

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROFORETİK HAREKETLİLİK KAYMA
YÖNTEMİ İLE TRANSKRİPSİYON FAKTÖR-
PROMOTÖR ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

CEYDA ÇALIŞKAN

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİMDALİ
YÜKSEKLİSANS TEZİ**

İZMİR - 2011

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008940069

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROFORETİK HAREKETLİLİK KAYMA
YÖNTEMİ İLE TRANSKRİPSİYON FAKTÖR-
PROMOTÖR ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİMDALİ
YÜKSEKLİSANS TEZİ

CEYDA ÇALIŞKAN

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

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008940069

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji ve Genetik** Anabilim Dalı, **Yüksek Lisans** öğrencisi **Ceyda Çalışkan**, **Elektroforetik Hareketlilik Kayma Yöntemi ile Transkripsiyon Faktör-Promotör Etkileşiminin Belirlenmesi** konulu Yüksek Lisans tezini **21-06-2011** tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

DOÇ. DR. HAKKI OGÜN SERCAN



ÜYE

DOÇ. DR. KEMAL KORKMAZ



ÜYE

YRD. DOÇ. DR. ÇİĞDEM ERESEN
YAZICIOĞLU



ÜYE

PROF. DR. GÜLGÜN OKTAY

ÜYE

DOÇ. DR. SEFA KIZILDAĞ

İÇİNDEKİLER	Sayfa Numarası
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1 Araştırmanın tipi.....	32
3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı.....	32
3.3 Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	33
3.4 Çalışma materyali.....	33
3.5 Araştırmanın değişkenleri.....	33
3.6 Veri toplama araçları.....	33
3.7 Araştırma planı.....	51
3.8 Verilerin değerlendirilmesi.....	51
3.9 Araştırmanın sınırlılıkları.....	52
3.10 Etik kurul onayı.....	53
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR.....	73
8. EKLER.....

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo.1 Hücre hattından nükleer lizat eldesi için çalışma tamponu hazırlanması, Tampon A.....	34
Tablo.2 Hücre hattından nükleer lizat eldesi için çalışma tamponu hazırlanması, Tampon C.....	35
Tablo.3 Çalışma tamponuna eklenen proteaz inhibitörleri.....	35
Tablo.4 Protein ölçümü için standart ve örneklerin hazırlanması.....	37
Tablo.5 Standart ve örneklerin spektrofotometre ölçümü ile elde edilen absorbans değerleri.....	37
Tablo.6 Biotinle işaretlemeye kullanılacak oligonükleotidlere ait DNA dizileri.....	42
Tablo.7 Tek iplik oligonükleotidlerin biotinle işaretleme reaksiyon içeriği.....	43
Tablo.8 Biotinle işaretlenmiş tek iplik oligonükleotidlerin bir araya getirilmesi için kullanılan ısı profili.....	44
Tablo.9 10 ml hacminde %6'lık denatüre edici olmayan jel hazırlanması.....	46
Tablo.10 Kontrol-EBNA sistemi için bağlanma reaksiyonu.....	48
Tablo.11 Test sistemi için bağlanma reaksiyonları.....	49
Tablo.12 Araştırma zaman çizelgesi.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil.1 DNA'nın nükleotid yapısı.....	4
Şekil.2 DNA'nın moleküler yapısı.....	5
Şekil.3 Transkripsiyon kompleksinin oluşumu.....	7
Şekil.4. Tipik bir gene özgül transkripsiyon faktörünün yapısı.....	8
Şekil.5. a) Kendi kendini düzenleme motifi b) Tek girdi motifi c) Geri besleme halkası d) Çoklu bileşen halkası e) Çoklu bileşen halkası f) Düzenleyici zincir motifi.....	10
Şekil.6. a) Sarmal döngü sarmal motifi ile DNA'ya bağlanan dimerik protein b) Sarmal döngü sarmal motifi detayı.....	11
Şekil.7. a) Cys ₂ His ₂ tipi çinko parmak motifi b) Üç çinko parmak motifi ile DNA bağlanma.....	12
Şekil.8. Lösin fermuar bağlanma motifi.....	12
Şekil.9. a) Sarmal ilmek sarmal motifi detayı b) Sarmal ilmek sarmal bağlanma motifi.....	13
Şekil.10. Sp/XKLF transkripsiyon faktörlerinin filogenetik ağacı.....	14
Şekil.11. Memeli Sp/XKLF ailesi üyelerinin çinko parmak domainlerinin protein dizisi uyuşması.....	14
Şekil.12. Sp1 geninde posttranslasyonel modifikasyonlar.....	15
Şekil.13. a) Sp1transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivite ve DNA-bağlanma bölgesi aktivitesi, b) Sp1'in çinko parmak bağlanma motifini içeren primer ve sekonder yapısı.....	16
Şekil.14. KLF proteininin şematik gösterimi.....	18
Şekil.15. a) Egr-1 çinko parmak bağlanma motifi b) Egr-1 çinko parmak bağlanma dizisi.....	19
Şekil.16. Egr-1 transkripsiyon faktörünün modüler yapısı.....	19
Şekil.17. EMSA yönteminin şematik gösterimi.....	22
Şekil.18. (a) Wnt/ β -katenin yolağı, (b) Wnt/Kalsiyum yolağı, (c)Wnt/Jun-Amino terminal kinaz(JNK) yolağı.....	26
Şekil.19. β -Katenin bağımsız yolakta Fz/ PCP çekirdek bileşenleri arasındaki etkileşimler.....	29

Şekil.20 Genomatix matinspector programıyla Fz4, Fz5, Fz7 ve Wnt5b promotörlerine ortak bağlanan GSTF'lerin gösterimi.....	31
Şekil.21 Tez çalışması akış şeması.....	32
Şekil.22 Kontrol sisteminin EBNA özütü ve biotin işaretli EBNA DNA'sı ile test edilmesi (%6'lık Denatüre edici olmayan jelde 100V'da 75 dakika).....	54
Şekil.23 %6'lık denature edici olmayan jelde işaretlenmemiş, çift iplik Sp1, Egr-1, KLF'nin yürütülmesi.....	55
Şekil.24 Saf Sp1 proteinin, Sp1 DNA'sı ile inkübe edilmesi (%6'lık jel, 100V, 1 saat).....	56
Şekil.25 Bağlanma reaksiyonunun saf Sp1 proteininin ve biotin-Sp1 DNA'nın iki katı konsantrasyonda, MgCl ₂ 'süz kurulması. (%6'lık jel, 100 V, 1 saat).....	56
Şekil.26 KCl ve EDTA varlığında/yokluğunda biotin-Sp1 DNA ve saf Sp1 proteinini içeren bağlanma reaksiyonunun kurulması (%6'lık jel, 100 V, 1 saat).....	57
Şekil.27 MgCl ₂ varlığında ve yokluğunda saf Sp1 proteini ve Biotin-Sp1 DNA ile bağlanma reaksiyonu kurulması (%8'lik jel, 60 V, 2 saat).....	58
Şekil.28 Biotin işaretli Sp1 oligonükleotidinin saf Egr-1 ve saf Sp1 proteini ile inkübe edilmesi (%6'lık jel, 100 V, 1 saat).....	59
Şekil.29 Tek iplik biotinle işaretli 50 fmol Sp1 DNA'nın yürütülmesi (%8'lik jel,100 V, 1 saat).....	60
Şekil.30 Sp1 için, PolydI/dC içermeyen bağlanma reaksiyonu kurulması, süper shift denemesi (%8'lik jel, 60 V, 2 saat).....	61
Şekil.31 Sp1 oligonükleotidi ile kurulan bağlanma reaksiyonlarının %4'lük gliserolsüz jelde yürütülmesi (%4'lük jel, 60 V, 96 dakika).....	62
Şekil.32 PolydI/dC varlığında ve yokluğunda bağlanma reaksiyonu kurulması (%8'lik jel, +4C'de 100V-40 dakika, 120 V-30 dakika).....	62
Şekil.33 Sp1 DNA'nın EBNA özütü ile muamele edilmesi (%8'lik jel, +4C'de 100V 90 dakika).....	63

Şekil.34 Egr-1 proteini ile Sp1 DNA'sının inkübe edilmesi (%8'lik jel, +4C'de, 100 V-2saat).....	64
Şekil.35 K562 hücre hattından elde edilen nükleer lizat ile Sp1 proteini için Western blot kurulması.....	64
Şekil.36 Nükleer lizat ve Sp1 oligonükleotidi ile bağlanma reaksiyonu hazırlanması.....	65
Şekil.37 Sp1 DNA+nükleer lizat ile antikorun inkübe edilmesi.....	66
Şekil.38 Mutant Sp1 DNA ile nükleer lizattan bağlanma reaksiyonu kurulması).....	66
Şekil.39 Nükleer lizat ile farklı konsantrasyonlarda mutant Sp1 ve normal Sp1 oligonükleotidlerinin inkübe edilmesi.....	67
Şekil.40 Nükleer lizat ile Egr-1 ve KLFS proteinin inkübe edilmesi.....	67

KISALTMALAR

EMSA: Elektroforetik hareketlilik kayma yöntemi

Fzd: Frizzled

TCF/LEF: T hücre spesifik transkripsiyon faktör / lenfoid enhancer bağlayıcı faktör (T cell factor / lymphoid enhancer factor)

LRP: Düşük Dansiteli Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein (Low-density lipoprotein receptor-related protein)

APC: Adenomatöz polipozis koli (Adenomatous Polypsis Coli)

GSK3 β : Glikojen sentaz kinaz 3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β)

EMSA: Elektroforetik hareketlilik kayma yöntemi (Electrophoretic mobility shift assay)

Sp1: Spesifite proteini (Specificity protein)

Egr-1: Erken büyüme cevap elementi-1 (Early growth response element-1)

KLFS: Krüppel benzeri faktör (Krüppel like factor)

CTD: Karboksi Terminal Domain (Carboxy terminal domain)

PBS: Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline)

rpm: Bir dakikadaki devir sayısı (Rotation per Minute)

TBE: Tris-Borik asit-EDTA (Tris-Boric asit-EDTA)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

FBS: Föetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)

APS: Amonyum Persülfat (Ammonium Persulfate)

pmol: Piko mol

fmol: Femto mol

EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antigen

aa: Aminoasit

SDS: Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodesyl sulfate)

TBST: Tris buffered saline/Tween 20

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

b.ç: Baz çifti (Base pair)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde laboratuvar olanaklarını sunarak bu konudaki deneyim ve bilgilerini bana aktarıp tez çalışmamın başarıyla sonuçlanmasını sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Hakkı Ogün Sercan'a, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı bünyesinde bulunan ve çok değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, bu süreci beraber geçirdiğim, manevi desteklerini, bilgi paylaşımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma, en iyi eğitim olanaklarını bana sunan, manevi desteğini asla eksik etmeyen babama, anneme ve ablama teşekkür ederim.

Ceyda Çalışkan

ELEKTROFORETİK HAREKETLİLİK KAYMA YÖNTEMİ İLE TRANSKRİPSİYON FAKTÖR-PROMOTÖR ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

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

ÖZET

DNA’da var olan bilginin kullanımı ve düzenlenmesi proteinler ile ilişki içerisindedir. DNA’ya bağlanan proteinler organizmada transkripsiyon, paketlenme, DNA tıpkı yapım (replikasyon) ve DNA onarımı gibi süreçlerin her basamağında önemli role sahiptir. Protein-DNA arasında kurulan bağın doğasını anlamak, genetik işleyişi çözmek açısından büyük öneme sahiptir.

DNA-protein etkileşiminin tanımlanmasında DNaseI footprinting, nitroselüloz filtreleme, ChIP yöntemleri uygulanmaktadır. Elektroforetik hareketlilik kayma yöntemi (Electrophoretic mobility shift assay/EMSA) protein-nükleik asit etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. EMSA radyoaktif temelli bir yöntem olmakla birlikte, radyoaktif olmayan işaretleme yöntemleriyle de kullanılabilir.

Tez çalışmasında, DNA-protein ilişkisinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntem olan EMSA’yı laboratuvar koşullarımızda radyoaktif olmayan işaretleme ile optimize etmeyi amaçladık. Wnt5b, Fzd4, Fzd5 ve Fzd7 genleri çalışmamızda model olarak kullanıldı. Bu genlere ait promotör bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörleri biyoinformatik yöntemlerle belirlendi. Dört gene de, ortak bağlandığı hipopetik olarak gösterilen üç transkripsiyon faktörü ile çalışıldı. Bunlar; “genomatix genom çözümlene yazılımı” kullanılarak belirlenen Sp1, Egr-1, KLFS transkripsiyon faktörleridir.

Yapılan çalışmalar sonrasında radyoaktif olmayan EMSA yöntemi, laboratuvar koşullarında optimize edilmiştir. EMSA’nın ileriki çalışmalar için bir araç olarak kullanılması planlanmaktadır.

Anahtar Sözcük: EMSA, protein-DNA etkileşimi, Sp1 transkripsiyon faktörü

DETERMINING TRANSCRIPTION FACTOR-PROMOTER INTERACTION BY ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY

ABSTRACT

The organization and use of information on the DNA molecules is closely related with protein binding. DNA binding proteins have important roles in all steps of DNA packaging, transcription, replication and repair. Understanding the nature of DNA-protein interactions are important for analyzing genetic processes.

DNaseI foot printing, nitrocellulose filter binding and ChIP methods are used for direct detection of DNA-protein interactions. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) is a fast and sensitive method for determination of nucleic acids-DNA interactions. Although EMSA is a radioactive method, it can also be used with non-radioactive labeling.

In our work, we tried to optimize a non-radioactive based EMSA method in our laboratory. Wnt5b, Fzd4, Fzd5 and Fzd7 gene promoters were used in our work. The transcription factors which bind to promoter regions of these genes were determined with bioinformatics methods. We worked with three transcription factors which bind to all of the four gene promoters. These are the Sp1, Egr-1 and KLF transcription factors which were determined by Genomatics genome analyzing software.

We optimized the non-radioactive EMSA method for our laboratory and we plan to use this method for our future projects to explore DNA-Protein interactions.

Key Words: EMSA, protein-DNA interaction, Sp1 transcription factor

1.GİRİŞ VE AMAC

Birçok nükleer mekanizma özgül DNA-protein etkileşimlerini içerir. Transkripsiyon faktör-DNA etkileşiminin açığa çıkarılması, transkripsiyonel kontrol için hangi regülatörlerin gerekli olduğu ve gene özgül transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel regülasyonu nasıl organize ettiğinin anlaşılması açısından önemlidir. Protein-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde Elektroforetik hareketlilik kayma yöntemi (Electrophoretic mobility shift assay/EMSA) efektif olarak kullanılmaktadır. EMSA, bir diğer protein-DNA etkileşimini belirleyici yöntem olan DNaseI footprinting yöntemine göre uygulama açısından kolaylık sağlamaktadır. Az miktarda malzeme, düşük konsantrasyonda protein ve DNA ile özgül olarak etkileşimleri belirlemek mümkündür. EMSA, proteinlerin bağlanma motiflerinin ve bağlanma koşullarının farklılığı, kofaktör ihtiyacı göstermesi gibi sebeplerden ötürü her protein-DNA etkileşimi için ayrı ayrı optimizasyon yapılmasını gerektirmektedir.

Wnt yolağı, son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı, çeşitli hastalık ve gelişim modellerinde hücre çoğalması, farklılaşma ve kutuplaşmayı düzenlediği belirlenen bir sinyal iletim yolağıdır.

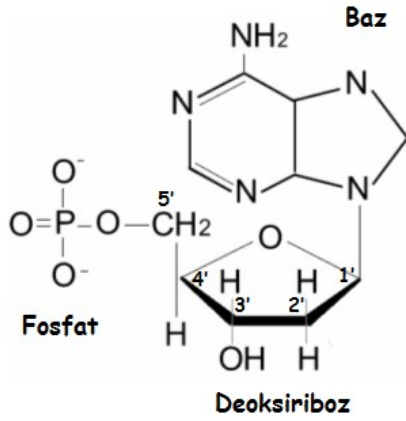
Wnt sinyal ileti yolağı ve apoptoz arasındaki ilişkinin açıklanmasına yönelik yapılan çalışmalarda, bu yolda yer alan bazı proteinlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (TUBİTAK yayınlanmamış veri). Ancak belirtilen Wnt proteinleri ile etkileşim kurarak ekspresyon düzeyini artıran transkripsiyon faktörleri hala bir araştırma konusudur. Ekspresyon düzeyi arttığı belirlenmiş proteinlerden birisi de Wnt5b'dir. Hangi yolak yada yolakların Wnt5b ekspresyonunu uyardığı araştırmaya devam edilen bir konudur. Bu konu kapsamında Wnt5b'nin promotor bölgesi ile ilişkili özel transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması önemlidir. Önerilen tez projesinde, EMSA yöntemi kullanılarak hipotetik olarak tanımlanmış (farklı veri bankaları ve programlar aracılığıyla) transkripsiyon faktörlerinden Sp1, Egr1 ve Klf5'in Wnt5b promotörüne bağlanıp bağlanmadığının test edilmesi amaçlanmaktadır.

EMSA'da bütün proteinlerin bağlanmalarını belirlemek için çalışan tek bir protokol bulunmamaktadır. Aday gene özgül transkripsiyon faktörleri: Sp1, Egr-1, Klf5'in hedef oligonükleotidlere bağlanma koşullarının EMSA kullanılarak tek tek optimize edilmesi planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 DNA Yapısı ve Paketlenme

DNA'nın kimyasal yapısı temel olarak, beş karbonlu şeker, fosfat ve nükleik asit bazlarından oluşur. DNA'daki şekerin, ikinci karbon atomuna bağlı tek bir hidrojen atomu olduğu için deoksiriboz olarak adlandırılır. Nükleik asit bazları, şekerin birinci karbon atomuna glikozidik bağla bağlanır. Şeker ve nükleik asit bazından oluşan bu yapıya nükleozid denir. Nükleozidin yapısındaki şekerin beşinci karbon atomuna, fosfodiester bağıyla bir fosfat eklenince, şeker, fosfat ve nükleik asit bazından oluşan bu yeni yapı, nükleotid olarak adlandırılır (**Şekil.1**) (1).

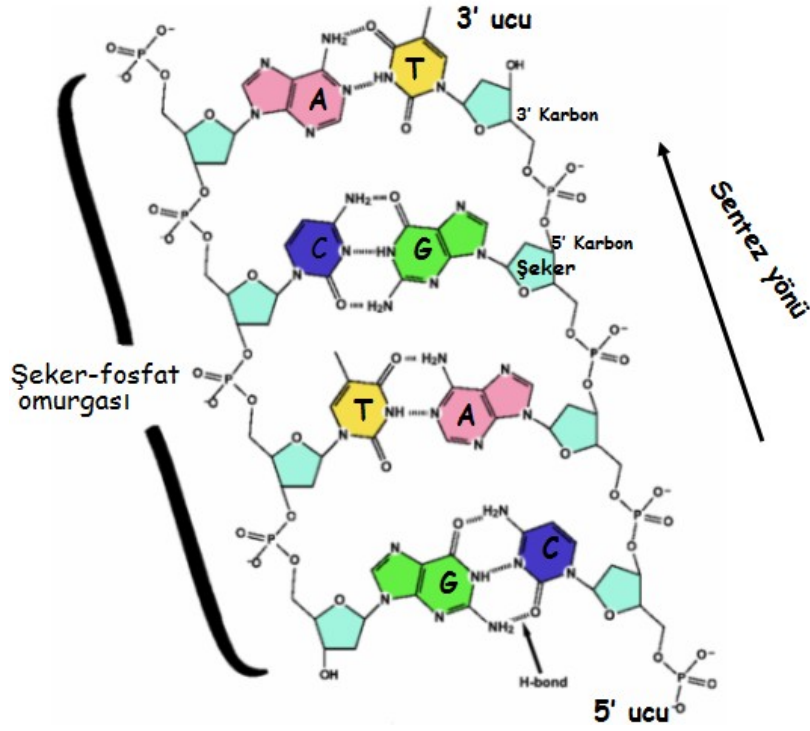


Şekil.1 DNA'nın nükleotid yapısı (2)

DNA'da bulunan nükleik asit bazları, aromatik heterosiklik bileşik yapısındaki çift halkalı iki pürin [adenin (A:Adenine), guanin (G:Guanine)] ve tek halkalı 2 pirimidinden [timin (T:Thymine), sitozin (C:Cytosine)] oluşur. Adenin daima timinle, guanin ise daima sitozin ile eşleşir (3).

DNA, sarmal şekilde düzenlenmiş, iki polinükleotid zincirden oluşur. İplikler birbirine anti paraleldir. İki nükleotid, nükleik asit bazları arasında kurulan hidrojen bağlarıyla bir arada tutulur. G-C arasında üç hidrojen bağı kurulurken, A-T arasında iki hidrojen bağı kurulur (1).

Fosfodiester bağı bir deoksiribozun 5' ucunu, ona komşu diğer şekerin 3' ucuna bağlar. Bu nedenle ipliğin sentezi 5'-3' yönünde sağlanabilir (**Şekil.2**) (1).



Şekil.2 DNA'nın moleküler yapısı (4)

Paketlenmemiş DNA, hücrede kararsızdır ve DNA'yı parçalayan nükleazlara karşı savunmasızdır. Paketlenmiş DNA, daha kararlı bir yapı oluşturur. Ökaryot hücrelerin DNA'sı, bu DNA'yı çekirdek içinde düzenli şekilde paketleyen bazik proteinlere (histonlara) sıkıca bağlıdır (1,5). Beş tip histon tanımlanmıştır: H1, H2A, H2B, H3, H4. DNA, histon proteinleriyle paketlenir. Bu yapıya nükleozom denir. Nükleozom yapısında H2A, H2B, H3, H4 histonlarının iki kopyası bulunur. 147 baz çifti uzunluğundaki DNA sekiz histon proteinin etrafını çevrelemektedir. Histon proteinlerinin amino kuyrukları nükleozom yapısının dışına doğru uzanır. Histonlar, amino kuyruklarından çeşitli modifikasyonlara uğrar. Histonların kimyasal yapısında, modifikasyonlar yoluyla gerçekleşen değişiklikler, nükleozomun dinamik yapıda olmasını sağlar (1,6).

2.2 Ökaryotik Gen Regülasyonu

DNA'da kodlanmış genetik bilginin işlevsel olabilmesi için RNA'ya transkribe edilmesi (yazılması) gerekir. Kalıtımın fonksiyonel ve fiziksel birimi gen olarak adlandırılır. Genler, proteinler ve RNA için bilgiyi barındırır. Biyolojik süreçlerin genelinde birçok proteinin iş birliğine dayanan bir kontrol ve düzenlenme söz konusudur. Transkripsiyon işleminde DNA kalıbından bir genin transkribe edilmesi RNA polimeraz adı verilen enzim ve

özelleşmiş proteinlerin varlığı ile gerçekleşir. Transkripsiyon sürecinde başlangıç (inisiyasyon), uzama (elongasyon), sonlanım (terminasyon) olarak devam eden seri işlemlerle RNA sentezi gerçekleşir (6).

Transkripsiyonun başlaması için RNA polimerazın promotör olarak adlandırılan DNA dizisi ile etkileşmesi gerekmektedir. Promotör bölge transkripsiyon başlama bölgesinin yukarı yönünde bulunur. Bu bölge türler arasında korunmuş özel DNA dizileri barındırır (6).

