

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STBM/VANGL (Strabismus/VanGogh Like) GEN
EKSPRESYONUNUN HEPATOSELLÜLER
KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE HÜCRE
DAVRANIŞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

G. OZAN ÇETİN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

İZMİR
2006

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STBM/VANGL (Strabismus/VanGogh Like) GEN
EKSPRESYONUNUN HEPATOSELLÜLER
KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE HÜCRE
DAVRANIŞI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

G. OZAN ÇETİN

Danışman: Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Yardımcı Danışman: Prof. Dr. A. Uğur YILMAZ

DEÜ BAP Proje No: 04.KB.SAĞ.094

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER

Özet

İngilizce Özet

A. Tablo Listesi

B. Şekil Listesi

C. Kısaltmalar

1. GİRİŞ ve AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hepatosellüler Karsinom

2.1.1 Hepatit B Virusu (HBV)

2.1.2 Hepatit C Virusu (HCV)

2.1.3 Wnt Sinyal iletim yolağı ve β – katenin

2.1.3.1 Klasik Wnt Yolağı

2.1.3.2 Wnt/ Ca^{2+} Yolağı

2.1.4 Düzlemsel Hücre Polaritesi Yolağı ve VANGL

2.1.4.1 Düzlemsel Hücre Polaritesi Yolağı

2.1.4.2 İnsan VANGL Geni

2.2 Tümör Hücrelerinin İnvazyon ve Migrasyon Özellikleri

2.3. shRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

3.2 RNA İzolasyonu

3.2 cDNA Sentezi

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.4 Gerçek Zamanlı PCR

3.5 Protein İzolasyonu

3.6 Western Blotlama

3.7 Transfeksiyon Optimizasyonu

3.7.1 Transfeksiyon İçin Uygun Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi

3.7.2 Transformasyon İçin Kompetan Hücre Elde Edilmesi

3.7.3 Plazmid İzolasyon Kiti Kullanılarak Plazmid Elde Edilmesi

3.7.4 Transfeksiyon İçin Hücre Sayısı Optimizasyonu

3.7.5 Plazmid İzolasyon Kiti ile Elde Edilen DNA'nın Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi

3.7.6 pSV- β -Gal Plazmidinin Maksipreparasyonu

3.7.7 Transfeksiyon Etkinliğinin Optimizasyonu

3.8 Saç Tokası Şeklindeki siRNA İçin Kalıp Görevi Görecek Oligonükleotid Dizisinin Saptanması

3.9 Oligonükleotidlerin Eşleştirilmesi

3.10 Saç Tokası Şeklindeki siRNA Kalıbının pSilencer™4.1 Plazmidine Eklenmesi

3.11 E. coli Bakterilerinin pSilV1 Plazmidi ile Transformasyonu

3.12 pSilencer™4.1 ile Transformasyon Olan E. coli Bakterilerinden Plazmid İzolasyonu

3.13 Maksipreparasyon Sonrası Elde Edilen Plazmidin Dizi Analizi

3.14 Hücrelerin pSilV1 Plazmidi ile Transfeksiyonu

3.15 Motilite ve İnvazyon Deneylelerinin Optimizasyonu

3.16 Hücre Döngüsü Analizi

4. BULGULAR

4.1 HCC Hücrelerinden RNA İzolasyonu

4.2 HCC Hücre Dizilerinde VANGL1 Ekspresyonu Analiz Sonuçları

4.3 Transfeksiyon Optimizasyonu

4.3.1 Antibiyotikle Hücre Ölümü Eğrisi:

4.3.2 Plazmid İzolasyon Kiti Kullanılarak Plazmid Elde Edilmesi:

4.3.3 Transfeksiyonda Kullanılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu:

4.3.4 Plazmid izolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi:

4.3.5 pSV- β -Gal Plazmidinin Maksipreparasyonu:

4.3.6 Transfeksiyon Etkinliğinin Optimizasyonu:

4.4 siRNA Kalıp Oligonukleotidin İpliklerinin Eşleştirilmesi

4.5 siRNA Kalıbının pSilencer™4.1-CMV Neo Plazmidine Bağlanması

4.6 Kompetan E. coli Bakterilerinin siRNA Kalıbını İçeren pSilencer™4.1-CMV Neo Plazmidi ile Transformasyonu

4.7 siRNA Kalıbını İçeren pSilV1 Plazmidinin Maksipreparasyonu

4.8 Maksipreparasyon Sonucunda Elde Edilen Ürünün DNA Dizi Analizi

4.9 Hücrelerin pSilV1 Plazmidi ile Transfeksiyonu

4.10 Transfekte Olmuş Hep G2 Hücrelerinden RNA Elde Edilmesi

4.11 Hep G2 Kolonilerinin β -aktin ve VANG1 Ekspresyonu ve pSilencerGAPDH ile Transfekte Pozitif Kontrol HepG2 Hücrelerinin GAPDH Ekspresyonu

4.12 Motilite ve İnvazyon Deneylelerinin Optimizasyonu

4.13 Motilite ve İnvazyon Deneyleleri

4.14 Hücre Döngüsü Analizi

5. TARTIŞMA

6. KAYNAKLAR

7. EKLER

Ek 1 Hücre dizilerinin özellikleri

Ek 2 Hücre kültürü protokolleri

Ek 3 Kullanılan solüsyonlar

Ek 4 İnoue yöntemi ile kompetan bakteri elde edilmesi ve Maksipreparasyon

Ek 5 Transfeksiyon sonrası seçilen Hep G2 kolonilerinden elde edilen RNA'ların absorbans değerleri.

Ek 6 pSilencerGAPDH ile HepG2 Hücrelerinde Gliseraldehid 3-fosfat Dehidrogenaz Geninin Sessizleştiğinin RT-PCR ile Gösterilmesi

A. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Çeşitli kanser hücre dizilerinde Vangl1 ekspresyonu

Tablo 2: VANGL1 geni için kurulan PCR karışımı ve reaksiyonun sıcaklık profili.

Tablo 3: PCR'da kullanılan kimyasalların listesi.

Tablo 4: Gerçek Zamanlı PCR karışımı ve reaksiyonun sıcaklık profili.

Tablo 5: X-gal boyama çözeltisi içeriği.

Tablo 6: Ligasyon reaksiyonu karışımı.

Tablo 7: Plazmid dizi analizi için kurulan PCR profili.

Tablo 8: Pozitif kontrol hücre dizileri ve HCC hücre dizilerinden elde edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik sonuçları.

Tablo 9: Gerçek zamanlı PCR ile hücre dizilerindeki VANGL1 ekspresyonu düzeylerinin relatif kantifikasyon sonuçları

Tablo 10: Hep G2 hücrelerinin pSV- β -Gal plazmidi ile transfeksiyonu sonucu transfekte olan hücre sayıları.

Tablo 11: Hep G2 hücrelerinin plazmid izolasyon kiti ile elde edilen pSV- β -Gal DNA'sı ve kontrol pSV- β -Gal DNA'sı ile transfeksiyon sonuçları.

Tablo 12: Hep G2 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonu değerleri.

Tablo 13: Gerçek Zamanlı PCR sonucunda örneklerin VANGL1 ekspresyon düzeylerinin relatif kantifikasyonu.

Tablo 14: Atasal HepG2 hücreleri, monoklonal anti-LPP2 antikoru ile karşılaşan atasal HepG2 hücreleri, pSilV1 plazmidi ile transfekte edilmiş ve VANGL1 geni sessizleştirilmiş 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş pSilencer 4.1 vektörüyle transfekte 40 numaralı kolonideki hücrelerin, hücre döngüsü analizi sonuçları

Tablo 15: GAPDH siRNA'sı ile transfekte edilen HepG2 kolonilerinin GAPDH RT-PCR profili.

B. ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** HCC gelişiminde yer alan hücresel olayların kronolojik sıralanması.
- Şekil 2:** WNT sinyal iletimi yolağı.
- Şekil 3:** İki alternatif Wnt sinyal iletim yolağı
- Şekil 4:** Düzlemsel hücre polaritesi ve konverjant ekstansiyon hareketi.
- Şekil 5:** RNAi mekanizması.
- Şekil 6:** Kısa saç tokası şeklinde RNA eksprese eden vektör. Şekilde belirtilen elemanların birçoğu günümüzde kullanılan birçok vektörde bulunmaktadır.
- Şekil 7:** pSV-β-Gal plazmid DNA'sının restriksiyon enzimi kesim sonuçları.
- Şekil 8:** Transfeksiyon etkinliğinin optimizasyon deneyinin planı.
- Şekil 9:** pSilencer4.1 CMV neo vektör haritası.
- Şekil 10:** *E. coli* bakterilerinin eklenti içeren pSilV1 plazmidi ile transformasyonu deneyi.
- Şekil 11:** Transfeksiyon deneyinin kurulumu.
- Şekil 12:** Motilite ve invazyon deneylerinin kurulumu.
- Şekil 13:** Motilite ve invazyon odacıklarının yandan görünümü.
- Şekil 14:** Bazı örneklerle RNA'ların %1.5 agaroz jel görünümü.
- Şekil 15:** Hücre dizilerinin VANGL1 ekspresyonu.
- Şekil 16:** Hep G2 hücrelerinin G418 antibiyotiği ile hücre ölüm eğrisi.
- Şekil 17:** pSV-β-Gal plazmid DNA'sının restriksiyon enzimi kesim sonuçları.
- Şekil 18:** Ortalama transfekte olan hücre sayısına göre, Hep G2 transfeksiyon optimizasyonu sonuçları.
- Şekil 19:** siRNA için kalıp görevi görecektir çift iplikli hale getirilmiş oligonukleotid molekülünün %2 agaroz jeldeki görüntüsü.
- Şekil 20:** siRNA kalıbının pSilencer™4.1-CMV Neo plazmidine bağlanması.
- Şekil 21:** Kompetan *E. coli* bakterilerinin siRNA kalıbını içeren pSilV1 plazmidi ile transformasyonundan sonra kültür sonuçları:
- Şekil 22:** Maksipreparasyon sonucunda elde edilen ve siRNA kalıbını içeren pSilV1 plazmidinin %1 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi.
- Şekil 23:** Maksipreparasyon sonucunda elde edilen plazmid DNA'sının PCR ürününün %2 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
- Şekil 24:** İleri primerle yapılan eklenti dizi analizi ile elde edilen histogram görüntüsü.
- Şekil 25:** Geri primerle yapılan eklenti dizi analizi ile elde edilen histogram görüntüsü.

Şekil 26: pSilV1 plazmidiyle transfekte olmuş Hep G2 hücrelerinin oluşturduğu koloni.

Şekil 27: Hep G2 kolonilerinin β -aktin ekspresyonu.

Şekil 28: Hep G2 kolonilerinin VANGL1 ekspresyonu.

Şekil 29: İlk PCR sonucunda VANGL1 geninin baskılandığı görülen kolonilerin RNA örneklerinden sentezlenen ikinci cDNA ile kurulan VANGL1 PCR sonuçları.

Şekil 30: pSilV1 ile transfekte 2 ve 16 nolu koloniler, boş vektörle transfekte 40 nolu koloni ve negatif kontrol olarak kullanılan HL60 promiyelositik lösemi hücre dizilerinin VANGL1 ekspresyonlarının western blotla gösterilmesi.

Şekil 31: HepG2 hücrelerinin invazyon (A, B) ve motilite (C,D) optimizasyonu.

Şekil 32: Atasal HepG2, anti-LPP2 monoklonal antikoru ile karşılaşmış HepG2 hücreleri, pSilV1 ile transfekte 2 numaralı ve 16 numaralı koloniler ve boş vektörle transfekte 40 numaralı kolonideki hücreler arasında motilite ve invazyon farklılıkları.

Şekil 33: Atasal HepG2 hücreleri, monoklonal anti-LPP2 antikoru ile karşılaşan atasal HepG2 hücreleri, pSilV1 plazmidi ile transfekte edilmiş ve VANGL1 geni sessizleştirilmiş 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş pSilencer 4.1 vektörüyle transfekte 40 numaralı kolonideki hücrelerin, hücre döngüsü analizi akış sitometresi sonuçları.

Şekil 34: Elde edilen kolonilerin β - katenin (A) ve GAPDH (B) ekspresyonu durumları.

C. KISALTMALAR

HCC: Hepatosellüler kanser/karsinoma

HBV: Hepatit B virusu

HBx: Hepatit B virusu X proteini

HCV: Hepatit C virusu

IGF2R: İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü

DHP: Düzlemsel hücre polaritesi yolağı

KE: Konverjant ekstansiyon hareketi

Wnt: Wingless –type MMTV (Mouse mammary tumor virus) integration site family

APC: adenomatoz polipozis koli

GSK 3 β : Glikojen sentaz kinaz 3 β

VANGL/Stbm: Van Gogh like/Strabismus

Dsh/Dvl: Dishevelled

Pk: Prickle

Fz: Frizzled

Fmi/fML: Flamingo

JNK: c-Jun amino terminal kinaz

ROCK: Rho ile ilişkili kinaz

TCF/LEF: T hücresi faktörü/Lenfosit etkinleştirici faktör

MMP: Matriks metalloproteinaz

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

dsRNA: Çift iplikli RNA

siRNA: Small interfering RNA

shRNA: Small hairpin RNA

ECM: Hücre dışı matris

EMD: Epitelial mezenkimal dönüşüm

MLCK: Miyozin hafif zincir kinaz

RISC: RNAi Sessizleştirme kompleksi

Özet

STBM/VANGL (Strabismus/VanGogh Like) Gen Ekspresyonunun Hepatosellüler Kansere Hücre Dizilerinde Hücre Davranışı Üzerine Olan Etkileri

G. Ozan ÇETİN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, İzmir

Hepatosellüler kanser (HCC) dünyadaki en yaygın beşinci kanser türüdür ve bilinen etkin bir tedavisi bulunmamaktadır.

Wnt düzlemsel hücre polaritesi yolunda yer alan ve transmembran bir protein olan Van Gogh like 1 (Vangl1) proteini gelişimsel süreçte embriyonik hücrelerin planar hücre polaritesi kazanmalarını sağlar ve konverjant ekstansiyon hareketinden sorumludur. Erişkinde, spesifik olarak testis ve ovaryumda, bunların dışında beyinde ve prostatta eksprese olur.

VANGL1 ekspresyonu, aralarında HCC'in de bulunduğu çeşitli insan kanser hücre dizilerinde gösterilmiştir. Araştırmamızda, VANGL1 geni siRNA yöntemiyle baskılanan HCC hücrelerinde, bu baskılanmanın yol açacağı hücre davranış değişikliklerinin incelenmesi hedeflendi.

HCC hücre dizilerinde, VANGL1 ekspresyonunun varlığı, RT-PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle gösterildi. İnternet tabanlı bir yazılım kullanılarak VANGL1 genine spesifik siRNA hedef bölgesi belirlendi. Bu hedefe yönelik saç tokası yapısındaki siRNA'yı transkribe edecek DNA dizisi tasarlandı. pSilencer 4.1 CMV Neo plazmidine siRNA kalıbı eklenip HepG2 hücreleri plazmidle transfekte edildi. VANGL1 geninin baskılandığı koloniler RT-PCR ile saptandı. Bu kolonilerden elde edilen protein lizatları western blotlama ile değerlendirilerek gen ekspresyonunun baskılandığı doğrulandı. VANGL1 geni baskılanmış hücrelerin motilite ve invazyon özellikleri Boyden odacık deney sistemi ile proliferasyon analizleri ise akım sitometresi ile değerlendirildi.

VANGL1 geni sessizleştirilen HCC hücrelerinin motilite özellikleri, baskılanmayan hücrelere göre belirgin değişiklik göstermezken, invazyon yeteneklerinin üç kat azaldığı gözlemlendi. Proliferasyon analizinde, VANGL1 geni

sessizleştirilmiş hücrelerle atasal hücre grubu arasında S fazındaki hücre oranı açısından belirgin farklılık gözlenmemiştir.

Sonuçta Vangl1 hücre motilitesinden çok hücre invazyonunu etkilemektedir. Bu etkinin mekanizmasını ortaya çıkartmak üzere ileri araştırmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Wnt, VANGL1, hepatosellüler kanser, motilite, invazyon, proliferasyon,

Summary

The effects of STBM/VANGL (Strabismus/Van Gogh like) gene expression on cell behaviour in hepatocellular cancer cell lines

G. Ozan Cetin

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Izmir

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer and has no effective treatments so far.

Van Gogh like 1 (Vangl1) is a transmembrane protein on Wnt planar cell polarity pathway. It has an important role in planar cell polarity and convergent extension in embryonic development. In adults, it is expressed specifically in testis and ovarium as well as in brain and prostate.

VANGL1 expression has been shown in several human cancer cell lines including HCC. Our aim in this study was to investigate the changes in the behaviour of the HCC cells whose VANGL1 gene was silenced by siRNA.

VANGL1 expression in HCC cell lines was shown by RT-PCR and real time PCR. An internet based software was used to find and design the siRNA target sequence and the siRNA template which will transcribe the specific hairpin siRNA for VANGL1 gene. The siRNA insert was ligated to pSilencer 4.1 CMV Neo vector and HepG2 cells were transfected. The colonies with the silenced VANGL1 gene were detected by RT-PCR and the level of the suppression was quantified by quantitative PCR. The silencing of the gene expression was confirmed by Western blotting. Motility and invasion of the cells with the silenced VANGL1 were assessed by Boyden chamber assay while proliferation analysis was performed by flow cytometry.

The motility of the cells was not affected with gene silencing while there was a three fold decrease in the invasion potential of the cells with the siRNA. The proliferation analysis revealed no significant difference in the cells with the silenced VANGL1 compared to the parental cells with regard to S phase cell ratio.

In conclusion, VANGL1 gene has an effect on cell invasion rather than cell motility. Further investigations are needed to understand the mechanism of this effect.

Key Words: Wnt, VANGL1, hepatocellular cancer, motility, invasion, proliferation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatosellüler karsinom (HCC) en sık görülen kanser türlerinden biridir. Etyolojisinde en çok hepatojenik viruslar, kronik alkolizm, aflatoksin B1 yer almaktadır. Çoğunlukla sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda daha sık görülmekle birlikte ABD ve Avrupa'da sıklığı artmaktadır.

HCC patogeneğinde yer alabileceği düşünülen pek çok moleküler mekanizma ortaya konmakla birlikte, eldeki verilerin çoğunun birbiriyle bağlantısız olması mikrodizilim analizlerine dayalı daha kapsamlı araştırmalara olan gereksinimi artırmaktadır.

Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family) yolağı, HCC gelişiminde suçlanan mekanizmalardan biridir ve evrimsel süreçte oldukça korunmuş olup hücre polaritesi, farklılaşması, çoğalması gibi kanserleşme sürecinde önemli pek çok hücre fonksiyonla ilişkilidir. Üç ana Wnt sinyal iletim yolağı bulunmaktadır. Bunlar klasik yolak, düzlemsel hücre polaritesi (DHP) yolağı ve Wnt/Ca²⁺ yolağıdır.

Klasik Wnt yolağında yer alan β -katenin proteini, bu yolağın aktivasyonu sonucunda aksin, APC, GSK-3 β ve konduktin proteinleriyle ubiquitin-proteazom sistemine yönlendirilerek parçalanır. Adı geçen proteinlerde herhangi bir fonksiyon kaybı olması durumunda β -katenin ubiquitinlenmediğinden parçalanmaz ve sitoplazmada birikerek hücre çekirdeğine geçer. Hücre çekirdeğinde β -katenin, birçoğu hücre döngüsü, farklılaşması gibi kanserle ilgili fonksiyonlar düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonunu etkiler.

DHP yolağı ise daha çok embriyonik dönemde aktif olduğu düşünülen bir yolaktır. Embriyo hücrelerinin konverjant ekstansiyon hareketinden ve düzlemsel hücre polaritesinden sorumludur. Bu yolakta yer alan Vangl1 proteini hücrenin düzlemsel polaritesinin sağlanması yanında aralarında HCC'un da bulunduğu insan kanser hücre dizilerinde eksprese edilmektedir. Çeşitli çalışmalarda hücrelerin motilite ve invazyon özellikleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

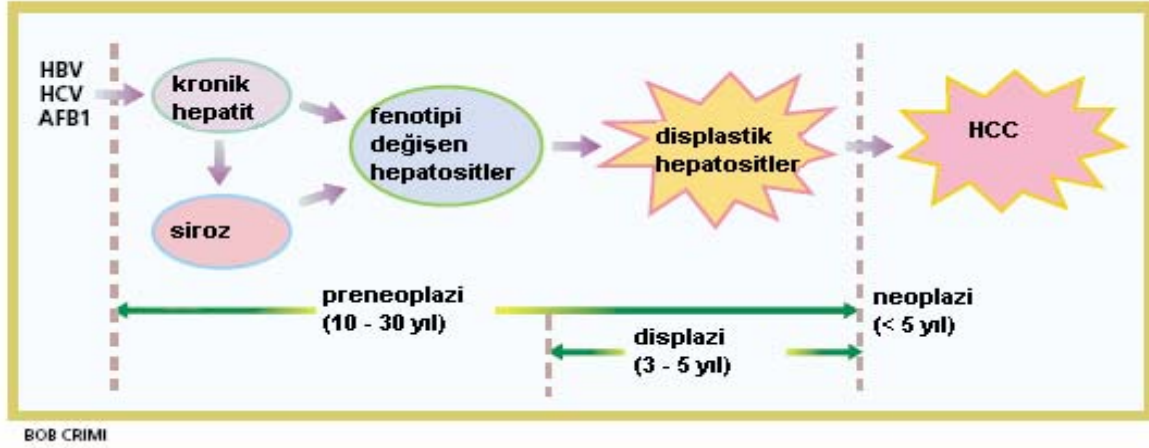
Araştırmamızda, HCC hücre dizilerinde Vangl1 ekspresyon durumunu değerlendirdikten sonra, güncel bir gen sessizleştirme yöntemi olan siRNA uygulamasıyla, HCC hücrelerinde ortaya çıkacak davranış değişikliklerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hepatosellüler Karsinom

Hepatosellüler karsinom (HCC) dünyadaki en yaygın beşinci kanser türüdür ve her yıl yaklaşık 600 000 ölümden sorumludur¹. Olguların yaklaşık %85'inden Hepatit B ve C viruslarının neden olduğu enfeksiyonlar ile aflatoksin B1 ve kronik alkolizm sorumludur². Bu bağlamda viral enfeksiyonların kökünün kazınmasına ve sağaltımına yönelik çalışmaların artması, HCC'un bazı toplumlarda yayılmasını engellese de özellikle Batı Avrupa ve ABD'de HCC görülme sıklığı artmaktadır³⁻⁴. HCC gelişiminden sorumlu pek çok moleküler mekanizma, hem HCC hücrelerinde hem de preneoplastik lezyonlarda araştırılarak gün ışığına çıkartılmıştır. Ancak, bu veriler çoğunlukla birbiriyle bağlantısız çalışmalardan elde edilmiştir ve çoğunlukla tek bir kromozom lokusu ya da gen grubundaki değişiklikleri kapsamaktadır. Dolayısıyla, günümüze dek elde edilen veriler yararlı olmakla birlikte, bütünlük göstermediklerinden HCC'in gelişimi, tanısı ya da spesifik tedavisi hakkında tutarlı bir görüş gelişmesini sağlayamamaktadırlar⁵. Günümüzde mikrodizin teknolojilerine dayalı, daha karmaşık gen ekspresyon analizlerini içeren araştırmalar yapılmaktadır.

HCC gelişimi ve ilerleyişi ile ilgili moleküler olaylar tam olarak bilinmemekle birlikte, en çok kabul gören görüşe göre, dış etkenlerin etkilemesiyle olgun hepatositlerde hücre nekrozu ve bunun sonucunda yenilenme amaçlı hücre çoğalması ve inflamatuvar hücre istilası ortaya çıkar. Bu değişiklikler karaciğer matrisinde ve mikroçevresinde büyük değişikliklere yol açarlar. Sonuçta monoklonal popülasyonların oluşumuna neden olan çeşitli genetik değişiklikler ortaya çıkar^{2,6}. Bu tip hücre popülasyonları displastik hepatositlerden oluşur ve displastik nodüllere evrimleşirler⁷. Yüksek dereceli displastik nodüller, preneoplastik lezyonlar olarak değerlendirilirler. Yaklaşık 1-5 yıl içerisinde olguların yaklaşık %30'unda malinite gelişir⁸. Başlangıçta, nodüllerde yeni damarlanma gözlenmezken, zamanla, hepatik arter tarafından desteklenen yeni damar oluşumuyla birlikte malin fenotip ortaya çıkar. Erken dönemde gözlenen iyi diferansiye bu tümörler yüksek düzeyde proliferatiftir ve 1–1.5 cm boyuta ulaştıklarında daha az diferansiye hale gelirler⁹. Bu aşamada, olguların yaklaşık %25'inde anjiyogenez, doku invazyonu ve metastazlar baş gösterir. Daha sonra, neoplastik hücreler farklılaşma özelliklerini kaybederler ve son dönem hastalığın özellikleri olan, damar içine invazyon ve karaciğer dışı metastazlar ortaya çıkar¹⁰.



Şekil 1: HCC gelişiminde yer alan hücresel olayların kronolojik sıralanması.²

Hastalığın çeşitli aşamalarındaki genetik hasarın ortaya çıkarılması için pek çok araştırma yapılmıştır ancak kesin olarak belirlenebilmiş bir değişiklik bulunmamaktadır. Hepatokarsinogenezin erken dönemlerinde telomerlerde kısalma, 1p36-p34 bölgesinde ve M6F/IGF2R geninde heterozigosite kaybı gibi genetik değişiklikler gözlenmiştir¹¹. Ayrıca, SP70, glipikan-3 gibi erken dönem HCC belirteci olabilecek bazı genler öne sürülse de bu sonuçların doğrulanması gerekmektedir¹². Hastalığın ileri dönemlerinde, olguların yaklaşık %60'ında özellikle 1, 4, 8, 16 ve 17 olmak üzere tüm kromozomlarda allelik değişiklikler gözlenir. Hastaların %30-40'ında p53 davnregülasyonu görülmektedir¹⁰. TP53 geninin 249. kodonundaki G → T mutasyonu aflatoksin ile ilişkilendirilmiştir¹³. HCC'a yol açan yolaklar etiyolojiye göre değişiklik göstermektedir. Hepatit B virusu (HBV) ile ilişkili HCC, birçok kromozomda değişikliğin gözlendiği daha yoğun bir genetik instabilite ile seyrederken, HBV ile ilişkili olmayan HCC'da daha çok β – katenin mutasyonları ve Wnt yolağının aktivasyonu gözlenir¹⁴⁻¹⁵.

2.1.1 Hepatit B Virusü (HBV)

HCC için en önemli risk faktörlerinden biri kronik hepatit B virusu (HBV) enfeksiyonudur. HBV DNA'sının hücre DNA'sına entegrasyonu ile, enfekte hücrelerin ilerleyici klonal çoğalımı söz konusudur¹⁶. Uzun vadeli süregelen yangı, karaciğer hücre çoğalma hızındaki artışla birlikte entegre olmuş viral genomda yeniden

düzenlenmelerin ortaya çıkma olasılığını arttırır¹⁷. Bunu yanı sıra virus genomunun entegre olduğu bölgede kromozomal yeniden düzenlenmeler de gözlenebilir. Sonuçta HBV enfeksiyonu, kromozomal kararsızlığa neden olabilir.

HBV DNA'sı, hücre içi sinyal iletiminde, çoğalmasında ya da hücre canlılığının sürdürülmesinde rolü olan proteinleri kodlayan genler de dahil olmak üzere, karaciğer hücre genlerinden birine entegre olarak söz konusu genin ekspresyonunu artırabilir. HBV ile ilişkili farklı HCC olgularında yapılan çalışmalarda, telomeraz geninin HBV entegrasyonu için hedef genlerden biri olduğu gösterilmiştir. Benzer durum kalsiyum homeostazında ve MAP-kinaza bağımlı sinyal iletiminde yer alan proteinleri kodlayan genler için de geçerlidir¹⁸⁻²⁰. HBV'na ait proteinlerden viral bir onkoprotein olan HBx proteininin açık okuma çerçevesi, viral genlerin hücre DNA'sına entegrasyonundan sonra da korunur ve transkripsiyonu sürer¹⁶. Bu proteine karşı oluşan anti-HBx antikorunu saptamaya yönelik bir çalışmada, antikorun, HCC'lu hastalarda, HCC'lu olmayan kronik hepatitli hastalara göre daha fazla olduğu görülmüştür²¹. Yapılan çalışmalarda HBx'in biyolojik aktivitesi ile ilgili elde edilen bulgular şöyle özetlenebilir:

- a) HBx *cis*-aktiviteli düzenleyici elemanlar üzerinden hücresel promotörlere etki ederek, hedef gen ekspresyon düzeylerini değiştirir ve apoptoz, hücre çoğalması, DNA hasarına yanıt gibi hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını bozabilir²².
- b) Proteazom fonksiyonunu değiştirerek, hücresel ve viral proteinlerin yıkımını kontrol edebilir²³.
- c) Mitokondri fonksiyonu üzerinde etkisi vardır²³.
- d) Kalsiyum homeostazını etkileyebilir²⁴⁻²⁵.

2.1.2 Hepatit C Virusu (HCV)

HCC için bir diğer önemli enfeksiyöz etiyolojik faktör de hepatit C virusu (HCV) ile kronik enfeksiyondur. Son yıllarda özellikle 1960–1970 kuşağının yaşlanmasıyla birlikte, özellikle gelişmiş ülkelerde HCV pozitif HCC olgularının sıklığında artış beklenmektedir²⁶. Bir RNA virusu olan HCV'nun genomunda 10 protein kodlanır. Bu proteinler, viral yaşam döngüsündeki rollerinin yanı sıra apoptoz, malin dönüşüm, çeşitli sinyal iletim yolları, immün baskılama gibi fonksiyonlara da sahiptir. HCV'nun yapısal olmayan proteinlerinden NS3 proteini bir viral proteaz olmasının yanında,

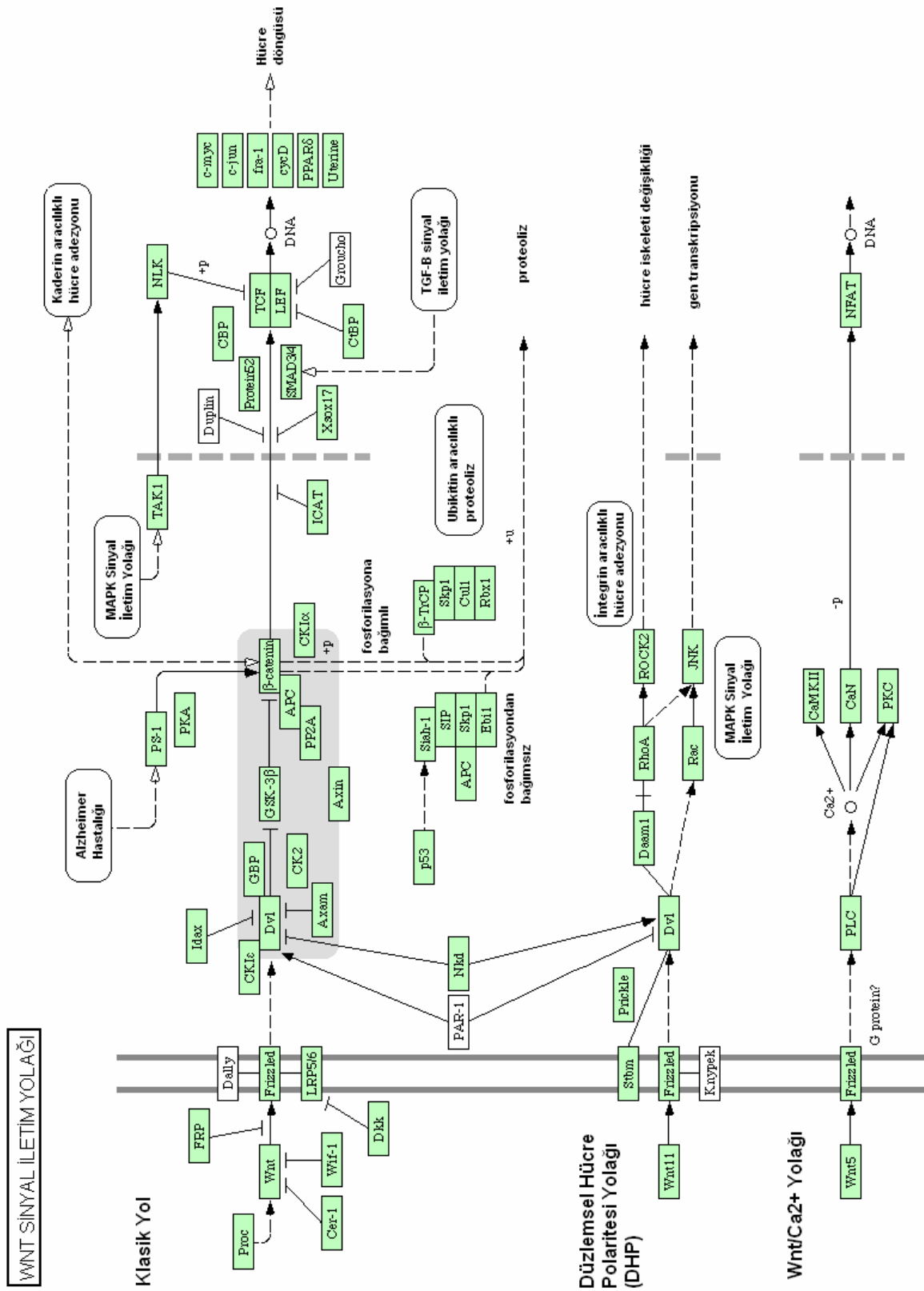
viral enfeksiyonlara yanıt olarak oluşan, interferon yanıt faktörü (IRF)-3-aracılıklı tip I interferon yanıtını baskılayarak, HCC hücrelerinin, bağışıklık sisteminin gözünden kaçmasını kolaylaştırabilir²⁷. Birçok karaciğer hastalığında hepatik hasarın oluşumundaki asıl mekanizmalardan biri oksidatif strestir²⁸. HCV'nun kor ve NS5A proteinlerinin, enfeksiyon sırasında karaciğer hasarını artıran, süperoksit ve peroksit gibi, reaktif oksijen radikallerinin üretimini artırdığı gözlenmiştir²⁹⁻³⁰. Kor proteini, mitokondriye yerleşerek reaktif oksijen radikali üretimini artırır ve mitokondri içerisindeki sitokrom c, kor proteinini eksprese eden hücrelerde, olasılıkla antioksidan ve antiapoptotik genlerin indüklenmesi nedeniyle, spontan apoptoz gerçekleşmez²⁹. NS5A ise, hücre içi kalsiyum salınımını indükleyerek reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur³⁰. Sonuçta NFkB ve STAT-3 yolları aktive olur³⁰. Ayrıca kronik yangı nedeniyle yangısal sitokinlerin üretilmesi de reaktif oksijen radikali oluşumuna katkıda bulunur. Tüm bu olayların sonucunda, kromozom hasarının kolaylıkla oluşabileceği prokarsinojenik bir ortam ortaya çıkar.

