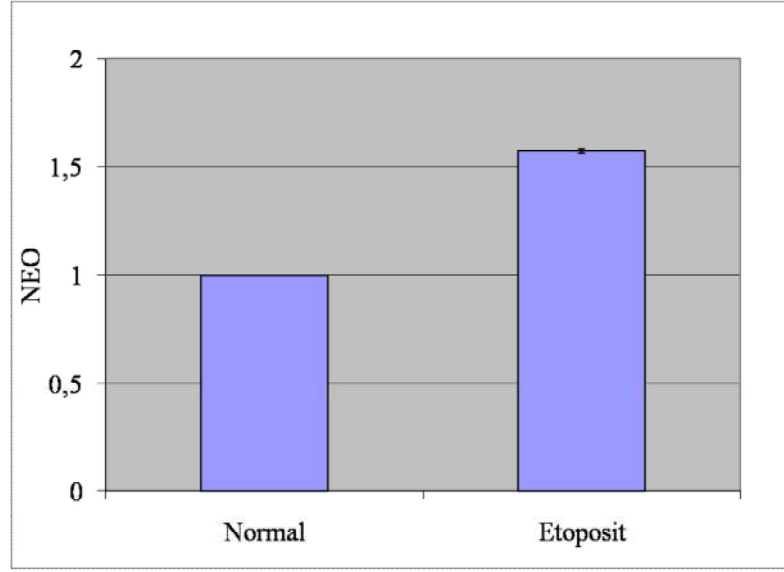
4.5 Dual Lusiferaz Bildirici Deney sistemi

Renilla ve firefly' dan elde edilen luminesans değerleri kullanılarak promotör dizileri için göreceli lusiferaz aktivitesi hesaplanmıştır. Bunun için internal kontrol olan *Renilla* luminesans değerleri eşitlenerek bu eşitlikten elde edilen katsayı ile firefly luminesans değeri çarpılmıştır. Bu şekilde normalize edilen değerler ile firefly/ *Renilla* oranı hesaplanarak apoptozun tetiklendiği (etoposit) ve tetiklenmediği (normal) hücrelerdeki rölatif lusiferaz aktiviteleri bulunmuştur.

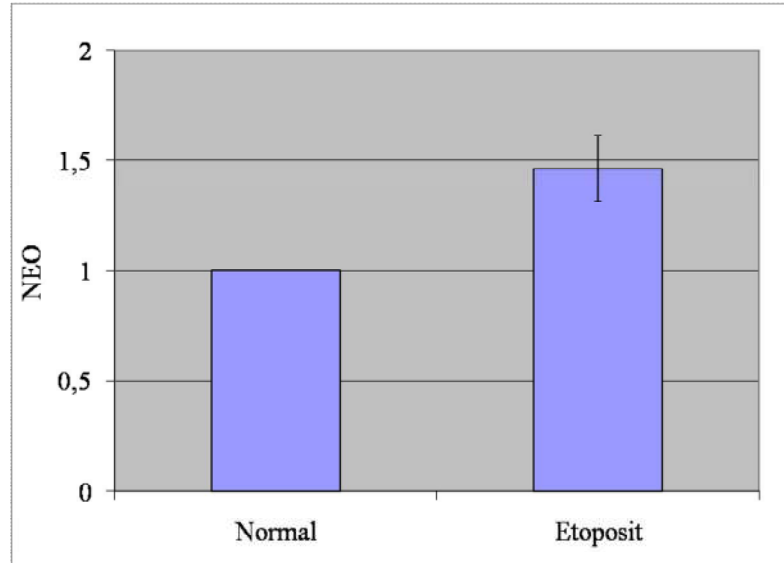
Buna göre: Şekil.24' de Wnt7b promotör dizisinden elde edilen lusiferaz aktivitesi; Şekil.25' de Wnt8a promotör dizisinden elde edilen lusiferaz aktivitesi; Şekil.26' de Wnt10a promotör dizisinden elde edilen lusiferaz aktivitesi yer almaktadır. Deneyler birbirinden bağımsız olarak üçer set halinde 2 kez tekrarlanmıştır. Her deney için hücrelerin apoptoza girdikleri gösterilmiştir (şekil.22 ve 23). İki ayrı sette elde edilen toplam altı ölçüme ait lüsiferaz ölçüm değerleri, sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmak amacı ile bir arada değerlendirilmiş ve normalize edilmiş oran (NEO) olarak verilmiştir (şekil.22, 23, ve 24). Hesaplamalar sonrasında Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a promotörlerinin apoptotik uyarı verilmiş hücrelerde yaklaşık olarak normale göre 1,5 kat artıkları belirlendi.