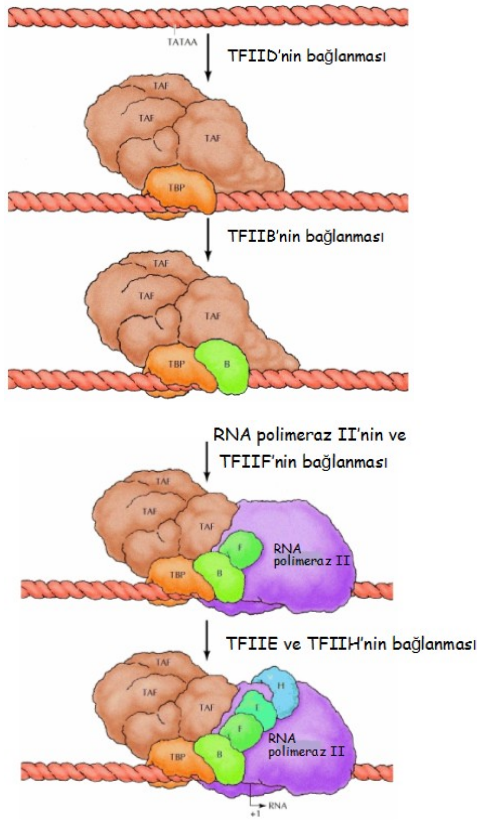
Ökaryotlarda transkripsiyonda rol alan üç tip RNA polimeraz vardır, mRNA'ların sentezinden RNA polimeraz II soruludur. Ökaryotlarda RNA polimeraz, transkripsiyonu başlatabilmek için pek çok proteine gereksinim duymaktadır. Bu proteinler genel (bazal) transkripsiyon faktörleri ve gene özgül transkripsiyon faktörleri olmak üzere ikiye ayrılır. Genel transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonun başlaması ve ilerlemesinden sorumludur. TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH genel transkripsiyon faktörleridir. Gene özgül transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyon kontrolünden sorumlu proteinler olarak gruplandırılmıştır.

RNA polimeraz II'nin promotör bölgeye bağlanmasında, pek çok ökaryotta korunmuş TATA kutusu olarak adlandırılan TATAAA dizisinin varlığı önemlidir. TATA kutusu transkripsiyon başlama noktasının 25 ile 30 nükleotid yukarısında bulunur (6). TATA kutusu, transkripsiyonun başlamasında önemli olan TATA bağlayan protein (TATA binding protein/TBP) için bağlanma bölgesini oluşturur. Bu bölge ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş olmakla beraber, TATA kutusu barındırmayan gen promotörleri de bulunmaktadır (7). Bu tip genlerde promotör bölge ile ilişkili üç DNA elementi daha bulunmaktadır. Bunlar TFIIB tanıma bölgesi (BRE), inisiyatör (inr), downstream promotör eleman (DPE)'dir (7).

2.2.1 Genel (Bazal) Transkripsiyon Faktörleri (GTF:General transcription factors)

Genel transkripsiyon faktörleri (GTF), RNA polimeraz II'nin promotöre özgül olarak bağlanması için gereklidir. GTF belirli bir sırayla promotor bölgeye bağlanarak, RNA polimeraz II'nin promotör bölgeye bağlanması sağlanmış olur. Promotör bölgede, GTF ve RNA polimeraz II'den oluşan bu yapı, ön başlangıç (pre-inisiyasyon) kompleksi olarak adlandırılır. Ön başlangıç kompleksinin oluşumundaki ilk basamak TFIID'nin TATA kutusuna bağlanmasıdır. TFIID çok sayıda alt birimden oluşur. TFIID'nin TATA kutusuna bağlanan birimi TATA'ya bağlanan protein (TBP:TATA Binding Protein), kompleksteki diğer alt birimler TBP ilişkili faktörler (TAF:TATA Associated Factor) olarak tanımlanmıştır. TBP-DNA kompleksi diğer GTF'lerin ve RNA polimeraz II'nin bu bölgeye

toplanması için uygun konfigürasyonu sağlar. TFIID'nin bağlanmasını TFIIB'nin eklenmesi izler. TFIIB, RNA polimeraz II'nin TFIIF ile birlikte TBP-TFIIB kompleksine bağlanmasını sağlar. RNA polimeraz II promotöre katıldıktan sonra TFIIE ile TFIIH sırayla komplekse katılır. TFIIH'nin alt bileşenleri üç enzimatik aktiviteye sahiptir; DNA-bağımlı ATPaz, ATP-bağımlı helikaz, karboksil kuyruk domain (CTD:Carboxyl tail domain) kinaz. TFIIH'nin, insanda, XPB/ERCC3 ve XPD/ERCC2 olarak adlandırılan iki alt birimi helikaz aktivitesine sahiptir. Promotör bölgedeki DNA çift ipliğinin açılması enerji gerektirir ve bu TFIIH'nin helikaz aktivitesi ile gerçekleşir. RNA polimeraz II'nin büyük alt birimi kuyruk olarak uzayan CTD'ye sahiptir. TFIIH'nin sahip olduğu CTD kinaz aktivitesi, RNA polimerazın CTD'ini fosforillemesiyle RNA polimeraz II başlangıç kompleksinden kurtulur ve transkripsiyon süreci başlamış olur (Şekil.3) (5-7).



Şekil.3 Transkripsiyon kompleksinin oluşumu (6)

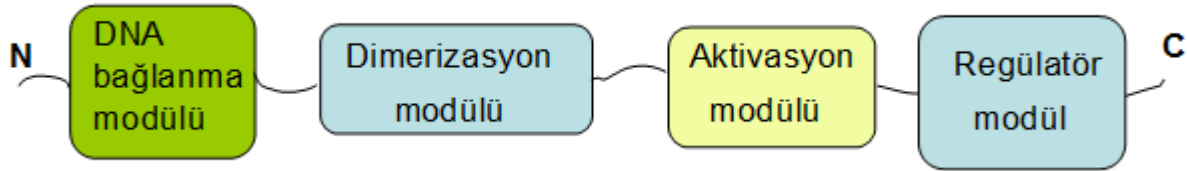
2.2.2 Gene Özgül Transkripsiyon Faktörleri (GSTF:Gene specific transcription factor)

Ökaryotlarda binlerce protein kodlayan gen bulunmaktadır. Transkribe edilen genlerin miktar ve kompozisyonu hücre döngüsü, hücre tipi, fizyolojik ve çevresel etkilere yanıt olarak değişim göstermektedir (8). Bu genlerin her birisinin özgül transkripsiyonel kontrol programı

bulunmaktadır. Bu programların özgülüğü, hedef genlerin promotör bölgesine ve düzenleyici dizilerine (güçlendirici, sessizleştirici) bağlanan gen özgül transkripsiyon faktörleriyle sağlanır. Gen özgül transkripsiyon faktörleri, genetik bilgi ile transkripsiyon sistemi arasındaki ara birim gibi işlev gösterir (9).

2.2.3 Gene özgül transkripsiyon faktörlerinin özellikleri

Gene özgül transkripsiyon faktörleri (GSTF:Gene specific transcription factors) modüller şeklinde organize olmuştur. Tipik bir GSTF, en az bir tane aktivasyon ve/veya represyon modülü ile DNA bağlanma modülünden oluşur. Buna ek olarak birçok GSTF, homo- veya heterodimer şeklinde düzenlenir. Bu düzenlenim dimerizasyon modülü tarafından sağlanır. Bazı transkripsiyon faktörleri yardımcı bir molekülün bağlanması ile aktivitesinin düzenlenmesini sağlayan regülatör modüle de sahiptir (**Şekil.4**) (9).



Şekil.4. Tipik bir gene özgül transkripsiyon faktörünün yapısı (9)

GSTF'lerin, DNA ile özgül etkileşim kurmasını sağlayan çeşitli DNA bağlanma motifleri tanımlanmıştır. Tanımlanmış ilk DNA bağlanma modülü, sarmal-döngü-sarmal (Helix turn helix) motifine sahiptir. Daha sonraki çalışmalar ile çinko parmak (Zinc finger), homeodomain, lösün fermuar (Leucine zipper), sarmal ilmek sarmal gibi (Helix loop helix) DNA bağlanma motifleri de bulunmuştur. GSTF'ler DNA'ya daha çok majör oluktan bağlanırlar. Çünkü DNA bazları majör olukta, kendilerini GSTF aminoasitlerine daha iyi sunarlar (5). Minör olukta hidrojen bağı vericileri ve alıcıları daha az değişkendir. Majör olukta DNA bazlarının tanınmasında en sık kullanılan protein yapısal elementi alfa sarmal yapılarıdır. Alfa sarmal yapı, DNA iskeletine paralel konumdaki eksenyle majör oluğa girdiğinde, maksimum sayıda DNA bazıyla etkileşim kurabilir. Bazların tanınması için bir protein kodu yoktur. Protein yan zincirlerinin esnek oluşu, protein katlanmasının çeşitliliği, protein yüzeyini DNA'nın belirli dizilerine kimyasal olarak uyumlu hale getirir (10). Aktivasyon modülü çoğu proteinde 3 tip aminoasit bakımından zengindir; (i) Asidik aktivasyon domaini, (ii), Glutamin zengin domainler, (iii) Prolince zengin bölgeler. Bu durum

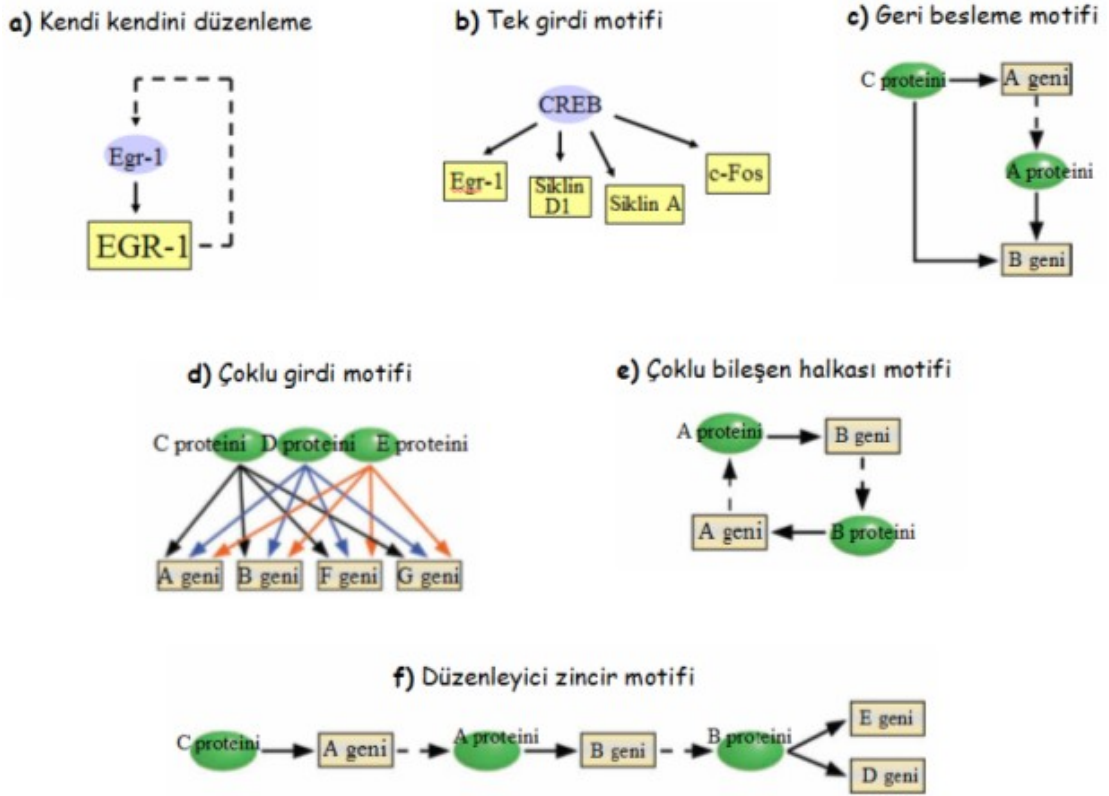
genel bir sınıflandırma olup, farklı tipte aminoasitler ile transkripsiyonel aktivasyonu uyaran proteinler de belirlenmiştir (9).

GSTF'ler promotörün proksimalinde yer alan "upstream activating sequence/upstream repressing sequence" (UAS/URS) olarak adlandırılan düzenleyici dizilere bağlanırlar. Bu bölgelerde diğer düzenleyici proteinlerin [güçlendirici (enhancer), sessizleştirici (silencer), baskılayıcı (represor)] bağlanabileceği diziler de bulunmaktadır (11). GSTF'ler için tanıma bölgeleri kümeler halinde bulunur. GSTF'ler DNA'ya düşük özgüllükle, zayıf bağlarla (hidrojen bağları, van der Waals bağları gibi) bağlanır. Fakat transkripsiyonun tam kontrolü, GSTF'lerin DNA'ya bağlandığından daha yüksek derecede bir özgüllüğe ihtiyaç duymaktadır. Bu özgüllük cis-etkili elementlere, trans-etkili proteinlerin bağlanmasıyla sağlanmaktadır. Bağlanma dizisinin uzunluğu, DNA bağlanma domainin konformasyonuna, boyutuna, tanıma motiflerinin sayısına, diğer DNA bağlanan proteinlerle heterodimer oluşmasına veya oligomerik etkileşim kurmasına bağlıdır (10).

Ökaryotik transkripsiyon, GSTF'lerden, kromatin düzenleyicilerine, GTF'lerden, GTF düzenleyicilerine çok sayıda proteinle kontrol edilmektedir. Bu proteinlerin ortak görevi, işleyişi kısmen anlaşılmış çevresel sinyallerin etkisiyle, ilgili genlerin ekspresyonunu sağlamaktır. Transkripsiyonel aktivasyonun işleyişine ilişkin en yaygın görüş, birçok gene özgül düzenleyicinin, hücrel uyaranlara yanıt olarak hedef DNA motifine bağlanmasıdır. Kromatin yapısına ulaşılması için transkripsiyonel koaktivatörleri bir araya getirirler; GTF ve RNA Pol II'den oluşan başlangıç öncesi kompleksin toplanmasını kolaylaştırırlar. (11).

GSTF'lerin gen ekspresyonunun kontrolünde nasıl organize olduğu temel sorulardan biridir. Bu karmaşık ağı basitçe tanımlamak için altı motif tanımlanmıştır;

- 1- **Kendi kendini düzenleme motifi:** Egr-1'in kendi genine bağlanarak kendi kendini regüle etmesi otheregülasyon motifine örnektir (Şekil.5a)
- 2- **Tek girdi motifi** (Şekil.5b).
- 3- **Geri besleme halkası** (Şekil.5c).
- 4- **Çoklu girdi motifi:** Çoklu girdi motifi, farklı koşullar altında bir takım sinyal yollarını bütünleyerek bir dizi genin ekspresyonunu koordine eder (Şekil.5b).
- 5- **Çoklu bileşen halkası** (Şekil.5e).
- 6- **Düzenleyici zincir** (Şekil.5f).



Şekil.5. a) Kendi kendini düzenleme motifi b) Tek girdi motifi c) Geri besleme halkası d) Çoklu bileşen halkası e) Çoklu bileşen halkası f) Düzenleyici zincir motifi

(Düzenleyici proteinler oval ile, genler dikdörtgen ile gösterilmiştir. Kesintisiz oklar bir aktivatörün gen promotörüne bağlandığını, kesintili oklar genlerin, gene özgül düzenleyici kodladığını belirtmektedir) (11)

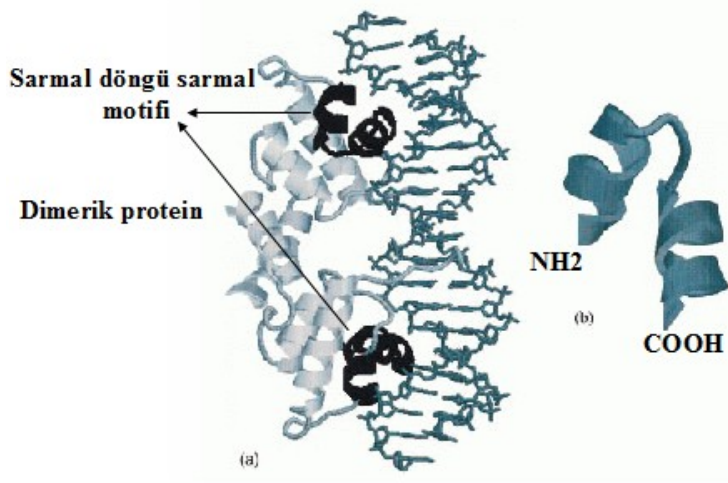
Düzenleyici zincir motifinden yola çıkılarak “emirler zinciri (Chain of command)” olarak adlandırılan hiyerarşik iletişim ağı (network) modeli tanımlanmıştır. Bu kaskadın başında bulunan düzenleyici protein, çeşitli iç ve dış uyarıların varlığında hangi grup genlerin ifade edileceğine karar verir.

GSTF’ler genellikle çoklu proteinlerden oluşan ailelerin üyeleridir. Tanımlanmış çok sayıda transkripsiyon faktörü protein ailesi bulunmaktadır. Her bir protein ailesinin üyesi birbirine çok yakın veya birbirine eş DNA bağlanma özelliğine sahiptir; ancak üyeler birbirinden farklı aktivasyon fonksiyonlarına sahiptir. Bu durum her bir transkripsiyon faktörü ailesinin, üyelerinin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması önünde büyük zorluk oluşturmaktadır (9).

2.3 Bağlanma Motifleri

2.3.1 Sarmal Döngü Sarmal Motifi (HTH: Helix turn helix)

Sarmal döngü sarmal motifi bir grup prokaryotik baskılayıcı proteinde tanımlanmış ilk DNA bağlanma motifidir. Bu yapı kısa bir aminoasit zinciri ile birbirine eklenen iki alfa sarmaldan oluşur. Aradaki zincir belirli bir dönüş açısı sağlar (5). Motifin amino ucunu içeren sarmal, tanıma sarmalı olarak adlandırılır ve bu sarmal DNA'nın majör oluşuna girer. Motif ile DNA arasındaki bağlanma, DNA bazlarıyla, sarmalın aminoasit yan zinciri arasında hidrojen bağı oluşumuyla gerçekleşir (Şekil.6) (7).

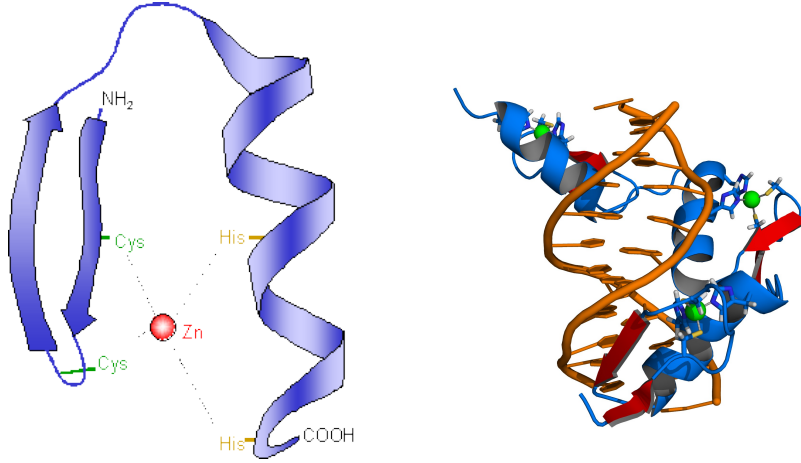


Şekil.6. a) Sarmal döngü sarmal motifi ile DNA'ya bağlanan dimerik protein b) Sarmal döngü sarmal motifi detayı (12)

2.3.2 Çinko parmak bağlanma motifi (Zinc finger binding motif)

Çinko parmak motifi 1985 yılında Miler, McLachlan ve Klug tarafından tanımlanmıştır. Çinko parmak motifi transkripsiyon faktörleri arasında en yaygın görülen bağlanma motifidir (13). Çinko atomu, sistein ve histidin rezidüleri ile etkileşerek DNA bağlanma domainin bütünlüğünün korunması için gerekli yapısal görevi sağlar. Her bir parmak, birbirine antiparalel, bir alfa sarmal ile iki beta tabakası arasına sıkışmış tek bir çinko iyonuyla bağlanır (Şekil.7) (14). Çinko, alfa sarmaldaki (α -helix) iki histidin rezidüsü ve β tabakasındaki iki sistein rezidüsü ile koordine edilir. Çinko atomunun, DNA ile etkileşimde rolü bulunmamaktadır. DNA, majör oluşa yerleşen bazik aminoasitler içeren alfa sarmal ile tanınır. Motifin DNA'ya bağlanması için minimal iki çinko parmak gerekir. Her bir parmak üç-dört baz çifti ile özgül olarak etkileşir (14). Bir diğer çinko parmak ailesi, çinko

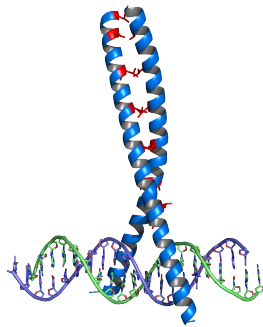
iyonunun dört sistein aminoasidi arasında koordine edildiği gruptur. Bu motife sahip proteinler alfa sarmal ile DNA'nın majör oluşuna homodimer veya heterodimer oluşturarak bağlanırlar.



Şekil.7. a) Cys₂His₂ tipi çinko parmak motifi (15) **b)** Üç çinko parmak motifi ile DNA bağlanma (16)

2.3.3 Lösin fermuar motifi (*Leucine Zipper*)

Lösin fermuar motifi, DNA'ya bağlanan yüzeyleri ve dimerizasyonu tek yapısal bir birimde birleştirir. İki uzun α -sarmalı DNA'yı sıkıca kavrayan kısaç benzeri yapı oluşturur ve α -heliksler ile DNA'nın majör oluşuna, birbirine yarım döngü uzaklıkta eklenir. DNA ile motif arasındaki bağlanma özgülüğü diğer motiflerde olduğu gibi α -heliks üzerindeki aminoasit zincirleri ve majör oluktaki baz çiftleri arasındaki bağlantı ile gerçekleşir (7). Motifin DNA ile etkileşim kuran kısmı arjinin ve lizince zengindir. Böylece DNA ve motif arasında, DNA dizisinden bağımsız, DNA'nın şeker/fosfat iskeletine bağlanan non-spesifik etkileşim kurulur (Şekil.8) (17).

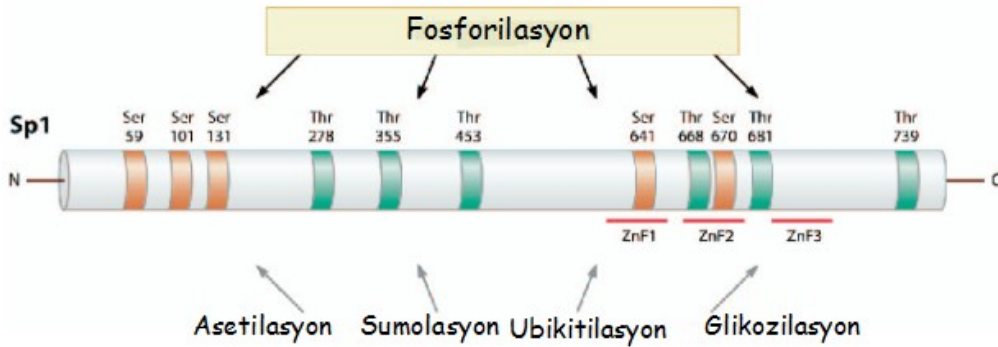


Şekil.8. Lösin fermuar bağlanma motifi (16)

Sp1 geni 12q13.1 de yerleşiktir ve 7652 baz çifti (bç) uzunluğundadır (22). Sp1 proteini 785 amino asit uzunluğundadır ve yaklaşık 81 kDa molekül ağırlığındadır (23). Sp1, RNA polimeraz II ile ilişkisi tanımlanmış ilk memeli gene özgül transkripsiyon faktörüdür (24). Aynı zamanda ilk kez klonlanan transkripsiyon faktörlerinden biridir (25). Guanince zengin diziler, GGGGCGGGG motifine sahiptir ve GC kutuları olarak adlandırılırlar. Bu kutular birçok genin ekspresyonunda gerekli cis-etkili elementlerdir (20). DNaseI footprinting deneyleri, Sp1'in GC kutusuna bağlandığını göstermiştir. Sp1 bağlanma bölgesi promotörde transkripsiyon başlama bölgesinin 70-110 baz çifti yukarısında bulunur (26).

