

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

**OLGUN YAĞ HÜCRELERİNİN REKOMBİNANT
PROTEİN İFADE KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Parisa SHARAFİ

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. Çetin KOCAEFE**

ANKARA

2013

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji
 Program :Tıbbi Biyoloji
 Tez Başlığı :Olgun Yağ Hücrelerinin Rekombinant Protein İfade
 Kapasitelerinin İncelenmesi”
 Öğrenci Adı-Soyadı :Parisa SHARAFİ
 Savunma Sınavı Tarihi :20.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

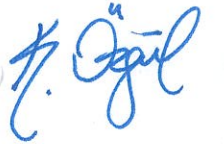
Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Şükriye AYTER**
 TOBB Ekonomi ve Teknoloji
 Üniversitesi
 Tez danışmanı: **Doç.Dr. Y.Çetin KOCAEFE**
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: **Prof. Dr. Serap DÖKMECİ**
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: **Doç. Dr. Köksal ÖZGÜL**
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: **Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN**
 Hacettepe Üniversitesi

(İmza)





Serap

(İmza)




ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



(İmza)

Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür y.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, bilgisi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren sayın Doç. Dr. Çetin KOCAEFE' ye,

Gösterdikleri özveri ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma ve sevgili arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince beni bu konuda destekleyen, her türlü fedakarlığı gösteren sevgili aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, **107S088** no'lu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

SHARAFI P. Olgun Yağ Hücrelerinin Rekombinant Protein İfade Kapasitelerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2013. Olgun yağ hücreleri, çok sayıda adipokin ve sitokin salgılayan, protein yapımı yönünden zengin hücrelerdir. Tez kapsamında, yağ hücrelerinin protein salgı mekanizmasının rekombinant protein ifadesi ve salgısı amacıyla kullanım imkanlarının araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak, yağ hücrelerine özgü hücre içi salgısal proteinlere ait 7 farklı adipokinin sinyal dizilerinin salgı etkinliği bakımından karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırma, yeşil floresan protein (GFP) bildirici geninin bu öncü sinyal dizilerinin “N” terminaline füzyon ile ekleyip hücre içi ve dışında takibi gerçekleştirilmiştir. Farklılaşmış, olgun yağ hücreleri G1 evresinde olup bölünmemektedir. Bu nedenle aktarılan vektörlerin gen ifade sürecinin bölünen hücrelere göre daha kalıcı olması beklenmektedir. Ancak, gen ifadesinin korunması ve ifade süresinin daha da uzatılması amacıyla hazırlanan vektörlere *scaffold/matrix* bağlanma bölgesi (S/MAR) dizilerinin eklenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, *İnterferon beta (IFNβ)* ve *Apolipoprotein B (APOB)* genlerinin S/MAR dizileri, hazırlanan vektöre yerleştirilerek bildirici gen ifadesi sürecinin takibi yapılmış olup en uzun süre gen ifadesi sağlayan S/MAR dizisi karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. Olgun yağ hücrelerinde rekombinant gen ekspresyonu ve salgısını sağlayan yaklaşımın etkinliğinin dominant-negatif etkili miyostatin (MSTNdn) aracılığı ile hücre kültüründe gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda en etkin öncü dizisi olarak Retinol bağlama proteini (RBP4) genine ait öncü dizisi seçilmiştir. S/MAR dizileri arasında bir fark görünmemiştir. Çalışmanın son basamağında yukarıda sıralanan deneysel yaklaşımlarla belirlenen en uygun salgı sinyali (RBP4), S/MAR dizisi ve MSTNdn içeren vektör omurgasının etkinliğinin gösterilebilmesi amacıyla olgun yağ hücrelerince salgısı sağlanarak etkinliği *in vitro* deneylerle gösterilmiştir.

Anahtar kelime: Yağ dokusu, Rekombinant protein ifadesi, Protein mühendisliği, viral olmayan gen transferi.

ABSTRACT

SHARAFI, P. Investigation of Recombinant Protein Expression Capacity Of Mature Adipocytes. Hacettepe University Institute Of Health Sciences, PhD. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2013. This study postulates that the extracellular transport of the secretory proteins of the adipocytes (adipokines) can be utilized to achieve recombinant protein expression. Adipokines are exported outside of the adipocytes by the help of leader sequences which deduce the extracellular export traffic. It is aimed to achieve the expression of a recombinant protein extracellularly by using the leader sequences of the 7 selected adipokines. This approach will aid in production and extracellular secretion of the protein of interest by mature adipocytes. The efficiency and intracellular- extracellular follow-up of these export signals will be done by fusing these export signals to N- terminal of Green Fluorescence Protein (GFP). The S/MAR sequences increase the episomal persistence of the transgenic vector where it is located to and prolong its expression in mammalian cells. In this study, it is aimed to use this property of S/MAR sequences by adding it to the vector construct to increase the episomal expression of the transgenes in mature adipocytes (non-dividing cells). It is proposed to compare the efficacy of two different S/MARs in this study, the S/MAR sequences of *Apolipoprotein B (APO-B)* and *Interferon B (IFN-B)* genes. The efficiency of this designed recombinant gene expression construct will be shown by expressing the dominant-negative form of myostatin (MSTNdn), as a model of gene of interest, in adipocytes and observing its effect on myoblast cells. As a result of this study, export signal of Retinol Binding Protein (RBP4) has been selected as the most efficient export signal. No differences have been observed between the selected S/MAR sequences. At the end of this study, the *in vitro* efficiency of the designed vector construct containing selected export signal (RBP4), S/MAR sequences, and MSTNdn was shown by implementing the secretion of this model recombinant protein from the transfected mature adipocytes.

Key words: Fat tissues, Recombinant protein expression, Protein engineering, Non-viral gene transfer.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yağ Dokusu ve Özellikleri	4
2.1.1. Yağ Dokusunun Farklılaşması	4
2.1.2. Yağ Dokusunun Salgısal Özellikleri	5
2.1.3. Yağ Dokusu ile Çalışma Teknikleri ve Sınırları	7
2.2. Biyolojik Sistemlerde Protein Salgı Mekanizmaları	9
2.2.1. Ökaryotik Klasik Salgı Yolağı	9
2.2.2. Ökaryotik Klasik Olmayan Salgı Yolağı	11
2.2.3. Klasik Salgı Yolağında Öncü Dizi ve Özellikleri	12
2.3. Biyolojik Sistemlerde Gen Aktarımı ve Rekombinant Protein Tasarımı	14
2.3.1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Temelleri	14
2.3.2. Memeli Hücrelerine Gen Aktarımının Temelleri (Kalıcı / Geçici Gen Aktarımı)	15
2.3.3. Ökaryotik Gen Aktarımı ve Tedavide Kullanımı (Gen Replasman Tedavisi)	16
2.3.4. Prokaryotik Gen Aktarımı ve Bakterilerin Biyoteknolojide Kullanımı	18
2.3.5. Ökaryotik Gen Aktarımı ve Biyoteknolojide Kullanımı	18
2.4. Ökaryotik S/MAR Dizilerinin Özellikleri	19

2.4.1.	S/MAR Dizilerinin Avantajları	22
2.4.2.	Memeli Genomunda İyi Tanımlanan S/MAR Dizileri	22
2.4.3.	S/MAR Dizilerinin Tahmin Kuralları	23
2.5.	İskelet Kası ve Gelişiminin Temel Özellikleri	24
2.5.1.	C2C12 Fare Miyoblastik Hücre Hattı	24
2.5.2.	İskelet Kası Farklılaşma Yolağı	24
2.5.3.	İskelet Kası Gelişimini Düzenleyen <i>TGFβ</i> Yolağı Düzenleyicileri (Miyostatin)	25
2.5.4.	Yağ Hücreleri ve Miyostatin	27
2.5.5.	Dominant Negatif Etkili Miyostatin Proteinin Kas ve C2C12 Hücrelerin Üzerindeki Etkisi	28
2.6.	Amaç	29
3.	GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1.	Gereçler	30
3.1.1.	Bakteri Kültürü	30
3.1.2.	Klonlama	30
3.1.3.	Plazmid İzolasyonu	31
3.1.4.	Modifiye Agaroz Jelden DNA İzolasyonu	31
3.1.5.	DNA Dizi Analizi	31
3.1.6.	Hücre Kültürü	32
3.1.7.	Cerrahi Malzemeler	32
3.1.8.	Primer Miyoblast İzolasyonu	33
3.2.9.	Hücre Dondurulması	33
3.1.10.	Transfeksiyon	33
3.1.11.	Hücre Canlılık Testi	34
3.1.12.	Hücre DNA İzolasyonu	34
3.1.13.	Hücre ve Dokudan RNA İzolasyonu	34
3.1.14.	cDNA Sentezi	34
3.1.15.	Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
3.1.16.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	35
3.1.17.	İmmü floresan Boyama	35
3.1.18.	Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	36

3.1.19.	Western Blot	37
3.2.	YÖNTEMLER	39
3.2.1.	Megaprimerlerin Tasarımı	39
3.2.2.	Rekombinant Genin Modifikasyonları ve Tasarımı	41
3.2.3.	Megaprimer Aracılığıyla PZR Yöntemi	42
3.2.4.	“Gene-Soeing” Yöntemi ile PZR Aracılıklı Mutageniz Oluşturulması	43
3.2.5.	“Gene Soeing” Yöntemi ile Öncü Dizilerinin Amplifikasyonu ve V5+6H Epitoplarının Eklenmesi	45
3.2.6.	Çoğaltılan Öncü Dizi ve EGFP Dizilerinin <i>pGEM-T Easy</i> Vektörüne Klonlanması	48
3.2.7.	<i>pGEM-T Easy</i> Vektörü İçerisindeki Öncü Dizi ve EGFP Gen Parçalarının pcDNA3.1(+) Vektörüne Klonlanması	49
3.2.8.	S/MAR Dizilerinin Amplifikasyonu ve Klonlanması	50
3.2.9.	MSTN cDNA Sentezi ve MSTNdn Dizisinin Oluşturulması	54
3.2.10.	Hücre Kültürü	58
3.2.11.	Poli-Laktik-Ko-Glukonik Asit (PLGA) Polimerlerin Hazırlanması	63
3.2.12.	Hücre Kültürü Lamalarının Laminin ve Poli-l-lizin ile Kaplanması	63
3.2.13.	Gen Transferi Protokolleri ve Protein İfadesi Takibi	64
3.2.14.	Gen Transferi Yapılan Hücrelerde ER Stres İncelenmesi	65
3.2.15.	Hücre Kültürü Örneklerinin İmmünfloresan Boyaması	66
3.2.16.	β -galaktozidaz Aracılıklı Transfeksiyon Normalizasyonu (<i>β-galactosidase assay</i>)	68
3.2.17.	Hücrelerde Sentezlenen ve Ortama Salınan Rekombinant EGFP Sinyalinin Kantitasyonu	69
3.2.18.	S/MAR Dizileri İçeren Vektör Yapılarının Hücre İçinde Vektör Kalıcılığı ve Vektörün İfadesine Etkisinin Karşılaştırılması	70
3.2.19.	Ko-Kültür Çalışmaları	73
3.2.20.	RNA İzolasyonu	76
3.2.21.	cDNA Sentezi	77

3.2.22.	Kantitatif Gerçek Zamanlı Ters Polimeraz Zincir Reaksiyonu	79
3.2.23.	Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	80
3.2.24.	Western Blot	81
3.2.25.	İstatistiksel Yöntemler	83
4.	Bulgular	84
4.1.	PZR Aracılıklı Mutagenizasyon Yöntemi ile Aday Öncü Sinyallerini İçeren EGFP Genlerinin Hazırlanması ve Klonlanması	84
4.2.	Adiposit Öncülü Hücrelerde Salgısal Protein Yolaklarının Kinetik Değerlendirilmesi	87
4.3.	EGFP Salgı Etkinliğinin Kantitatif Analizi	94
4.4.	Doku Kültüründe Hücre Tarafından Sentezlenen EGFP Proteininin Kantitasyonunun Sonucuna Göre Öncü Sinyallerinin Karşılaştırılması	97
4.4.1.	Doku Kültürü Ortamına Salınan EGFP Proteininin Kantitasyonu	97
4.4.2.	Transfekte Hücre Lizatında EGFP Proteininin Kantitasyonu	99
4.5.	Hücre Kültürü Çalışmalarında Sıçan Primer Yağ Öncülü ve 3T3-L1 Fare Hücre Hattı Hücrelerinde Farklılaşma ve Gen Transferinin Standardizasyonu	100
4.5.1.	Farklılaşma Süreçlerinin Karşılaştırılması	100
4.5.2.	Transfeksiyon Standardizasyonu ve Verimliliklerinin Karşılaştırılması	102
4.5.3.	Elektroporasyon ile Gen Transferi Sonrasında Canlılık Testi	106
4.6.	Epizomal Gen İfadesinin Sürdürülebilmesi Amacıyla Vektör Yapılarına S/MAR Dizilerinin Aktarılması	107
4.6.1.	<i>APOB</i> ve <i>IFNβ</i> S/MAR Dizileri Klonlama Sonuçları	108
4.6.2.	<i>IFNβ</i> ve <i>APOB</i> S/MAR Dizilerin Karşılaştırılması	109
4.7.	Rekombinant Protein İfadesi Modeli Olarak Kullanılmak Üzere Miyostatin ve Dominant Negatif Miyostatin cDNAsının Eldesi, Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	118
4.7.1.	Miyostatin cDNAsının Sentezlenmesi ve Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	118

4.7.2.	Dominant Negatif Etkili Miyostatin cDNAsının Sentezlenmesi ve Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	120
4.8.	Olgun Yağ Hücrelerinde MSTNdn Protein İfadesinin Sağlanması ve Takibi	122
4.9.	Salgısal Protein Yolağı Aracılığı ile Rekombinant Protein İfadesine Bağlı Olası ER Stres Oluşumunun İncelenmesi	123
4.10.	MSTNdn Yapısının C2C12 Miyoblast Hücrelerinde Etkinliğinin Gösterilmesi	125
4.10.1.	MSTNdn Yapısının C2C12 Farklılaşma Sürecine Morfolojik Etkisi	126
4.10.2.	Mstndn Yapısının C2C12 Hücrelerinde Kas Farklılaşma Belirteçleri Üzerine Etkisi	127
4.11.	Olgun Yağ hücrelerinin Rekombinant Protein Üretim Etkinliğinin Gösterilmesi	129
4.11.1.	Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen C2C12 Hücrelerinin Morfolojik Farklılaşma Bulguları	130
4.11.2.	Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen C2C12 Hücrelerinin Farklılaşma Programı Bulguları	131
4.11.3.	Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaşma Programı Bulguları	136
4.11.4.	Olgun 3T3-L1 Hücrelerinden Salınan Rekombinant Protein İfade Analizi	136
5.	TARTIŞMA	139
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	149
	KAYNAKLAR	152
	EKLER	164

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ac	Asetilasyon
AdipoQ	Adiponektin
Adipsin	Kompleman faktörü D
APOB	Apolipoprotein beta
APOE	Apolipoprotein E
APS	Amonyum persülfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bç	Baz çifti
BGH	Bovın büyüme faktörü
BSA	Bovın serum albumin
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
CK	Kreatin kinaz
CMV	Sitomegalovirüs
Ct	<i>Cycle of threshold</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dk	Dakika
DEPC	Dietil pirokarbonat
DES	Desmin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
dsDNA	Çift zincirli DNA
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü

EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal Bovin Serumu
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Standart yerçekimi ivmesi
GPD1	<i>Glycerol 3 Phosphate Dehydrogenase</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
h/h	Hacim/hacim
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>
IFN-B	<i>Interferon beta</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	İmmünglobulin G
IPTG	İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid
Kb	kilo baz
kDa	kiloDalton
kHz	kiloHertz
kRT-PZR	Kantitatif ters transkriptaz – polimeraz zincir
lacZ	Beta-galaktozidaz
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEP	Leptin
M	Molar
M-Cad	M-Kaderin
MEM	<i>Modified eagle medium</i>
MHY3	Myosin Heavy Chain 3
MMP9	<i>Matrix metalloprotease 9</i>
MRF	Miyojenik regülatör faktörü
mRNA	Mesajcı RNA
MSTN	Miyostatin
MSTNdn	Dominant negatif etkili miyostatin
Myf5	Miyojenik faktörü 5
MyoD	<i>Myogenic differentiation (Myoblast Determination 1)</i>

NCAM	Nöral hücre adezyon molekülü
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
°C	Derece santigrad
OD	Optik Dansite
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	<i>Phosphorylation</i>
PAI	Plazminojen aktivator inhibitörü-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pCMV	<i>Sitomegalovirüs promotoru</i>
PFA	Paraformaldehit
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RBP4	Retinol bağlama proteini-4
RNA	Ribonükleik asit
Rnaz	Ribonükleaz
rpm	<i>Rotations per minute</i>
SAF-A	<i>Scaffold attachment factor A</i>
S/MAR	<i>Scaffold/matrix attachment region</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	Saniye
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
STAT	<i>Signal-transducer and activator of transcription</i>
sXBP1	<i>spliced XBP1</i>
TAE	Tris Acetate EDTA
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS(T)	<i>TBS with Tween-20</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor - beta</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
U	Ünite

UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UV	Ultraviole
uXBP1	<i>unspliced XBP1</i>
V	Volt
W	Watt
w/v	<i>weight / volume</i>
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Yağ hücresi farklılaşma yolağında yer alan transkripsiyon faktörleri.	5
2.2. Olgun yağ hücresi, vücudun fizyolojik durumuna bağlı olarak sayısız adipokinleri salgılar.	6
2.3. Klasik salgı yolağı ve hücre içi trafiğı.	11
2.4. 2000 yılında Ladunga tarafından yayınlanan makaleye göre sinyal peptidlerinde bulunan bölgeler (<i>domain</i>) ve amino asitlerin oranları.	13
2.5. S/MAR dizilerin fonksiyonu	21
2.6. Kas hücrelerindeki farklılaşma yolağı.	25
2.7. Miyostatin proteinin <i>in vivo</i> işlenişi.	26
3.2.1. Klonlama stratejisi ile oluşturulan rekombinant gen dizileri.	42
3.2.2-A. İlk aşamada birinci tüpte gerçekleştirilmiş mutagenез PZR reaksiyonu.	43
3.2.2-B. İlk aşamada ikinci tüpte gerçekleştirilen mutajenik PZR reaksiyonu.	44
3.2.2-C. İkinci aşama mutagenез PZR reaksiyonu.	45
3.2.3. Megaprimer aracılığıyla PZR sonucunda elde edilen ürün.	46
3.2.4. Hazırlanan öncü dizi ve EGFP ampikonun pcDNA3.1(+) plazmidine eklenmesi.	49
3.2.5. pcDNA3.1 (+) vektör omurganın haritası.	53
3.2.6. Klonlanmış S/MAR dizisi içeren plazmid vektörlerin şeması.	54
3.2.7. Zhu ve ark. tarafından tanımlanan dominant negatif etkili miyostatin eldesi klonlama stratejisi (RSRR dizisinin GLDG'ye dönüştürülmesi).	57
3.2.8. Yüksek yoğunlukta (a) ve farklılaşmanın erken aşamalarında sıçan yağ hücreleri (b).	59
3.2.9. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci ve morfolojisi.	61

3.2.10.	3T3-L1 hücrelerine immünboyama uygulamak için kullanılan <i>Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™</i> lamaları.	63
3.2.11.	Boyamalar için kullanılan özel petri kaplarının görüntüsü.	68
3.2.12.	S/MAR dizilerin etkinliğini karşılaştırmak için uygulanan deney planının şeması.	71
3.2.13.	Ko-kültür çalışmalarında kullanılan süzgeçler.	74
3.2.14.	Ko-kültür çalışmalarının özet şeması.	76
4.1.	PZR aracılıklı mutagenез ile elde edilen öncü dizilerine ve V5 epitopuna ait DNA fragmanlarının elektroforez görüntüsü.	85
4.2.	Hazırlanan amplikonların <i>pGEM-T Easy</i> vektörüne klonlama sonrasında DNA dizi analiz yöntemiyle doğrulanması.	85
4.3.	Yağ hücrelerine ait salgısal öncü dizilerin etkinliğinin ölçülebilmesi için oluşturulan sentetik gen yaklaşımının şeması.	86
4.4.	Öncü sinyali içermeyen GFP molekülünün adiposit öncülü hücrelerde lokalizasyon bulguları.	87
4.5.	Öncü dizisi içeren EGFP sinyalinin transfeksiyonun 18. saatinde yerleşimi.	88
4.6.	Transfeksiyonun 18. saatinde, PAI öncü sinyali içeren EGFP molekülünün yerleşimi.	89
4.7.	Transfeksiyonun 24. saatinde EGFP sinyalinin ER'den golgiye geçişi.	89
4.8.	Transfeksiyonun 30. saatinde EGFP molekülünün hücre içinde golgi organeline yerleşimi.	90
4.9.	Transfeksiyonun 12. ve 30. saatinde EGFP sinyalinin golgiye lokalizasyonu.	91
4.10.	Transfeksiyonun 30. saatinde EGFP sinyalinin hücre içerisinde golgi cisimciğine lokalize olmakta ve yer yer veziküller halinde görünüm sergilemektedir.	92
4.11.	Transfeksiyonun 36. saatinde EGFP ve klatrin proteinlerinin hücre içinde yerleşimi ve profil eğrisi.	93

4.12.	Hücre kültürü ortamından florometrik ölçüm yapılan farklı sayılarda transfekte hücrelerin hücre kültürü kabındaki görüntüleri verilmiştir.	95
4.13.	<i>Versamax</i> floroskopi cihazında EGFP transfekte hücre sayısına karşılık gelen göreceli floresan değeri çizilmiştir.	96
4.14.	Rotorgene 6000 floroskopi cihazında EGFP transfekte hücre sayısına karşılık gelen göreceli floresan değeri çizilmiştir.	96
4.15.	Zamana karşı, hücre dışından yapılan EGFP ölçüm sonuçları. Y eksenini, göreceli floresan değişimini göstermektedir.	98
4.16.	Olgun yağ hücrelerince hücre içi EGFP miktarı değişimi.	99
4.17.	3T3-L1 hücrelerin farklılaşma süreci.	101
4.18.	Sıçan yağ öncülü ve 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinin karşılaştırılması.	102
4.19.	Primer yağ öncülü ve 3T3-L1 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonu değerlendirme şeması.	103
4.20.	Sıçan yağ öncülü hücrelerinde transfeksiyon standardizasyonu.	104
4.21.	3T3-L1 hücrelerinde transfeksiyon standardizasyonu.	105
4.22.	3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmanın 5. gününde yapılan elektroporasyon işlemi sonrasında 7. gün görüntüsü.	106
4.23.	Tripan mavisi ile hücre canlılık testi.	107
4.24.	Klonlanan S/MAR dizilerinin jel görüntüleri.	108
4.25.	S/MAR içermeyen vektör omurgası (Negatif kontrol).	110
4.26.	IFNB 830 içeren vektör omurgası.	110
4.27.	IFNB 314x1 içeren vektör omurgası.	111
4.28.	IFNB 314x2 - BNBN içeren vektör omurgası.	111
4.29.	IFNB 314x2 - BNNB içeren vektör omurgası .	112
4.30.	APOB - BN - içeren vektör omurgası.	112
4.31.	APOB – NB içeren vektör omurgası.	113
4.32.	Bölünen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı.	114

4.33.	Dondurularak yeniden çözülen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı.	115
4.34.	Bölünen pasajlarda S/MAR dizileri eğim değerleri oranı.	116
4.35.	Dondurularak yeniden çözülen pasajlarda S/MAR dizileri eğim değerleri oranı.	117
4.36.	Kalp, kas, ve yağ dokularından elde edilen cDNAlardan MSTN gen ifadesinin karşılaştırılması.	119
4.37.	MSTN cDNA sentezi. Lider dizisi içeren (F1R – 1148 bç) ve içermeyen (F2R ve F2F, 1116 bç) MSTN cDNA ampliconları agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.	119
4.38.	PZR aracılıklı mutagenез ile MSTNdn eldesi.	120
4.39.	MSTNdn DNA dizi analizi sonucu. PZR aracılıklı mutagenез ile MSTN cDNA üzerinde yer alan RSRR dizisi, mutasyon yaratarak DLDG dizisine dönüştürüldü.	121
4.40.	İşlevsel analiz için rekombinant gen modeli.	121
4.41.	Olgun yağ hücresinde MSTNdn ifadesinin sağlanması.	122
4.42.	Öncü sinyali ve MSTNdn içeren yapıları ifade eden hücrelerde gözlenen bazı morfolojik değişimler.	124
4.43.	Transfeksiyona bağlı ER stresinin değerlendirilmesi.	125
4.44.	MSTNdn yapısının C2C12 hücrelerinde farklılaşma morfolojisi üzerine etkileri.	126
4.45.	MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde miyojenik regülatör faktörlerinden miyogenin ifadesi.	127
4.46.	MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde füzyon belirteci olan M-Kaderin ifadesi.	128
4.47.	MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde miyozin ağır zincir ifadesi.	128
4.48.	3T3-L1 hücrelerin farklılaşmanın birinci ayında morfolojileri.	129

- 4.49. PLGA yapıları içinde farklılaştırılmış yağ hücreleri. 3T3-L1 adipositlerin EGFP.C1 plazmid vektörü aktarımından sonra PLGA iskeletleri üzerine aktarılmış ve hücre kültüründe farklılaşmaya bırakılmıştır. 130
- 4.50. Transfekte olgun yağ hücreleri ile birlikte kültüre edilen C2C12 hücrelerinin morfolojik farklılaşma bulguları. 131
- 4.51. RBP4+APOB-NB+MSTNdn+pcDNA 3.1 vektör yapıları taşıyan 3T3-L1 hücrelerinin C2C12 farklılaşma belirteçleri üzerine etkisi. 133
- 4.52. RBP4+IFNB-NB+MSTNdn+pcDNA 3.1 vektör yapıları taşıyan 3T3-L1 hücrelerinin C2C12 farklılaşma belirteçleri üzerine etkisi. 134
- 4.53. MSTNdn'nin farklılaşma sürecindeki C2C12 hücre döngüsünde doğrudan etkisi. 135
- 4.54. MSTNdn varlığının 3T3-L1 adipojenik farklılaşması üzerine etkisi. 136
- 4.55. *APOB* S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında MSTNdn proteinlerin ifadesi. 137
- 4.56. *IFNB* 314x2 S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında MSTNdn proteinlerin ifadesi. 138

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
3.2.1. Seçilen adipokinlerin gen kodu ve öncü protein amino asit dizisi.	39
3.2.2. Tasarlanan megaprimerlerin dizisi.	40
3.2.3. IFNB-S/MAR830 bölgesi için tasarlanan primerler.	50
3.2.4. IFNB-S/MAR314 dizisi için tasarlanan primerler.	51
3.2.5. APOB genine ait S/MAR bölgesi için tasarlanan primer dizileri.	51
3.2.6. Miyostatin cDNAsı klonlama primerleri (öncü dizisi içermektedir).	54
3.2.7. MSTN öncü dizisine V5 epitopu eklemek için kullanılan primer dizileri.	55
3.2.8. Öncü dizi içermeyen miyostatin cDNA'sını çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.	55
3.2.9. Dominant-negatif etkili miyostatin amplikonunu sentezlemek için kullanılan primerler.	56
3.2.10. Farklı hücre tipleri için optimize edilen elektroporasyon şartları.	65
3.2.11. ER stres araştırması için tasarlanan sıçan XBP1 primerleri.	66
3.2.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmasında standardizasyon amaçlı kullanılan vektör omurgası dilüsyonları ve kopya sayıları.	72
3.2.12. Çalışmada kullanılan kRT-PZR primer dizileri.	78
4.1. S/MAR dizilerinin RBP4 ve EGFP dizisi içeren pcDNA3.1 vektör omurgasına eklenen plazmit dizileri.	108
4.2. Bölünen örneklerde farklı S/MAR dizilerinin pasajlar boyunca vektör omurga kaybı eğim değerleri.	116
4.3. Dondurularak yeniden çözülen örneklerde farklı S/MAR dizilerinin pasajlar boyunca vektör omurga kaybı eğim değerleri.	116

1. GİRİŞ

Yağ dokusu insan vücudunda en yaygın olarak bulunan yapıdır (Vücut kütlelerinin %20-25'i). On yıl öncesine kadar yağ hücreleri daha çok depo işlevi gören statik hücreler olarak kabul görmüştür. Son yıllarda yağ dokusu ile ilgili bilgiler, sanılanın aksine yağ hücrelerinin dinamik metabolik ve salgısal özellikleri olduğunu ortaya koymuştur. Erişkin insan vücudunda enerji beyaz yağ dokusu olarak adlandırılan hücreler, temelde enerji deposu olarak işlev görmektedir. Yağ hücreleri uygun uyarılara hızla cevap vererek, **adipokin** adı verilen, protein yapıda hormonları ve **sitokin** olarak bilinen bağışıklık sistemini düzenleyen sinyal moleküllerini üretebilmekte ve salgılamaktadır. Bu sinyal molekülleri aracılığı ile yağ hücreleri temel metabolik aktiviteyi etkileyerek, vücudun enerji metabolizması, yeme isteği, enerji kullanımı ve bağışıklık sistemini düzenleyebilmektedir. Bu süreçte yağ hücreleri, yoğun olarak memeli hücrelerine özgül salgısal peptid yollarını kullanır. Klasik salgısal peptid yollarının hücresel temelleri günümüzde iyi anlaşılmıştır. Bir salgısal proteinin salgı yolağına doğru taşınması gereken dizi ve yapı özellikleri iyi bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, salgı yollarının kullanımı ile arzu edilen bir proteinin yağ hücreleri tarafından sentezlenmesi teorik olarak mümkündür. Salgısal yolağına ait özgül dizilerle yapımı arzu edilen proteinin rekombinant DNA teknolojisi kullanımı ile bir araya getirilmesi mümkündür.

Rekombinant DNA teknolojisi 1980'lerin başında uygulamaya konulan bir biyoteknoloji kavramıdır. Çeşitli genlerin üzerinde yapılan değişiklikler sonucunda, doğaldan farklı protein ürünleri geliştirilerek gen mühendisliği uygulamalarını tanımlar. Burada amaç, gen dizileri üzerinde değişiklikler oluşturarak bu genlerin kodladığı proteinlerin daha dayanıklı hale getirilmeleri, yıkımlarının engellenmesi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değiştirilmesidir. Uygulamaları arasında, rekombinant enzim üretimi ve saflaştırılması, araştırma amaçlı rekombinant protein üretimi ve saflaştırılması, aşı geliştirme amacı ile immün cevap oluşturacak peptid epitoplarının üretimi, üretim sanayinde kullanılmak üzere endüstriyel enzimlerin eldesi sayılabilir. Günümüz nükleik asit teknolojisi uygulamaları ile doğal gen dizileri üzerinde yapılan değişikliklerle gen ürünü proteinlerin hücre trafiğinin yönlendirilmesi ve salgısal özellik kazandırılmasını da mümkün hale getirebilir. Bu

amaçla hazırlanan sentetik gen parçasının hedef hücre veya organizmaya uygun şartlarda aktarımı gerekmektedir. Bu işleme gen transferi adı verilir.