HCV ile enfekte B-lenfoma hücre dizileriyle yapılan bir çalışmada, enfekte olmayan kontrol grubu hücreler ile karşılaştırıldığında, HCV ile enfekte hücrelerin immünglobulin ağır zincir, β -globin, BCL, p53 ve β -katenin genlerinde mutasyon frekansı 5 -10 kat daha fazla saptanmıştır. Aynı çalışmada HCV ile enfekte hücrelerde çift iplikli DNA kırıklarının sıklığının arttığı da gösterilmiştir. Bu artış, her ikisi de hipermutator fenotipin moleküler mekanizmasında yer alan, DNA polimeraz ζ ve sitidin deaminazın indüklenmesine bağlanmıştır³¹.

2.1.3 Wnt Sinyal iletim yolağı ve β – katenin

Dölllenmiş yumurta hücresinden kompleks çok hücreli organizmanın gelişimi, karmaşık ve gelişmiş sinyal iletim yolları tarafından sıkıca kontrol edilmektedir. Bu sinyal yolları, Hedgehog, Tgf- β , Wnt ailesi gibi faktörleri içermekte ve birçok basamakta kontrol altında tutulmaktadır³². Bununla birlikte kontrolün bozulması veya sürekli olarak uygunsuz bir şekilde aktivasyonu çeşitli kanserlerin ortaya çıkması ile ilişkilidir. Evrim sürecinde yüksek derecede korunmuş olan Wnt proteinleri, Wnt sinyal yolağını yönlendirirler ve bileşenleri olan β -katenin, APC, GSK-3 β , aksin ve konduktin ile embriyogenez sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde, erişkin dokularında ise hücre çoğalmasında önemli rollere sahiptirler³³. Salgılanan Wnt ligandının, frizzled (Fz) ailesi üyesi olan reseptörüne bağlanması ile üç farklı hücresel sinyal iletimi

yolağı aktive olur. Bunlar, klasik Wnt yolağı, Wnt/Ca²⁺ yolağı ve düzlemsel hücre polaritesi (DHP (Planar Cell Polarity (PCP)) yolağıdır. (Şekil 2)



04310hsa 3/18/04

Şekil 2: WNT sinyal iletimi yoluğı. (http://kegg.com/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04310)

2.1.3.1 Klasik Wnt Yolağı

Klasik Wnt yolağı, evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş proteinleri kapsamaktadır. Bu çok fonksiyonlu protein ailesinin oluşturduğu yolak, sonda yer alan β -katenin'in, özel hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmesi ile sonuqlanır. β -katenin, Wnt sinyal iletimi olmadığında, GSK-3 β , aksin, konduktin ve APC proteinleri aracılığıyla, N-ucundaki serin-treonin alt birimlerinden fosfatlanır ve ubiquitin-proteazom sistemine y6nlenerek parqlanır³⁴. Wnt yolağının aktive olması GSK-3 β aktivitesini inhibe eder ve b6ylece β -katenin ubiquitin sisteminden korunarak kararlı hale gelir. Sitoplazmada biriken β -katenin, Tcf/Lef ailesinden proteinlere bağlanır ve h6cre qlerdeğine geqlerek c-Myc, Siklin D1 gibi hedef genlerin transkripsiyonunu d6zenler³⁵⁻³⁷. Buradaki hedef genlerin bir qlou; h6cre qlalması, farklılaşması, invazyonu ve tedaviye yanıt gibi kanserle ilişkili fonksiyonlardan sorumludur³⁸. HCC h6cre dizilerinde, β -katenin geninin, GSK-3 β fosforilasyon b6lgelerini iqleren 6ql6nc6 ekson mutasyonlarının, β -katenin'in sitoplazmada ve h6cre qlerdeğinde birikmesine neden olduğu g6sterilmiřtir³⁹. Primer HCC'lerin yaklaşık %62'sinde anormal β -katenin ekspresyonu bildirilmiřtir⁴⁰.

2.1.3.2 Wnt/Ca²⁺ yolağı

Wnt sinyal iletim yolaklarından bir diğeri olan Wnt/Ca²⁺ yolağı, fosfolipaz C aktivasyonunu sağlar ve Ca²⁺ d6zeyini y6kseltir. H6cre iqler serbest Ca²⁺un d6zeyinin artması protein kinaz C'yi (PKC), Ca²⁺-kalmodulin bağımlı protein kinaz II'yi (CaMKII) ve fosfataz kalsin6rini (CaN) aktive eder. B6ylece transkripsiyon fakt6r6 NFAT fosfatlanır ve n6kleusa geqlerek hedef genlerin ekspresyonunu değiştirir^{32,41-42}.

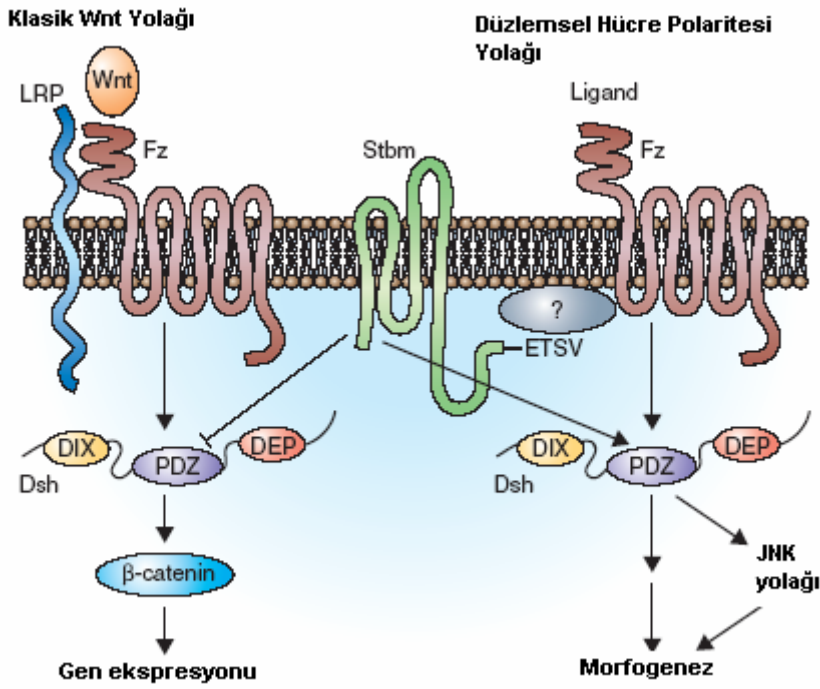
2.1.4 D6zlemsel H6cre Polaritesi Yolağı ve VANGL

2.1.4.1 D6zlemsel H6cre Polaritesi Yolağı

D6zlemsel h6cre polaritesi (DHP) yolağı, h6crenin biyolojik aktivitesinde birql rol6 olduğu g6sterilen Wnt yolaklarından biridir ve h6cre polaritesi ve gelişimsel s6reqlerle ilgilidir. DHP sinyali, sinyal iletimi molek6llerinin h6crede asimetric olarak dağılımını ve sonuqlta h6cre iskeletinin asimetric d6zenlenimini sağlar. Bazı

durumlarda, DHP sinyaline yanıt olarak JNK yolağının aktive olduğu gözlenmiştir⁴³. Hem klasik Wnt yolağı, hem de DHP yolağı Fz (Frizzled) reseptörü ve sitoplazmik adaptör protein Dvl/Dsh (Dishevelled) aracılığı ile sinyal iletimini gerçekleştirirler. LRP koreseptörü ise, klasik Wnt yolunda yer alırken DHP yolağında bulunmaz⁴⁴. Dsh'in üç korunmuş bölgesi vardır: - DIX bölgesi klasik Wnt yolağında görevlidir, PDZ bölgesi, Stbm (Strabismus/Van Gogh Like (VANGL)) ve CKI bağlanmasını sağlar, DEP bölgesi ise DHP sinyal iletimi sırasında Dsh'in zara yerleşiminde rol oynar⁴⁵⁻⁴⁶. (Şekil 3).

VANGL1 (strabismus 2 olarak da bilinir), transmembran bir proteindir ve klasik Wnt sinyal iletimi ile DHP yolağı arasındaki geçişte klasik yolu baskılayıp sinyalin DHP yolağı üzerinden iletilmesini sağlar.



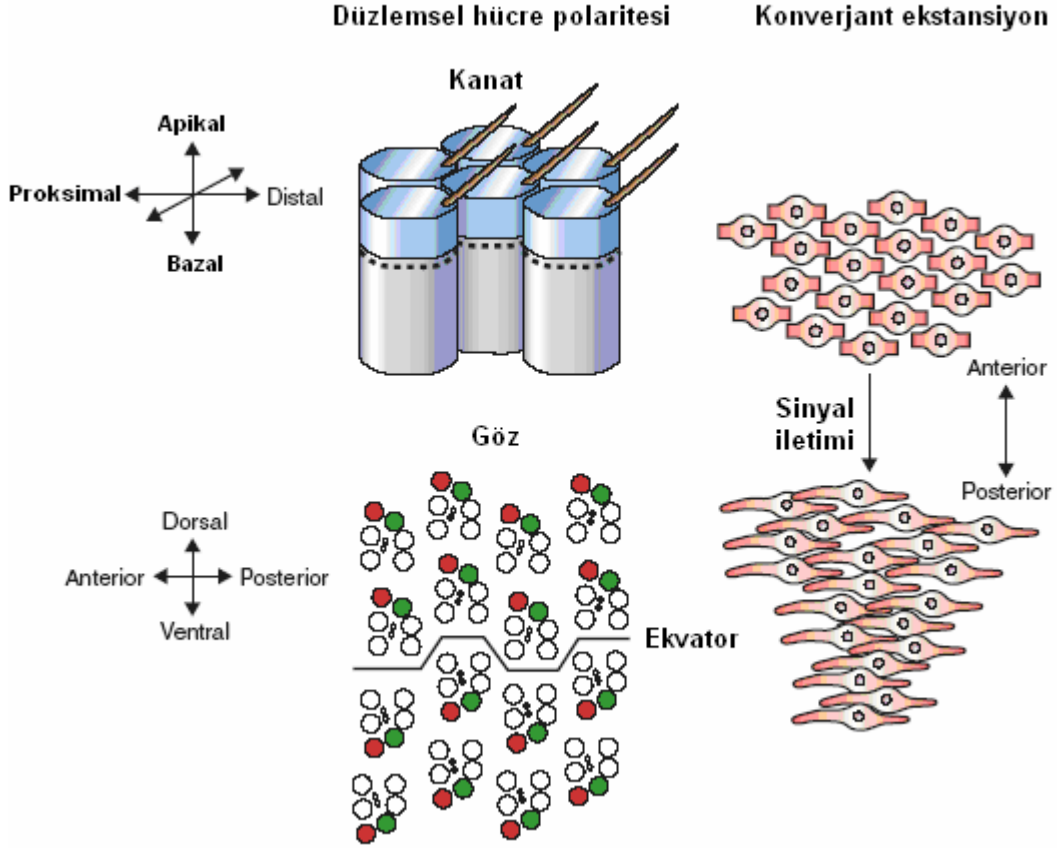
Şekil 3: İki alternatif Wnt sinyal iletim yolağı⁵⁶

DHP yolağının aktive olması sonucunda, konverjant ekstansiyon (birleştirici uzama) olarak bilinen bir morfojenik hareket düzenlenmektedir. Bu harekette, hücreler polarize olur ve aralarındaki boşluğu dolduracak şekilde uzarlar. Sonuçta birbirlerinden uzaktaki lateral yapılar yakınlaşır (konverjans) ve ön-arka eksenleri uzar (ekstansiyon)⁴⁷⁻⁴⁹. (Şekil 4)

DHP yolağının, *Drosophila*'da epitel polaritesinin düzenlenmesinde sahip olduğu rol aydınlatılmıştır. Ligandın Frizzled'a (Fz) bağlanmasından sonra, DHP

sinyal iletiminin gerçekleşmesi için Dvl ve Vang aktive olmaktadır⁵⁰⁻⁵¹. Bu proteinlerin aktivasyonu sonucunda JNK aktive olur⁵²⁻⁵³. Vang *Drosophila*'nın göz gelişiminde R3/R4 fotoreseptör hücre kaderini belirler ve kanat hücrelerinin polaritesini düzenler⁵⁴ (Şekil 4).

Vang'ın faredeki homoloğu olan Ltp (Loop tail) genindeki mutasyonların ise nöral tüp defektine neden olduğu gösterilmiştir⁵⁵.



Şekil 4: Düzlemsel hücre polaritesi ve konverjant ekstansiyon hareketi⁵⁶.

Çok hücreli organizmalarda epitel hücreleri, sadece apikal – bazal ekseninde değil aynı zamanda, epiteliyal düzlemde de polarize olurlar. Bu polarizasyon, omurgalılarda en iyi balık pullarında, kuş tüylerinde ve iç kulak gibi tüysü hücrelerin düzenli bir dizilim gösterdiği iç organlarda gözlenir⁵⁷.

Drosophila'da düzlemsel hücre polaritesi kazanılırken DHP yolağında yer alan Fz, Dsh, Dgo, Fmi ve Pk proteinleri kanat hücrelerinin apikal zarında üniform dağılım gösterirler⁵⁸. DHP sinyali iletimi sırasında ve hemen ardından, bu proteinler yer değiştirirler ve dağılım konsantrasyonları değişir. Pk proteini hücrenin proksimal

tarafında yoğunlaşırken, Fz ve Dsh proteinleri distalde yoğunlaşmaktadırlar. Fmi proteini yoğunluğu ise her iki yüzde de artmaktadır⁵⁷.

Hücrenin düzlemsel polaritesinin sağlanması sırasında, DHP sinyal iletiminde yer alan proteinlerin apikal zardaki yoğunluk değişimleri göz hücrelerinde de görülmektedir. Polaritenin kazanılması için hücre plazma zarında üniform halde dağılmış olan proteinler, proksimalde Stbm ve Pk'dan distalde ise Fz ve Dsh'dan yoğun olacak şekilde yer değiştirirler⁵⁹. Fmi proteini ise hem Fz/Dsh protein kompleksi hem de Stbm/Pk protein kompleksi ile ilişki halindedir.

Drosophila ve *Xenopus*'ta yapılan lokalizasyon çalışmalarında, Pk ve Stbm'un birbirlerinin yerleşimini etkileyerek, hücre zarında kümeleştikleri öne sürülmüştür. Stbm/Pk protein kompleksleri Dsh'in Fz'a bağımlı zar yerleşimini de etkilemektedir⁵⁷. Stbm, C ucundaki PDZ bölgesi aracılığıyla Dsh ile etkileşim kurmaktadır⁴⁵.

2.1.4.2 İnsan VANGL Geni

İnsan VANGL geni ilk kez iki farklı grup tarafından *Drosophila*'da klonlanarak Strabismus (Stbm) ve Van Gogh (Vang) olarak adlandırılmıştır^{54,60}. Vang/Stbm geninin epitel hücrelerinin düzlemsel yönlendirilmesinde (düzlemsel hücre polaritesi) önemli rolü olduğu belirlenmiştir⁶¹. İnsanda Vangl1 ve Vangl2 olarak bilinen ve aralarında %73.1 amino asit benzerliği bulunan iki homoloğu vardır. Bu genlerin evrimsel süreçte korunmuş oldukları saptanmıştır. Vangl1 ile *Xenopus* Vang'ı arasındaki amino asit dizi homolojisi %72.7, Vangl2 için ise %90.1'dir⁶².

İnsan VANGL1 geni, 2062 baz çifti uzunluğunda bir cDNA'ya sahiptir. Toplam yedi eksonu vardır. 1p13-p11 bölgesine lokalize edilmektedir. Vangl1 proteini 524 amino asit uzunluğunda, 59.9 kD büyüklüğünde, dört transmembran bölgesi olan bir proteindir. C-ucunda Ser/Thr-X-Val motifi bulunur. N-ucunda sinyal dizisi bulunmamaktadır. Dört transmembran bölgesi olduğu için tetraspanin grubu proteinler arasına konumlandırılmaktadır. Tetraspaninler, dört transmembran bölgesi olan hidrofobik glikoproteinlerin oluşturduğu bir ailedir ve bir çok farklı proteinle ilişki kurarlar⁶³⁻⁶⁴. Vangl1 erişkinde testis ve overde spesifik olarak eksprese olurken, beyin ve prostattaki ekspresyonu nonspesifiktir⁶⁵. Ayrıca intestinal epitel hücrelerinde de ekspresyonu gösterilmiştir⁶⁶. Çeşitli insan kanser hücre dizilerinde VANGL1 geninin eksprese olup olmadığı incelendiğinde, çoğunda ekspresyonun var olduğu

belirlenmiştir (Tablo 1). Ayrıca, primer hepatosellüler kanser dokularıyla yapılan bir çalışmada, Vangl1 ekspresyonu varlığı saptanmıştır⁶⁷.

Tablo 1: Çeşitli kanser hücre dizilerinde Vangl1 ekspresyonu⁶².

Hücre dizisi	Alındığı doku	Vangl1 ekspresyon durumu
HeLa S3	Serviks kanseri	Var
K-562	KML	Var
MOLT-4	Lenfoblastik lösemi	Var
SW 480	Kolorektal kanser	Var
A549	Akciğer kanseri	Var
HL-60	Promiyelositik lösemi	Yok
Raji	Burkitt lenfoma	Yok
MKN28	Gastrik kanser	Var
MKN74	Gastrik kanser	Var
BxPC-3	Pankreas kanseri	Var
PSN-1	Pankreas kanseri	Var
Hs766T	Pankreas kanseri	Var
AsPC-1	Pankreas kanseri	Yok

Drosophila'da, DHP yolağında yer alan proteinleri kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu, DHP yolağı sinyal iletiminin bozulmasıyla, gözlerdeki ommatidler, kanat hücrelerindeki tüysü yapılar, bacaklardaki dikensi yapılar gibi yüksek düzeyde organize, spesifik epitelial yapılarda yönlenme bozuklukları ortaya çıkmaktadır^{61,68}.

Drosophila'da yapılan çalışmalarda, düzgün bir düzlemsel polaritenin sağlanması için, Vang, Pk, Dvl ve Fz'dan oluşan multiprotein zar kompleksinin oluşması gerekir. *Drosophila* kanadındaki hücrelerin her birinde, DHP proteinleri apikal zarda simetrik olarak dağılırlar. Ancak düzlemsel hücre polaritesi oluşumu sırasında bu dağılım asimetric hale dönüşür. Vang ve Pk'in oluşturduğu kompleks, apikal-proksimal yerleşim gösterirken, Fz-Dvl kompleksi hücrenin apikal-distal kısmına yönelir⁶⁹⁻⁷⁰. Bu asimetrinin, düzlemsel polaritenin sağlanmasında anahtar rolü olduğu düşünülmektedir⁶¹. Moleküler düzeyde gerek Vang'ın gerekse Vangl'in,

sitoplazmik Dvl ve Pk proteinlerine bağlandığı ve plazma zarına yerleşmelerini sağladığı gösterilmiştir^{45,57,70}.

Omurgalılarda yapılan çalışmalarda, Vangl 2'nin, kurbağalarda ve zebra balığında gasturulasyon ve nörolasyon sırasında, hücrelerin konverjant ekstansiyon (KE) hareketini düzenlediği gösterilmiştir^{45,71,72}. KE hareketi sırasında, dorsal mezenşimal ve nöroepiteliyal hücreler mediyolateral yönde polarize olurlar ve göç ederek bir araya toplanırlar. Bu hareketle birlikte, anterior-posterior eksen uzar ve epitel kitlede dikey bir daralma ortaya çıkar⁷³. Mezenşimal KE hareketi engellendiğinde hayvanlar kısa, geniş gövdeli olurlar⁷³⁻⁷⁴. Nöral tüp oluşumu sırasında KE'da bozukluk olursa, nöral tabaka orta hatta çok genişler ve sonuç olarak nöral tüp kıvrımları birbirlerinden çok uzakta kaldığında nöral tüp kapanması gerçekleşemez^{75,76}.

Bir tümör metastaz supressörü ve tetraspanin olan KAI1 ile yapılan bir çalışmada, Vangl1 proteininin kolon kanseri hücrelerinde, KAI1 proteinine bu proteinin C-ucundan bağlantılı olduğu bildirilerek Vangl1'e KİTENİN (KAI1 COOH-terminal Interacting Tetraspanin) ismi önerilmiştir. Aynı çalışmada metastatik kolon kanseri hücrelerinde Vangl1'in KAI1 ekspresyonunu azalttığı ve fare modellerinde antisens Vangl1 ile transfekte kanser hücrelerinin metastatik yeteneğinin kontrol hücrelerine göre önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir⁷⁷. Aynı grubun yine farelerde daha sonra yaptığı bir çalışmada ise hayvanlarda oluşturulan kolon kanserinde tümörün metastaz özelliğinin intravenöz Vangl1 siRNA'sı uygulanarak azaldığı gösterilmiştir⁷⁸.

İnsan barsak epitelinde Vangl1 ekspresyonu, normal kolonda ve intestinal epitel hücre dizilerinde saptanmıştır. Oluşturulan yara iyileşmesi modeli ile intestinal epitel tamiri sırasında önemli bir rolü olan ITF/TFF3 polipeptidinin Vangl1'in Ser/Thr fosforilasyonunu sağladığı gösterilmiştir. ITF ile uyarı sonucu Vangl1 plazma membranındaki normal lokalizasyonunu değiştirerek sitoplazmik veziküllerde yer alır. Ayrıca Vangl1 ekspresyonunun artırılmasının yara kapanmasını hızlandırdığı da gösterilmiştir⁶⁶.

Sonuç olarak VANGL1, hücrelerin polarizasyonu ve dolayısıyla motilitesinden sorumlu olan bir sinyal iletim yolağında yer alan önemli bir adaptör proteindir. HCC ve diğer kanser türleri ile ilişkisiyle ilgili veriler olmakla birlikte, çeşitli kanser hücrelerinin invaziv yeteneklerini sağladığı düşünülmekte ancak bu konuda kesinleşmiş bir bilgi bulunmamaktadır.

2.2 Tümör Hücrelerinin İnvazyon ve Migrasyon Özellikleri

Kanser hücreleri invazyon ve migrasyon yetenekleri sayesinde dokular arasında göç ederler. Tümör hücrelerinin bu özellikleri embriyoner morfogenez, yara iyileşmesi, immün-hücrelerin ilgili organlara göçü gibi, kanserleşmemiş normal dokularda görülen fizyolojik göç mekanizmalarına çok benzer⁷⁹.

Bir hücrenin göç edebilmesi için öncelikle şeklini değiştirmesi ve yakın çevresinde yer alan hücre dışı matrisle (ECM) ilişki kurabilmesi gerekir⁸⁰.

Hücre göçünde yer alan olaylar bir dizi basamaktan oluşur⁷⁹. Öncelikle hücrenin polarize hale gelmesi ve uzaması gerekir. Daha sonra hücrenin, ECM ile bağlantı kuran, öncü kenarında hücre zarının uzaması ile psödopod adı verilen bir yapı oluşur. Ardından bazen hücrenin öncü kısımları bazense tamamı kasılarak, hücre gövdesinin ileri doğru itilmesini sağlayan bir çekiş kuvveti oluşturulur. Böylece hücre yer değiştirmiş olur.

Hücre psödopodları, aktin ve çeşitli yapısal proteinler ile sinyal iletimi molekülleri içerir. Böylelikle, ECM'te yer alan substratlarla bağlantı kurabilir⁸⁰.

Başlangıçta yer alan psödopod oluşumu sırasında aktin polimerizasyonu gerçekleşir ve mikrofilamanlar oluşur⁸¹. Bu aşamada, ECM'e integrin bağlanmasıyla oluşan adezyon ya çok az miktardadır ya da hiç görülmez. Uzayan hücre çıkıntıları daha sonra yakınındaki ECM'e dokunur ve çoğu integrin ailesi reseptörlerinden olan transmembran proteinleri ile tutunur⁸². İntegrinler, adaptör proteinler aracılığıyla, aktin iskeletle ilişkilidirler ve hemen bir araya gelip, kümeleşerek fokal kompleksi ve ardından fokal kontağı oluştururlar. Fokal kompleksler, hücre ve ECM arasında oluşan küçük, geçici bağlantılardır. Fokal kontakt ise fokal adezyon olarak da bilinen, fokal kompleksin oluşturduğu kalıcı, hücre ECM bağlantısıdır. İntegrinlerle CD44, CD26, yüzey proteoglikanları gibi diğer adezyon moleküllerinin bir araya gelmesi yüzey proteazlarının adezyon bölgelerine yönlenmesine neden olur ve sonuçta ECM komponentlerinin yıkımı gerçekleşir⁸⁰. Hücre, arkasında tüp şeklinde bir matris boşluğu bırakarak, ECM'de proteazların oluşturduğu boşluğa doğru yer değiştirir.

Fokal kontaktların oluşumu sırasında ve öncesinde, aktin filamanları, bölgesel olarak uzarlar ve α -aktinin, miyozin II gibi çapraz bağlanma sağlayan proteinler ile bir ağ yapısı oluştururlar⁸⁰. Plazma zarının iç kısmında yer alan dallanmış aktin ağı kortikal aktin olarak adlandırılırken, sitoplazmada yer alan aktin filamanlarına stres fibrilleri denir. Aktin filamanlarının kontraksiyonu miyozin II tarafından sağlanır. Stres

fibrillerinin oluşumu ve kontraksiyonu, miyozin II tarafından kontrol edilirken, küçük bir G-proteini olan RHO ve sinyal iletiminde RHO'nun aşağısında yer alan ROCK tarafından indüklenir⁸³. Kortikal aktin ağı ise MLCK (miyozin hafif zincir kinaz) tarafından düzenlenir^{84,85}.

Kanser hücrelerinin motilitesinde de integrin sinyal iletimi, fokal kontakt oluşumu ve aktomyozine bağımlı kontraktilite görülmektedir⁸⁶. Matris metalloproteinazlar (MMP) ve katepsin gibi ECM'i parçalayan enzimlerin miktarları tümör hücrelerinde çoğunlukla artmıştır ve *in vitro* olarak migrasyonu⁸⁷, *in vivo* olarak da metastazı sağladıkları görülmüştür⁸⁸. Benzer şekilde, *in vitro* tümör hücresi migrasyonunda ve *in vivo* invazyon ve progresyonda RAC, RHO, ROCK ve MLCK sinyal iletim yollarının aktive olduğu bulunmuştur⁸⁹.

In vitro ve *in vivo* gözlemlerde tümör hücrelerinin çevrelerindeki doku matrisini farklı şekillerde infiltre ettikleri görülmüştür⁸⁰. Tek tek hücreler şeklinde yayılım gösterebilecekleri gibi solid hücre kümeleri şeklinde de yayılabilirler. Birçok tümörde her iki durum da gözlenmiştir, ancak, lösemiler, lenfomalar ve birçok solid stromal tümörü oluşturan hücreler yalnız başlarına göç ederken, epiteliyal tümörleri oluşturan hücreler daha çok bir arada göç ederler. İlke olarak, tümörün differansiyasyon düzeyi azaldıkça, tümör hücrelerinin yalnız başlarına migrasyon özellikleri artmaktadır⁹⁰.

Hücrelerin bir arada göçü normal dokularda, embriyoner dönemde nöral tüpün kapanmasından sonra ektoderm ve blastoderm hücrelerinde⁹¹, meme dokusunda kanalların oluşumunda ve yeni damar oluşumunda gözlenir^{92,93}. Tümörlerde ise invaziv epiteliyal kanserlerde görülen, lokal invazyonla sonuçlanan, bir grup hücrenin ana tümör yapısıyla bağlantısını koparmadan komşu dokuya geçmesi ya da küçük kümeler şeklinde kopan hücrelerin perinöral kılıf gibi direncin düşük olduğu yolları ya da interstitiel boşlukları kullanarak göç etmesi şeklinde ortaya çıkar⁸⁰.

Daha çok epiteliyal kökenli kanserlerde görülen tümör hücrelerinin yalnız başına göç etme özelliği, hücre tipine, integrin bağlantılarına, hücre iskeleti yapısına ve proteaz üretimine göre farklı morfolojik varyantlar gösterebilir. Bunlar, mezenkimal göç, ameboid tipte göç ve hücre zinciri şeklinde göçtür⁸⁰.

Mezenkimal göç, daha çok fibrosarkoma ve gliyoma gibi bağ dokusu tümörleri ile ilerleyici tipte dedifferansiyasyon gösteren epiteliyal tümörlerde görülür⁹⁴.

Ameboid göç, daha çok lenfositler ve nötrofiller gibi daha yuvarlak yapılı hücrelerde, ayrıca tanımlanmış hücre dizilerindeki hücrelerde gözlenen daha az adeziv bir migrasyon tipidir⁹⁰. ECM'te proteolitik aktivite gözlenmemektedir⁸⁰.

Hücre zinciri şeklindeki göç ise embriyoner nöral krista hücrelerinde, miyoblastlarda ve melanoma hücrelerinde görülür^{95,96}. Burada hücreler birbirleri ardınca bir zincir oluşturacak şekilde göç ederler. Hücreler, göç sırasında birbiri ardına dizildikleri ve uçlardan tutundukları için bu göç tipinde bazı hücre-hücre bağlantılarının korunduğu düşünülmektedir⁸⁰. Bu tipte göç yoluyla invaze olan tümörlerin, özellikle metastatik kapasiteyi gösteren etkin bir penetrasyon mekanizmalarının olduğu, dolayısıyla kötü prognozlu oldukları düşünülmektedir⁹⁷.

Epitelial mezenkimal dönüşüm (EMD), dedifferansiyasyondan sonra epitelial kanser hücrelerinin, fonksiyonel olarak kolektif invazyon paterninden ayrı ayrı ve yaygın hücre göçü mekanizmasına dönüşümüdür. EMD'e uğrayan hücreler fibroblastlara benzer şekilde göç ederler. Histolojik olarak bu dönüşüm, epitelial tümörler içerisinde gelişen sarkom benzeri oluşumlardır. EMD'nin oluşması için, hücrelerin hücre-hücre bağlantılarını kaybetmiş olmaları ancak integrinler gibi migrasyonu sağlayacak moleküllerinin ekspresyonunun korunmuş olması gerekir⁹⁰. Hücre-hücre adezyonunun kaybı tümör mikroçevresinde sitokinlerin üretilmesiyle de oluşabilir. Örneğin, hepatosit büyüme faktörü kadinleri azaltırken, promigratör küçük GTPazları aktive eder⁸⁰.

EMD, invaziv özellik kazanmada önemli bir basamaktır çünkü epitelial hücrelerin birlikte göç mekanizmasından, yalnız başlarına göç mekanizmasına dönüşümünü gösterir ve farklılaşma kaybının önemli bir sonucudur⁹⁰.

2.3. shRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi

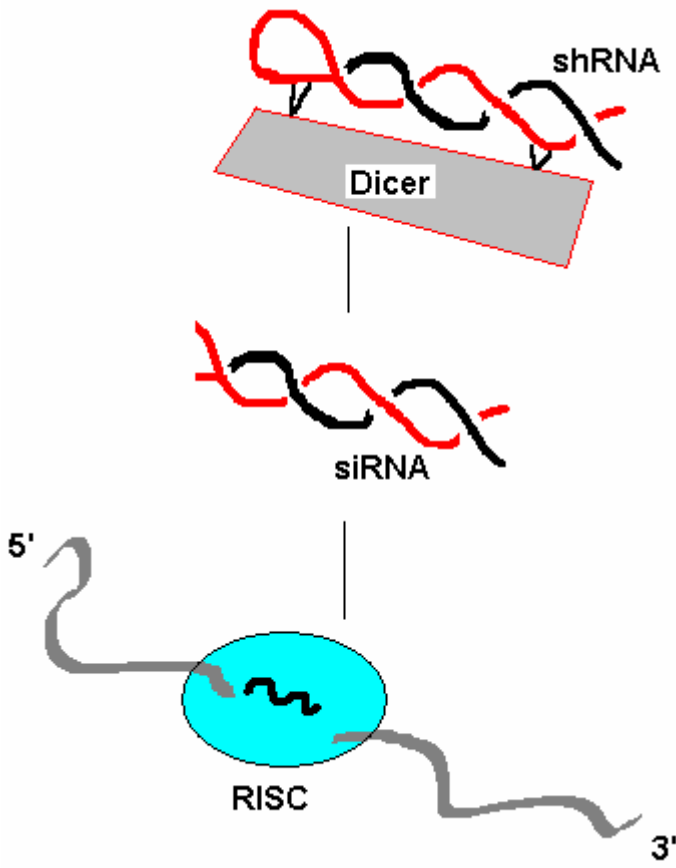
RNAi son dönemde oldukça popüler olan bir gen ekspresyonu baskılama yöntemidir. Spesifik genlerin etkin bir biçimde baskılanmasının yanında, geleneksel gen baskılama yöntemlerinin kullanılmadığı organizmalarda özellikle kullanışlıdır⁹⁸.