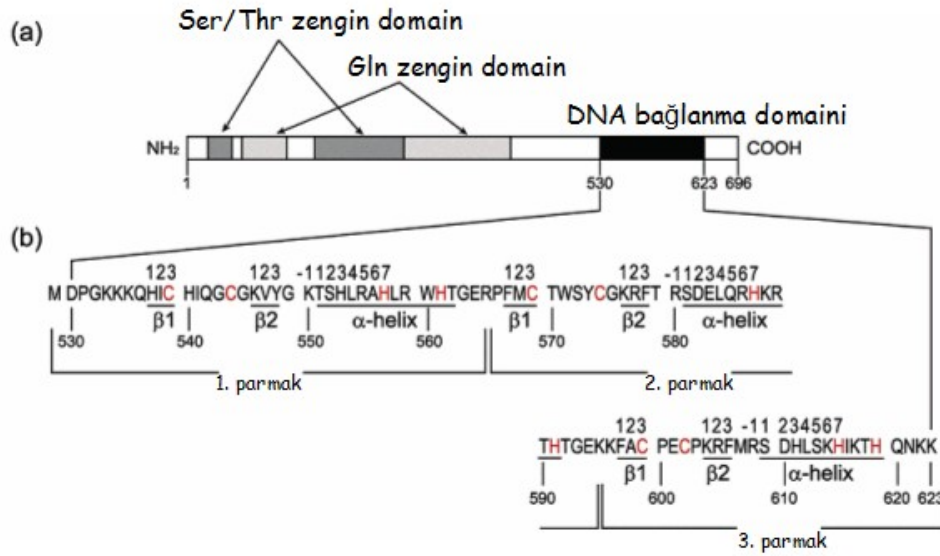
Sp1 proteini nükleusta yerleşim gösterir (22). Çok sayıda promotör bölgeye bağlanarak gen ekspresyonlarını aktive eder (27). "Sp1 bağlanma bölgeleri" bir çok housekeeping genin promotöründe bulunur (26). TATA kutusu içermeyen promotörler için bazal transkripsiyon faktörü gibi işlev gösteren bir transkripsiyonel aktivatördür (28).

Sp1 proteini fosforilasyon, sumoylasyon, asetilasyon, glikozilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlar ile regüle ve stabilize edilmektedir (**Şekil.12**). Sp1'in fosforilasyonu Sp1'in DNA'ya bağlanması ve transkripsiyonel aktivasyonunu etkilemektedir. Glikozilasyonu ise nükleer lokalizasyon için önemlidir (27).



Şekil.12. Sp1 geninde posttranslasyonel modifikasyonlar (27)

Amino terminal bölgesinde iki adet glutamin zengin bölgeye, serin/treonin zengin bölge iç içe geçmiş bir komşuluk gösterir (21) ve bu bölge transkripsiyonel aktivasyon için gereklidir (29). Karboksil terminalinde 3 adet sıralı tekrarlı Cys₂His₂ çinko parmak motifi içerir ve 5'- GGG GCG GGG -3' konsensus dizisine özgül olarak bağlanır (**Şekil.13**) (25).



Şekil.13. a) Sp1 transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivite ve DNA-bağlanma bölgesi aktivitesi, **b)** Sp1'in çinko parmak bağlanma motifini içeren primer ve sekonder yapısı (30)

Sp1'in farklı sınıftan nükleer proteinler ile heterotipik intraksiyonlar oluşturabildiği belirtilmiştir (21). Buna örnek olarak mediatör kompleks yapısında bulunan TAF110, TAF130, TAF55 koaktivatörleri üzerinden bazal transkripsiyon faktörlerini hedef promotöre yönlendirip transkripsiyonu aktive etmesi gösterilebilir (31). İki adet glutamin zengin aktivasyon bölgesiyle ve koaktivatörlerin varlığında TBP'nin karboksil terminaline bağlanır (32). Bu örnekler Sp1'in promotör ve uzak düzenleyici elementler arasında ilmekleme mekanizması (looping mechanism) ile interaksiyon kurduğunu akla getirmektedir (25). Sp1 ile etkileşim kuran diğer proteinlere örnek olarak retinoblastoma ilişkili protein p107, transkripsiyon faktörü YY1 veya E2F gösterilebilir.

Sp1 proteini, p300, histon deasetilazlar (HDAC:histon deacetylase) gibi kromatin modifiye edici faktörler yoluyla kromatin yeniden düzenlemesiyle ilişkilendirilmiştir (27). İn vitro Sp-1 ilişkili transkripsiyon, CRSP (Cofactor required for Sp1 activation/Sp1 aktivasyonu için gerekli koaktivatör) olarak adlandırılan bir koaktivatör kompleksi ile uyarılmaktadır (21).

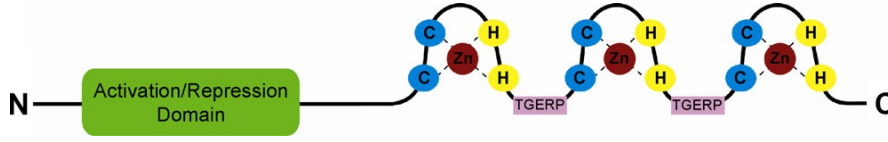
Sp1 hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasarı, bağışık yanıt oluşumu, farklılaşma gibi çeşitli hücrel süreçlerin regülasyonunda gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (33,34). Bu özelliklerinden ötürü Sp1 üretemeyen bir hücrenin yaşama şansı çok azdır (20). Sp1^{-/-} fare embriyonik kök hücreleriyle (ES:Embryonic Stem cells) yapılan çalışmalar bu proteinin

yaşamsal önemini ortaya koymuştur. Sp1^{-/-} ES' ler ilk başta normal büyüme karakteristikleri göstermiş ve embriyonik hücelere farklılaşabilirken, Sp1^{-/-} embriyoların gelişimin onuncu gününden sonra öldüğü saptanmıştır. Bu deney Sp1 yetersizliğinin otonom hücre eksikliği yarattığını ve gelişimin 10.cu gününden sonra farenin hayatta kalması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (20). Sp1^{-/-} fenotipine sahip farelerde MeCP2 (Metil-CpG bağlanan protein/Methylcytosine-binding protein) protein miktarında 10 kat düşüş gözlenmiştir. MeCP2 eksprese edemeyen fare hücreleri dokulara özelleşmeden embriyogenezin erken evrelerinde ölmüşlerdir. Bu durum MeCP2'nin hücrelerin farklılaşması için gerekli olduğunu göstermektedir (20,21,25). Tüm örnekler Sp1'in hayatta kalım sürecinde kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Sp1 aynı zamanda c-myc ile beraber insan telomeraz ters transkriptaz geninde (HTERT:Human telomerase reverse transcriptase) transkripsiyonu aktive eder (35).

2.5 Krüppel Benzeri (Krüppel like factors/KLFs) Transkripsiyon Faktörü 5:

Ökaryotik Krüppel benzeri faktörlerin (KLFs) DNA bağlanma bölgesi, Drosophila embriyonik patern düzenleyicisi Krüppel proteini ile homoloji göstermektedir. Ökaryotlardaki adlandırma bu homolojiye dayanmaktadır. Sp/XKLF ailesine dahildir. KLF'nin başındaki "X" ifadesi, faktörün majör ekspresyon bölgesini tanımlamaktadır. Örneğin eritroid hücre hattında eksprese olan EKLF (Erithroid/EKLF), akciğer hücrelerinde eksprese olan (Akciğer/Lung/LKLF) gibi (20). KLF ailesinin ilk kez klonlanan ve karakterize edilen geni, Klf1/eritroid krüppel benzeri faktör (EKLF)'dür (36). Günümüzde 17 adet Klf geni tanımlanmıştır (Klf1-Klf17) (37).

Krüppel benzeri faktör ailesi proliferasyon, hematopoezis, adipogenez, kök hücre onarımı, apoptoz, somatik hücre yeniden programlanması, diferansiyasyon ve gelişmeyi de içeren pek çok biyolojik süreçte rol oynar. Bu ailenin karakteristik özelliği transkripsiyonu baskılayan yada aktive eden GC'ce zengin, CACCC motifi olan DNA dizilerine bağlanan 3 Krüppel benzeri çinko parmağının olmasıdır. Birinci ve ikinci çinko parmaklar 23 rezidü içerirken üçüncü çinko parmak 21 rezidüye sahiptir. Bu parmaklar proteinin karboksi terminalinde lokalizedir ve promotördeki GC zengin dizilere veya CACCC elementlerine KLF'nin bağlanmasını sağlar (37). Amino terminali aktivasyon/represyon domainine sahiptir. Bu domain, gen aktivasyonu, baskılanması, protein-protein interaksyonlarında görevlidir (Şekil.14) (37).



Şekil.14. KLF proteininin şematik gösterimi (37)

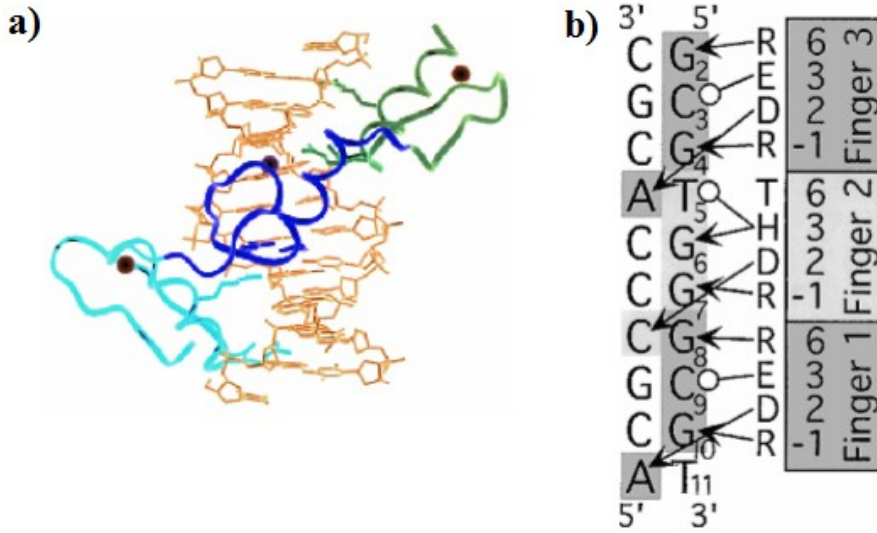
KLF, çeşitli kanserlerde somatik mutasyonlar, heterozigote kaybı veya promotör hipermetilasyonu yoluyla transkripsiyonel sessizleştirme şeklinde deregüle edilir. Örneğin kolorektal kanserde Klf4'ün heterozigote kaybı gösterdiği bulunmuştur (38). Bir çok çalışma KLF'nin hücre regülasyonunda pozitif düzenleyici olduğunu göstermektedir. Klf4 (Gut enriched-GKLF) ve Klf6 (Ubiquitius/UKLF) tümör baskılayıcı gibi işlev gösterir. (38). Klf5 (Intestinal enriched-IKLF) ise hücre proliferasyonundan sorumlu bulunmuştur (36).

Klf5 454 aminoasit (a.a.) uzunluğundadır. Klf5, epitel dokularda, mide, deri, akciğer, uterus ve testiste daha yüksek oranda eksprese edilmektedir. Klf5'in kolon kanserinde ve K-Ras onkogenik mutasyonunu içeren primer tümörlerde ekspresyonu artmaktadır. Sırasıyla onkogenik H-Ras ve K-Ras içeren fare fibroblastlarında ve bağırsak epitel hücrelerinde, Klf5 artmaktadır. Onkogenik H-Ras ve K-Ras, Klf5'i Egr-1 üzerinden MAPK (Mitojen aktive edilmiş protein kinaz/Mitojen activated protein kinase) yolağı ile aktive etmektedir (36). Klf5, hücre döngüsünü ilerleten siklin D1, siklin B1, Cdc2 genlerini aktive etmektedir. Bu veriler bir arada değerlendirildiğine Klf5'in proproliferatif özellikte olduğu sonucuna varılabilir (36). Klf5, Wnt sinyal yolağında etkin Wnt1'in downstream hedefidir (39). Wnt sinyal yolağı, β -katenin bağımsız yolak üzerinden Klf5'i aktive etmektedir. Wnt1'in hem in vivo hem de in vitro aşırı ekspresyonu, protein kinaz C yolağının (PKC) kısmi kontrolü altında Klf5 ekspresyonunu artırmaktadır (36).

2.6 Egr-1 Transkripsiyon Faktörü [Early Growth Response Factor-1/Erken Gelişim Yanıt Faktörü-1/(Zif268, Krox24, TIS8)]:

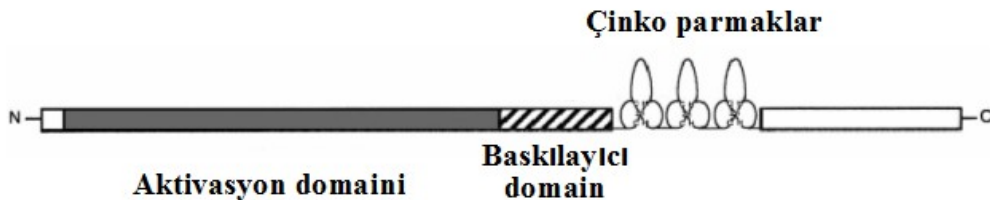
Egr-1 geni erken cevap genleri grubuna dahildir. NGFI-A (Nevre growth factor-I A), Krox24, zif268, TIS8 olarak da adlandırılır. Egr-1 proteini kodlayan Egr-1 geni 5q3.1 kromozomal lokalizasyonunda bulunmaktadır. Egr-1 proteini yaklaşık 58 kDa molekül ağırlığındadır, 543 amino asit uzunluğundadır. Egr-1 transkripsiyon faktörü, nükleer lokalizasyon sinyali, iki aktivatör bölge ve bir baskılayıcı bölge içerir (40). Nükleer bir proteindir ve transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev gösterir. Pek çok büyüme regüle edici genin, GCG(G/T)GGGCG içeren promotör sekansına özgül olarak bağlanır (41). Egr-1'in

DNA bağlanma bölgesi olan karboksil ucu C₂H₂ ailesine üye olan üç çinko parmak motifi içerir. Her bir çinko parmağın alfa helikal yapısı DNA'nın majör oluğu ile uyumludur ve bu yapı proteinin DNA'yı mükemmel şekilde sarmasını sağlar. Çinko parmakların her biri dört baz çifti ile eşleşir. Birinci çinko parmak bağlanma motifinin 3' doğrultusuyla, üçüncü çinko parmak 5' doğrultusuyla ilişkilidir (Şekil.15) (14).



Şekil.15. a) Egr-1 çinko parmak bağlanma motifi (42) b) Egr-1 çinko parmak bağlanma dizisi (14)

Egr-1'in aktivasyon domaini ile DNA bağlanma domaini arasında NGFI-A 1 ve 2 (NAB1/Nerve growth factor-I A-binding protein-1 ve NAB2) kofaktörlerinin bağlanabileceği inhibitör (durdurucu) domain bulunur (Şekil.16). NAB 1 ve NAB 2, Egr-1'in biyolojik aktivitesini engeller (43). Bu baskılayıcı aktiviteye ait moleküler mekanizma bilinmese de, NAB proteinleri ile Egr-1 arasındaki ilişkinin daha önce tanımlanan negatif geri besleme halkası motifi ile uyumlu olduğu görülmektedir (43).



Şekil.16. Egr-1 transkripsiyon faktörünün modüler yapısı (43)

Egr-1, büyüme faktörleri, hormonlar, mitojenler, nörotransmitterler, stres uyaranları gibi çevresel sinyaller ile eksprese olmaktadır. Ayrıca nörit oluşumu, yaraların iyileşmesi, büyüme kontrolü, makrofaj farklılaşması, apoptoz sürecinde de etkindir (43). Egr-1 hematopoietik kök hücre yerleşimi ve proliferasyonunu kontrol etmektedir (44). Egr-1, çoğu hücrede mitojenik uyaranlar ve hücre sel strese yanıt olarak sentezlenmektedir. Hücre ölümünde baş rollerdedir (43).

1998 yılında Liu ve arkadaşları tarafından Egr-1 'pro-apoptotik protein' olarak tanımlanmıştır. Egr-1'in apoptotik sinyal yolağında aktif rol oynadığına ilişkin üç durum bulunmaktadır:

- 1) p53 tümör baskılayıcı promotörüne doğrudan bağlanarak, bu proteinin sentezlenmesini sağlaması,
- 2) Nöronal apoptozdan sorumlu c-Jun transkripsiyon faktörüne bağlanarak bu proteinin proapoptotik aktivitesini artırması,
- 3) PTEN genini aktive etmesidir (43).

Egr-1, hücre ölümünü düzenlemektedir. Egr-1'in pro-apoptotik aktivitesi hücre tipine ve sitotoksik uyarana bağlıdır. p53, p300, RelA, Sp1, c-Jun, PTEN (45) ile direkt etkileşim kurmaktadır. Böylece hücrede apoptotik yolları regüle eden aktivatörlerin ekspresyonunu sağlar (43). Egr-1'in KLF5 promotöründe bağlanma bölgesi bulunur. Aktive ettiği genlerin ürünleri hücre farklılaşması ve mitogenezi için gereklidir. Egr-1 geni, Sp1 transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi içerir. Sp1, Egr-1 gen ekspresyonunu aktive etmektedir (46). Egr-1 aynı zamanda kendi genine bağlanarak kendi geninin transkripsiyonunu downregüle etmektedir (46). Bu durum gene özgül transkripsiyonel düzenleyicilerin gen ekspresyonu kontrolü için tanımlanan "kendi kendini düzenleme motifi" ile uyumludur.

Egr-1 geni hem tümör baskılayıcı hem de tümör promotörü olarak işlev gösterir (47). Pek çok insan tümör hücre hattı çok az Egr-1 eksprese eder veya hiç Egr-1 eksprese etmemektedir. Bu durum Egr-1'in apoptoz üzerindeki etkisini doğrulamaktadır. Meme kanseri, fibrosarkoma, glioblastoma gibi kanser türlerinde Egr-1 tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Son çalışmalarla prostat kanseri gelişimindeki rolü de ortaya konulmuştur. Egr-1 geni inaktive fare embriyo fibroblast hücreleri senesence (yaşlanma) dönemini geçerek ölümsüz, büyüme özelliği kazanmışlardır (47). EMSA (Electrophoretic mobility shift assay/Elektroforetik hareketlilik kayma yöntemi) ve ChIP (Chromatin

immunoprecipitation/Kromatin immün çöktürmesi) gibi yöntemler p53'ün Egr-1'in direkt hedefi olduğunu göstermiştir (47).

2.7 Bir Yöntem Olarak Elektroforetik Hareketlilik Kayma Yöntemi (Electrophoretic mobility shift assay/EMSA)

Birçok nükleer mekanizma özgül DNA-protein etkileşimlerini içerir. Transkripsiyon faktör-DNA etkileşiminin açığa çıkarılması, transkripsiyonel kontrol için hangi düzenleyicilerin gerekli olduğu ve GSTF'lerin nasıl bir uyum içinde çalışarak transkripsiyonel sinyalleri oluşturduğunun anlaşılması açısından önemlidir.

Jel reterdasyon yöntemi olarak da bilinen, EMSA basit, etkili, ve protein-nükleik asit etkileşimlerini belirlemek için sıklıkla kullanılan duyarlı bir yöntemdir. EMSA yöntemi, proteinlerin bağlandığı nükleik asitlerin karakterizasyonu için altın standarttır (48).

EMSA yöntemi E.coli laktöz represörünün bağlandığı DNA bölgesi ile etkileşiminin kinetik çözümlenmelerinin belirlenmesinde ilk kez Fried ve Crothers (1981)/Garner ve Revzin tarafından geliştirilmiştir (49).

Kurulan reaksiyonun basitliği, duyarlılığı ve yöntemin kantitatif özellikte olması araştırmacıların transkripsiyon/gen regülasyonu çalışmalarında bu yöntemi sıklıkla kullanmalarını sağlamıştır. Kullanım kolaylığı 10^{-18} mol DNA'nın bile yüksek duyarlılıkla belirlenmesine olanak sağlar (50). Protein-DNA kompleksleri, buldukları solüsyon içindeki durumuna göre elektroforez sırasında jelde daha kararlı bulunmaktadır, bu özgül jel kararlılığı Cann tarafından 1989 yılında "Caging" olarak tanımlanmıştır. Çünkü poliakrilamid jel matriksi, protein-DNA kompleksinin ayrışmasını (dissosiyasyonu) engeller (51).

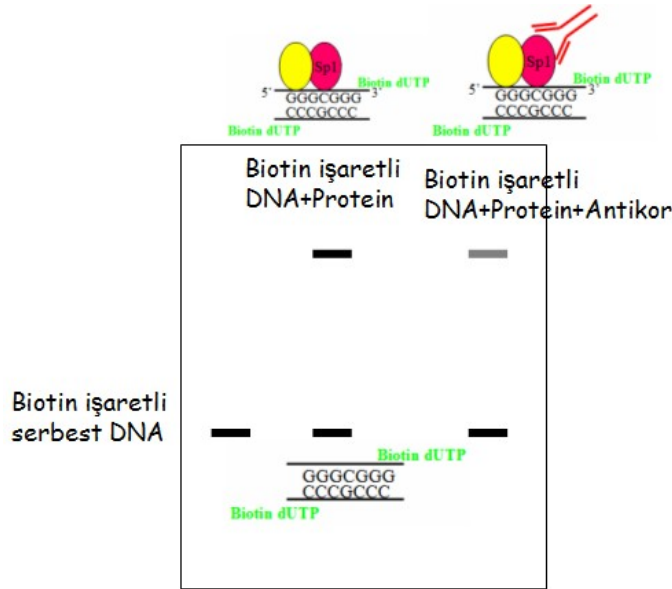
EMSA sadece gen regülasyonu çözümlenmelerinde değil, aynı zamanda DNA replikasyonu, onarımı ve rekombinasyonu çalışmalarında da kullanılmaktadır (52). Kalitatif amaçla kullanımda yararlı olabileceği gibi kantitatif ve kinetik çözümlenmelerde de kullanıma uygundur. EMSA yönteminin yüksek duyarlılığı protein veya DNA sitokiyometrisinin (Stoichiometry) belirlenmesine olanak sağlar (50).

Protein-DNA kompleksi, proteine bağlanmayan serbest DNA'dan daha büyük boyutta olduğu için oluşan kompleks, denatüre edici olmayan poliakrilamid jelde ikinci bir bant şeklinde görülebilen kayma yapar (50). Yöntem, bu özelliği kullanarak protein ve DNA'nın özgül etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılır. Günümüzde bu yöntem DNA'ya bağlanan proteinlerin saflaştırılması, proteinin bağlandığı şüpheli DNA dizisinin belirlenmesi, reaksiyon bileşenlerinin belirlenmesi gibi amaçlarla rutin olarak kullanılmaktadır. Aynı

zamanda proteinlerin bağlanma bölgelerinin belirlenmesinde altın standart kabul edilmektedir (48). EMSA ile karşılaşılabilecek en büyük güçlük farklı protein-DNA etkileşimleri için farklı koşulların denenmesi sürecinde yaşanmaktadır. Her bileşenin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiği için optimizasyon süreci uzun sürmektedir.

2.7.1 Yöntemin prensipleri

EMSA yöntemi, proteinlerin, farklı boyut, moleküler ağırlık ve yükte olmasına bağlı olarak denatüre edici olmayan jel matrisinde farklı elektroforetik hareketlilik oluşturması temeline dayanır (50). DNA-protein kompleksi oluştuğunda DNA'ya bağlanmış protein, jelde serbest DNA'dan karakteristik olarak daha yavaş ilerleyerek görüntülenebilen bir kayma yapmasına olanak sağlar (Şekil.17) (52).



Şekil.17. EMSA yönteminin şematik gösterimi (53)

EMSA yöntemi genellikle 20-70 baz çifti aralığında kısa oligonükleotidlerin kullanımına uygundur (50). Birden çok bağlanma bölgesi bulunan multi protein komplekslerinin bağlanma bölgelerinin belirlenmesinde 100-500 bp aralığında daha uzun DNA fragmentleri de kullanılabilir. Çift iplik oligonükleotidler ile daha verimli sonuçlar elde edilmektedir (54). GSTF'lerin bağlanacağı hedef diziyi içeren DNA iplikleri birbirinin eşleniği olmalıdır (50). EMSA yönteminde DNA'nın belirlenmesi amacıyla geleneksel olarak DNA problemlerinin 3' ucu Klenow fragmenti ve [γ - 32 P] dNTP kullanılarak 32 P ile işaretlenir. 5' ucu ise [γ - 32 P]dNTP ve T4 polinükleotid kinaz kullanılarak radyoaktif olarak işaretlenebilir.