Memeli hücrelerine gen transferi iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi, transfer edilen genetik elemanların (transgen) memeli hücre genomuna katılımı ile gen ifadesinin sürekliliğinin ve kalıcılığının sağlandığı durumdur. Bu duruma kalıcı gen nakli adı verilir. Ancak bu yaklaşım çeşitli biyogüvenlik riskleri taşımaktadır (1) . Bu risklerin başında transgenin hücre genomunda mutasyonlara (hatta kanserleşmeye) neden olması yer almakla birlikte, entegre olan genin ifadesinin zaman içinde ortadan kalkması da mümkündür. Diğer bir yöntem ise transfer edilen genin genoma katılmadan hücre çekirdeğinde aktif olarak kalması temeline dayanır (epizomal). Ancak, her hücre bölünmesi ile birlikte transgen kaybı da ortaya çıkabilmektedir. Bölünmeyen hücrelerde transgen daha stabil olarak kalmakla birlikte, yine de zamanla ortadan kalkmaktadır. Bu sorunun olası bir çözümü, transfer edilen genetik elemanların çekirdek içi yapısal proteinlere (*scaffold/matrix*) bağlanmasını sağlamaktır (2) .

Memeli gen dizileri içinde adenin ve timinden zengin S/MAR dizileri tanımlanmıştır. Günümüzde genom bilimin temel kavramlarına “bir gen – bir S/MAR” görüşü eklenmiştir (2) . Literatürde en iyi tanımlanmış S/MAR dizileri içinde apolipoprotein B (*APOB*) ve interferon beta (*IFN β*) genlerine ait diziler yer almaktadır. Bu amaçla memeli hücrelerine aktarılan bir transgenin ömrünün uzatılması için, rekombinant DNA teknolojisi kullanımı ile hazırlanan yapıların içine *scaffold / matriks* bağlanma dizilerinin (S/MAR) ilave edilmesi mümkündür.

Olgun yağ hücrelerinin protein üretim ve salgı işlevinin etkinliğinin gösterilebilmesi için hazırlanması gereken DNA yapısının yukarıda sıralanan özellikleri içermesi gereklidir. Bu niteliklerin yanında *in vitro* ve *in vivo* şartlarda işlevsel takibi mümkün olan bir aday proteine de ihtiyaç vardır.

In vitro ortamda olgun yağ hücresi eldesi ve bu hücrelerle çalışmanın bazı teknik güçlükleri ve sınırları vardır. Olgun yağ hücreleri kısa dönem çalışmalarda sıklıkla *in vitro* organ kültürü veya organotipik kültür olarak bilinen yağ biyopsisinin hücre kültürü ortamında yaşatılması yöntemi kullanılmaktadır. En ideal hücre kültürü koşullarında dahi bu hücrelerin iki haftadan daha uzun süre yaşatılmaları mümkün değildir. Bu nedenle uzun süreli gözlemler için bu yaklaşım uygun değildir. Diğer

yönden, olgun yağ dokusundan izole edilen yağ öncülü hücreler uzun süreli kültüre edilebilir ve istenildiğinde olgun yağ hücreleri olarak farklılaştırılabilir (3) . Bu farklılaşmayı indüklemek için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır (4) . Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda, sıçan interskapular yağ dokusundan elde edilen primer adiposit öncülü hücreler (preadiposit) ve 3T3-L1 adiposit öncülü hücre hattı kullanılmıştır ve *in vitro* koşullarda farklılaştırılması ile oluşturulan olgun yağ hücreleri kullanılacaktır (5) .

Miyostatin *TGF-β* protein ailesinin bir üyesi olup, memelilerde kas gelişiminin bir inhibitörüdür (6) . Kas dokusundan salgılanan miyostatin peptidi, hücre dışında proteolitik kesime uğrayarak aktif hale geçer. Bu peptid, dimer oluşturarak kas dokusunda yer alan aktivin tip 2 reseptörlerine bağlanarak kas gelişimini (hipertrofi ve hiperplazi) durdurmaktadır. Diğer yönden, miyostatin propeptidi üzerinde yer alan proteolitik kesim bölgesinin mutasyona uğratılması sonucunda, dimerizasyon sağlayan ancak aktivin tip 2 reseptörüne bağlanamayan dominant-negatif etkili bir rekombinant miyostatin izoformu oluşturulabilmektedir (7) . Bu yapay peptid, miyostatin'in kas gelişimini durdurucu etkisini ortadan kaldırabilmesi nedeni ile yağ hücrelerinin salgı yolağı tarafından üretilmek üzere iyi bir aday protein özellikleri taşımaktadır. Dominant negatif etkinin, *in vitro* şartlarda etkinliğinin gösterilmesi ve takibi mümkündür.

Bu çalışmanın amacı yağ hücrelerinin protein üretim ve salgı mekanizmasını kullanmak üzere rekombinant DNA teknolojisi yaklaşımı ile hazırlanan tasarımlarla; en etkin salgısal işlevi gösteren yaklaşımın seçilerek, en uzun süreli gen ifade yönteminin karşılaştırılması ve bunun sonucunda seçilen en uygun yaklaşım ile bir protein üretim modelinin etkinliğinin gösterilmesidir.

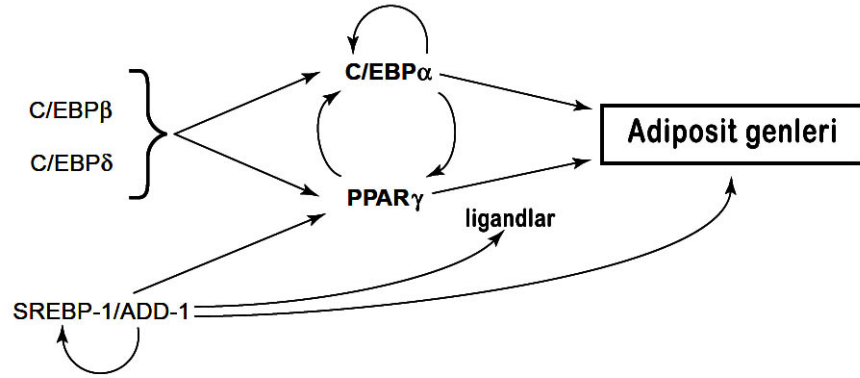
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusu ve Özellikleri

Yağ dokusu insan vücudunda temelde iki farklı yerleşimde bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, cilt altı dokusu olup, yağ hücrelerinin en yaygın bulunduğu ve en kolay erişilebilir hücre kaynağıdır. Cilt altı yağ dokusunda yağ hücreleri yoğun bir stromal desteğe sahiptir ve bu stromayı oluşturan bağ dokusu hücreleri de gereğinde çoğalarak yeni yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Cilt altı yağ dokusu stroması içinde bu bağ dokusu hücrelerinin yanı sıra yaygın bir kılcal damar ağı da bulunur. Bu kılcal damar ağı yağ dokusunun sürekli olarak kanlanması sağlar ve yağ hücrelerine hem efferent hem de afferent amaçlarla destek olur. İnsan vücudunda yer alan ikinci önemli yağ dokusu ise periton içi ve çevresinde bulunan karın içi yağ dokusudur. Cilt altı yağ dokusundan daha farklı özelliklere sahip olan karın içi yağ dokusu daha statik durumda olup ilerleyen yaşla birlikte kütlelerinde artış gözlenir. Cilt altı ve karın içi yağ dokusu temelde beyaz yağ dokusu olarak isimlendirilir. Erişkin insan vücudunda varlığı tartışmalı olan bir diğer yağ dokusu ise kahverengi yağ dokusudur. Bu doku daha çok yenidoğan bebeklerde baş, boyun çevresi, sırt ve göğüs bölgelerinde bulunur. Kahve rengi yağ dokusunun en önemli özelliği mitokondriden zengin oluşu ve “*uncoupling*” proteinleri yardımı ile ısı oluşturmasıdır. Bu doku, kemirgenlerin vücudunda bölgede, interskapular bölgede beyaz yağ dokusu ile birlikte yaşam boyu yer alır. Kahverengi yağ dokusu köken olarak kas dokusu ile benzerlikler gösterir ve beyaz yağ dokusuna dönüşebilir (8) .

2.1.1. Yağ Dokusunun Farklılaşması

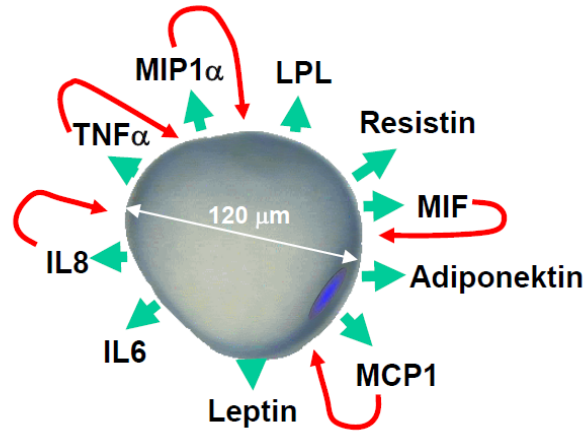
Adipositlerde farklılaşma programı iki farklı temel mekanizma ile tetiklenir. Bunlardan birincisi olan hücre içi yolak C/EBP β ve C/EBP δ transkripsiyon faktörleri aracılığı ile tetiklenir. Bu iki faktör, ikinci basamakta yer alan PPAR γ ve C/EBP α 'yı indükler. Bu ikinci basamak, yağ farklılaşma programına özgü biyokimyasal fenotipin kazanımdan sorumlu tüm genlerin transkripsiyonundan sorumludur (Şekil 2.1.). Yağ farklılaşma programını başlatan ikinci yolak ise hücre dışı yolak olarak adlandırılır. Hücre dışı uyarımlar aracılığı ile indüklenen SREBP-1 yukarıda sıralanan ikinci basamak transkripsiyon faktörleri olan PPAR γ ve C/EBP α 'yı indükler (9) .



Şekil 2.1. Yağ hücresi farklılaşma yolağında yer alan transkripsiyon faktörleri.

2.1.2. Yağ Dokusunun Salgısal Özellikleri

İnsan vücudunda son on yıla kadar yağ dokusunun fazla kalori alımına bağlı yağ depolayan ve temelde “depo” işlevi gören pasif bir doku tipi olduğuna inanılırken özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla yağ dokusunun çok önemli aktif metabolik görevleri olduğu ortaya konmuştur. Yağ dokusunun özellikleri arasında bu tez çalışması açısından en önemli yönü, yağ dokusunun çok güçlü bir endokrin salgı organı olarak da işlev görmesidir. Yağ dokusu uygun koşullarda ve gerektiğinde sayısız sitokin, endokrin ve parakrin mediyatör ve proteini işleyerek hızla hücre dışına (dolaşıma) salgılayabilmektedir (Şekil 2.2.). Bu özelliğinden dolayı yağ dokusu tarafından salgılanan bu peptid grubuna “adipokinler” adı verilmiştir (10) .



Şekil 2.2. Olgun yağ hücresi, vücudun fizyolojik durumuna bağlı olarak sayısız adipokinleri salgılar.

Beyaz yağ dokusu tarafından salınan ve bu tez çalışması kapsamında yer alan adipokin ve benzeri salgısal proteinler ve işlevleri aşağıda özetlenmiştir.

Leptin: Gıda alımı sonrasında karaciğerden salgılanan yağ asitlerine cevaben beyaz yağ dokusundan salınan leptin, hipotalamusta yer alan doyma merkezini uyarak yemek yeme isteğini baskılayan 16 kDa ağırlığında bir peptid hormondur (11).

Apolipoprotein E (ApoE): Başlıca karaciğer ve yağ dokusu tarafından sentezlenen (beyin, böbrek ve dalakta da bulunur) trigliseridden zengin şilomikronların yüzeyinde yer alan bir yapısal proteindir. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden vitamin E metabolizmasına kadar sayısız işlevde yer almakla birlikte kolesterol metabolizmasında da önemli rol alır (12).

Adiponektin (AdipoQ): Glukoz ve yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu bir adipokindir. Özgül olarak yağ dokusundan salgılanır ve hedef organı olan karaciğer ve diğer periferik dokular üzerinde etki eder. Yağ dokusunda en fazla bulunan ve salgılanan protein olarak da tanımlanmıştır (13).

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1): Doku plazminojen aktivatörü (tPa) ve urokinaz'ın (uPa) özgül inhibitörü olan PAI-1, oluşmuş olan kan pıhtılarının parçalanması işlemini düzenler. Temelde endotel tarafından yapılmakla birlikte beyaz yağ dokusu tarafından da sürekli bir bazal yapımı söz konusudur (14).

Retinol bağlama proteini-4 (RBP-4): Adipositler tarafından salgılanan ve retinoik asitin transportundan sorumlu lipokalin ailesi üyesi taşıyıcı özellikte bir proteindir (15) .

Adipsin: Alternatif kompleman aktivasyon yolağının bir bileşeni olan adipsin, tripsin peptidaz ailesi üyesi bir proteindir. Beyaz yağ dokusundan yüksek miktarda sentezlenerek salgılanır. Yağ dokusunun bağışıklık sistemi ile olan yakın ilişkisinin önemli kanıtlarından biridir (16) .

Yağ dokusunun salgısal özelliğini daha da önemli kılan başka bir niteliği ise, bu hücrelerin farklılaşma sürecini tamamlamaları halinde yıllar boyu kendilerini idame etmeleridir. Başka bir ifadeyle, farklılaşmış yağ hücreleri hiç bir zaman eski haline geri dönmez (17) . Bu nedenle adipokinlerin sentezi ve salınımı bu hücrelerde yaşam boyu devam eden bir işlemdir.

2.1.3. Yağ Dokusu ile Çalışma Teknikleri ve Sınırları

Obesite ve insülün direnci gibi hastalıklar yağ dokusu ve metabolizması ile yakından ilişkili yaygın sağlık sorunlarıdır. Bu nedenle, yağ hücrelerini konu alan çalışmalar sıklıkla yağ dokusu biyokimyası ve gelişimini sorgulamaktadır. Olgun adiposit hücreleri ile *in vitro* ortamda çalışmanın güçlükleri ve sınırları vardır. İlk olarak, olgun yağ hücreleri proteolitik enzimlerle muameleye dayanıksız olmaları nedeni ile canlı dokudan çıkartılarak kültüre edilemezler (18) . Dayanıksız fiziksel özellikleri nedeni ile mekanik ayrıştırma uygulamalarının kullanımı da mümkün değildir. Olgun yağ hücreleri ile çalışmanın pratik yollarından biri *in vitro* organ kültürü veya organotipik kültür olarak bilinen yağ biyopsisinin hücre kültürü ortamında yaşatılmasıdır. Bu koşullarda yağ biyopsisinin yüzeyinde yer alan hücrelerin manipülasyonu ve gözlenmesi mümkün olabilmektedir ve iyi hücre kültürü koşullarında iki haftadan daha uzun süre gözlenebilmeleri mümkün değildir (5) . Diğer yönden, *in vivo* yağ dokusundan izole edilen yağ öncülü hücreler *in vitro* şartlarda kültüre edilebilir ve istenildiğinde olgun adipositler olarak farklılaştırılabilir (19) . Bu farklılaşmayı indüklemek için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır (4) . Bu tez çalışması kapsamında, yağ öncülü hücreler sıçan interskapular yağ dokusundan izole edilmiş ve *in vitro* koşullarda farklılaştırılarak olgun adiposit hücreleri elde edilmiştir (5) . *İn vitro* koşullarda farklılaştırılan yağ hücreleri dokuda bulunan stromal yapı

desteğinin bulunmaması nedeni ile hücreler kırılabilir ve dış etkilere açık durumdadır. Bu durumdan dolayı hücrelerin idamesini güçlendirmektedir. Bu tanımlanan problemin dışında *in vitro* ortamda farklılaştırılan yağ hücreleri ile ilgili bir diğer önemli sorun daha vardır. Olgun adipositlerin hücre kültüründen alınıp başka bir işlem için farklı bir ortama taşınması mümkün değildir. Bunun nedenlerinin başında, olgun adipositlerin proteaz enzimleri ile muamele edilememesi yer almaktadır. Tripsin veya benzeri enzimlerle muamelesi ile olgun yağ hücreleri hızla ölmektedir (20) . Bu her iki problemin de aşılabilmesi için uygulanabilecek bir yaklaşım, yağ hücrelerinin taşınabilir, biyoyumlu *scaffold* matriks yapıları içinde olgunlaştırılmasıdır.

Scaffold matriks yapıları, Poli-Laktik-ko-Glukonik Asit (PLGA) polimerinden üretilmektedir. Laktik asit ve glukonik asit bileşenlerinin farklı oranlarda karışımları ile elde edilen ve yıkım süresi ayarlanabilen katı yapıda polimerik materyallerdir. Çeşitli polimer hazırlama teknikleri ile istenilen por çapına sahip yapılar oluşturulabileceği gibi uzun dönemde suda çözünebilir yapılar, laktik asit ve glukonik asit gibi iki biyoyumlu bileşiğe yıkılmaktadır. Yağ hücrelerine mekanik destek sağlamak bakımından dayanıklı ve katı yapıda olması nedeni ile *in vitro* çalışmalarda tercih edilmiştir (5, 21) .

Primer yağ dokusundan hücre izolasyonunun önemli sorunlarından bir diğeri de, bu dokunun yağ hücrelerinden başka diğer hücre tiplerini de zengin oranda barındırmasıdır. Yağ dokusunda yağ öncülü hücreler ile birlikte fibroblast, vasküler endotel hücreleri, ve makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık sistemine ait hücreler bulunur (22, 23) . Hücre kültürü şartlarında yağ öncülü hücreleri diğer hücrelerden arındırmak pratik olarak mümkün değildir. İzole edilen yağ öncülü hücrelerin saf olmamaları hücre kültüründe yapılan çalışma sonuçlarını, özellikle gen transferi verimliliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu sorunun akılcı çözümlerinden biri de, hücre hatlarının kullanımınıdır. Primer yağ hücrelerinin tüm özelliklerini en iyi modelleyen ve en yaygın kullanılan hücre hatlarından biri 3T3-L1 hücre hattıdır.

3T3-L1 Hücre Hattının Özellikleri

3T3-L1 hücre hattı (*Swiss Mouse embryonic fibroblast - adipose like cell line*) 1963'te bir embriyonik fibroblast hücre hattı olan 3T3 hücre hattından elde edilmiştir (24) . 3T3-L1 hücrelerin morfolojisi fibroblast hücrelerine benzerlik göstermekte ve uygun şartlar altında farklılaştırılıp yağ hücrelerine dönüşmektedirler, bu nedenden dolayı adipogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılan standart bir hücre modelidir. Farklaşma sürecinde yüksek insulin reseptörü ifadesi göstermelerinden dolayı diyabet ve obezite çalışmalarında da tercih edilen hücrelerdir (25) .

2.2. Biyolojik Sistemlerde Protein Salgı Mekanizmaları

Ökaryotik hücreler temelde iki farklı protein salgı yolağını kullanmaktadır;

1. Klasik salgı yolağı (endoplazmik retikulum – golgi yolağı)
2. Klasik olmayan salgı yolakları

Enzimler ve hormonlar gibi salgısal peptidlerin çoğu, kltrin ile kaplanmış veziküller içinde hücre zarına yöneltilerek salgılanır. Bu klasik salgı yolağıdır. Hücre dışında özgül işlevleri olan sınırlı sayıda özel proteinler, endoplazmik retikulum (ER)- golgi yolağını kullanmadan ve proteolitik değişime uğramadan klasik olmayan salgı yolakları ile hücre dışına salgılanabilmektedir (26, 27) .

2.2.1. Ökaryotik Klasik Salgı Yolağı

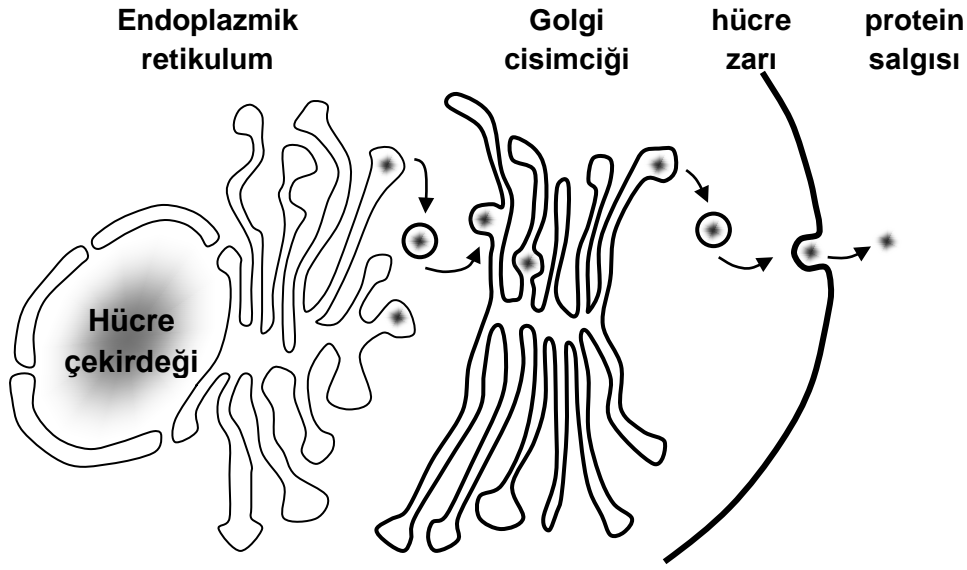
Hücre içinde sentezine başlanan salgısal proteinlerin çoğu, klasik salgı yolağı ile hücre dışına salınır. Bu salgısal işlem özellikle memeli vücudunda karaciğer, pankreas ve yağ dokusu gibi salgı yapma gücü yüksek ekzokrin dokuların hücrelerinde önemli bir hücresel aktivitedir (28) .

DNA üzerinde yer alan genetik kodun kalıp olarak kullanılması ile birlikte yeni protein dizisine ait şifre mRNA molekülüne aktarılır. Yeni sentezlenen mRNA molekülünün çekirdeği terk ederek sitoplazmaya çıkması ile birlikte protein sentezi sitoplazmada başlar. Ribozomlarda mRNA molekülü üzerinde yer alan genetik şifre 5' ucundan 3' ucuna doğru okunur ve karşılık gelen amino asitler N ucundan C ucuna doğru dizilmeye başlanır. Yeni bir protein sentezinin ilk sentezlenen kısmı

amino ucu yani N terminalidir. Salgısal proteinlerde, bu N terminalinde yer alan protein zincirinin öncü kısmı, yeni sentezlenen proteinin hücre içinde yerleşim yerini belirleyen bir “öncü dizi” içerir. Literatürde “öncü dizi”, sinyal dizi, sinyal peptid, lider dizi gibi başka adlarla da anılmaktadır. “Öncü dizi” bir sinyal görevi görerek yeni sentezlenmekte olan proteinin gerekli hücre içi kompartmanına yönlmesine aracılık eder. Öncü dizi ve özellikleri 2.2.3 kısmında detaylandırılmıştır. Bir öncü dizi taşımayan proteinler, hücrenin içinde, genellikle sitoplazmada kalır. Bir proteinin N terminalinde yer alan “öncü dizi”, amino asit içeriğine ve özelliklerine göre hücre tarafından sentezlendikten sonra salgılanmasına aracılık eder (29) .

Öncü dizi taşıyan salgısal proteinler ribozomlarda sentezlenirken sinyal tanıma partikülü (*Signal recognition particle* - SRP) adı verilen aracı proteinler tarafından tanınarak ER’a taşınır. ER, üzerinde SRP özgül reseptörüne bağlanarak salgısal proteinin sentezinin ER lümeninin içine doğru devam etmesi sağlanır. ER lümeni içinde yer alan BIP şaperonu, salgısal proteinin doğru katlanmasına aracılık eder. Protein sentezinin sonlanması ile birlikte lider dizi sinyal peptidaz adı verilen bir enzim tarafından kesilir. Yeni sentezlenen salgısal proteinin, bir kanallar ağı yapısında olan ER lümenine düşmesi sağlanır (28) .

ER içinde taşınan salgısal protein golgi kompleksine aktarılır. Golgi organelinde kltrin kaplı veziküllere paketlenen salgısal proteinler bu veziküllerin hücre zarına kaynaması ile hücre dışına salgılanır (30) . Bu hücresel işleve “klasik salgı yolağı” adı verilir. Aşağıda Şekil 2.3.’te klasik salgı yolağı şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Klasik salgı yolağı ve hücre içi trafiğı.

2.2.2. Ökaryotik Klasik Olmayan Salgı Yolağı

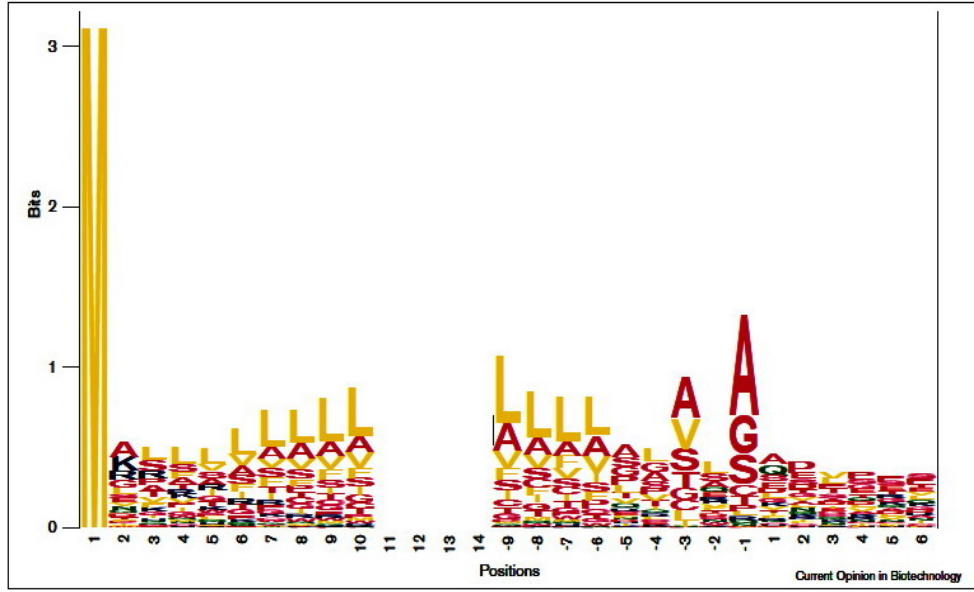
Klasik olmayan salgı yolları ile salgındığı gösterilmiş proteinler arasında, sitokinler, büyüme faktörleri, hücre proliferasyonu, angienez, farklılaşma ve enflamasyon gibi fizyolojik olaylarda rol alan moleküller sıralanabilir (26) . Klasik olmayan salgı yolları ile salgılanan proteinler iki alt sınıfta gruplandırılabilir. İlk olarak, başlıca hücre dışı alanda fonksiyon gösteren faktörler yer alır. İnterlukin 1 α ve 1 β bu sınıfta yer alır (31, 32) . İkinci sınıftaki proteinler sitoplazmada veya çekirdekte yerleşim gösterir. Ancak, hücre dışından gelen belirli bir uyarı varlığında, hücre içerisinde sahip oldukları işlevden farklı bir göreve aracılık etmek üzere hücre dışına salgılanırlar (33) .

Literatürde, klasik olmayan salgı yollarında sentezlenen proteinlerin dört temel mekanizma ile hücre dışına salgılandıkları tartışılmıştır. Bu yollar; lizozomal salgı (34,35) , plazma membran taşıyıcıları (36) , ekzozomlar (*vesicular export*), ve ekzo-veziküller (tomurcuklanma) olarak adlandırılmıştır (33, 37) .

2.2.3. Klasik Salgı Yolağında Öncü Dizi ve Özellikleri

Hücre içinde protein transportu konusundaki çalışmaları ile 1999 yılında Nobel ödülü alan Günter Blobel ve David Sabatini'nin hipotezine göre, bu öncü dizilerinde bulunan amino asit dizisi, sentezlenen proteinlerin hücre zarına hedeflenmeleri için gereken bilgiyi taşımaktadırlar (38,39) . Günümüzde salgısal proteinlerin N-terminalinde bulunan lider dizileri detaylı karakterize edilmiştir (40) .

Öncü dizi, proteinlerin hedeflenmeleri ve hücre içi salgı sistemi boyunca translokasyonunu düzenlemektedir (41) . Salgısal proteinlerin öncü dizilerinin amino asit dizileri ve uzunlukları birbirlerinden farklıdır. Ancak, tüm sinyal peptidlerin değişmez ortak özellikleri vardır; sinyal peptidler genellikle 20-30 amino asitten oluşmaktadır. Bu dizi içinde 3 önemli bölge (*domain*) bulunur. N-terminal kısmı genelde, metiyonin amino asidini takip eden, pozitif yüklü amino asitler dizisinden oluşmaktadır. Bu bölgeyi takiben 7-13 hidrofobik amino asitten oluşan H-bölgesi (*H-domain*) yer almaktadır. H-bölgesi, lösin, alanin ve valinden zengin bir bölgedir ve bu nedenle alfa-heliks yapısı oluşturma eğilimindedir. En son kısım olan C-bölgesi (*C-domain*), sinyal peptidazlar tarafından tanınarak kesilmektedir. Bu bölge başlıca alanin ve prolin olmak üzere polar amino asitlerden zengin bir kısımdır (Şekil 2.4.) (42,43) . Sinyal peptidlerin en önemli özelliği, H-bölgesinin hidrofobik içeriğe sahip olmasıdır. H-bölgesin hidrofobik özelliği ile, sinyal peptidi tanıma proteini "SRP" parçacığı tarafından tanınır ve bu şekilde yeni sentezlenen protein ER'a yönlendirilir. Sinyal peptidin hidrofobisitesinin bozulması, SRP'nin sinyal peptide bağlanmasını engeller (44) .



Şekil 2.4. 2000 yılında Ladunga tarafından yayınlanan makaleye göre sinyal peptidlerinde bulunan bölgeler (*domain*) ve amino asitlerin oranları. Öncü dizinin N-terminalinde, metiyonin ile başlayan hidrofilik bir bölgedir. Ardından, 7-13 hidrofobik amino asitten oluşan, lösin, alanin ve valin den zengin H- bölgesi bulunmaktadır. Peptidin C-terminalinde ise alanin ve prolinden zengin C-bölgesi bulunmaktadır.