Şekil.24 Wnt7b promotör dizisi lusiferaz aktivitesi



Şekil.25 Wnt8a promotör dizisi lusiferaz aktivitesi



Şekil.26 Wnt10a promotör dizisi lusiferaz aktivitesi

5 TARTISMA

Programlanmış hücre ölümü, çok hücreli canlıların gelişiminde ve homeostazın sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Wnt sinyal iletimi de nöronların, epitelyal hücrelerin, vasküler düz kas hücrelerinin ve kardiyomiyositlerin hem gelişiminde hem de hücre hasarında apoptozun erken ve geç dönemlerini regüle etmektedir. Embriyonik gelişim sürecinin tamamında apoptotik ve wnt yolağındaki genler başarılı bir koordinasyonla aktive edilmektedir (53).

Çalışmamızın temelini oluşturan deney, apoptotik uyarı verilmiş (Etoposit) Kelly hücre hattında gerçekleştirilen mikroyarray çalışmasıdır. Bu çalışma tez çalışmasında bağımsız olarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle elde edilen verilerin tamamı ve yöntem bilgisi taz raporumuzda verilmemiştir. Mikroyarray çalışması sonrasında apoptotik uyarı verilmiş Kelly hücrelerinde çalışmamıza ilk aşamada kaynak oluşturan genlerin mRNA ekspresyon düzeyler; Wnt1 için 39 kat, Wnt4 için 5 kat, Wnt5a için iki kat, Wnt7a için 29 kat, Wnt7b için 4 kat, Wnt 8a için 38 kat ve Wnt 10a için 5 kat artış saptanmıştır (TUBİTAK 107T509 proje raporu).

Yapılan ikili lusiferaz deneyi sonucunda Wnt7b, Wnt8a ve Wnt10a bildirici vektörlerinin transfekte edildiği ve apoptotik uyarı verilen hücrelerde promotör aktivitesinde yaklaşık 1,5 katlık artış saptandı. Gen ifadesindeki bu artış değerleri beklenen düzeyin oldukça altındadır. Mikroyarray çalışmaları ile kıyaslandığında özellikle Wnt8a'nın mRNA düzeyindeki yaklaşık 38 katlık artış karşısında deneylerimizde elde ettiğimiz veri çok düşük düzeyde kalmaktadır. Wnt 7b ve 10a için elde edilen değerler bizim deneylerimizde elde ettiklerimiz ile yakınlık göstermekle beraber, genel olarak baktığımızda "reporter assay" sonrasında, etoposit ile apoptotik uyarı verilmiş hücrelerde çalıştığımız genler açısından kesin bir ekspresyon artışının varlığından söz etmek mümkün değildir. Mikroyarray deneyleri mRNA düzeylerinin PCR yöntemiyle değerlendirildiği veriler sunmakta iken reporter vektör deneyleri ise doğrudan promotörlerdeki aktivite artışının gösterilmelerine yönelik daha sağlıklı veriler sunmaktadır. Relatif kantitasyon işlemi sonrasında elde edilen verilerin spesifik antikorlar kullanılarak Western blot ile doğrudan protein artışının gösterildiği deneyler yada reporter assay yardımı ile doğrulanması gerekmektedir. Western blot ile deneylerimizdeki sonuçların doğrulanmasını elimizde bu genlere ait antikorların bulunmaması nedeniyle gerçekleştiremedik. Elde ettiğimiz sonuçları doğrudan apoptotik uyarı ile hedef gen

artışlarının olduğuna dair hipotezimizi destekler veri sağlamamasına rağmen, bir yöntem olarak “reporter assay” sisteminin optimizasyonu ileriki deneylerde kullanılabilir bir yönteme ait tecrübelerin kazanımı açısından önemlidir.