Radyoaktivitenin sağlık üzerine etkileri üzerine bu işaretleme yöntemine alternatif olarak haptin (biotin, digoksinin) veya florasan (C₅) boyalarla radyoaktif olmayan işaretleme de uygulanmaktadır. Haptin ile işaretlenmiş DNA problemleri streptavidin, anti-DIG antikorları gibi sekonder deteksiyon içerikleri ile belirlenebilir (54).

Genellikle bir proteinin, DNA dizisinde bağlanabildiği birden fazla dizi olduğunda özgül olmayan bağlanmaları engellemek için işaretlenmemiş yarışmacı DNA dizileri kullanılır. Bu amaçla sonike edilmiş Salmon sperm DNA'sı, poly dI/dC, dana timüsü DNA'sı, E. Coli DNA'sı gibi diziye özgül olmayan yarışmacı DNA kullanılır (50). Poly dA/dT özellikle GC zengin DNA dizilerinin kullanıldığı bağlanma reaksiyonlarında özgül olmayan protein bağlanmalarını engellemek amacıyla kullanılmaktadır (54). İşaretlenmemiş DNA, ya işaretlenmiş DNA ile özdeş diziden oluşur yada proteinin hedef bağlanma bölgesiyle ortak diziye sahip olmalıdır. Poly dI/dC nükleik asit polimerinin tavsiye edilen miktarı 50µg/ml'dir. Eğer hedef DNA dizisi TATATGTA gibi bir motife sahipse poly(dA-dT) yerine poly(dG-dC) sentetik polimeri kullanılması daha uygun bir seçim olur (55).

DNA'ya bağlanacak protein olarak tüm hücre lizatı, ham nükleer ekstrakt veya doku ekstraktı kullanılabilir veya pürifiye edilmiş, rekombinant proteinler tercih edilebilir (50).

İyonik direnç, bağlanma tamponunun pH'sı, iyonik olmayan deterjanların varlığı, gliserol, taşıyıcı proteinler (BSA gibi), divalent katyonların varlığı/yokluğu, kullanılan DNA'nın konsantrasyonu, bağlanma reaksiyonunun sıcaklığı ve süresi protein/DNA kompleksinin özgüllüğünü ve direncini etkilemektedir. Düşük iyonik güce sahip tamponlar daha az ısı oluşturur ve makro molekül tarafından taşınan akım fraksiyonunu artırarak göçü hızlandırır. Bu özelliğinden ötürü elektroforez sırasında EMSA deneylerinde bu tür tamponlar kullanılır. Protein-DNA kompleksini belirlemek için denatüre edici olmayan (SDS içermeyen) TBE-poliakrilamid jel veya daha uzun DNA fragmentlerini yürütmek için TAE-agaroz jel kullanılmaktadır. Jel boyunca serbest nükleik asidin göçü ile en küçük por çapı yarışma halinde olduğu için poliakrilamid jel kullanılması optimum çözünürlük sağlar (52). Jel yüzdesi, hedef DNA'nın uzunluğuna, proteinin moleküler ağırlığına ve yüküne bağlıdır. Poliakrilamid jel konsantrasyonu genel olarak % 4 ile 8 arasında değişmektedir. Agaroz jel için de % 0.7-1.2'lik jel kullanılmaktadır (54). Bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmeden önce jelin ön yürütmesinin yapılması örneklerin kuyucuklarda takılı kalmaması, düzgün yürümesi açısından önemlidir.

Gliserol veya sukroz genellikle proteinleri kararlı kılmak ve aynı zamanda protein/DNA etkileşimlerinin stabilize olmasını güçlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak gliserolün yüksek konsantrasyonda kullanılması, yüksek viskozitesinden ötürü görüntü alındığında vertikal düzlemde arka plan oluşumuna neden olmaktadır (54). Protein çözünürlüğünü sağlamada iyonik olmayan deterjanların kullanımının önemli olduğu belirlenmiştir. Protein nükleer ekstraktan kullanılacak ise proteinin yapısının korunması için proteaz, nükleaz, fosfataz inhibitörleri de bağlanma reaksiyonuna eklenebilir. Örneklerin yürütmesini takip ederken bromofenol mavisi kullanılmaktadır.

DNA-protein kompleksi jel elektroforeziyle yürütüldükten sonra, kompleksin pozitif yüklü naylon membrana transferinin gerçekleştirilmesi gereklidir. Radyoaktif yöntem dışında, DNA'yı işaretlemeye kullandığımız biotinin, kemoluminesans deteksiyonu sırasında gerçekleştirilecek yıkama aşamalarında membrandan DNA'yı kaybetmemek adına UV ışığı ile proteinlerin naylon membrana çapraz bağlanması (UV crosslink) gerekir.

Oluşan protein-DNA kompleksinin özgüllüğünü belirlemede o proteine özgü antikor kullanılarak 'Süper Shift' adı verilen protein:antikor kompleksine ait ikinci bir özgül bant elde edilerek bağlanmanın doğru gerçekleştiği belirlenebilir (54). Fakat EMSA'da protein doğal formda, denature edilmeden kullanıldığı için kullanılacak antikor western blottan farklı olarak proteinin denature olmayan formunu tanıyacak özellikte olmalıdır.

EMSA, kısa oligonükleotidlerden, daha uzun DNA dizilerine, tek iplik veya çift iplik DNA dizilerinin kullanımına uygundur. Oligopeptidlerden, transkripsiyon faktörlerine farklı boyuttaki proteinlerin bağlanma bölgeleri hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Belirtilen avantajlarının dışında yöntemin sınırlılıkları da bulunmaktadır. Örnekler elektroforez sırasında kimyasal dengede bulunamazlar; protein-nükleik asid kompleksinin kararlılığı pek çok değişkene bağlıdır; kullanılan proteinlerin doğru şekilde moleküler ağırlığı belirlenemez. Proteinin bağlanma dizisi hakkında direkt bilgi edinilemez. EMSA'nın yetersiz kaldığı bu gibi durumlarda alternatifleri kullanılır (48).

2.7.2 EMSA yönteminin alternatifleri

EMSA yöntemine alternatif olarak protein-DNA etkileşiminin belirlenmesinde en çok nitroselüler filtreleme – bağlanma yöntemi ve DNase I footprinting yöntemi kullanılır. Bu yöntemlerin dışında southwestern blotting, CHIP, metilasyon korunması, metilasyon interferansı, bildirici vektör (reporter assay) de kullanılmaktadır (48).

Nitroselüloz filtreleme yöntemi, DNA ile etkileşim kuran proteinlerin nitroselüloz membrana bağlanması temeline dayanır (56). Nitroselüloz filtreleme işlemi ile çok uzun nükleik asitlerle (örn; lambda fajı:48kb) işlem yapılabilir. Fakat filtreleme işlemi sırasında tek iplik nükleik asitler de yakalanabilir. Bu da bağlanma sinyalini baskılayarak, arka plan oluşumuna neden olabilir. Hazırlanan örnekte birden fazla DNA bağlanan proteinin olması filtreleme-bağlanma analizlerini yanıltabilir. Birden fazla DNA bağlanan proteinin olduğu, nükleer lizat gibi karışımların kullanılması açısından EMSA yöntemi daha avantajlıdır (48).

Footprinting yöntemi çeşitli nükleaz ve kimyasallar ile proteinin bağlandığı DNA dizisinin özgül olarak belirlenmesini sağlar. Tek bir nükleik aside bağlanan birden fazla proteinin çözümlenmesini sağlar. Footprinting yönteminde, kimyasal işlemler sırasında nükleik asidlere bağlanan radyoizotopların yapıları bozulabileceğinden bağlanmanın belirlenmesi EMSA'ya göre daha az duyarlıdır. Bazı proteinler DNA dizisine özgül olmadan bağlanır, bu da bağlanma bölgesine ilişkin footprinting yönteminin çözümleyebileceği belirgin bir iz sağlamaz. Bu durumda EMSA yönteminin kullanılması elde edilen bağlanma sinyallerinin daha kolay yorumlanmasını sağlar (48).

2.8 Wnt Sinyal İletimi

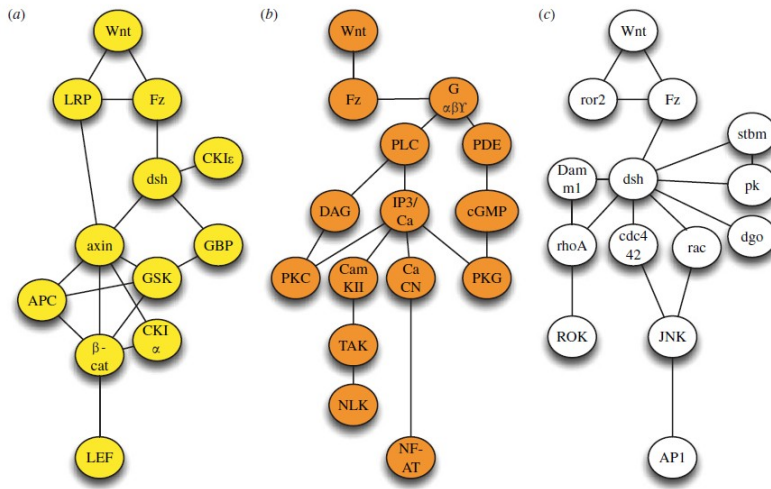
Günümüzde pek çok sinyal yolağı tanımlanmıştır. Bunlardan birisi de doku homeostasisi, hücre hareketi (motilitesi), hücre adhezyonu, proliferasyonu, hücre göçü, apoptoz gibi hücrede çok çeşitli ve temel biyolojik süreçlerin işleyişinde önemli rolü bulunan Wnt sinyal iletimidir (57). İlk olarak β -katenin sinyal yolağı olarak tanımlanan Wnt sinyal yolağı, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, zebra balığı, tavuk, fare ve insanda yüksek oranda korunmuştur.

Wnt sinyal iletimi insan deri, kan, bağırsak ve beyin hücrelerini de içeren çok çeşitli kök hücre sistemlerini regüle etmektedir. Aynı zamanda Wnt sinyal yolağının kontrolündeki hataların çeşitli hücre dizilerinde tümör oluşumuna neden olduğu ve bunun bir sonucu olarak kolon, hepatosellular karsinoma, lösemi, melanomanında aralarında bulunduğu pek çok insan kanseri ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (57).

Wnt yolağının ismi *Drosophila* (meyve sineği) *Wingless geni* ile fare *Int-1* geninden türetilmiştir (58). 1982'de farede göğüs kanseri çalışmalarında, ilk Wnt proteinin bulunuşundan bu yana omurgalılarda 19 Wnt geni belirlendi (59). Bu genler 12 alt ailede toplanabilir. Evrimsel süreçte, çok hücrelilerde Wnt genleri, 650 milyon yıldır korunmaktadır (60).

Wnt proteinlerinin, Wnt/ β -katenin, Wnt/Kalsiyum (Wnt/ Ca^{2+}), Wnt/Jun-Amino terminal kinaz (JNK) olmak üzere 3 yoluğı aktive ettiğı bilinmektedir (61).

β -katenin bağımlı yolak tek bir doğrusal ileti biçimiyken, β -katenin bağımsız yollar çoklu dallanma gösterir. Bu yollardan birisi hücre içi Ca^{2+} düzeylerini kontrol eden ve β -katenin yoluğının antagonisti gibi işlev gören Wnt/ Ca^{2+} yoluğıdır. Diğeri ise küçük GTPaz'lar ve JNK yoluğı üzerinden hücre iskeleti yeniden yapılanması ve aktin polimerizasyonunu uyaran Wnt/JNK yoluğıdır (Şekil.18) (62).



Şekil.18. (a) Wnt/ β -katenin yoluğı, (b) Wnt/Kalsiyum yoluğı, (c) Wnt/Jun-Amino terminal kinaz (JNK) yoluğı (63).

2.8.1 β -katenin Yoluğı (Kanonikal)

β -katenin yoluğında gerçekleşen olay, sitozolik β -katenin proteininin sitoplazmik birikimi sonrasında nükleer geçişi olarak tanımlanır (64).

Wnt proteinleri, genel olarak 350 aminoasit uzunluğunda, yaklaşık 40kDa moleküler ağırlığında, sisteince zengin, hücreler arası alana salınan hidrofobik karakterli proteinlerdir (65, 66). Wnt proteinlerinin hücreler arası alana salındıktan sonra hücre içi sinyal iletim yoluğın aktive edebilmesi için Frizzled (Fz) transmembran proteinlerinden biri ile etkileşmesi gerekmektedir. Bu ilişki LRP-5/6 (Düşük Dansiteli Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein 5/6-Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) ko-reseptörleri ile güçlendirilmektedir. Wnt ligandı Fz ve LRP reseptörlerine bağlandıktan sonra Dishevelled ve Axin proteinleri membrana yönelirler. Yıkım kompleksinin ana bileşeni Axin membranda tutulduğu için β -katenin yıkımdan kurtulur. β -katenin sitoplazmada birikir ve nükleusa hedef genlerini regüle etmek üzere transloke olur (67). Wnt ligandı eksikliğinde sitoplazmada β -katenin

konsantrasyonu düşük tutulur (63). Eğer Wnt reseptörler ile etkileşemezse β -katenin Axin ve Adenomatous poliposis coli (APC) tarafından sitoplazmada tutulur. Axin, kazein kinazla (Casein kinase1a/CK1a) ve glikojen sentez kinaz 3 β (Glycogen synthase kinase-3 β /GSK3 β) için iskele görevi görür. β -katenin, GSK3 β ve CK1a tarafından fosforillenir ve ubiquitinasyon yolu ile yıkılır (67).

2.8.1.1 Wnt/ β -Katenin Yolağı Hedef Genleri

Wnt/ β -Katenin yolağının 80'den fazla hedef genin regülasyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu ikilinin ekspresyonu ve aktivitesi kök hücre ve progenitör hücrelerin kendi kendini yenilemesi, hücre proliferasyonu, hücre kaderinin belirlenmesi gibi süreçleri kontrol etmektedir. Bu açıdan bakıldığında hücrede dengenin sağlanması açısından Wnt/ β -Katenin kompleksinin büyük önemi vardır (68).

2.8.2 β -Katenin Bağımsız Yolaklar (Kanonikal olmayan/Non canonical)

15 yıl önce β -katenin bağımsız Wnt yolağı, embriyonik gastrulasyonda hücre hareketini kontrol eden yolak olarak tanımlanmıştır. β -katenin bağımsız Wnt yolağı, diğer sinyal yolaklarıyla da çakışan üç mekanizma olduğu için parça parça açıklanabilmiştir (69).

2.8.2.1 Wnt/Kalsiyum yolağı

Wnt5a veya Wnt11 mRNA'ları zebra balığı embriyolarına enjekte edildiğinde blastodiski çevreleyen kalsiyum geçişiminde iki kat artış olması kalsiyumun Wnt yolağında ikinci mesajcı olduğunu düşündürmüştür. Aynı zamanda Zebra balığı embriyolarının sıçan Frizzled 2 (Rfz-2) ile ektopik ekspresyonu, hücre içi kalsiyum salınımını Wnt5a ko-ekspresyonu ile artırmaktadır (69). Bu bilgiler, kalsiyumun Wnt5a veya diğer benzer ligandlar ile Wnt sinyal yolağında kalsiyum geçişinin frizzled reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmesinde rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Hücre içi kalsiyum salınımı heterotrimerik G proteinleri, fosfotidil inozitol döngüsünün aktivasyonu ve ligand etkileşimine bağlıdır. Aynı zamanda Wnt/Ca⁺⁺ yolağının nemo benzeri kinazı aktivasyonu (NLK), TCF transkripsiyon faktörlerini fosforiller böylece klasik Wnt yolağı inhibe olur (63).

Hücre içi kalsiyum salınımı vücut yapısı özelleşmesi için gereklidir. Kalsiyum sinyalizasyonu yetişkin kaslarında yavaş kas fiberlerinin oluşumu ile ilişkilidir (69).

Wnt/Ca⁺⁺ yolağında özgül Wnt ve frizzled homologları kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinaz II (CamKII) and protein kinaz C (PKC)'ı aktive etmektedir.

Wnt proteinlerinin Frizzled transmembran proteinlerine bağlanmasıyla fosfolipaz C ve fosfodiesteraz mobilizasyonunu takiben heterotrimerik G-proteinleri aktive olur. Bu, cGMP seviyelerinde düşüş, intraselüler Ca^{2+} miktarında artış, protein kinaz C aktivasyonu ile sonlanır. Bu değişimler sonucu aktive olan metabolik yollar veya tam olarak genler bilinmemektedir. Ama NF-AT'ın gerekli olduğu görülmektedir. Aynı zamanda Wnt/ Ca^{2+} yolağının bazı noktalarda beta-Katenin yolağının antagonisti olduğu öne sürülmektedir (62).

2.8.2.2 Wnt/JNK yolağı (Planar cell polarity)

PCP yolağı ilk kez *Oncopeltus fasciatus* ve *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmıştır. *Drosophila*'da PCP'deki mutasyonlar bileşik gözde ve/veya kutikular yapıda organizasyon bozukluklarına neden olmaktadır. *Drosophila*'nın kanadındaki duyu kıllarında karakteristik proksimal-distal oryantasyonun dışında dalgalı ve farklı yönelmeler alan bir yapı oluşmasına neden olmaktadır. Daha sonra sineklerdeki anormal yapılanmaya sebep olan PCP ile düzlemsel kutuplaşma ile ilişkili genlerin evrimsel süreçte omurgalılarda da korunmuş olduğu bulunmuştur (70). Omurgalılarda iç kulak sterosillerin farklılaşması ve oryantasyonuna katkıda bulunur, gastrulasyon sırasında mezoderm ve ektodermin yayılmasını yönlendirir.

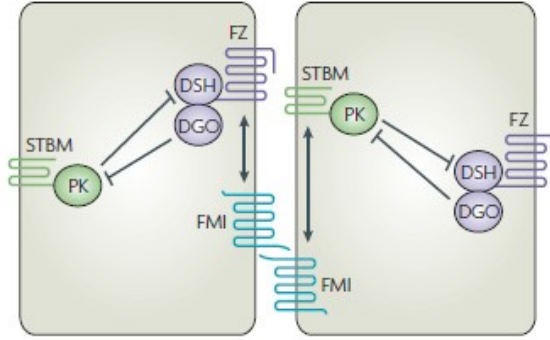
PCP/Fz sinyal yolağının çekirdek komponentleri hücrede kutuplaşmayı sağlamak için etkileşirler. Çekirdek komponentleri membran geçen proteinler Frizzled (Fz), Flamingo (FMI), Strabismus (STBM), Dishevelled (DSH), Diego (DGO), Prickle (PK) sitoplazmik proteinlerdir ancak PCP sinyalizasyonu sırasında membranla etkileşim gösterir. Bazı çekirdek bileşenlerinin diğerinin aktivitesini engellediği gözlenmiştir (70).

PCP yolağı, küçük GTPazlar, Rho ve Rac ile aktin sitoskeletonindeki değişiklikleri organize eder (62).

PCP yolağının aktivasyonu apikal-basal sınırdaki dikey aksis boyunca belirli epitel dokularda kutuplaşmayı tanımlar.

Hücre kutuplaşmasının başında DGO, diversin, DSH, STBM, PK, Fz hücrenin apikalinde toplanmış durumdadır. Fz ve DSH bir kompleks gibi hareket ederek hücrenin distaline göç eder. Diego, Fz/DSH'ın distal yerleşimi için pozitif düzenleyici işlevi gösterir (62). İn vitroda Fz karboksilik kuyruğu DSH'ın PDZ domaini ile etkileşime girer. Fz, DSH'ı hücre membranına salar. İki G-proteini Rho ve Rac birbirinden bağımsız olarak aktive olur. STBM, PK'nın membrana salınımını sağlar. PK, STBM-PK kompleksinin protein kompleksi halinde agregat oluşturmasını sağlar. PK, DSH ile etkileşerek hücre kültüründe DSH'ın

membran lokalizasyonunda azalmaya neden olur. In vivo yüksek PK konsantrasyonu DSH'ı inhibe eder. D. melanogaster'de DGO'nun Fz/PCP yolağında pozitif etkisi vardır. DGO, PK ile DSH'a bağlanmada yarışmaya girebilir ve PK'nın Fz/PCP yolağındaki inhibisyonu üzerinde antagonist etki gösterebilir (Şekil.19) (70).



Şekil.19. β -Katenin bağımsız yolda Fz/ PCP çekirdek bileşenleri arasındaki etkileşimler (6).

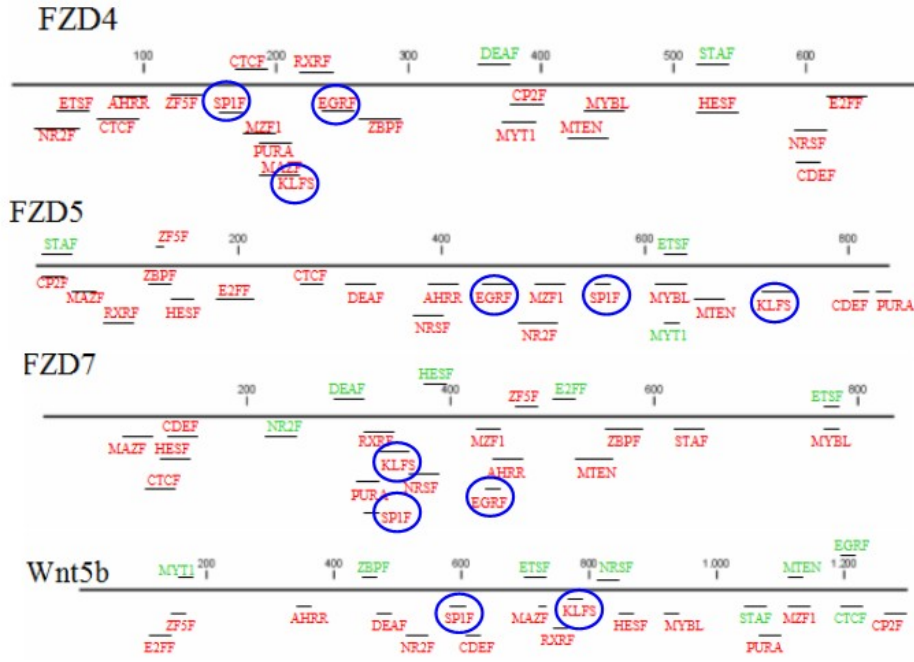
2.9 Apoptoz –Wnt Sinyali İlişkisi

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), organizmanın hayatta kalım sürecinde kritik öneme sahiptir. Apoptoz, yüksek ökaryotların tümünde korunmuştur (71). Apoptoz ve Wnt sinyal iletimi daha çok Wnt/ β -katenin yolağı ile ilgili çalışmalar ile ilişkilendirilmiştir. Fare meme tümör virüsüne indüklenen fare meme tümörlerinde Wnt-1'in bir proto-onkogen gibi aktive olduğu bilinmektedir (58). Chen ve ark. kemoteröpatik ilaçlar (vincristine, vinblastine) ile uyarılmış hücrelerde, Wnt-1'in sitokrom-c salınımını engelleyerek, kaspaz-9 aktivasyonunu artırdığını ortaya koymuşlardır. Wnt-1 eksprese eden hücrelerin apoptoz ilişkili kanser tedavisine karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir (72). Bir diğer çalışmada da Wnt sinyal yolağının apoptozu engelleyerek NF- κ B'yi aktive edip veya GSK-3 β 'yi inaktive ederek hayatta kalımı artırdığını ortaya koymuştur (71).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