Genom projesinin tamamlanması ile sinyal peptidlerin tahmini ile ilgili veri tabanları ve birçok sayısal tahmin algoritmaları tanımlanmıştır. Bu veri analizi yaklaşımlarının çoğu, ökaryot ve prokaryotların klasik salgı yolağı için kullanılan sinyal peptidleri öngörebilmektedir (45, 46) . Ayrıca, klasik olmayan yollar aracılığı ile salgılanan proteinleri öngörmek üzere de yaklaşımlar vardır (45) . Klasik yolları kullanarak salgılanan proteinlerin sinyal peptidlerini tanımlamaya yönelik algoritmaların arasında, *SignalP* başarılı bir uygulamadır (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (47) . Bu program, sağlanan bir protein dizisinin sinyal peptid taşıyıp taşımadığını birden fazla algoritma ile öngörerek peptidaz kesim noktasını da belirlemektedir (48) .

Salgısal olmayan bir polipeptid dizisinin N-terminal kısmına bir “öncü dizi” yerleştirilmesi halinde, bu proteinin ER’a yönlendirilerek salgısal sistem boyunca

taşınarak hücre dışına salgılanması sağlanabilir. Bu işlem rekombinant protein tasarımı ve gen mühendisliği teknolojisi ile gerçekleştirilebilir.

2.3. Biyolojik Sistemlerde Gen Aktarımı ve Rekombinant Protein Tasarımı

Son yirmi yıl içinde makromoleküllerin ökaryot hücelere aktarımında çeşitli yöntemler ve yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle DNA, RNA, oligonukleotid ve protein gibi biyomoleküllerin canlıya ve kültürü yapılan hücelere aktarımı mümkündür. Başta DNA olmak üzere, bu yaklaşım, gen tedavisi, kanser gen tedavisi ve viral enfeksiyon hastalıkları tedavisi yanında çok çeşitli araştırma uygulamalarında da kullanılmaktadır (49, 50) . DNA temelli gen transferi uygulamaları, rekombinant DNA teknolojisi aracılığı ile işlevsel gen dizileri tasarımı ve hazırlamayı gerektirir.

2.3.1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Temelleri

Rekombinant DNA teknolojisi, genombilim alanı içinde yer alan işlevsel çalışmalar, biyokimyasal analizler ve protein eldesine yönelik ihtiyaçlar sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji, ilgilenilen DNA parçası üzerinde gerekli işlevsel incelemeleri yapabilmek amacıyla saf olarak elde ederek amaca uygun bir taşıyıcı DNA dizisine (vektör) aktarımı olarak özetlenebilir. Rekombinant DNA teknolojisi uygun DNA işleme enzimleri aracılığı ile kırılan DNA parçalarının doğru bir şekilde okunabilmesi ve içerdiği dizinin ifade edilebilmesi için uygun vektörlerin kullanımı gereklidir. Bu amaçla moleküler klonlama teknikleri ve klonlama vektörleri kullanılır. Klonlama çalışmalarında çembersel DNA yapıları olan plazmidler en sık başvurulan aracı vektörlerdir. Gen taşıyan vektörler temelde üç gruba ayrılır. İlk olarak klonlama vektörleri dizi içeriğinden bağımsız şekilde bakteri hücresinde ilgilenilen geni çoğaltmak amacıyla kullanılır. İkinci olarak prokaryotik ekspresyon vektörleri, ilgilenilen gen dizisinde kodlu olan protein dizisinin bakteri hücrelerinde eldesini amaçlamaktadır. Üçüncü olarak ökaryotik ekspresyon vektörleri ise ilgilenilen dizide kodlu olan genin ökaryot hücrelerinde (sıklıkla memeli hücrelerinde) proteine dönüştürülmesini sağlar (51) .

Plazmid vektörler üzerinde aktarılan ve ilgilenilen DNA parçasının bakteri tarafından çoğalabilmesi için gereken genetik diziler mevcuttur (ör: replikasyon

başlama dizisi). İlgilenilen DNA parçasının kırılmasında ve vektöre eklenmesinde gerekli olan bir diğer önemli gereç ise DNA modifikasyon enzimleridir. Bu enzimler içinde restriksiyon endonükleaz enzimleri, DNA parçasının doğru yönde ve doğru yere yerleştirilebilmesi için kullanılır (51,52) .

2.3.2. Memeli Hücrelerine Gen Aktarımının Temelleri (Kalıcı / Geçici Gen Aktarımı)

Memeli hücrelerine gen parçalarının nakli için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlar temelde fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlar aracılığı ile sağlanmaktadır. Fiziksel gen transferi, ısı şoku veya elektroporasyon gibi yöntemleri içermekte ve daha çok *in vitro* şartlarda uygulanmaktadır (53) . Kimyasal gen transferi ise, DNA yapılarını dokulara ve hücrelere taşımaya yardımcı polietilenimin veya lipozomlar gibi özelleşmiş yapılar aracılığıyla sağlanır (54) . Gen transferinin biyolojik aracısı ise, virüslerdir (55) . Memeli hücrelerine gen transferi için çok yaygın olarak kullanılan bu yöntemde, transfer edilmesi amaçlanan gen parçası bir virüsün genomuna ilave edilerek hedef hücreye yönlendirilmesi prensibini taşımaktadır. Viral vektörler, viral olmayan gen aktarım yöntemlerine göre daha yüksek başarı sağlamaktadır. Örnek olarak, HeLa hücrelerine gen aktarımında, plazmidlerin fiziksel yöntemlerle aktarım etkinliği adenovirüslere göre 7000 kat daha az olduğu gösterilmiştir (56) .

Memeli hücrelerine nakledilen DNA yapılarının kaderi hücre çekirdeğinde iki farklı şekilde devam eder. Birinci durumda, transferi uygulanan genetik elemanların memeli hücre genomuna kalıcı şekilde entegrasyonu ile gen ifadesinin sürekliliği sağlanır. Bu kalıcı entegrasyon canlı uygulamalarında biyogüvenlik açısından çeşitli riskler taşımaktadır (2) . Bu risklerin içinde en önemlisi, gen transferi yapılan hücrede mutageneze bağlı işlev bozukluğu ve kanserleşmeye neden olma riskidir. Transfer edilen genin bir diğer olası kaderi ise DNA parçasının genoma entegre olmadan epizomal olarak çekirdekte kalması durumudur. Ancak, bu durumda, DNA parçası, bir kromozom kadar stabil olamamaktadır. Her hücre bölünmesi ile birlikte transfer edilen DNA fragmentının kaybı ortaya çıkabilmektedir. Bölünmeyen hücrelerde transfer edilen gen parçaları daha uzun süre kalıcı olabilmekle birlikte, yine de çeşitli hücre içi savunma mekanizmaları ve öncelikle metilasyon işlevi

aracılığı ile zaman içinde inaktive olabilmektedir. Kalıcı olmayan epizomal gen transferi sonrasında ortaya çıkan bu sorunların olası bir çözümü de, transfer edilen genetik elemanların çekirdek içi yapısal proteinlere (*scaffold/matrix*) tutunmasını sağlamaktır (2) . Bu konu aşağıda 2.4.'te detaylandırılmıştır.

Kalıcı gen aktarımı (genoma entegrasyon) ve geçici gen aktarımının birbirlerine çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Yakın zamanlara kadar, genoma entegrasyonun amaçlandığı kalıcı transfeksiyon yaklaşımında doğrusal DNA parçaları kullanılmıştır. Nakli yapılan doğrusal DNA molekülünün kromozoma entegre olması homolog olmayan DNA tamir mekanizması ile yeniden organize olma olasılığına bağlıdır. Bu yaklaşım, genetiği değiştirilmiş hücre hatları veya genetiği değiştirilmiş hayvan eldesinde kullanılmaktadır. Günümüzde bu yaklaşımın yerini genoma entegre olan viral vektörler almıştır (retroviral / lentiviral). Transfer edilen DNA'nın inaktive edilme olgusu ise hedef hücrenin bir savunma mekanizması niteliğindedir; Genel olarak plazmid vektörler üzerinde yer alan prokaryotik replikasyon merkezi, ve antibiyotik rezistan geni gibi bakteriye ait DNA elemanları tekrarlayan CpG motifleri içermektedir (57, 58) . Bu dizi özellikleri nedeni ile bu bakteriyel gen yapıları metillenerek inaktive edilmektedir. Diğer yönden, ökaryot organizmada bir işlevi olmayan antibiyotik direnç geninin yatay gen geçiş yolu ile yayılması ve alıcı hücrede kalıcı etkinlik yapması biyolojik risk olarak algılanmaktadır (59) .

2.3.3. Ökaryotik Gen Aktarımı ve Tedavide Kullanımı (Gen Replasman Tedavisi)

Kalıtsal hastalıkların tedavisine yönelik olarak gen replasman tedavisi, son 20 yılın önemli araştırma konularından birini oluşturmaktadır. Hatalı genlerin yeniden düzenlenmesi veya gen aktarımı yoluyla sağlıklı genlerin nakledilmesi iki farklı yaklaşım olarak başı çekmektedir.

İnsanda ilk gen terapisi denemesini 1990'da Dr. French Anderson gerçekleştirmiştir. Adenozin deaminaz enziminin (ADA) geninde meydana gelen mutasyonlarla ortaya çıkan bu nadir tek gen hastalığı ağır kombine immun yetmezlik tablosuna neden olmaktadır. *Ex vivo* gen terapisi stratejisinin kullanıldığı bu girişimde, adenozin deaminaz enziminin (ADA) eksikliğinden kaynaklanan

hastalığın tedavisi amaçlanmıştır (60) . ADA eksikliği, bir nadir genetik hastalıktır. Bu ilk insan gen terapisi denemesi 2 hasta çocuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hastaların T-lenfosit hücreleri alınarak normal insan ADA geni, retrovirüs vektörü yardımıyla nakledildi. Düzeltilmiş hücreler tekrar hastalara geri verildi. Tedavi sonucunda iki çocukta da iyileşme kaydedildi. Bu ilk insan denemesinden sonra kistik fibrosis, hiperkolesterolemi, bazı kanser türleri ve AIDS için gen terapileri tasarlandı. Yukarıda başarılı örneği verilen viral gen aktarımı yaklaşımının yanında tedavi uygulamalarının tartışmalı örnekleri de vardır (61) .

Vektörlerin uygun bir genomik bölgeye hedeflenmesindeki başarısızlık gen tedavi yaklaşımını güçleştirmektedir. Viral vektörlerin klonlama kapasiteleri genelde sınırlıdır. Nakledilmesi istenen bazı gen dizileri viral vektörlerin kapasitesinin çok üzerinde uzunluğa sahiptir (Distrofin geni). Viral vektörlerin hazırlanma ve analiz işlemleri zahmetli ve çaba gerektiren bir süreçtir. Hedefleme konusunda seçiciliğinin yanında, retrovirüsler sadece bölünen hücelere hedeflenebilir (62) . Uzun süreli gen ifadesinin idamesi mümkün olamamaktadır. Diğer yönden, adenovirüsler ise immünojenik nitelikleri ve epizomal konumu nedeniyle canlıda uygulanamaz ve gen ifadesi yalnızca geçici niteliktedir (63) . Kromozomal organizasyon sürecinde bu gibi sorunları engellemek amacıyla yeni jenerasyon viral-olmayan vektörler giderek daha fazla popülerlik kazanmaktadır (64) .

Memeli hücrelerine gen transferi ve yaklaşımının içermekte olduğu sorunlar yukarıda özetlenmiştir. Bu sorunların aşılabilmesi için aşağıda olası çözüm yolları ve alternatif yaklaşımlar sıralanmıştır.

1. Viral vektörlerin yerine plazmit vektörleri kullanarak viral vektörlerin kapasite sınırlarını aşmak mümkündür. Benzer şekilde viral vektörlerin bağışıklık sistemi ve diğer ilgili biyogüvenlik sorunları bertaraf edilebilir.
2. Genoma entegrasyon yerine kalıcılığı arttırılmış epizomal transfeksiyon biyogüvenlik endişelerini azaltacaktır. Belirli bir hücre veya organın hedeflenmediği, rekombinant protein üretiminin amaçlandığı durumlarda aşağıdaki yaklaşımlar çözüm niteliği taşımaktadır:
 - a. Üretimi amaçlanan proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan mekanizmanın kullanımı (yukarıda 2.2.3.'te tartışılmıştır).

- b. Gen aktarım vektörünün hücre bölünmesinden bağımsız olarak kromatine tutunmasını sağlayan özelleşmiş S/MAR dizilerinin eklenmesi (Aşağıda 2.4.'te tartışılmıştır).

2.3.4. Prokaryotik Gen Aktarımı ve Bakterilerin Biyoteknolojide Kullanımı

Biyoteknoloji alanında iki temel protein üretim yaklaşımı uygulanmaktadır. Bunlardan ilki en yaygın üretim metodu olan prokaryotik protein üretimidir. Üretilmesi amaçlanan rekombinant protein bu yaklaşımda genellikle bir fermentatör içerisinde bir ekspresyon plazmidi aracılığı ile prokaryotik organizmalara sentezlettilererek hücre dışına salınımı sağlanır. Bu amaçla en sık kullanılan bakteri türü *E. coli* olmakla birlikte “*sec*” yolağı olarak da bilinen klasik bakteriyel salgı yolağı aracılığı ile rekombinant ürünün bakteri dışına atılması sağlanır (65) . Fermentatör ortamında supernatan'dan saflaştırılan proteinin, endüstriyel skalada üretimi mümkündür. Ancak bu yaklaşımın uygulanabileceği ve uygulanamayacağı farklı durumlar söz konusudur. Özellikle ve sıklıkla post-translasyonel protein işleme basamaklarına ihtiyaç duyan sayısız ökaryotik proteinin bu şekilde üretimi mümkün değildir. Prokaryotların fosforilasyon, glikozilasyon gibi özgül modifikasyon işlevleri prokaryotlarda olmadığı gibi, doğru protein katlanmasını sağlayacak şaperon sistemlerinin de bulunmaması nedeni ile işlevsel proteinlerin ve özellikle rekombinant enzimlerin üretimi için uygun birer sistem değildir. Diğer yönden önemli translasyon sonrası değişikliklerin gerekli olmadığı durumlarda prokaryot üretim teknikleri kullanılabilir. Bu duruma en iyi örnek, küçük boyutlu ve hafif bir immunomodulatör sinyal molekülü olan interferon- β üretimidir (66) .

2.3.5. Ökaryotik Gen Aktarımı ve Biyoteknolojide Kullanımı

Prokaryotik ekspresyona uygun olmayan proteinlerin biyoteknolojik üretim ve eldesi için çeşitli ökaryotik sistemler kullanılabilir. Bu amaçla en kolay uygulama alanı bulan organizmalar mayalardır. Memeli hücrelerinin sahip olduğu pek çok modifikasyon enzimine sahip olan mayalar günümüzde rekombinant protein üretimi için kullanılmaktadır. Ancak, maya hücrelerinin de bu amaçla bazı sınırlamaları vardır. Yüksek memelilerin içerdiği tüm işlevsel modifikasyon enzimlerine sahip

olmamalarının yanında üretilen proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan memeli şaperonlarından yoksun olması nedeni ile bazı proteinlerin üretim ve saflaştırma işlemleri düşük başarı ile sağlanmaktadır (67) .

Memeli proteinlerinin üretiminde en geçerli ancak yukarıda sıralanan yaklaşımlara oranla en düşük verim düzeyine sahip olan sistem ise memeli hücre kültürü sistemleridir. Çeşitli memeli hücreleri rekombinant protein üretimi ve eldesi için çeşitli yaklaşımlarla kullanılmaktadır. Bu yaklaşımların hemen hepsinin temelinde protein üreten bir hücresel sistem ve daha sonra bu proteinin saflaştırılmasını amaçlayan ikinci bir basamak yer almaktadır. Memeli hücrelerinin tedavi amaçlı ve insana verilecek kalitede protein üretimi ile ilgili kısıtlayıcı bazı darboğazları vardır. Bunların başında da memeli hücre kültürünün günümüzde hayvansal serum üretimine bağımlı bir şekilde sürdürülüyor olması ve kullanılan serumun bilinen tüm patojenlerden arındırılmış olması zorunluluğu gelmektedir. Diğer bir güçlük ise memeli hücrelerinin kendi proteinlerinin saflaştırma aşamalarında son ürünü kontamine etme riskidir. Özellikle tartışılan bu son noktanın aşılabilmesi için üretilen proteinin hücre dışına salınabilmesi ve üretimin idamesinin sağlanabilmesi önemli bir konudur (68) .

2.4. Ökaryotik S/MAR Dizilerinin Özellikleri

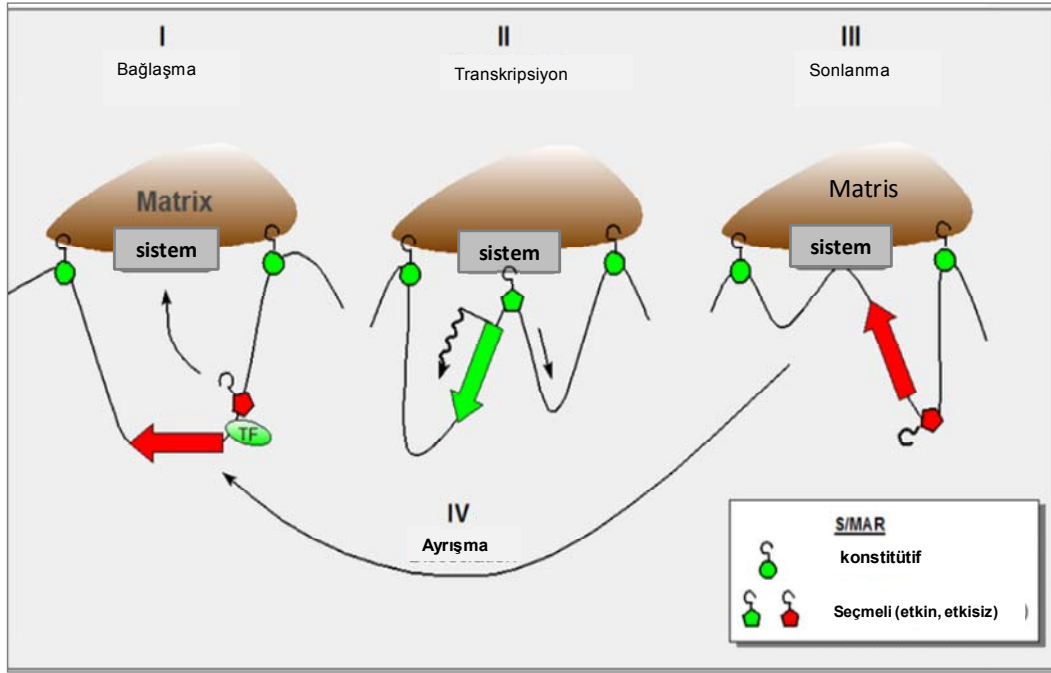
Memeli hücrelerine gen aktarımı alanında önemli sorunlardan biri hücreye aktarılan genin kromozoma rastgele entegre olmasıdır. Dışarıdan verilen bir genin entegrasyonu, iki temel olumsuz etki yaratabilmektedir; bunlardan ilki, aktarılan genin genomda yer alan bir genin yakın komşuluğuna veya içine yerleşimi durumudur. Bu durumda entegre olduğu bölgede yer alan genin işlevini tamamen bozabilir, etkisiz hale getirebilir veya tam aksi şekilde kapalı bir gende işlev kazanımına neden olabilir. Genom anatomisinde genler, transkripsiyon üniteleri niteliği taşımakta ve yakın komşuluktaki trans yerleşimli diğer transkripsiyon ünitelerinden etkilenmektedir. Diğer bir deyişle, hızlı çalışan bir promotor, yakın komşuluğunda yer alan diğer promotorları da tetikleyebilmektedir. Bu fenomene genom biliminde, konum-etkisi (*position-effect*) adı verilir. 2002 yılında ağır kombine immün yetmezlik gen tedavi programının durdurulmak zorunda kalınmasının nedeni de bu durumdur (61) . İkinci olarak, aktarılan gen yerleştiği bölgede yer alan diğer

elemanların durumuna bağılı olarak susturulabilir. Bu fenomene engel olmak için, aktarılan gen dizisine kromatin yapısında korunmuş yapıda bulunan *housekeeping genlerinin* promotrlarında veya virüs genomlarında yer alan “*long terminal repeats*” DNA dizileri eklenebilir. Bu elemanlar, nakledilen genlerin susturulmasına engel olurken, onkogenler gibi ifadesi istenmeyen genlerin aktif hale gelmesine de neden olur. Bu istenmeyen etkileri ortadan kaldırmak ve entegre olan genin etkisini attırmak amacıyla bu yeni öğelerin kullanımını son yıllarda tercih edilmektedir. Bu amaçla DNA üzerinde yer alan elemanların pozisyona bağılı etkilerini birbirinden ayıran, bir sınır veya izolatör (*insulator*) dizilere başvurulmaktadır. Bu diziler, entegre olan genin etkisinin hetrokromatin üzerinde yayılmasını ve gen ifadesini susturmasını (*boundary activity*), yakında ya da uzakta bulunan *enhancer* ve *repressorleri* üzerindeki etkisini (*insulator activity*) engellemektedir (69,71) .

Memeli hücre çekirdeği içinde liflerden (fiber) oluşan bir ağ yapı mevcuttur. Bu yapı “çekirdek matriksi” veya “çekirdek iskelesi” (*nuclear scaffold*) olarak adlandırılmaktadır. Bu ağyapı, hareketli ve dinamik bir yapıya sahiptir. Çekirdek matriksi, moleküllerin serbest geçişi için gereken açık alanlara (kompartmanlara) sahip bir süngere benzer (72) . S/MAR (*scaffold/matrix attachment region*) (MAR veya SAR olarak da bilinmektedir) terimi, ökaryotik kromozomlarda bulunan ve çekirdek matriksine tutunabilen DNA dizisidir. Kromatinin loop yapısı görüşü ilk olarak 1970 yılında Laemmli ve ark. tarafından ortaya atılmıştır (73) . Kromatinin loop bölgeleri şeklinde düzenlenmesini sağlayan S/MAR dizileridir. Özünde, S/MAR dizileri çekirdek içinde yer alan kromatinin yapısal organizasyonu yönetmekle sorumludur. S/MAR elemanları kromatini çekirdek iskelesine bağlamak için DNA dizisi üzerinde bir çıpa görevi görmektedir. Bu S/MAR bölgeleri, çekirdek iskeletine “*ubiquitous*” proteinler aracılığı ile tutunmaktadır. Bu kompleksin en önemli işlevsel elemanlarından biri *Scaffold attachment factor A* (SAF-A) proteindir. Bu protein, kromatin düğümünün (loop) tabanını oluşturarak birbirinden bağımsız işlevlere sahip gen birimlerini (ünitelerini) oluşturur (74) . SAF-A proteini, S/MAR elemanları aracılığıyla organize olan dinamik kromatin yapısı ile gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu anlaşılmıştır (74) .

S/MAR’lar, genom içerisinde farklı yerlerde farklı işlevler göstermektedir. Kostitütif S/MAR’lar, genin iki sınırında bulunup bir replikonun sınırlarını belirler.

Kromatin yapısındaki loop bölgeleri kostitütif S/MAR'lar tarafından şekillenmiştir (75) . Fakültatif S/MAR'lar ise, Kostitütif S/MAR'lardan daha kısa dizilerden oluşmaktadır ve en çok hücre döngüsünün farklı evrelerinde fonksiyonel olarak fakültatif S/MAR intergenik bölgelerde bulunabilirler (76) . Bu şekilde transkripsiyon başladığında, bu S/MAR dizileri kromatin matriksine tutunarak iki ayrı bölge oluşturup aynı genden farklı bir transkript elde edilmesini sağlar (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. S/MAR dizilerin fonksiyonu: Devamlı (constitutive) veya seçmeli (Facultative): (I) bir kromatin *domain*'i ve her iki ucunda bulunan S/MAR bölgeleri. (II) Genin fonksiyonel hale gelmesi gerektiğinde transkripsiyon faktörlerin (TF) bağlanması ve histon asetilasyon desteğiyle topolojik bir değişim meydana gelir ve genin birleşenleri matrikse doğru yer değiştirir. Gen transkripsiyon sistemine girdiğinde topolojik değişim gen üzerinde ilerlemeye devam eder. (III) transkripsiyon sona erdikten sonra (IV) transkripsiyon birleşiminin ayrışma hareketi gerçekleşir.

2.4.1. S/MAR Dizilerinin Avantajları

- S/MAR dizileri transkripsiyon mekanizması üzerinde farklı etkiler göstermektedir. S/MAR dizileri, bir *cis* faktörü olarak işlev görerek, *enhancer* yokluğunda, transkripsiyon başlatma hızını arttırabilir (77, 78) bu özellikleri *augmentation* etkinliği olarak tanımlanmıştır (79) .

- S/MAR'dizileri, transkripsiyon etkinliğini arttırmadan da bir genin susturulmasını engelleyebilmektedir. *Housekeeping* gen dizileri gibi yüksek ifade hızına sahip olan lokusların, genomda yer alan S/MAR'lar tarafından yöneltildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (80, 81) .

- S/MAR'ların bir diğer fonksiyonu negatif gerilim altındaki süpersarmal çift zincirli DNA'larını birbirinden ayırmanın başlatılmasıdır (82) .

- S/MAR'lar genomda izolatör olarak da fonksiyon göstermektedirler (80, 83)

- S/MAR dizilerine bazı transkripsiyon faktörlerin ve kromatin modelleme faktörlerinin bağlanması komşu genlerinin ifadesini susturma veya etkinleştirme potansiyeline sahiptirler (84) . Yapılan çalışmalarda transkripsiyonel olarak etkin olan lokusların metile olmaları, S/MAR dizileri tarafından engellendiği desteklenmektedir (85) .

S/MAR dizisinin en önemli özelliği gen transferi ve gen tedavisindeki rolüdür. S/MAR dizisinin bir viral veya viral olmayan vektörün yapısında bulunması, vektörün kromatin yapısına bağlanmasını ve kromatin organizasyon düzenine girmesini sağlar. Hücre bölünmesi sırasında yer aldığı hücrenin genomunun bir parçası gibi veya bağımsız bir ünite olarak kopyalanabilir, böylelikle genoma entegre olmadan, transgen varlığının idamesini ve ekspresyonun uzun süre sürdürülmesini sağlayabilmektedir (86) .

2.4.2. Memeli Genomunda İyi Tanımlanan S/MAR Dizileri

1999 ve 2002 yıllarında yapılan çalışmalar S/MAR bölgelerinin dağılımının ortalama gen yoğunluğu ile aynı olduğunu göstermiştir ve bu sonuca göre “bir gen- bir S/MAR” hipotezi ortaya atılmıştır (87) . Bununla birlikte, S/MAR'dizilerinin matriks ile etkileşiminin, gen ve hücre tipine özgül olarak değişim gösterebildiği

önerilmiştir (88) . Ökaryöt hücrelerine gen transfer vektörlerinde en çok kullanılan ve tanımlanan S/MAR dizileri aşağıda özetlenmiştir (2) ;

- İmmünoglobulin ağır zincir lokusuna ait *E μ MAR*: bu S/MAR dizisi B-hücrelerine özgüdür ve intronik bölgede yer almaktadır. Yerleşim gösterdiği vektörlerde gen ifadesini arttırır, kopya sayısı ve konuma bağımsız gen ifadesini sağlayabilir.
- İnsan *interferon- β* lokusuna ait insan *IFN- β MAR*: Dokuya özgüllük gösterdiği bilinmektedir. *IFN β* geninin 5' ve 3' bölgelerinde yerleşim göstermektedir. Yerleşim gösterdiği vektör üzerinde yer alan genin ifadesini yüksek düzeyde indükler. Her zaman konumdan bağımsız olarak etki gösterebilmektedir.
- İnsan *apolipoprotein B* lokusuna ait *ApoB MAR*: Dokuya özgül olarak işlev göstermektedir. Sadece karaciğer, barsak, plasenta, ve makrofaj hücrelerinde kullanılabilir. Genin 5' ve 3' bölgesinde bulunmaktadır. Vektördeki aday proteinin gen ifadesini arttırır.
- Tavuk lizozim lokusuna aid *LysMAR*: Dokuya özgül olarak kullanılmaktadır. Genin 5' ve 3' bölgesinde bulunmaktadır. Gen ifadesini arttırır
- T-hücrelerinin beta reseptör lokusuna ait *MAR β* : genin 5' bölgesinde bulunmaktadır.
- MAR 1-68; X-29: *in-silico*'da tanımlanmış insan S/MAR'ları olarak tanımlanır. Etkili bir şekilde transgenin ifadesinin artmasını ve stabilize olmasını sağlar.

2.4.3. S/MAR Dizilerinin Tahmin Kuralları

S/MAR'ların fonksiyon hakkındaki bilgilere dayanarak S/MAR dizileri ve buldukları bölgeler tahmin edilebilir (89,90) .

- S/MAR dizileri, transkripsiyon faktörlerinin tanıma ve bağlanma bölgeleri ve memeli replikasyon orijinleri de bulunan AT'den zengin bölgelerdir.
- Bazı genlerin 3' bölgelerinde (3'UTR) TG'den zengin diziler halinde bulunur.
- Loop yapısında olan DNA dizilerin 5' ve 3' uçlarında bulunur. S/MAR dizilerin içeriği TG, CA ve TA dinükleotid dizileri sıklıkla bulunmaktadır ve %90 AT tekrar kutucuklar içermektedir.
- Topoizomeraz II kesim bölgeleri S/MAR dizilerin ortasında bulunmaktadır.

Yukarıda sıralı olan 4 temel kural, *MARfinder* ve *MAR-Wiz* bilgisayar algoritmalarının temelini oluşturmaktadır. Bu iki algoritmanın yanında S/Mar dizilerin incelenebilmesi amacıyla *SMARtDB* veritabanı da kullanılmaktadır (91) .

2.5. İskelet Kası ve Gelişiminin Temel Özellikleri

İskelet kası, dokunun mekanik unitesi olan kas liflerinin demetler halinde bir araya gelerek oluşturduğu bir organdır. Yapısını oluşturan lifler, embriyogenez sırasında kas dokusunu oluşturacak olan tek çekirdekli hücrelerin füzyon mekanizması ile birleşerek, çok çekirdekli miyotüp yapılarını oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bu özelliğiyle kas dokusu diğer doku tipleriyle karşılaştırıldığında ileri düzeyde farklılaşmış bir yapıdır ve fizyolojik koşullarda çok düşük çekirdek bölünme oranına sahip olup, diğer dokulara göre idame ihtiyacı da daha azdır (92) .