RNAi ilk olarak *C. elegans* üzerinde yapılan çalışmalarla dikkati çekerek popüler hale gelmiştir. *C. elegans*'ın çift iplikli RNA'yı (dsRNA) etkili bir biçimde alabilmesi ve fenotipik etkinin kolayca belirlenebilmesi nedeniyle, çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak, *C. elegans*'ın aksine, memeli hücrelerinin 30 nükleotidden daha uzun dsRNA'ya fizyolojik yanıtı çoğunlukla hücrenin ölümü şeklinde olabilmektedir. Otuz nükleotidden daha uzun tek bir dsRNA molekülü interferon yanıtını başlatmak için yeterli olabilmektedir. Sonuçta apoptoza dek ilerleyen olaylar dizisi başlar⁹⁹.

Drosophila'da gen sessizleştirilmesini sağlayacak 21-23 nükleotid uzunluğunda dsRNA molekülleri ile çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir^{100,101}. Bu RNA moleküllerine siRNA (small interfering RNA) adı verilmiştir⁹⁸.

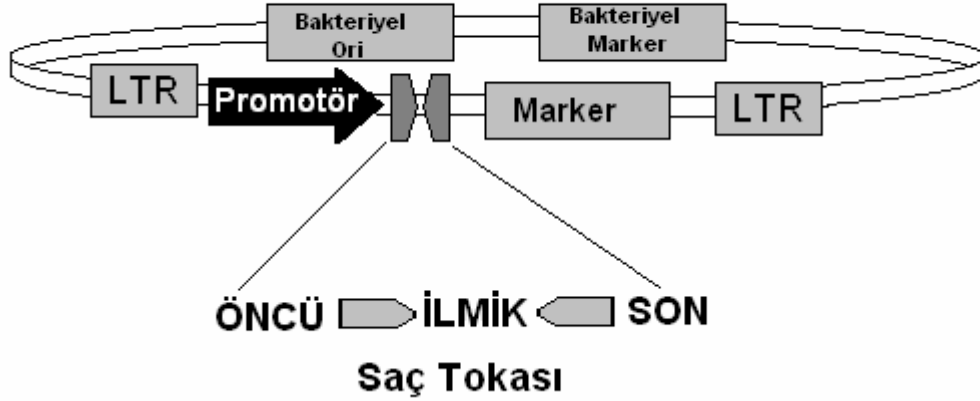
siRNA moleküllerinin bulunmasının önemli bir etkisi de, memeli hücre kültürlerinde etkili gen sessizleştirilmesinin sağlanmasıdır. Memeli hücrelerindeki RNAi uygulamalarının *C. elegans*'takinden farkı, memeli hücrelerinin dışarıdan verilen dsRNA'yı kendiliğinden değil de katyonik lipid ya da elektroporasyon gibi yöntemlerle almasıdır. Bu yöntemlerin *in vivo* koşullarda pratik olmaması uygulamayı kısıtlamaktadır⁹⁸. *C. elegans* ve memeli hücreleri arasındaki bir diğer fark da RNAi yanıtının süresidir. Memeli hücrelerinde, RNAi yanıtını amplifiye etme özelliği bulunmamaktadır ve yanıtın sürekliliği 4-8 hücre bölünmesi ile sınırlıdır^{102,103}.

500–1000 nükleotid uzunluğunda, saç tokası şeklindeki dsRNA moleküllerini eksprese eden *in vivo* sistemlerde gen sessizleştirilmesi, basit organizmalarda gösterilmiştir^{104,105,106,107}. siRNA oluşumunu sağlayacak *in vivo* transkripsiyonun en önemli üstünlüğü, gen sessizleşmesinin, dağılım ve süre olarak, geçici yöntemlere göre daha düzenli olmasıdır. *In vivo* transkripsiyon, genlerin canlı kalabilme ya da üreme için gerekli olduğu, biyokimyasal analizler için çok sayıda mutant hücreye ihtiyaç duyulduğu veya gen sessizleştirilmesinin hedeflendiği dokuların, sinir sistemi gibi, girişime daha az izin veren dokular olduğu durumlarda özellikle yararlıdır. Ancak memelilerde, bu kadar uzun moleküllerle transfeksiyon sonrası interferon yanıtı oluşumu gibi sıkıntılar çıkacağından, dsRNA'ya dayalı farklı bir sistem geliştirilmiştir⁹⁸. Eş zamanlı olarak birkaç grup tarafından, shRNA (kısa saç tokası RNA) moleküllerine dayalı yöntem ortaya konmuştur. shRNA molekülleri, 30 nükleotidden daha kısa uzunlukta olup, hedef diziyeye homoloji gösteren ve uzun dsRNA moleküllerinde görülen hücresel yanıtı oluşturmadan, etkin gen sessizleştirilmesi sağlayan moleküllerdir^{108,109,110,111}. Bu yöntemde, hedef diziyeye homoloji arttıkça sessizleştirme etkinliği de artmaktadır. Sessizleştirme mekanizmasında, RNaz III benzeri bir enzim olan Dicer nükleaz, shRNA'yı substrat olarak görerek aktive olur ve hedef dizilerin yıkımı gerçekleşir¹¹⁰. (Şekil 5)



Şekil 5: RNAi mekanizması. (RISC: RNAi sessizleştirme kompleksi) ⁹⁸

Günümüzde, memeli hücrelerinde kalıcı gen sessizleştirmesini sağlamak üzere farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde genellikle, siRNA'nın ekspresyonunu sağlayan bir promotör içeren DNA vektörleri kullanılır. Bu vektörler, hücre içerisine transfeksiyonla veya enfeksiyonla aktarıldıktan sonra, ya epizomal olarak kalırlar ya da genoma entegre olurlar. Bir çok vektör dsRNA'yı 19-29 nükleotid uzunluğunda çift sarmallı, basit saç tokası yapısında eksprese eder. RNA polimeraz III, kompleks yapılı, küçük RNA transkriptlerini eksiksiz olarak sentezlediği için bir çok vektörde polimeraz III bağımlı promotörler yer alır⁹⁸ (Şekil 6).



Şekil 6: Kısa saç tokası şeklinde RNA eksprese eden vektör. Şekilde belirtilen elemanların birçoğu günümüzde kullanılan birçok vektörde bulunmaktadır. (LTR: Uzun uç tekrarı) ⁹⁸.

shRNA'ya dayalı RNAi tekniği günümüzde yaygın olarak kullanılsa da aslında pek çok parametresi henüz tam olarak optimize edilmemiştir. Tasarlanacak shRNA molekülünün büyüklüğü, RISC'in (RNAi Sessizleştirme kompleksi) tanıyacağı kadar büyük, ancak protein kinaz ve interferon yanıtı oluşturmayacak kadar küçük olmalıdır. Hedef genin büyüklüğü önemli değildir. Çift iplikli ve 18-29 nükleotid uzunluğundaki yapılar etkinlik bakımından hemen hemen birbirlerine denktir¹¹². Gen sessizleştirme etkinliği kısıtlı, kısa bir saç tokası yapısını uzatmak etkinliğini artırsa da, zaten efektif bir şekilde gen sessizleşmesi sağlayan moleküllerin uzatılması etkinliği %90'ın üzerine çıkaramaz. shRNA'nın, çift ipliğinden birinin hedef RNA'nın anlamlı ipliğine komplementer olması yeterlidir. İlmik kısmının dizisi ise önemsizdir⁹⁸.

Her ne kadar tam olarak kesinleşme de, RNAi için hedef dizi belirlenmesinde genel olarak kabul gören kurallar aşağıda belirtilmiştir:

1. İlgilenilen gende AA dinükleotidi ile başlayan 21 nükleotidlik hedef dizi bulunması: 3' ucunda sarkık UU dinükleotidi bulunan siRNAların etkin olduğu gösterilmiştir^{101,102}. Ayrıca RNA polimeraz III kullanılan sistemlerde transkripsiyon 4-6 nükleotidlik poli(T) bölgelerinde sonlanır ve sonuçta poli(U) uçlu RNA molekülleri oluşur.
2. İki-dört adet hedef dizi seçilir: Rasgele tasarlanan tek bir siRNA molekülü gen ekspresyonunda en az %50'lik bir baskılanma sağlar.

Dört molekül kullanıldığında bu oran %75-95 arasındadır. Hedef bölgelerin şu özellikleri olmalıdır¹¹³:

- a. siRNA'nın GC içeriği %30-50 arasında olmalıdır,
- b. Dört-altı nükleotidlik poli(T) bölgesi RNA polimeraz III için sonlandırma sinyali oluşturduğundan, RNA polimeraz III kullanılan vektörlerde, hedef bölgede dört ve daha fazla T ya da A içeren bölgelerden kaçınılmalıdır.
- c. Bazı mRNA bölgeleri kompleks yapılı olduğu ya da bazı regülatör proteinler için bağlanma bölgesi oluşturduğu için, ilgilenilen gen dizisi boyunca birkaç farklı hedef bölge seçilmelidir. Hedef bölgelerin mRNA'daki pozisyonu ile siRNA etkinliği arasında ilişki bulunamamıştır.
- d. Potansiyel hedef bölgeler belirlenirken uygun veri tabanları kullanılarak (BLAST gibi), başka kodlayıcı genlere ait dizilerle, ardışık 16-17 nükleotidlik eşleşmelerden kaçınılmalıdır.

Pratikte, hedef dizi belirlendikten sonra, hedef diziyeye yönelik shRNA molekülünü kodlayan DNA oligonükleotidleri kimyasal olarak sentezlenir. Tek iplik halindeki oligonükleotidler eşleştirilir ve bir shRNA ekspresyon vektörüne, ökaryotik promotörün aşağı yönünde klonlanır.

Gen ekspresyonunu özgül ve etkin olarak baskılayacak shRNA moleküllerinin tasarlanması ve hedef bölgenin saptanması konusunda hala öğrenilmesi gereken birçok nokta bulunmaktadır. Bu yüzden, etkin gen sessizleştirilmesi için araştırmacıların hedef gene yönelik, en az iki, tercihen üç molekülle çalışmaları önerilmektedir⁹⁸.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmada, insan hepatosellüler kanser hücre dizileri Hep G2, Hep 3B ve SK Hep 1, kolon kanseri hücre dizisi SW480 ve kronik miyelositik lösemi hücre dizisi K562 ile promiyelositik hücre dizisi HL60 kullanıldı.

Hücre kültürü kabına yapışarak üreyen hücreler (SW480, Hep G2, Hep 3B ve SK Hep 1) %10 fetal sıgır serumu (FBS, Biochrom S0115), mililitrede 100U/0.1 mg Penisilin/Streptomisin (Biological Industries 03-031-1C) ve 2 mM L-Glutamin (Sigma G7513) içeren Dulbecco'nun Değiştirilmiş Eagle Ortamı (DMEM, Biochrom F0415) besisi ortamında 37°C'ta ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe (Heal Force HF90) üretildi. Süspansiyon halinde üreyen hücreler (K562 ve HL60) ise %15 FBS, mililitrede 100U/0.1 mg Penisilin/Streptomisin ve 2 mM L-Glutamin içeren RPMI1640 (Sigma R0882) hücre kültürü ortamında, 37°C'ta ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe üretildi. Ters bakışlı faz kontrast mikroskobu (Nikon Phase Contrast-2, LWD 052, 202086) ile düzenli aralıklarla kontrol edilen hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, bir bölümü çalışmada kullanılırken bir bölümü donduruldu ve sıvı azotta saklandı. Bütün hücre kültürü çalışmaları hava akım kabini (Aura Vertical S.D.4 C5681) içerisinde ve steril malzeme kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre dizilerinin özellikleri Ek 1'de, pasajlanması, dondurulması, çözülmesi, sayılması ve canlılık testleri ile ilgili protokoller Ek 2'de verilmiştir.

3.2 RNA İzolasyonu

Hücre kültürlerinden RNA izolasyonu, Macherey Nagel marka NucleoSpin®RNA II total RNA izolasyon kiti (Katalog No: 740 955.50) kullanılarak yapıldı. Üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokol kullanıldı. Protokoldeki santrifüleme işlemleri Eppendorf 5415 R'de gerçekleştirildi.

1. Hücreler üç kez DPBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcısı kullanılarak kültür kabından 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. 350 µL RA1 tamponu ve 3.5 µL β- merkaptoetanol (Sigma M7154) eklendi ve vortekslenerek (Elektromag Girdap Karıştırıcı) hücre parçalanması sağlandı.

3. Hücre lizatı filtrasyon kolonuna yüklendi ve 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Filtre kolonu atıldı ve toplama tüpünde kalan lizat üzerine 350 µL %70 etanol eklenerek vortekslendi.
5. Örnek RNA kolonuna yüklendi ve 30 saniye 8 000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
6. Kolon üzerine kit içeriğinde yer alan MDB (zar tuz giderme tamponu) solüsyonundan 350 µL eklendi ve 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Steril bir mikrotüpte kit içeriğinde yer alan 10 µL DNaz I ile 90 µL DNaz reaksiyon tamponu karıştırıldı. Bu karışımdan 95 µL alınarak kolona eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Kolona 200 µL kit RA2 tamponu eklendi ve 30 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alındı.
9. Kolona 600 µL kit RA3 tamponu eklenerek 8000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
10. Kolona 20 µL kit RA3 tamponu eklendi ve 2 dakika 11 000 g'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir mikrotüpe alındı.
11. 11 000 g' de 1 dakika santrifüjlenerek, 60 µL RNaz içermeyen distile su ile RNA elde edildi.
12. 11. basamak tekrarlandı ve elde edilen miktar artırıldı.

Elde edilen RNA örneklerinin, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanları spektrofotometrede (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000) ölçülerek saflık dereceleri ve konsantrasyonları değerlendirildi.

Konsantrasyon hesaplamasında,

$$A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40 \mu\text{g/mL} = X \mu\text{g/mL RNA}$$

formülünden yararlanıldı.

RNA saflık derecesi A_{260}/A_{280} oranı ile belirlendi.

3.2 cDNA Sentezi

Hücre kültürlerinden elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi Fermentas marka RevertAid™ First Strand cDNA sentez kiti (Katalog No: K1622) kullanılarak yapıldı. Sentez sırasında üretici firmanın önerdiği protokol izlendi.

1. Buz üzerinde reaksiyon karışımı hazırlandı.
 - 2 µg total RNA
 - 1 µL random heksamer primer
 - Reaksiyon karışımını 12 µL'ye tamamlayacak kadar su
2. Karışım 70°C'ta 5 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası tüp buz üzerinde soğutuldu ve aşağıdakiler sırayla eklendi:
 - 4 µL 5X reaksiyon tamponu
 - 1 µL ribonükleaz inhibitörü
 - 2 µL 10 mM dNTP karışımı
4. Karışım 25°C'ta 5 dakika inkübe edildi.
5. Reaksiyona 1 µL M-MuLV revers transkriptaz eklendi.
6. Karışım 25°C'ta 10 dakika ve daha sonra da 42°C'ta 1 saat inkübe edildi.
7. Reaksiyon 70°C'ta 10 dakika inkübe edilerek enzim inaktive edildi.

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

VANGL1 geni için **5'-atcaccaacggcatgacc** ileri (F) ve **5'-aggctgaagtccaagcac** geri (R) primerler FastPCR v 3.4.20 programı kullanılarak tasarlandı ve internetteki NCBI BLAST programı ile değerlendirildi. PCR sonucu elde edilen ürün 179 bp uzunlukta idi. Yaşamsal gen olarak β-aktin geni kullanıldı.

β-aktin İleri (F) primer:

5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA

β-aktin Geri (R) primer:

5' CATCTCCTGCTCGAAGTCCA

Reaksiyonlar, MJ Research Inc, PTC-100™ sıcaklık döngü düzenleyicisinde gerçekleştirildi.

Primerlerin optimizasyonu yapıldıktan sonra reaksiyonun koşulları aşağıdaki şekilde belirlendi:

Tablo 2: VANGL1 geni için kurulan PCR karışımı ve reaksiyonun sıcaklık profili.

Reaksiyon Karışımı		Sıcaklık Profili	
dNTP	0.5 µL	95°C	5 dak
MgCl ₂	2.5 µL	95°C	30 sn
10X Tampon	2.5 µL	59°C	30 sn
Primer R	0.5 µL	72°C	45 sn
Primer F	0.5 µL	72°C	5 dak
cDNA	2.0 µL		
Taq Polimeraz	0.5 µL		
dH ₂ O	16 µL		

Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler %2 agaroz jel elektroforezinde, 80V akım altında, yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra değerlendirildi. Elektroforez sonrası elde edilen bantlar, Stratagene Eagle Eye II görüntü analiz sistemi ile görüntülendi.

PCR'da kullanılan kimyasalların listesi, kimyasalı sağlayan firma, katalog numaraları ile stok ve son konsantrasyonları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: PCR'da kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal	Üretici	Katalog No	Stok Kons.	Son Kons.
10X Tampon	MBI Fermentas	EP0401	10X	1X
MgCl ₂	MBI Fermentas	EP0401	25 mM	1 mM
dNTP	Larova	0200/0205	10 mM	200 µM
Primer F	VBC Biotech	-	10 pmol/µL	10 pmol
Primer R	VBC Biotech	-	10 pmol/µL	10 pmol
Taq Polimeraz	MBI Fermentas	EP0401	5 U/µL	2.5 U

3.4 Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek Zamanlı PCR için Roche LightCycler 2.0 cihazı kullanıldı ve ürünlerin belirlenmesi Roche marka LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Katalog No:12 239 264 001) kiti ile sağlandı. Yaşamsal gen olarak HPRT primerleri kullanıldı.

HPRT İleri (F) primer:

5' GTGGAGATGATCTCTCAACT

HPRT Geri (R) primer:
5' ACATGATTCAAATCCCTGAAG
Ürün büyüklüğü 262 bp.

Tablo 4: Gerçek Zamanlı PCR karışımı ve reaksiyonun sıcaklık profili.

Reaksiyon Karışımı		Sıcaklık Profili	
Vial 1	2 µL	95°C	10 dak
Primer F	1 µL	95°C	10 sn
Primer R	1 µL	59°C	10 sn
MgCl ₂	2.4 µL	72°C	20 sn
dH ₂ O	11.6 µL		
cDNA	2 µL		

VANGL1 geninin baskılanmasının değerlendirilmesi sırasında kurulan Gerçek Zamanlı PCR deneylerinde ise aynı reaksiyon karışımı kullanılmasına karşın, döngü sayısı 28'e düşürüldü.

3.5 Protein İzolasyonu

Kültür kabına yapışarak üreyen HepG2 ve SW480 hücre dizilerinden protein izolasyonunda aşağıdaki yöntem kullanıldı:

1. Ortam uzaklaştırıldı.
2. Hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandı. Tüm PBS kalıntıları uzaklaştırıldı.
3. Hücrelerin üzerine 1 mL soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcıyla kazındı.
4. Hücreler 1.5 mL'lik mikrotüpe konuldu ve +4°C'de ve 2500 g'de beş dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine yaklaşık üç katı hacimde lizis tamponu eklendi. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi, bu süre boyunca beş dakikada bir vortekslendi.
6. İnkübasyon süresinin sonunda +4°C'de maksimum hızda (Eppendorf 5415 R) 15 dakika santrifüj edildi.
7. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alındı.

Süspansiyon halinde üreyen K562 ve HL60 hücre dizilerinde ise aşağıdaki yöntem kullanıldı:

1. Hücre süspansiyonu 5 dakika 600 g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Çökelti üzerine 1.5 mL soğuk PBS eklendi ve +4 °C'de ve 2500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
3. Son yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine yaklaşık 3 katı hacimde lizis tamponu eklendi. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi, bu süre boyunca 5 dakikada bir vortekslendi.
4. İnkübasyon süresinin sonunda +4°C'de maksimum hızda (Eppendorf 5415 R) 15 dakika santrifüj edildi.
5. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alındı.

Her iki yöntemin de sonunda elde edilen protein lizatındaki protein miktarı BCA Protein Assay kitinin (Katalog No: 23225) protokolüne göre, 562 nm dalga boyundaki optik dansiteleri ölçülerek hesaplandı.

3.6 Western Blotlama

Western blotlama için %12'lik SDS-poliakrilamid jel kullanıldı. Her bir kuyuya 50 µg protein yüklendi. 1X jel yürütme tamponu içerisinde jel başına 25 mA akımla dört saat süre ile yürütüldü. Yürütme sonrası jel, metanol ile ıslatılmış PVDF membran (Immobilon-P IPVH15150) ve blotlama kağıtları ile birlikte 1X transfer tamponu içine alındı ve transfer kasedine yerleştirildi. Jel üzerinde bulunan proteinler 1X transfer tamponu içerisinde 300W'ta 90 dakika süreyle PVDF membrana aktarıldı.

Blotlama sonrasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla, membran %5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika bloklandı. Bloklama sonrasında %0.5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde 1:1500 oranında seyreltilmiş Anti-LPP2 (Sigma L 2790) monoklonal antikoru ile +4°C'de bir gece boyunca muamele edildi. TBS-T ile yıkamalar sonrasında %0.3 süt tozu içeren TBS-T ile 1:3500 oranında seyreltilmiş Anti-tavşan IgG HRP ikincil antikoru ile oda sıcaklığında 45 dakika karşılaştırıldı. TBS-T ile birkaç kez yıkandıktan sonra ECL (Amersham RPN2108) kiti kullanılarak deteksiyon işlemi gerçekleştirildi. Antikor bantları Kodak Biomax film kullanılarak görüntülendi.

3.7 Transfeksiyon Optimizasyonu

3.7.1 Transfeksiyon İçin Uygun Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi:

Aşağıdaki Geneticin G418 (Sigma G8168) konsantrasyonlarında hücre ölüm eğrisi çizilmesi için, hücreler, 4×10^4 hücre/mL olacak şekilde 10 cm çaplı hücre kültürü kaplarına (Costar 430167) 10'ar mL ortam içerisinde ekildi. Her bir G418 konsantrasyonu için üç ayrı kültür kuruldu. Kültürler, %70 hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra 0, 500, 650, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda G418 antibiyotiği içeren kültür ortamlarına alındı. Bu aşamadan sonra hücrelerin yoğunluğu her gün kontrol edildi ve gınaşırı ortamın tamamı değiştirildi. Onbeş günlük kültür süresinin sonunda hücrelerin tamamını öldüren G418 konsantrasyonu belirlendi.

3.7.2 Transformasyon İçin Kompetan Hücre Elde Edilmesi

Inoue¹⁴ yöntemi kullanılarak kompetan *E.coli* bakterileri üretildi. Inoue yöntemi, elde edilen kompetan bakterilerin transformasyon etkinlikleri ve maksipreparasyon yöntemiyle pSV-β-gal kontrol plazmidinin çoğaltılması yöntemi Ek 4'te bulunabilir.

3.7.3 Plazmid İzolasyon Kiti Kullanılarak Plazmid Elde Edilmesi

Daha önce pSV-β-gal plazmidi ile transforme edilen *E.coli* bakterilerinden bir tek koloni alınarak ampisilin içermeyen 5 mL LB kültür ortamında başlangıç kültürü kuruldu. Kültür tüpü 37°C'de, 220 devir/dakika hızla çalkalanarak, orbital karıştırıcıda beş saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda başlangıç kültüründen 1:500 seyrececek şekilde alınarak 250 mL lik Erlen-Mayer içerisindeki, 100 µg/mL ampisilin (AppliChem A0839) içeren 25 mL LB kültür ortamına seçici kültür kuruldu ve 37 °C'de, 150 devir/dakikada bir gece inkübasyona bırakıldı.

Ertesi sabah, Macherey-Nagel NucleoSpin®Plazmid (Katalog No: 740 588.50) kiti kullanılarak, üreticinin yönergesi doğrultusunda bakterilerden plazmid izolasyonu yapıldı.

1. Bakteri kültüründen 1 mL alınarak mikrosantrifüjle (Eppendorf 5415 R) 30 saniye 11 000 g'de santrifüj edildi ve bakteriler çöktürüldü. Supernatan uzaklaştırıldı.
2. Çökelti üzerine 250 µL kit A1 tamponu eklendi. Hızlı bir şekilde vorteksendi (Elektromag Girdap Karıştırıcı).
3. 250 µL kit A2 tamponu eklendi ve tüp ters yüz edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında beş dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 300 µL kit A3 tamponu eklendi. Tüp ters yüz edilerek karıştırıldı.
5. Oda sıcaklığında 11 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Supernatan izolasyon kolonuna yüklendi ve bir dakika 11 000 g'de santrifüj edildi.
7. Kolona 600 µL A4 tamponu eklendi ve bir dakika 11 000 g'de santrifüj edildi.
8. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve kolon tekrar tüp üzerine yerleştirilerek, silika membranın tam olarak kuruması için iki dakika 11 000 g'de santrifüj edildi.
9. Kolon 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 50 µL AE tamponu eklenerek bir dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra bir dakika 11 000 g'de santrifüj edildi.
10. Elde edilen plazmid DNA'sının saflığı spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve konsantrasyonu ölçüldü.
11. Plazmid DNA'sına EcoRI (Fermentas ER0271) ve BamHI (Sigma R0260) restriksiyon enzim kesimleri uygulanarak %1 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

EcoRI restriksiyon enzimi reaksiyon karışımı:

pSV-β-gal	10 µL
EcoRI (5000 IU)	1.0 µL
10X Tampon	10 µL
<u>dH₂O</u>	<u>79 µL</u>
Toplam	100 µL

37°C'de iki saat inkübasyon sonrası 65°C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı.

BamHI restriksiyon enzimi reaksiyon karışımı:

pSV-β-gal	10 µL
BamHI (5000 IU)	1 µL

10X Tampon	10 µL
dH ₂ O	79 µL
Toplam	100 µL

37°C'de iki saat inkübasyon sonrası 80°C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı.

3.7.4 Transfeksiyon İçin Hücre Sayısı Optimizasyonu

Hangi sayıda hücre ile en yüksek düzeyde transfeksiyon gerçekleşebileceğini bulmak için hücre sayısı optimizasyonu yapıldı.

Altı kuyucuklu hücre kültürü kabının (TPP 92006) her bir kuyucuğuna çeşitli sayılarda hücre ekildi ve elde edilen pSV-β-gal plazmidinden kuyucuk başına 0.5 µg kullanılarak, Promega Tfx™50 (Promega E181A) reaktifi aracılığıyla, üretici firmanın yönergesi doğrultusunda transfeksiyon yapıldı. Her bir kuyucuğa 2 mL hücre kültürü ortamı konuldu ve aşağıdaki sayılarda Hep G2 hücre ekimi gerçekleştirildi. Her hücre sayısı için deney üç kez tekrarlandı:

4x10³ hücre/mL

1x10⁴ hücre/mL

4x10⁴ hücre/mL

1x10⁵ hücre/mL

4x10⁵ hücre/mL

1x10⁶ hücre/mL

Hücre kültürleri kurulduktan 48 saat sonra transfeksiyon yapıldı ve transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler X-gal ile boyanarak transfekte olan hücreler sayıldı.

X-gal boyama için aşağıdaki yöntem kullanıldı:

1. Hücreler 2-3 kez oda sıcaklığında PBS ile yıkandı.
2. 1 mL %0.2 Glutaraldehid (Sigma G6257) /PBS solüsyonunda hücreler 5 dakika, oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi.
3. Süre sonunda iki kez PBS ile yıkandı.
4. Kullanılmadan hemen önce aşağıdaki gibi hazırlanan X- gal (Sigma B-9146) solüsyonu ile hücreler yıkandı.

Tablo 5: X-gal boyama çözeltisi içeriği.

Stok Solüsyonu	Son Konsantrasyon	2 mL boya için gereken miktar
X-gal (Dimetilformamid (Merck 822275) ile 20 mg/mL)	1 mg/mL	100 µL
K Ferrisiyanid (Sigma P8131) (0.5 M)	5 mM	20 µL
K Ferrosiyanid (Sigma P9387) (0.5M)	5 mM	20 µL
MgCl ₂ (1M)	2 mM	4 µL
PBS		1856 µL

5. 37°C'de, nemli inkübatörde bir gece bekletildi.
6. Ters bakışlı mikroskopta mavi renkli, pozitif boyanmış hücreler sayıldı.

3.7.5 Plazmid İzolasyon Kiti ile Elde Edilen DNA'nın Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Hep G2 hücreleri ile yapılan hücre sayısı optimizasyonu deneyinde çok az sayıda transfekte hücre elde edilmesi üzerine plazmid izolasyon kitiyle elde edilen DNA'nın transfeksiyon kalitesinde olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, kit aracılığıyla izole edilen DNA, daha önce transfeksiyon deneylerinde kullanılmış ve iyi çalıştığı bilinen bir DNA ile karşılaştırıldı.

Altı kuyucuklu hücre kültürü kabına, her bir kuyucukta 2 mL ortam içerisinde 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde Hep G2 hücreleri ekildi. Kültürün kurulmasından 24 saat sonra Tfx™50 reaktifi kullanılarak kuyu başına 0.5 µg pSV-β-gal plasmid DNA'sı ile transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra ise X-gal boyaması yapılarak transfekte olan hücreler sayıldı.

3.7.6 pSV-β-Gal Plazmidinin Maksipreperasyonu:¹¹⁵

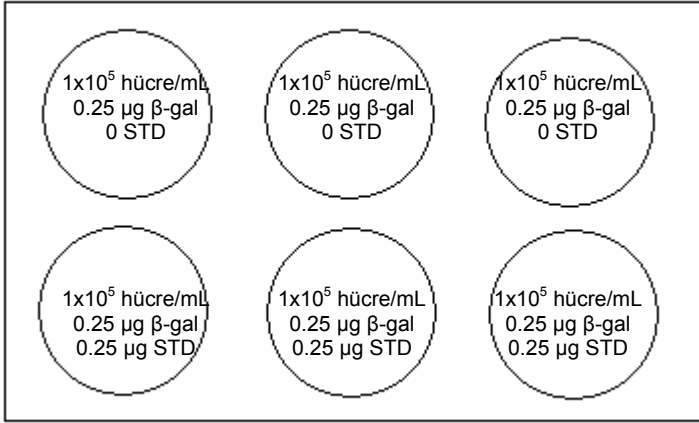
Ek 4'teki protokol kullanılarak transforme *E. coli* bakterilerinden pSV-β-gal plazmid izolasyonu yapıldı:

3.7.7 Transfeksiyon Etkinliğinin Optimizasyonu

Transfeksiyonda optimize edilmesi gereken diğer önemli noktalar; kullanılacak DNA miktarının DNA:transfeksiyon reaktifi iyonik yük oranının optimizasyonudur. Tfx™50 reaktifinin katyonik lipid komponentinin oluşturduğu pozitif yük, DNA'daki fosfatların oluşturduğu negatif yük miktarını geçerek DNA'ya bağlanan multilameller veziküller üzerinde net pozitif yük oluşturmaktadır. Oluşan bu net pozitif yük, veziküllerin, negatif yüklü hücre yüzeyiyle ilişki kurmasını kolaylaştırır.

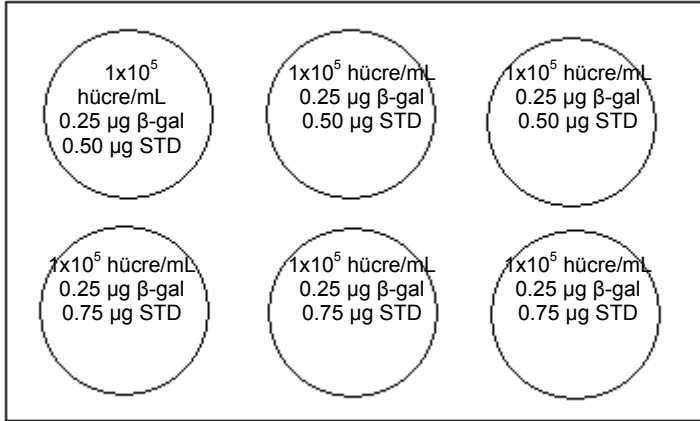
Bu optimizasyonların gerçekleştirilmesi için aşağıdaki deney planlandı:

- Hem Hep G2, hem de Hep 3B hücreleri için dörder adet altı kuyucuklu hücre kültürü kabı hazırlandı.
- Her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre/mL sayıda hücre ekildi ve 2 mL hücre kültürü ortamı eklendi.
- Transfeksiyon için kullanılan DNA miktarları birbirinden farklıydı. Her bir kuyucuğa, sabit olarak, 0.25 µg pSV-β-gal plazmid DNA'sı eklenirken, DNA miktarındaki değişiklikler somon testis DNA'sı (STD) (Sigma D-1626) ile sağlandı. Böylece transfeksiyon etkinliğinde gözlenecek değişikliğin, plazmid miktarındaki artıştan değil, DNA miktarındaki artıştan kaynaklandığının gösterilmesi amaçlandı.