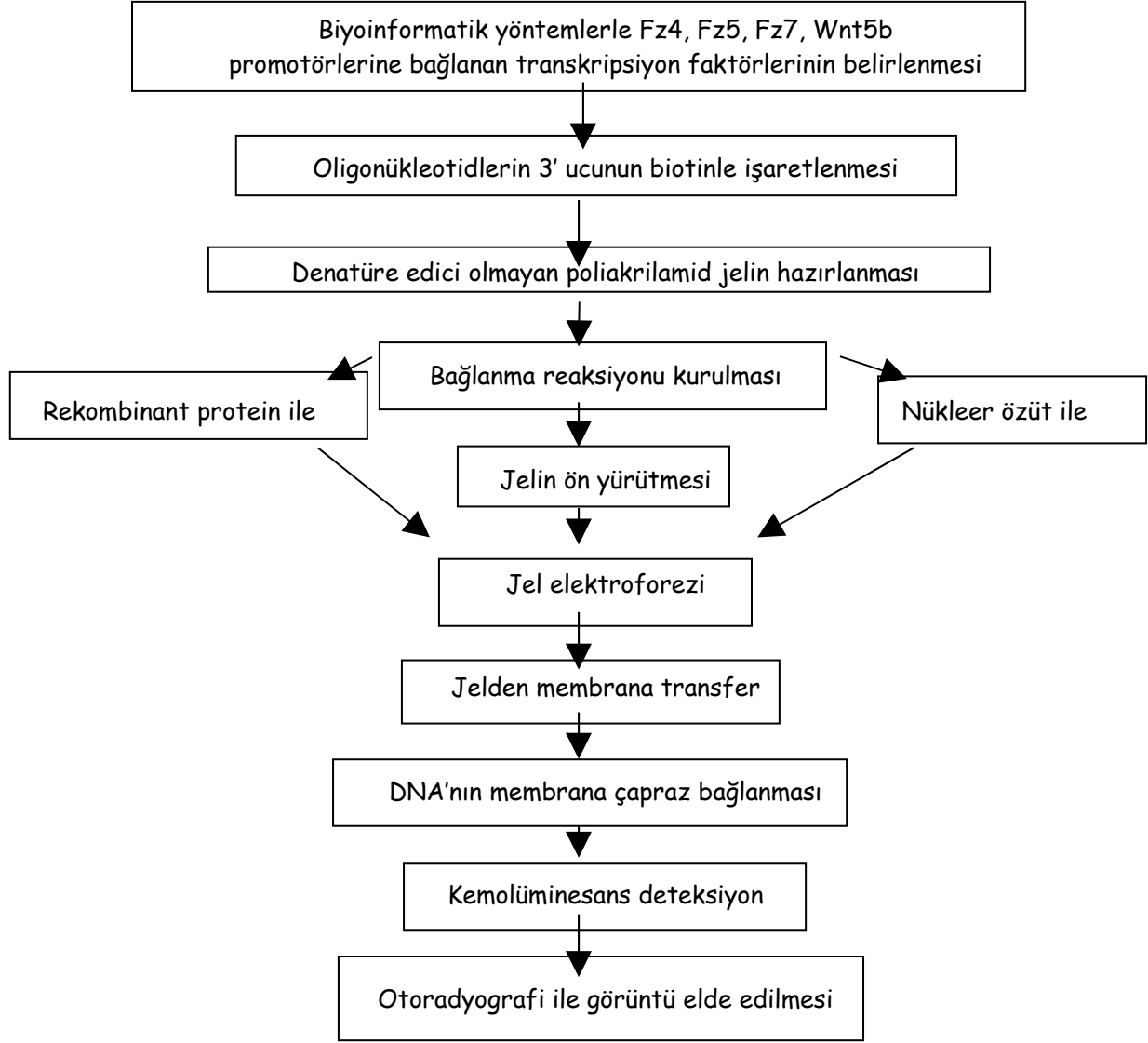
Tez çalışmasında kullandığımız GSTF'ler için, DNA bağlanma dizilerinin hipotetik olarak belirlenmesinde, **Genomatix** firmasının, **Matinspector/MatBase** modülü kullanıldı. Matinspector programı, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (73). Matinspector yazılımıyla, gen adı veya ID numarası girilerek ilgili promotör bölgeye ulaşılabilceği gibi kendi promotör dizimizi de FASTA formatında kullanabilmemize de olanak sağlar. MatBase, verisini girdiğimiz promotör bölgeyle ilişkili yapıda ve/veya fonksiyonel olarak ilişkili transkripsiyon faktörlerinin (TF:Transcription factor) gruplandırılmasını sağlar, sonuçlar grafiklerle sunulur. MatBase, TF'lerin bağlanma bölgelerine, pozisyonel ağırlık matrislerine, bağlanma bölgesi dizisi ve domainlerine, literatür referanslarına erişilebilen online üyelik sistemi ile kullanılan bir yazılımdır.

Genomatix genom analizör yazılımının **Matinspector** programından yararlanılarak elimizde bulunan Wnt5b, Fzd4, Fzd5, Fzd7 promotörleri ile etkileşebilecek transkripsiyon faktörleri hipotetik olarak belirlendi (**Şekil.20**). Dört genin promotör bölgesinde de ortak olarak bağlanma bölgesi olduğu belirlenen Sp1 (Spesifty protein1), Egr-1 (Early Growth Response Element-1), KLF1 (Krüppel Like Factor) transkripsiyon faktörleri seçildi. **CLC sekans göstericisi (CLC sequence viewer ver. 6.1)**, transkripsiyon faktörlerinin genom üzerinde bağlanma bölgelerine ulaşılmasını sağlayan biyoinformatik yazılım programıdır (74). CLC sekans göstericisi programı ile transkripsiyon faktörlerinin olası bağlanma bölgelerini içeren DNA dizileri, promotör bölgede aratıldı ve bu dizilerin birbiri üzerine katlanma yapıp yapmadığı **OLIGOS 6.0** programı yardımıyla kontrol edildi. Komplementer tek iplikli oligonükleotidler biotinle ayrı ayrı işaretlendi ve sonrasında çift iplik oluşturacak şekilde bir araya getirildi. Böylece transkripsiyon faktörleri için sentetik bağlanma bölgesi elde edilmesi amaçlandı.



Şekil.20 Genomatix matinspector programıyla Fz4, Fz5, Fz7 ve Wnt5b promotörlerine ortak bağlanan GSTF'lerin gösterimi

Sp1 proteininin bağlandığı 22 baz çifti uzunluğundaki DNA dizisi, Egr-1 ve KLF proteinlerinin bağlanma bölgelerine ait 27 baz çifti uzunluğundaki oligonükleotidler sentetik olarak sentezletirildi (Metabion). Bu DNA dizilerine bağlandığı düşünülen Sp1 (Promega, Ürün Kodu: E6391, Ana stok:215µg/ml) ve Egr-1 (Alexis Biochemicals, Ürün Kodu: ALX-201-074) rekombinant proteinleri, EMSA çalışmasında kullanıldı. Ticari olarak elde edilen saf proteinlerin yanısıra K562 hücre hattından elde edilen nükleer lizat ile de EMSA çalışmaları gerçekleştirildi. Tez boyunca izlenen işlemler **Şekil.21**'deki akış şemasında belirtilmiştir.



Şekil.21 Tez çalışması akış şeması

3.1 Araştırmanın Tipi

Uygulanan yöntem; protein-DNA ilişkisinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Tez projemiz protein-DNA etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan EMSA'nın optimize edilmesini amaçlayan deneysel bir yöntemdir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

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

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

İnsana yada deney hayvanına ait herhangi bir materyal kullanılmamıştır. Ticari olarak edinilen Sp1, Egr-1, KLF transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı dizileri içeren oligonükleotidler, saf Sp1 proteini ve nükleer lizat ile muamele edildi. EMSA yöntemi ile bu proteinlerin hedef oligonükleotidlere bağlanma koşulları optimize edildi.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda saf Sp1 proteini, Egr-1 proteini ile Sp1 proteinine özgül antikor kullanıldı. Sp1, Egr-1 ve KLF proteinleri için bağlanma dizisi barındıran oligonükleotidler sentezlettilirdi. Nükleer lizatın eldesinde K562 hücre hattı kullanıldı.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın değişkeni bulunmamaktadır.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hücre Kültürü

Western blot yönteminde kullanılmak üzere hazırlanacak nükleer lizat, Sp1 proteini için pozitif kontrol olduğu bilinen K562 hücre hattından elde edildi. K562 hücre hattının kültür koşulları aşağıda açıklanan şekilde yapıldı:

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) İverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon-Diaphot 200)
- 2) Pipetör (Greiner Labortechnik 000424NS- 9)
- 3) 1, 2, 5 ve 10 ml'lik steril pipetler (Falcon serological plastic pipette)
- 4) 25, 75,125 cm² 'lik hücre kültürüne özel filtreli kapaklı kültür kapları (Greiner Bio-one, Kat No:690175)
- 5) CO₂ inkübatörü (Heraeus)
- 6) 5ml'lik şırınga
- 7) RPMI 1640 besi ortamı (BiochromAG, Kat No: FG 1385)
- 8) FBS (Fötal Bovin Serum) (Biochrom AG, Kat No:S0115)
- 9) L-Glutamin (Biochrom AG, Kat.No:K0281)
- 10) Penisilin /Streptomisin (Biochrom AG, Kat.No:A 2210)
- 11) Steril çalışma kabini (Nüve, LN090)

Yöntem

Kültürde süspanse olarak üreyen K562 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI 1640 içerisinde üretildi. K562 hücreleri, süspanse olarak üredikleri için 1 ml'deki hücre sayısı 1.5×10^6 'da sabitlenerek 2-3 günde 1/3 oranında pasajları yapıldı.

Tüm işlemler, steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirildi. Hücrelerin inkübasyonu, 37 °C'de % 5 CO₂ 'li etüvde yapıldı.

3.6.2 Nükleer Lizat hazırlanması

Gereç ve Solüsyonlar

1. 10 ml'lik kırmızı kapaklı tüp
2. Hücre kazıyıcı (Cell Scraper)
3. Soğutmalı santrifüj
4. Fosfat tuz tamponu (PBS: Phosphate Buffered Saline)
5. Pipetör
6. 2 ml'lik ependorf tüp
7. NP-40
8. Vorteks
9. Manyetik karıştırıcı
10. Nükleer lizat eldesi için hazırlanan Tampon A (**Tablo.1**)
11. Nükleer lizat eldesi için hazırlanan Tampon C (**Tablo.2**)
12. Çalışma tamponuna eklenmek üzere proteaz ve fosfataz inhibitörleri (**Tablo.3**)

Tablo.1 Hücre hattından nükleer lizat eldesi için çalışma tamponu hazırlanması

Tampon A (50 ml)

Solüsyon	Firma	Katalog no	Konsantrasyon	Miktar
Hepes (pH 8.0)	Sigma	H-0087	1M	500 µl
MgCl ₂	Sigma	M-1028	1M	150µl
KCl	Applichem	A2939,1000	1M	500µl
DTT	İnvitrogen	12371-019	1M	50µl

Tampon A 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. +4°C'ye kaldırıldı.

Tablo.2 Hücre hattından nükleer lizat eldesi için çalışma tamponu hazırlanması

Tampon C (50 ml)

Solüsyon	Firma	Katalog no	Konsantrasyon	Miktar
Hepes (pH 8.0)	Sigma	H-0087	1M	1 ml
MgCl ₂	Sigma	M-1028	1M	75µl
Gliserol	Sigma	G-2025	%100	12,5 ml
NaCl	Applichem	A2942,1000	1M	21 ml
EDTA	Applichem	A3145,1000	0,5 M	20µl
DTT	İnvitrogen	12371-019	1M	50µl

Tampon C 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. +4°C'ye kaldırıldı.Çalışma tamponları hazırlandıktan sonra proteaz inhibitörleri taze olarak **Tablo.3**'te verilen konsantrasyonlarda eklendi. Protez inhibitör kokteyl tableti, 7 X "Complete, Mini, EDTA-Free" nin (Roche, Ürün Kodu: 11 836 170 001) 1X çalışma stoğunda olabilmesi için 400µl distile suda bir tablet çözdürüldü.

Tablo.3 Çalışma tamponuna eklenen proteaz inhibitörleri

	Ana Stok	Son Konsantrasyon	Miktar
Aprotinin	2mg/ml	100µg/ml	25 µl
Leupeptin	2mg/ml	5µg/ml	1,25µl
Miniprep EDTA	25 X	1X	20µl
PMSF	100mM	0.5 mM	2,5µl

Proteaz inhibitörleri, Tampon A/ Tampon C için ayrı ayrı eklenip her bir çalışma tamponu ile 500 µl'ye tamamlandı. Tüm işlemler buz üstünde gerçekleştirildi. Hücreleri yıkamada kullanacağımız PBS ve tamponlar buz üstünde bekletildi.

Yöntem

- 1) Hücre yoğunluğu %80 olan bir adet kültür kabındaki 4 ml hücre, 10 ml'lik kırmızı kapaklı tüpe alındı. Kültür kabının yüzeyine yapışmış hücreleri kaldırmak amacıyla hücre kazıyıcı (cell scraper) kullanıldı.
- 2) Ependorf santrifüj, +4°C' ye soğutuldu. Tüpün 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjünden sonra hücre ortamını içeren üst faz uzaklaştırıldı.
- 3) Hücreler 500 µl soğuk PBS'le 2500 rpm'de 5 dakika olacak şekilde iki kere yıkandı.

- 4) Çökelti üzerine taze olarak proteaz inhibitörlerini içeren 500 µl soğuk A Tamponu eklendi, hücreler resüspanse edildi. Hücreler 2 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Tüp buzda 15 dakika bekletildi.
- 5) Son konsantrasyonu % 0.5 olacak şekilde %100 NP-40'dan 2,5 µl, hücrelerin üzerine eklendi , 10 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
- 6) +4°C'de 6500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz atıldı. Çökeltinin üzerine 150 µl soğuk C Tamponu eklendi. Eppendorf tüpün içine en küçük boyuttaki manyetik bar atıldı. Beherin içine buz konuldu, buzun içinde 2 ml'lik ependorf tüpün pozisyonu sabitlendi. Beher, manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Manyetik karıştırıcı 30 dakika orta hızda çalıştırıldı.
- 7) 12000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz alınıp bir başka ependorfa aktarıldı, nükleer özüt alıkatlandı, -80°C'ye kaldırıldı.

3.6.2.1 Protein Ölçüm İşlemi

BIO-RAD Protein assay, kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için formüle edilmiş bir testtir. Konsantrasyonu bilinen standartların 595 nm.' de verdiği absorbanslardan yararlanılarak standart eğri grafiği çizildi. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin verdiği absorbansların standart eğri grafiğinden karşılığı hesaplanarak, protein konsantrasyonları belirlendi.

Gereç ve solüsyonlar

1. "Dye reagent" /BIO-RAD BCA Protein Assay kiti (Ürün kodu: 500- 0006)
2. Spektrofotometre küveti (Greiner: Ürün kodu: 613101)
3. Otomatik pipet seti (Eppendorf)
4. 5mg/ml Sığır serum albumin (BSA: Bovine serum albumin)

Yöntem

- 1) "Dye Reagent" tan 5 ml alınıp üzerine 20 ml distile su eklenip BCA hazırlandı. 8 adet spektrofotometre küvetine 2'şer ml olacak şekilde konuldu. 5 adet standart, 2 kör ve örnekler hazırlandı.
- 2) Küvetlerdeki tüm içerikler 1000 µl'lik pipetle karıştırıldı. 5 dakika beklenildi. (Tablo.4).

Tablo.4 Protein ölçümü için standart ve örneklerin hazırlanması

	BCA	dH ₂ O	BSA (5mg/ml)	Protein
Kör	2ml	-	-	-
Kör	2ml	-	-	-
Standart1	2ml	99µl	1µl	-
Standart2	2ml	98µl	2µl	-
Standart3	2ml	95µl	5µl	-
Standart4	2ml	90µl	10µl	-
Standart5	2ml	80µl	20µl	-
Örnek1	2ml	98µl	-	2µl
Örnek2	2ml	96µl	-	4µl
Örnek3	2ml	94µl	-	6µl

3.6.2.2 Protein miktar tayini:

İzole edilen nükleer lizatın üç farklı konsantrasyonunun spektrofotometrede (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000) 595 nm.'de absorbanları ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA kullanılarak elde edilen standart eğri yardımı ile, örneklerimizin konsantrasyonları belirlendi.

Tablo.5 Standart ve örneklerin spektrofotometre ölçümü ile elde edilen absorban değerleri

Ölçüm değerleri	Abs (595 nm)	Miktar
Standart1	0.028	1µl
Standart2	0.054	2µl
Standart3	0.160	5µl
Standart4	0.281	10µl
Standart5	0.571	20µl
Örnek1	0.176	2µl
Örnek2	0.305	4µl
Örnek3	0.423	6µl

3.6.3 Western Blot

1) Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog Numarası: 165- 3301) cihazı kullanılarak SDS (Sodyum dodesil sülfat) poliakrilamid jel elektroforezleri yapıldı.

- 2) Mini Trans-Blot Cell (Katalog No:) sistemi kullanılarak ıslak yöntem ile SDS poliakrilamid jelinden PVDF membrana transfer yapıldı.
- 3) Spesifik antikor (Santa Cruz sc-420) ile blotlama işlemi gerçekleştirildi.
- 4) “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Pierce – Katalog no:34080) kiti ile deteksiyon yapıldı.
- 5) “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (Pierce – Katalog no: 34095) kiti ile deteksiyon yapıldı.

3.6.3.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS: Sodium dodesyl sulfate) içeren Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Örneklerin yürütülebilmesi için SDS içeren poliakrilamid jel döküldü.

Gereç ve solüsyonlar

- 1) Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog Numarası: 165–3301) yürütme cihazı
- 2) Güç kaynağı
- 3) %10' luk Ayrıştırıcı (resolving) jel ve “Stacking” jel
- 4) Yürütme Tamponu (BIO-RAD 10 x Tris/Glycine/SDS Buffer, Kat. No. 161-0732)
- 5) 2X yükleme tamponu (BIO-RAD, Kat. No. 161-0737)
- 6) 50 ml.' lik ve 15 ml.' lik tüpler.
- 7) Protein işaretleyici (Fermentas, Katalog no: SM0671)

Jelin içeriği

10 ml hacminde %10'luk Ayrıştırıcı Jel:

1. 4,8 ml distile su
2. 2,5 ml %40 Akrilamid/Bisakrilamid (29:1) (BIO-RAD Kat. No. 161-0146)
3. 2,5 ml 1,5 M Tris (pH: 8.8)
4. 100 µl %10 SDS (Biological industries, 01-890-1B)
5. 100 µl %10 Amonyum per sülfat (APS: Amonium persulfate) (Applichem, A2941,0100)
6. 4 µl TEMED (Applichem, A1148,0025)

2 ml hacminde %2'lik Yükleme Jeli:

1. 2,2 ml distile su
2. 250 µl %40 Akrilamid/Bisakrilamid (29:1)

3. 250 µl 1M Tris (pH: 6,8)
4. 20 µl %10 SDS
5. 20 µl %10 APS
6. 4 µl TEMED

Yöntem:

Jelin Hazırlanması

1. BİO-RAD'a ait western blot camları distile suyla yıkanıp kurulandıktan sonra iç yüzeyleri %70 alkol ile iki kez silindi. Ardından izopropanol (Sigma, Kat. No. I-9516) ile bir kez silindi. Camların arasına kalınlığı 1mm olan spacerlar yerleştirildi. Silinmiş yüzeyler birbirine bakacak şekilde bir araya getirildi. Camlar düzeneğe yerleştirildi.
2. Ayırıştırıcı jel döküldükten sonra polimerizasyona kadar jel üzerine bir miktar izopropanol eklendi. Jel donduktan sonra aparat yan tutularak izopropanol döküldü. Fazlası kurutma kağıdına emdirildi. Ardından yükleme jeli, ayırıştırıcı jel üzerine döküldü. Tarak bu jel üzerine yerleştirildi.
3. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkarıldı ve sisteme yeteri kadar yürütme tamponu eklendi. Kuyucuklar bu tampon ile yıkanarak kuyucukta kalmış olabilecek akrilamid uzaklaştırıldı. Hücre lizatı denatüran yükleme tamponu ile karıştırılıp, ısıtılarak denatüre edildikten sonra jele yüklendi.

Örneğin Hazırlanması

1. Örneğin karıştırılacağı örnek tamponu hazırlandı. 95 µl Laemmli sample (BIO-RAD, Kat. No. 161-0737) üzerine 5µl β-merkaptolanol eklendi. Örnek ile 1:1 oranında 2X Laemmli sample bir araya getirildi. Mikro santrifüj tüplerine 30 µg protein içerecek konsantrasyonda lizat alındı.
2. SDS'li örnekte disosiyasyonun tam olması için 95°C thermal blokta 5 dakika inkübe edildi.

Örneklerin Yüklmesi

1. Örnek ince uçlu bir pipetle kuyucuğa yüklendi. Aynı zamanda jele kontrol amaçlı 5µl protein ağırlık belirteci (marker) (Fermentas, Katalog no: SM0671) yüklendi.
2. 120 V' da protein işaretleyicisinin tamamen açıldığı yere kadar Mini-PROTEAN® 3 Cell cihazında 1 saat elektroforez gerçekleştirildi.

3. Yürütme işlemi sonrasında jel elektroforez tankından alınarak, cam plakalardan ayrıldı.
4. Yükleme jeli kesilip atıldı.
5. PVDF membrana ıslak transfer yapıldı.

3.6.3.2 Membrana “Islak” Yöntem İle Transfer:

Gereçler ve Solüsyonlar

- 1) “Mini Trans-Blot Cell” ıslak transfer sistemi (BIO-RAD, Katalog Numarası: 165–3301)
- 2) PVDF membran (0.45 µm, Applichem, A5243,3030R)
- 3) Transfer tamponu (BIO-RAD Premixed 10X Tris/Glycine Buffer, 161-0734)
- 4) Hybond Blotlama kağıdı (Amersham Biosciences, RPN6101M)
- 5) Güç kaynağı

Yöntem:

1. Jel büyüklüğünde PVDF membran ve whatman kağıtları kesildi.
2. Transfer tamponu ile whatman kâğıtları, jel ve süngerler ıslatıldı.
3. Membran 1 dakika metanolde iyice ıslatıldı ve distile su ile yıkandı.
4. “Mini Trans-Blot Cell” cihazına aşağıda belirtilen sırada kağıt, membran ve jel yerleştirildi:
 - En alta kalın sünger
 - 2 adet Whatman kâğıdı
 - Üzerine membran
 - Üzerine poliakrilamid jel
 - Üzerine 2 adet Whatman kâğıdı
 - En üste ince sünger kasede yerleştirildi. Membran ve jel arasında baloncuk kalmaması için süngerlerin üstünden pipetle geçildi. 1X Transfer tamponu kabın içine balık atıldı, buz kalıbı yerleştirildi.
 - 300 mA’de 1,5 saat transfer yapıldı.

Gereçler:

- 1) 1X TBST (Tris buffered saline – %0,05 Tween 20)
- 2) Transferi yapılmış membran

- 3) Süt tozu (Applichem, A0830,1000)
- 4) Primer antikor (Santa Cruz, sc-2004)
- 5) Sekonder antikor (Santa Cruz, sc-2005)
- 6) ECL kiti.

Yöntem:

1. Membran transferden sonra TBST içinde 1 kere çalkalandı. % 5 süt tozu içeren TBST içerisinde 1 saat membran blotlandı.
2. 4 °C’ de % 5 Süt tozu, primer antikor (Santa Cruz Sp1(1C6) sc-20) (Dilüsyon oranı 1:1000) içeren TBST içerisinde bir gece boyunca membranın blotlanmasına devam edildi.
3. Membran 5 dakikada bir 6 kez TBST ile yıkandı.
4. %5 oranında süt tozu ve sekonder antikor (Santa Cruz, Goat-anti Mouse, sc-2005) içeren TBST içerisinde iki saat inkübe edildi.
5. Membran 5 dakika ara ile 6 kez TBST ile yıkandı.

3.6.3.3 Sinyal saptanması:

Gereçler:

- 1) SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific,34080)
- 2) SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, 34095)
- 3) “Exposure Cassette” (Kodak, X-Omatic – Seri no:1482277)
- 4) Poşet dosya
- 5) Film (Kodak, Biomax Light Film - Katalog no: 8761520 ve Kodak Medical X – ray Film Katalog no: 8143059)

Yöntem:

1. “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” veya “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı.
2. Membran 5 dakika boyunca bu karışım içerisinde inkübe edildi.
3. Bir poşet dosya içerisine alınıp kaset içerisine yerleştirildi.
4. Kaset içerisine karanlık odada film yerleştirildi.

5. 1 saniye'den 5 dakika' ya kadar olan farklı zaman aralıklarında film kaset içerisinde tutulup, görüntü elde edildi.