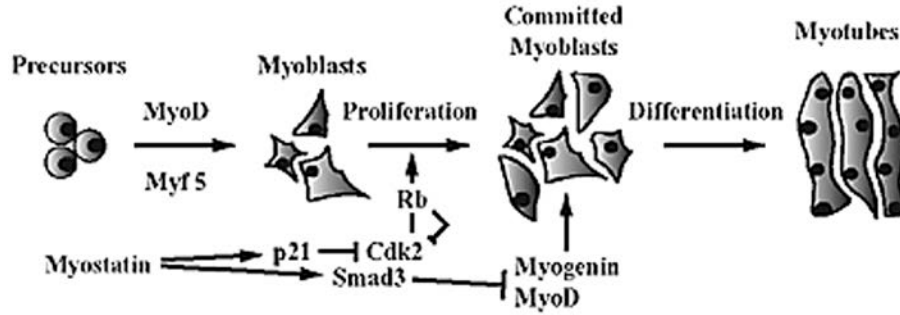
2.5.1. C2C12 Fare Miyoblastik Hücre Hattı

C2C12, fare embriyosundan izole edilmiş bir miyoblastik hücre hattıdır (93) . Kültürde yüksek yoğunluğa (%90-100) ulaştıktan sonra çoğalmayı indükleyen faktörleri içeren serum miktarı azaltıldığında C2C12 hücreleri bölünmeyi durdurup farklılaşmaya başlamaktadır. Bu süreçte uzantılar oluşturarak füzyon olarak tanımlanan bir işlevle bu hücreler birbirleri ile birleşmektedir. Çok çekirdekli miyotüp yapılarının gelişiminden sonra kontraktil proteinlerin sentezlenmesiyle kalın miyotüp yapıları oluşmaktadır. Bu özellikleriyle C2C12 hücre hattı, iskelet kası farklılaşmasının *in vitro* modeli olarak yaygın kabul görmüştür.

2.5.2. İskelet Kası Farklılaşma Yolağı

Kas farklılaşma programı, iyi anlaşılmış transkripsiyon basamakları kontrolünde gelişmektedir. Miyojenik farklılaşmanın tetiklenmesinde en önemli rolü *MyoD* transkripsiyon faktörü üstlenmektedir. *MyoD*, kas farklılaşma programı içinde yer alan genlerin regülatör bölgelerinde bulunan *enhancer* dizilerine bağlanarak sağladığı transaktivasyon aracılığı ile kas gelişimini tetikler (94) . Bir hücrede *MyoD* ekspresyonunu takiben miyojenik farklılaşma programının transkripsiyonu tetiklenir (95) . *MyoD* transkripsiyon faktörü görev ve işlevi embriyogenez sırasında *Myf5*

tarafından da yüklenilebilir (96) . *Myf5* ve *MyoD*'nin miyojenik farklılaşma için gerekli olduğu göstermiştir. Farklılaşma programının ilerlemesi ve olgun kas dokusu fenotipinin kazanımı ise miyogenin ve *MRF4* farklılaşma faktörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir (97) . Kas farklılaşma yolu Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



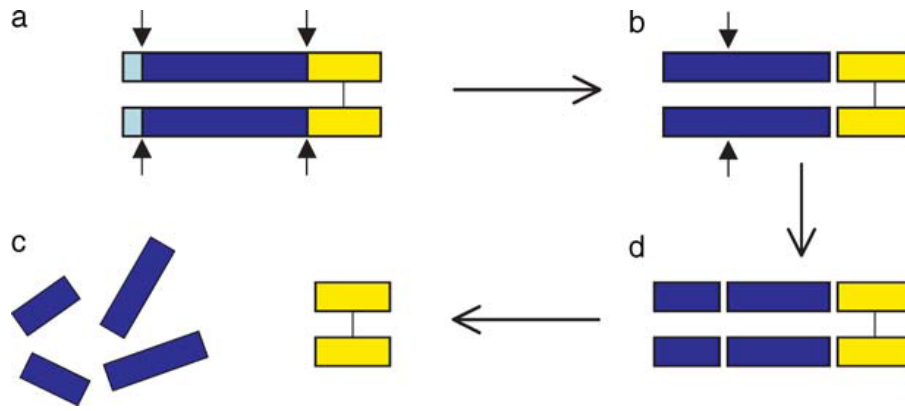
Şekil 2.6. Kas hücrelerindeki farklılaşma yolu. Kas farklılaşma yolu ve sürecinde etkin olan transkripsiyon faktörleri ve miyostatin etki mekanizması gösterilmiştir.

2.5.3. İskelet Kası Gelişimini Düzenleyen *TGFβ* Yolu Düzenleyicileri (Miyostatin)

Miyostatin (MSTN), *TGFβ* ailesi üyesi bir sinyal proteini olarak kas dokusu gelişiminin negatif regülatörüdür. Embriyogenez döneminde, miyostatin gelişmekte olan kas hücrelerinde ifade edilmekte ve bu şekilde oluşumunu tamamlamış kas liflerinin sayısı, çapı ve çekirdek içeriği sınırlandırılmaktadır (98) . Erişkin insanlarda, miyostatin proteini iskelet kas hücreleri ile birlikte, yağ, kalp ve rahim hücrelerin tarafından da sentezlenerek dolaşıma verilmektedir (99) .

Miyostatin protein dizisi, diğer *TGF-β* aile elemanlarına ait olan dizilerden farklı olmakla birlikte özellikle GDF-11'e (%90), önemli homoloji göstermektedir (100) . Miyostatin proteini, etkin hale gelebilmesi için iki farklı proteolitik işlemden geçmektedir. İlk olarak öncül bir protein olarak sentezlenir (100) . Post-translasyonel modifikasyonun ilk basamağı olarak yukarıda da anlatıldığı üzere, proteinin hedeflenmesi için gereken 24 amino asitten oluşan öncü dizisi uzaklaştırılır. Peptidin geri kalan C-terminal kısmı, latent form olarak adlandırılmıştır (101) . İkinci kesim

ise, latent peptidin RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) bölgesinden (240–243 amino asitler arasından) gerçekleşir ve bu şekilde glikozile olmayan N-terminal (propeptid) ve C-terminal olarak, 2 fragmana ayrılır. Bu fragmanların moleküler ağırlıkları, sırası ile, 27 kDa and 12,4 kDa'dur. Dolaşımında, N-terminal peptidi, C-terminal dimeri, ve latent formu olarak 3 farklı şekilde bulunmaktadır (101) . İkinci peptid kesiminden sorumlu olan proteaz enzimi tanımlanmamıştır. C2C12 hücrelerinde yapılan çalışmalarda, bu kesimden metalloproteinaz moleküllerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (102) .



Şekil 2.7. Miyostatin proteininin *in vivo* işlenişi. Miyostatin proteinini öncül formda sentezlenir, daha sonra iki proteolitik kesimi ile N-terminal ve C-terminal dimeri olarak iki fragman elde edilir (a). İlk kesim sonrası öncü dizi uzaklaştırılır. Peptidin geri kalan kısmı (sarı ve mavi bölgeler) latent formu olarak adlandırılmaktadır (b). Metalloproteinazlar tarafından gerçekleşen ikinci proteolitik kesim sonucunda latent formu C-terminal (aktif form) ve N-terminal (propeptid formu) olarak iki pepide bölünür (c, d).

Proteolitik enzimlerce kesildikten sonra disülfid bağı ile birbirine bağlanmış C-terminal dimer fragmanı, miyostatin proteininin biyolojik olarak aktif formudur. Miyostatin aktifleştğinde aktivin IIB reseptörüne (ActRIIB) yüksek affinite, Acvr2a reseptörüne ise (ActRIIA), zayıf affinite göstermektedir (103) .

Kan dolaşımında bulunan miyostatin proteininin farklı formları, kanda bulunan diğer proteinler tarafından regüle edilebilmektedir. örneğin, kandaki latent

formu gerektiğinde metalloproteinaz ailesi (*bone morphogenetic protein (BMP)-I/tolloid*) tarafından kesime uğrayıp etkinleşebilmektedir (104) . Aslında miyostatin proteinin latent ve propeptid yapıları, metalloproteinaz ailesinde bulunan tüm dört proteinaz üyesinin tarafından kesilebilmektedirler (Şekil 2.7.c). Kan dolaşımında bulunan diğer bir protein ise, C-terminal dimerine bağlanıp etkinliğini engelleyen Follistatin proteinidir. Follistatin, *TGF-β* ailesindeki tüm üyelerine bağlanabilmektedir (103) . Follistatin, miyostatin proteinin bir antagonistidir ve hücre üzerinde bulunan aktivin reseptörlerine bağlanarak miyostatinin aktif formu olan C-terminal dimerin bağlanmasını engelleyerek miyostatin proteinin etkisini modüle eder (101) . Ayrıca, follistatin, *in vivo*'da beyaz yağ hücrelerinde (105) , *in vitro* da ise 3T3-L1 hücrelerinde (106) yüksek ifadesi bulunduğu gösterilmiştir. Ancak, yağ öncülü hücrelerin farklılaşması sürecinde follistatin ifadesi çarpıcı bir şekilde azalmaktadır. Son olarak, fare üzerinde yapılan çalışmalarda, follistatin proteinin aşırı miktarda sentezlendiği durumlarda, kas büyümesinin çarpıcı şekilde arttığı gözlenmiştir (107) , follistatin ifadesi susturduğunda ise kas kütlesi azaldığı anlaşılmıştır (108) .

2.5.4. Yağ Hücreleri ve Miyostatin

Miyostatinin en çok kas, kalp ve rahim dokularında ifade edildiği, yağ dokusunda da sentezlenip hücre dışına salgılanmakta olduğu bildirilmiştir (99) . Miyostatin proteini, yağ öncülü ve 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmalarını önlemektedir (109) . Ancak, miyostatin, farklılaşmanın ilk aşamasında, hücrede yüksek miktarda ifade ettirilirse ancak o zaman adipogenez inhibe edilmektedir. Bu hücrelerde *glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1)*, *CAAT Enhancer Binding Protein α (CEBPa)*, ve *peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ)*, etkisi azaldığı anlaşılmıştır. Ancak *CEBPβ* ve leptin ifadelerinde bir değişiklik görünmediği anlaşılmıştır (110) . Farklılaşmamış yağ hücrelerini ve 3T3-L1 hücreleri, miyostatin proteinine maruz bırakıldığında ise herhangi bir değişiklik ortaya çıkmamaktadır (109) . Yağ öncü hücreleri farklılaştırma faktörlerine maruz bırakıldığında, adipogenezini induklediği bilinen *CEBPa*, *PPARγ*, veya *sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c)* faktörlerinin *MSTN* gene

promotoruna bağlanarak miyostatin proteininin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (111).

2.5.5. Dominant Negatif Etkili Miyostatin Proteinin Kas ve C2C12 Hücrelerin Üzerindeki Etkisi

Dominant-negatif etkili miyostatin molekülü, bloke edici anti-miyostatin antikoları gibi etki gösteren bir protein olarak tanımlanmıştır (7). Miyostatin proteinin ortadan kalkması ile kas gelişimi sürebilmekte ve kas kitlesi artışı gözlenmektedir (7,101). Memelilerde miyostatin mutasyonlarında, kas hücrelerinde hiperplazi (112) veya hipertrofi (7) gerçekleştiği gösterilmiştir. Mc Pherron ve Lee, miyostatin mutasyonu taşıyan farelerde kas kütlelerinde artış saptamıştır. Bu artış, kas liflerinin sayısında (*hyperplasia*) ve boyutlarda (*hypertrophy*) artışın bir kombinasyonu olarak ortaya çıkmıştır (100). Heterozigot farelerde ise, homozigot fareler kadar olmamakla beraber, kas kütlelerinde artış gözlenmiştir (100). Bu gözlemler sonucunda, miyostatin etkisinin doza bağlı olduğu anlaşılmıştır.

Miyostatin geni, miyoblast farklılaşmasını engelleyerek miyoblast çoğalmasını kontrol etmektedir. Bu nedenden dolayı C2C12 hücrelerine MSTN'dn proteini gönderildiğinde myogenin üzerindeki inhibisyon etkisi kalkmaktadır. Buna bağlı olarak kas hücreleri füzyonu devam etmekte ve miyotüp oluşumu daha fazla gelişmektedir, Bu şekilde kas hücrelerinin büyüme süreci devam etmekte ve myogenin geninin ifadesi artmaktadır (bkz. Şekil 2.6.). Miyostatin, myogenin geninin negatif regülatördür (113). *MyoG* kas dokusuna özgül bir transkripsiyon faktörü olup *MyoD* transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. M-kaderin (*Mcadherin*) proteini, kas-1 transmembran protein ailesinin üyesidir ve hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlar. Miyogenik farklılaşma sürecinde ise miyogenik regülatör faktörleri (*MRF*), M-kaderin promotorunun E-box bölgesine bağlanarak M-kaderin ifadesinin artmasına neden olur. Bu artış terminal farklılaşmanın bir göstergesidir (114). *MHC3* geni memeli canlılarda embriyonik dönemde özellikle miyotüp oluşumunun ikinci gününde ifade edilmektedir (115). C2C12 hücrelerinde çoğalma durduğunda veya farklılaşmanın son basamağında bu genin ifadesi artmaktadır (116). Kas hücrelerinde farklılaşma ve miyotüp oluşumu baskılandığında, hücreler büyümeye ve füzyon yapmadan çoğalmaya devam

etmektedir. Bu hücrelerde, tam anlamıyla hücre proliferasyonu ile ilgili olan MKi67 proteininin ifadesi artmaktadır (117) .

2.6. Amaç

Yağ hücreleri yüksek salgısal aktiviteye sahip hücrelerdir. Adipokin adı verilen peptid yapıda sinyal molekülleri aracılığı ile metabolizma ve bağışıklık sistemi gibi temel homeostatik mekanizmaların kontrolüne aracılık etmektedir. Yaygın şekilde salgıladıkları adipokinler klasik salgı yolağını kullanır. “Bu salgı mekanizması yeniden programlanarak, istenilen bir memeli proteininin yağ hücreleri tarafından sentezlenerek salgılatılması mümkündür.” Bu hipotezi farklı yönleri ile test etmek amacıyla rekombinant DNA teknolojisi yaklaşımı kullanarak çeşitli DNA yapıları hazırlanarak etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Adipokinlerin salgılanmasını sağlayan farklı öncü diziler yeşil floresan proteinin (EGFP) N-terminaline aktararak hazırlanan yapıların yağ hücre kültürü sisteminde salgısal etkinlik başarısının karşılaştırılması planlanmıştır. Bu yaklaşım ile yağ hücrelerinin salgısal işlevinin kalitatif ve kantitatif karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Yağ hücrelerine aktarılan DNA yapılarına *APOB* ve *IFN β* genlerine ait S/MAR dizileri eklenerek yapıların kalıcılığının ve etkinliğinin artırması amaçlanmıştır. Farklı S/MAR dizilerinin karşılaştırılması sonucunda yağ hücrelerinde sentezlenen rekombinant proteinin ifade süresini uzatabilen en etkin dizinin tanımlanması planlanmıştır.

Yukarıda sıralanan adımlar doğrultusunda hazırlanacak yapının olgun yağ hücrelerinde rekombinant protein üretimi etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu yönde, bir kas dokusu farklılaşma modeli seçilmiştir. C2C12 miyoblast hücreleri hücre kültüründe farklılaşarak çok çekirdekli miyotüp yapıları oluşturmaktadır. Rekombinant protein salgılayan olgun yağ hücreleri ile birlikte kültüre edilen C2C12 hücrelerinin gözlenmesi ve incelenmesi mümkündür. Model olarak farklılaşmayı pozitif yönde etkilediği bilinen dominant negatif miyostatin sinyal molekülü hazırlanarak olgun yağ hücrelerine aktarılması amaçlanmıştır. Bu yaklaşımda olgun yağ hücrelerinden salgılanan sinyal molekülünün C2C12 hücrelerinin farklılaşma programını değiştirmesi beklenmektedir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Bakteri Kültürü

Kompetan *JM109* bakteri suşu (Promega, P9751)

Agar, bakteriyoloji kullanımı saflığında (AppliChem)

Sıvı Bakteri (LB) besiyeri (pH=7,0 - 7,2):

Trypton (Applichem)	10 g
Maya özütü (Applichem)	5 g
NaCl (Sigma)	5 g
NaOH (Sigma) (1 M)	1 ml

dH₂O ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanır, pH ayarlanır ve sterilize edilir.

Katı Bakteri (LB) Besiyeri :

%1,5 Agar (Sigma) içeren sıvı LB besiyeri

Ampisilin (Ampisina IV flakon) (50 µg/ml)

Kanamisin (Sigma-Aldrich) (25 µg/ml)

IPTG (İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid) (su içerisinde, 1M)

X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid)

(dimetil sülfoksit içinde %5'lik çözelti)

Miniprep Kiti (Qiagen, 27106)

Plasmid Midi Kiti (Qiagen, 12145)

Midiprep Endo-free kiti (Qiagen)

3.1.2. Klonlama

GoTaq® DNA Polymerase kiti (promega, M317)

SuperTaq Plus Polymerase kiti (Ambion, AM2054)

pGEM-T Easy vektörü (Promega, A1360)

pcDNA3.1(+) vektörü (Invitrogen, V790-20)

pSV- β gal vektörü (Promega, E1081)

Ligasyon tamponu: *2x Rapid Ligation Buffer* (Promega)

Ligasyon tamponu: *10x Ligation Buffer* (Promega, C126A)

T4 DNA Ligaz (Promega, M180A)

Restriksiyon enzimler:

ApaI (Promega, R6041)

BstBI veya *Csp45I* (Promega, R657)

EcoRI (Promega, R6011)

KpnI (Promega, R6345)

NheI (Promega, R6505)

NsiI (Promega, R6531)

XbaI (Promega, R6501)

XhoI (Promega, R6051)

Asetile dana serum albümini (BSA) (Promega, R3961)

Antartic dephosphatase (NEB, M0289)

3.1.3. Plazmid İzolasyonu

Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, 27106)

Plasmid Midi Kit (Qiagen, 12145)

Etanol, %70

İzopropanol

T4 DNA Ligaz (Promega, M180A)

3.1.4. Modifiye Agaroz Jelden DNA İzolasyonu

Agaroz, moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Prona)

Modifiye TAE tamponu konsantresi, 50x (Millipore, LSKG EL0 50)

Etidyum bromür (Sigma), 1mg/ml distile su

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kiti (Promega, A9282)

Moleküler ağırlık belirleyicisi : *1kb DNA Ladder* (Promega)

3.1.5. DNA Dizi Analizi

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 4336917)

SP6 Promoter Primeri (Promega, Q5011)

T7 Promoter Primeri (Promega, Q5021)

BGH *Reverse* Primer (Invitrogen, N575-02)

pCMV *Sequencing Primer* (Clontech)

Sodyum asetat (3M)

Etanol (Riedel)

Formamid (Sigma, F7508)

3.1.6. Hücre Kültürü

3T3-L1 hücre hattı (ATCC)

C2C12 fare miyoblast hücre hattı (Türkiye Şap Enstitüsü – Ankara)

1X PBS (Phosphate buffered saline) (pH 7.4) (Sigma P2194)

Ham's F10 (Biochrome FG-0715)

L-Glutamin (Biochrome K0282)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Biochrome F-0425)

Fetal Dana Serumu (FBS) (Biochrome S0123)

At Serumu (Biochrome S9133)

Amfoterisin B (Biochrome A2612)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome A2210) (1 mg/ml)

IBMX (3-izobütil-1-metil-ksantin) (Sigma) (50 mM)

At Serumu (Biochrome S9133)

İnsülin (Sigma) (500 µg/ml)

Poli-L-lizin (Sigma) (1 mg/ml)

Laminin (Gibco/Invitrogen) (16 µg/ml)

Tripsin EDTA (Gibco/Invitrogen)

Versene (Gibco/Invitrogen)

Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (154526)

Glass Bottom petri kablaları (MatTek corporation, P35G-0-10)

Hücre kültürü süzgeç (*insert*) (Merk Millipore, PIHP01250)

VersaMax ELISA Microplate okuyucu

3.1.7. Cerrahi Malzemeler

Ksilazin (Alfazin)

Ketamin (Ketalar)

Portegü

Penset

Hemostatik pens

Bisturi

Cerrahi makas

Steril iğneli 4/0 katgüt atravmatik emilebilir dikiş malzemesi

3.1.8. Primer Miyoblast İzolasyonu

Etanol (Riedel)

1X PBS (*Phosphate buffered saline*) (pH: 7.4) (Sigma P2194)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome A2210)

Amfoterisin B (Biochrome A2612)

Kollejenaz B (Roche 11 088 807 001)

Dispaz II (Roche 04 942 078 001)

Elek Filtre (70 ve 40 µm, Becton-Dickson)

% 1 Ficoll çözeltisi (Sigma D2532)

3.2.9. Hücre Dondurulması

Dondurulma ortamı

DMEM : % 80

FCS : % 10

DMSO : % 10

Her bir vialde 1 ml aldı, buna göre dondurulma ortamı hazırladı.

3.1.10. Transfeksiyon

MEM-alpha (Biological Industries)

FuGENE HD transfeksiyon ajanı (Promega, E2312)

ECM 830 *Electroporation System* (45-0002)

BTXpress High Performance Electroporation Solution (45-0805)

β-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega, E2000)

3.1.11. Hücre Canlılık Testi

Tripan mavisi boyası (Sigma)

Thoma camı (C.A.HAUSSEN and SON, Phila., USA)

3.1.12. Hücre DNA İzolasyonu

Amonyum asetat:

Amonyum asetat	74 g
dH ₂ O	20 ml

37⁰C’de eridikten sonra dH₂O ile 100 ml’ye tamamlanacaktır.

Çekirdek liziz tamponu (pH:8,2):

Tris-HCl (10mM)	1.21 g
NaCl (400mM)	23.4 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (dihydrate) (2mM)	0,74 g
dH ₂ O 1L’ye tamamlanacaktır	

Proteinaz K (Applicine) 10 mg/ml

%10 SDS (pH:7.2)

3.1.13. Hücre ve Dokudan RNA İzolasyonu

Fast Prep RNA Pro-green kit (QBiogene)

Trizol Reagent (Invitrogen, 15596-026)

Kloroform (Sigma, C7559)

Dietil pirokarbonat (DEPC, Sigma D5758)

Etanol (Riedel)

3.1.14. cDNA Sentezi

ImProm-II™ tamponu, 5x (Promega)

ImProm-II™ RT (Promega) 1 µl/ reaksiyon

MgCl₂ (Promega) 25 mM

Oligo(dT)15 primeri (Promega) 0,5 µg/µl

3.1.15. Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SYTO9 (invitrogen, S34854)

GoTaq® DNA Polymerase kiti (promega, M317)

dNTP karışımı (Promega) 10 mM, her birinden

MgCl₂ (Promega) 25 mM

3.1.16. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Prona): Molekuler biyoloji kullanımı saflığında

Tris-asetat tamponu (pH 8.0):

Tris baz (Merck)	2 M
Glasiyel asetik asit (Merck)	1.14 ml
Na ₂ EDTA (Merck)	0.5 M

Yükleme tamponu:

Gliserol (Merck)	5.5 ml
1X TAE tamponu	4.5 ml
Orange G boya (Merck)	0.01g

Etidyum bromur (Sigma): 10mg/ ml distile su

Molekuler ağırlık belirleyicisi (Promega): 100bpDNA Ladder

3.1.17. İmmünfloresan Boyama

Paraformaldehit (PFA) (Sigma)

1X PBS (pH: 7,4) (Sigma P2194)

Triton X-100 (Sigma)

Fötal Dana Serumu (FCS) (Biochrome S0123)

Primer antikorlar:

Mouse monoclonal, α- V5 tag [SV-Pk1](Abcam, ab27671)

Mouse monoclonal, ER marker [RL 90](Abcam, ab2792)

Mouse monoclonal, Clathrin, Heavy chain (Thermo Scientific, MAI-065)

Rabbit polyclonal to GOLPH4 [Golgy marker] (Abcam, ab28049)

Sekonder antikolarlar:

Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG (Molecular Probes, A11036)

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (Molecular Probes, A11029)

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1mg/ml stok)

ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)

Lamel kapatma solüsyonu

Oje

Dakocytomation Pen

Doku dondurma ortamı (OCT/JUNG)

Kriyotom (Leica CM1900)

Leica DFC 320 floresan mikroskop

Carl-Zeiss LCM-510 konfokal mikroskop

3.1.18. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore, UFC801096)

Proteaz inhibitörü tablet (Roche, *Complete Mini*, 11 836 170 001)

Protein izolasyon tamponu (toplam 20ml):

Tris HCl (0,5M, pH=6,8)	2,5 ml
EDTA (0,5M)	200 µl
SDS (%20)	10 ml
Proteaz inhibitörü tablet	2 adet
Distile su	7,3 ml

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225)

3.1.19. Western Blot

%12'lik ayırıcı jel:

%30 Akrilamid / bisakrilamid	4,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
% 10 SDS	0,1 ml
% 10 APS (amonyum persülfat)	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
Distile su	10 ml

%5'lik toplayıcı jel:

%30 Akrilamid / bisakrilamid	0,33 ml
1,0M Tris (pH 6,8)	0,25 ml
% 10 SDS	0,02 ml
% 10 APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml
Distile su	2 ml

Elektroforez tamponu (pH 8,3):

Trizma baz	0,025 M
Glisin	0,192 M
SDS	% 0,1
Distile su	2,5 L

Mini Protein II elektroforez seti (Bio-Rad)

İndirgeyici ajan: *NuPAGE 10x Sample Reducing Agent* (Invitrogen, NP0004)

Örnek tamponu: *LDS 4x Sample Buffer* (Invitrogen, NP0008)

Protein ağırlık belirleyicisi: *Novex Sharp Protein Standard* (Invitrogen, LC5800)

ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (NEB, P7711S)

Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad)

Ponceau S çözeltisi (Sigma)

Coomassie Blue çözeltisi:

Coomassie Blue R-250	% 0,025
Metanol	% 40
Glisial asetik asit	% 7

10 X TBS (*Tris buffered saline*) (pH 7,6):

Trizma baz	61 g
NaCl	90 g
Distile su	1 L

Tween 20 (Sigma) : 0,05% / PBS (h/h)

Yarı kuru transfer tamponu:

Trizma baz	5,82 g
Glisin	2,93 g
SDS (% 10)	3,75 ml
Metanol	200 ml
Distile su	1 L

Nitrosellüloz membran (0,34 µm kalınlığında) (Thermo Scientific)

Whatman filtre kağıdı

Yağsız süt tozu

Birincil Antikorlar: *Anti V5 tag* antikorü [SV-Pk1](Abcam, ab27671)

İkincil Antikorlar: *Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate* (Invitrogen, 21040)

Görüntüleme kiti:

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

X ışını görüntüleme filmi (Mediphot X – O/RP, Colenta, 528 9871)

Film kasedi (Kodak)

BioMax XAR Film, *Scientific Imaging Film*, 8 x 10 in. (Sigma Aldrich)

Film kasedi (Kodak)

Stripping çözeltisi:

2-merkaptoetanol	0,375 ml
% 10 SDS	10 ml
Tris-HCl (1M, pH 6,8)	125 ml
Distile su	50 ml

Fotoğraf filmi developer çözeltisi (Defiks)

Fotoğraf filmi fikser çözeltisi (Defiks)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Megaprimerlerin Tasarımı

Tez önerisinde de ayrıntılandırıldığı gibi, aday genin (EGFP) 5' ucuna yağ hücreleri tarafından sentezlenerek hücre dışına salınan adipokinlere ait öncü dizinin (lider dizi) takılması öngörülmüştür. Bu amaçla insan ve sıçana ait çeşitli adipokinlerin öncü dizileri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve denenmek üzere yedi tanesi seçilmiştir. Bu diziler ve ait oldukları genler Tablo 3.2.1'de verilmiştir.

Tablo 3.2.1. Seçilen adipokinlerin gen kodu ve öncü protein amino asit dizisi.

	Genbankası gen kodu (GI)	Genin adı	Öncü Protein Amino asit Dizisi
İNSAN	4757760	Adiponektin	MLLLGAVLLLLALP
	4557715	Leptin	MHWGTLCGFLWLWPYLFYVQA
	10835159	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1	MQMSPALTCLVLGLALVFGGSA
	55743122	Retinol bağlama proteini-4	MKWVWALLLLAALGSGRA
	42544239	Kompleman faktör D (Adipsin)	MHSWERLAVLVLLGAAACAA
	4557325	Apolipoprotein E	MKVLWAALLVTFFLAGCQA
SIÇAN	62990185	Adiponektin	MLLLQALLFLLILP
	6981148	Leptin	MCWRPLCRFLWLWSYLSYVQA
	6981331	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1	MQMSSALTCLTLGLVLVFGKGF
	158187534	Retinol bağlama proteini-4	MEWVWALVLLAALGGGSA
	117647197	Kompleman faktör D (Adipsin)	MHSSVYLVALVVLEAAVCVA
	20301954	Apolipoprotein E	MKALWALLLVPLLTGCLA
	111494000	Miyostatin	KPQMYVYI

Tablo 3.2.1.'den anlaşılacağı üzere insan ve sıçan arasında seçilen öncü diziler korunmuştur. Bu öncü dizilerinin tüm ökaryotlar için geçerli olacağı öngörülebilir. Bu hipotezin deneysel olarak kanıtlanabilmesi için yukarıda sıralı yedi öncü diziyi içeren klonlama primerleri Tablo 3.2.2.'de verilmiştir.

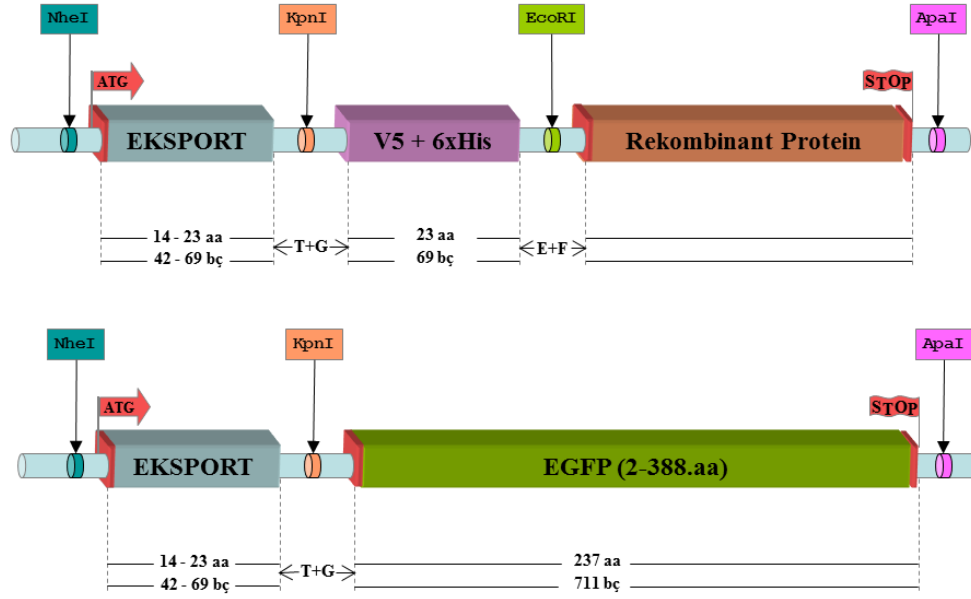
Tablo 3.2.2. Tasarlanan megaprimerlerin dizisi.