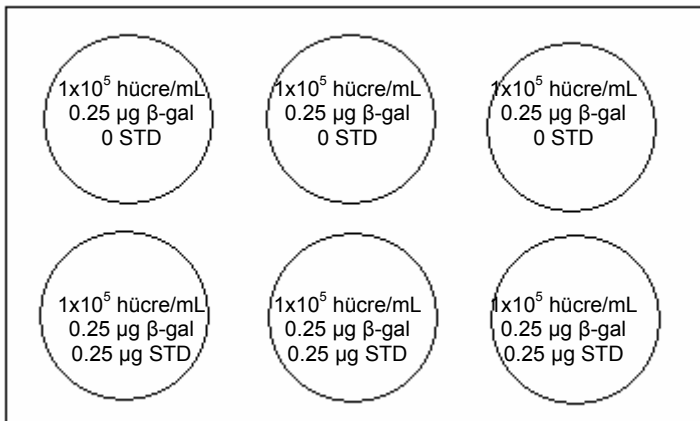
İyonik yük oranı 2:1
Σ DNA miktarı 0.25 µg

İyonik yük oranı 2:1
Σ DNA miktarı 0.50 µg



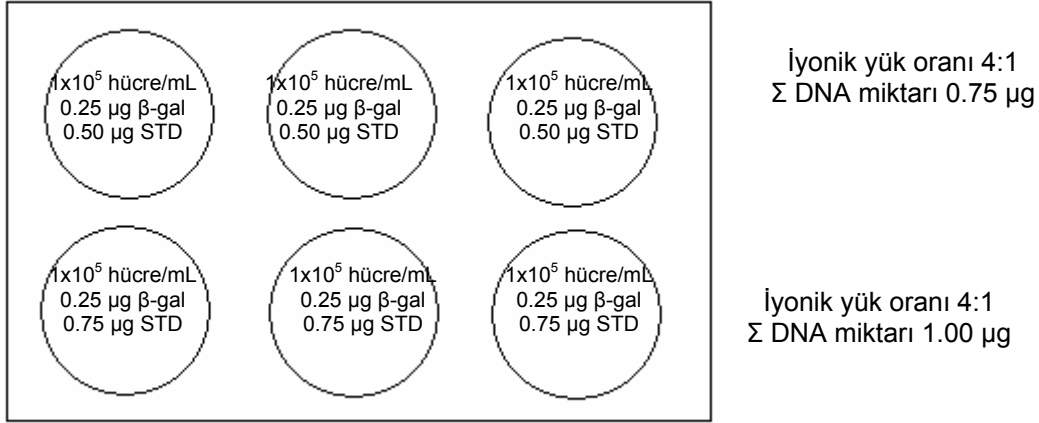
İyonik yük oranı 2:1
Σ DNA miktarı 0.75 µg

İyonik yük oranı 2:1
Σ DNA miktarı 1.00 µg



İyonik yük oranı 4:1
Σ DNA miktarı 0.25 µg

İyonik yük oranı 4:1
Σ DNA miktarı 0.50 µg



Şekil 8: Transfeksiyon etkinliğinin optimizasyon deneyinin planı.

Hücre kültürleri kurulduktan 24 saat sonra, Tfx™50 reaktifinin kullanma kılavuzunda önerildiği şekilde transfeksiyonlar gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler X-gal ile boyandı ve her kuyucuktan altısı kuyucuğun kıyısından, dördü merkezinden olmak üzere eşit büyüklükte 10 alan işaretlenerek, ters bakışlı mikroskopta 10x büyütmede X-gal (+) olan hücrelerin toplam sayısı belirlendi.

3.8 Saç Tokası Şeklindeki siRNA İçin Kalıp Görevi Görecekt Oligonükleotid Dizisinin Saptanması

VANGL1 geninin sessizleştirilmesini sağlaması planlanan siRNA'yı oluşturacak aşağıdaki oligonükleotid dizisi, Ambion internet sitesindeki (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) araç kullanılarak tasarlandı:

Anlamalı oligonükleotid:

**5'-GATCC GCCACAACGAGTTGTATTA TTCAAGAGA
TAATACAACCTCGTTGTGGCTT A-3'**

Anlamsız oligonükleotid:

**5'-AGCTT AAGCCACAACGAGTTGTATTA TCTCTTGAA
TAATACAACCTCGTTGTGGC G-3'**

3.9 Oligonükleotidlerin Eşleştirilmesi

Aşağıda haritası verilen ve hücrelerin siRNA kalıbıyla kararlı transfeksiyonunda kullanılacak olan p*Silencer*TM4.1-CMV Neo plazmidinin (Ambion 5779) kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde, plazmid kiti içerisinde bulunan DNA “Annealing” Çözeltisi kullanılarak oligonükleotidlerin “annealing”i gerçekleştirildi (çift iplikli hale gelmesi sağlandı).

Reaksiyon tüpü:

- 2 µL anlamlı oligonükleotid
- 2 µL anlamsız oligonükleotid
- 46 µL 1 X DNA “Annealing” Solüsyonu

Karışım üç dakika 90°C’de bekletildi, daha sonra 37°C’ye soğutuldu ve bu sıcaklıkta bir saat inkübe edildi.

Agaroz jel elektroforeziyle (%2) reaksiyon sonucu kontrol edildi.

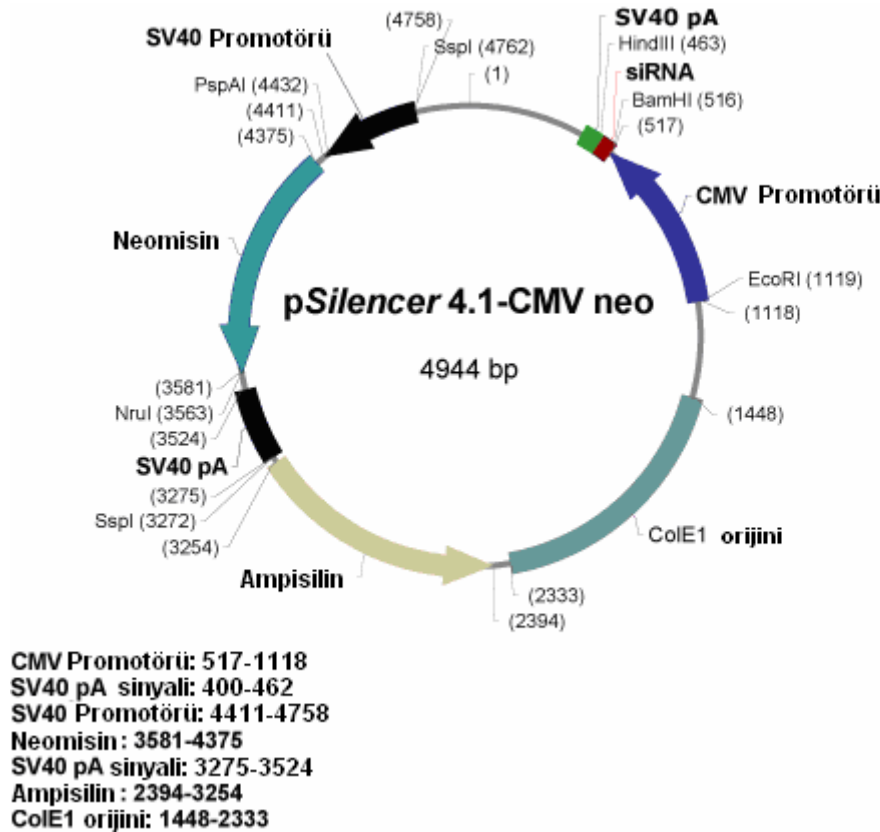
3.10 Saç Tokası Şeklindeki siRNA Kalıbının p*Silencer*TM4.1-CMV Neo Plazmidine Eklenmesi

p*Silencer*TM4.1-CMV Neo plazmid kiti kullanma kılavuzunda önerildiği biçimde, “annealing” reaksiyonundan alınan 5µL shRNA kalıp DNA’sı, 45 µL suyla seyreltildi. Daha sonra aşağıdaki reaksiyon tüpleri oluşturuldu:

Tablo 6: Ligasyon reaksiyonu karışımı.

Ekleni (+)	Ekleni (-)
1 µL siRNA kalıbı	1 µL DNA annealing solüsyonu
6 µL su	6 µL su
1µL 10X T4 reaksiyon tamponu (Ambion 2134)	1µL 10X T4 reaksiyon tamponu (Ambion 2134)
1 µL vektör	1 µL vektör
1 µL T4 ligaz (Ambion 2134)	1 µL T4 ligaz (Ambion 2134)

Reaksiyon tüpleri üç saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 65°C'de 15 dakika bekletilerek T4 ligaz (Ambion 2134) enzimi inaktive edildi.

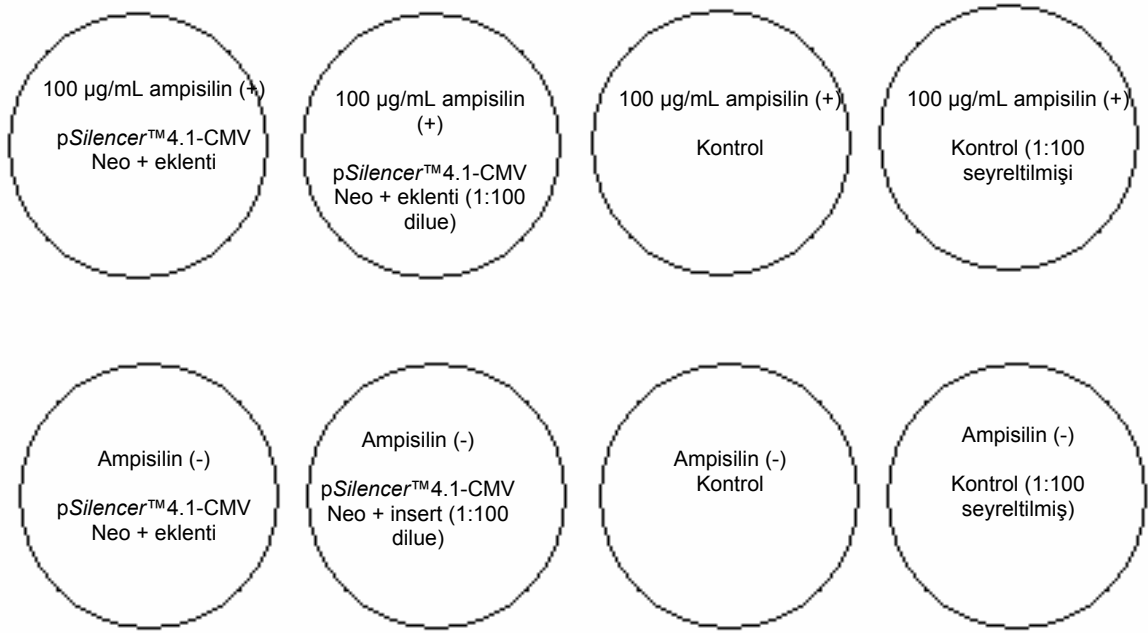


Şekil 9: pSilencer4.1 CMV neo vektör haritası.

Eklentinin vektöre bağlanmasıyla oluşan plazmid pSilV1 olarak adlandırıldı. Reaksiyon sonucu %1 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi.

3.11 *E. coli* Bakterilerinin pSilV1 Plazmidini ile Transformasyonu

E. coli bakterileri Ek 3'te belirtilen protokol kullanılarak transforme edildi ve aşağıdaki şekilde hazırlanan petri kaplarındaki LB agara ekim yapıldı.



Şekil 10: *E. coli* bakterilerinin eklenti içeren pSilV1 plazmidini ile transformasyonu deneyi.

Kültürler bir gece 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra pSilV1 plazmidiniyle karşılaşan *E.coli* bakterilerinin, sıvı kültür hacminin 1:100 seyreltilerek ekilmesiyle oluşturdukları tek koloni alınarak 100 µg/mL ampicilin içeren 30 mL sıvı LB besi yerine aktarıldı ve bu koloniyle maksipreparasyon başlatıldı.

3.12 pSilV1 ile Transforme Olan *E. coli* Bakterilerinden Plazmid İzolasyonu

Sırasıyla maksipreparasyon, minipreparasyon ve PEG çöktürme yöntemleri uygulanarak transforme *E.coli* bakterilerinden, VANGL1 geni için siRNA kalıbı içeren pSilV1 plazmid izolasyonu yapıldı.

Sonuçta elde edilen plazmid DNA'sının 1:100 seyreltme sonrası absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen plazmid DNA'sına BamHI ve HindIII (Sigma R1137) restriksiyon enzim kesimi uygulanarak %1 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi.

HindIII restriksiyon enzimi reaksiyon karışımı:

DNA	10 µL
HindIII (10000 IU)	1 µL
10X Tampon	10 µL
dH ₂ O	79 µL
<hr/>	
Toplam	100 µL

BamHI restriksiyon enzimi reaksiyon karışımı:

pSV-β-gal	10 µL
BamHI (5000 IU)	1 µL
10X Tampon	10 µL
dH ₂ O	79 µL
<hr/>	
Toplam	100 µL

37°C'de iki saat inkübasyon sonrası 65°C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı.

3.13 Maksipreparasyon Sonrası Elde Edilen Plazmidin Dizi Analizi

Üretici firmanın dizi analizi için önerdiği primerler kullanılarak aşağıdaki koşullarda, maksipreparasyon sonrası elde edilen plazmid DNA'sıyla PCR kuruldu.

İleri primer:

5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3'

Geri primer:

5'-CGGTAGGCGTGTACGGTG-3'

Tablo 7: Plazmid dizi analizi için kurulan PCR profili.

Reaksiyon Karışımı		Son Konantrasyon	Sıcaklık Profili	
dNTP	0.5 µL	200 µM	95°C	5 dak
MgCl ₂	2.5 µL	1.5 mM	95°C	30 sn
10X Tampon	2.5 µL	1X	58°C	30 sn
Primer R	0.5 µL	5 pmol	72°C	45 sn
Primer F	0.5 µL	5 pmol	72°C	5 dak
Plazmid DNA (stok: 150 µg/mL)	0.5 µL	50 ng/µL		
Taq Polimeraz (5U)	0.5 µL	2.5 ünite		
dH ₂ O	17.5 µL			

Reaksiyon sonucunda 245 bp lik bir ürün elde edildi ve %2 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi.

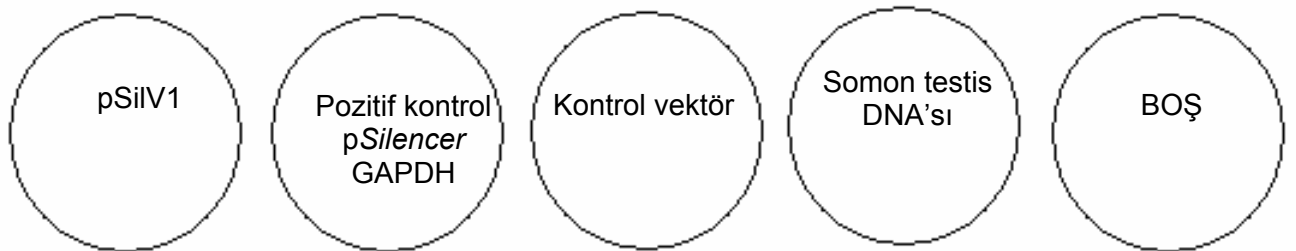
PCR ürünü daha sonra dizi analizi için Güney Kore'deki MacroGen (www.macrogen.com) firmasına gönderildi.

3.14 Hücrelerin pSilV1 Plazmidini ile Transfeksiyonu

Maksipreparasyon sonucu elde edilen VANGL1 geni için siRNA kalıbını içeren pSilV1 plazmidini kullanılarak Hep G2 hücreleri transfekte edildi.

Hücreler 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde 10cm'lik hücre kültürü kaplarına ekildi. Hücre kültürü kaplarına 10 mL ortam konuldu.

Deney aşağıdaki gibi planlandı:



Şekil 11: Transfeksiyon deneyinin kurulumu.

Her bir koşul için üç ayrı kültür kuruldu. Kontrol vektörü olarak p*Silencer*TM4.1-CMV Neo plazmid kiti içeriğinde bulunan ve bilinen hiçbir insan genini baskılamayan bir nükleotid dizisi içeren vektör, pozitif kontrol olarak da, yine kit içerisinde bulunan ve GAPDH genini baskılayan eklenti içeren, vektör kullanıldı.

Kültürler kurulduktan 24 saat sonra transfeksiyon gerçekleştirildi.

Transfeksiyon için deney grubunda ve somon testis DNA'sı grubunda kültür kabı başına 5 µg DNA kullanıldı. Kontrol vektör grubunda ise örnek miktarı çok az olduğu için kap başına 0.5 µg DNA kullanıldı.

TfxTM50 reaktifi: DNA iyonik yük oranı 2:1 alındı.

Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler uygun miktarlarda G418 içeren (1000 µg/mL) ortama alındılar.

İki hafta boyunca iki günde bir ortamları değiştirilerek izlenen kültürlerde transfekte olmayan hücreler ölürken transfekte olan hücreler koloniler oluşturmaya başladı. Seçici ortama geçildikten sonraki 17. günde boş hücreler ve somon testis DNA'sı ile transfekte olan hücrelerin oluşturduğu kontrol gruplarındaki tüm hücreler ölmüştü. Bunun üzerine bu kültürler atıldı. Ondokuzuncu günde, eklenti içeren ve kontrol plazmid ile transfekte olan hücrelerin oluşturduğu kolonilerin yeterince büyüdüğüne karar verilerek, koloni seçimine gidildi. Bu aşamada Sigma Aldrich marka 3 mm çaplı klonlama diskleri (Sigma F37847-0001) kullanıldı. Koloni seçiminde üretici firmanın önerdiği yöntemden yararlanıldı.

1. Seçilecek koloniler ters bakışlı mikroskopta işaretlendi.
2. Hücre kültürü ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
3. Klonlama diskleri Tripsin solüsyonuna batırıldı ve işaretlenmiş kolonilerin üzerine bırakıldı.
4. 5-7 dakika tripsinizasyonun tamamlanması için beklendi.
5. Bu sürede 24 kuyucuklu hücre kültürü kabına (TPP 92024) ortam eklenerek hazırlık yapıldı.
6. Süre sonunda diskler steril pensetle toplanarak her bir disk bir kuyucuğa yerleşecek şekilde koyuldu.

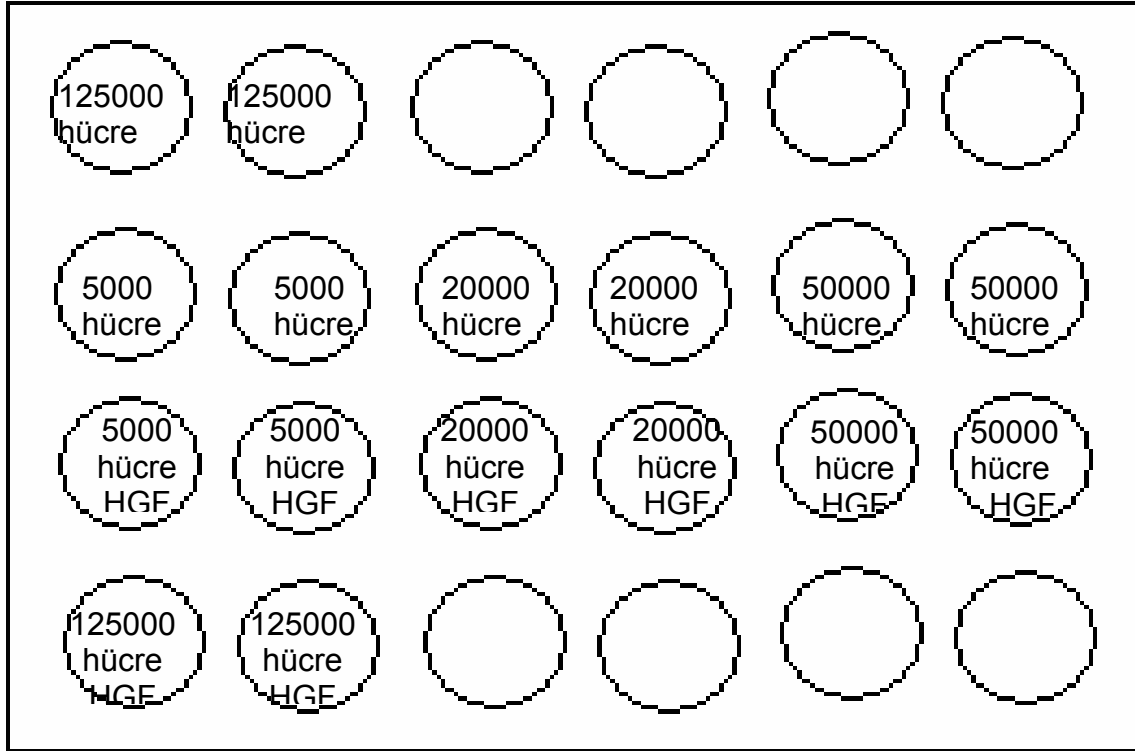
Seçilmiş olan koloniler bu yöntemle toplandıktan sonra koloniler her gün ters bakışlı mikroskop ile izlendi. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan koloniler, tripsinlenerek, oniki kuyucuklu hücre kültürü kabına (TPP 92012) ve daha sonra da ardışık bir biçimde, önce altı kuyucuklu hücre kültürü kabına (TPP 92006) ve son olarak da 10 cm çaplı kültür kaplarına (Corning Costar 430167) pasajlandı.

10 cm çaplı kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinlendikten sonra ikiye bölündü. Yarısı donduruldu, diğer yarısı da ikiye bölünerek hücre kültürüne devam edildi. Bu iki ayrı kültür kabındaki hücreler sırasıyla RNA ve protein izolasyonu amacı ile kullanıldı.

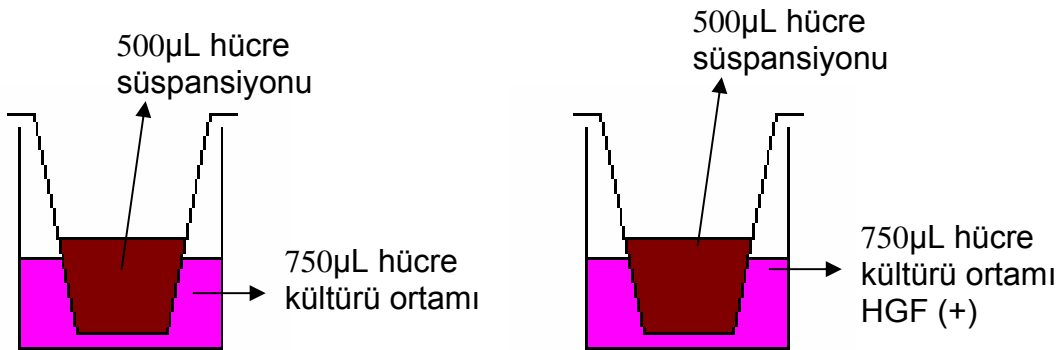
3.15 Motilite ve İnvazyon Deneylerinin Optimizasyonu

Bu aşamada, HepG2 hücrelerinin VANGL1 geninin baskılanması sonucu motilite ve invazyon davranışlarında ortaya çıkacak farklılıkların belirlenmesi amacıyla kurulacak deneylerin kaç hücre ile yapılacağı optimize edildi. Motilite deneyleri 8.0 mikron gözenek çaplı BD BioCoat kontrol insertlerinde (Katalog no: 354578), invazyon deneyleri ise 8.0 mikron gözenek çaplı BD BioCoat BD Matrigel™ invazyon odacıklarında (Katalog no: 354483) gerçekleştirildi.

Her iki deney de paralel kuruldu ve deneylerin başlangıcından bir gece önce, %70 yoğunluktaki hücreler serum içermeyen hücre kültürü ortamına alınarak a bırakıldı. Ertesi sabah tripsinlenerek kaldırılan hücreler, kuyucuk başına 5000, 20 000, 50 000 ve 125 000 hücre/500 µL %2 FBS içeren hücre kültürü ortamı olacak Şekilde, gruplanarak kuyucuklara ekildi. Her bir hücre sayısı için iki kuyucuk kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, HCC hücreleri için bir kemoatraktan olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) eklenmiş ortamdaki hücreler kullanıldı.



Şekil 12: Motilite ve invazyon deneylerinin kurulumu.



Şekil 13: Motilite ve invazyon odacıklarının yandan görünümü.

Deneyler kurulduktan 24 ve 48 saat sonra kültürler sona erdirildi ve Diff-Quik® (Dade Behring B4132-1) boya seti kullanılarak boyandı. Boyama sonrası ters bakışlı mikroskopta, 20X büyütmede, ya membranın tamamında ya da her membrandan rasgele seçilen 10 alanda hücre sayımı yapıldı.

Optimizasyon sonrası ana deneyler, motilite için 50000 hücre/500 µL, invazyon içinse 100000 hücre/500 µL konsantrasyonda hücre ile kuruldu ve 48 saatte sonlandırıldı.

3.16 Hücre Döngüsü Analizi

VANGL1 geninin siRNA ile sessizleştirilmesinin hücrelerin proliferasyon özellikleri üzerine etkisi olup olmadığını göstermek üzere Beckman Coulter Epics XL.MCL akım sitometresi cihazı ile hücre döngüsü analizi yapıldı. Deney, propidyum iyodid (PI) boyama yöntemine dayalı DNA-Prep Coulter®Reagents kiti (Katalog No: PN 6607055) ile uygulandı. Tripsinlenerek kaldırıldıktan sonra 500 µL PBS tamponu içerisinde, yoğunluğu 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde süspanse edilen hücrelerden silikonize test tüplerine 100 µL alındı ve 1 mL PI eklenerek 6-8 saniye vortekslendi. zerine 1 mL daha PI eklendi ve tekrar vortekslenerek 20 dakika +4°C'da bekletildi. İnkübasyon sonrası yarım saat içerisinde hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı 488 nm dalga boyunda, her bir örnek için toplam 20000 hücre sayılarak gerçekleştirildi.

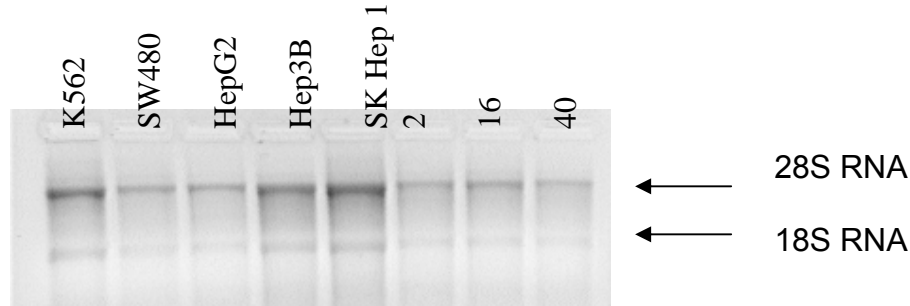
4. BULGULAR

4.1 HCC Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Elde edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik değerlendirmeleri Tablo 8'de görülmektedir. RNA örnekleri yatay jel elektroforeziyle değerlendirildi (Şekil 14). SW480 ve K562 hücre dizileri pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 8: Pozitif kontrol hücre dizileri ve HCC hücre dizilerinden elde edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik sonuçları.

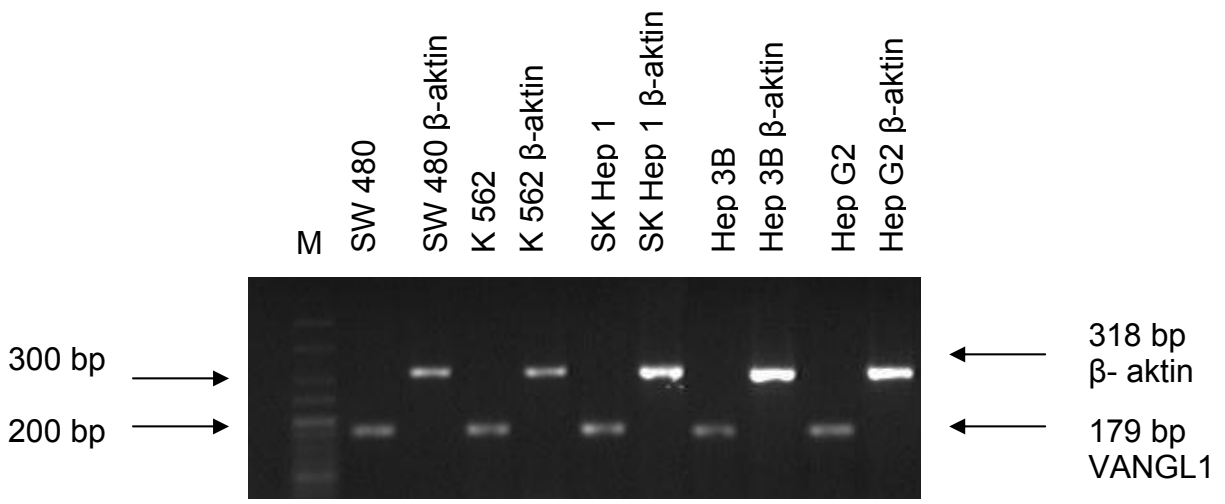
Örnek	A260	A280	Oran	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
SW480	0,652	0,313	2,083	1043
K562	0,926	0,439	2,109	740
SK Hep1	0,860	0,389	2,210	688
Hep G2	0,302	0,137	2,204	241
Hep 3B	0,448	0,198	2,262	358



Şekil 14: Bazı örneklere ait RNA'ların %1.5 agaroz jel görünümü.

4.2 HCC Hücre Dizilerinde VANGL1 Ekspresyonu Analiz Sonuçları

Hep G2, Hep3B ve SK Hep 1 HCC hücre dizilerinden elde edilen RNA ile kurulan RT-PCR reaksiyonu sonrası, her üç hücre dizisinde de VANGL1 ekspresyonu saptandı (şekil 15). SW 480 ve K562 hücreleri pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 15: Hücre dizilerinin VANGL1 ekspresyonu. (**M:** Marker (HyperLadder V))

RT-PCR sonrasında ekspresyon varlığı gerçek zamanlı PCR yöntemi ile doğrulandı ve tek renkli relatif kantifikasyon yapıldı (tablo 9). Relatif kantifikasyon sonucunda en yüksek VANGL1 ekspresyonu HepG2 hücrelerinde görüldüğü için bu aşamadan sonra araştırmaya HEPG2 hücre dizisiyle devam edildi.

Tablo 9: Gerçek zamanlı PCR ile hücre dizilerindeki VANGL1 ekspresyonu düzeylerinin relatif kantifikasyon sonuçları (**Cp:** Geçiş noktası. Reaksiyondaki amplifiye olmuş DNA kopya sayısının eşik değerini geçtiği döngü sayısı). Konsantrasyon oranı, hücrelerdeki VANGL1 ekspresyonunu β- aktin düzeylerine göre; normalleştirilmiş oran ise referans olarak alınan (burada K562 hücre dizisi) hücre dizisindeki VANGL1 ekspresyonuna göre hesaplandı.

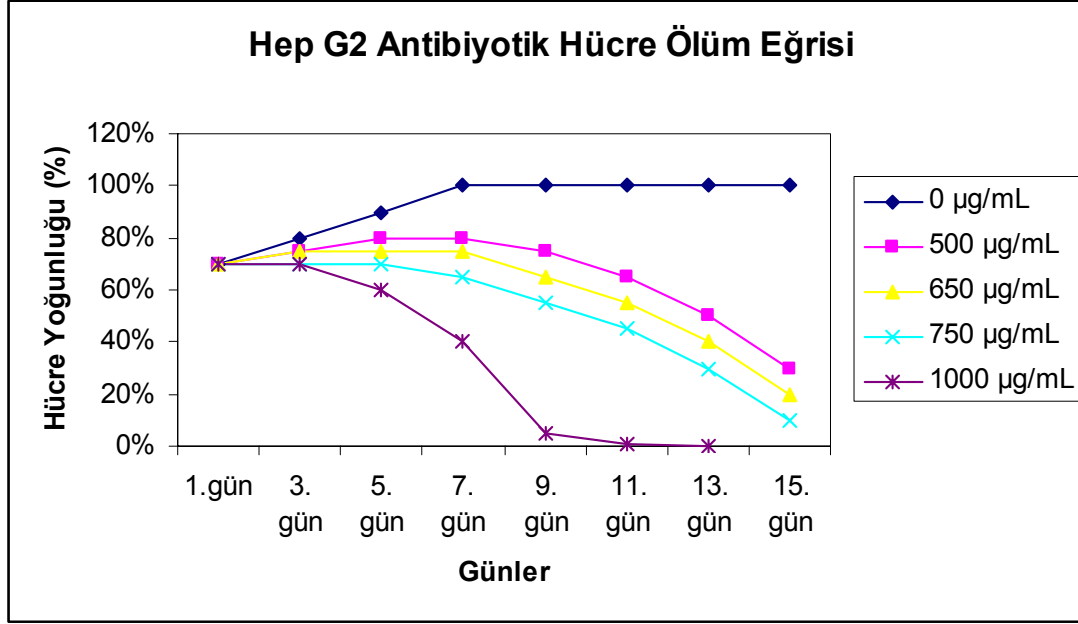
Örnek	Ortanca Cp	Konsantrasyon Oranı	Normalleştirilmiş Oran
K 562	19.48	0.78	1.00
Hep 3B	21.98	0.57	0.74
SK Hep 1	19.52	1.57	2.02
Hep G2	18.88	2.33	2.99

4.3 Transfeksiyon Optimizasyonu

Saç tokası şeklindeki siRNA molekülünün sentezini sağlayacak DNA dizisinin HCC hücrelerine transfekte edilmesi planlandığından, HCC hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılacak yöntem optimize edildi.