3.6.4 DNA'nın 3' ucunun Biotinle İşaretlenmesi

DNA'nın 3' ucunun biotinle işaretlenmesi "PIERCE Biotin 3' End Labeling Kit" (Thermo Scientific/Pierce, Ürün Kodu: 89818) kullanılarak yapıldı. Biotin suda çözünebilen bir vitamindir. Pirimidin halkasının beşinci karbonuna kovalent bağlanır. Kit Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile 1-3 biotinli ribonükleotidi (Biotin 11-UTP), oligonükleotidin 3'-OH ucuna eklemektedir. Bu yöntem oligonükleotidlerin tek tek işaretlenip daha sonra çift zincir haline getirilmesi durumunda daha etkili çalışmaktadır. Fakat aynı zamanda 3' ucu çıkıntılı veya küt uçlu çift iplik DNA'ların daha düşük etkinlikle işaretlenmesinde de kullanılmaktadır.

Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulandı. Biotinle işaretlemede kullanılacak oligonükleotidlere ait diziler **Tablo.6**'da gösterilmiştir. Sp1 mutant oligonükleotidinin, Sp1 proteininin bağlanma kontrolü olarak kullanılması amaçlandı. Sp1 proteinin bağlanacağı motifte iki nükleotid bazında değişiklik yapıldı.

Tablo.6 Biotinle işaretlemede kullanılacak oligonükleotidlere ait DNA dizileri (Kırmızı ile işaretlenmiş kısım Sp1 proteinin bağlanma motifini göstermektedir. Mutant Sp1 oligonükleotidinde değiştirilen nükleik asit bazları kırmızı ile işaretlenmiştir)

Primer	Dizi	Ürün büyüklüğü
Sp1(F) Sp1(R)	5'ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C 3' 5'GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T 3'	22bp 22bp
Egr-1 (F) Egr-1 (R)	5'CAG GGG CTC TCG GGG GCG GAT AGA GGA3' 5' TCC TCT ATC CGC CCC CGA GAG CCC CTG 3'	27bp 27bp
KLF (F) KLF (R)	5'GAG CCA GCA GGG AAG GGC TGT GGC ATC3' 5' GAT GCC ACA GCC CTT CCC TGC TGG CTC3'	27bp 27bp
Mutant Sp1 (F) Mutant Sp1 (R)	5'ATT CGA TC G GTT CGG GGC GAG C 3' 5' GCT CGC CCC GAA CCG ATC GAA T 3'	22 bp

Gereç ve Solüsyonlar:

1. Ultra saf su
2. İşaretleme için 1µM oligonükleotidler (**Tablo.6**)
3. 37°C ısı bloğu (Techne Dri-Block® DB-2D) veya su banyosu

4. 0.2 M EDTA, pH 8.0
5. Kloroform: izoamilalkol (24:1)
6. Mikrosantrifüj tüpleri ve mikrosantrifüj (Eppendorf, Mini spin)

Kit İçeriği:

1. 5X TdT reaksiyon tamponu
2. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)
3. Biotin-11-dUTP
4. İşaretlenmemiş Kontrol Oligonükleotid (5pmol)
5. Biotin-Kontrol Oligonükleotid

Yöntem

1. TdT dışındaki tüm kit içerikleri çözdürülüp, buz üstüne yerleştirildi. TdT kullanılabildiği kadar -20°C’de tutuldu.
2. Kullanımdan hemen önce stok 20U/μl TdT, 1X TdT reaksiyon tamponu içinde 2U/μl çalışma konsantrasyonuna dilüe edildi. TdT hemen kullanıldı.
3. İşaretleme reaksiyonu **Tablo.7**’de belirtilen sırada gerçekleştirildi. 5pmol 3'-OH ucu olan oligonükleotidler kullanıldı. Reaksiyon içeriği, vortekslenmeden, dikkatlice karıştırıldı.

Tablo.7 Tek iplik oligonükleotidlerin biotinle işaretleme reaksiyon içeriği

Komponent	Hacim	Son Konsantrasyon
Saf su	25μl	-
5X TdT Reaksiyon tamponu	10μl	1X
İşaretlenmemiş oligonükleotid (1μM)	5μl	100nM
Biotin-11-dUTP (5 μM)	5μl	0.5μM
Dilüe TdT (2U/μl)	5μl	0.2U/μl
Toplam Hacim	50μl	-

4. Reaksiyon 37 °C’de ısı bloğunda 30 dakika inkübe edildi.
5. Her tüpteki reaksiyonu durdurmak için 2.5μl 0.2M EDTA eklendi.
6. TdT’yi uzaklaştırmak için her reaksiyona 50μl kloroform:izoamilalkol eklendi. Kısa

süre vortekslenildi, fazları birbirinden ayırmak için maksimum hızda 1-2 dak. santrifüj yapıldı. Üst faz ayrı ayrı tüplere alındı.

7. İplikler 1:1 oranında “Thermal Cycler” veya ısı bloğunda bir araya getirildi.

3.6.5 İşaretlenmiş oligonükleotidlerin bir araya getirilmesi:

Gereç ve solüsyonlar

1. Thermal cycler (Techne, Ürün kodu: TC-3000X)
2. 0.2 ml’lik PCR tüpleri
3. Standart pipet seti

Yöntem

Biotinle işaretlenmiş ileri ve geri oligonükleotidler **Tablo.8**’de belirtilen ısı profiline uyularak, 1:1 oranda bir araya getirildi. Bir araya getirme işleminden sonra biotin işaretli, çift iplikli DNA alikatlandı ve -20 °C’de stoklandı. Hazırlanan oligonükleotidler, EMSA işleminde kullanılmadan önce 20fmol/μl’ye dilüe edildi.

Tablo.8 Biotinle işaretlenmiş tek iplik oligonükleotidlerin bir araya getirilmesi için kullanılan ısı profili

	Derece	Zaman	Döngü
1. Basamak	95 °C	5 Dakika	1 döngü
2. Basamak	95 °C (-1°C/Döngü)	1 Dakika	40 döngü
3. Basamak	55 °C	30 Dakika	1 döngü
4. Basamak	55 °C (-1°C/Döngü)	1 Dakika	20 döngü
5. Basamak	4 °C	HOLD	

3.6.6 EMSA ile nükleik asit-protein hedefinin belirlenmesi

EMSA reaksiyonunda spesifik transkripsiyon faktörü-DNA etkileşiminin kurulması için “LightShift Chemiluminescent EMSA Kit” (Thermo Scientific/ PIERCE, Ürün Kodu: 20148) kullanıldı. Bütün EMSA deneylerinde, 10X bağlanma tamponu, reaksiyon başına 2 μl, %50 gliserol 1 μl, 100mM MgCl 1μl, %1 NP-40 1 μl kullanıldı. Jelin 20 dakika 110V’da ön yürütmesi yapıldı. Yöntem, üretici firmanın belirttiği şekilde uygulandı.

Uygulanacak Prosedür

- a) Bağlanma reaksiyonlarının planlanması

- b) Jelin hazırlanması ve ön yürütmesi
- c) Bağlanma reaksiyonunun hazırlanması ve gerçekleştirilmesi
- d) Bağlanma reaksiyonunun elektroforezi
- e) Bağlanma reaksiyonlarının naylon membrana elektroforetik transferi
- f) Transfer edilmiş DNA'nın membrana çapraz bağlanması
- g) Biotin işaretli DNA'nın kemoluminesan ile belirlenmesi

Kit içeriği:

1. 10X Bağlanma tamponu (100mM Tris, 500mM KCl, 10mM DTT; pH 7.5)
2. Biotin-EBNA Kontrol DNA
3. İşaretlenmemiş EBNA DNA
4. Epstein-Barr Nükleer Antijen (EBNA) Özütü
5. Poly(dI.dC)
6. %50 Gliserol
7. %1 NP-40
8. 1M KCl
9. 100 mM MgCl₂
10. 200 mM EDTA pH 8.0
11. 5X yükleme tamponu

Gereç ve Solüsyonlar:

1. 3' veya 5' ucundan biotin işaretli DNA hedefi
2. İnternal olarak biotin işaretleme yapılan problemler kullanılmamalı
3. UV cross linker (Stratagene, 254 nm bulb/ 312 nm bulb transilluminatör)
4. Elektroforez aparatları
5. Elektrobloetter veya kapiller transfer aparatı
6. + yüklü naylon membran (Thermo Scientific, Biotin B Pre Cut Modified, Ürün Kodu: 77016)
7. "Power supply" (Thermo, Ürün kodu: EC 250-90)
8. 5X TBE (450mM Tris, 450 mM Borik asit, 10 mM EDTA, pH 8.3) (Applichem, A4228,5000PE)
9. X-ray film

10. Yüksek kalite blotting kağıdı (Hybond Blotting paper-Amersham Biosciences, Ürün kodu: RPN6101M)
11. Su banyosu
12. Plastik pens
13. 0.5X TBE’de poliakrilamid jel

3.6.6.1 0.5X %6’lık poliakrilamid jel hazırlanması

Denature edici olmayan %6’lık poliakrilamid jel **Tablo.9**’da belirtilen miktarlarda hazırlandı.

Gereç ve Solüsyonlar:

- 1) Akrilamid /Bisakrilamid solüsyonu (%40, 29:1)
- 2) Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)
- 3) TEMED
- 4) 0.5X TBE (Tris-borik asit-EDTA)
- 5) 1mm’lik Spacer
- 6) Vertikal elektroforez camları
- 7) Thermo Scientific Vertikal elektroforez sistemi (Model P81)

Tablo.9 10 ml hacminde %6’lık Denatüre edici olmayan jel hazırlanması

Ürün	Firma	Kat No.	Miktar
5X TBE (pH 8.3)	Applichem	A4228,5000	1ml
%40 Acr/Bis	Applichem	A3757,0250	1.5 ml
%99 Gliserol	Sigma	G-2025	0.5 ml
dH ₂ O			7.00 ml
TEMED	Applichem	A1148,0025	10 µl
APS	Applichem	A2941,0100	200 µl

Yöntem:

Jelin Hazırlanışı:

- 1) Jeli dökeceğimiz camlar bol distile su ile temizlendi, kurulandı.
- 2) Camların iç yüzeyleri % 70’lik etil alkol ile bir kez, izopropanol ile üç kez silindi.
- 3) İki cam arasına kalınlığı 1mm olan “Spacer” (aralayıcı) yerleştirilerek kısıkaçlar ile iki cam birbirine tutturuldu.

- 4) Akrilamid /Bisakrilamid solüsyonu, %50'lik gliserol , 5X TBE, dH₂O **Tablo.9**'da belirtilen miktarlarda bir araya getirildi.
- 6) Jel dökülmeden önce APS ve TEMED eklendi.
- 7) 10 ml'lik pipet aracılığı ile iki cam arasına hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü ve kuyucukları oluşturan tarak yerleştirildi.
- 8) Jel donduktan sonra 0.5X TBE'de oda sıcaklığında 25 dakika, 100 V'luk akım uygulandı. Polimerize olmamış akrilamidin uzaklaşması, jelin her tarafında ısının eşit dağılması için ön yürütme her denemede mutlaka tekrarlandı.

a) Bağlanma reaksiyonlarının planlanması

Bağlanma reaksiyonları, üretici firmanın önerdiği şekilde, kontrol-EBNA sistemi ve test sistemi olmak üzere iki tipte hazırlandı. Kontrol sistemi, üretici firmanın sağladığı EBNA özütü ve biotin işaretli EBNA oligonükleotidi ile gerçekleştirildi. Üretici firmanın belirttiği şekilde EMSA kontrol sisteminin anlaşılması ve kit içeriklerinin çalışıp çalışmadığının belirlenmesi amacıyla deney kuruldu. Kontrol deneyinde kit içeriğinde bulunan Epstein Barr Nükleer Antijenine (EBNA: Epstein Barr Nuclear Antigen) ait özüt ve bu proteinin bağlanma bölgesini içeren 60 baz çifti uzunluğunda oligonükleotid kullanıldı. Bağlanma motifi 5'-TAGCATATGCTA-3' dizisini içermektedir. Oligonükleotidin 5' ucu biotin işaretlidir. Reaksiyon içinde DNA'nın son konsantrasyonu 20 fmol'dür. Ayrıca biotin işaretli DNA'nın 200 katı konsantrasyonda işaretlenmemiş DNA dizisi de kontrol olarak kullanıldı. İşaretlenmemiş DNA'nın reaksiyondaki son konsantrasyonu 2 pmol'dür. Üretici firma bağlanma reaksiyonu için inkübasyon süresini oda sıcaklığında 20 dakika olarak önermiştir. Bağlanma reaksiyon sisteminin planlanması için **Tablo.10** rehber olarak kullanıldı. Deneyde, %6'lık denature edici olmayan jel kullanıldı. Reaksiyon oda sıcaklığında kuruldu (21°C), örnekler 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 0.5X TBE'de 20 dakika jelin ön yürütmesi gerçekleştirildi. Örnekler 100 Voltta, 1saat 15 dakika yürütüldü. Örnekler 380 mA'lık akım uygulanarak, DNA jelden, pozitif yüklü naylon membrana aktarıldı. Naylon membrana yalnızca DNA bağlanabilmektedir. Bu işlem 45 dakikada tamamlandı. DNA, UV çapraz bağlayıcı ile naylon membrana bağlandı. Kitin içeriğinde bulunan kemoluminesans deteksiyon sistemi ile biotin streptavidinle işaretlendi. Pozlama (exposure) 3 dakikada alındı. Her bir bağlanma reaksiyonu 20µl olup 20fmol Biotin-EBNA kontrol DNA'sı içermektedir.

Tablo.10 Kontrol-EBNA sistemi için bağlanma reaksiyonu

Kontrol Reaksiyonları				
İçerik	Son Konsantrasyon	#1	#2	#3
dH ₂ O	-	12µl	11µl	9µl
10 X Bağlanma Tamponu	1 X	2µl	2µl	2µl
%50 Gliserol	%2.5	1µl	1µl	1µl
10 mM MgCl ₂	5mM	1µl	1µl	1µl
1µg/µl PolydI.dC	50ng/µl	1µl	1µl	1µl
%1 NP-40	%0.05	1µl	1µl	1µl
İşaretlenmemiş EBNA DNA	4pmol	-	-	2µl
EBNA ekstraktı	1Unit	-	1µl	1µl
Biotin EBNA Kontrol DNA	20fmol	2µl	2µl	2µl
Toplam Hacim		20µl	20µl	20µl

Test sisteminin planlanması ve optimize edilmesi için **Tablo.11** rehber olarak kullanıldı. Test sistemi için:

1. Özgül bağlanma koşullarının bilinmediği durumlar için minimal reaksiyon komponentleri (örn 10X bağlanma tamponu ve poly (dI·dC) biotin işaretli hedef DNA, protein özütü ve test sisteminin işaretlenmemiş DNA'sı ile birlikte) kullanıldı.
2. Test sisteminin optimizasyonunda protein-DNA bandının oluşumu KCl, gliserol, MgCl₂ ve deterjan gibi diğer komponentlerin katılması ile güçlendirildi.
3. Poly (dI·dC) özgül olmayan DNA yarışmacısıdır. Özgül olmayan protein-DNA etkileşimlerinin engellenmesi amacıyla polydI/dC kullanıldı. Test sistemindeki hedef DNA sekansının G-C zengin olduğu durumlar için poly(dA·dT), sonike edilmiş dana timüsü DNA'sı, salmon spermi DNA'sı veya E.coli DNA'sı reaksiyon içeriğine eklenebilir.
4. Nükleer özüt ve biotin işaretli hedef DNA'nın eklenmesi DNA-protein kompleksinin özgüllüğünü etkileyebilir. Bağlanma reaksiyonu içerikleri her zaman **Tablo.10**'da belirtilen sırada eklendi.
 5. Özgül olmayan etkileşimlerin üstesinden gelmek için biotin işaretli DNA'yı koymadan önce kısa bir ön-inkübasyon gerçekleştirildi.
 6. Bağlanma koşulları 21-23 °C'lik oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
 7. Optimizasyon için reaksiyon bileşenlerinden yalnız biri değiştirildi.

Tablo.11 Test sistemi için bağlanma reaksiyonları

Kontrol Reaksiyonları				
İçerik	Son Konsantrasyon	#1	#2	#3
dH ₂ O	-			
10 X Bağlanma Tamponu	1 X	2µl	2µl	2µl
1µg/µl PolydI.dC	50ng/µl	1µl	1µl	1µl
Opsiyonel: %50 Gliserol				
Opsiyonel: %1 NP-40				
Opsiyonel: 100 mM MgCl₂				
Opsiyonel: 1M KCl				
Opsiyonel: 200mMEDTA				
İşaretlenmemiş DNA	4 pmol	-	-	
Protein ekstraktı	Sistem Bağımlı	-		
Biotin İşaretli DNA	20 fmol			
Toplam Hacim	-	20µl	20µl	20µl

b) Jelin hazırlanması ve ön yürütmesi

1. 0.5X TBE’de native poliakrilamid jel hazırlandı. Elektroforez ünitesi 0.5X TBE ile dolduruldu, kuyular dolduruldu ve 30-60 dakika ön-yürütme gerçekleştirildi. 8x8x0.1 cm’ lik jel için 100 V gerilim uygulandı.

2. Jelin ön yürütmesi yapılırken bağlanma reaksiyonu hazırlandı.

c) Bağlanma reaksiyonunun hazırlanması ve gerçekleştirilmesi

1. Bütün reaksiyon içerikleri eritildi ve buz üstüne konuldu. Kullanılana kadar EBNA özütü/nükleer özüt/saf protein çözülmedi.

2. Kontrol EBNA sistemi/Test sistemi için 20µl’lik bağlanma reaksiyonları hazırlandı (**Tablo 10-11’e göre**).

3. Bağlanma reaksiyonu oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.

4. Her bir 20 µl’lik bağlanma reaksiyonuna 5µl, 5X yükleme tamponu eklendi. Birkaç kez nazikçe pipetaj yapıldı. Vorteks veya kuvvetli karıştırma yapılmadı.

d) Bağlanma reaksiyonunun elektroforezi

1. Ön yürütmesi yapılan jelin akımı kesildi.

2. Kuyulara her bir örnekten 20 µl yüklendi.

3. 8x8x0.2 cm’lik jel için 100v’luk akım uygulandı.

4. Bromfenol mavisi, jelin 2/3-3/4 oranında ilerlemelidir. Serbest biotin EBNA kontrol DNA dubleksinin %6'lık jelde bromfenol mavisinin biraz arkasında olacak şekilde göç ettiği gözlemlendi. Akım kesildi.

e) Bağlanma reaksiyonlarının naylon membrana elektroforetik transferi

1. Naylon membran 0.5X TBE'de 10 dakika kadar iyice ıslatıldı.
2. Sandwich hazırlandı. ~10°C'ye kadar soğutulmuş 0.5X TBE transfer kabına eklendi. Sandwich hazırlanırken, Western blotta kullanılan süngerlerin kullanılmamasına dikkat edildi.
3. 380mA (~100V) 45 dakika transfer yapıldı.
4. Membranın kurummasına izin verilmedi.

f) Transfer edilmiş DNA'nın membrana çapraz bağlanması

DNA, 120 mJ/cm² UV Crosslinker ile 45 saniyede (254 nm) naylon membrana çapraz bağlandı.

g) Biotin işaretli DNA'nın kemoluminesan ile belirlenmesi

8x10 cm'lik membran için tavsiye edilen; orbital karıştırıcıda tüm bloklayıcı ve deteksiyon inkübasyonları yeni kaplarda gerçekleştirildi.

1. Bloklama tamponu ve 4X yıkama tamponu 37-50 °C su banyosunda eriyene kadar ısıtıldı.
2. Membranın bloklanması için 20 ml bloklama tamponu eklenmeli ve 15 dakika çalkalayıcıda tutuldu.
3. Konjuge/ Bloklama tampon solusyonunun hazırlanması; 66.7µl stabilize edilmiş Streptavidin-HRP, 20 ml Bloklama tamponuna eklendi
4. Membrandan bloklama tamponu dökülüp konjuge/bloklama solusyonu ile yer değiştirildi. Konjuge/bloklama tampon solusyonunda membran 15 dakika tutuldu.
5. 40 ml 4X yıkama tamponuna 120 ml ultrapure su eklenerek 1X'lik yıkama solüsyonu hazırlandı.
6. Membran yeni bir kaba alınır. 1X'lik yıkama solüsyonu ile çalkalandı.
7. Membran her 5 dakikada bir 4 kere 20 ml 1X yıkama solüsyonu ile çalkalayıcıda tutuldu.
8. Membran yeni bir kaba alındı. 30 ml "Substrat Dengeleme" tamponu eklendi. Karıştırıcıda 5 dakika boyunca inkübe edildi.

9. Substrat çalışma solüsyonu; 6 ml “Luminol/Enhancer” solusyona 6 ml “Stable peroxide” solüsyonu eklenerek hazırlandı.
10. Substrat dengeleme tamponu uzaklaştırıldı. Membran yeni bir kaba alındı.
11. Substrat çalışma solüsyonu membrana aktarıldı ve tüm yüzeyi kaplaması sağlandı. Membran bu solüsyonda 5 dakika çalkalayıcı kullanılmadan bekletildi.
12. Membran çalışma solüsyonundan uzaklaştırıldı. Kağıt havlu ile tampon uzaklaştırıldı, membranın kurummasına izin verilmedi.
13. Membran, plastik dosya kağıdı ile sarıldı. Membranda kalmış olabilecek tamponun fazlası plastik membranı kaplayan plastik dosyanın üzerinden kağıtla geçilerek emdirildi.
14. Film kasedine yerleştirip 2-5 dakika X-ray filmde tutuldu.

3.7 Araştırma Planı ve Takvim

Tez boyunca gerçekleştirilen konu seçimi, literatür araştırması, optimizasyon, deneyler, sonuçların değerlendirilmesi, tez yazımı **Tablo.12**'de belirtilen süreler içinde tamamlanmıştır.

Tablo.12 Araştırma zaman çizelgesi

	2009						2010						
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6
Konu Seçimi	X												
Literatür Araştırması	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Optimizasyon					X	X	X						
Deneyler							X	X	X	X	X	X	
Sonuçların Değerlendirilmesi									X	X	X	X	
Tez Yazım										X	X	X	X

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Deneyler araştırma takviminde belirtilen süre içerisinde optimize edilip, tamamlanmıştır. Laboratuvar ortamının sıcaklık ve nem gibi değişkenleri sabit tutulamadığı için kurulan deneyler, sıcaklık ve nem değişimlerinden etkilenmiştir. Oda sıcaklığı deney kurulmadan önce ölçülerek, kurulan tüm deneylerin benzer koşullarda gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Radyoaktif izotoplar ile çalışılmaya uygun laboratuvar ortamı bulunmaması, örneklerin radyoaktif olmayan yöntemle işaretlenmesine neden olmuştur. Bu durum elde edilen bant verimliliğini dūřürmüřtür. Ticari olarak edinilen rekombinant proteinler bu tip çalışma için uygun olmamaktadır. Kullanılan ürünlerin yurt dışından getirilmesi sürecindeki aksamalar planlanan sürecin uzamasına neden olmuştur. Aynı zamanda ürünlerin yüksek fiyatlı olması ve bittiğinde yurt dışından gelme süreci göz önüne alındığında yapılması planlanan deneme sayısı sınırlanmaktadır.

3.10 Etik Kurul Onayı

Ektedir.