EGFP-F	5'-AAAGGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'
EGFP-R	5'-AAAGAATTCTTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'
V5-B	5'GGTACCGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG-3'
V5+6H	5'TCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCAC-3'
LEP+V5-A	5'GGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTGGTACCGGTAAGCCTATCCCT-3'
LEP+V5-B	5'AAAGCTAGCATGCATTGGGGAACCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATG-3'
ADQ+V5-A	5'GGAGCTGTTCTACTGCTATTAGCTCTGCCGGTACCGGTAAGCCTATCCCT-3'
ADQ+V5-B	5'AAAGCTAGCATGCTGTTGCTGGGAGCTGTTCTACTGCTATTAGCTC-3'
PAI+V5-A	5'TGGGCCTGGCCCTTGTCTTTGGTGAAGGGTCTGCTGGTACCGGTAAGCC TATCCCT
PAI+V5-B	5'AAAGCTAGCATGCAGATGTCTCCAGCCCTCACCTGCCTAGTCCTGGGCC TGGCCCTTGTCTTTGGT-3'
RBP4+V5-A	5'TGCTGTTGGCGGCGCTGGGCAGCGGCCGCGGGTACCGGTAAGCCTA TCCCT-3'
RBP4+V5-B	AAAGCTAGCATGAAGTGGGTGTGGGCGCTCTTGCTGTTGGCGGCGCTGGG CAGC-3'
ADS+V5-A	5'TTCTGGTCCTCCTAGGAGCGGCCGCTGCGCGGCGGGTACCGGTAAGCC TATCCCT-3'
ADS+V5-B	5'AAAGCTAGCATGCACAGCTGGGAGCGCCTGGCAGTTCTGGTCCTCCTAG GAGCGGCCG-3'
APOE+V5-A	5'CGTTGCTGGTCACATTCTGTCAGGATGCCAGGCCGGTACCGGTAAGCC TATCCCT-3'
APOE+V5-B	5'AAAGCTAGCATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGG CAG-3'

3.2.2. Rekombinant Genin Modifikasyonları ve Tasarımı

Planlanan çalışmada ortaya konması amaçlanan rekombinant genin taşınması öngörülen özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

- Şekil 3.2.1.'de teorik şeması verilen rekombinant kaset, ekspresyona öncü dizi sinyalinin birinci amino asidi olan metiyonin (ATG) ile başlamaktadır. Daha önceden belirlenen yedi öncü dizi, 14-23 amino asit arasında değişen uzunluklara sahiptir.
- Öncü diziyi takiben *KpnI* enzim kesim bölgesinin kodladığı treonin (T) ve glisin (G) amino asitleri ifade olmaktadır ve rekombinant transgenin öncü dizisinin son amino asidinden sonra kesilerek hücre dışına salgılanması sağlanmaktadır.
- Rekombinant EGFP veya her hangi bir model proteinin N-terminaline bitişik şekilde ifade edilecek olan paramiksovirus V5 yüzey antijeni etiketi (tag) 17 amino asit uzunluktadır. Rekombinant proteinin gereği halinde saflaştırılabilmesini sağlamak amacıyla V5 ve enzim arasında altı adet histidin amino asidi yerleştirilmiş, gereğinde bir metal afinite kolonu yardımı ile rekombinant proteinin saflaştırılması amaçlanmıştır. V5 tag ve altı histidin amino asidinin toplam uzunluğu 23 amino asittir.
- Öncü diziyi takiben *EcoRI* enzim kesim bölgesinin kodladığı glutamik asit (E) ve fenilalanin (F) amino asitlerinin translasyonu gerçekleşmektedir.
- Glutamik asit ve fenilalanin amino asitlerini takiben C ucunda rekombinant proteinin kendisi gelmektedir. Kaçak translasyonun engellenebilmesi amacıyla gen ifadesi ikinci amino asitten başlatılmıştır ve son amino aside dek devam etmesi öngörülmüştür.
- Son amino asit pozisyonunda yer alan DUR (*STOP*) kodonu ile gen ifadesi sona ermektedir.



Şekil 3.2.1. Klonlama stratejisi ile oluşturulan rekombinant gen dizileri.

3.2.3. Megaprimer Aracılığıyla PZR Yöntemi

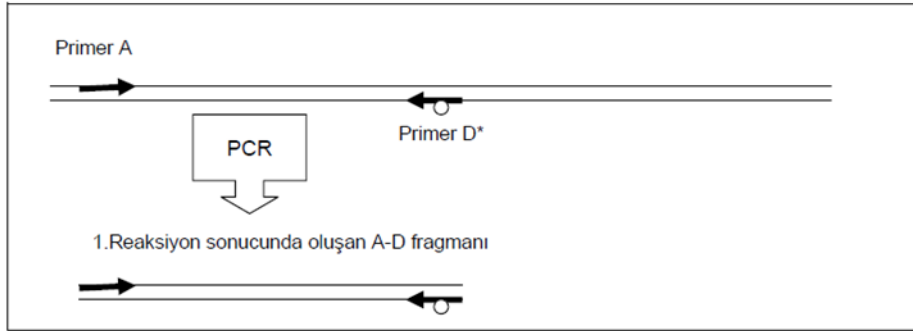
Öncü diziler, V5 epitopu, ve 6xHistidin dizilerinin birbirine ardışık olarak yerleştirilmesi işlemi, “Gene-SOEing” yöntemi ile gerçekleştirildi. PZR aracılıklı mutagenез işleminin temelinde komplementer DNA primerlerinin istenen dizileri oluşturmak üzere tasarlanması yer almaktadır. PZR çoğaltımında kullanılan oligonükleotidler, birbirlerine kısmen komplementer yapıda olup, PZR aracılığı ile birbirlerine komplementer çift iplikli DNA parçaları oluşturmak üzere tasarlanmıştır. Kullanılan mega-primerlerin her iki ucuna yerleştirilmiş olan restriksiyon enzim tanıma bölgeleri aracılığı ile bu gen fragmanlarının istenilen plazmid dizilere klonlanabilmesi de sağlanmaktadır.

Bu yaklaşım, aynı zamanda doğal bir gen dizisi üzerinde de mutasyon oluşturmak üzere kullanılabilir; mutasyon taşıyan primerlerin kullanımı ile doğal diziye komplementer olmayan ve değişiklik yapılmak istenen bir veya birden fazla baz oluşturulan DNA dizilerine yerleştirilebilir. Bu şekilde kalıp görevi gören doğal

DNA dizisi üzerinden yapılacak olan bir çoğaltımın ürünü, içine alacağı mutant primer sayesinde istenilen mutasyon değişikliğini içerir.

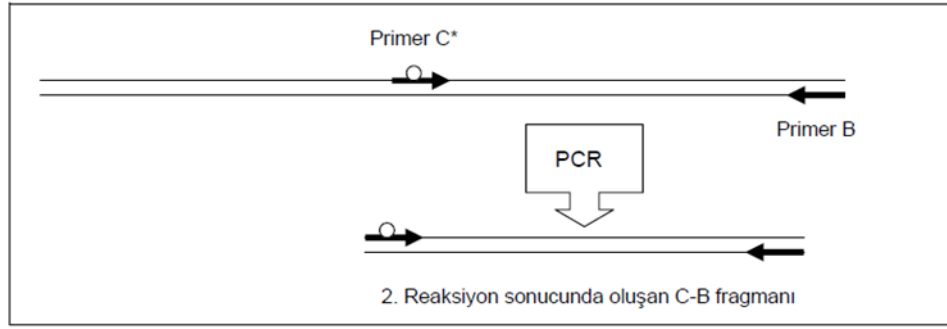
3.2.4. “Gene-SOEing” Yöntemi ile PZR Aracılıklı Mutagenез Oluşturulması

PZR kullanımı ile iki aşamalı mutagenез işleminin temelinde DNA fragmanlarının çoğaltımında kullanılan primer oligonükleotidler içerisinde gerçekleştirilmek istenen mutasyon değişikliğinin yerleştirilmesi bulunmaktadır. PZR kullanılan iki primer oligonükleotidinden biri, doğal diziyeye komplementer olmayan ve değişiklik yapılmak istenen bir veya birden fazla bazı içerir. Bu şekilde kalıp görevi gören doğal DNA dizisi üzerinden yapılacak olan bir çoğaltımın ürünü, içine alacağı mutant primer sayesinde istenilen mutasyon değişikliğini içerir.



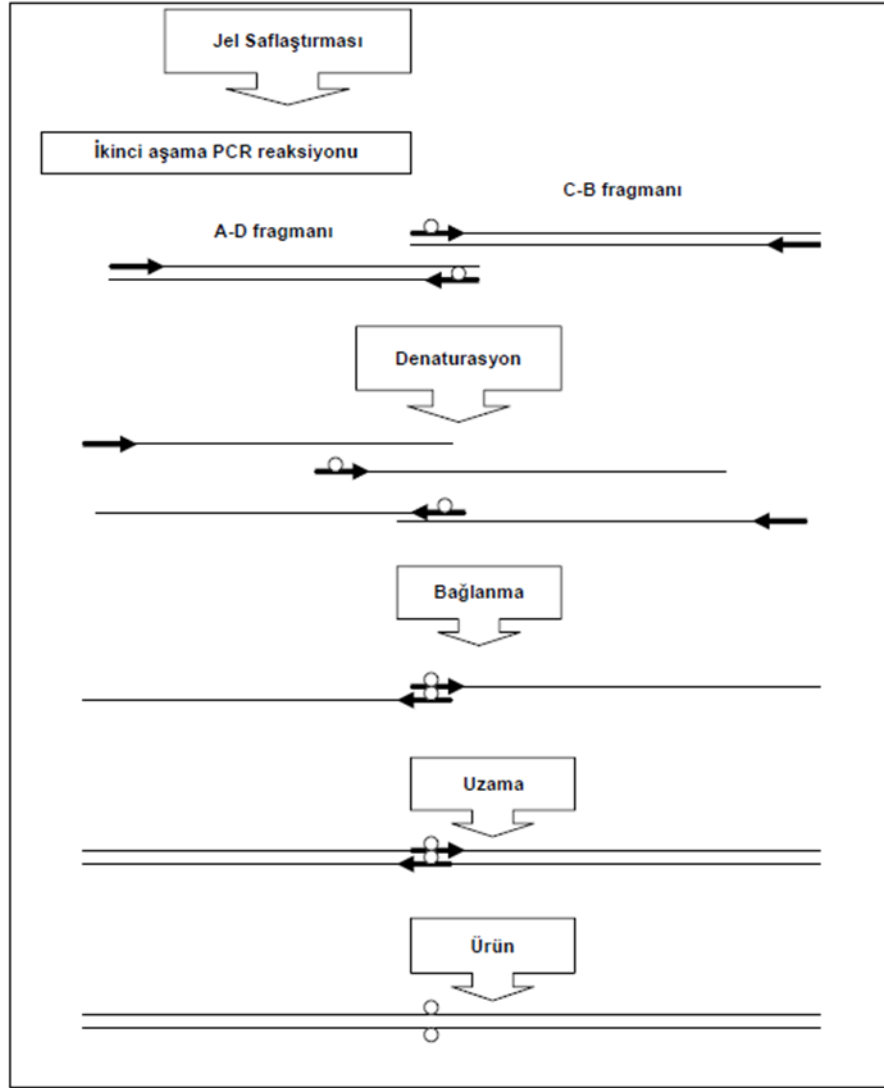
Şekil 3.2.2-A. İlk aşamada birinci tüpte gerçekleştirilen mutagenез PZR reaksiyonu.

Mutasyon gerçekleştirilmek istenilen nokta ortak olmak üzere doğal DNA dizisinin 5' ve 3' uçlarına doğru iki ayrı PZR amplifikasyonu farklı tüplerde gerçekleştirildi. Bu amplifikasyon ürünlerinin birinin 5' ucunda, diğerinin ise 3' ucunda mutasyon içeren ve kısmen örtüşen (komplementer) iki PZR ürünü elde edildi (Şekil 3.2.2-A ve B).



Şekil 3.2.2-B. İlk aşamada ikinci tüpte gerçekleştirilen mutajenik PZR reaksiyonu.

Kalıp DNA'dan arındırmak üzere bu iki PZR ürünü agaroz jelden saflaştırıldı. İkinci aşamada ise, bu iki PZR ürünü aynı tüp içine eşit molar miktarlarda konarak tekrar PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Üst üste örtüşen dizileri taşıyan DNA fragmanlarının ortak dizileri “*annealing*” aşamasında birbirlerine birer primer görevi oluşturarak 5'→3' yönünde DNA polimeraz enzimi tarafından tamamlandı. Bu ikinci reaksiyonun sonucunda mutasyon bölgesini bulunduran tam uzunlukta DNA fragmanı elde edildi. Agaroz jelden saflaştırma ve ikinci aşama PZR reaksiyonları Şekil 3.2.2.C'de gösterilmiştir. V5 yüzey epitopu ve adipokinlere özgü öncü dizilerinin oluşturulması işlemleri yukarıda da açıklanan *in vitro* mutagenез yöntemi kullanımı ile gerçekleştirildi. Sonraki aşamalarda uygun restriksiyon endonükleazlarca kesilerek ekspresyon vektör omurgasına bu DNA parçaları aktarıldı.



Şekil 3.2.2-C. İkinci aşama mutagenез PZR reaksiyonu.

3.2.5. “Gene SOEing” Yöntemi ile Öncü Dizilerinin Amplifikasyonu ve V5+6H Epitoplarının Eklenmesi

Öncü dizilerin oluşturulması ve V5+ 6H epitop etiketleri mutagenik mega-primerler kullanarak Şekil 3.2.3.’te gösterildiği şekilde “Gene SOEing” yöntemi ile birleştirildi. Her bir öncü dizi için dört farklı PZR reaksiyonu kuruldu. İlk reaksiyonda V5 ve V5+6H primer dizileri birleştirildi.



Şekil 3.2.3. Megaprimer aracılığıyla PZR sonucunda elde edilen ürün.

Öncü dizileri, V5 ve 6xHistidin dizilerini birbirine ardışık olarak sentezlenebilmeleri için “Gene-Soeing” yöntemi kullanıldı. PZR kullanımı ile iki aşamalı mutagenез işleminin temelinde DNA fragmanlarının çoğaltımında kullanılan primer oligonükleotidler içerisine gerçekleştirilmek istenen mutasyon değişikliğinin yerleştirilmesi bulunmaktadır. PZR çoğaltımında kullanılan iki primer oligonükleotidinden biri, doğal diziye komplementer olmayan ve değişiklik yapılmak istenen bir veya birden fazla baz içerir. Bu şekilde kalıp görevi gören doğal DNA dizisi üzerinden yapılacak olan bir çoğaltımın ürünü, içine alacağı mutant primer sayesinde istenilen mutasyon değişikliğini içerir.

GoTaq® DNA Polymerase kiti kullanıldı.

<i>GoTaq®</i> DNA Polymeraz	0,25 µl
5x <i>GoTaq®</i> PZR Tamponu	10,0 µl
Primer-F (10µM)	1,0 µl
Primer-R (10µM)	1,0 µl
MgSO ₄ (25mM)	1,0 µl
dNTP (10mM karışım)	2,0 µl
Kalıp DNA	-
dH ₂ O	34,75 µl
Toplam	50 µl

Tepkime koşulları:

94°C	02:00	
94°C	00:05	} 30 döngü
65°C	00:10	
72°C	00:40	
72°C	02:00	
4°C	∞	

Birinci PZR reaksiyonunda kalıp (*template*) kullanılmamaktadır. Bu reaksiyon sonucunda elde edilen ampikon “*Wizard® SV Gel and PZR Clean-Up System*” ile pürifiye edildi ve sonraki reaksiyonlar için kalıp olarak kullanıldı. Kullanılan PZR karışımı aşağıda verilmiştir.

GoTaq® DNA Polymeraz	0,25 µl
5x GoTaq®PZR Tamponu	10,0 µl
Primer-F (10µM)	1,0 µl
Primer-R (10µM)	1,0 µl
MgSO ₄ (25mM)	1,0 µl
dNTP (10mM karışım)	2,0 µl
Kalıp DNA	1,0 µl
dH ₂ O	33,75 µl
<hr/> Toplam	<hr/> 50 µl

Tepkime koşulları:

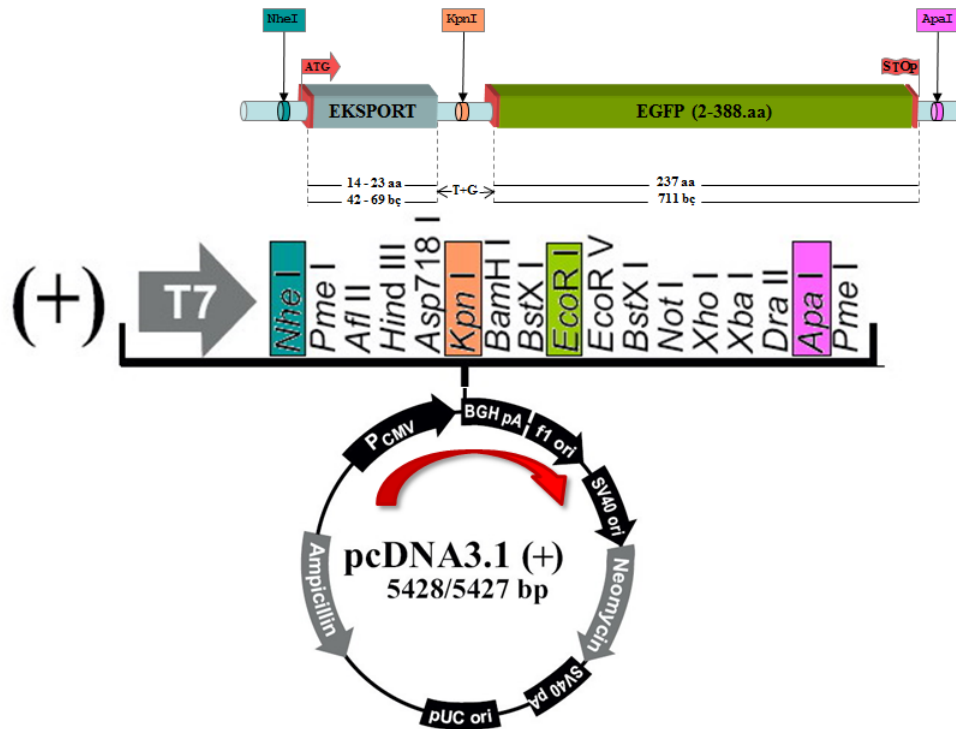
94°C	02:00	
94°C	00:05	} 30 döngü
65°C	00:10	
72°C	00:40	
72°C	02:00	
4°C	∞	

3.2.6. Çoğaltılan Öncü Dizi ve EGFP Dizilerinin *pGEM-T Easy* Vektörüne Klonlanması

Birleştirilerek çoğaltılan öncü dizi ve EGFP fragmanları, modifiye agaroz jelde yürütülerek uygun uzunlukta bantlar kesilerek jelden izole edildi. Bu amaçla *Wizard SV Gel and PZR Clean-Up System* kullanılarak amplicon örnekleri saflaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda *pGEM-T Easy* vektörü ile cDNA ligasyonu sağlandı. Kompetan *E. coli JM109* hücreleri, ligasyon ürünü transforme edilerek X-Gal ve IPTG içeren, 50 µg/ml ampisilinli katı LB besiyerine ekildi. Beyaz koloniler seçilerek çoğaltıldıktan sonra *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* kiti kullanılarak miniprep yöntemi ile plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmid içerisinde hedef dizinin varlığı *EcoRI* enzim kesimi kontrol edilip *T7* ve *SP6* primerlerinin kullanıldığı DNA dizi analizi ile doğrulandı. Doğru diziyi içeren klonlar çoğaltılarak *Plasmid Midi Kit* yardımı ile endotoksinlerden arındırılmış izolasyon uygulandı.

3.2.7. *pGEM-T Easy* Vektörü İçerisindeki Öncü Dizi ve EGFP Gen Parçalarının *pcDNA3.1(+)* Vektörüne Klonlanması

Hazırlanan dizilerin 5' ve 3' uçlarında sırasıyla *NheI* ve *ApaI* restriksiyon enzimleri için kesim bölgeleri yer almaktadır (Şekil 3.2.4.). Midiprep yöntemi ile izole edilmiş *pcDNA3.1(+)* vektörü ve RBP4-EGFP-*pGEM-T Easy* plazmidi, *NheI* ve *ApaI* enzimleri ile kesilerek *pcDNA3.1(+)* vektör iskeleti ve gen fragmanları modifiye jel içerisinde saflaştırıldı. Ligasyon ve transformasyonun ardından bakteriler 50 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine ekildi. Seçilen ve çoğaltılan kolonilerden miniprep yöntemi ile izole edilen plazmidler içerisinde hedef dizinin varlığı, *NheI*, *KpnI*, ve *ApaI* enzim kesimi ile kontrol edilip *T7* ve *BGH-reverse* primerlerinin kullanıldığı DNA dizi analizi ile doğrulandı. Doğru diziyi içeren klonlar çoğaltılarak midiprep yöntemi ile endotoksinde arındırılmış izolasyon uygulandı.



Şekil 3.2.4. Hazırlanan öncü dizi ve EGFP amplikonun *pcDNA3.1(+)* plazmidine eklenmesi.

3.2.8. S/MAR Dizilerinin Amplifikasyonu ve Klonlanması

Son yıllarda S/MAR üzerinde yapılan çalışmalar, *Interferon-Beta* veya *IFN β* (GI: 224831235) geninin 5' kısmında bulunan S/MAR bölgesinin uygun bir seçim olduğunu düşündürmektedir (118) . Bu S/MAR bölgesinin uzunluğu 2.2 kb'dir. Andreas ve ark., 2004 yılında vektör yapılarının, çekirdek içinde matrikse bağlanması için gerekli en kısa S/MAR uzunluğunu 620 bç olarak tanımlanmıştır. Bu uzunluktan daha kısa olması halinde ise, DNA yapısının kromozoma entegre olabileceğini göstermişlerdir (119) . Bu nedenle, *IFN β* geninin 5'distal bölgesinde bulunan 2.2 kb'lik S/MAR dizisi içinde AT'den zengin ve daha kısa bir bölge olan 830bç'lik kısım klonlanak üzere seçilmiştir (IFNB-S/MAR830). Bununla birlikte bu S/MAR dizisi içinde yerleşim gösteren ve AT tekrar dizilerinden daha zengin bir kısım olarak 314 baz çifti uzunluğundaki bölge de klonlanmak üzere seçilmiştir. Seçilen bu bölge için tasarlanan primerler, 314 bazlık AT'den zengin tekrarları barındıran 600 bç uzunluktaki bir bölgeyi (IFNB-S/MAR314) kapsamaktadır. Bu ana yapıya takılan S/MAR dizisinin 620 baz'dan daha kısa olması nedeni ile bu dizinin 2 ardışık kopya halinde vektöre yerleştirilmesi tasarlanmıştır.

IFNB-S/MAR830 ve IFNB-S/MAR314 Dizilerin Amplifikasyonu

IFN β geninin 5' bölgesinde yer alan 2.2 kilobazlık S/MAR dizisinde AT içeriği olan bir alt bölge çoğaltılmıştır (primer dizileri Tablo 3.2.3.'de verilmiştir). Bu primerlerin uçlarında *BstBI* ve *NsiI* (sırası ile 5' ve 3' uçlarda) enzim kesim bölgeleri bulunmaktadır.

Tablo 3.2.3. IFNB-S/MAR830 bölgesi için tasarlanan primerler.

IFNB-SMAR0.8-BF	5'-AAATTCGAAGTTAGGCGACAGCACAGATAG-3'
IFNB-SMAR0.8-NR	5'-AAAATGCATGCAGAAACGGAGAGACATAC-3'

PZR aracılıklı çoğaltılan diziler agaroz jelde yürütüldü ve “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*” yardım ile pürifiye edildi. Saflaştırılan amplicon dizileri, IFNB-S/MAR314 isimli ampliconun hazırlanması için kalıp olarak

kullanıldı. 600 bç uzunlukta olan bu dizinin amplifikasyonu için kullanılan primerler Tablo 3.2.4.'te gösterilmiştir. Bu primerlerin 5' uçlarında (sırası ile *BstBI* ve *NsiI*) enzim kesim bölgeleri bulunmaktadır.

Tablo 3.2.4. IFNB-S/MAR314 dizisi için tasarlanan primerler.

IFNB-SMAR314-BF	5'-AAATTCGAACTCTGATTTCTGAGATTGAGTTTC-3'
IFNB-SMAR314-NR	5'-AAAATGCATGCAAAGCATGAGATGTGTGG-3'

Apolipoprotein-B S/MAR Dizilerinin Çoğaltılması

Apolipoprotein B veya *APO-B* (GI: 105990531) geni ile ilişkili üç farklı S/MAR bölgesi tanımlanmıştır. Genin 3' ve 5' uçlarını çevreleyen iki S/MAR dizisinin yanında, 5' distal bölge olarak adlandırılan 4-5 kilobaz uzaklıkta bir S/MAR daha bulunmaktadır (120) . Bu bölgeler arasında çekirdek iskelesine bağlanma etkinliği bakımından bir fark bulunmadığı anlaşılmıştır (121) . AT içeriği bakımından daha zengin olmasından dolayı, tez çalışmasında kullanılmak üzere, genin 3' ucunda tanımlanan S/MAR bölgesi seçilmiştir. Apolipoprotein beta genin 3' S/MAR dizisi 700 baz çifti uzunluktadır. Bu bölgenin çoğaltımı için iki farklı klonama primer seti hazırlandı (Tablo 3.2.5.). Bu yaklaşımın amacı, dizileri farklı yönelimlerde (orientasyon) olmaları ve bu yönelimin S/MAR etkinliği bakımından bir fark oluşturup oluşturmadığını araştırmaktır. Bu nedenle, seçilen primer dizilerinin 5' ve 3' uçlarında sırasıyla *BstBI* ve *NsiI* enzim kesim bölgeleri yerleştirilmiştir. 5'→3' yönelimli diziye APOB-BN (*BstBI*- *NsiI*) adı verilirken 3'→5' yönelimli klonlanan dizi APOB-NB (*NsiI*- *BstBI*) olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3.2.5. *APOB* genine ait S/MAR bölgesi için tasarlanan primer dizileri.

APOB-CLBF	5'-AAATTCGAAAAAGACAGTGAAACGAGGGCATTG-3'
APOB-CLNF	5'-AAAATGCATAAAGACAGTGAAACGAGGGCATTG-3'
APOB-CLBR	5'- AAATTCGAACTAGCCATTCCTTCTCCACTCCTG-3'
APOB-CLNR	5'- AAAATGCATCTAGCCATTCCTTCTCCACTCCTG-3'

PZR aracılığı ile çoğaltılan S/MAR dizileri modifiye jelde yürütülerek klonlamak üzere kesildi ve “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” yardım ile saflaştırıldı.

Reaksiyon şartları (*GoTaq® DNA Polymerase* kiti kullanıldı):

GoTaq® DNA Polymeraz	0,25 µl
5x GoTaq®PZR Tamponu	10,0 µl
Primer-F (10µM)	1,0 µl
Primer-R (10µM)	1,0 µl
MgSO ₄ (25mM)	1,5 µl
dNTP (10mM karışım)	2,0 µl
Kalıp (sıçan DNA'sı)	0,5 µl
dH ₂ O	33,75 µl
<hr/> Toplam	<hr/> 50 µl

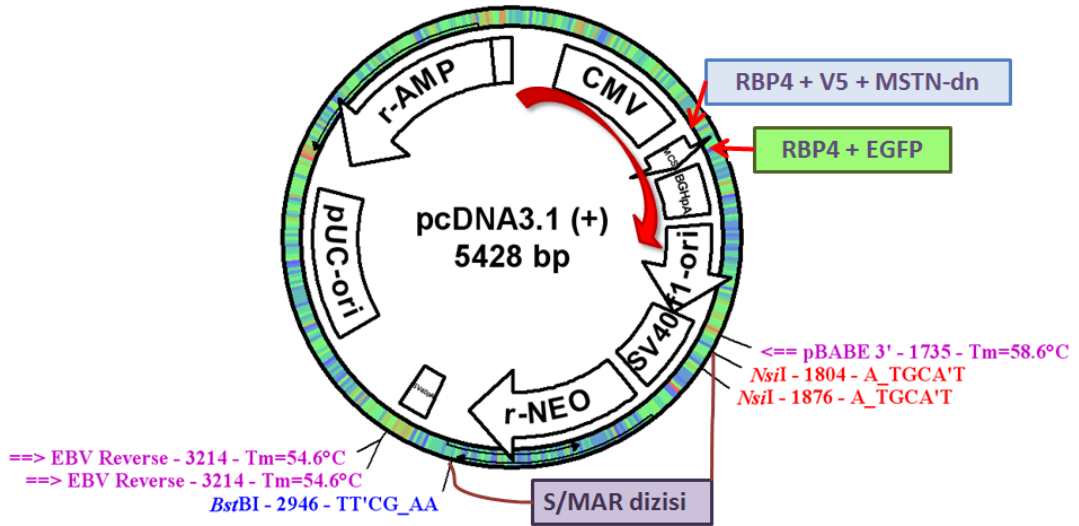
Tepkime koşulları (Her döngüde sıcaklık 1°C düşürülerek *touchdown* PZR yapıldı):

94°C	02:00 dk	
94°C	00:20	} 10 döngü
60°C - 51°C	00:10	
72°C	01:30	
94°C	00:20	
51°C	00:20	} 20 döngü
72°C	01:30	
72°C	02:00	
4°C	∞	

S/MAR Dizilerinin Klonlanması

Hazırlanan IFNB830, IFNB-314, APOB-BN, ve APOB-NB S/MAR dizilerinin 5' ve 3' uçlarında enzim kesim noktaları bulunmaktadır. Tüm S/MAR dizileri PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve saflaştırıldıktan sonra *pGEM-Easy T*-vektörüne aktarıldı. S/MAR dizilerinin doğruluğu uygun restriksiyon endonükleaz enzim kesim

analizi ile ve DNA dizi analizi yöntemi ile kontrol edildi. Klonlama vektörlerinden, 5' ve 3' uçlarında bulunan *BstBI* ve *NsiI* enzimleri ile kesilerek çıkartılan S/MAR dizileri RBP4 öncü dizi ve EGFP dizisini içeren pcDNA3.1 (+) omurgasına aktarıldı. Bu aktarım için pcDNA3.1 omurgasının ökaryotik direnç geni bölgesine, kalıcı entegrasyon için kullanılan neomisin direnç geninin bulunduğu bölge hedeflendi. Hazırlanan bu plazmidlerin dizisi DNA dizi analizi yöntemi ile kontrol edildi ve doğrulanan plazmidler çoğaltılarak midiprep yöntemi ile yeniden plazmid izolasyonu yapıldı. S/MAR dizilerinin ana omurga yapılarına eklendiği bölge ve enzim kesim noktaları Şekil 3.2.5.'te gösterilmiştir.