4.3.1 Antibiyotikle Hücre Ölümü Eğrisi:

siRNA kalıbı ile transfekte olan hücrelerin seçilmesinde kullanılacak G418 antibiyotiğinin, transfekte olmayan hücreleri hangi konsantrasyonda öldürdüğü hesaplandı. Hep G2 hücre dizisi için antibiyotikle ölüm eğrisi çizildi (şekil 16). Transfekte hücrelerin seçilimi için G418'in 14 gün süreyle 1000 µg/mL konsantrasyonda kullanılmasına karar verildi.



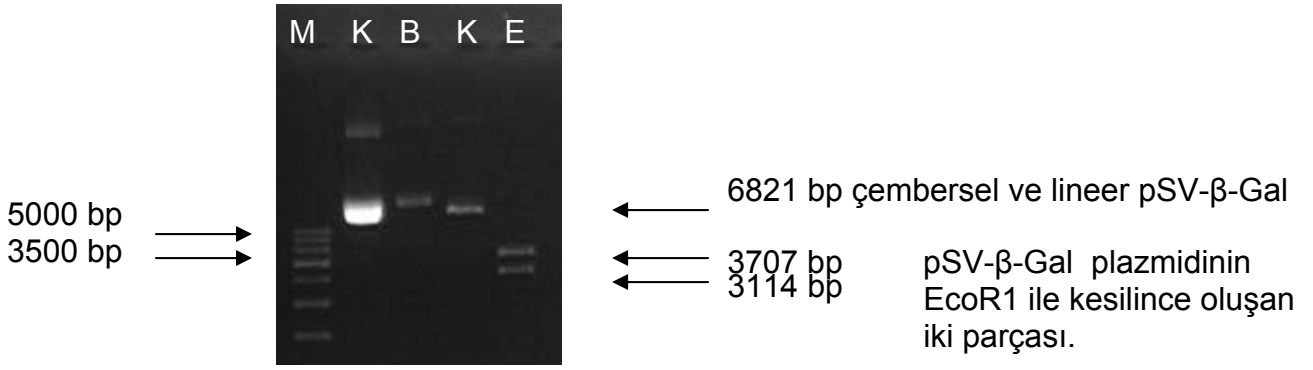
Şekil 16: Hep G2 hücrelerinin G418 antibiyotiği ile hücre ölüm eğrisi.

4.3.2 Plazmid İzolasyon Kiti Kullanılarak Plazmid Elde Edilmesi:

Macherey-Nagel NucleoSpin®Plazmid plazmid izolasyon kiti kullanılarak elde edilen pSV-β-Gal plazmid DNA'sının absorbans değerleri:

<u>A₂₆₀</u>	<u>A₂₈₀</u>	<u>Oran</u>	<u>Konsantrasyon</u>
0.025	0.013	1.923	125 µg/mL

Plazmid DNA'sına EcoRI ve BamHI ile restriksiyon enzim kesimi uygulandı ve %1 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jel elektroforezinde plazmidin bütünlüğü bozulmadan izole edildiği görüldü.



Şekil 17: pSV-β-Gal plazmid DNA'sının restriksiyon enzimi kesim sonuçları. (**M:** Marker (HyperLadder III) , **K:** Kontrol, **B:** Bam HI, **E:** EcoRI)

4.3.3 Transfeksiyonda Kullanılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu:

pSV-β-Gal plazmidi kullanarak, transfeksiyon için optimum hücre sayısı belirlendi (Tablo 10). Optimizasyon sonrası en fazla hücrenin, 1×10^5 hücre/mL yoğunlukta transfekte olduğu görüldü ve transfeksiyonun bu miktarda hücre kullanılarak yapılmasına karar verildi.

Tablo 10: Hep G2 hücrelerinin pSV-β-Gal plazmidi ile transfeksiyonu sonucu transfekte olan hücre sayıları.

Hücre kültürü kabı	Hücre sayısı (hücre/mL)	β -Gal (+) boyanan hücre sayısı
1	4x10 ³	1
	1x10 ⁴	1
	4x10 ⁴	6
	1x10 ⁵	10
	4x10 ⁵	6
	1x10 ⁶	1
2	4x10 ³	0
	1x10 ⁴	5
	4x10 ⁴	5
	1x10 ⁵	8
	4x10 ⁵	4
	1x10 ⁶	4
3	4x10 ³	0
	1x10 ⁴	1
	4x10 ⁴	8
	1x10 ⁵	13
	4x10 ⁵	3
	1x10 ⁶	2

4.3.4 Plazmid izolasyon kiti ile elde edilen DNA'nın transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi:

Macherey-Nagel NucleoSpin®Plazmid izolasyon kiti kullanılarak elde edilen pSV-β-Gal plazmidi ile HepG2 hücrelerinin transfeksiyonunda, optimizasyon deneylerinde çok az sayıda hücrenin transfekte olması nedeniyle, plazmidin transfeksiyon etkinliğinin incelenmesine karar verildi. Bu amaçla, transfeksiyon etkinliği yüksek olduğu bilinen manuel yöntemle izole edilmiş başka bir pSV-β-Gal

plazmid DNA'sı ile izolasyon kiti kullanılarak elde edilen plazmid DNA'sı karşılaştırıldı.

Tablo 11: Hep G2 hücrelerinin plazmid izolasyon kiti ile elde edilen pSV- β -Gal DNA'sı ve kontrol pSV- β -Gal DNA'sı ile transfeksiyon sonuçları.

Hücre Grubu	X-gal boyama sonucu
Hep G2 (-) kontrol	Boyanma yok
Hep G2 (kit ile elde edilen plazmidle transfekte)	Boyanma yok
Hep G2 (kontrol plazmid ile transfekte)	Tüm kuyucukta 454 hücre X-gal (+)

Sonuçta hem izole edilen DNA'nın transfeksiyon kalitesinde olamaması hem de çok miktarda bakteri ile çalışılmasına izin vermemesi nedeniyle plazmid izolasyonunda kit kullanılmasından vazgeçildi ve manuel maksipreparasyon yönteminin^{115,116,117} kullanılmasına karar verildi.

4.3.5 pSV- β -Gal Plazmidinin Maksipreparasyonu:

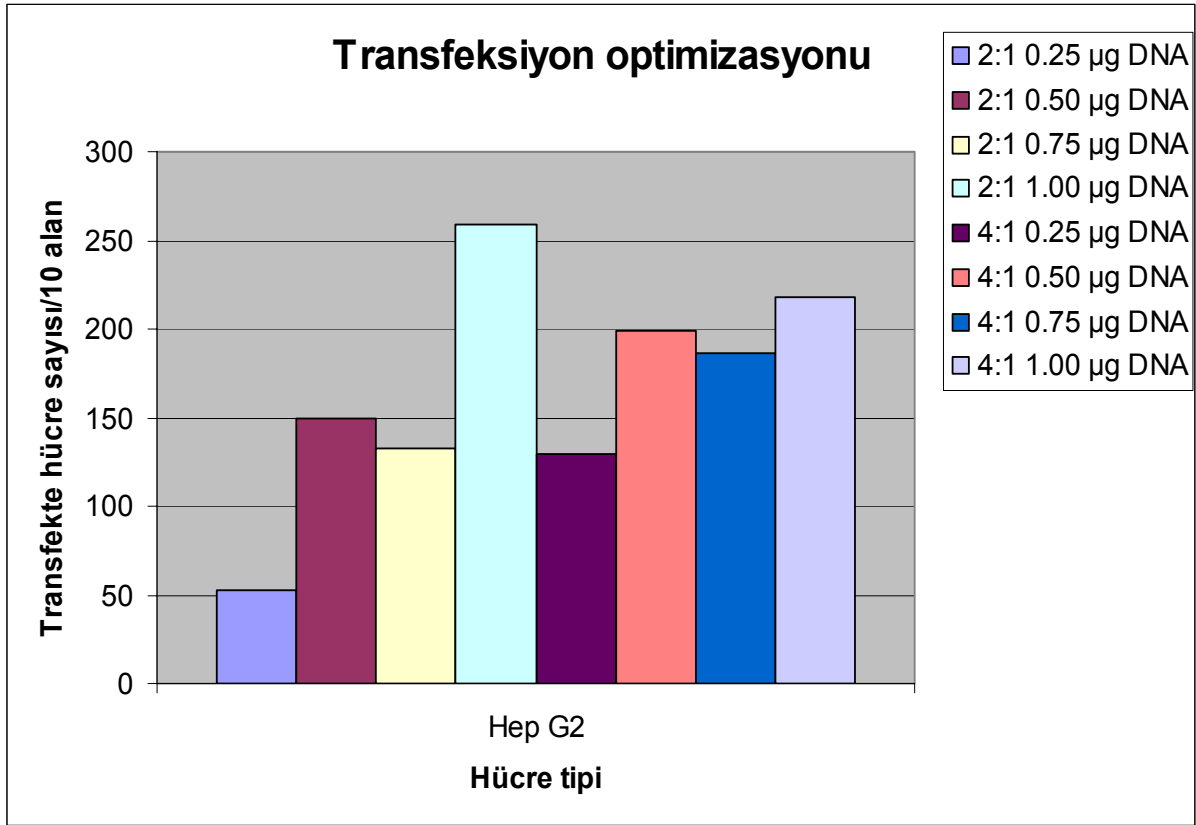
Hep G2 hücrelerinin transfeksiyonunun optimizasyonunda kullanılacak pSV- β -Gal plazmidini maksipreparasyon yöntemi ile hazırlandı. Bu amaçla, *E.coli* hücreleri pSV- β -Gal plazmidini ile transforme edildi ve maksipreparasyon hazırlandı. Bu deneylerin sonuçları Ek 3'te görülebilir.

4.3.6 Transfeksiyon Etkinliğinin Optimizasyonu:

Elde edilen veriler sonucunda HepG2 hücrelerinin transfeksiyonu için DNA:transfeksiyon tepkileyicisi iyonik yük oranının 2:1 alınmasına ve transfeksiyonda kullanılacak DNA miktarının 10cm'lik hücre kültürü kabı başına 1 μ g plazmid DNA'sı olmasına karar verildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler ters bakışlı mikroskopta 10X büyütmede 10 alan belirlenerek sayıldı.

Tablo 12: Hep G2 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonu değerleri.

İyonik yük oranı	DNA miktarı (µg)	Kuyucuk numarası	Transfekte olan hücre sayısı	Ortalama
2:1	0.25	1	42	53
		2	59	
		3	57	
	0.50	1	136	149
		2	184	
		3	127	
	0.75	1	149	134
		2	141	
		3	110	
1.00	1	265	260	
	2	317		
	3	197		
4:1	0.25	1	110	129
		2	143	
		3	135	
	0.50	1	271	199
		2	189	
		3	137	
	0.75	1	193	186
		2	179	
		3	186	
	1.00	1	247	218
		2	176	
		3	231	



Şekil 18: Ortalama transfekte olan hücre sayısına göre, Hep G2 transfeksiyon optimizasyonu sonuçları. İyonik yük oranları ve DNA miktarları farklı renkte gösterilmiştir.

4.4 siRNA Kalıp Oligonukleotidin İpliklerinin Eşleştirilmesi

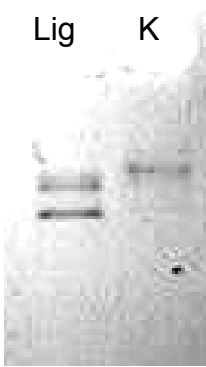
3' ve 5' uçlarında pSilencer 4.1 plazmidine bağlanmalarını sağlayacak enzim kesim bölgeleri bulunacak şekilde, tek iplikli olarak sentezlenen eklenti oligonükleotidleri eşleştirilerek çift iplikli hale getirildi. Reaksiyon sonucu %2 agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi. Sonuçta anlamlı ve anlamsız ipliklerin eşleştiği görüldü.



Şekil 19: siRNA için kalıp görevi görecek çift iplikli hale getirilmiş oligonukleotid molekülünün %2 agaroz jeldeki görüntüsü. (**Çİ:** çift iplikli, **S:** anlamlı iplik, **AS:** anlamsız iplik). Çİ kuyusunda tek iplikli oligonükleotidlerin eşleştiği görülüyor.

4.5 siRNA Kalıbının p*Silencer*TM4.1-CMV Neo Plazmidine Bağlanması

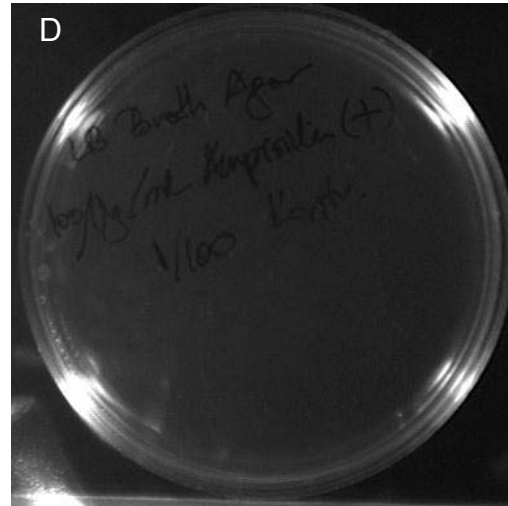
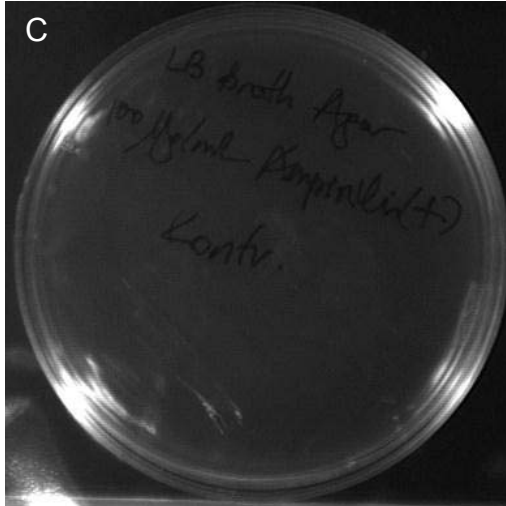
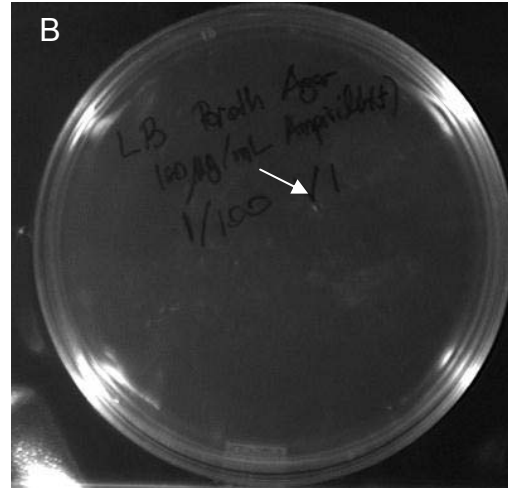
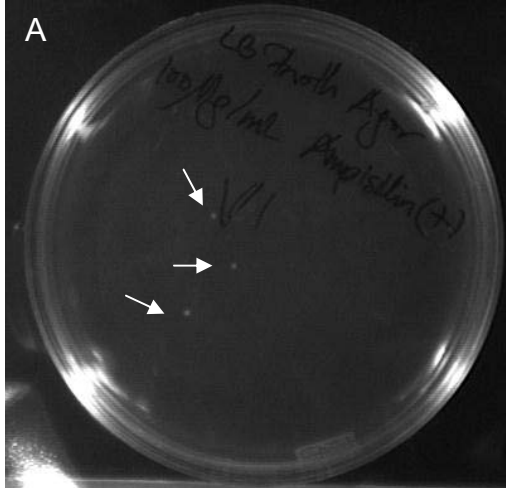
Oligonükleotid ipliklerinin eşleştirilmesiyle çift iplikli hale getirilen eklenti p*Silencer* 4.1 plazmidine T4 ligaz enzimi ile bağlandı ve reaksiyon sonucu %1 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi. Bağlanmanın gerçekleştiği görüldü. Elde edilen plazmid p*SiV1* olarak adlandırıldı.

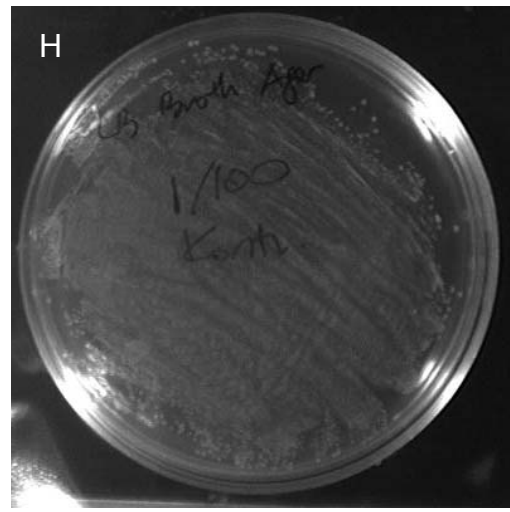
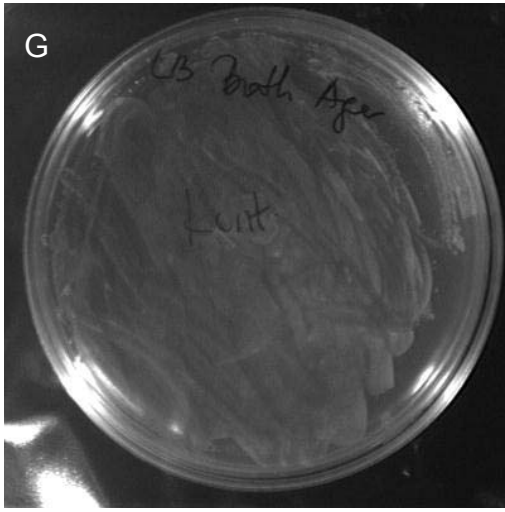
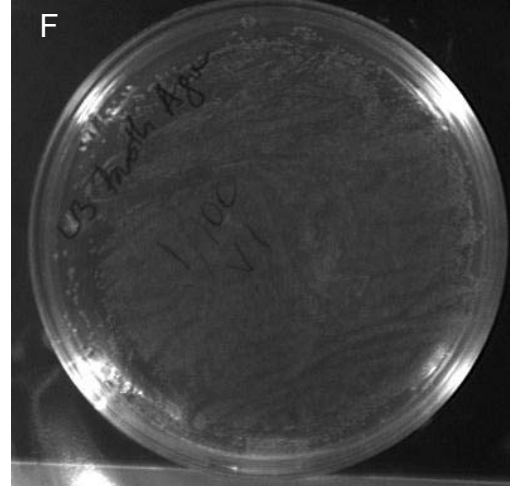
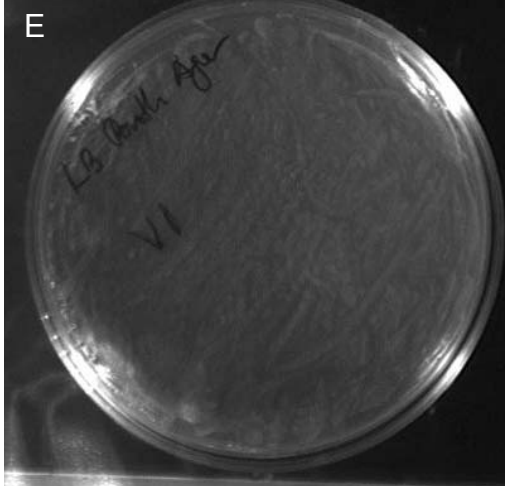


Şekil 20: siRNA kalıbının p*Silencer*TM4.1-CMV Neo plazmidine bağlanması. Bağlanma reaksiyonu sonucunda doğrusal durumdaki p*Silencer* vektörü çembersel hale geldi. (**Lig:** Ligasyon, **K:** Kontrol)

4.6 Kompetan *E. coli* Bakterilerinin siRNA Kalıbını İçeren pSilV1 Plazmidini ile Transformasyonu

siRNA kalıbını taşıyan pSilV1 plazmidini, klonlamak ve maksipreparasyon sağlamak amacıyla kompetan *E. coli* içerisine Inoue yöntemi kullanılarak transforme edildi. Transformasyon sonrası petri kaplarında bakterilerin üreme durumları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.





Şekil 21: Kompetan *E. coli* bakterilerinin siRNA kalıbını içeren pSilV1 plazmidi ile transformasyonundan sonra kültür sonuçları:

A: 100 µg/mL ampisilin (+), pSilV1

B: 100 µg/mL ampisilin (+), pSilV1 (bakteriler 1:100 seyreltildi)

C: 100 µg/mL ampisilin (+), Kontrol plazmid

D: 100 µg/mL ampisilin (+), Kontrol plazmidi (bakteriler 1:100 seyreltildi)

E: Ampisilin (-), pSilV1

F: Ampisilin (-), pSilV1 (bakteriler 1:100 seyreltildi)

G: Ampisilin (-), Kontrol plazmidi

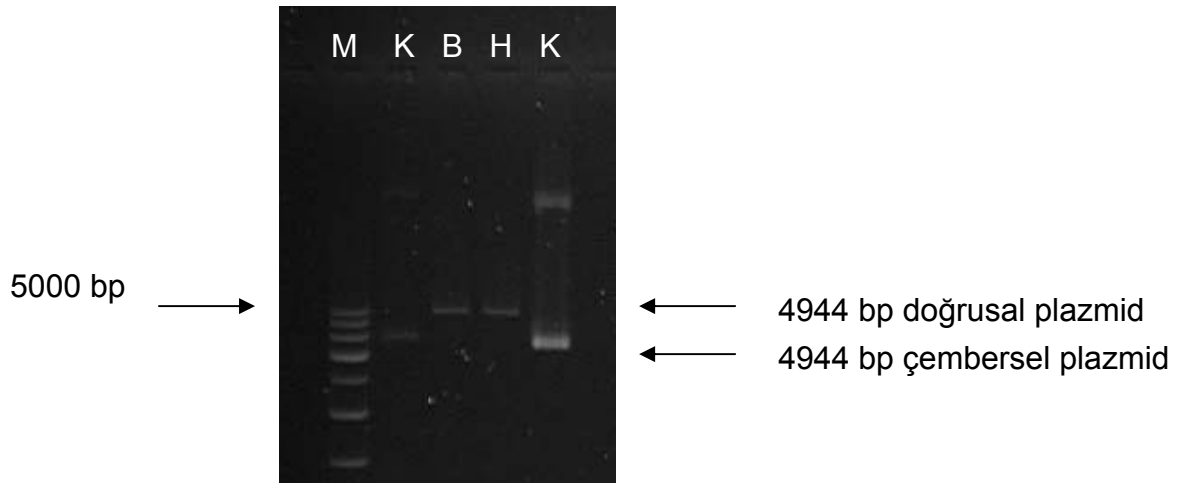
H: Ampisilin (-), Kontrol (bakteriler 1:100 seyreltildi)

4.7 siRNA Kalıbını İçeren pSilV1 Plazmidinin Maksipreparasyonu

pSilV1 plazmidıyla transforme edilmiş bakterilerin oluşturduğu kolonilerden biri alınarak sıvı LB ortamında bakteriler çoğaltıldı ve maksipreparasyon hazırlandı. Maksipreparasyon sorunsuz olarak uygulandıktan sonra elde edilen plazmid DNA'sının absorbans değerleri aşağıdaki şekildedir:

<u>A₂₆₀</u>	<u>A₂₈₀</u>	<u>Oran</u>	<u>Konsantrasyon</u>
0.030	0.013	2.307	150 µg/mL

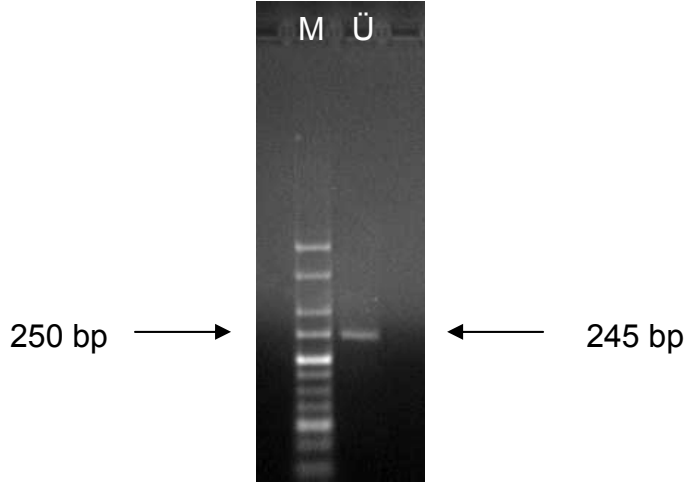
Elde edilen plazmid DNA'sına BamHI ve HindIII restriksiyon enzim kesimi uygulanarak %1 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi. Maksipreparasyon sonucunda plazmidin, bütünlüğü bozulmadan elde edildiği görüldü.



Şekil 22: Maksipreparasyon sonucunda elde edilen ve siRNA kalıbını içeren pSilV1 plazmidinin %1 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi. (**M:** Marker (HyperLadder III), **K:** Kontrol, **B:** BamHI, **H:** HindIII)

4.8 Maksipreparasyon Sonucunda Elde Edilen Ürünün DNA Dizi Analizi

pSilencer 4.1 plazmidini üretici firma tarafından dizi analizi için önerilen ileri ve geri primerler kullanılarak kurulan PCR sonucunda 245 bp'lik bir ürün elde edildi ve %2 agaroz jel elektroforeziyle değerlendirildi.

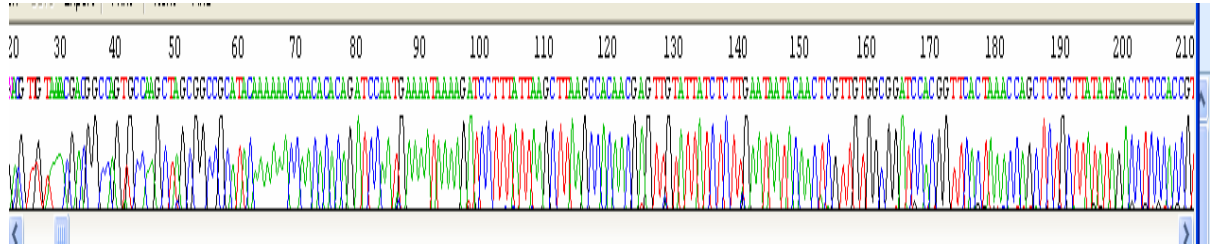


Şekil 23: Maksipreperasyon sonucunda elde edilen plazmid DNA'sının PCR ürününün %2 agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (**M:** Marker (HyperLadder V), **Ü:** PCR ürünü)

Reaksiyon sonucunda elde edilen ürün, Güney Kore'deki Macrogen firmasına gönderildi ve dizi analizi orada gerçekleştirildi. Dizi analizi sonucunda primer bağlanma bölgelerinin, enzim kesim bölgelerinin ve siRNA için kalıp görevi görecekleklenti bölgesinin okuma çerçevesinin sağlam olduğu bulundu.

İleri primerle yapılan dizi analizi sonucunda elde edilen anlamlı iplik oligonükleotid sekansı:

GACGGATCCCCAGTCACGNACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCG
GCCGCATACAAAAACCAACACACAGATCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTATTA
AGCTTAAGCCACAACGAGTTGTATTATCTCTTGAATAATACTCGTTGTGGCG
GATCCACGGTTCACTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGC
Geri Primer
CTACCG
Geri Primer

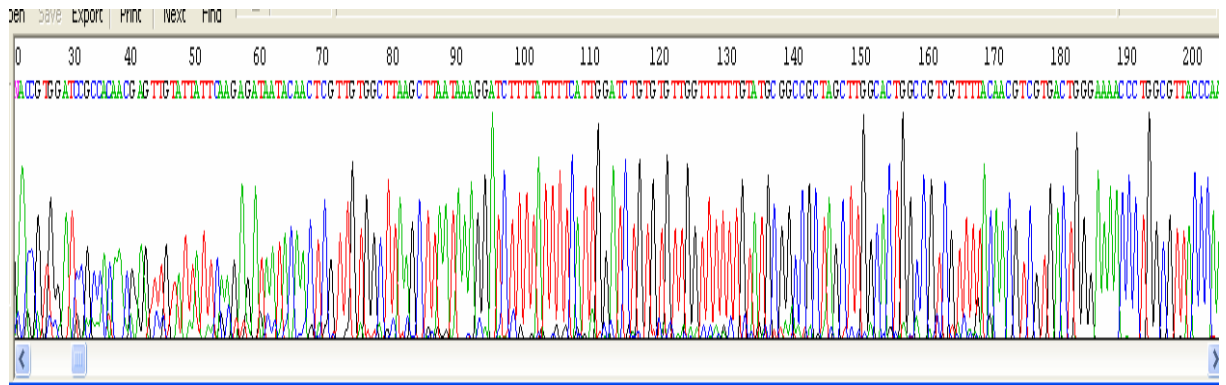


Şekil 24: İleri primerle yapılan eklenti dizi analizi ile elde edilen histogram görüntüsü.

Geri primerle yapılan dizi analizi sonucunda elde edilen anlamsız iplik oligonükleotid sekansı:

ACCGTGGATCCGCCACAACGAGTTGTATTATTCAAGAGATAATACTCGTTGT
GGCTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTT
GTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGG
AAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCT

← İleri Primer

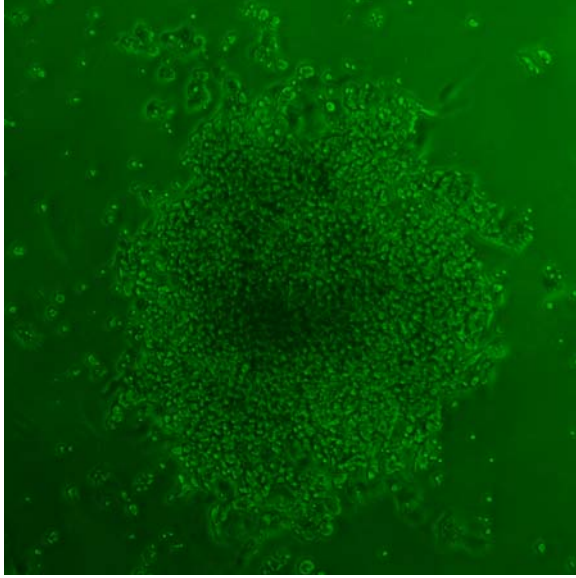


Şekil 25: Geri primerle yapılan eklenti dizi analizi ile elde edilen histogram görüntüsü.

4.9 Hücrelerin pSilV1 Plazmidini ile Transfeksiyonu

Tfx™50 reaktifi kullanılarak yapılan transfeksiyon sonrası 1000 µg/mL genetisin içeren hücre kültürü ortamında tutulan transfekte hücrelerin oluşturduğu kolonilerin seçimi 19. günde yapıldı. Seçilen koloniler, 24 kuyucuklu hücre kültürü

kaplarına, her bir kuyucukta bir koloni olacak şekilde alındı ve 1000 µg/mL G 418 içeren DMEM hücre kültürü ortamında inkübasyona devam edilerek 10 cm'lik hücre kültürü kaplarını dolduracak kadar üremeleri sağlandı. Daha sonra hücrelerin yarısı dondurulurken yarısından protein ve RNA izolasyonu yapıldı.



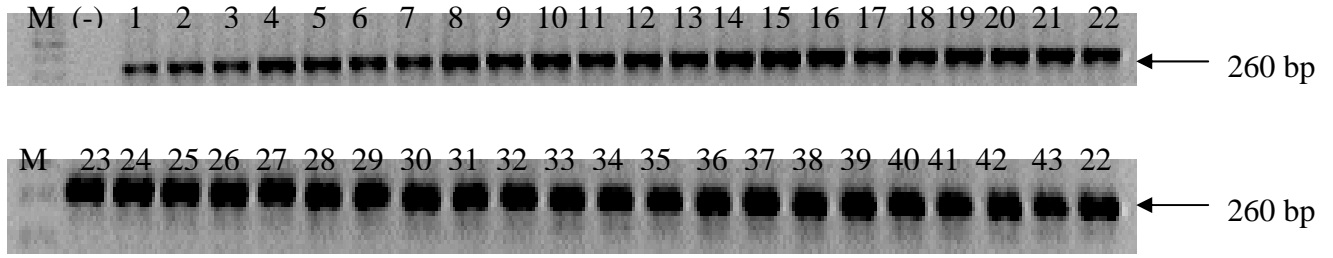
Şekil 27: pSilV1 plazmidile transfekte olmuş Hep G2 hücrelerinin oluşturduğu koloni.

4.10 Transfekte Olmuş Hep G2 Hücrelerinden RNA Elde Edilmesi

Transfekte olmuş hücrelerin oluşturduğu toplam 57 koloniden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNAların absorban değerleri Ek 5 'te yer almaktadır.