6 KAYNAKÇA

1. Liu PT, Wakamiya M, Shea MJ et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics* 1999; 22: 361-365.
2. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary-tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109.
3. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E et al. The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987; 50: 649-657.
4. Cadigan KM, Nusse R. Wnt Meeting 1996. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1997; 1332: R1-R5.
5. Tamai K, Semenov M, Kato Y et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000; 407: 530-535.
6. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histology and Histopathology* 2006; 21: 103-124.
7. Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM et al. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 2859-2863.
8. Nusse R. WNT targets - repression and activation. *Trends in Genetics* 1999; 15: 1-3.
9. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 1997; 390: 410-413.
10. Katoh M. Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: Threshold model of WNT action (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2002; 10: 683-687.
11. Lin SL, Li B, Rao S et al. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 4194-4199.
12. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research* 2005; 15: 28-32.
13. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* 2009; 17: 9-26.
14. Sugimura R, Li LH. Noncanonical Wnt Signaling in Vertebrate Development, Stem Cells, and Diseases. *Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews* 2010; 90: 243-256.

15. Badiglian L, Oshima CTF, Lima FDO et al. Canonical and noncanonical Wnt pathway: A comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncology Reports* 2009; 21: 313-320.
16. Peifer M, Polakis P. Cancer - Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287: 1606-1609.
17. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: Functions and mechanisms of beta-catenin-independent wnt signaling. *Developmental Cell* 2003; 5: 367-377.
18. Merkel CE, Karner CM, Carroll TJ. Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatric Nephrology* 2007; 22: 1825-1838.
19. Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C et al. Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 2008; 135: 1771-1780.
20. Jordan BK, Shen JHC, Olaso R et al. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 10866-10871.
21. He X, Semenov M, Tamai K et al. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 2004; 131: 1663-1677.
22. Tahinci E, Thorne CA, Franklin JL et al. Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* 2007; 134: 4095-4106.
23. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. *Growth Factors* 2005; 23: 111-116.
24. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 2005; 132: 4421-4436.
25. Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mechanisms of Development* 1999; 83: 27-37.
26. Kuan CY, Yang DD, Roy DRS et al. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 1999; 22: 667-676.
27. Weston CR, Wong A, Hall JP et al. JNK initiates a cytokine cascade that causes Pax2 expression and closure of the optic fissure. *Genes & Development* 2003; 17: 1271-1280.
28. Habas R, Dawid IB, He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development* 2003; 17: 295-309.

29. Semenov MV, Habas R, MacDonald BT et al. SnapShot: Noncanonical Wnt signaling pathways. *Cell* 2007: 131.
30. Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Developmental Biology* 2007: 307: 1-13.
31. Gilland E, Miller AL, Karplus E et al. Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999: 96: 157-161.
32. Slusarski DC, YangSnyder J, Busa WB et al. Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Developmental Biology* 1997: 182: 114-120.
33. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992: 69: 1073-1087.
34. Chien AJ, Conrad WH, Moon RT. A Wnt Survival Guide: From Flies to Human Disease. *Journal of Investigative Dermatology* 2009: 129: 1614-1627.
35. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP. Differential transformation of mammary epithelial-cells by wnt genes. *Molecular and Cellular Biology* 1994: 14: 6278-6286.
36. Sokol S, Christian JL, Moon RT et al. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in xenopus embryos. *Cell* 1991: 67: 741-752.
37. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ et al. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 2000: 405: 76-81.
38. Wang YS, Macke JP, Abella BS et al. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *Journal of Biological Chemistry* 1996: 271: 4468-4476.
39. Bhanot P, Brink M, Samos CH et al. A new member of the *frizzled* family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996: 382: 225-230.
40. Dann CE, Hsieh JC, Rattner A et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two *Frizzled* cysteine-rich domains. *Nature* 2001: 412: 86-90.
41. Pinson KI, Brennan J, Monkley S et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000: 407: 535-538.
42. Tamai K, Zeng X, Liu CM et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell* 2004: 13: 149-156.
43. Mao JH, Wang JY, Liu B et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular Cell* 2001: 7: 801-809.

44. Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A et al. Wg/Wnt signal can be transmitted through Arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3 beta activity. *Developmental Cell* 2003; 4: 407-418.
45. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 beta and beta-catenin and promotes GSK-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo Journal* 1998; 17: 1371-1384.
46. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN et al. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Current Biology* 1998; 8: 573-581.
47. Kishida S, Yamamoto H, Hino S et al. DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19: 4414-4422.
48. Yamamoto H, Kishida S, Uochi T et al. Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3 beta and beta-catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 2867-2875.
49. Kraus C, Liehr T, Hulsken J et al. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3P21 - a region implicated in tumor-development. *Genomics* 1994; 23: 272-274.
50. Yochum GS, Cleland R, Goodman RH. A Genome-Wide Screen for beta-Catenin Binding Sites Identifies a Downstream Enhancer Element That Controls c-Myc Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2008; 28: 7368-7379.
51. Wang XS, Goode EL, Fredericksen ZS et al. Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008; 17: 2101-2108.
52. Saldanha G, Ghura V, Potter L et al. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *British Journal of Dermatology* 2004; 151: 157-164.
53. Pecina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell International* 2010; 10.
54. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 2000; 14: 1837-1851.
55. Panhuysen M, Weisenhorn DMV, Blanquet V et al. Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2004; 26: 101-111.

56. Niemann C, Owens DM, Hulsken J et al. Expression of Delta N Δ 1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development* 2002; 129: 95-109.
57. Zechner D, Fujita Y, Hulsken J et al. beta-catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental Biology* 2003; 258: 406-418.
58. Junghans D, Hack I, Frotscher M et al. beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. *Developmental Dynamics* 2005; 233: 528-539.
59. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen-synthase kinase-3 from rabbit skeletal-muscle - separation from cyclic-AMP-dependent protein-kinase and phosphorylase-kinase. *European Journal of Biochemistry* 1980; 107: 519-527.
60. Wada A. Lithium and Neuropsychiatric Therapeutics: Neuroplasticity via Glycogen Synthase Kinase-3 beta, beta-Catenin, and Neurotrophin Cascades. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009; 110: 14-28.
61. Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chemical Reviews* 2001; 101: 2527-2540.
62. Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience* 2010; 11: 539-551.
63. Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry* 2001; 78: 1219-1232.
64. Sussman DJ, Klingensmith J, Salinas P et al. Isolation and characterization of a mouse homolog of the drosophila segment polarity gene dishevelled. *Developmental Biology* 1994; 166: 73-86.
65. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis. In: G.H. Bourne JFDaKWJ, ed. *International Review of Cytology*, Vol. Volume 68: Academic Press, 1980: 251-306.
66. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784-788.
67. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis - distinct modes of cell-death with fundamentally different significance. *Pathology Annual* 1982; 17: 229-259.
68. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.

69. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
70. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9: 231-241.
71. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
72. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 1999; 6: 1028-1042.
73. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 1999; 68: 383-424.
74. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (FAS/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo Journal* 1995; 14: 5579-5588.
75. Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C et al. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Molecular Cell* 2003; 11: 543-549.
76. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
77. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 9357-9360.
78. Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M et al. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 16443-16446.
79. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M et al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 339-345.
80. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 641-650.
81. Ellies DL, Church V, Francis-West P et al. The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development* 2000; 127: 5285-5295.
82. Chen SQ, Guttridge DC, You ZB et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *Journal of Cell Biology* 2001; 152: 87-96.
83. You ZB, Saims D, Chen SQ et al. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology* 2002; 157: 429-440.