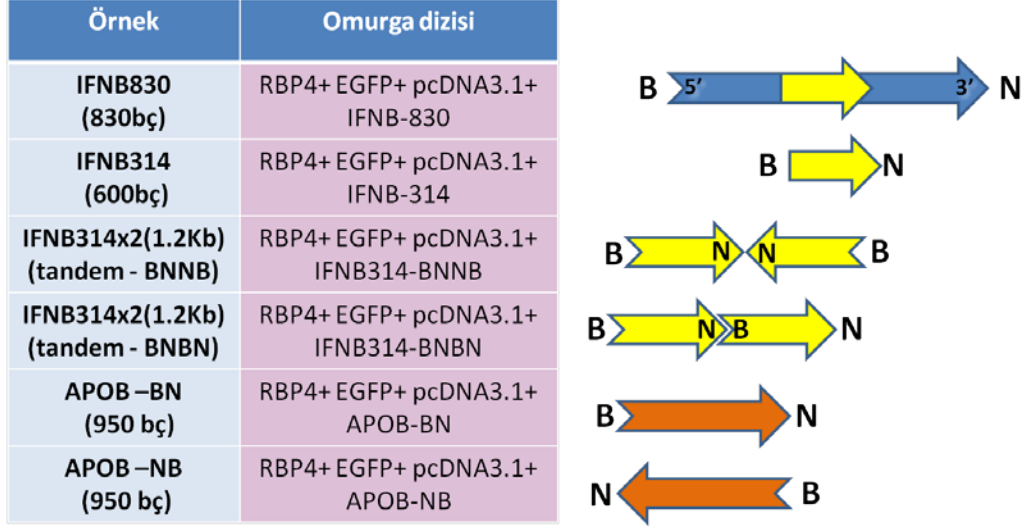
Şekil 3.2.5. pcDNA3.1 (+) vektör omurganın haritası.

IFNB-S/MAR314 Dizilerinin Ardışık Olarak Klonlanması

IFN β genin 5-'S/MAR bölgesinde yer alan AT'den zengin 314 baz çifti uzunluktaki dizi klonlamak üzere seçilmiştir (122). S/MAR dizi verimini arttırmak amacıyla AT'den zengin bu dizini 2 ardışık kopya halinde vektöre aktarılması amaçlandı. Bu yaklaşım ile ilgili açıklayıcı diyagram Şekil 3.2.6.'da verilmiştir.

Bu yöntem ile iki farklı ardışık *IFN β* -314 dizisi içeren yapı elde edildi. Bunların ilki, her iki *IFN β* -314 dizisini de ardışık olarak 5'→3' yönünde taşıyan yapıdır (IFNB-314-BNBN). İkincisi ise, iki IFNB314 dizisinden birinin ters

yönelimli olarak klonlanması sonucundan elde edilen dizidir (IFNB-314-BNNB). Çalışmada gerçekleştirilen tüm S/MAR yapıları, Şekil 3.2.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 3.2.6. Klonlanmış S/MAR dizisi içeren plazmid vektörlerin şeması.

3.2.9. MSTN cDNA Sentezi ve MSTN'dn Dizisinin Oluşturulması

Miyostatin mRNA'sına kaynak oluşturmak üzere, 2 günlük sıçan kalp, bacak kasları, ve supraskapular yağ dokuları diseksiyon mikroskobu altında çıkartıldı ve total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA örneklerinden miyostatin öncü dizisi içeren cDNA sentezi yapıldı. Miyostatin cDNA sentezi için kullanılan primerler Tablo 3.2.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.2.6. Miyostatin cDNAsı klonlama primerleri (öncü dizisi içermektedir).

rMSTN-F	5'-AAAGCTAGCATTTTAAAATGATTCAAAAACCGCAA-3'
rMSTN-R	5'-AAAGGGCCCTCACGAGACCCACACCGGTCTACTACCAT-3'

Elde edilen cDNA örnekleri modifiye agaroz jelden pürifiye edilerek, öncü dizi ve pre-miyostatin cDNAsı arasına V5 epitop dizisi eklemek üzere Tablo 3.2.7. teki primerler tasarlandı ve "gene soeing" yöntemi ile PZR yapıldı. Elde edilen ürün modifiye agaroz jelde yürütüldü ve klonlamak üzere jelden "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" yardım ile pürifiye edildi.

Tablo 3.2.7. MSTN öncü dizisine V5 epitopu eklemek için kullanılan primer dizileri.

rMSTN-F3	5'AAAGCTAGCATGATTCAAAAACCGCAAATGTATGGTACCGGTAA GCCTATCCCTA-3'
rMSTN-R	5'-AAAGGGCCCTCACGAGCACCCACACCGGTCTACTACCAT-3'

Öncü dizi ve V5 epitopu içeren MSTN cDNAsı *pGEM-T Easy* vektörüne klonlandıktan sonra primerlerin 5' ve 3' uçlarında sırasıyla bulunan *NheI* ve *ApaI* enzim kesimi ile çıkartıldı ve pcDNA3.1 (+) ana omurgasına klonlandı. *JM 109* kompetan bakterilere transforme edildi. Bakterilerden izole edilen plazmit, enzim kesimi ve DNA dizi analiz yöntemi ile kontrol edildi.

MSTN geninin öncü dizisinin EGFP N-terminaline eklemek üzere öncü dizi, *KpnI* ve *ApaI* restriksiyon enzim kesimi ile, pcDNA3.1(+) plazmidinden çıkartılarak yerine aynı enzim çifti ile hazırlanan ve saflaştırılan EGFP gen dizisi eklendi. Hazırlanan plazmit yapısı *JM109* kompetan bakterilerine transforme edildi ve çoğalan bu bakterilerden midiprep kit yardım ile plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen bu plazmit yapısı enzim kesimi ve DNA dizi analiz yöntemi ile kontrol edildi.

Adipokin öncü dizilerinin C-terminal kısmına eklenmek üzere öncü dizi içermeyen miyostatin cDNAsı hazırlamak üzere Tablo 3.2.8.'deki primerler ile PZR amplifikasyonu yapıldı. Elde edilen ürün modifiye agaroz jelde yürütüldü ve klonlamak üzere jelden “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*” yardım ile pürifiye edildi.

Tablo 3.2.8. Öncü dizi içermeyen miyostatin cDNAsını çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.

rMSTN-F2	5'-AAAGAATTCGTTTATATTTACCTGTTTGTGCTGATTG-3'
rMSTN-R	5'-AAAGGGCCCTCACGAGCACCCACACCGGTCTACTACCAT-3'

Miyostatin'in fizyolojik etkilerini tersine çeviren ve bloke edici anti-miyostatin etkisi gösteren dominant-negatif miyostatin molekülünün hazırlanması için Zhu ve ark. tarafından uygulanan yaklaşım kullanıldı (7) . Bu deneysel yaklaşımda miyostatin proteininin plazma proteazlarınca tanınarak kesilmesini sağlayan RSRR amino asit dizisi mutajenik primerler yardımı ile cDNA üzerinde DLDG dizisine dönüştürüldü (Şekil 3.2.7.). Tablo 3.2.9.'da açıklanan primerler ile

miyostatin cDNAsı 750 bç'lik 5' kısım (parça a) ve 370 bç uzunluğunda 3' kısım (parça b) olarak iki amplikon dizisi sentezlendi. Hazırlanan ve agaroz jelden saflaştırılan bu iki amplikon eşit molaritede bir araya getirilerek *in vitro* mutagenез tekniği ile birleştirildi.

Tablo 3.2.9. Dominant-negatif etkili miyostatin amplikonunu sentezlemek için kullanılan primerler.

rMSTN-Fa	5'-AAAGCTAGCATTTTAAAATGATTCAAAAACCGCAA-3'
rMSTN-NPRa	5'-TCCGTCTAGACCCTTGGGTGTGTCTGTTACTTTG-3'
rMSTN-CPFb	5'-CACCCAAGGGTCTAGACGGAGACTTTGGGCTTGACTGTG-3'
rMSTN-Rb	5'-AAAGGGCCCTCACGAGCACCCACACCGGTCTACTACCAT-3'

Hazırlanan dominant negatif etkili MSTN cDNAsı (MSTNdn), *pGEM-T Easy* vektörüne klonlandıktan sonra primerlerin 5' ve 3' uçlarında sırasıyla bulunan *EcoRI* ve *ApaI* enzim kesimi yapıldı. Bu amplikon, aynı enzim kesimleri yapılan ana omurgası olan Öncü dizi, V5+ 6H epitopu, ve EGFP içeren pcDNA3.1(+) vektörüne, EGFP dizisinin yerine ligasyon yapılarak eklendi ve *JM 109* kompetan bakterilere transforme edildi. Bakterilerden izole edilen plazmit, enzim kesimi ve DNA dizi analiz yöntemi ile kontrol edildi.

Zhu et al 2000 klonlama stratejisi (RSRR dizisini GLDG'ye çevirme)

NotI/EagI

Primer Fa → 5' -TGGCGGCCGCCACC **ATGATG** CAAAACTG

Aaataaga acaagggaaaaa aaaaga ttgtgctgatt tttaaa **atgatg** caaaa actgcaaatgta tgttta tat
 ttacctgt tcatgc tgattgctgctggccagtgat ctaaat gagggc agtgagagaga agaaaa tgtgga aaa
 agaggggc tgtgta atgcatgtgcgtggaga caaaacacgagg tactccagaat agaagc cataaaaattcaat
 cctcagta agctgcgctggaacagctccta aacatc agcaaatgctata agacaact tctgcc aagagcgcc
 tccactccgggaac tgatcgatcagt acgacgtccagaggat gacagc agtga tggctc tttgga agatga cga
 ttatcacg ctacca cggaaa caatca ttaccatgctacagag tctgac tttctaatgca agcgga tggcaagcc
 caatgttgctttt taaat ttagct ctaaa atacag tacaac aaagtagtaaa agccca actgtggatata tct
 cagaccog tcaagactocta caacag tgtttgtgcaa atcctgagactc atcaa acccat gaaaga cggta caag
 gtatactggaatccgatctc tgaac ttgacatgagc ccaggc actgggt atttggcagag tattga tgtgaagac
 agtgttgcaaaa ttggctcaaacagc ctgaa tccaac ttaggc attgaa atcaa agctttggatgagaatggcca
 tgatcttgctgtaa ccttcc caggac caggagaagatgggctgaatccc ttttta

XbaI

ACAGACACACCCCAAGGG **TCTAGACG** GAGAC - 3' ← Primer Ra

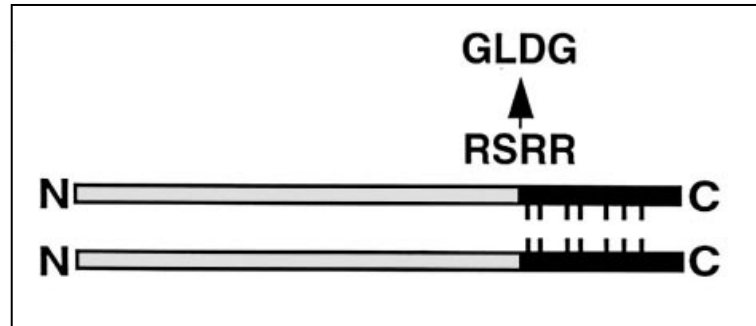
Primer Fb → 5' -AAGGG **TCTAGACG** GAGACT TGGGCTTGAC

Gaagtcaagggtgacagacacaccaag **aggtccgggaga** gact ttgggc ttgac tgcgatgagcac tccacggaa
 tcccgggtgctgcgctaccc cctcacggctgattttgaa gctttggatgggac tggattatcgca cccaaa aga
 tataaggc caatta ctgctcaggagagtgtg aatttg tgtttt tacaaaaaatat ccgcat actcatcttgtg cac
 caagcaaa cccagaggctcagcagg ccctt gctgca ctccga caaaaa tgtctccattaatatgctata ttt
 aatggcaaaagaaca aataat atatgggaaaa ttccag ccatgg tagtagaccgc tgtgggtgctca **tga** gct ttg
 TAGACCGCTGTGGGTGCTCAGAGCAGAAG

SalI

CTGATCAGCGAAGAGGATCTA **TAG** TCGACTC - 3' ← Primer Rb

cattaggt tagaaa tttcccaagtc a tggaa ggtctt cccctcaatttc gaaactgtgaa tccaag caccacag
 ctgtaggccttgatgctctagta acgta agcaca agctacagtgtgaactaaa agagagaa tagatgcaa
 tggttggcattcaaccacca aataa accat acta



Şekil 3.2.7. Zhu ve ark. tarafından tanımlanan dominant negatif etkili miyostatin eldesi klonlama stratejisi (RSRR dizisinin GLDG'ye dönüştürülmesi). Bu yaklaşımda iki set primer çifti (a ve b) aracılığı ile miyostatin cDNAsı 5' ve 3' kısımlar olarak iki parçaya bölünerek çoğaltıldı. primer a çiftinin 3' ucunda (*reverse*) ve primer b çiftinin 5' ucunda (*forward*) dizi değişikliğini amaçlayan mutajenik primerleri içermektedir. Uygulanan PZR sonucunda iki a ve b amplikonları elde edildi, bu iki parça amplikon ise ortak dizileri aracılığı ile PZR yardımı ile birleştirildi.

PZR için *GoTaq® DNA Polymerase* kiti kullanıldı.

GoTaq® DNA Polymeraz	0,1 µl
5x GoTaq®PZR Tamponu	4,0 µl
Primer-F (10µM)	0,8 µl
Primer-R (10µM)	0,8 µl
MgSO ₄ (25mM)	2,4 µl
dNTP (10mM karışım)	0,8 µl
Kalıp (Kalp- cDNAsı)	4,0 µl
dH ₂ O	7,1 µl
Toplam	20 µl

Tepkime koşulları:

94°C	02:00 dk	
94°C	00:05	} 30 döngü
51°C	00:10	
72°C	00:15	
72°C	02:00	
4°C	∞	

3.2.10. Hücre Kültürü

Sıçan Yağ Öncülü Hücrelerin İzolasyonu ve Çoğaltımı

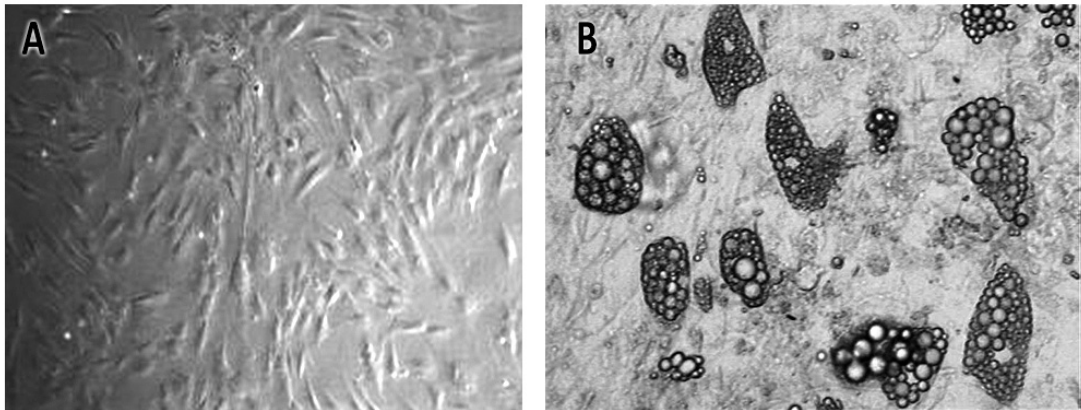
Yağ öncülü hücrelerin izolasyonu ve çoğaltımı amacıyla 3 aylık erkek Sprague-Dewley ırkı sıçan kullanılmıştır. Bu amaçla anestezisi altında % 70 etil alkol ile dezenfeksiyonu takiben sırt cilt dokusu diseke edilerek yağ dokusu çıkartıldı. Interskapular yağ dokusu, toraks arka duvarından sıyrılarak diseke edildi. Bu diseksiyon sırasında yüzeysel sırt kaslarının çıkartılan yağ dokusunu kontamine etmemesine özellikle dikkat edildi. Doku % 1 FCS içeren soğuk PBS tamponu içine kondu. Bu aşamadan sonraki işlemler kültür kabini içinde sürdürüldü. Çıkartılan ve soğuk PBS tamponu içinde bekletilen interskapular yağ dokusu tekrar bistüri yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı. Bu parçalar, DMEM besi ortamı içinde çözelti halinde hazırlanan 1:1 hacimde % 1'lik Diaspaz II ve % 1'lik Kollajenaz B solusyonları içine kondu (Her iki enziminde son konsantrasyonu % 0.5

olacak şekilde). Çalkalamalı su banyosunda 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Ara ara pipetlenerek olası doku grupları dağıtmaya çalışıldı. Inkübasyonun sonunda iki defa 50 ml %1 FCS içeren PBS tamponu içinde yıkandı ve sırası ile 70 ve 30 µm’lik filtrelerden geçirildi. Bu işlem ile küçük çaplı mononükleer hücrelerin dışında kalan yapılardan arınma sağlandı. Bu yöntemle elde edilen hücreler çoğaltılmak üzere, adiposit çoğaltma ortamı içeren 10 cm’lik doku kültürü kaplarına, 10⁵ hücre gelecek şekilde dağıtıldı. Hücreler adiposit çoğalma ortamı içinde yüksek yoğunluğa erişmeden sık pasajlanarak çoğaltıldı. Yeterli primer preadiposit elde edildiğinde, toplanan hücreler, erken pasajlarda (1-3), 10⁵ hücre içeren viallerde sıvı azot içinde dondurularak saklandı.

Farklılaşmanın indüklenebilmesi için yüksek yoğunluğa erişen hücreler adiposit farklılaşma ortamına alınarak iki gün boyunca bu ortamda tutuldu. Daha sonra her iki günde bir besi ortamının yarısı alınarak adiposit idame ortamı ile değiştirildi.

Sıçan Yağ Öncülü Hücrelerin Farklılaştırılması

Hücrelerin olgun yağ dokusuna farklılaşmaları için % 90 yoğunluğa erişen hücre kültürüne insulin, IBMX ve *Dexamethasone* kokteyli ilave edilerek farklılaşma başlatıldı. Aşağıda Şekil 3.2.8.’da çoğalmakta olan (a) ve üç haftalık farklılaşma süreci sonunda izlenen genç adipositler (b) görülmektedir.



Şekil 3.2.8. Yüksek yoğunlukta (a) ve farklılaşmanın erken aşamalarında sıçan yağ hücreleri (b).

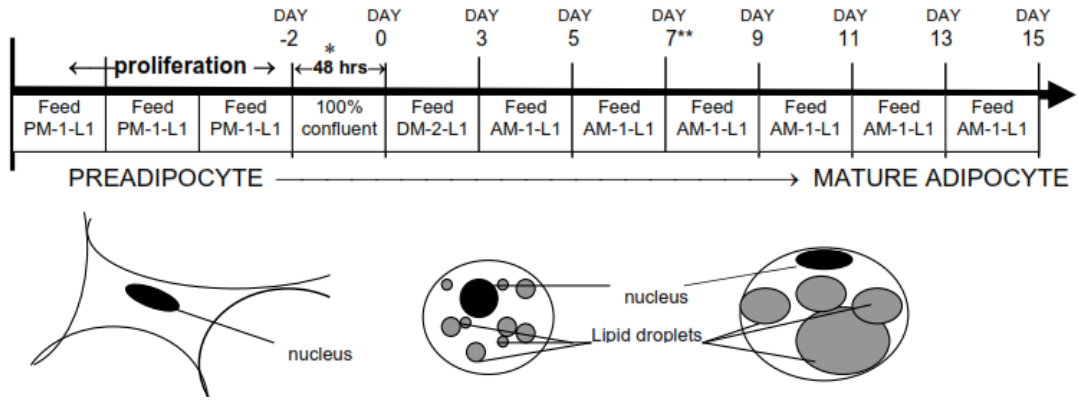
Adiposit farklılaşmasının önemli bulgularından biri olan hücre içi yağ vezikülü depolarının ortaya çıkması ve bu veziküllerin büyüyerek birbirleri ile birleşmesi bulgusu sudan, “*Oil Red O*” veya benzeri yağ boyaları ile gösterilebilmektedir.

3T3-L1 Fare Adipogenez Hücre Hattının Çoğaltılması ve Farklılaştırılması

3T3-L1 fare adiposit hücre hattı, ATCC temsilcisinden CL-173 satın alındı. Hücreler, 2 ml adipojenik çoğalma ortamı ile süspansiyon oluşturacak şekilde 25cm²'lik flasklarda çoğaltıldı. Her bir örneğin üzerine yeteri miktarda adipojenik çoğalma ortamı eklendi. Adipojenik çoğalma ortamı, DMEM içerisinde % 10 FBS, 2mM L-Glutamin ve % 1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlandı. Örnekler, 37°C, % 5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı. Bölünerek, petri yüzeyinde % 90 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlandı. Yüksek yoğunluğa ulaşan hücreler, % 5 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren besi ortamında sıvı azot tankından uygun şartlarda dondurularak stoklandı. Gereğinde, hızlıca 37°C su banyosunda çözüldü. İçinde 10 ml besi ortamı bulunan tüpe alındı ve 180 g'de 5 dk santrifüj edildi ve çoğalmaya bırakıldı

Farklılaşma deneyleri için % 90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besi ortamı, adipojenik farklılaşma ortamı ile değiştirildi. Adipojenik farklılaşma ortamı, 1:1 oranında Ham's F10 ve DMEM karışımı içinde % 10 FBS, 2 mM L-Glutamin (% 1), 11.5 mg/mL IBMX (% 1), 167 µM insülin (% 1), 10 mM *Dexametason* (1:10,000), ve % 1 Penisilin/Streptomisin çözeltisi eklenerek hazırlandı. Besi ortamları gün aşırı değiştirildi. Farklılaşmanın indüklenmesinden sonra, 8. günde, hücrelerin besi ortamı çoğalma besi ortamı ile değiştirildi.

Süreci tamamlayan hücreler 1ml Trizol çözeltisi ile toplanarak, petri yüzeyine yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlandı. Kalkan hücreler 1.5 ml'lik tüpe alınarak, RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C'de saklandı.



Şekil 3.2.9. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci ve morfolojisi (Zenbio,Inc).

3T3-L1 hücreleri, farklılaşmanın ilk günlerinde multiloküler yağ vezikülleri oluşmaya başlar ve farklılaşmanın ikinci haftasının sonunda bu yağ vezikülleri bileşip monoloküler yağ damlacıkları oluştururlar (Şekil 3.2.9.).

C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattının Çoğaltılması ve Farklılaştırılması

C2C12 fare miyoblast hücre hattı, Şap Enstitüsü'nden satın alınarak, miyojenik çoğaltım ortamında düşük yoğunlukta sürekli çoğalmaya bırakılmıştır. Stoklamak amacıyla her vial içinde 1×10^6 hücre gelecek şekilde dondurularak azot tankında. %10 DMSO içeren besiyerinde saklanmıştır. Gerekliğinde, saklanmakta olan hücreler hızlıca 37°C su banyosunda çözüldü. İçinde 5 ml besi ortamı bulunan tüpe alındı ve 400 g'de 10 dk santrifuj edildi. Üst faz atıldı. Pellet halindeki hücreler, 2 ml miyojenik çoğalma ortamı ile süspansiyon oluşturacak şekilde karıştırıldı. Hücreler eşit hacimde, 30 mm çapında petri kaplarına paylaştırıldı. Her bir örneğin üzerine miyojenik çoğalma ortamı eklendi. Miyojenik çoğalma ortamı, DMEM içerisinde % 10 FBS, 2 mM L-Glutamin ve % 1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlandı. Örnekler, 37°C, % 5 CO2 içeren etüvde tutuldu. Bölünerek, petri yüzeyinde % 60 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlandı.

Farklılaşma deneyleri için % 90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besi ortamı, miyojenik farklılaşma ortamı ile değiştirildi. Miyojenik farklılaşma ortamı, 1:1 oranında hazırlanan Ham's F10 ve DMEM karışımına % 2 at serumu, 2 mM L-Glutamin, % 1 penisilin/ve streptomisin çözeltisi eklenerek hazırlandı. Besi ortamları gün aşırı değiştirildi. Hücreler 7-9 gün arasında farklılaştırma besi ortamına maruz

bırakıldı. Süreci tamamlayan hücrelerin üzerine 1ml Trizol çözeltisi eklendi ve petri yüzeyine yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlandı. Kalkan hücreler 1.5 ml'lik tüpe alınarak, RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C'de saklandı.

Hemositometrede Hücre Sayımı

Hücreler tripsin yardımı ile kaldırdı. Kaldırılan hücrelerden 100 µl pipet yardımı ile alındı ve 900 µl besiyeri içeren 1.5ml'lik tüpe eklendi ve karıştırıldı. Hücre sayımı bu karışımdan 10 µl alıp hemositometre (*LEVY and LEVY-HAUSSER, Corpuscule Counting Chamber*) yüzeyine eklendi ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı.

HÜCRE SAYISI = Ortalama Hücre Sayısı x Sulandırım faktörü (10) x Hacim x10⁴

Tripan Mavisi ile Hücre Canlılık Testi

Vektör transfeksiyonu yapılan hücrelerde gözlenen EGFP protein ifadesine özgül floresan olduğunu ve hücre ölümüne bağlı otofloresan sinyali olmadığını göstermek amacıyla, Tripan mavisi yöntemi ile canlılık testi uygulandı (123) . Tripan mavisi ölü hücrelerin tespiti için kullanılan bir boyadır. Tripan mavisi sağlıklı hücrelerin zarından içeriye giremediğinden, sağlıklı hücreler renksiz kalırken, ölü hücreler maviye boyanır. Bu deneyde, pozitif kontrol olarak serum açlığı uygulanarak hücresel stres ve ölüm gerçekleşen hücreler kullanıldı.

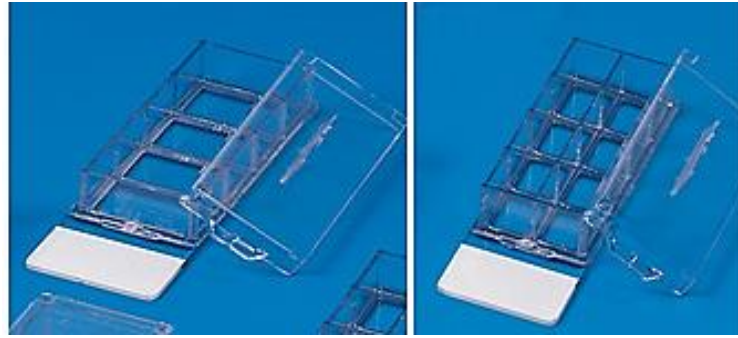
Tripan mavisi, ile muamele öncesinde hücre kültürü şartlarında çoğalan hücrelerin serumdan arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla, hücre kültürleri 1xPBS ile 3 defa yıkandı. Hücrelerin üzerine 1xPBS ile 1:1 karıştırılarak yoğunluğu %4'ten % 2'ye seyreltilen Tripan mavisi eklendi ve 1 dakika bekletildi. Tripan mavisi uzaklaştırıldı ve hücreler % 4 PFA (pH:7.5) ile oda sıcaklığında 10 dakika, veya 0°C'de 20 dakika sabitleştirildi. Hücreler, 1xPBS ile 3-4 defa nazikçe yıkandı, immersiyon yağı eklenip lamel ile kapatılarak gözlendi.

3.2.11. Poli-Laktik-Ko-Glukonik Asit (PLGA) Polimerlerin Hazırlanması

PLGA (poly-lactic-co-glycolic asit) polimer diskleri, 50:50 25:75 ve 10:90 oranında laktik asit: glikolik asit içeren karışımlardan, kloroform içinde çözülerek ve 70-100µm çaplı KCl tuz kristalleri içeren teflon kapların içine dökülerek polimer çapları 12mm ve kalınlığı 2mm olacak şekilde hazırlandı. Tuz kristallerinden arındırmak amacıyla hazırlanan bu yapılar, 24-48 saat dH₂O içerisinde bekletildi ve kurutuldu. Oluşturulan yapılar etilen oksit aracılığı ile sterilize edildi. Çeşitli oranlarda poli-laktik/glukonik asit (PLGA) içeren polimerler, üzerine adiposit öncülü hücreler yerleştirilerek farklılaştırma için hazırlandı. Bu işlemlerin tümü biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Hücre Kültürü Lamlarının Laminin ve Poli-L-lizin ile Kaplanması

Transfekte edilen 3T3-L1 hücrelerine immün floresan boyama uygulamak üzere, *Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™* lamları kullanıldı. Bu lamlar, kullanmadan önce, laminin ve poli-L-lizin ile kaplandı (Şekil 3.2.10.).



Şekil 3.2.10. 3T3-L1 hücrelerine immünboyama uygulamak için kullanılan *Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™* lamları. Bu lamların bölmeli olmaları sayesinde daha az hücre sayısı ve antikor kullanılabilir.

Ana stoğu 100 µg/ml olan poli-L-lizin'den, 1:10 oranında seyreltilerek 1 mg/ml ara stok elde edildi ve 30 mm'lik petri içerisinde yer alan lamellerin üzerini kapatılacak şekilde ilave edildi. En az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Solüsyonun fazlası pipet yardımıyla alındı ve 1xPBS ile üç kez yıkandı. Stok konsantrasyonu 16 µg/ml olan laminin, 1xPBS ile seyretildi ve 4 µg/ml ara stok

olarak hazırlandı. Bu çözeltiden lamellerin yüzeyini kapatılacak kadar ilave edildi. +4°C’de bir gece boyu ya da 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Lameller 3 defa 1xPBS ile yıkandı. Kaplanan malzemeler hemen kullanılmayacak ise 1xPBS ilave edildi ve +4°C’de saklandı. Yeni hazırlanmış kültür kapları ile çalışılması tercih edildi.

3.2.13. Gen Transferi Protokolleri ve Protein İfadesi Takibi

FuGene ile Gen Transferi Protokolü

Transfeksiyon öncesinde uygulama yapılacak hücreler PBS ile yıkanarak antibiyotikten arındırıldı. Yüksek transfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksik yan etki amacıyla, *FuGENE HD* transfeksiyon reaktifi kullanıldı. Oda sıcaklığında 100 µl DMEM üzerine sırasıyla midiprep ile izole edilmiş endotoksinde arındırılmış, 8 µl *FuGENE HD* transfeksiyon ajanı ve 2 µg plazmit eklendi (8:2 oranında). Karışım hafifçe vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi. Yaklaşık $1 - 2,5 \times 10^5$ yağ öncülü hücre içeren petri kabının besiyeri ortamı çekilerek antibiyotiksiz besiyeri ile değiştirildi. İnkübasyonu tamamlanan transfeksiyon karışımı, kuyunun içine damlatılıp hafifçe karıştırıldı. Hücreler, etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hücreler Leica DMIL floresan donanımlı ters mikroskop aracılığı ile gözlenerek Leica sayısal kamera ile görüntülendi. Daha sonra bu hücreler tripsinize edilerek protein izolasyonu amacıyla -20°C’da donduruldu.