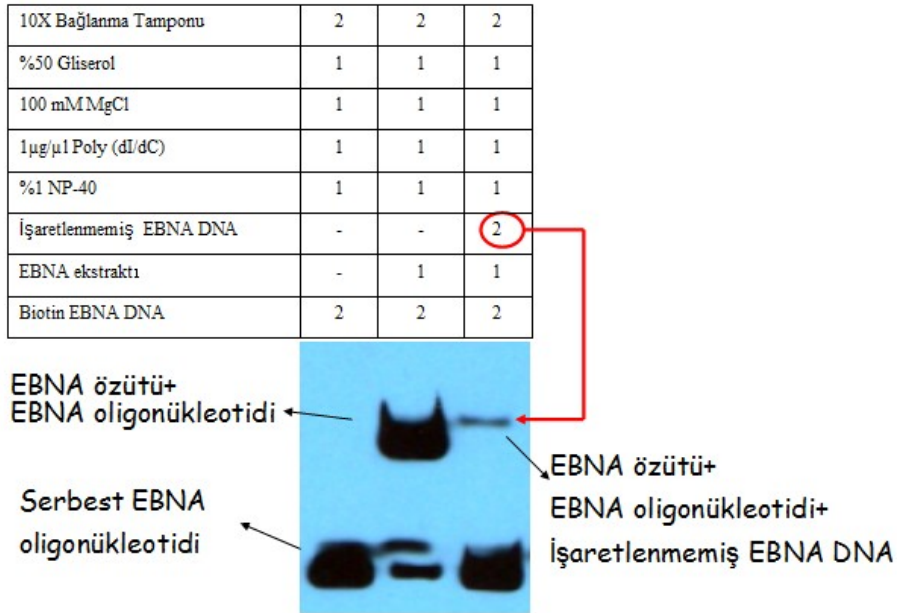
4. BULGULAR

“Pierce LightShift Chemiluminescent EMSA Kit”in anlaşılması ve optimizasyonu için üç farklı tipte deney kuruldu:

- Üretici firmanın sağladığı EBNA özütü ve EBNA DNA’sı ile kontrol sisteminin denenmesi,
- Ticari olarak edinilen saf Sp1 proteini ve Egr-1 proteini ile test sisteminin optimize edilmesi,
- K562 hücre hattından elde edilen nükleer lizat ile test sisteminin optimize edilmesi

a) Kontrol Sisteminin denenmesi

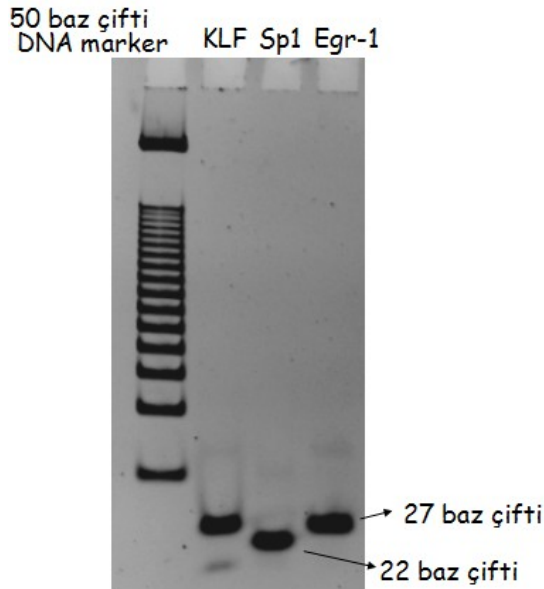
Serbest EBNA DNA’sının, EBNA proteini ile kompleks oluşturarak, jelde serbest DNA’dan geride kaldığı gözlemlendi. İşaretlenmemiş oligonükleotidlerin varlığında, işaretlenmiş oligonükleotidler, -aralarındaki yarışmadan dolayı- daha az miktarda protein bağlayabilmektedir. Bu nedenle üçüncü kuyuda EBNA proteinine bağlanan işaretli DNA miktarındaki azalma nedeniyle daha zayıf bir sinyal elde ettik.



Şekil.22 Kontrol sisteminin EBNA özütü ve biotin işaretli EBNA DNA’sı ile test edilmesi (%6’lık Denatüre edici olmayan jelde 100V’da 75 dakika)

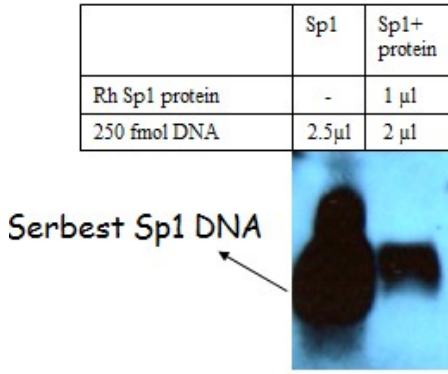
b) Ticari olarak edinilen proteinler ile test sisteminin optimize edilmesi

Oligonükleotidlerin bir araya getirilmesi: Ana stoğu 100 pmol olan biotinle işaretlenmemiş Sp1, Egr-1, KLF oligonükleotidlerinin her biri 1M NaCl, 1M Tris pH 7.6, 0.5M EDTA pH 8.0 içeren çözelti ile 1:1 oranda karıştırılarak, bir araya getirildi. Biotinle işaretlenmemiş DNA dizileri femtomol konsantrasyonda etidyum bromür ile belirlenemediği için çift iplikli dizilerin son konsantrasyonu 1 pmol olacak şekilde bu çözelti içinde dilüe edildi. İşaretlenmemiş çift iplik 1pmol konsantrasyondaki diziler, %6'lık poliakrilamid jelde yürütüldü. Poliakrilamid jel, etidyum bromür ile boyandı. İpliklerin bir araya geldiği gözlemlendi (**Şekil.23**).



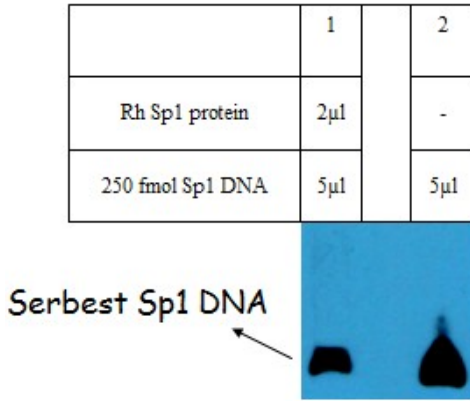
Şekil.23 %6'lık denature edici olmayan jelde işaretlenmemiş, çift iplik Sp1, Egr-1, KLF'nin yürütülmesi

Saf Sp1 proteini, 3' uçları işaretlenmiş "Sp1 çift iplik DNA" ile inkübe edildi. %6'lık denatüre edici olmayan jel hazırlandı. DNA-Sp1 protein kompleksine ait görüntü elde edilemedi (**Şekil.24**).



Şekil.24 Saf Sp1 proteinin, Sp1 DNA'sı ile inkübe edilmesi (%6'lık jel, 100V, 1 saat)

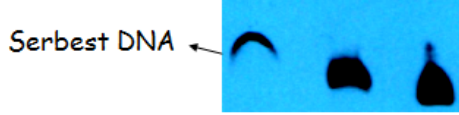
Bir önceki deneyde, protein-DNA kompleksi elde edilememesi üzerine, bağlanma reaksiyonunda kullanılan protein ve DNA miktarının artırılmasına karar verildi. Saf Sp1 proteinin ve biotin-Sp1 DNA'sının bağlanma reaksiyonundaki konsantrasyonu iki katına çıkarıldı. Bağlanma reaksiyonuna $MgCl_2$ katılmadı. %6'lık denature edici olmayan jel kullanıldı. Protein-DNA kompleksi elde edilemedi. Kompleks oluşumunun protein ve DNA konsantrasyonunun artışından etkilenmediği gözlemlendi (**Şekil.25**).



Şekil.25 Bağlanma reaksiyonunun saf Sp1 proteininin ve biotin-Sp1 DNA'nın iki katı konsantrasyonda, $MgCl_2$ 'süz kurulması. (%6'lık jel, 100 V, 1 saat)

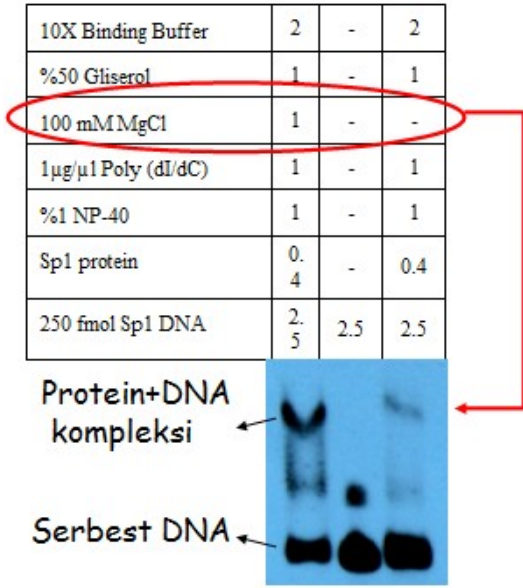
Bağlanma reaksiyonu, test sisteminde önerilen 1M KCl ve 200mM EDTA'nın varlığında ve yokluğunda saf Sp1 proteini ve biotin-Sp1 DNA ile kuruldu. %6'lık jel hazırlandı. Protein-DNA kompleksinin varlığı gösterilemedi (**Şekil.26**).

10X Bağlanma Tamponu	2µl	2 µl	-
%50 Gliserol	1µl	1 µl	-
100 mM MgCl	1 µl	1 µl	-
1µg/µl Poly (dI/dC)	1 µl	1 µl	-
%1 NP-40	1 µl	1 µl	-
KCl	1 µl	-	-
EDTA	1 µl	-	-
Rh Sp1 protein	2 µl	2 µl	-
250 fmol Sp1 DNA	5 µl	5 µl	5 µl



Şekil.26 KCl ve EDTA varlığında/yokluğunda biotin-Sp1 DNA ve saf Sp1 proteinini içeren bağlanma reaksiyonunun kurulması (%6'lık jel, 100 V, 1 saat)

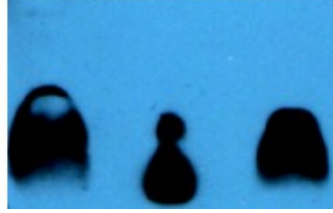
Biotin-Sp1 DNA, MgCl₂ varlığı ve yokluğunda saf Sp1 proteini ile inkübe edildi. MgCl₂ varlığında DNA-protein kompleksine ait güçlü bir bant elde edilirken, MgCl₂ kullanılmayan bağlanma reaksiyonunda protein-DNA kompleksine ait bandın zayıf olduğu gözlemlendi. Bu durum Sp1 proteinin MgCl₂ varlığında bağlanma bölgesine daha güçlü bağlandığını göstermektedir. %8'lik gliserol içermeyen denatüre edici olmayan jel hazırlandı (Şekil.27).



Şekil.27 MgCl₂ varlığında ve yokluğunda saf Sp1 proteini ve Biotin-Sp1 DNA ile bağlanma reaksiyonu kurulması (%8'lik jel, 60 V, 2 saat)

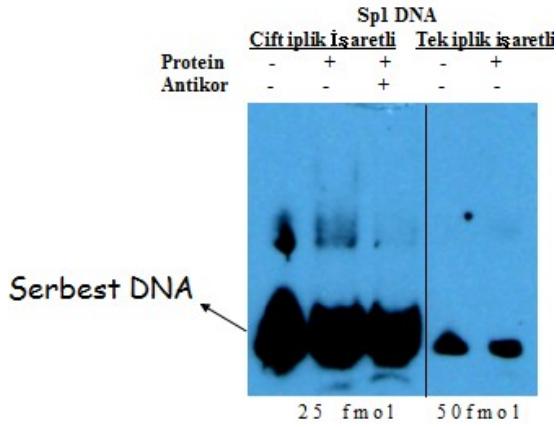
Biotin-Sp1 DNA, saf Egr-1 proteini ve saf Sp1 proteini ile ayrı ayrı inkübe edildi. Bağlanma reaksiyonu 1M KCl ve 200mM EDTA ile kuruldu. Oda sıcaklığında %6'luk jel hazırlandı. Ancak protein-DNA dizisine ait bant elde edilemedi (**Şekil.28**).

	Egr-1 Protein		Sp1 protein
10X Binding Buffer	2	-	2
%50 Gliserol	1	-	1
100 mM MgCl	1	-	1
1µg/µl Poly (dI/dC)	1	-	1
%1 NP-40	1	-	1
KCl	1	-	1
EDTA	1	-	1
Protein	2	-	2
250 fmol Sp1 DNA	5	5	5



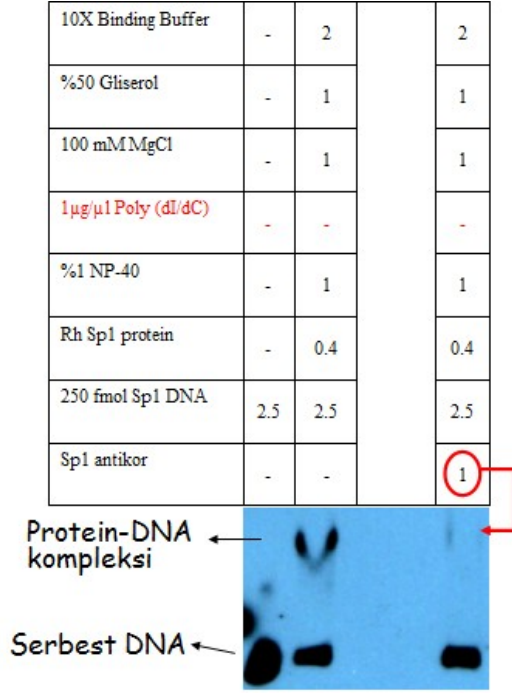
Şekil.28 Biotin işaretli Sp1 oligonükleotidinin saf Egr-1 ve saf Sp1 proteini ile inkübe edilmesi (%6'lık jel, 100 V, 1 saat)

Sp1 DNA'nın her iki ipliğinin biotinle işaretlenmesinin Sp1 proteinin bağlanma etkinliğini düşürüp düşürmediğinin anlaşılması için Sp1 oligonükleotidlerinden yalnızca birisi işaretlendi. Bağlanma reaksiyonunda kullanılan DNA konsantrasyonunun iki katı kullanıldı (Son konsantrasyon: 50 fmol Sp1 oligonükleotidi). %8'lik jel hazırlandı. Protein-DNA dizisine ait kompleks oluşmadı (**Şekil.29**).



Şekil.29 Tek iplik biotinle işaretli 50 fmol Sp1 DNA'nın yürütülmesi (%8'lik jel,100 V, 1 saat)

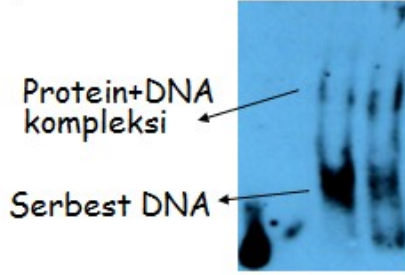
Bağlanma reaksiyonlarında özgül DNA parçacıkları ile özgül olmayan yarışmacıların varlığının etkisini araştırmak için PolydI/dC içermeyen yeni bir bağlanma reaksiyonu hazırlandı. Protein-DNA dizisi arasında kurulan kompleksin konsantrasyonu bu yarışmalı durumdan dolayı düşük olduğu için bant elde edilemedi. Bu durum protein-DNA dizisi arasında kurulan bağın özgül olduğunu göstermektedir (**Şekil.30-2. kuyu**). Bu deneyde, bağlanma reaksiyonuna antikor varlığı ile "Supershift" deneyi de eklendi. Sp1 proteinine özgül antikor, bağlanma reaksiyonuna eklendikten sonra 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eklenen özgül antikor nedeniyle bu reaksiyonda, antikor olmayan reaksiyona göre çok zayıf bir sinyal elde edildi (**Şekil.30-3. kuyu**).



Şekil.30 Sp1 için, PolydI/dC içermeyen bağlanma reaksiyonu kurulması, süper shift denemesi (%8'lik jel, 60 V, 2 saat)

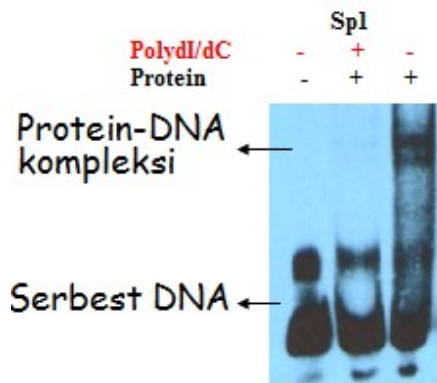
Yapılan deneylerde örnekler jele yüklenip yürütme işlemi ve membrana transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra jelde örnek kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir. Jel etidyum bromür ile boyandıktan sonra, özellikle protein içeren bağlanma reaksiyonlarının yüklendiği kuyularda DNA'ların takılı kaldığı gözlenmiştir. Jelin yüzdesinin DNA'nın kuyularda takılı kalmasına neden olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle jelin yüzdesi %4'e düşürülmüştür. Ancak %4'lük jelde örneklere ait bantların düz bir hatta ilerlemediği gözlenmiştir, jelin ince olmasından ve yüzdenin düşürülmesinden ötürü jel ile yapılan işlemler güçleşmiştir (**Şekil.31**).

10X Binding Buffer	-	2	2
%50 Gliserol	-	1	1
100 mM MgCl	-	1	1
1µg/µl Poly (dI/dC)	-	-	-
%1 NP-40	-	1	1
Rh Sp1 protein	-	0.4	0.4
250 fmol Sp1 DNA	2.5	2.5	2.5
Sp1 antikor	-	-	1



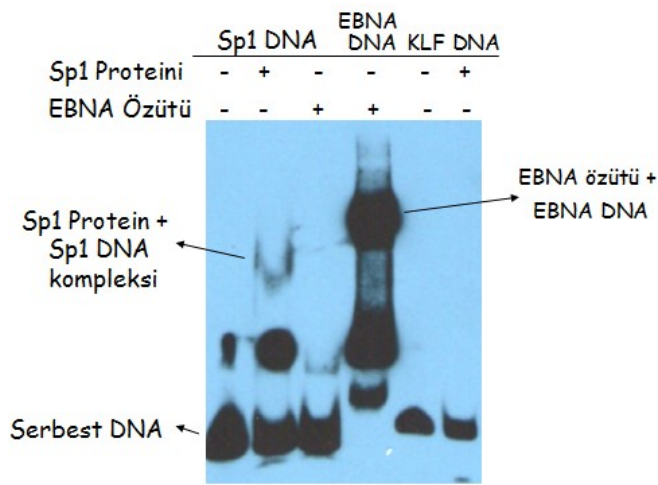
Şekil.31 Sp1 oligonükleotidi ile kurulan bağlanma reaksiyonlarının %4'lük gliserolsüz jelde yürütülmesi (%4'lük jel, 60 V, 96 dakika)

PolydI/dC varlığında ve yokluğunda saf Sp1 protein ile Sp1 DNA ile oluşan komplekslerin sonuçların tekrar edilebilir olduğunun gösterilmesi amaçlandı. %8'lik jel hazırlandı. Yürütme işlemi bir önceki deneyden farklı olarak oda sıcaklığı yerine, +4°C'de gerçekleştirildi. PolydI/dC içermeyen bağlanma reaksiyonunda, proteinin, DNA dizisine bağlanmasıyla oluşan komplekse ait bant görüntülendi. PolydI/dC içeren bağlanma reaksiyonunda protein-DNA dizisine ait bandın oluşmadığı gösterildi (**Şekil.32**).



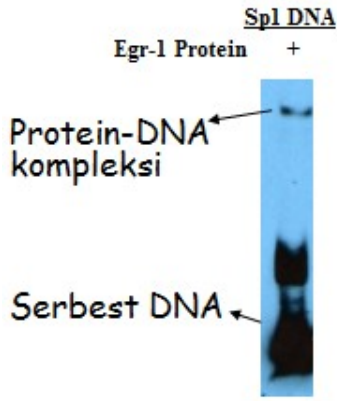
Şekil.32 PolydI/dC varlığında ve yokluğunda bağlanma reaksiyonu kurulması (%8'lik jel, +4°C'de 100V-40 dakika, 120 V-30 dakika)

Sp1 proteinin, Sp1 DNA'sına bağlanması ile oluştuğu düşünülen bantların özgüllüğünün anlaşılması açısından Sp1 DNA'sı, EBNA özütü ile inkübe edildi. Buradaki amacımız EBNA özütü ile Sp1 DNA'sının bağlanmayarak daha önceki deneylerimizde oluşan komplekslerin özgül olduğunun gösterilmesidir. Sp1 DNA'sı, EBNA özütü için bağlanma bölgesi içermediğinden protein-DNA dizisine ait bant elde edilemedi. KLF1 DNA'sı ile saf Sp1 proteini ile inkübe edildiğinde özgül bir ilişki olmadığı için bant gözlenmedi. Sp1 oligonükleotidi ile Sp1 proteini arasında oluşan komplekse ait zayıf bir bant elde edildi (Şekil.33).



Şekil.33 Sp1 DNA'nın EBNA özütü ile muamele edilmesi (%8'lik jel, +4C'de 100V 90 dakika)

Sp1 DNA'sı, saf Egr-1 proteini ile inkübe edildi. %8'lik jel hazırlandı. Egr-1 proteini ve Sp1 proteini aynı transkripsiyon ailesinden olduğu için bağlanma bölgeleri benzerlik göstermektedir. Bu nedenle Egr-1 proteini ile Sp1 oligonükleotidi arasında bağlanma gerçekleşti (Şekil.34).



Şekil.34 Egr-1 proteini ile Sp1 DNA'sının inkübe edilmesi (%8'lik jel, +4C'de, 100 V-2saat)

c) Nükleer lizat ile test sisteminin optimize edilmesi

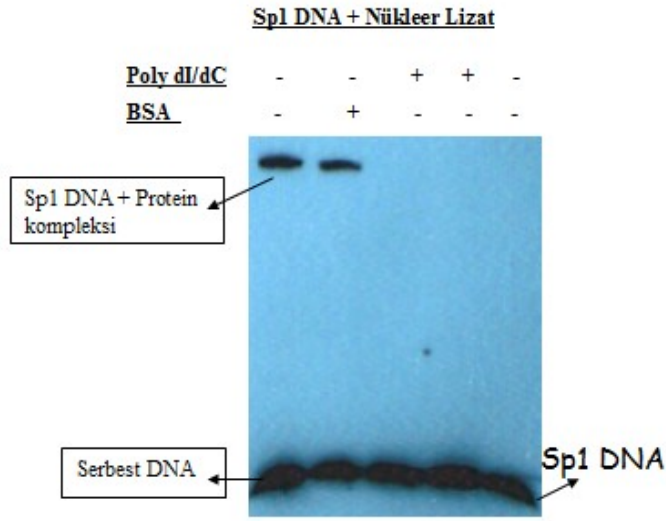
K562 hücre hattından elde edilen nükleer lizat ile kurulan Western Blot görüntüsü

Sp1 proteinin nükleer lizat içinde varlığının belirlenmesi amacıyla Western blot yapıldı. Elde edilen nükleer lizatta Sp1 proteinin bulunduğu belirlendi. Kullanılan Sp1 proteinin moleküler ağırlığı 105-110 kDa'dur (**Şekil.35**).



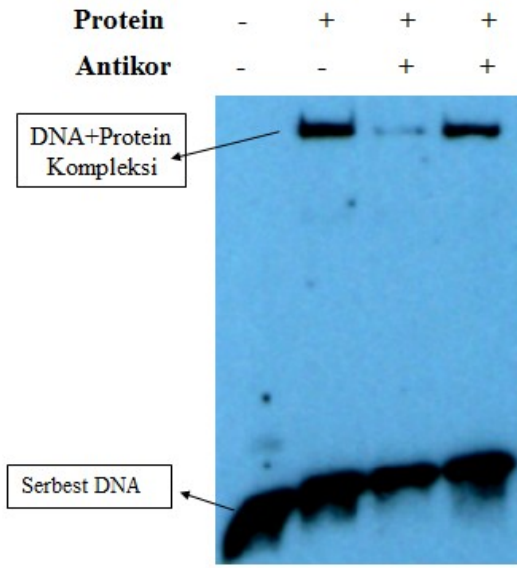
Şekil.35 K562 hücre hattından elde edilen nükleer lizat ile Sp1 proteini için Western blot kurulması

Saf protein ile hazırlanan bağlanma reaksiyonlarında olduğu gibi nükleer lizat ile hazırlanan bağlanma reaksiyonlarında da polydI/dC varlığı/yokluğu denendi. PolydI/dC içeren bağlanma reaksiyonunda protein-DNA dizisine ait bant elde edilemedi. PolydI/dC'siz bağlanma reaksiyonlarında BSA'nın solüsyona eklenmesi bağlanma etkinliğini değiştirmedir (**Şekil.36**).