84. Munemitsu S, Albert I, Souza B et al. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis-coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92: 3046-3050.
85. Chen T, Yang I, Irby R et al. Regulation of caspase expression and apoptosis by APC. *Annals of Surgical Oncology* 2003; 10: 50.
86. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP et al. SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 13636-13641.
87. Jones SE, Jomary C, Grist J et al. Modulated expression of secreted Frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* 2000; 11: 3963-3967.
88. Mirkovic I, Charish K, Gorski SM et al. *Drosophila nemo* is an essential gene involved in the regulation of programmed cell death. *Mechanisms of Development* 2002; 119: 9-20.
89. Glinka A, Wu W, Delius H et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998; 391: 357-362.
90. Bournat JC, Brown AMC, Soler AP. Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappa B in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61: 21-32.
91. Gould SJ, Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry* 1988; 175: 5-13.
92. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies* 2007; 5: 127-136.
93. Dewet JR, Wood KV, Helinski DR et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in escherichia-coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; 82: 7870-7873.
94. Matthews JC, Hori K, Cormier MJ. Purification and properties of renilla-reniformis luciferase. *Biochemistry* 1977; 16: 85-91.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 01

TOPLANTI TARİHİ : 15.12.2009

TOPLANTI GÜNÜ : Salı

TOPLANTI SAATİ : 12:30

KARAR 1: Kurul Başkanı Prof.Dr.Yeşim TUNÇOK, Başkan Yardımcısı Prof.Dr.Reyhan UÇKU olmasına,

KARAR 2: Her ay en az 1 (bir) kere toplanılmasına,

KARAR 3: Kurulun yerel çalışma kapsamının ve çalışma ilkelerinin belirlenmesine ,

KARAR 4: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.H.Ogün SERCAN'ın danışmanı olduğu Yüksek Lisans Öğrencisi Ceyda ÇALIŞKAN'ın "EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Yöntemi ile Transkripsiyon Faktör - Promotor Bölge İlişkisinin Belirlenmesi" konulu tez çalışmasının etik olarak uygun olduğuna,

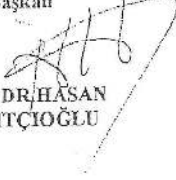
KARAR 5: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.H.Ogün SERCAN'ın danışmanı olduğu Yüksek Lisans Öğrencisi İlgin ÖZTÜRK'ün "Frizzled Gen Ekspresyon Düzeyinin Apoptotik Uyarı Verilmiş Hücrelerde Araştırılması" konulu tez çalışmasının etik olarak uygun olduğuna,

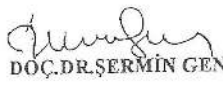
Oy birliği ile karar verildi.


PROF.DR. YEŞİM TUNÇOK
Başkan


PROF.DR. REYHAN UÇKU
Başkan Yardımcısı

**PROF.DR.GÜL GÜNER
AKDOĞAN**
Doğal Üye


**PROF.DR.HASAN
HAVİTÇIOĞLU**


DOÇ.DR.ŞERMIN GENÇ


**YRD.DOÇ.DR.ÇİGDEM ERESEN
YAZICIOĞLU**

DEVHAN CÜRKAN
SEKRETERYA


NESLİHAN CÜNGÖR
SEKRETERYA

ÖZGEÇMİŞ ILGIN ÖZTÜRK

TC Kimlik No / Pasaport No:	40096350894
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	NARBEL YAPI KOOP. 2.İNÖNÜ MH. ÖZKARAKAYA CAD.C-2 BLOK ALBATROS APT. NO:11 DAİRE:24 NARLIDERE 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	
e-posta :	ilgin.ozturk@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Yüksek Lisans	2007

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere 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