Elektroporasyon ile Gen Transferi Protokolü

Elektroporasyon ve gen transferi için gereken malzeme ve sarflar *BTX Harvard apparatus* firmasından temin edildi. Bu firma tarafından önerilen yöntem ve protokol temel alınarak yüksek bir transfeksiyon verimi elde etmeye yönelik optimizasyon yapıldı.

75 cm² kültür kaplarında çoğaltılan hücreler %80 -%90 yoğunluğa ulaştığında 1xPBS ile yıkanarak tripsin yardım ile toplandı. 1 milyon hücre 250 µl 1xPBS, DMEM veya BTX elektroporasyon solusyonu içine pipetlenerek üzerine 30µg plazmit ilave edildi ve elektroporasyon kuvvetlerine dağıtıldı. Her hücre tipi için özgül olarak optimize edilen şartlar ile elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi (Tablo 3.2.10.). Transfekte olan hücreler, 6-kuyulu kültür kabı kuyularına dağıtıldı

ve % 10 FCS içeren çoğalma besi ortamı eklendi. Transfeksiyonun 24 saat sonrasında, hücreler farklılaşma besiyerine maruz bırakıldı ve hücrelerin morfolojisi Leica DMIL floresan donanımlı ters mikroskop aracılığı ile takip edildi.

Tablo 3.2.10. Farklı hücre tipleri için optimize edilen elektroporasyon şartları.

Hücre tipi	DNA miktarı	Voltaj	Süre	Atım sayısı
Sıçan yağ-öncülü hücreleri	30 µg	400-500 V	1 msn	4
3T3-L1 Hücre hattı (Farklılaşma öncesi transfeksiyon)	30 µg	475 V	1 msn	4
3T3-L1 Hücre Hattı (Farklılaşma sonrası transfeksiyon)	20 µg	225 V	1 msn	4
C2C12 hücre hattı	10 µg	360 V	10 msn	1

Transfeksiyon oranını hesaplamak amacıyla transfeksiyonun 24. saatinde her örnek için petri kabında 10x büyütme ile 10 farklı bölge seçilerek her bölgede bulunan EGFP sinyali içeren transfekte edilmiş hücre sayısı ve toplam hücre sayısı mikroskop altında sayıldı ve transfeksiyon oranı hesaplandı.

3.2.14. Gen Transferi Yapılan Hücrelerde ER Stres İncelenmesi

Transfekte edilen hücrelerde, plazmit içerisinde bulunan ve transkripsiyonu düzenleyen CMV promotörü, yüksek transkripsiyon hızına sahiptir. Bundan dolayı, hücre içinde yoğun bir protein translasyonu ve ER içinde de taşınma ve paketlenme söz konusudur. Bu nedenden dolayı ER’de, hatalı katlanma ve proteinlerin agregat oluşturmaya bağlı olarak transfekte edilen hücrelerde ER stresi oluşumu ihtimali vardır. Rekombinant protein içeren vektör ile transfekte edilen olgun yağ hücrelerinde ER stresi varlığını incelemek amacıyla hücrel ER stresi belirteçlerinden biri olan *XBPI* mRNA’sının kırılma durumu (*spliced* - *sXBPI*) incelendi. ER stres algısında, sinyal iletiminden görevli olan *XBPI* mRNA’sı, normal şartlarda hücre sitoplazmasında kırılmamış “*unspliced*” formdadır (*uXBPI*) ve translasyonu gerçekleşmez. ER stresi halinde özgül bir enzim tarafından sitoplazmada kırılarak işlevsel olarak aktif *XPB1* mRNA’sına dönüşür ve *XBPI*

transkripsiyon faktörü çekirdeğe yönelir. XBP1 transkripsiyon faktörü, hücre çekirdeğine girerek ER şaperonlarının gen ifadesini artırır.

Bu çalışmada, sıçan yağ öncülü hücreler, RBP4 ve MSTNdn cDNAsı içeren pcDNA3.1 (+) vektör omurgası ile transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak hücelere pEGFP.C1 vektörü aktarıldı. Negatif kontrol olarak transfekte edilmeyen yağ öncülü hücreler çoğaltıldı. 48. ve 120. saatlerde örnekleme ikişerli olarak yapılmak üzere 6-kuyulu petride hazırlandı. Trizol reaktifi yardımı ile hücrelerden mRNA toplandı cDNA sentezlendi. Sentezlenen cDNAlardan XBP1 primerleri kullanarak PZR yapıldı ve elde edilen ampikonlar %3 agaroz jelde yürütüldü. XBP1 üzerinde yer alan ve kırılma bölgesini hedefleyen primerler dizileri Tablo 3.2.11.'de verilmiştir.

Tablo 3.2.11. ER stres araştırması için tasarlanan sıçan XBP1 primerleri.

rXBP1-F	5' -CTCAGAGGCAGAGTCCAAGGG -3'
rXBP1-R	5' -GAAGAGGCAACAGCGTCAGAATC-3'

3.2.15. Hücre Kültürü Örneklerinin İmmü Floresan Boyaması

İlk olarak, öncü dizilerinin kullandığı salgısal yolağın rekombinant protein üretim kapasitesini araştırmak için EGFP dizinin N-terminalinde klonlanan farklı öncü dizileri içeren pcDNA3.1(+) ile hücre kültürü şartları altında transfekte edilen hücreler, transfeksiyonun 12, 16, 24, ve 36. saatlerde % 4 PFA ile tespit edildi. Golgi, ve ER'a özgül antikorlar ile immü floresan boyama yapıldı.

İkincil olarak, RBP4 ve MSTNdn içeren pcDNA3.1(+) vektör yapıları aracılığı ile sağlanan rekombinant protein sentezi kinetiği ve hücre içinde izlediği salgısal yolak trafiği gösterilmeye çalışıldı. Bu amaçla, 3T3-L1 hücreleri, RBP4+V5+MSTNdn dizisini içeren pcDNA3.1(+) plazmit vektörü ile transfekte edildi ve laminin-poli-L-lizin ile kaplanmış *Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber* lamları üzerinde farklılaşmaya bırakıldı. Bu farklılaşma sürecinin 21. gününde hücreler tespit edildi. V5, Klatrin, ve golgiye özgül antikorlar ile ikili boyamalar yapıldı ve analiz edildi.

Uygulanan immü floresan boyama yöntemi 7 aşamadan oluşmaktadır:

1- Hücrelerin ortamı çekilerek steril PBS ile yıkandı. Lamlar, steril 1xPBS içinde hazırlanmış % 4'lük PFA çözeltisi eklendi ve 4°C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında PFA çekilip lameller 3 defa 1xPBS ile yıkandı.

2- Hacimce % 0,2'lik *Triton X-100*/PBS çözeltisi ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu yolla hücre zarının geçirgenliği sağlandı.

3- Bloklama işlemi sırasında bloklama solüyonu olarak adlandırılan %3 keçi serumu, % 10 sığır serum albumini ve % 0,1 *Tween 20* içeren PBS çözeltisi olarak taze olarak hazırlandı ve lamların üzerine eklendi. Kurumayı önlemek için nemli ortamda oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi.

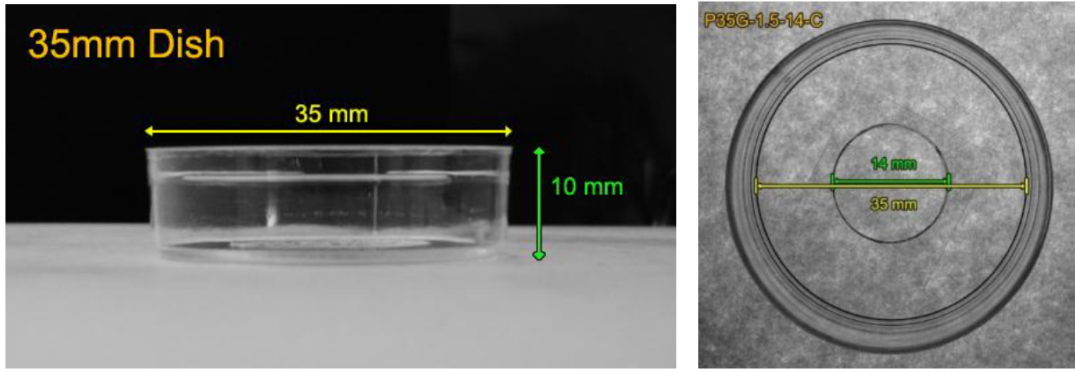
4- Bloklama çözeltisi uzaklaştırıldı ve yerine uygun seyreltme oranlarında hazırlanan birincil antikolar eklendi. Nemli ortamda oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edildi. Daha sonra % 0,1 *Tween 20* içeren PBS çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Kullanılan birincil antikoları olan α V5 epitopu 1/500, α golgi 1/400, α ER 1/100, ve α Klatrin 1/250 oranlarında seyretilerek kullanıldı.

5- Birincil antikor uygulamasından sonra, bir kez daha bloklama çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. bu işlemin devamında, Sekonder antikolar (*Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG* ve/ya *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG*) bloklama çözeltisi ile 1:1000 oranında seyreltilerek birlikte uygulandı. Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, hücreler % 0.1 *Tween 20* içeren PBS çözeltisi ile 5 kez yıkandı.

6- Son olarak hücrelerin çekirdeklerinin görüntülenebilmesi için 1dk süreyle bloklama çözeltisi ile 1:2000 oranında seyreltilerek DAPI boyaması yapıldı. 2 kez yıkama çözeltisi (1x PBS içinde % 0,1 *Tween 20*) ile, ardından 1 kez 1x PBS ile yıkama yapıldı.

7- Boyamaların bitiminde hücrelerin üzerine *Prolong Antifade* kaplama solüsyonu damlatıldı ve hücrelerin üzeri kapatıldı. Preparatlar ışık görmeyecek şekilde 4°C'da saklandı. Hazırlanan preparatlar, *Carl-Zeiss* LCM-510 konfokal ve *Leica* IM50 floresan mikroskopları kullanılarak incelendi.

Boyamalar, konfokal ve floresan mikroskobunda yüksek büyütmelemlerde ve iyi çözünürlükte görüntü alabilmek için tasarlanmış özel petri kaplarında yapıldı (Şekil 3.2.11.). Bu petri kaplarının iç kısmında, merkezde 14 mm çapında bir çukur bulunmaktadır. Bu çukurun alt kısmı lamel benzeri bir cam ile kapatılmıştır. Bu çukur sayesinde, hücrelerin üzerine lamel kapatıldığında hücreler ezilmemektedir. 3boyutlu yapılarını koruyan hücreler, konfokal mikroskobunun 3 boyutlu tarama özelliğini kullanarak görüntüleme yapılmasına olanak vermektedir. Ayrıca hücre içinde bulunan proteinlerin yerleşimlerinin araştırılacağı dikkate alındığında, hücre yapısını doğru yansıtan görüntülerin elde edilmesi gerektiğinden bu petri kaplarını kullanmak oldukça önemlidir.



Şekil 3.2.11. Boyamalar için kullanılan özel petri kaplarının görüntüsü. a) Petri kabının yandan görünüşü b) Petri kabının üstten görünümü.

3.2.16. β -galaktozidaz Aracılıklı Transfeksiyon Normalizasyonu (β -galactosidase assay)

Farklı plazmidler ile uygulanan transfeksiyon işlemleri deneyler arasında transfeksiyon başarısı ve etkinliği bakımından farklılıklar sergilemektedir. Transfeksiyon tekniği sonrasında yapılan ölçüm ve analizlerin güvenilirliği için, transfeksiyonda gözlenen varyasyonun teknik olarak normalize edilmesi gereklidir. İşlevsel ölçümlerle yapılan karşılaştırmaların doğru, sağlıklı ve güvenilir olması için, Transfeksiyon deneylerine bir iç kontrolün (internal kontrol) dahil edilmesi gereklidir. Bu amaçla, bütün transfeksiyon deneylerine sabit molar miktarda

β -galaktozidaz ifade vektörü (pSV- β Gal plazmid) ilave edilerek deney sonuçlarında β -galaktozidaz tayini yapılmıştır.

Tez kapsamında seçilen öncü dizilerinin protein salgı verimliliklerini karşılaştırmak için, GFP dizisinin N-terminalinde bulunan seçilen farklı öncü dizileri içeren pcDNA3.1(+) plazmidleri, beta galaktozidaz ifadesini sağlayan pSV- β Gal plazmit vektörü ile 9:1 molar oranda karıştırıldı ve 3T3-L1 hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile aktarıldı. Pozitif kontrol örneği olarak, hücreler sadece pSV-Bgal ile transfekte edildi. Transfekte edilen hücreler 12 kuyulu kültür kuyularına dağıtıldı (her plazmit örneğinin 48. ve 120. saat dilimlerinde 3'er kez bağımsız olarak takibi amaçlanmıştır). Transfeksiyonun 48. ve 120. saatlerinde hücreler toplandı, hücre lizatları hazırlandı. Bu örneklerde, üretici firmanın önerileri doğrultusunda β -galaktozidaz tayini yapıldı. β -galaktozidaz çalışması için, tüm örnekler kolorimetrik yöntemle 420 nm'de *VersaMax ELISA Microplate* okuyucu ile okunarak hücre lizatlarındaki beta galaktozidaz miktarı ölçüldü. Bu ölçümler, aşağıda yer verilen florimetrik ölçümlerin normalizasyonunda kullanıldı.

3.2.17. Hücrelerde Sentezlenen ve Ortama Salınan Rekombinant EGFP Sinyalinin Kantitasyonu

Salgısal öncü dizi içeren rekombinant EGFP protein ifade vektör yapıları ile transfekte edilen 3T3-L1 hücrelerinden ortama salınan EGFP miktarları ve ayrıca, hücre gövdelerinde yer alan EGFP miktarları florimetrik kantitasyon yöntemi ile ölçülmüştür. Florimetrik ölçümler 470 nm'de uyarım yaparak 510 nm'de ışımaya ölçümü yapmaktadır. Elde edilen ölçüm sonuçları, beta galaktozidaz sonuçlarına normalize edildi.

Rekombinant EGFP vektörü içeren hücrelerde bulunan EGFP proteininin floresan ölçümlerinin yapılması amacıyla canlı hücre sayısına göre ölçülen floresan miktarları uygun standart eğri çizilerek ölçüm aralığı saptanmıştır. Bu amaçla 96 kuyulu kültür kabı formatında hazırlanan hücrelere. EGFP plazmid transfekte edilerek sağlıklı ölçüm aralığı hesaplanmıştır. Bu çalışmada bir standart eğri çizilerek EGFP floresan ışımaya değerlerinin güvenilir doğrusal ölçüm aralığı saptanmaya çalışılmıştır. En az 750 ve en fazla 57000 (~60000) EGFP (+) hücre ölçülerek standardizasyon yapılmıştır.

3.2.18. S/MAR Dizileri İçeren Vektör Yapılarının Hücre İçinde Vektör Kalıcılığı ve Vektörün İfadesine Etkisinin Karşılaştırılması

Hücre Kültürü Örneklerinden DNA İzolasyonu ve Kantitatif Çalışma

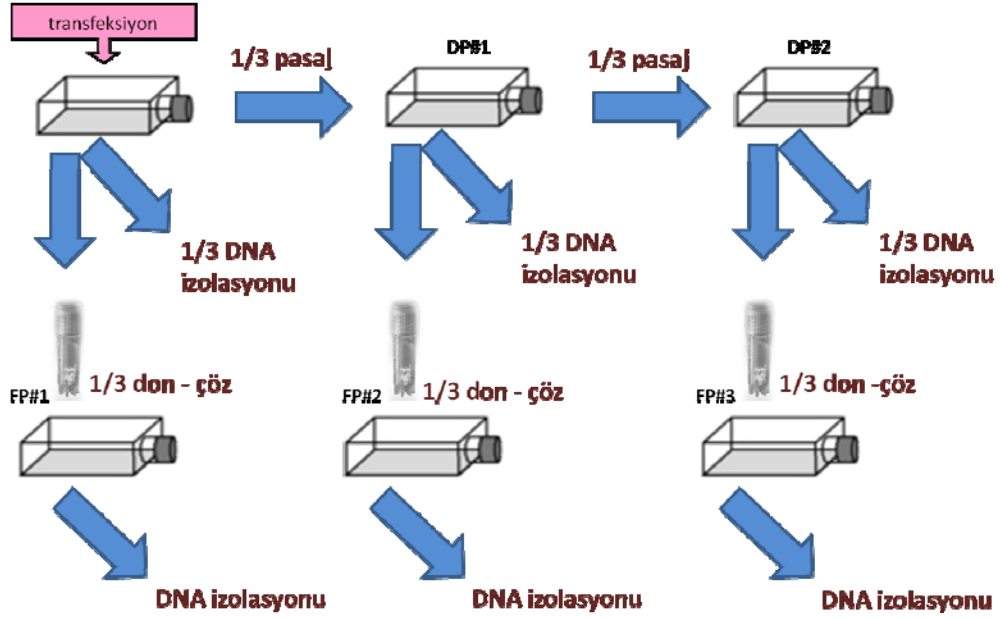
Bu çalışmada S/MAR dizileri içeren plazmit yapılarının, vektörün kalıcılığına ve taşıdığı rekombinant gen ifadesine olası etkisi incelendi. Bu amaç için 3T3-L1 hücreleri hazırlanan 6 farklı S/MAR dizisini içeren pcDNA3.1+ EGFP plazmit vektörü ile transfekte edildi. Hücreler 25 cm²lik kültür kaplarına dağıtıldı. Hücrelerin EGFP ifadeleri floresan mikroskop ile takip edildi ve görüntülendi. Deney planı Şekil 3.2.12.'de gösterilmiştir.

Bölünmekte olan 3T3-L1 hücreleri % 80-% 90 yoğunluğuna ulaştıklarında, tripsin yardımı ile kaldırılarak üç kısma ayrıldı. İlk 1/3 kısmı pasajlanarak bölünme sürdürüldü. İkinci 1/3 bölümü dondurularak -80°C'de saklandı. Son 1/3 kısmı ise DNA izolasyonu için toplanarak pellet olarak -80°C'de saklandı. Bu işlem, hücrelerin 6. pasajına kadar sürdürüldü ve bu deney grubu “bölünmekte olan 3T3-L1 pasajları” olarak adlandırılmaktadır. Dondurulan hücreler ise, 3-4 gün sonra yeniden çözülerek, tekrar çoğalma ortamına bırakıldı. Bu hücreler kültür kabının %80-%90'ını doldurduğunda, tripsin yardımı ile tekrar kaldırıldı ve DNA izole etmek üzere pellet olarak -20°C de saklandı. Bu işlem 6. pasaja kadar sürdürüldü ve bu deney grubu “dondurularak yeniden çözülen 3T3-L1 pasajları” olarak adlandırıldı. Negatif kontrol olarak S/MAR dizisi içermeyen RBP4+RGFP+pcDNA3.1 vektör yapısı ile transfekte edilen 3T3-L1 hücreleri yukarıda açıklandığı şekilde muamele edildi. Dondurulmuş pelletlerden, hücre sayısı ve plazmit sayısı kantitasyonu yapmak üzere DNA izolasyonu yapıldı.

DNA İzolasyonuna Yönelik Hücrelerinin Toplanması

Yukarıda anlatıldığı şekilde “bölünmekte olan 3T3-L1” ve “dondurularak yeniden çözülen 3T3-L1” hücreleri her pasajın sonunda toplandı. 25 cm²lik kültür kabında besi ortamları çekildi ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kaplayacak kadar tripsin eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin, eşit hacimli besiyeri ile inaktive edildi ve hücreler toplanarak 180 g'de 5 dakika santrifüj

edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler DNA izolasyonu işlemine kadar -20°C 'da saklandı.



Şekil 3.2.12. S/MAR dizilerin etkinliğini karşılaştırmak için uygulanan deney planının şeması.

3T3-L1 Hücrelerinden DNA İzolasyonu

Yukarıda açıklandığı şekilde toplanan ve -20°C 'da saklanmakta olan hücre pelleti üzerine $500\ \mu\text{l}$ çekirdek lizis tamponu eklendi ve süspansiyon haline getirildi. Üzerine $30\ \mu\text{l}$ SDS (% 10), $30\ \mu\text{l}$ proteaz K (10 mg/ml) eklenerek karıştırıldı ve 55°C 'de geceboyu çalkalanmaya bırakıldı. Ertesi gün, örneklerin üzerine $250\ \mu\text{l}$ amonyum asetat eklendi ve karıştırıldı. Örnekler, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildikten sonra 20 dk $4500\ \text{rpm}$ 'de santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. DNA içeren üst faz başka bir tüpe alındı ve üzerine 2 kat hacimde -20°C 'de saf etil alkol eklendi. Tüpler birkaç defa alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra -20°C 'de 1 saat boyunca DNA'nın çökmesi beklendi. $4500\ \text{rpm}$ 'de santrifüj edilen örneklerin üst fazı uzaklaştırıldı. Elde edilen DNA pelleti, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra üzerine $20\ \mu\text{l}$ dH₂O eklendi. DNA örneklerin konsantrasyonu *Nano-drop 1000* cihazı ile ölçüldü.

DNA Örneklerinden Kantitatif Analizi

S/MAR dizilerinin verimliliğini karşılaştırmak üzere, hücre başına düşen plazmit sayılarının kantitatif olarak hesaplanması gerekmektedir. Fare genomu için geçerli olan C-değeri (genom ağırlığı) uyarınca 20 ng genomik DNA 3000 hücreye karşılık gelmektedir (124) . Bununla birlikte tek kopya vektör plazmit yaklaşık 6.6×10^{-14} ng'dır. Bu deneyde, izole edilen tüm örneklerin DNA'ları 10 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı. Transfeksiyon uygulanmayan 3T3-L1 DNA'sı standart eğrisi hazırlamak üzere, 10 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı ve Tablo 3.2.12.'de gösterildiği gibi EGFP geni içeren pcDNA3.1 plazmidyle farklı miktarlarda karıştırıldı. Bu deneyde, hücre pasajlarından izole edilen DNA örneklerinde bulunan vektör kopya sayısı gerçek zamanlı PZR tekniği ile EGFP geni içinde yer alan bir kısım çoğaltılarak belirlendi. Hücre başına düşen plazmit kopya sayısı hesaplandı. Bu sonuçlara dayalı bir karşılaştırma ve değerlendirme yapıldı. Gerçek zamanlı PZR için SYTO9 nükleik asit boyası kullanıldı ve örnekler üçlü bağımsız tekrarlar şeklinde çalışıldı.

Tablo 3.2.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmasında standardizasyon amaçlı kullanılan vektör omurgası dilusyonları ve kopya sayıları.

Standartlar	Kopya Sayısı	Kullanılan Plazmit Miktarı
1	10^7	6.6×10^{-4} μg
2	10^6	6.6×10^{-5} μg
3	10^5	6.6×10^{-6} μg
4	10^4	6.6×10^{-7} μg
5	10^3	6.6×10^{-8} μg
6	10^2	6.6×10^{-9} μg

Bu çalışma, Bölünen pasajlar ve Dondurularak yeniden çözülen pasajlar olarak (hücreleri strese maruz bırakmak amacıyla) her iki grup için gerçekleştirildi. Alınan sonuçlar farklı açılardan değerlendirildi.

Bu çalışmalarda kullanılan SYTO®9 boyası konsantrasyonu (5 mM stok) 100 kat sulandırarak çalışma stoğu (50 µM) hazırlandı ve -20°C’de ışıktan uzak saklandı. Kullanılan EGFP primerlerinin dizileri Tablo 3.2.2.’de verilmiştir.

Standartlar ve örnekler için gerçek zamanlı PZR reaksiyon şartları:

GoTaq® DNA Polymeraz	0,1 µl
5x GoTaq®PZR Tamponu	2,0 µl
SYTO9 boyası (50 mM)	0,4 µl
Primer-F (10 µM)	0,3 µl
Primer-R (10 µM)	0,3 µl
MgSO ₄ (25 mM)	0,4 µl
dNTP (10 mM karışım)	0,3 µl
Kalıp DNA ^{1,2}	
1. Standartlar için EGFP içeren pcDNA3.1(+) plazmit dilusyonları kullanılmıştır.	1,0 µl
2. Örnekler için ise transfekte edilen hücrelerin DNAsı kullanılmıştır.	
dH ₂ O	5,2 µl
Toplam	10 µl

Tepkime koşulları:

94°C	02:00 dk	
94°C	00:10	} 45 döngü
60°C	00:10	
72°C	00:15	

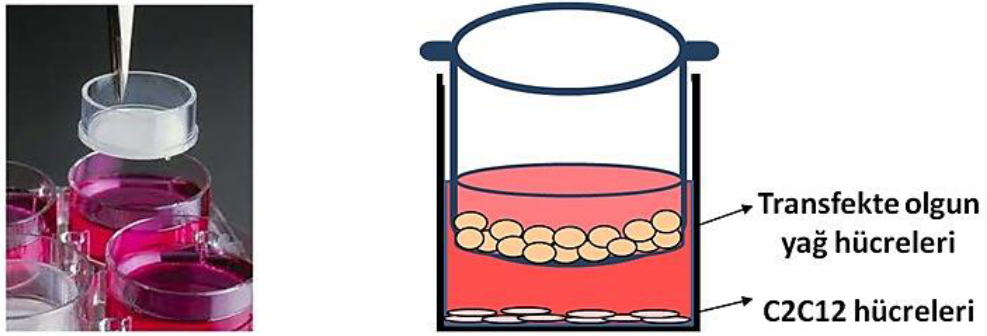
3.2.19. Ko-Kültür Çalışmaları

Miyostatin sinyal yolağı kas ve yağ farklılaşma programları üzerinde bağımsız ve zıt yönde etki etmektedir. MSTNdn aracılığı ile oluşturulan sinyal, kas farklılaşma programını pozitif yönde etkilerken, yağ hücrelerinin adipojenik farklılaşma sürecini ise inhibe etmektedir.

Bu tez çalışmasında, olgun 3T3-L1 yağ hücrelerinin protein salgı mekanizmasının kullanımı ile MSTNdn üretim ve salgısı amaçlanmıştır. Bu salgı

etkinliğinin işlevselliğinin gösterilebilmesi için, bu hücrelerle fiziksel temasa girmeden aynı ortamda bulunan diğer hücrelerin değişen farklılaşma kinetiğinin gözlenmesi planlanmıştır. Aşağıda sıralanan deneysel yaklaşımlar, MSTNdn sinyalinin birbirinden bağımsız iki deneyle yağ ve kas farklılaşma programları üzerindeki etkisini göstermek üzere planlanmıştır

Ko-kültür çalışmaları için hücre kültüründe *millipore* markasına ait 0,4 μm çapında gözenekleri olan süzgeçler (*insert*) kullanıldı (Şekil 3.2.13.). Bu çalışma için ilk olarak 3T3-L1 hücreleri, %90 yoğunluğa kadar çoğaltıldı ve *APOB* ve *IFNB314x2 S/MAR* dizilerini içeren *RBP4+MSTNdn+pcDNA3.1* vektör yapıları ile transfekte edildi. Bu çalışma, biyolojik olarak üçlü bağımsız tekrarlar şeklinde uygulandı (her plazmit için 3 farklı süzgeç hazırlandı).



Şekil 3.2.13. Ko-kültür çalışmalarında kullanılan süzgeçler. Süzgeçlerin alt kısmı, polikarbonat membran filtreden oluşmaktadır. Süzgeç içine yerleştirilen hücreler tutunarak çoğalabilmektedir. Süzgecin yerleştirildiği hücre kültürü kabı içinde yer alan hücreler ile hiçbir fiziksel etkileşime girmeden aynı ortamı paylaşmaktadır. Bu deney yaklaşımında, transfekte edilen olgun yağ hücreleri süzgeçler içine yerleştirildi. C2C12 hücreleri ise hücre kültürü petri kuyucuklarına eklendi.

MSTNdn Salgılayan Olgun 3T3-L1 Hücrelerinin Ko-Kültür Ortamında C2C12 Hücrelerinin Miyojenik Farklılaşması Üzerine Etkisi

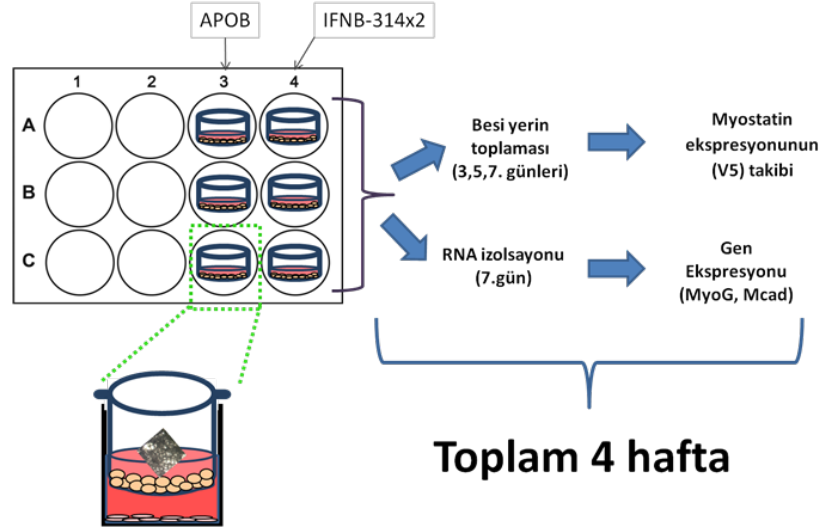
İlgili plazmidler ile transfekte edilen 3T3-L1 hücreleri, PLGA (50:50) polimerlerinin içerisinde hapsedilip süzgeçlerin içerisine yerleştirildi ve 6 gün adipojenik farklılaşma ortamına maruz bırakıldı. Her bir süzgeç için yaklaşık 5×10^5 hücre eklendiğinden ve deneyin 1 ay sürdürülmesi planladığından dolayı, transfekte edilen hücreler PLGA polimerlerine eklendikten sonra süzgeçlere yerleştirildi. Bu süre içerisinde C2C12 hücreleri, çoğaltıldı ve %50 yoğunluğa geldiğinde hücreler tripsin yardımı ile kaldırılarak hücre sayımı yapıldı. Deneyin devamında 6-kuyulu kültür kabının her kuyusuna yaklaşık 6500 C2C12 hücresi kondu (farklılaşma ve gözlem için en uygun hücre yoğunluğu 6500 hücre ile sağlanmıştır). 24 saat sonra, MSTNdn ifade eden vektör ile transfekte edilmiş ve farklılaşmış 3T3-L1 hücreleri içeren süzgeçler, C2C12 hücrelerini içeren kuyulara yerleştirildi. Ko-kültür deneyi, miyojenik farklılaşma ortamında başlatıldı (Şekil 3.2.14.). Miyojenik farklılaşma ortamı % 2 at serumu içermektedir. At serumu, 3T3-L1 hücrelerin adipojenik farklılaşması için uygun olmamakla beraber, hali hazırda farklılaşmış olan hücrelerin idamesi için herhangi bir sorun teşkil etmemektedir. Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinin canlılıklarını ve olgun adiposit fenotipinde işlevlerini idame ettirmeleri için uygundur (125) . Kontrol grubunda yer alan C2C12 hücreleri ise, transfeksiyon uygulanmayan 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültür edildi.