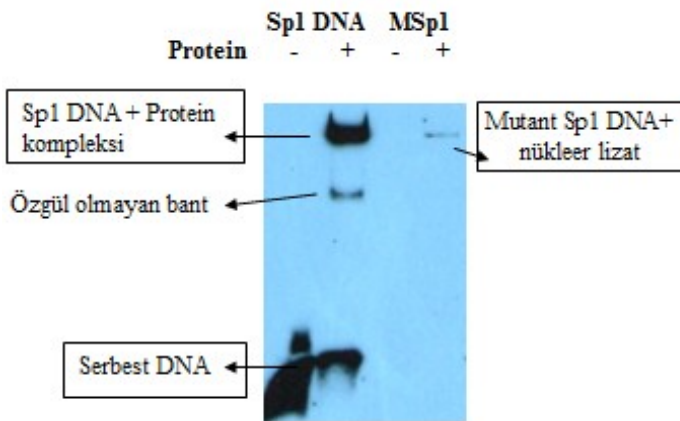
Şekil.36 Nükleer lizat ve Sp1 oligonükleotidi ile bağlanma reaksiyonu hazırlanması

Protein-DNA dizisine ait bandın özgülüğünün anlaşılması açısından bağlanma reaksiyonuna Sp1 antikoru eklendi. Bağlanma reaksiyonu, önce nükleer lizat ve antikor birlikte 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sp1 DNA'sı, bu inkübasyonun sonunda reaksiyona katıldı. Protein+antikorun birlikte inkübe edilmesi sonucu ortaya çıkan kompleks, DNA'nın bağlanma ortamındaki protein konsantrasyonu azaldığı için elde edilen sinyal daha düşük gözlemlendi. (**Şekil.37-2. kuyu**). Diğer reaksiyon tüpünde ise önce Sp1 DNA'sı, nükleer lizat ile inkübe edildi sonra antikor eklendi (**Şekil.37-3. kuyu**). Bu kuyuda reaksiyona antikor katılmasına rağmen ikinci kuyudan daha güçlü sinyal elde edildi. Bu durum, antikorum reaksiyona eklenme sırasının bağlanma etkinliğini değiştirdiğini göstermektedir.



Şekil.37 Sp1 DNA+nükleer lizat ile antikorun inkübe edilmesi

Mutant Sp1 DNA'sının kullanılmasının protein bağlanma etkinliğini düşürerek kontrol olarak kullanılması amaçlandı. Sp1 proteinin bağlanma bölgesi mutant olan oligonükleotidler sentezletirildi (**Tablo.6**). Normal Sp1 DNA'sı ile nükleer lizat reaksiyonunda yüksek özgüllükle bağlanmanın varlığı saptanırken, mutant Sp1 DNA'sı içeren örnekte, protein-DNA bandının daha zayıf olduğu gözlemlendi. Bağlanma bölgesindeki iki nükleotidlik farkın bağlanma etkinliğini düşürdüğü gösterildi (**Şekil.38**).



Şekil.38 Mutant Sp1 DNA ile nükleer lizattan bağlanma reaksiyonu kurulması)

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında protein-DNA ilişkisinin belirlenmesinde duyarlılığı yüksek bir yöntem olan EMSA, laboratuvar koşullarında optimize edilmeye çalışıldı. Bu amaçla biyoinformatik yöntemlerle Wnt5b, Fzd4, Fzd5 ve Fzd7 promotörlerine bağlanan transkripsiyon faktörleri belirlendi. Bu dört promotöre ortak olarak bağlanan Sp1, Egr-1 ve KLF transkripsiyon faktörleri çalışmamızda model oluşturdu. “LightShift Chemiluminescent EMSA Kit” kullanılarak Sp1, Egr-1, KLF transkripsiyon faktörlerinin hedef dizilere bağlanma koşulları optimize edildi.

EMSA'nın yaygın kullanımında, kullanılan DNA dizilerinin belirlenmesi amacıyla, radyoaktif izotoplarla işaretlenme işlemi uygulanmaktadır. Ancak Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvar koşulları, radyoaktif izotoplarla çalışma olanağı sağlamadığı için tez çalışmasında radyoaktif olmayan bir yöntem ile DNA'lar işaretlendi. DNA'lar, radyoaktif olmayan biotin, digoksinin gibi haptenlerle işaretlenebileceği gibi, florokromlarla da işaretlenmektedir. Uygulama kolaylığı açısından, güvenilir ve duyarlı olduğundan ötürü DNA'nın biotinle işaretlenmesine karar verildi. Sentetik olarak sentezlettilen ve işaretleme tepkimeleri sonrasında bir araya getirilerek ikili sarmal yapı oluşturan oligonükleotidler kullanıldı. Tanımladığımız transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesini oluşturacak oligonükleotidler Metabion firmasına sentezlettilirdi. Her bir iplik biotin-11 dUTP ile 3' ucundan işaretlenip, çift iplik oluşturacak şekilde bir araya getirildi. Biotinle işaretleme işleminde kullanılan DNA dizilerinin tek iplik halinde bulunması, işaretleme işleminin daha etkili olması açısından önemlidir. EMSA kitinde bulunan kemoluminesans deteksiyon sistemi ile 20 fmol konsantrasyondaki DNA görüntülenmektedir. Ancak biotinle işaretlemenin, protein-DNA komplekslerinin belirlenmesi sürecinde yeterince etkin olmadığı gözlemlendi. Bunun nedeni radyoaktif işaretlemenin, radyoaktif olmayan işaretlemeye göre daha duyarlı olmasıdır (55). DNA, radyoaktif izotoplarla direkt işaretlendiği için DNA'ya ait sinyal doğrudan alınmaktadır. Biotinle işaretlenmiş DNA'dan indirekt yoldan sinyal alınabilir. Biotin bağlı DNA'dan sinyal alınabilmesi için biotinin streptavidin ile işaretlenmesi gerekmektedir. İşaretlemede kullanılan biotin ile bağlı olduğu nükleotidin arasındaki bağın uzunluğu önemlidir. Kısa bağ, biotinin streptavidin tarafından ulaşılabilir olmasını engellemektedir. Biotin 11-dUTP, biotin-16-dUTP'ye göre beş CH₂ daha az barındırdığından daha kısa bir bağ oluşturmaktadır. Streptavidinin, protein+DNA+antikordan oluşan bir kompleksdeki biotine ulaşabilmesi daha

zor olduğu için, bu kompleksi içeren bağlanma reaksiyonlarına ait sinyal şiddeti düşük elde edildi (55). Özellikle “Super shift” deneylerimizde işaretleme için kullanılacak oligonükleotidin biotin 16-dUTP olması sinyalin belirlenmesi sürecindeki sorunların çözümüne katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

EMSA optimizasyonunda ilk olarak, üretici firmanın kit sisteminin anlaşılması ve kontrolü için sağladığı EBNA özütü ve Biotin-EBNA kontrol DNA’sı ile üç farklı reaksiyon kuruldu. Beklendiği şekilde bu çalışmalardan başarılı sonuçlar elde edildi (**Şekil.22**). Bu aşamadan sonra ticari olarak elde edilen saf proteinler ile deneyler gerçekleştirildi. Bu süreçte DNA-protein bağlanma sinyalinin eldesi noktasında problemler yaşandı. EMSA, aynı anda bir çok faktör ve değişkenin etkilediği bir yöntemdir. İdeal koşullar hedeflenen protein ve DNA dizisine göre optimize edilmelidir. DNA-protein bağlanması için gerekli reaksiyon içeriğinin iyonik dengesi önemlidir. Ortamdaki divalent katyonların varlığı/yokluğu, protein/DNA komplekslerinin oluşumu açısından büyük önem oluşturmaktadır. Bir denemede $MgCl_2$, bağlanma reaksiyonuna eklenmediğinde görüntü elde edilemediği gözlemlendi (**Şekil.27**). Her ne kadar DNA-protein bağlanmasında ortama EDTA eklenmesi önerilmekle birlikte, EDTA’nın şelatlayıcı özelliğinden ötürü ortamdaki Mg^{+2} iyonlarını çekerek bağlanmayı güçleştirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle bağlanma reaksiyonu kurarken ortama EDTA ilavesi yapılmamıştır.

Özellikle hedef DNA bölgesine çinko parmak motif ile bağlanıyorsa ortama Zn^{+2} iyonları da eklenmelidir. Bir başka problem ise jel uygulaması sırasında protein-DNA kompleksinin kuyulara takılmasıdır. Kuyulara takılan proteinlerin jele geçişini sağlamak amacıyla 0.1mg/ml konsantrasyonunda taşıyıcı protein olan BSA kullanılması veya bağlanma reaksiyonuna jelin içinde de bulunan TBE’nin katılması önerilmekle beraber, kendi denememizde BSA veya TBE kullanımının bu sorunu aşmada etkili olmadığı gözlemlenmiştir (**Şekil.36**).

Bazı proteinler redükleyici ortamda çalışabilir dolayısıyla DTT konsantrasyonu 1mM veya daha fazla kullanılmalıdır. Hellman ve Fried’in önerdiği gibi pek çok uygulamada özgül olmayan yarışmacı DNA kullanılmasının özgül olmayan protein/DNA komplekslerinin oluşmasına engel olacağı bildirilmektedir (48). Ancak kendi denemelerimizde PolydI/dC kullandığımızda belirgin şekilde elde ettiğimiz protein/DNA bandını kaybederken, kullanmadığımızda bant elde edebildik (**Şekil.36**). Çünkü bizim yaptığımız deneyler önceden

optimize edilmiş koşulların tekrarı biçiminde olduğu için, bu eklemeler ideal koşulların bozulmasıyla sonuçlanmıştır.

Protein/DNA kompleksinin elektroforez sırasında kararlılığını sağlamanın bir diğer önemli yolu da uygun volt ile yürütme işleminin gerçekleştirilmesidir. Proteinin denatüre olmasını engellemek, örneklerin kuyucuklardan geçebilmesini sağlamak ve serbest DNA ile kompleksin birbirinden ayrılmalarını sağlamak için o kompleksi birbirinden ayırmayacak maksimum voltaj belirlenmeli ve en kısa sürede elektroforez işlemi gerçekleştirilmelidir. Yaptığımız denemelerde 120 V yürütmenin protein/DNA kompleksi kararlılığının bozunmadan korunduğu gerilim olduğu saptanmıştır.

Oda sıcaklığı, nemlilik gibi koşullar kompleks oluşumunu etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda Sp1 için reaksiyonun kurulacağı en uygun oda sıcaklığının 20-25 °C arasında olduğu belirtilmektedir. Ortam bu sıcaklık değerlerinin üstünde olduğunda veya nemlilik yüksek olduğunda bağlanma olumsuz etkilenmiştir.

Protein/DNA kompleksinin serbest DNA'dan ayrılmasında jelin yüzdesi önemli yer tutmaktadır. Kendi denemelerimizde %8'lik jelde bantların daha keskin olduğu ancak kuyudan kimi örneklerin jele geçemediği, %6'lık jelde verimin arttığı, %4-5'lik jellerde ise jelin ince ve vizkoz yapısından ötürü kolayca yırtıldığı için sorun yaşanmıştır ve örneklerin tek bir sırada yürümediği gözlenmiştir (**Şekil.27,31**). Aynı zamanda hazırlanan jelde gliserol kullanılmamasına karar verildi, çünkü jeldeki gliserol örneklerin yürümesini yavaşlatarak vertikal alanda yoğun arka plan oluşumuna neden oldu.

Protein/DNA kompleksinin kuyucukta takılı kalması protein-DNA kompleksinin yoğunluğundan kaynaklanabileceği gibi, proteinin sahip olduğu sekonder yapı da kuyucuktan geçmeyi engellemiş olabilir. Bu problemi aşmak için BSA gibi bir taşıyıcı protein kullanılıp, jel yüzdesi düşürüldü, jele uygulanan voltaj artırıldı ancak sonuçta değişme gözlenmedi.

Örneklerin yürümesini kontrol etmek açısından reaksiyona katılan yükleme tamponu, proteinin DNA ile kompleks oluşturmasını engelleyebileceğinden protein içeren tüplere yükleme tamponu eklenmemelidir. Boş kuyucuklar veya sadece serbest DNA içeren tüplere bromfenol mavisi içeren yükleme tamponu eklenerek DNA'nın jeldeki konumu hakkında fikir sahibi olunabilir. Bromfenol mavisinin 70 bç'lik bir DNA fragmenti ile hemen hemen aynı hızda hareket ettiği beklendiğinden kendi DNA fragmanımızın jeldeki hareketini bu ölçüte göre takip etmemize olanak sağlar.

Çalışmamızın son aşamasında kullandığımız nükleer lizat ile özgül DNA dizilerinin bağlanma reaksiyonları sonrasında elde ettiğimiz jel görüntüleri oldukça keskin elde edildi. Kullanılan nükleer lizattaki protein konsantrasyonunun daha yüksek olmasının daha fazla miktarda özgül DNA-protein kompleksi oluşumuna yol açtığı için daha başarılı sonuçlar elde ettik.

Sp1 proteini ve ona özgül DNA'yı içeren bağlanma reaksiyonlarına antikor eklendiğinde bandın zayıf sinyal verdiği gözlemlendi (**Şekil.37**). Bu durum antikorum reaksiyona eklenme sırası ile ilişkilidir. Sp1 proteini, mutant Sp1 DNA'sı ile inkübe edildiğinde proteinin, bu DNA'ya daha düşük özgüllükle bağlandığı gözlemlendi (**Şekil.38**). Tüm bu sonuçlar bir arada ele alındığında, Sp1 DNA'sı ile protein arasında kurulan komplekslerin özgül olduğu doğrulandı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

EMSA yöntemi protein-DNA etkileşiminin belirlenmesinde önerilen bir yöntemdir. Her ne kadar kullanımında, sıklıkla radyoaktif işaretli DNA parçacığı kullanılsa da, tez çalışmasında optimize ettiğimiz şekilde radyoaktif olmayan yaklaşımla da EMSA yönteminin kullanılması mümkündür. EMSA yöntemini tez çalışmamızla birlikte radyoaktif olmayan biçimde laboratuvar koşullarında optimize ettik. Yöntemi ileriki dönemlerde, protein-DNA etkileşimlerinin tanımlanmasında bir araç olarak kullanmayı düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Watson J, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. The structures of DNA and RNA, In: Fellowes A, Zalesky J, ed. *Molecular Biology Of The Gene*, 5.basım. San Francisco: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2004;97-108
2. http://bioweb.wku.edu/courses/Biol115/Wyatt/Nucleic_Acids/Nucleotides.htm (19.04.2011)
3. Koolman J, Roehm KH. *Metabolic charts, Color atlas of biochemistry*, 2. basım. Thieme, 417-419
4. <http://www.dna-sequencing-service.com/wp-content/uploads/2010/09/DNA-Molecular-Structure.png> (19.04.2011)
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. Birinci basım. Sistem ofset basım yayın, Ankara, 2008
6. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*, third edition, , 2006
7. Watson J, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Expression of the genome, In: Fellowes A, Zalesky J, ed. *Molecular Biology Of The Gene*, 5.basım. San Francisco: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2004; 343-74
8. Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP ve ark. The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 2003;20(9):1377-1419
9. Kadonaga JT. Regulation of RNA Polymerase II Review Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors. *Cell*, 2004;116:247–257
10. Garvie CV, Wolberger C. Recognition of specific DNA sequences. *Molecular Cell*, 2001;(8):937–946
11. Venters BJ, Pugh BF. How eukaryotic genes are transcribed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2009; 44(2-3):117-141
12. http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?doc=TRUE&pdbcode=n/a&profunc=TRUE&template=doc_hth.html (04.04.2011)
13. Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 2001;11:39–46
14. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000;(29): 183-212

15. http://www.google.com.tr/imgres?imgurl=http://www.chemistrydaily.com/chemistry/upload/f/f2/Zinc_finger.png&imgrefurl=http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Zinc_finger&usq=__4TqAywKkd3HfYS5PUEfB3Nr3n7Y=&h=323&w=250&sz=8&hl=tr&start=0&zoom=1&tbnid=bAV390jlqXb7YM:&tbnh=131&tbnw=99&ei=gK2uTa2WGMa3hAfW2aHeAw&prev=/search%3Fq%3Dzinc%2Bfinger%26um%3D1%26hl%3Dtr%26sa%3DN%26rlz%3D1T4ACAW_tr__TR329%26biw%3D1345%26bih%3D533%26tm%3Disch&um=1&itbs=1&iact=hc&vpx=553&vpy=43&dur=16&hovh=255&hovw=197&tx=91&ty=121&oei=Ra2uTY2kLjPtAa_spzXDA&page=1&ndsp=22&ved=1t:429,r:3,s:0 (04.04.2011)
16. <http://www.pymol.org/> (02.03.2011)
17. http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/boyer/0471661791/structure/protein_dna/protein_dna.htm (02.03.2011)
18. <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins7.html> (02.03.2011)
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26806/figure/A1255/?report=objectonly> (02.03.2011)
20. Philipsen S, Suske G. A tale of three finger:the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. 1999;27(15):2991-3000
21. Suske G. The Sp family of transcription factors. *Gene*, 1999;238: 291-300
22. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SP1>
23. <http://www.uniprot.org/uniprot/P08047>
24. Cook T, Gebelein B, Urrutia R. Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factor. *Annals New York Academy of Sciences*, 94-102
25. Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F ve ark. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 1997;89: 619-628
26. Dynan WS, Tjian R. The promoter specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 1983;(35): 79-87
27. Tan NY, Khachigian LM. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 2009; 2483-2488
28. Black AR, Jensen D, Lin SY, Azizkhan JC. Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *The journal of biological chemistry*, 1999,273(3):1207-1215

29. Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 1989;59:827-836
30. Oka S, Shiraishi Y, Yoshida T, Ohkubo T. NMR structure of transcription factor Sp1 DNA binding protein. *Biochemistry* 2004;43: 16027-16035
31. Gill G, Pascal E, Tsieng ZH, Tjian R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAF11110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Biochemistry*,1994;91:192-196
32. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the tata box-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 1994; 1582-1593
33. Gunther M, Laithier M, Brison O. A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000;210: 131-142
34. Astrinidis A, Kim J, Kelly CM, Olofsson BA ve ark. The Transcription Factor SP1 Regulates Centriole Function and Chromosomal Stability Through a Functional Interaction With the Mammalian Target of Rapamycin/Raptor Complex. *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* 2010;49:282–297
35. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T. ve ark. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of human telomerase reverse transcriptase gene (HTERT). *Nucleic Acids Research*, 2000;28(3): 669-677
36. Nandan MO, Yang VW. The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histol Histopathol.* 2009 October ; 24(10): 1343–1355
37. Pearson R, Fleetwood J, Eaton S. ve ark. Krüppel like transcription factors: a functional family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008;40: 1996-2001
38. Bureau C, Hanoun N, Torrisani J, Vinel JP. ve ark. Expression and function of Kruppel Like-Factors (KLF) in carcinogenesis. *Current Genomics*, 2009;(10): 353-360
39. Bieker JJ. Krüppel like factors: Three fingers in many pies. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001;276(37): 34355-34358
40. Gashler AL, Swaminathan S, Sukathme VP. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-

- early transcription factor Egr-1. *Molecular and cellular biology*, 1993;13(8);4556-4571
41. Christy, B. & Nathans, D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989;86;8737-8741
 42. Ericson ME, Rould MA, Nekludova L, Pabo CO. Zif268 protein–DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger–DNA interactions. *Current Biology*, 1996;(4): 1171-1180
 43. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *Journal of cellular physiology*, 2002;193:287-292
 44. Min IM, Pietramaggiori G, Kim FS, Passegue E, et al. The transcription factor Egr1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008; 380-391
 45. Ferrigno, O, Virolle T, Djabari Z, Ortonne JP, White R J, Aberdam D. Transposable B2 SINE elements can provide mobile RNA polymerase II promoters. *Nat. Genet.* 2001;28:77-81
 46. Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. Detection and characterization of cellular Egr-1 binding to its recognition site. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993; 16949-16957
 47. Herzig KA, Mittal S, Yule K, Liang H, et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res*, 2005;65 (12):5133-5143
 48. Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols* 26 July, 2007; 2(8); 1849-1861
 49. Garner MM., Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acid Research*, 1981; 9(13): 3047-3060
 50. Gaudreault M, Gingras M-A, Lessard M, Leclerc S et al. Electrophoretic mobility shift assays for DNA-protein interactions. In: Moss T, Leblanc B, ed. *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein Interactions*. Humana Press; 2009. p. 15-35
 51. Lane D, Prentki P, Chandler M. Use of retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological reviews*, 1992; 56(4): 509-528

52. Laniel M-A, Beliveau A, Guerin S. Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods in Molecular Biology, DNA-protein interactions: Principles and Protocols*, 2nd edition. Totowa : Humana Pres, 1999; 13-30
53. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=06010701> (30.04.2011)
54. <http://www.piercenet.com/files/0919as4.pdf> (06.03.2011)
55. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, ve ark. Mobility Shift DNA-Binding Assay Using Gel Electrophoresis. *Current protocols in molecuar biology*. 2003:1839-1849
56. Hall KB, Kranz JK. Nitrocellulose filter binding for determination of dissociation constants, In: Haynes S, ed. *Methods in molecular biology, RNA-protein interaction protocols* Totowa: Humana pres, 105-114
57. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development* 2006; 20:1394-1404
58. Barker N. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. In: Vincan E, ed. *Wnt signaling*, volume 1, first edition. Newyork: Humana Press, 2008; 5-15
59. Miller J.R. The Wnts. *Genome Biology* 2001; 3(1):reviews3001.1-3001.15
60. Kusserrow A, Pang K, Sturm C, Hrauda M et al. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, 2005; 433, 156–160
61. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shangai)*. July, 2008; 577-594
62. James RG, Conrad WH, Moon RT. β -catenin independent Wnt pathways: signals, core promoters and effectors. 2008;468:131-141
63. Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signaling network. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2008; 363, 1333-1347
64. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple patways, multiple receptors and multiple transcription factors. *The Journal of biological chemistry*:281(32);22429-22433
65. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research* 2008; 18: 523-527
66. Wnt receptors and pathways, R&D Systems, 2005 Catalog
67. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 781-810

68. Clevers H. Wnt/ β -catenin in signaling development and disease. *Cell*, 2006;127:469-480
69. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: β -catenin independent pathways. *Cell Calcium* , 2005; 439-446
70. Seifert RK, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Gen* 2007; 8:126-138
71. Slaus NP. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer cell international*, 2010;10(22):1-5
72. Chen S, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, et al. WNT-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -Catenin/T Cell Factor–Mediated transcription. *JCB*, 2001;152(1): 87-96
73. <http://www.genomatix.de/en/index.html> (27.04.2011)
74. <http://www.clcbio.com/index.php?id=28> (27.04.2011)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 01
TOPLANTI TARİHİ : 15.12.2009

TOPLANTI GÜNÜ : Salı
TOPLANTI SAATİ : 12:30

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


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


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

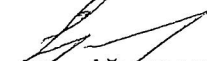
KARAR 4: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.H.Ogün SERCAN'ın danışmanı olduğu Yüksek Lisans Öğrencisi Ceyda ÇALIŞKAN'ın "EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Yöntemi ile Transkripsiyon Faktör – Promotor Bölge İlişkisinin Belirlenmesi" konulu tez çalışmasının etik olarak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

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

Oy birliği ile karar verildi.


PROF.DR. YEŞİM TUNÇOK
Başkan


PROF.DR. REYHAN UÇKU
Başkan Yardımcısı

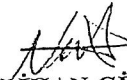

PROF.DR.GÜL GÜNER
AKDOĞAN
Doğal Üye


PROF.DR.HASAN
HAVİTÇIOĞLU


DOÇ.DR.ŞERMIN GENÇ


YRD.DOÇ.DR.ÇİĞDEM ERESEN
YAZICIOĞLU


BEYHAN GÜRKAN
SEKRETERYA


NESLİHAN GÜNGÖR
SEKRETERYA

ÖZGEÇMİŞ
CEYDA ÇALIŞKAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	46678383342
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Berin Taşan sok. no:41 d:7 Buğrahan Apt. Karşıyaka/ İzmir 35530 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-3231686 05556599183
e-posta :	Ceydax86@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

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

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Diğer

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer yayınlar

--

Düzenleme Tarihi :23/05/2011