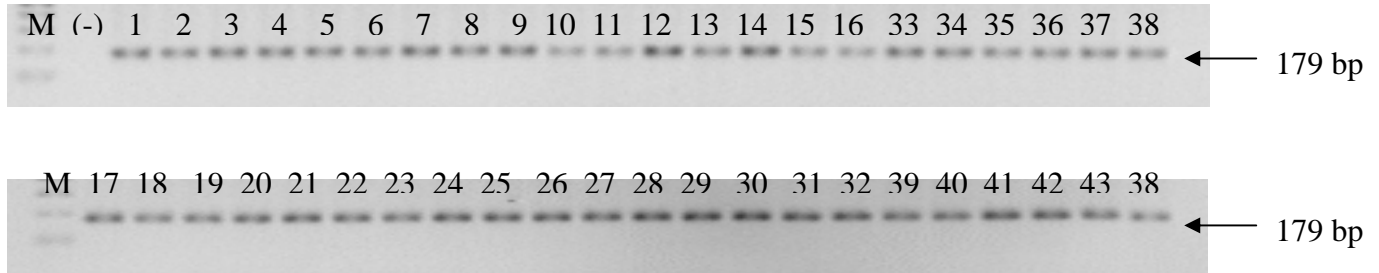
4.11 Hep G2 Kolonilerinin β -aktin ve VANGL1 Ekspresyonu ve pSilencerGAPDH ile Transfekte Pozitif Kontrol HepG2 Hücrelerinin GAPDH Ekspresyonu

pSilV1 plazmidi ile transfeksiyon sonrası seçilen kolonilerden elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapıldıktan sonra β -aktin primerleri ile kurulan RT-PCR sonrası elde edilen reaksiyon ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Kolonilerin ekspresyonlarının birbirine yakın olduğu görüldü.



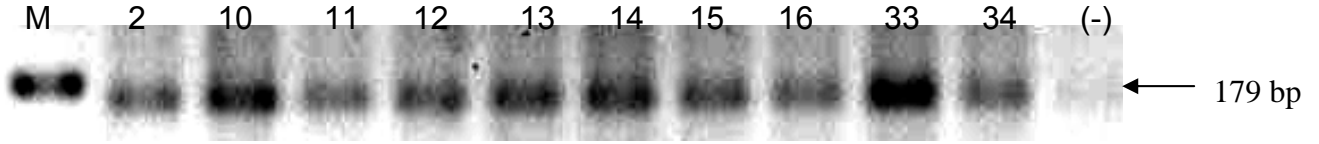
Şekil 28: Hep G2 kolonilerinin β -aktin ekspresyonu. (**M:** Marker, 1-32 nolu örnekler pSilV1 ile transfekte deney grubu, 32-43 nolu örnekler boş vektörle transfekte kontrol grubu)

Daha sonra kolonileri VANGL1 ekspresyonu açısından değerlendirildi. Kurulan RT-PCR sonucunda elde edilen ürünler %2 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. VANGL1 baskılanmasının en yüksek düzeyde 10, 11, 13, 15 ve 16 numaralı pSilV1 ile transfekte kolonilerde olduğu görüldü.



Şekil 29: Hep G2 kolonilerinin VANGL1 ekspresyonu. (**M:** Marker 1-32 nolu örnekler pSilV1 ile transfekte deney grubu, 33-43 nolu koloniler boş vektörle transfekte kontrol grubu)

VANGL1 gen baskılanması gözlenen 2, 10, 11, 13, 15, 16, gözlenmeyen 12, 14 ve kontrol grubundan 33 ve 34 numaralı örneklerden tekrar cDNA sentezi yapıldı ve VANGL1 PCR kuruldu.



Şekil 30: İlk PCR sonucunda VANGL1 geninin baskılandığı görülen kolonilerin RNA örneklerinden sentezlenen ikinci cDNA ile kurulan VANGL1 PCR sonuçları.

Aynı kolonilerden ikinci kez RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNAlardan yeniden cDNA sentezlendi ve β - aktin ve VANGL1 PCR kuruldu. İlk reaksiyonla aynı bulguların elde edilmesi üzerine Gerçek Zamanlı PCR'a geçildi.

pSilencerGAPDH ile transfekte edilmiş HepG2 hücrelerinin gliseraldehid fosfodehidrogenaz (GAPDH) ekspresyon düzeyleri de RT-PCR ile değerlendirildi ve vektörün çalıştığı saptandı. Pozitif kolonilerin β - aktin ve GAPDH ekspresyon durumunu gösterir %2 agaroz jel elektroforezi görüntüleri Ek 6 'da görülebilir.

Gerçek Zamanlı PCR'da, geleneksel PCR ile gen sessizleşmesi gözlenen iki ve 16 numaralı örnekler ile 40 numaralı kontrol grubu örneği, hiç vektörle karşılaşmamış atasal hücre örneği ile karşılaştırıldı. Sonuçta 16 numaralı örnekte %61 düzeyinde gen sessizleştirilmesinin sağlandığı gözlemlendi.

Tablo 13: Gerçek Zamanlı PCR sonucunda örneklerin VANGL1 ekspresyon düzeylerinin relatif kantifikasyonu. (Cp: Geçiş noktası. Reaksiyondaki amplifiye olmuş DNA kopya sayısının eşik değerini geçtiği döngü sayısı). Konsantrasyon oranı, hücrelerdeki VANGL1 ekspresyonunu β - aktin düzeylerine göre; normalleştirilmiş oran ise referans olarak alınan (burada atasal HepG2 hücre dizisi) hücre dizisindeki VANGL1 ekspresyonuna göre hesaplandı.

Örnek	Ortanca Cp	Konsantrasyon Oranı	Normalleştirilmiş Oran
Atasal Hep G2	20.19	0.70	1.00
2 nolu koloni	23.00	0.76	1.08
16 nolu koloni	23.00	0.28	0.39
40 nolu koloni	20.10	1.86	2.65

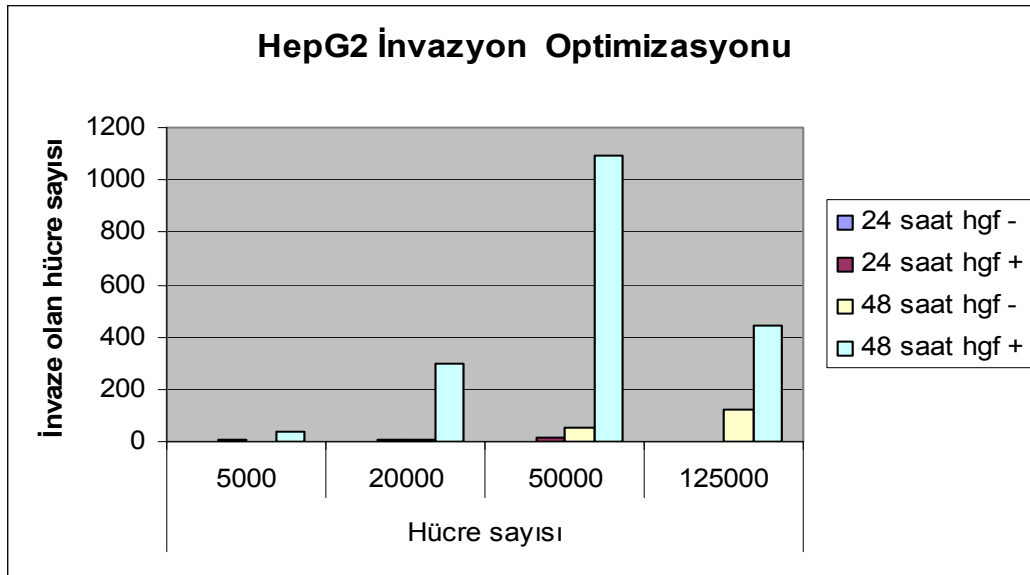
Gerçek Zamanlı PCR sonrasında western blotlama ile VANGL1 ekspresyonunun baskılandığı gösterildi:



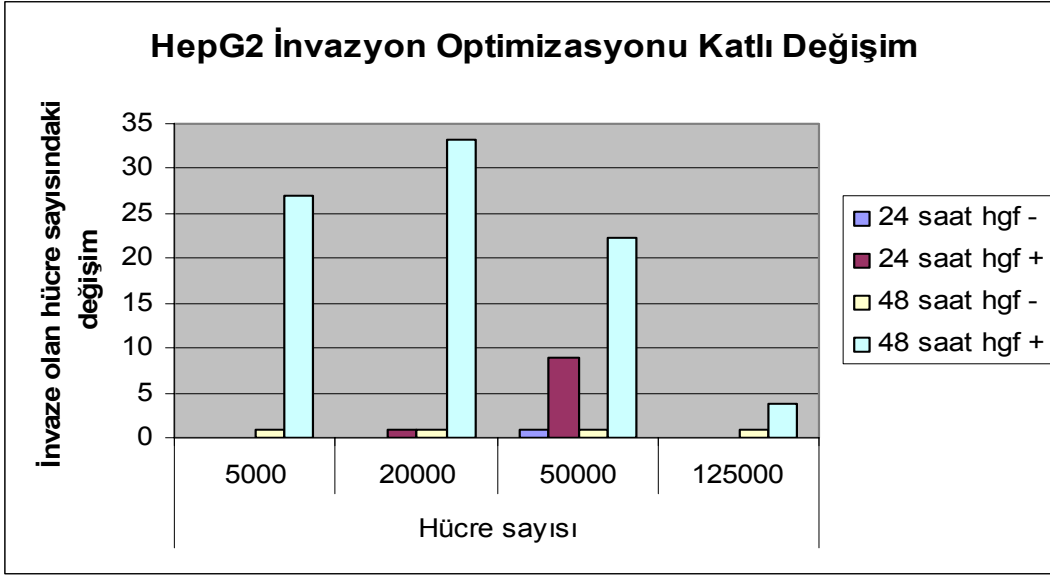
Şekil 30: pSilV1 ile transfekte 2 ve 16 nolu koloniler, boş vektörle transfekte 40 nolu koloni ve negatif kontrol olarak kullanılan HL60 promiyelositik lösemi hücre dizilerinin VANGL1 ekspresyonlarının western blotla gösterilmesi.

4.12 Motilite ve İnvazyon Deneylerinin Optimizasyonu

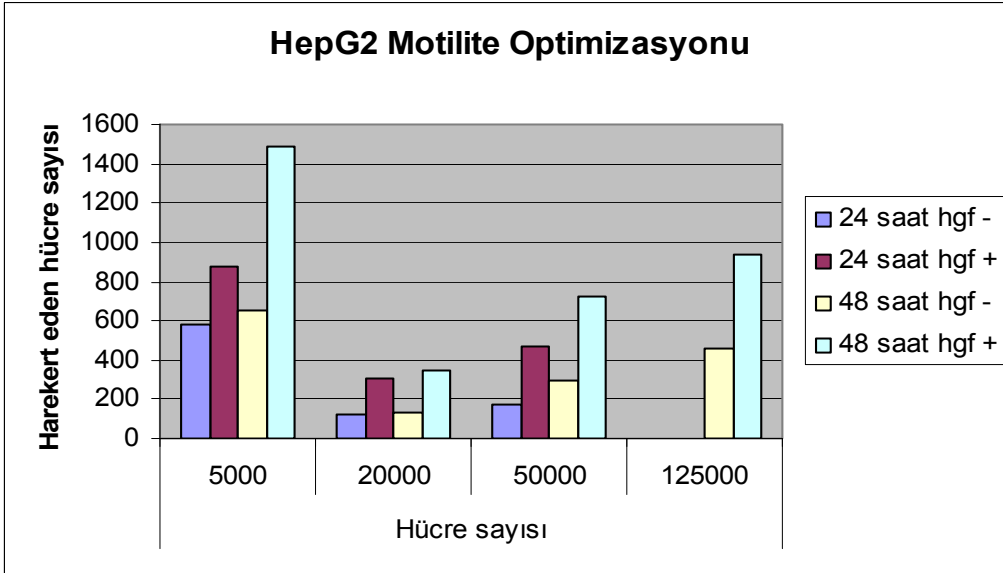
siRNA ile VANGL1 baskılanmasının hücre motilite ve invazyonu üzerine olası etkisini incelemek üzere hazırlanan Boyden odacık deneyi 24 ve 48 saatte değerlendirildi. Deneyin 125000 hücre/kuyucuk koşuluyla kurulan kısmı, başlangıç kültüründeki hücre sayısı deneyi tüm koşullarıyla kurmaya yetmediği için yalnızca 48 saatlik inkübasyon sonrasında değerlendirildi.



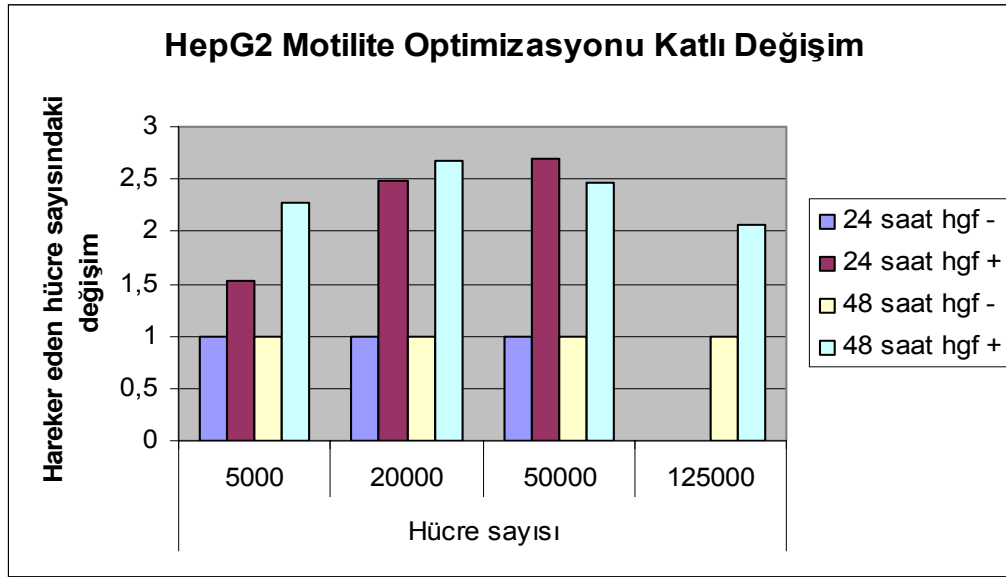
A



B



C



D

Şekil 31: HepG2 hücrelerinin invazyon (A, B) ve motilite (C,D) optimizasyonu. B ve D grafiklerinde Y eksenindeki değerler, hücre dizilerinde hepatosit büyüme faktörüne (HGF) yanıt olarak hareket eden hücre sayılarının ortamda HGF yokken hareket eden hücrelere göre oranını vermektedir.

Elde edilen verilere göre, gerek 20000 gerekse 50000 hücre/kuyucuk koşulunda kurulan motilite deneylerinde HGF uyarılması ile göç eden hücre sayısında 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda iki katlık artış saptanmıştır. 20000 hücre/kuyucuk kullanıldığında 24 ve 48 saatte göç eden hücre sayısı birbirine yakındır. 50000 hücre/kuyucuk ile kurulan deneylerde ise HGF uyarımı varlığında ve yokluğunda, 48. saatte 24. saate göre daha çok hücre göç etmiştir.

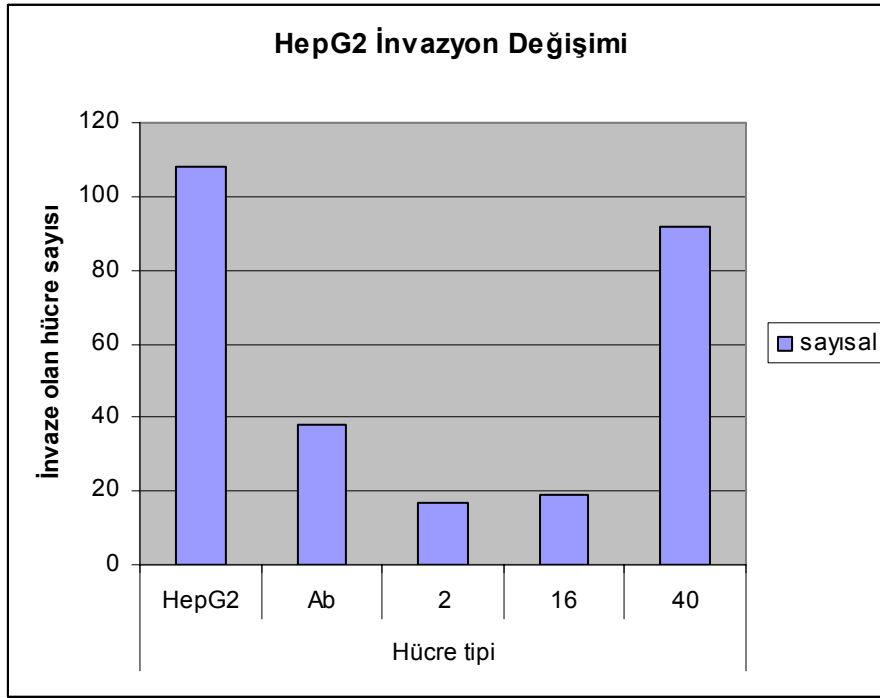
İnvazyon deneyleri, 20000 hücre/kuyucuk ile kurulduğunda 24. saatte HGF varlığında ve yokluğunda değerlendirilebilecek sayıda hücre invazyonu gerçekleşmemiştir. 50000 hücre/kuyucuk ile kurulan invazyon deneyinde ise HGF uyarılması ile invaze olan hücre sayısında 24. saatte 10 kat, 48. saatte de 20 katlık artış gözlenmiştir. Motilite ve invazyon kuyucuklarına 125000 hücre ekleyerek yapılan deneylerde, hareket eden hücre sayısında değişiklik olmamasına rağmen invazyon yapan hücre sayısında, HGF uyarımı ile azalma saptanmıştır. Motilite ve invazyon deneylerinde hücreler kuyucuklara 500 µL hacim içerisinde eklendiklerinden 125000 hücre/kuyucuk kullanılarak yapılan deneylerde ortam hacmi/hücre sayısı oranı çok

düşük olduğu için hücrelerin invaziv yeteneklerini yeterli olarak gösteremedikleri düşünülmüştür. Bu nedenle asıl deneylerin motilite için 50000 hücre/kuyucuk, invazyon içinse 100000 hücre/kuyucuk ile kurulmasına ve deneyin 48 saatte sonlandırılmasına karar verilmiştir.

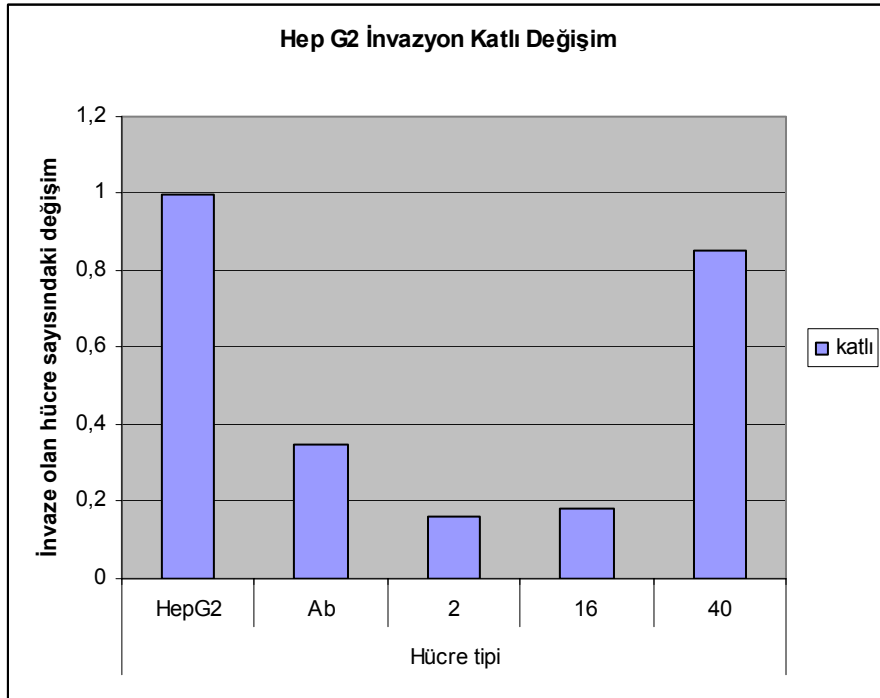
4.13 Motilite ve İnvazyon Deneyleri

Yapılan optimizasyonların ardından, siRNA ile VANGL1 genleri sessizleştirilen HepG2 hücrelerinde, bu sessizleştirmenin sonucunda, motilite ve invazyon özelliklerinde ortaya çıkabilecek değişiklikleri değerlendirmek üzere, pSilencer 4.1 vektörü ile hiç karşılaşmamış HepG2 atasal hücreleri, anti-LPP2 monoklonal antikoruna maruz bırakılarak (%2 FBS içeren DMEM hücre kültürü ortamında 1:200 seyreltme ile 37°C'da 15 dakika inkübasyon sonucunda) Vangl1 proteini baskılanmış HepG2 atasal hücreleri, pSilV1 ile transfekte 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş vektörle transfekte 40 numaralı koloni ile motilite ve invazyon deneyleri kuruldu. Motilite için kuyucuk başına 50000 hücre, invazyon içinse kuyucuk başına 100000 hücre ile ekim yapıldı ve deney 48 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirildi.

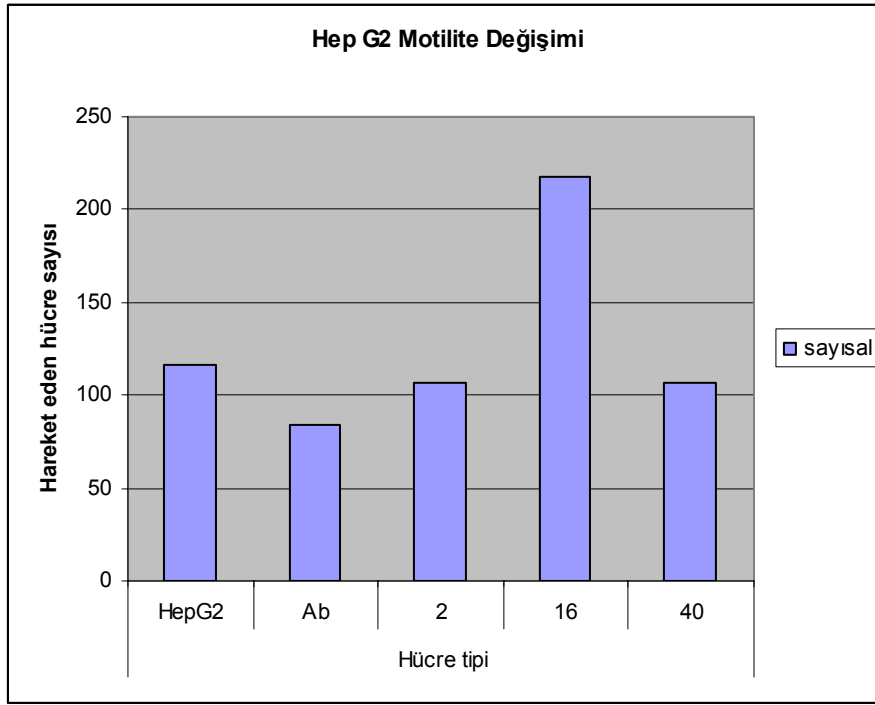
Deney sonucunda Vangl1 proteini Anti-LPP2 antikoruna ile bloklanmış HepG2 hücreleri ile 2 ve 16 numaralı kolonilerde hücrelerin invaziv yetenekleri atasal HepG2 hücreleri ve boş vektörle transfekte 40 numaralı koloniye göre 3 kat azalmış olarak bulundu. Tekrarlanan deneylerle bu durum doğrulandı. Hücrelerin motilite özellikleri ise Anti-LPP2 ile karşılaşan HepG2 hücreleri ve 2 numaralı kolonide, atasal HepG2 hücrelerine ve boş vektörle transfekte koloniye göre belirgin bir değişiklik göstermezken, pSilV1 ile transfekte 16 numaralı kolonide diğer hücre tiplerine göre yaklaşık iki katlık bir artış gösterdi.



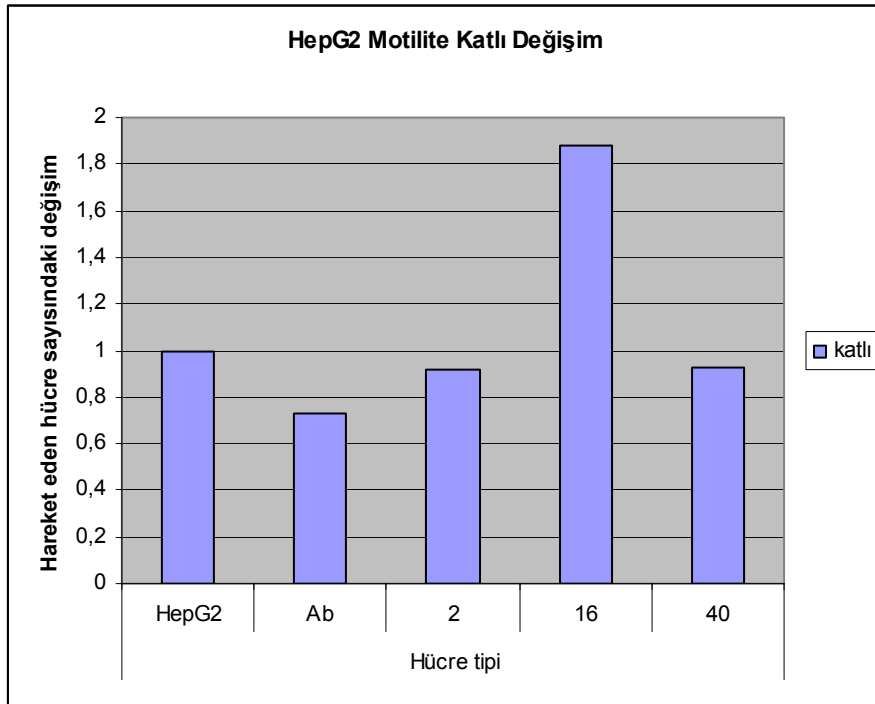
A



B



C



D

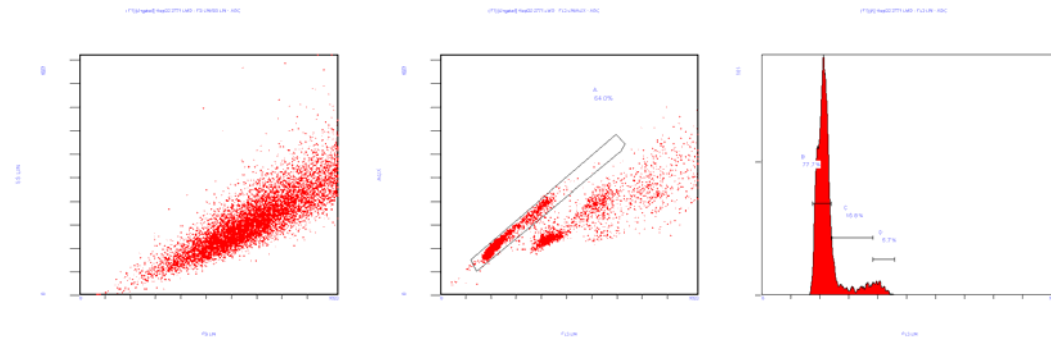
Şekil 32: Atasal HepG2, anti-LPP2 monoklonal antikoru ile karşılaşmış HepG2 hücreleri, pSilV1 ile transfekte 2 numaralı ve 16 numaralı koloniler ve boş vektörle transfekte 40 numaralı kolonideki hücreler arasında motilite ve invazyon farklılıkları. B ve D grafikleri hücre tipleri arasında gözlenen invazyon ve motilite farklılığının katlı değişimini göstermektedir.

4.14 Hücre Döngüsü Analizi

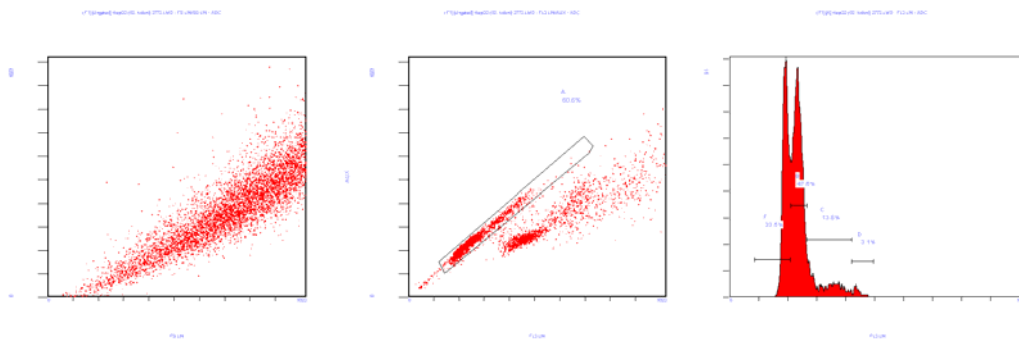
Beckman Coulter Epics XL.MCL akış sitometresi cihazıyla atasal HepG2 hücreleri, monoklonal anti-LPP2 antikoruna ile karşılaşan atasal HepG2 hücreleri, pSilV1 plazmidi ile transfekte edilmiş ve VANGL1 geni sessizleştirilmiş 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş pSilencer 4.1 vektörüyle transfekte 40 numaralı kolonideki hücrelerin, hücre döngüsü analizi sonuçları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 14. Atasal HepG2 hücreleri, monoklonal anti-LPP2 antikoruna ile karşılaşan atasal HepG2 hücreleri, pSilV1 plazmidi ile transfekte edilmiş ve VANGL1 geni sessizleştirilmiş 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş pSilencer 4.1 vektörüyle transfekte 40 numaralı kolonideki hücrelerin, hücre döngüsü analizi sonuçları (mAb: Anti-LPP2 monoklonal antikor).

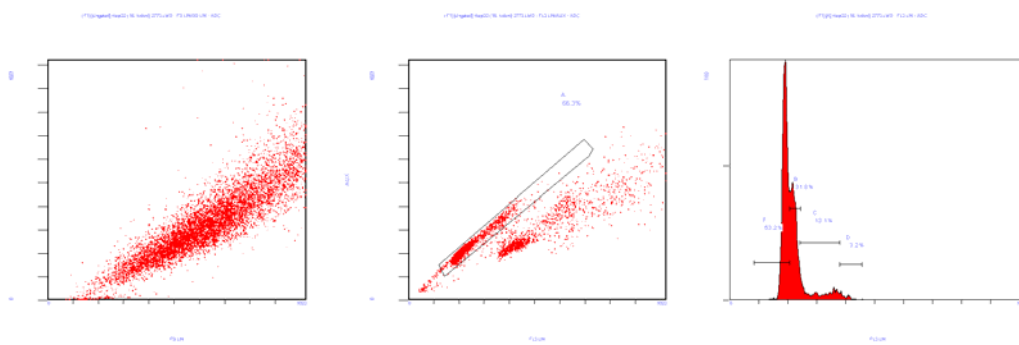
Hücre Tipi	G ₀ +G ₁ fazlarındaki hücre oranı (%)	S fazındaki hücre oranı (%)	G ₂ +M fazlarındaki hücre oranı (%)	Apoptotik hücre oranı (%)
Atasal HepG2	77.7	15.6	5.7	-
2 numaralı koloni	47.6	13.8	3.1	33.5
16 numaralı koloni	31.8	13.1	3.2	53.2
40 numaralı koloni	40.8	18.7	3.3	31.9
HepG2 +mAb	74.2	19.0	5.2	-



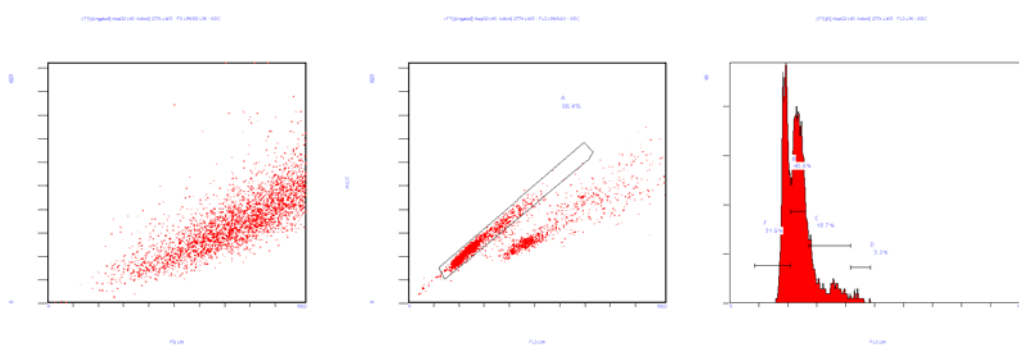
A



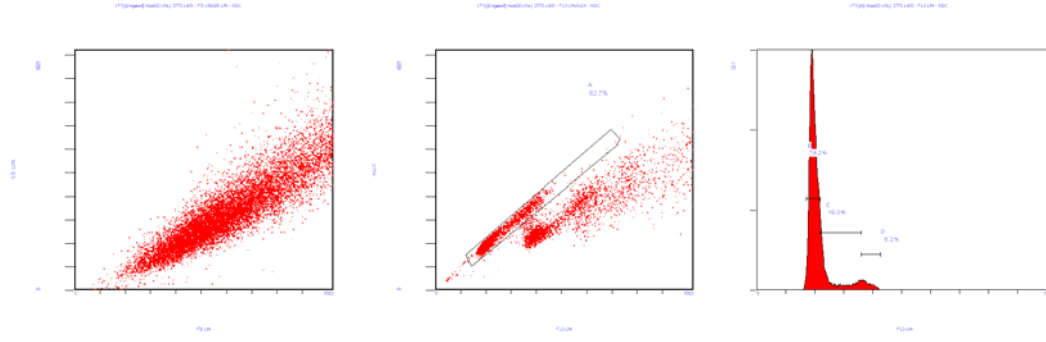
B



C



D



E

Şekil 33: Atasal HepG2 hücreleri, monoklonal anti-LPP2 antikoru ile karşılaşan atasal HepG2 hücreleri, pSiV1 plazmidi ile transfekte edilmiş ve VANGL1 geni sessizleştirilmiş 2 ve 16 numaralı koloniler ve boş pSilencer 4.1 vektörüyle transfekte 40 numaralı kolonideki hücrelerin, hücre döngüsü analizi akış sitometresi sonuçları.

A: Atasal HepG2 hücreleri

B: pSiV1 ile transfekte 2 numaralı koloni hücreleri

C: pSiV1 ile transfekte 16 numaralı koloni hücreleri

D: Boş vektörle transfekte 40 numaralı koloni hücreleri

E: Anti-LPP2 monoklonal antikoru ile karşılaşmış atasal HepG2 hücreleri

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Klasik Wnt yolağının, birçok gelişimsel süreçte ve neoplazide önemli görevlere sahip olmasının yanı sıra, osteosarkom ve mesane kanseri hücrelerinin migrasyonunu da etkilediği gösterilmiştir^{118,119}. Ancak, hücre polaritesinin düzenlenmesi ve hücre hareketliliğinde asıl rolü DHP yolağının oynadığı belirlenmiştir¹²⁰. DHP yolağı ilk kez, *Drosophila*'da Fz ve Dsh'a bağımlı olarak epitelyal hücre polaritesini belirleyen bir mekanizmanın varlığının bulunmasıyla tanımlanmıştır⁴³. JNK (c-Jun N-terminal kinaz) ile Rho ve ROCK (Rho-ilişkili kinaz) da bu yolakta yer alır^{43,121,122}. Omurgalılarda, gastrulasyon sırasında hücrelerin konverjant ekstansiyon hareketini sağlayan benzer bir mekanizma bulunmuştur¹²³. *Xenopus* ve zebra balığında DHP yolağının aktivatörü olarak Wnt-11 gösterilmiştir^{47,48}. Vangl/Stb, Dvl, RhoA/ROCK ve Rac/JNK'in DHP sinyal iletiminin ve hücre motilitesinin aktive olmasını sağladığı çeşitli model sistemlerde gösterilmiştir^{45, 48, 57,74,124,125,126}.

Vangl1, hücre polaritesinde önemli rolü olan, tetraspanin (zarı dört kez kateden) grubundan bir proteindir ve polarite değişiklikleri ile hücre hareketliliğinin değişmesi beklenir. Tetraspaninler, hücre plazma zarında, büyük, çok moleküllü kompleksler oluşturan, hidrofobik yapıda glikoproteinlerin oluşturduğu 28 üyeli bir protein ailesidir^{77,127,128,129,130}. Transmembran bölgeleri oldukça korunmuştur. Birbirlerinden farklı büyüklüklerde, iki adet hücre dışı bölgeleri vardır. N ve C uçları hücre içinde olup, oldukça küçüktürler⁷⁷. Tetraspaninler başta birbirleriyle olmak üzere, aralarında integrinler, MHC proteinleri, büyüme faktörü reseptörleri, immünglobulinler, başka membran proteinleri ve sinyal iletimi moleküllerin de olduğu birçok moleküle ilişki kurarlar. Transmembran bölgeleri aracılığıyla birbirleriyle kurdukları kompleksler, tetraspanin ağı olarak bilinen mikrodomeyn kümelerini oluşturur¹³⁰. Tetraspaninler, hücre çoğalması, polarizasyon, aktivasyon, adezyon, migrasyon ve farklılaşma gibi birçok farklı hücre fonksiyonunda görevlidirler^{128,131,132}.

Araştırmamızda HepG2 HCC hücre dizisinde Vangl1 ekspresyonunu saptadıktan sonra, siRNA uygulayarak Vangl1'in *in vitro* hücre motilite ve invazyonu üzerine etkisini göstermeye çalıştık. pSilencer vektörü ile Vangl1 siRNA'sı uygulanan HCC hücrelerinde, Vangl1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre %61 baskılandığı gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle relatif kantifikasyon uygulanarak belirlendi. Yapılan invazyon deneylerinde, Vangl1 ekspresyonu baskılanan hücreler, atasal ve

boş vektör ile transfekte edilen hücrelere göre yaklaşık üç kat daha az invaziv özellik gösteriyordu. Ancak, Vangl1 ekspresyonu baskılanan hücrelerin motilite yetenekleri kontrol gruplarına göre yaklaşık iki kat artış gösterdi. HepG2 hücre dizileriyle tekrarlanan deneylerde elde edilen veriler, Vangl1'in motiliteden çok invazyona etkisi olduğunu gösterdi. Bu durum, Vangl1 protein miktarının azalması ile hücrelerin ECM içerisinde ilerleyebilmeleri için gerekli, matrisi parçalayıcı enzimlerin (MMPIlar ve TIMPIler) ekspresyonlarının azalması ile açıklanabilir. Olasılıkla, VANGL1 geninin sessizleştirilmesi ile hücre zarındaki protein miktarının azalması, Vangl1'in diğer tetraspaninlerle veya hücre motilitesini, adezyonunu ve migrasyonunu düzenleyen protein kompleksleriyle oluşturduğu ilişkinin azalmasına yol açmaktadır. Vangl1 proteini azaldığında, hücre invazyonunu baskılayıcı tetraspaninler serbest kalarak bu fonksiyonlarını ortaya koyabilirler⁷⁷.

Kalabis ve arkadaşlarının⁶⁶, araştırmasında da VANGL1 siRNA'sı uygulanan barsak epitel hücrelerinin motilite yeteneklerinin azalmaması VANGL1'in daha çok invazyonla ilişkili bir gen olduğu kanısını güçlendirmektedir. Araştırmada, insan barsak epitelindeki *in vitro* yara iyileşmesi modelinde Vangl1'in düzenleyici rol oynadığını gösterilmiştir. Vangl1 ekspresyonunun, kolon ve çalışmaya alınan intestinal epitel hücre dizilerinde var olduğu gösterilmiştir. İntestinal mukoza zedelenmelerinde ekspresyonu artan ve zedelenen bölgeye hücre migrasyonunu sağlayan ITF/TFF3 proteini, Vangl1 proteinini Ser/Thr alt birimlerinden fosforiller. Vangl1'in hücre içi yerleşimi fosforillenmenin ardından, E-kaderin ile birlikte bulunduğu plazma zarından, sitoplazmadaki vezikül zarlarına kaymıştır. Vangl1'in hücre üzerindeki etkisini göstermek üzere siRNA uygulandığında, VANGL1 siRNA'sı uygulanan hücrelerin ITF ile uyarılmaya yanıtları kontrol grubuna göre, azalmış ancak hücrelerin migrasyon özelliği değişmemiştir. Vangl1 ekspresyonu artırıldığında ise hücrelerin daha hızlı hareket ettiği ve ITF'ye daha iyi yanıt verdiği gözlenmiştir. *In vitro* oluşturulan yara iyileşmesi modelinde, yara kapanmasından sonra hücrelerde Vangl1 ekspresyonu saptanmış ve bu ekspresyonun, hücrelerin epitel polarizasyonunu yeniden kazanmalarını sağladığı düşünülmüştür. Elde edilen veriler, Vangl1'in sinyal iletiminde ITF'nin aşağısında yer aldığını ve yara iyileşmesinde görülen hücre migrasyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir⁶⁶.

Lee ve arkadaşları tarafından, Vangl1'in bir tümör metastaz baskılayıcısı ve tetraspanin olan KAI1'in C-ucuna bağlandığı, mide tümörü doku örnekleri ile metastatik potansiyeli olan kolon kanseri hücre dizilerinde ekspresyonunun arttığı

bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, KAI1 ile Vangl1 ekspresyonları arasında bir dengenin olduğu, metastatik hücrelerde KAI1 ekspresyonu azalırken Vangl1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Vangl1 genine antisens cDNA uygulanması, KAI1'in ekspresyonunun artırılmasına kıyasla hücrelerin invaziv yeteneklerini daha fazla azaltmıştır. Ayrıca Vangl1 ekspresyonu artırılan kolon kanseri hücrelerinin fibronektine daha sıkı tutundukları gösterilmiştir. Yani Vangl1'in hücrelerin adezyon ve invazyon yetenekleri üzerine etkisi, KAI1'den daha fazladır. Vangl1'i daha az eksprese eden hücrelerde nm23, KiSS1, TIMP2 gibi metastaz baskılayıcı genlerin ekspresyonu artmaktadır. Ayrıca Vangl1'in ekspresyonunun artırılması hücrelerin morfolojik özelliklerini değiştirmektedir⁷⁷. Aynı grubun yaptığı bir başka çalışmada, BALB/c farelerinde oluşturulan kolon kanseri modelinde, VANGL1 siRNA'sı intravenöz olarak uygulanmış ve siRNA uygulanan farelerde kontrol grubuna göre tümör boyutları ve uzak metastaz görülme sıklığı azalmıştır⁷⁸. Her iki araştırmada elde edilen tüm bu veriler, Vangl1'in hücrelerin invazyon ve metastaz özellikleriyle ilişkili olduğunu ayrıca plazma zarının aktin düzenlenimini etkileyerek hücre morfolojisini değiştirdiğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da VANGL1 geninin sessizleştirilmesi sonucunda bahsedilen iki araştırmada da gözlemlendiği gibi hücrelerin invazyon yetenekleri anlamlı derecede azaldı.

Araştırmamızda, akım sitometresi ile hücre döngüsü analizi yaparak atasal HepG2 hücreleri, anti-LPP2 monoklonal antikoruna ile karşılaşmış atasal HepG2 hücreleri, pSilV1 ile transfekte edilerek VANGL1 geni sessizleştirilmiş hücreler ile boş vektörle transfekte edilmiş hücreler arasında proliferasyon analizi yaptık. Analiz sonucunda hücre grupları arasında, proliferasyon göstergesi olan, S fazındaki hücre oranı açısından belirgin bir değişiklik bulunmamıştır. Ancak, shRNA kalıbını içeren pSilV1 ile transfekte edilmiş hücreler ve boş vektörle transfekte hücrelerde apoptotik hücre oranının arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış boş vektörle transfekte hücrelerde de gözlenmekte fakat Anti-LPP2 monoklonal antikoruna ile karşılaşmış hücrelerde saptanmamaktadır. Apoptotik hücre oranındaki artışın VANGL1 geninin sessizleştirilmesinden çok, pSilencer 4.1 vektörünün HepG2 hücrelerindeki ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Direkt olarak siRNA'lar ile geçici transfeksiyon yapılarak (ekspresyon vektörüne gerek duyulmaz) ya da apoptoza neden olmadığı bilinen bir başka vektörle transfeksiyon ile VANGL1 sessizleştirilmesinin hücre çoğalmasında yol açabileceği değişiklikler daha net olarak ortaya konabilir.

Vangl1'in baskılanması yoluyla kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerinin azalması, aynı zamanda, Vangl1'in kanser tedavisinde yeni bir hedef olma olasılığını da artırmaktadır. Bu durum, bilinen etkin bir tedavisi olmayan HCC için bir umut kaynağıdır.

Araştırma sonucunda elde edilen verilerimiz, bundan sonrası için planlanacak yeni projeleri beraberinde getirmektedir. Vangl1'in invazyonda etkisi olan matris metalloproteinazlar ve invazyon ve/veya migrasyonla ilintili diğer moleküller ile ilişkisinin aydınlatılması, maya-iki hibrid, faj sunumu ve benzeri yöntemlerle, bağlantılı olabilecek aday protein ve genlerin belirlenmesi, hücre iskeleti ile ilişkisinin olup olmadığının ortaya konması bunlardan bazılarıdır.

Araştırmamızda, VANGL1 geni literatürde önerilenin aksine sadece bir shRNA molekülü ile sessizleştirilmeye çalışılmıştır. Bu durum, literatürde belirtildiği şekilde ekspresyon inhibisyonu yüzdesinin düşük olmasına neden olmuşsa da baskılanma oranı tatminkâr düzeydedir ve elde ettiğimiz verilere etkisinin olduğu düşünülmemektedir. Yine de literatüre uygunluk ve elde edilen verilerin desteklenmesi açısından, ikinci ve üçüncü shRNA molekülleri ile gen sessizleştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2003;362:1907-1917
2. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Nat Genet 2002;31:339-346
3. Colombo M, Donato MF. Prevention of hepatocellular carcinoma. Semin Liv Dis 2005;25:155-161.
4. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma:recent trends in the United States. Gastroenterology 2004; 127(5 Suppl 1):S27-S34
5. Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Functional genomics of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2006;43:S145-S150
6. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. Semin Cancer Biol 2000;10:185-200.
7. Theise ND, Park NY, Kojiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. Clin Liver Dis 2002;6:497-512 .
8. Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL ve ark. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. J Hepatol 2003;39:208-214.
9. Nakashima Y, Nakashima O, Tanaka M, Okuda K ve ark. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type. Hepatol Res 2003;26:142-147.
10. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. Cancer Cell 2004;5:215-219.
11. Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, Sadovnikova NY ve ark. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2003;63:859-864.
12. Paradis V, Bieche I, Dargere D, Laurendeau I ve ark. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas(HCC) using a large-scale real time RT-PCR approach:determination of a molecular diagnostic index. Am J Pathol 2003;163:733-741.
13. Staib F, Hussein SP, Hofseth LJ, Wang XW ve ark. TP53 and liver carcinogenesis. Hum Mutat 2003;21:201-216.
14. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS ve ark. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. Am J Pathol 2000;157:763-770

15. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J ve ark. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinoma define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;20:1763-1773
16. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004;127:S56-S61
17. Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM ve ark. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP)-ribosylation. *Hepatology* 2002;35:217-223
18. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M ve ark. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003;22:3911-3916
19. Horikawa I, Barrett JC. cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1171-1173
20. Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK ve ark. Preferential integration of human papilloma virus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 2003;22:7233-7242).
21. Hwang GY, Lin CY, Huang LM, Wang YH ve ark. Detection of hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol* 2003;41:5598-5603
22. Yen TS. Hepadnaviral X. Protein: review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
23. Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. Hepatitis virus X protein co-localizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3 and alters its transmembrane potential. *J Virol* 2000;74:2840-2846
24. Chami M, Ferrari D, Nicotera P, Paterlini-Brechot P ve ark. Caspase dependent alterations of Ca²⁺ signalling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein. *J Biol Chem* 2003; 278:31745-31755
25. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signalling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001; 294:2376-2380.
26. Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of Hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S62-S71
27. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr ve ark. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148.

28. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997;38:601-628.
29. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA ve ark. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002;122:366-375
30. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9599-9604
31. Machida K, Cheng Kt, Sung VM, Shimodaira S ve ark. Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4262-4267
32. Van Es JH, Barker N, Clevers H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:28-33.
33. Pennisi E. How a growth control path takes a wrong turn to cancer. *Science.* 1998;281:1438-1441
34. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1332: F127-47
35. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H ve ark. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281:1509-12.
36. Clevers H, Van de Wetering M. TCF/LEF factors earn their wings. *Trends Genet* 1997;13:485-489
37. Tetsu o, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426
38. Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z ve ark. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18:280-7.
39. Ikenoue T, Ijichi H, Kato N, Kanai F ve ark. Analysis of the beta-catenin/T cell factor signaling pathway in 36 gastrointestinal and liver cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1213-1220
40. Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY ve ark. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol.* 2001;7:542-6.

41. Keiko M, Lothar H. β -catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res* 2003;5:63-68
42. Saneyoshi T, Kume SS, Amasaki Y. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in xenopus embryos. *Nature* 2002;417:295-299
43. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*. 1998;94:109-18.
44. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L ve ark. Arrow encodes an LDL-receptor related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000;407:527-530, 2000).
45. Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nature Cell Biology* 2002;4:20-25
46. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev*. 1998;12:2610-22.
47. Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L ve ark. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*. 2000;405:76-81.
48. Tada M, Smith JC. Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development*. 2000;127:2227-38.
49. Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut Jve ark. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development*. 2000;127:3091-100.
50. Fanto M, Mayes CA, Mlodzik M. Linking cell-fate specification to planar polarity: determination of the R3/R4 photoreceptors is a prerequisite for the interpretation of the Frizzled mediated polarity signal. *Mech Dev* 1998;74:51-58
51. Wong LL, Adler PN. Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol* 1993;123:209-221
52. Noselli S, Agnes F. Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* Morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev*1999;9:466-472
53. Weber U, Paricio N, Mlodzik M. Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *drosophila* eye. *Development* 2000;127:3619-3629

54. Wolff T, Rubin GM. Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. *Development*. 1998;125:1149-59.
55. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ ve ark. Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature Genet* 2001;28:251-255
56. Axelrod JD, Strabismus comes into focus. *Nature Cell Biol*. 4: E6-E8. 2002
57. Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. Prickle and strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *The EMBO Journal* 2003;22/17:4409-4420
58. Strutt DI. Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the Drosophila wing. *Mol Cell* 2001;7:367-375
59. Strutt D, Johnson R, Cooper K, Bray S. Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the Drosophila eye. *Curr Biol* 2002;12:813-824
60. Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN. Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. *Genetics* 1998;150:199-210.
61. Strutt D. Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. *Development*. 2003;130:4501-13. Review.
62. Kato M. Strabismus (STB)/Vang-like(VANGL) gene family (Review) *Int J Mol Med* 2002;10:11-15
63. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HRC. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:99-113
64. Jackson P, Marreiros A, Russell PJ. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:530-534
65. <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas>
66. Kalabis J, Rosenberg I, Podolsky DK. Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *J Biol Chem*. 2006;281:6434-41
67. Yagyu R, Hamamoto R, Furukawa Y, Okabe H ve ark. Isolation and characterization of a novel human gene, VANGL1, as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002;20:1173-1178
68. Mlodzik M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 2002;18:564-571

69. Axelrod JD. Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev.* 2001;15:1182-1187.
70. Bastock R, Strutt H, Strutt D. Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development.* 2003;130:3007-3014.
71. Goto T, Keller R. The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev Biol.* 2002;247:165-181.
72. Jessen JR, Topczewski J, Bingham S, Sepich DS ve ark. Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. - *Nat Cell Biol.* 2002;4:610-615.
73. Keller R. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 2002;298:1950-1954.
74. Wallingford JB, Rowling BA, Vogeli KM, Rothbacher U ve ark. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature.* 2000;405:81-85.
75. Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell.* 2002;2:695-706.
76. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet.* 2003;4:784-93.
77. Lee JH, Park SR, Chay KO, Seo YW ve ark. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer Research* 2004;64/15:4235-4243
78. Lee JH, Cho ES, Kim MY, Seo YW ve ark. Suppression of progression and metastasis of established colon tumors in mice by intravenous delivery of short interfering RNA targeting KITENIN, a metastasis-enhancing protein. *Cancer Res* 2005;65(19):8993-9003
79. Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:41-64
80. Friedl P, Wolf K. Tumor cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev Cancer* 2003;3:362-374
81. Cramer LP. Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 1999;65:173-205

82. Hynes RO. Integrins: bidirectional allosteric signalling machines. *Cell* 2002;110:673-687
83. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999;68:459-486
84. Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 2001;276:4527-4530
85. Somlyo AV, Phelps C, Dipierro C, Eto M ve ark. Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and the growth of human prostate cancer xenotransplants. *FASEB J* 2003;17:223-234
86. Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind: differential $\alpha\beta3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behaviour. *J Cell Biol* 2001;155:1319-1332
87. Sameni M, Moin k, Sloane BF. Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia* 2001;2:496-504
88. Maekawa K, Sato H, Furukawa M, Yoshizaki T. Inhibition of cervical lymph node metastasis by marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model. *Clin Exp Metas* 2002;19:513-518
89. Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 2001;20:755-766
90. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Rev Cancer* 2002;2:442-454
91. Davidson LA, Keller RE. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* 1999;126:4547-4556
92. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MV ve ark. Matrix metalloproteinases regulate neovasculation by acting as pericellular fibrinolysis. *Cell* 1998;95:365-377
93. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH ve ark. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 2003;101:1810-1817
94. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K ve ark. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-ameboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160:267-277
95. Jacques TS ve ark. Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins. *Development* 98;125:3167-3177

96. El Fahime E, Torrente Y, Caron NJ, Bresolin MD ve ark. In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res* 2000;258:279-287
97. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS ve ark. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:233-246
98. McManus MT, Conklin DS, shRNA-mediated silencing of mammalian gene expression, In: Hannon GJ, ed. *RNAi a guide to gene silencing*, New York: CSHL Pres, 2003;109-127
99. Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action. *Apoptosis* 2000;5:107-114
100. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
101. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A ve ark. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498
102. McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE ve ark. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T-lymphocytes. *J Immunol* 2002;169:5754-5760
103. Stein P, Svodoba P, Anger M, schultz RM. RNAi: Mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* 2003;9:187-192
104. Chuang CF, Meyerowitz EM. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4985-4890
105. Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 2000;18:896-898
106. Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA ve ark. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000;407:319-320
107. Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A ve ark. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 2000;24:180-183
108. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
109. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J ve ark. Gene silencing using micro RNA designed hairpins. *RNA* 2002;8:842-850

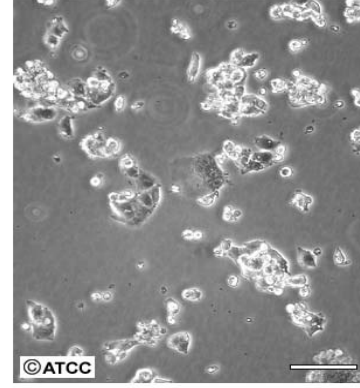
110. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ ve ark. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948-958
111. Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:6047-6052
112. Yu JY, Taylor J, DeRuiter SL, Vojtek AB ve ark. Simultaneous inhibition of GSK3alpha and GSK3beta using hairpin siRNA expression vectors. *Mol Ther* 2003;7:228-236
113. www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html
114. Sambrook J and Russell DW, eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, third edition. New York: CSHL Pres, 2001; 1.112—1.115
115. Sambrook J and Russell DW, eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, third edition. New York: CSHL Pres, 2001; 1.38-1.42
116. Sambrook J and Russell DW, eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, third edition. New York: CSHL Pres, 2001; 1.32—1.34
117. Sambrook J and Russell DW, eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, third edition. New York: CSHL Pres, 2001; 1.59—1.61
118. Muller T, Bain G, Wang X, Papkoff J. Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. *Exp Cell Res*. 2002;1:119-133
119. Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R ve ark. Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res*. 2004;64:2734-2739
120. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5:367-377.
121. Strutt DI, Weber U, Mlodzik M. The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*. 1997;387:292-295.
122. Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A ve ark. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*. 2001;105:81-91

123. Tada M, Concha ML, Heisenberg CP. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 ;13:251-260
124. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 1998;12:2610-2622
125. Yan D, Wallingford JB, Sun TQ, Nelson AM ve ark. Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:3802-3807.
126. Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR ve ark. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* 2003;161:769-777
127. Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci.* 2001;114:4143-4151.
128. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol.* 2001;155:1103-1107
129. Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal.* 2003;15:559-64.
130. Tarrant JM, Robb L, van Spriel AB, Wright MD. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* 2003;24:610-617
131. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:20121-20127.
132. Jang HI, Lee H. A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Exp Mol Med.* 2003;35:317-323

Ek 1 Hücre Dizilerinin Özellikleri (ATCC'den özetlenerek uyarlanmıştır)
(www.atcc.org)

Hep G2

Biyogüvenlik düzeyi:	1	Sağlayıcı:	Wistar Ensitüsü
Organizma:	<i>Homo sapiens</i>	Morfoloji:	Epitelial



Kaynak: **Organ:** Karaciğer
Hastalık: Hepatosellüler karsinom

Hüresel Ürünler: alpha-fetoprotein ; albumin; alpha2 macroglobulin; alpha1 antitrypsin; transferrin; alpha1 antichymotrypsin; haptoglobin; ceruloplasmin; plasminogen; complement (C4); C3 activator; fibrinogen; alpha1 acid glycoprotein; alpha2 HS glycoprotein; beta lipoprotein; retinol binding protein

Uygulamalar	Transfeksiyona uygun
Reseptörleri	insülin; insülin-benzeri büyüme faktörü II (IGF II)
Tümör oluşturma	İmmunitesi baskılanmış farede tümör oluşumu yok
DNA Profili (STR)	Amelogenin: X,Y CSF1PO: 10,11 D13S317: 9,13 D16S539: 12,13 D5S818: 11,12 D7S820: 10 F13A01: 5,7 F13B: 6,10 FESFPS: 11 LPL: 10,11 THO1: 9 TPOX: 8,9 vWA: 17
Sitogenetik Analiz:	Modal kromozom sayısı = 55 (aralık = 50 - 60)
Yaş:	15 yaşında ergen

Cinsiyet:	Erkek
İrk:	Beyaz
Yorumlar:	Hepatit B virus genomuna rastlanmamış

Hep 3B

Biyogüvenlik Düzeyi: 2 [Hücreler HEPATIT B içermekte] Sağlayıcı: Wistar Enstitüsü

Büyüme özellikleri: Yapışarak

Organizma: *Homo sapiens* Morfoloji: Epitelial

Köken: **Organ:** Karaciğer
Hastalık: Hepatosellüler Karsinom

HücreSEL ürünler: alpha fetoprotein; hepatitis B surface antigen (HBsAg); albumin; alpha2 macroglobulin; alpha1 antitrypsin; transferrin; alpha1 antichymotrypsin; haptoglobin; ceruloplasmin; plasminogen; complement (C3, C4); C3 activator; fibrinogen; alpha1 acid glycoprotein; alpha2 HS glycoprotein; beta lipoprotein; retinol binding protein; Gc globulin

Tümör oluşumu: İmmün baskılanmış farede tümör oluşturur

DNA Profili (STRler):
Amelogenin: X
CSF1PO: 8
D13S317: 12,14
D16S539: 10
D5S818: 13
D7S820: 8,10
THO1: 6,7
TPOX: 9
vWA: 17

Sitogenetik Analiz: Modal kromozom sayısı = 60

Yaş: 8 yaşında çocuk

Cinsiyet: Erkek

İrk: Siyah

Yorumlar: Hücre dizisi entegre hepatit B virus genomu içermekte.

SK-HEP-1

Biyogüvenlik 1
Düzeyi:

Sağlayıcı: G Trempe
LJ Old

Büyüme Özellikleri: Yapışarak

Organizma: *Homo sapiens*

Morfoloji: Epitelial

Köken: **Organ:** Karaciğer
Doku: Assid
Hastalık: Adenokarsinom
İzolasyon yılı: 1971

Tümör Oluşumu:	İmmün baskılanmış farede geniş hücreli karsinom oluşturur (hepatoma)
DNA Profili (STRler):	Amelogenin: X CSF1PO: 11,12 D13S317: 8,12 D16S539: 12 D5S818: 10,13 D7S820: 8,11 THO1: 7,9 TPOX: 9 vWA: 14,17
Sitogenetik Analiz:	Hücre dizisi, hipotriploid düzeyde kromozom sayılarına sahip anöloid (XX) hücrelere sahiptir. Sekiz adet marker kromozom tanımlanmıştır: del(1)(q21), der(1)t(1;2)(p36;q21), ?dic(1;12)(p36;q24), ampl.t(4pter-->4q11::HSR::4q12--->4q24::HSR?:4q26--->4q35::2q15--->2pter), 13p+, 13p++, 14p+, t(14q15q), iso(14q), 19q+, del(3)(p14p24), 15p+.
Yaş:	52 yaşında
Cinsiyet:	Erkek
İrk:	Beyaz
Yorumlar:	Endotel orijinli olduğu bildirilmiştir.

SW480

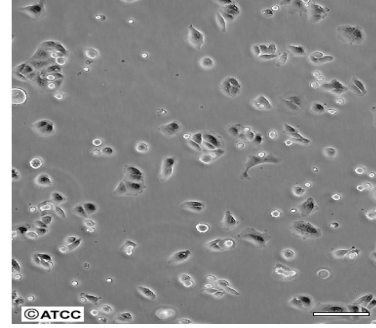
Biyogüvenlik 1
Düzeyi:

Sağlayıcı: A Leibovitz

Büyüme Özellikleri: Yapışarak

Organizma: *Homo sapiens*

Morfoloji: Epitelial



Köken: **Organ:** Kolon
Hastalık: Kolorektal adenokarsinom
Tümör Evresi: Dukes' tip B

Hücresel Ürünler: Karsinoembriyonik Antijen (CEA); keratin; TGF-beta

Uygulamalar: Transfeksiyon konağı

Reseptörü: Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Viral enfeksiyon: Human immunodeficiency virus 1 şüphesi

Tümör Oluşumu: İmmün baskılanmış farede tümör oluşturur

Onkogen: myc +; myb + ; ras +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -

Antijen Ekspresyonu: HLA A2, B8, B17; kan grubu A; Rh+

DNA Profili (STRler):
Amelogenin: X
CSF1PO: 13,14
D13S317: 12
D16S539: 13
D5S818: 13
D7S820: 8
THO1: 8
TPOX: 11
vWA: 16

Yaş: 50 yaşında

Cinsiyet: Erkek

İrk: Beyaz

K-562

Biyogüvenlik 1
Düzeyi:

Sağlayıcı: HT Holden

Büyüme Süspansiyon
özellikleri:

Organizma: *Homo sapiens*

Morfoloji: lenfoblast

Köken: **Organ:** Kemik iliği
Hastalık: Kronik miyelositik lösemi (KML)

Uygulamalar: Transfeksiyon konağı

Tümör oluşumu: İmmün baskılanmış farede tümör oluşturur

Antijen Ekspresyonu: CD7 (%25)

DNA Profili (STRler):
Amelogenin: X
CSF1PO: 9,10
D13S317: 8
D16S539: 11,12
D5S818: 11,12
D7S820: 9,11
THO1: 9.3
TPOX: 8,9
vWA: 16

Yaş: 53 yaşında

Cinsiyet: Dişi

HL-60

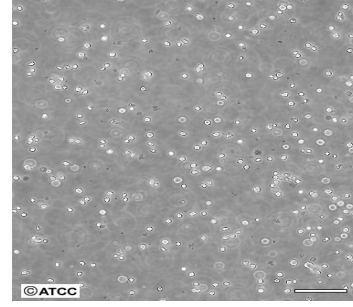
Biyogüvenlik 1
Düzeyi:

Sağlayıcı: RC Gallo

Üreme Süspansiyon
Özellikleri:

Organizma: *Homo sapiens*

Morfoloji: Miyeloblastik



Köken: **Organ:** Periferik kan
Hastalık: Akut promiyelositik lösemi

Hücresel Ürünler: Forbol mristik asitle uyarı sonrası tumor necrosis factor alpha (TNF)

Uygulamalar: Transfeksiyon konağı

Reseptörleri: Kompleman
Fc

Tümör oluşumu: İmmün baskılanmış farede tümör oluşturur
(ciltaltı miyeloid tümör)

Onkogen ekspresyonu: myc +

DNA Profili (STRler):
Amelogenin: X
CSF1PO: 13,14
D13S317: 8,11
D16S539: 11
D5S818: 12
D7S820: 11,12
THO1: 7,8
TPOX: 8,11
vWA: 16

Yaş: 36 yaşında

Cinsiyet: Dişi

Irk: Beyaz

Ek 2. Hücre Kültürü Protokolleri

2.1 Hücrelerin Pasajlanması

Sayısal değerler 25cm² lik flask içerisinde üretilen hücreler esas alınarak verilmiştir.

1. Kültür kabı içerisinde bulunan kültür ortamı uzaklaştırıldı ve 3mL PBS ile tamponu ile hücreler yıkandı.
2. Hücrelerin üzerine 1.5 mL soğuk (+4 °C) Trypsin solüsyonu (Biological Industries 03-054-1B) eklendi ve 37 °C'da 5-7 dakika bekletildikten sonra tutundukları yüzeyden ayrılmaları sağlandı.
3. 3 mL serumlu ortam eklenerek trypsin inaktivasyonu gerçekleştirildi.
4. Pipetaj işlemiyle hücreler süspansiyon haline getirildi.
5. Hücre süspansiyonu steril tüpe aktarılarak 1250 rpm'de beş dakika santrifüj (Hettich Universal) edildi.
6. Süpernatant uzaklaştırılıp, hücre çökeltisi yavaşça kaldırıldı ve üzerine taze ortam eklendi.
7. Hücre süspansiyonu belli oranlarda bölünerek kültür kaplarına aktarıldı.

2.2 Hücrelerin Dondurulması

1. 'Hücrelerin Pasajlanması' protokolünün, beşinci basamağındaki santrifüjasyon işleminden sonra elde edilen hücre çökeltisi yavaş hareketlerle vurularak kaldırıldı ve üzerine 1 mL %7.5 FBS içeren dimetil sülfoksit (DMSO) (sigma ...) eklendi.
2. Hücreler süspansiyon halinde edildikten sonra dondurma tüplerine aktarıldı ve tüp üzerine hücre tipi, pasaj numarası, tarih bilgileri yazıldı.
3. Tüpler 37°C ısıtılmış ve -1°C soğuma sağlayan buz kutusu (Nalgene 5100-0001) içerisine konularak -80 °C dondurucuya (Sanyo Ultra Low Temperature Freezer, MDF-43086SBT) yerleştirildi.
4. Bir gün sonra örnekler hücre dizileri saklama kutusuna yerleştirildi ve yerleşim pozisyonu, kutu numarası kaydedildi.

2.3 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

1. -80°C dondurucudan alınan hücreler 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda (Grant LT D6G) hızla çözüldü.
2. Hücre süspansiyonu üzerine 6 mL serumlu ortam eklenerek pipetaj yapıldı.
3. 1250 rpm'de beş dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra çökelti yavaşça kaldırıldı.
5. Çökelti üzerine ortam eklenerek hücreler süspansiyonda edildi ve kültür kabı içerisine aktarıldı.
6. Faz kontrast mikroskopunda incelenen hücreler inkübatöre kaldırıldı.

2.4 Hücrelerin Sayımı

1. Hücre süspansiyonundan 0.2 mL alınıp üzerine 0.4 mL PBS ve 0.4 mL tripan mavisi (Biochrom AG, L6323) eklendi.
2. Karışım vortekslendi.
3. Hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak Thoma lamı (Neubauer, ILDAM) üzerine akatıldı
4. Işık mikroskopunda 10X'lik büyütme altında iki sayım alanındaki toplam hücre sayısının ortalaması alındı.
5. Hücre sayısının belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Hücre sayısı} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 10^4$$

2.5 Canlı Hücre Sayımı

Ölü hücrelerin boyayı alıp mikroskop altında mavi renkli görünmelerini esas alan tripan mavisi boyama yöntemi kullanılarak 'Hücre Sayımı' protokolü uygulandı.

Ek 3. Kullanılan Solüsyonlar

- **10X TBE**
108 g TRIS baz (0.04 M)
55 g borik asit
40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
1 L'ye distile su ile tamamlanır.
- **5 M EDTA**
186.1 g disodyum EDTA (2 sulu) 1L'ye distile su ile tamalandı. pH 10 M NaOH ile 8.0'a ayarlanır.
- **3M Na Asetat**
408.1 g Na asetat 1 L dH₂O ile çözüldü, pH 5.2 'ye glasiyel asetik asitle ayarlanır.
- **10 mg/mL EtBr**
100 mg EtBr çeker ocak içerisinde tartılarak, 10 mL dH₂O'da çözülür.
- **%10 Amonyum Persulfat**
1 g amonyum persulfat 1 mL'ye dH₂O ile tamamlanır.
- **Sıvı LB Ortamı**
10 g Tripton
5 g maya ekstresi
10 g NaCl
950 mL dH₂O ile çözüldü. pH'sı 5N NaOH ile 7.0'a ayarlanıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak otoklavlanır.
- **SOB Ortamı**
20 g tripton
5 g maya ekstresi
0.5 g NaCl
950 mL dH₂O ile çözüldü. 250 mM KCl çözeltisinden 10 mL eklendi. Çözelti pH'sı 5N NaOH ile 7.0'a ayarlanıp toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak otoklavlanır.
Kullanmadan hemen önce 5 mL 2M MgCl₂ eklenir.
- **SOC Ortamı**
SOB ortamı ile aynı şekilde hazırlanır ek olarak 20 mM Glukoz içerir. SOB ortamı otoklavlandıktan sonra 60°C'ye soğutulur. 20 mL steril 1M glukoz çözeltisi eklenir.
- **LB Agar**
LB hazırlandıktan sonra otoklavlanmadan önce 15 g/L olacak şekilde agar agar eklenir.
- **STE**
10 mM Tris-Cl (pH 8.0),
0.1 M NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

- **Alkaleli Lizis Solüsyonu I**

50 mM Glukoz
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

- **Alkaleli Lizis Solüsyonu II**

0.2 N NaOH (10 N stoktan taze hazırlanır)
%1 (w/v) SDS

- **Alkaleli Lizis Solüsyonu III**

5 M K asetat, 60.0 mL
Glasiyal asetik asit, 11.5 mL
H₂O, 28.5 mL

- **%20 SDS**

200 g SDS
900 mL H₂O'da 68°C'ye ısıtılarak çözülür. pH'sı HCl ile 7.2'ye ayarlanır. Hacim 1L'ye tamamlanır.

- **TE**

100 mM Tris-Cl
10 mM EDTA (pH 8.0)

- **1M Tris-Cl**

121.1 g Tris-baz
800 mL suda çözülür. pH'sı HCl ile istenilen değere ayarlandıktan sonra hacim 1 L'ye tamamlanır.

- **5M LiCl**

21.2 g LiCl
100 mL H₂O'da çözülür.

- **PEG-MgCl₂**

40 g PEG8000
100 mL 30 mM MgCl₂ içerisinde çözülür. 0.22 µm'lik filtreden geçirilir.

- **PBS (pH 7.4)**

0.2 g KCl
0.2 g KH₂PO₄
8 g NaCl
1.15 g Na₂HPO₄
dH₂O ile 1L'ye tamamlanır.

- **TBS-T**

10 mM Tris-Cl (pH 7.2)
%0.9 NaCl
%0.5 (v/v) Tween®20

- **Lizis Tamponu**
10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
%1 NP40
%4 25X Complete ®
- **10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu**
10 g SDS
30.3 g Tris-Cl (pH 8.0)
144.1 g Glisin
dH₂O ile 1L'ye tamamlanır
- **Towbin Transfer Tamponu**
6.05 g Tris-baz
28.8 g Glisin
400 mL Metanol
4 mL %10 SDS
dH₂O ile 1L'ye tamamlanır

Ek 4. Inoue yöntemi ile kompetan bakteri elde edilmesi¹¹⁴ ve Maksipreparasyon.

Inoue Yöntemi¹¹⁴:

1. 37°C'da, 16–20 saat süreyle inkübe edilmiş, LB agar içeren petri kabından tek bir bakteri kolonisi alınarak 250 mL Erlen-Mayer içerisinde bulunan 25 mL LB bakteri kültür ortamına ekim yapıldı. Bakteri kültürü orbital karıştırıcıda (Gallenkamp 10X400), 37°C'de, 150 devir/dakika 6-8 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresi sonunda üç adet 1 L hacimli Erlen-Mayer başlangıç kültüründen inokülasyon yapıldı. Erlen-Mayerler içerisinde 250 mL SOB() ortamı bulunmaktaydı. Birinci Erlen-Mayer başlangıç kültüründen 10 mL, ikinci Erlen-Mayer 4 mL, üçüncüsüne ise 2 mL eklendi. Kültürler 18°C'de bir gece karıştırılarak inkübe edildi.
3. Ertesi sabah bakteri kültürlerinin 600nm dalga boyundaki optik dansiteleri (OD₆₀₀) değerlendirildi. Kültürlerden birinin OD₆₀₀'i 0.55'e ulaştınca inkübasyon sona erdirildi ve kültür kabı buzlu su banyosuna alınarak 10 dakika bekletildi. Diğer iki kültür kabı atıldı.
4. Hücreler santrifüj tüpüne alındı ve +4°C'de ve 2500g'de, 10 dakika santrifüj edildi (Sorvall RC3C Plus).
5. Ortam uzaklaştırıldı ve tüp kurutma kâğıdı üzerinde birkaç dakika ters şekilde tutularak tüm sıvının uzaklaşması sağlandı.
6. Hücreler 80 mL soğuk Inoue transformasyon tamponu ile yeniden süspande edildi.
7. +4°C'de ve 2500 g'de 10 dakika santrifügasyon yapıldı.
8. Ortam uzaklaştırıldı ve tüp kurutma kâğıdı üzerinde birkaç dakika ters şekilde tutularak tüm sıvının uzaklaşması sağlandı.
9. Hücreler 20 mL soğuk Inoue transformasyon tamponu ile yeniden süspande edildi.
10. 1.5 mL steril DMSO (Sigma D2650) eklendi, tüp sallanarak karıştırıldı ve 10 dakika buzda bekletildi.
11. Hücreler, dondurma tüplerine küçük miktarlarda dağıtılarak sıvı azotta donduruldu ve -80°C'ta saklandı.

Elde edilen kompetan *E. coli* hücreleri kontrol plazmidi olan pSV-β-gal plazmidi (Promega E108) ile transforme edildi. Transformasyon için aşağıdaki yöntem kullanıldı:

1. Stoktan alınan kompetan *E. coli* hücreleri (200 µL) buz üzerinde çözüldü.
2. Önceden soğutulmuş 15 mL santrifüj tüplerine 100µL/tüp olacak şekilde hücreler bölündü. Tüplerden biri transformasyon için deney tüpü, diğeri kontrol tüpü olarak işaretlendi.
3. pSV-β-gal plazmid DNA'sından 9 µg alınarak tüpe eklendi. Tüp hafifçe karıştırıldı.
4. Hücreler 30 dakika buzda bekletildi.
5. 42°C su banyosunda 45 saniye ısı şoku uygulandı.
6. İki dakika buzda bekletildi.
7. 900 µL oda sıcaklığında SOC eklendi.
8. Orbital karıştırıcıda 37°C sıcaklıkta 225 devir/dakika hızda bir saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresinin sonunda tepkimenin hacmi SOC ortamıyla 1:100 seyreltildi. Bu seyreltilmiş hacimden 100 µL alınarak 1 mg ampisilin içeren LB agarlı petri kaplarına ekim yapıldı. Petri kapları bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
10. Ertesi sabah koloniler değerlendirildi ve transformasyon etkinliği hesaplandı.

$$\text{Transformasyon etkinliği (CFU/µg)} = \frac{\text{Kontrol petrisindeki CFU}}{\text{Transformasyonda kullanılan DNA miktarı}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \text{seyreltme faktörü}$$

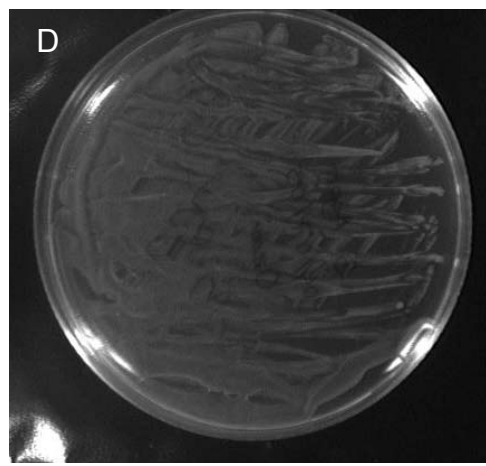
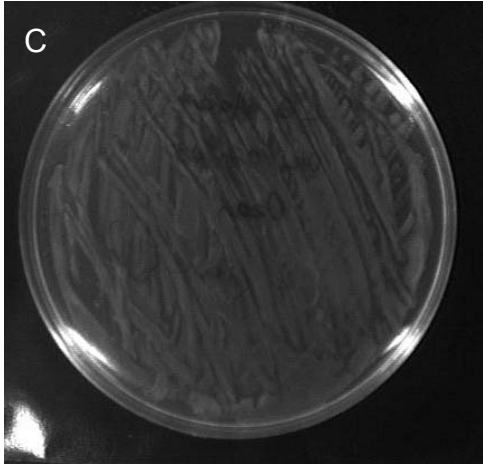
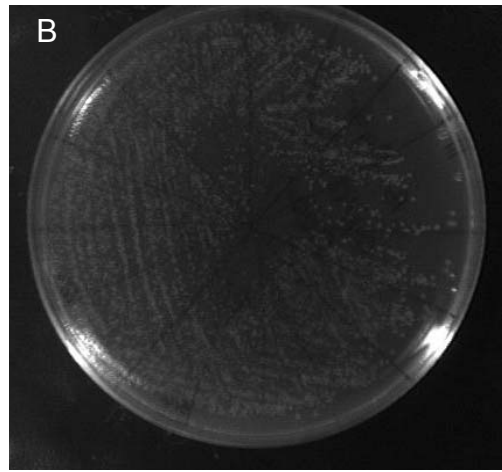
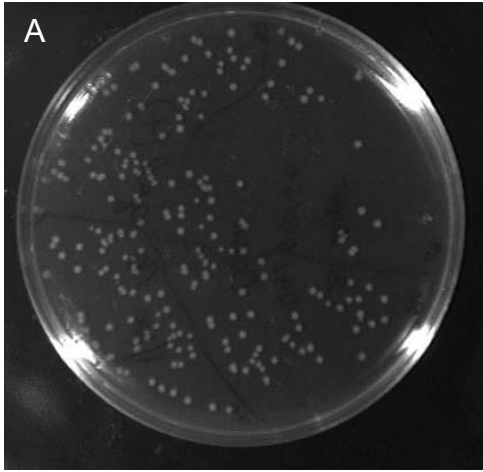
CFU: Koloni oluşturan birim

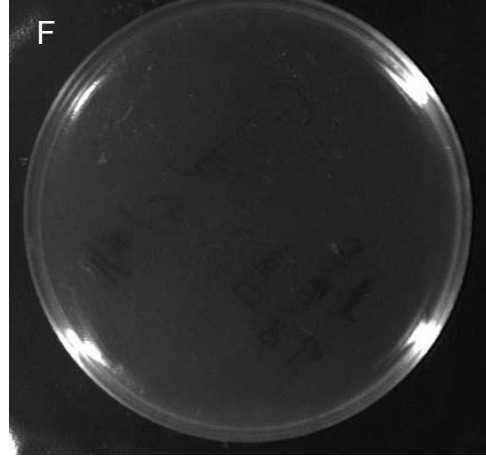
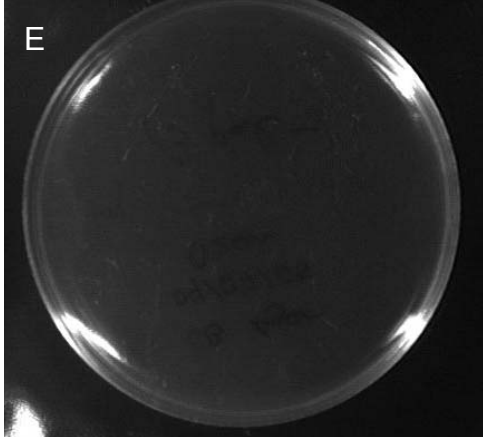
Tablo : pSV-β-Gal plazmidi ile transforme edilen kompetan *E.coli* bakterilerinin transformasyon değerleri.

Petri kabı	Üreme var/yok	Toplam koloni sayısı
1:100 pSV-β-gal (+), amp (+)	Var	236
pSV-β-gal (+), amp (+)	Var	1719 (4 alan)
1:100 pSV-β-gal (-), amp (+)	Yok	-

pSV-β-gal (-), amp (+)	Yok	-
pSV-β-gal (+), amp (-)	Var	Sayılmayacak
pSV-β-gal (-), amp (-)	Var	Sayılmayacak

Transformasyon sonrası kompetan bakterilerin transformasyon etkinliği = 25×10^6 CFU/μg olarak hesaplandı.





Şekil : Kompetan *E.coli* bakterilerinin pSV-β-Gal plazmidi ile transformasyonu sonrası kültür sonuçları:

- A: pSV-β-gal (+), ampisilin (+) 1:100 seyreltme
- B: pSV-β-gal (+), ampisilin (+) seyretme yok
- C: pSV-β-gal (-), amp (-) seyreltme yok
- D: pSV-β-gal (+), amp (-) seyreltme yok
- E: pSV-β-gal (-), ampisilin (+) seyreltme yok
- F: pSV-β-gal (-), ampisilin (+) 1:100 seyreltme

Maksipreparasyon

Aşağıdaki protokol kullanılarak transforme *E. coli* bakterilerinden pSV-β-gal plazmid izolasyonu yapıldı¹¹⁵:

1. 100 µg/mL ampisilin içeren 30 mL LB sıvı besi yerine, ampisilinli agarda üretilmiş transforme *E. coli* kolonilerinden bir adet alınarak inoküle edildi. Kültür, bakteriler geç log fazına ulaşıncaya kadar (OD₆₀₀: 0.6) 37°Cde 150 devir/dakika hızda çalkalanarak inkübe edildi.
2. İki litrelik Erlen Mayer içerisine 100 µg/mL ampisilin içeren 500 mL LB sıvı besi yeri konuldu ve başlangıç kültüründen 25 mL eklendi. Kültür, 37°Cde 150 devir/dakika hızda çalkalanarak bir gece inkübe edildi.
3. Kültürden 2 mL ayrılarak mikrotüpe alındı ve +4°C'ye kaldırıldı. Kültürün kalanı santrifüj tüpüne alınarak 2700 g'de ve +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp ağzı açık olarak baş aşağı tutuldu; tüm sıvının uzaklaşması sağlandı.

4. Bakteri çökeltisi 200 mL soğuk STE solüsyonu ile tekrar karıştırıldı ve bir önceki basamakta tarif edildiği şekilde santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra çökelti -20°C'ye kaldırıldı.
5. Minipreparasyon yöntemi kullanılarak daha önce ayrılmış olan 2 mL örnekten plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmide EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesim uygulanarak %1 agaroz jelde doğru plazmidin izole edilmediği kontrol edildi. Protokole bu sonuca göre devam edildi.
6. -20°C'deki çökelti 5–10 dakika beklenerek oda sıcaklığına getirildi ve 18 mL Alkalen Lizis Solüsyonu I ile karıştırıldı.
7. Taze hazırlanmış Alkalen Lizis Solüsyonu II'den 40 mL eklendi. Tüp birkaç kez karıştırıldı. 5–10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8. Soğuk Alkalen Lizis Solüsyonu III'ten 20 mL eklendi, karıştırıldı ve 10 dakika buzda bekletildi.
9. 20 000 g'de ve +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi (Sorvall RC3C Plus). Süpernatant bir ölçü kabına alındı ve üzerine 0.6 katı kadar izopropanol eklenerek yeni bir santrifüj tüpüne alındı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Çökelti atıldı.
10. Tüp 12 000 g'de ve oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj (Sorvall RC5C Plus) edilerek nükleik asitler çöktürüldü.
11. Süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti ve tüpün duvarları %70 etanol ile yıkandı. Tüp birkaç dakika baş aşağı tutularak tüm sıvı uzaklaştırıldı.
12. Çökelti 3 mL pH 8.0 TE tamponu ile çözüldü.
13. Polietilen glikol (PEG) kullanılarak DNA saflaştırıldı.
14. Restriksiyon enzim kesimi ve agaroz jel elektroforezi ile plazmid kontrol edildi.

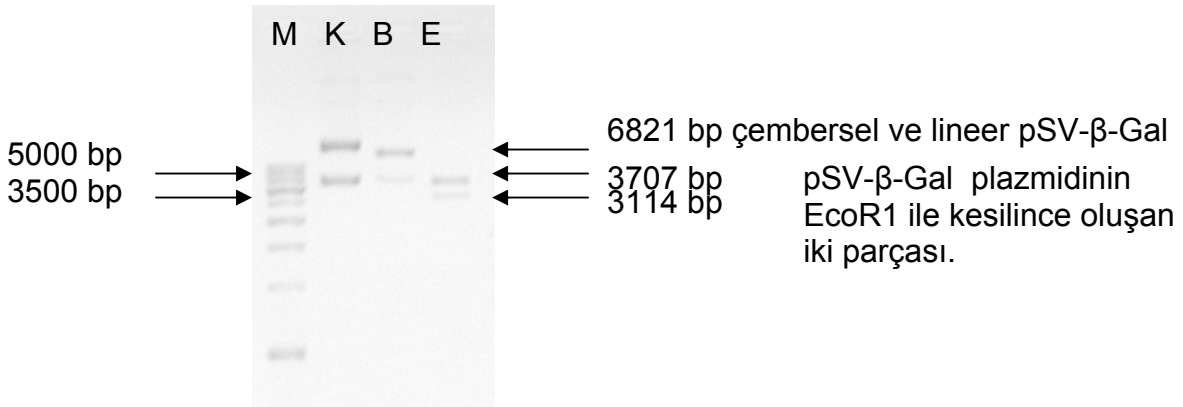
Minipreparasyon: ¹¹⁶

1. Bakteri kültüründen 1.5 mL alındı ve +4 °C'de maksimum hızda (Eppendorf 5415 R) 30 saniye santrifüj edildi. Ortam uzaklaştırıldı.
2. Bakteri çökeltisi 100 µL soğuk Alkalen Lizis Solüsyonu I ile karıştırıldı.

3. Taze hazırlanmış Alkalin Lizis Solüsyonu II'den 200 µL eklendi. Tüp karıştırıldı ve buz üzerine alındı.
4. Soğuk Alkalin Lizis Solüsyonu III'ten 150 µL eklendi. Tüp karıştırıldı ve buz üzerinde beş dakika bekletildi.
5. +4 °C'de, maksimum hızda beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı.
6. Eşit hacimde fenol:kloroform eklendi ve vortekslendi. +4 °C'de, maksimum hızda iki dakika santrifüj edildi. Sıvı üst kısım yeni bir tüpe alındı.
7. Oda sıcaklığındaki etanolden iki kısım eklenerek nükleik asitler çöktürüldü. Solüsyon vortekslendi ve oda sıcaklığında iki dakika bekletildi.
8. +4 °C'de, maksimum hızda beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp kağıt havlu üzerinde iyice kurutuldu.
9. 1 mL %70 etanol eklendi ve tüp iyice karıştırıldı. +4 °C'de, maksimum hızda iki dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Tüp, tamamen kuruyana dek kağıt havlu üzerinde, oda sıcaklığında tutuldu.
11. Nükleik asitler 50 µL TE tamponuyla (pH 8.0) çözüldü.
12. Restriksiyon enzim kesimi ve agaroz jel elektroforezi ile plazmid kontrol edildi.

Minipreparasyon sonucu elde edilen pSV-β-gal plazmid DNA'sının absorbanans değerleri ve restriksiyon enzim kesimi sonrası jel görüntüsü aşağıda gösterilmiştir:

<u>A₂₆₀</u>	<u>A₂₈₀</u>	<u>Oran</u>	<u>Konsantrasyon</u>
0.258	0.111	2.32	12.90 µg/mL



Şekil : Elde edilen pSV-β-Gal plazmid DNA'sının restriksiyon enzimi kesim sonuçları. (M: Marker, K: Kontrol, B: BamHI, E: EcoRI)

Bu sonuçlara göre plazmid izolasyonunun düzgün bir şekilde yapıldığı düşünüldü ve maksipreparasyona devam edildi. Sorunsuz uygulanan protokol sonrası PEG ile DNA saflaştırılmasına geçildi.

Plazmid DNA'sının PEG ile çöktürülerek saflaştırılması: ¹¹⁷

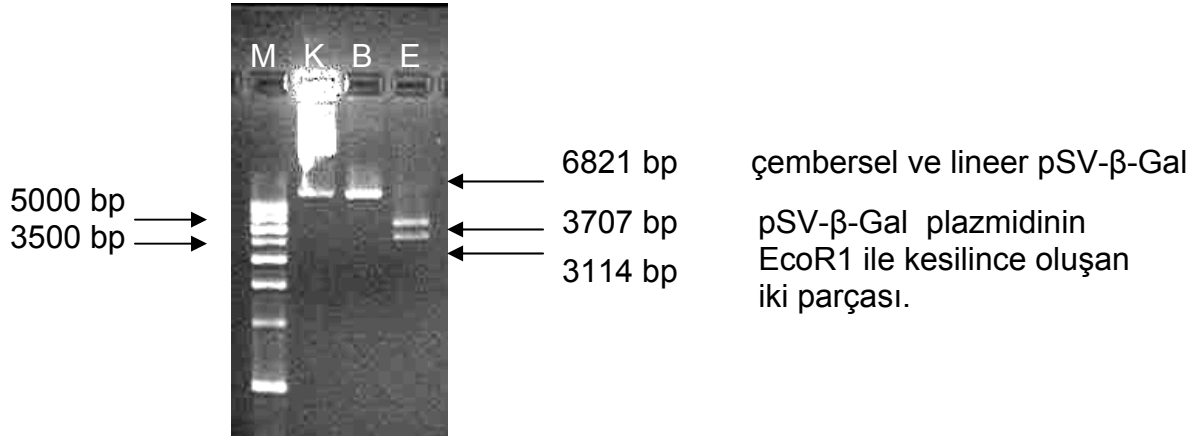
1. Maksipreparasyon ile elde edilen plazmid DNA'sı 15 mL'lik Corex tüpe alındı ve buz banyosunda 0°C'ye soğutuldu.
2. Soğuk 5M LiCl solüsyonundan 3 mL eklendi. İyice karıştırıldı ve +4°C'de ve 12 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi (Sorvall RC 5C Plus).
3. Süpernatant 30 mL'lik Corex tüpe alındı ve eşit hacimde izopropanol eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 12 000 g'de ve oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek (Sorvall RC 5C Plus) nükleik asitler çöktürüldü.
4. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Çökelti ve tüpün duvarları oda sıcaklığındaki %70 etanol ile yıkandı. Tüp ters çevrilerek kurutuldu.
5. Çökelti RNaz A içeren 500 µL pH 8.0 TE tampon ile çözüldü, mikrotüpe alındı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
6. Bir kez fenol:kloroform ile bir kez de kloroform ile plazmid-RNaz karışımı saflaştırıldı.
7. DNA standart etanol çöktürme yöntemiyle elde edildi.
8. Plazmid DNA'sı 1 mL steril dH₂O'da çözüldü ve üzerine 0.5 mL PEG-MgCl₂ çözeltisi eklendi.
9. Solüsyon 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında maksimum hızda 20 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5415 R).
10. Çökelti 0.5 mL %70 etanol ile çözüldü. Beş dakika maksimum hızda santrifüj edildi (Eppendorf 5415 R).
11. Etanol uzaklaştırıldı ve 10. basamak tekrar edildi. Bu yıkamadan sonra tüp 20 dakika kapağı açık olarak tezgah üzerinde bekletilerek tüm etanolün buharlaşması sağlandı.

12.Çökelti 500 µL pH 8.0 TE tamponu ile çözüldü. 1:100 seyreltmede absorbansları ölçüldü.

Maksipreparasyon sonrası elde edilen pSV-β-Gal plazmid DNA'sının spektrofotometrik ölçüm değerleri:

<u>A₂₆₀</u>	<u>A₂₈₀</u>	<u>Oran</u>	<u>Konsantrasyon</u>
0.021	0.012	1.750	105 µg/mL

Elde edilen pSV-β-gal plazmid DNA'sına BamHI ve EcoRI restriksiyon enzim kesimi uygulanarak, %1 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.



Şekil : Maksipreparasyon ile elde edilen pSV-β-Gal plazmid DNA'sının restriksiyon enzimi kesim sonuçları. (**M**: Marker (Hyperladder III), **K**: Kontrol, **B**: Bam HI, **E**: EcoRI)

Ek 5. Transfeksiyon sonrası seçilen Hep G2 kolonilerinden elde edilen RNA'ların absorbands değerleri.

No	Örnek	A260	A280	Oran	Konsantrasyon (ug/mL)
pSiV1					
1 nolu kültür					
kabı					
1	A1	0,069	0,029	2,38	276
2	A2	0,127	0,053	2,40	508
3	A3	0,095	0,039	2,44	380
4	A4	0,122	0,050	2,44	488
5	A5	0,086	0,035	2,46	344
6	A6	0,095	0,040	2,38	380
7	B1	0,086	0,036	2,39	344
8	B2	0,121	0,059	2,05	484
9	B3	0,074	0,032	2,31	296
10	B4	0,067	0,028	2,39	268
11	B5	0,079	0,033	2,39	316
12	B6	0,088	0,036	2,44	352
13	C1	0,093	0,039	2,38	372
14	C2	0,109	0,046	2,37	436
15	C3	0,112	0,046	2,43	448
16	C5	0,113	0,046	2,46	452
17	C6	0,130	0,054	2,41	520
18	D1	0,133	0,070	1,90	532
19	D2	0,093	0,040	2,33	372
pSiV1					
2 nolu kültür					
kabı					
20	A1	0,062	0,025	2,48	248
21	A2	0,083	0,033	2,52	332
22	A3	0,106	0,042	2,52	424

23	A4	0,203	0,084	2,42	812
24	A5	0,045	0,017	2,65	180
25	A6	0,087	0,035	2,49	348
26	B1	0,066	0,027	2,44	264
27	B2	0,100	0,056	1,79	400
28	B3	0,072	0,030	2,40	288
29	B5	0,063	0,027	2,33	252
30	B6	0,090	0,046	1,96	360
31	C1	0,105	0,043	2,44	420
32	C2	0,098	0,041	2,39	392
pSil (-)					
(boş vektör)					
33	A1	0,132	0,057	2,32	528
34	A2	0,100	0,044	2,27	400
35	A3	0,267	0,109	2,45	1068
36	B2	0,113	0,047	2,40	452
37	B3	0,103	0,044	2,34	412
38	B4	0,062	0,024	2,58	248
39	B5	0,090	0,040	2,25	360
40	C1	0,127	0,054	2,35	508
41	C2	0,107	0,045	2,38	428
42	C3	0,068	0,028	2,43	272
43	C4	0,053	0,022	2,41	212
44	C5	0,095	0,039	2,44	380
45	D1	0,103	0,044	2,34	412
46	D2	0,090	0,037	2,43	360
47	D3	0,074	0,031	2,39	296
pSil (+)					
GAPDH					
siRNA					
48	A1	0,895	0,39	2,29	1074
49	A2	0,931	0,375	2,48	1117
50	A3	0,455	0,18	2,53	728

51	A4	0,96	0,394	2,44	1152
52	A5	0,748	0,303	2,47	898
53	B1	0,611	0,2584	2,36	733
54	B2	0,871	0,358	2,43	1045
55	B3	0,947	0,383	2,47	1136
56	B5	0,851	0,344	2,47	1021
57	B6	0,77	0,306	2,52	924

Ek 6. pSilencerGAPDH ile HepG2 Hücrelerinde Gliseraldehid 3-fosfat Dehidrogenaz Geninin Sessizleştirilmesinin RT-PCR ile Gösterilmesi

pSilencer 4.1 vektörünün doğru çalıştığına gösterilmesi için pozitif kontrol olarak pSilencer 4.1 vektörünün içeriğinde bulunan Gliseraldehid 3-fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) siRNA kalıbı ile pSilencer 4.1 vektörü bağlandı ve maksipreparasyonla çoğaltıldı. Elde edilen plazmidle HepG2 hücreleri Tfx™50 reaktifi kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücreler 1000 µg/mL G418 içeren DMEM komple hücre kültürü ortamında, 19 gün süre ile inkübe edildi ve bu sürenin sonunda transfekte hücrelerin oluşturduğu 10 adet koloni klonlama diskleri kullanılarak toplandı. Toplanan koloniler önce 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına her bir kuyucuğa bir koloni olacak şekilde alındı ve yeterli yoğunluğa (%70) ulaştıkça sırasıyla 12 ve 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına son olarak da 10 cm çaplı hücre kültürü kabına pasajlanarak çoğaltıldı.

10 cm çaplı hücre kültürü kabında çoğalan hücreler ikiye bölündü yarısından total RNA izolasyonu yapılmak üzere hücre kültürü sürdürülürken diğer yarısı saklanmak üzere donduruldu.

Hücrelerden RNA izolasyonu Macherey Nagel marka NucleoSpin®RNA II total RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Üretici firmanın önerdiği protokol kullanıldı. Elde edilen RNA'ların absorbans değerleri Ek 5'te görülebilir (tablonun pSil(+)) kısmı, 48-57 numaralı koloniler). İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi Fermentas marka RevertAid™ First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapıldı. Sentez sırasında üretici firmanın önerdiği protokol izlendi. Sentez sonrası elde edilen cDNA ile RT-PCR reaksiyonu kurularak kolonilerin GAPDH ekspresyon durumları analiz edildi.

Tüm yöntemler ve kullanılan sarf malzemeleri Gereç-Yöntem kısmında bulunabilir.

RT PCR'da kullanılan primerler:

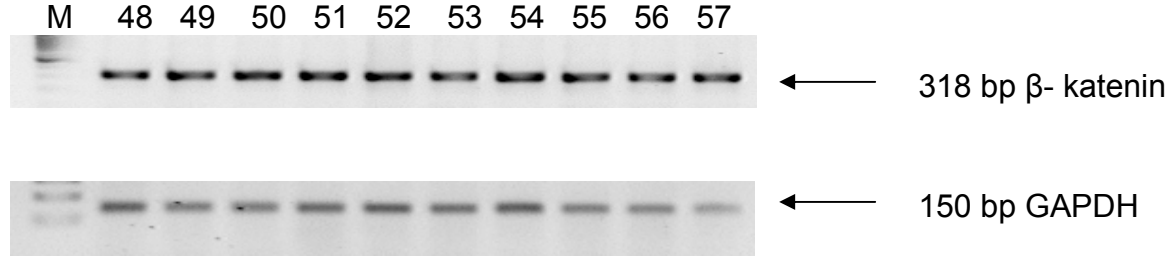
GAPDH-F	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT
GAPDH-R	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA

Tablo 15: GAPDH siRNA'sı ile transfekte edilen HepG2 kolonilerinin GAPDH RT-PCR profili.

Reaksiyon Karışımı		Son Konsantrasyon	Sıcaklık Profili	
dNTP	0.5 µL	1X	95°C	5 dak
MgCl	1.5 µL	3mM	95°C	30 sn
10X Tampon	2.5 µL	5mM	56°C	30 sn
Primer R	0.5 µL	5pmol	72°C	30 sn
Primer F	0.5 µL	5pmol	72°C	10 dak
cDNA	2.0 µL			
Taq Polimeraz	0.5 µL	2.5 ünite		
Su	16 µL			

Ürün büyüklüğü: 150 bp

RT-PCR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünleri, %2 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Sonuçta 50, 55, 56 ve 57 numaralı kolonilerde hücrelerin GAPDH ekspresyonlarının baskılandığı gözlemlendi ve pSilencer 4.1 vektörünün çalıştığı saptandı.



Şekil 34: Elde edilen kolonilerin β- katenin (A) ve GAPDH (B) ekspresyonu durumları.