MSTNdn Salgılayan Olgun 3T3-L1 Hücrelerinin Ko-Kültür Ortamında 3T3-L1 Hücrelerinin Adipojenik Farklılaşması Üzerine Etkisi

Dominant negatif etkili MSTN proteinin adipojenik farklılaşma süreci üzerindeki olası etkisini göstermek amacıyla MSTNdn içeren vektör ile transfekte edilen ve farklılaştırılan 3T3-L1 hücreleri, gen transferi uygulanmayan 3T3-L1 hücreleri ile yukarıda anlatıldığı şekilde ko-kültür ortamında farklılaşmaya bırakıldı.

Ko-kültüre besi ortamları, iki günde bir (3. 5. ve 7. günlerde) protein izole edilmek üzere toplandı ve yeni besi ortamı eklendi. Deneyin 7. gününde ko-kültüre edilmiş C2C12 hücreleri trizol yardımı ile RNA izole edilmek üzere toplandı. Transfekte edilmiş ve farklılaşmış 3T3-L1 hücreleri içeren süzgeçler ise yukarıda

anlatıldığı gibi C2C12 hücresi içeren yeni bir 6-kuyulu petri kabına alındı ve aynı süreç tekrar edildi. Bu çalışma anlatıldığı şekilde 4 hafta boyunca 4 tekrarlar gerçekleştirildi.



Şekil 3.2.14. Ko-kültür çalışmalarının özet şeması.

RNA İzolasyonu için C2C12 Hücrelerinin Toplanması

Ko-kültüre edilmiş 12 kuyulu hücre kültürü kaplarında bulunan C2C12 hücrelerin deneyin her 7. gününde petri kabındaki ortamları çekildi ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kaplayacak kadar tripsin eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin, eşit hacimli besiyeri ile inaktive edildi ve hücreler toplanarak 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C'de saklandı.

3.2.20. RNA İzolasyonu

Ko-kültür deneylerinde toplanan ve -80°C'de saklanan örneklerin RNA izolasyonu aşağıda anlatılan süreç takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tüm malzemeler % 0,1 DEPC ile muamele edilmiş sudan geçirilerek RNaz kontaminasyonunun önlenmesi sağlanmıştır. Bu önlemin dışında, mümkün olan tüm aşamalarda RNA izolasyonu malzeme ve yüzeyleri (spor, pipet, elektroforez kabı v.b.) *RNase Zap* solüsyonu ile temizlenmiştir.

-80°C'den çıkarılan örnekler eriyene kadar buz üzerinde bekletildi. Üzerine 200 µl kloroform eklendi ve karıştırıldıktan sonra +4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra, üst faz steril 1.5ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 750 µl, %100'lük etanol eklenip karıştırıldı ve -20°C'de 30 dk bekletildi. Bu süreç sonrası, örnekler +4°C'de 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pellet üzerine 750 µl, %75'lik etanol eklendi ve tekrar +4°C'de 7500 g'de 5dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Kalan etanolün uçması için, pellet, 60°C'de 5 dk bekletildi ve üzerine önceden DEPC ile muamele edilmiş steril su eklenerek RNA'nın çözülmesi sağlandı. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

RNA Konsantrasyon Ölçümü

İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı, NanoDrop ND1000 spektrometre ile 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında ölçülerek standart yöntemle hesaplandı.

3.2.21. cDNA Sentezi

Bu aşamalarda kullanılan malzemeler *RNase Zap* ve % 0,1 DEPC ile ribonükleazlardan arındırıldı. cDNA sentezi için *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) kullanıldı.

1 µg RNA ve 1 µl Oligo (dT)15 primeri (0,5 µg), RNaz içermeyen distile su ile 11,5 µl hacme tamamlanarak Karışım A hazırlandı. 70°C'da 6 dakika boyunca denatüre edildi. Ardından hızla buz üzerine alınıp en az 5 dakika bekletildi.

Karışım B:	5x Improm-II Tamponu	4µl
	Improm-II Ters Transkriptaz	1µl
	dNTP karışımı (her birinden 10mM)	1µl
	MgCl ₂ , 25mM	2,5µl
	<hr/> Toplam	<hr/> 8,5µl

Karışım A ve karışım B karıştırılarak (toplam 20µl) *Gene Amplification PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) cihazında 25°C'da 6 dakika, 42°C'da 60 dakika, 70°C'da 15 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA üzerine nükleaz içermeyen 60µl distile su eklenerek -20°C'da saklandı.

Primer Tasarımı

Kantitatif (gerçek zamanlı) ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonunda (kRT-PZR) kullanılacak primerler, *Beacon Designer* yazılımı (Primer Biosoft) kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerlerin fare ve sıçan transkriptleri için uygun olmalarına, sekonder yapı oluşturmamalarına, birbirleri ile komplementer olmamalarına, yalnızca kantite edilmek istenen mRNA'ya özgül olmalarına dikkat edildi (Tablo 3.2.13.). Normalizasyon için *housekeeping* gen ifadesi kullanıldı. Bunun için, β -aktin geni seçildi (126) .

Tablo 3.2.13. Çalışmada kullanılan kRT-PZR primer dizileri.

Gen	Primer dizileri	Tm (°C)
β -aktin	F-5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'	59
	R-5'-GATGCCACAGGATCCATAACCC-3'	58
mDES	F-5'-ACCTTCTCTGCTCTCAACTTCC-3'	62
	R-5'-CTCGCTGACAACCTCTCCAT-3'	60
MNCAM	F-5' - CAAAGTGCCACAATCTCCTG - 3'	60
	R-5'-ACTCCTGTCCAATACGGTTCA-3'	59
mMyoD	F-5' -CCTTCTACGCACCTGGAC -3'	58
	R-5'-TGTAATCCATCATGCCATCAGA-3'	58
mMhY3	F-5' -GGACAGGAAGAATGTGTTGAG -3'	59
	R-5'-CTTGTTTCATCAGCCTCCTC-3'	57
mMCad	F-5' -CATCTCCCTCGTAGTCATAG -3'	58
	R-5'-GACATTGCCAACTTCATCAG-3'	56
mMyoG	F-5' -CCAACCCAGGAGATCATTG -3'	58
	R-5'-GGGAAGGCAACAGACATATC-3'	58
MKI67	F-5' -TCTGATGTTAGGTGTTTGAGG -3'	57
	R-5'-ATGTCTTCATCCTCCTTCAG-3'	57
PPAR γ	F-5'-CAGTGGGGATGTCTCATAATGCC -3'	62,4
	R-5'-CCTCGCCTTTGCTTTGGTCAG-3'	61,8
Adiponektin	F-5'-CATCTCCTCCTCACTTCCATTCTG -3'	62,7
	R-5'-TGCCCGCCATCCAACCTG-3'	60,5
GDP1	F-5'-ATTTGAGGAAGACATTGGAG -3'	49,9
	R-5'-CTTGATGAACTGATG-3'	51

3.2.22. Kantitatif Gerçek Zamanlı Ters Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı (Real-Time) PZR, cDNA ya dönüştürülen RNA molekülünün enzimatik tepkime ile in-vitro çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde kantitasyon, reaksiyon sırasında oluşan ürüne bağlanan boya ile birlikte artan floresan ışımının ölçülmesi ile yapılır (127) .

Deneyleerde SYTO®9 floresan boya kullanıldı. Boya, her bir reaksiyon döngüsünde meydana gelen çift iplikli DNA ürününün küçük oluşuna bağlanarak ışımaya vermektedir. Reaksiyon sırasında meydana gelen ürünün artışına doğru orantılı olarak, DNA- boya kompleksi meydana gelir ve orantılı olarak floresan ışımaya artar.

SYTO9 boyası (50mM)	0,4 µl
GoTaq® DNA Polymerase	0,1 µl
5x GoTaq®PZR Tamponu	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8 µl
F-Primer (10µM)	0,3 µl
R-Primer (10µM)	0,3 µl
dNTP (10mM karışım)	0,3 µl
cDNA	1,5µl
dH ₂ O	4,3 µl
Toplam:	10,0µl

Her örnek için üç tekrarlı hazırlanan karışım ile kRT-PZR reaksiyonu *Corbett Life Sciences Rotor-gene 6000* cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

Denatürasyon:	94°C	02:00 dk	} 45 döngü
Amplifikasyon:	94°C	00:02 dk	
	60°C	00:15 dk	
Erime:	50°C'dan 99°C'a, her dakika 1°C artarak		

Her amplifikasyon döngüsünün sonunda ve her erime basamağında cihazın SYTO®9 boyasına uygun yeşil kanalında 470nm'lik ışık kaynağı ve 510nm'lik detektör ile ölçüm yapıldı.

Verilerin analizi için, *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* yazılımı kullanıldı. Erime eğrileri çizilerek amplifikasyon özgülüğü doğrulandı. Standart dilüsyonlar yardımıyla standart eğri çizildi. Standart eğriler kullanılarak göreceli kantitasyon hesabı, $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile yapıldı. Göreceli EGFP ifadesi, β -aktin ifadesine göre normalize edilerek incelendi. Amplifikasyon reaksiyonu ürünlerinin özgülüğü, % 2,5'luk agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.2.23. Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

Protein İzolasyonu İçin Hücrelerin Toplanması

Protein kantitasyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere 3T3-L1 hücreleri RBP4 öncü dizisi ve MSTNdn rekombinant geni içeren pcDNA3.1(+) omurgası ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde petri kabındaki hücrelerin besi ortamları çekildi ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kaplayacak kadar tripsin eklenerek 37°C'da 5 dakika inkübe edildi. Tripsin, eşit hacimli besi ortamı ile inaktive edildi ve hücreler toplanarak 180g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler protein izolasyonu işlemine kadar -20°C'da saklandı.

Hücre Lizatından Protein İzolasyonu

-20°C'dan alınan hücrelerin üzerine 50 μ l protein izolasyon tamponu eklendi. Protein izolasyon tamponu içindeki hücre örnekleri, 130W gücündeki sonikatörde 20 kHz frekans ve %50 genlikte her döngü arasında 20sn ara verilmek üzere 8'er kez 20sn boyunca sonike edildi. Sonikasyonu tamamlanan örnekler +4°C'da maksimum hızda 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Protein içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve -20°C'da saklandı.

Hücre Kültürü Örneklerinin Besi Ortamından Protein İzolasyonu

Ko-kültüre edilmiş hücrelerin besi ortamları 7 günlük deney süresince 15'lik falkon tüpüne toplandı. Toplanan besi ortamlarından protein izolasyonu amacıyla *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units* kiti kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda toplanan besi ortamları santrifüj edilerek filtreden geçirildi ve elde edilen protein örnekleri yeni bir tüpe aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

Protein Konsantrasyonu Ölçümü

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225) kullanıldı.

- %1 SDS kullanılarak kör çözelti oluşturuldu. 2 mg/ml derişimindeki albumin standartları %1 SDS ile seri seyreltilerek 50'şer µl hacminde standart çözeltiler hazırlandı. İzole edilmiş protein örneklerinden 2,5 µl alınarak %1 SDS ile 20 kat seyreltildi (toplam 50µl).

- 50ml *Reagent A* ve 1ml *Reagent B* karıştırılarak BCA indikatör çözeltisi hazırlandı ve örnekler üzerine 1ml BCA indikatör çözeltisi eklendi.

- Karışımlar birkaç saniye vortekslendikten sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında *NanoDrop ND1000* spektrofotometrede standart çözeltilerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kullanılarak ND-1000 v3.5.2 yazılımı yardımıyla standart eğri çizildi. Örnek çözeltilerinin absorbansları üçer kez ölçülerek standart eğri üzerinden konsantrasyonları hesaplandı.

- Bulunan konsantrasyon değerleri, dilüsyon faktörü olan 20 değeriyle çarpılarak stok protein çözeltilerinin konsantrasyonları elde edildi.

3.2.24. Western Blot

- *Mini-Protein II* sistemi kullanılarak altta %12'lik ayırıcı jel, üstte %5'lik toplayıcı jel olacak şekilde SDS-poliakrilamid mini jel döküldü.

- Jelin soğuyup polimerleşmesinin ardından elektroforez tankına yerleştirildi, üstünü kaplayacak kadar elektroforez tamponu eklenerek kuyular ve çevresi tampon yardımıyla temizlendi. 80 V'ta 15 dakika boyunca örnekler yüklenmeden jelden akım geçirildi (*pre-run*).

- Örnekler 2,4 µl indirgeyici ajan (10x) ve 6 µl örnek tamponu (4x) ile birlikte toplam 24 µl hacimde olacak şekilde hazırlandı. Her kuyuya ko-kültür besi ortamından izole edilmiş proteinlerden ve MSTNdn ve RBP4 öncü dizisi içeren vektör transfekte pozitif kontrol 3T3-L1 hücrelerinden 100 µg protein alındı. İndirgeyici ajan ve örnek tamponu ile karıştırılan örnekler kaynar su içinde 5 dakika bekletildikten sonra jele yüklendi.

- Örneklerin ve protein ağırlık belirleyicisinin jele yüklenmesinin ardından örnekler önce 80 V'ta 30 dakika boyunca yürütüldü; sonrasında protein ağırlık belirleyicisi takip edilerek 110 V'ta 100-120 dakika boyunca elektroforeze devam edildi.

- Mini jele uygun 9x6 cm boyutlarında 4 adet Whatman kağıdı ve 1 adet nitrosellüloz membran, kağıtların ve membranın yüzeylerine dokunmamaya özen göstererek kesildi.

- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı ve toplayıcı jel kesilerek atıldı. Jelin kalanı (ayırıcı jel), membran ve Whatman kağıtları 20 dakika boyunca taze hazırlanmış yarı kuru transfer tamponu içerisinde bekletildi.

- Yarı kuru blotlama cihazının plaka elektrodları gazlı bez yardımıyla önce distile su ile silindi ve elektrodlar üzerinde kalmış lekeler olabildiğince uzaklaştırıldı. Sonrasında elektrodlar transfer tamponu ile silindi.

- Plakalar kurumadan alttaki plakanın üzerine sırasıyla 2 adet Whatman kağıdı, membran, jel ve tekrar 2 Whatman kağıdı yerleştirildi. Membranın katoda, jelin anoda yakın olmasına dikkat edildi. Her bir tabaka yerleştirildikten sonra üzerinden cam baget ile geçilerek tabakalar arasında baloncuk ve fazla tampon kalmaması sağlandı.

- Blotlama cihazının üst plakası sıkıca kapatıldıktan sonra güç kaynağı 300mA akım şiddetine sabitlenerek 20 V'luk potansiyel fark geçilmemek kaydıyla 45 dakika boyunca transfer yapıldı.

- Transfer sonrasında membran *Ponceau S*, jel *Coomassie Blue* çözeltisi içine bırakılarak proteinler boyandı ve transfer etkinliği değerlendirildi.

- *Ponceau S* çözeltisi TBS(T) ile uzaklaştırıldıktan sonra membran TBS(T) içinde hazırlanmış %10'luk süt tozu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak bloklandı.

- TBS(T) içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile V5 epitopu antikoru 1:1000 oranında seyreltildi. Bloklama tamamlandıktan sonra membran bu karışım içerisinde +4°C'da 16 saat boyunca çalkalandı.

- Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran oda sıcaklığında 3 kez 10 dakika boyunca TBS(T) ile çalkalanarak yıkandı.

- TBS(T) içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile *anti-mouse* sekonder antikor, 1:3000 oranında seyreltildi. Yıkamalar tamamlandıktan sonra membran bu karışım içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalandı.

- Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından membran oda sıcaklığında 3 kez 10 dakika boyunca TBS(T) ile çalkalanarak yıkandı.

- Görüntüleme kitinin içindeki luminol ve peroksit solüsyonları eşit hacimde karıştırıldı ve membranın üzerini kaplayacak şekilde membran üzerine yayıldı. 4 dakika beklendikten sonra membran ışık geçirmeyen kaset içine alındı. Üzerine temiz asetat kağıdı ve üzerine film kapatılarak istenilen süre boyunca pozlandı. Pozlama süresinin bitiminde film developer karışımında çalkalandı, yıkandı, fikser karışımında çalkalandı ve yeniden yıkandı. Görüntüleme ile ilgili tüm işlemler karanlık odada yapıldı.

- V5 epitop proteininin görüntülenmesinin ardından membran TBS(T) içinde 5 dakika çalkalanarak görüntüleme solüsyonları uzaklaştırıldı. Ardından, 65 °C'da 30 dakika boyunca *stripping* çözeltisi içinde çalkalandı.

- *Stripping* tamamlanınca membran 3 kez TBS(T) ile hızlıca yıkandı ve sonrasında 10'ar dakika boyunca 3 kez TBS(T) içinde hafifçe çalkalandı ve saklamak üzere -20°C dolabına kaldırıldı.

3.2.25. İstatistiksel Yöntemler

Hücre örneklerindeki göreceli myojenik farklılaşma belirteçlerin mRNA düzeylerinin karşılaştırılmasında varyansları eşit olmayan grupların ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığını sınanan ANOVA testi kullanıldı (128) . Hesaplamalar için Microsoft Excel yazılımının 2003 sürümü kullanıldı.

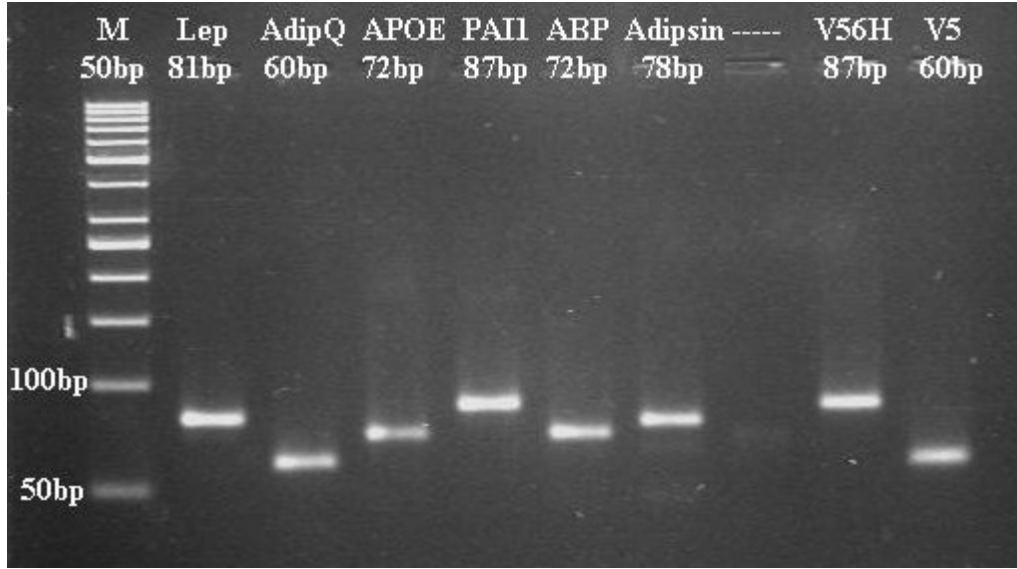
4. Bulgular

4.1. PZR Aracılıklı Mutagenез Yöntemi ile Aday Öncü Sinyallerini İçeren EGFP Genlerinin Hazırlanması ve Klonlanması

Yağ hücrelerine ait protein salgı yolağının yeniden programlanarak rekombinant protein üretim ve salgısının sağlanması amacıyla yedi farklı adipokine ait “öncü dizi”lerin EGFP geninin 5’ ucuna eklenmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşımın amacı, seçilen adipokinlerin takip ettiği salgı yolağını EGFP aracılığı ile kullanarak kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler elde etmektir. Bu yaklaşımla hazırlanan DNA yapılarına, sentetik öncü sinyal dizilerini takip eden ve 3’ pozisyonda yerleşimli V5 epitop dizisi yerleştirmek üzere yeni bir yaklaşım da tasarlanmıştır. Bu oligopeptid dizisi, paramyxovirüsün V5 kapsül proteinine ait bir kısım olan 14 amino asit uzunluğundaki özgül bir epitoptur (amino asit dizisi - GKPIP NPLLGLDST). Bu yaklaşımın amacı, rekombinant proteininin özgül bir monoklonal antikor yardımı ile tanınabilmesi ve takip edilmesidir. Aynı yaklaşımla, V5 dizisinin 3’ kısmına 6 adet histidin amino asidi ardışık olarak yerleştirilmiştir. Bu sayede, gereği halinde bir metal afinite kolonu aracılığı ile rekombinant proteinin saflaştırılabilmesi de mümkündür.

Bu amaçla ilk olarak PZR aracılıklı mutagenез yaklaşımı kullanılarak öncü sinyal dizileri hazırlandı. Aşağıda, Şekil 4.1.’te elde edilen öncü sinyal dizileri ve ardışık V5 epitoplarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir.

Şekil 4.1.’de agaroz jel elektroforez görüntüsü verilen ampikonlar ilk olarak *pGEM-T Easy* vektörüne klonlanarak kompetan *E. coli* bakterilerine transforme edilmiştir. Bu klonlama çalışmasının temel amacı dizilerin kalite kontrolünün yapılmasıdır. İlk olarak plazmid içerisinde hedef dizinin varlığı dizinin uçlarında bulunan *NheI*, *KpnI*, ve *EcoRI* enzim kesimleri ile doğrulandı. Daha sonra, hazırlanan dizilerin her biri her iki yönden de DNA dizi analizi ile incelenerek, PZR sürecinde ortaya çıkabilecek her türlü mutasyon veya baz değişiminin bulunmadığı doğrulanmıştır. Örnek olarak Şekil 4.2.’te adiponektin ve leptin öncü dizilerine ait DNA dizi analiz sonuçları verilmiştir.



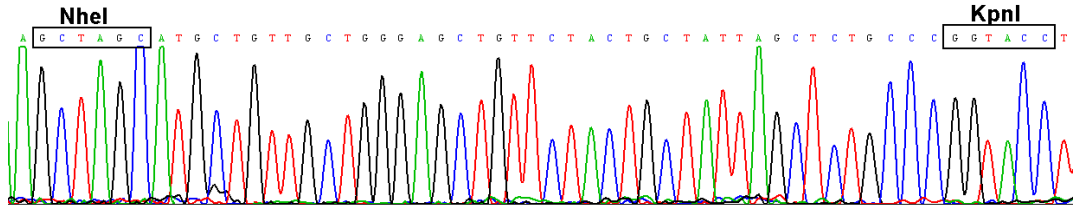
Şekil 4.1. PZR aracılıklı mutagenез ile elde edilen öncü dizilerine ve V5 epitopuna ait DNA fragmanlarının elektroforez görüntüsü.

Gen **nükleotid dizisi**

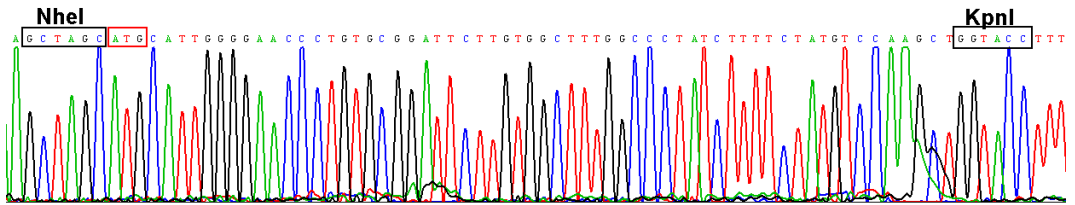
Adiponektin atgctgttgctgggagctgttctactgctattagctctgcc

Leptin atgcattggggaaccctgtgCGgattcttggcctttggccctatcttttctatgtccaagct

Adiponektin:

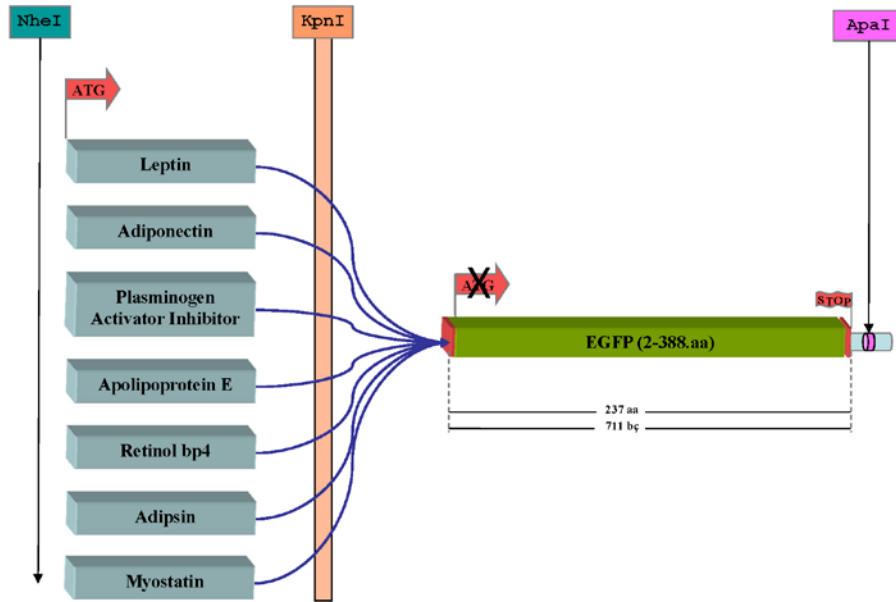


Leptin:



Şekil 4.2. Hazırlanan amplikonların *pGEM-T Easy* vektörüne klonlama sonrasında DNA dizi analiz yöntemiyle doğrulanması.

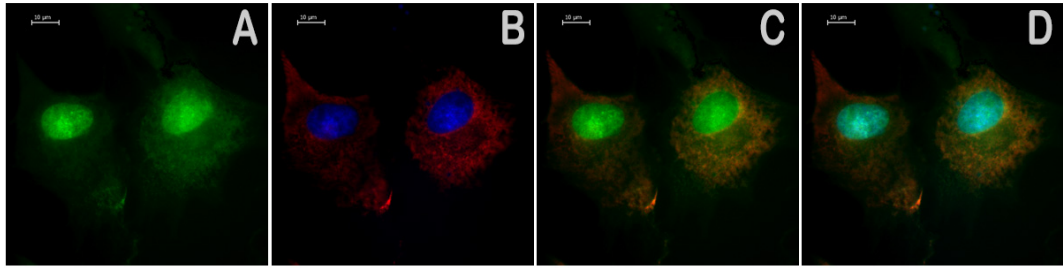
pGEM-T Easy klonlama vektöründen çıkarılan öncü sinyaller, pCDNA3.1(+) omurgası içinde yer alan EGFP geninin N-terminaline yerleşecek şekilde aktarıldı. Kompetan bakterilere transforme edildi. Ampisilin ile seçilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmasının ardından plazmid içinde doğru hedef dizinin varlığı, *NheI*, *KpnI*, *EcoRI* enzimi kesimi ve DNA dizi analizi ile tekrar kontrol edildi. Şekil 4.3.'te uygulanan yaklaşım ve hazırlanan sentetik gen yapıları gösterilmiştir. pCDNA3.1 vektörüne klonlanan EGFP proteininin başlangıç kodonunun çıkartılmasının amacı kaçak ekspresyonu önlemektir.



Şekil 4.3. Yağ hücrelerine ait salgısal öncü dizilerin etkinliğinin ölçülebilmesi için oluşturulan sentetik gen yaklaşımının şeması. Yedi farklı öncü dizi için bu yapı ayrı ayrı hazırlanmıştır. EGFP 237 amino asit (aa) uzunluğundadır. *NheI*, *KpnI* ve *ApaI* ise hazırlanan yapay gen dizisine yerleştirilen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgelerini ifade eder.

4.2. Adiposit Öncülü Hücrelerde Salgısal Protein Yolaklarının Kinetik Değerlendirilmesi

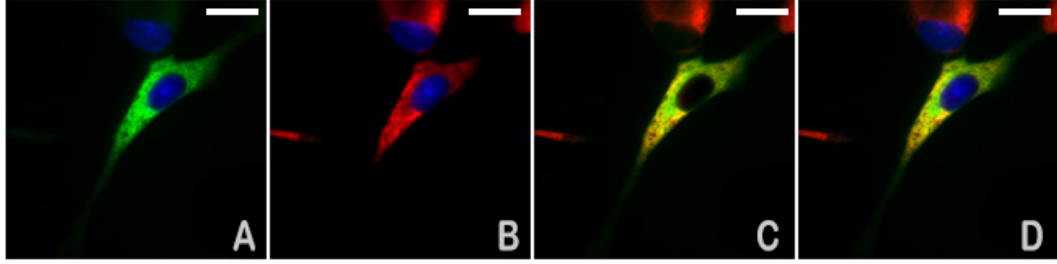
Klonlama çalışmaları ile hazırlanan yedi ekspresyon vektörü adiposit öncülü hücelere transfekte edilerek zamana karşı EGFP proteininin hücre içi lokalizasyonu gözlenmiştir. Bu amaçla, 12, 24 ve 48. saatlerde transfekte hüceler tespit edilerek golgi ve ER'a özgül antikorlar ile immün boyama yapılmıştır. Bu deneyler öncü sinyallerinin yağ öncülü hücelerinde izlemedikleri yolu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Öncü sinyali ilavesi yapılmış EGFP'nin hücre içi dağılım morfolojisi öncü sinyali içermeyen EGFP'den çok çok daha farklı bir lokalizasyon ve hücre içi trafiği sergilemektedir. Öncü sinyali içermeyen protein sitoplazmanın tamamında yaygın bir şekilde gözlemlenebilmekte ve EGFP sinyali özellikle çekirdekte daha yüksek lokalizasyon sergilemektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Öncü sinyali içermeyen GFP molekülünün adiposit öncülü hücelerde lokalizasyon bulguları. A) EGFP sinyalinin hücre sitoplazması ve özellikle çekirdekte toplandığı izlenmektedir. B) kırmızı renkte ER ve mavi renkte hücre çekirdeği gözlenmektedir. C) ER'ye ait kırmızı renk boyama ile EGFP'nin yeşil görüntüsü çakıştırılmıştır. D) çekirdek, EGFP ve ER görüntüleri bir arada sunulmuştur (GFP-yeşil, ER-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 10 μ m).

Diğer yönden, öncü sinyali klonlanmış EGFP sinyalinin ise klasik öncü yolağı trafiğini izlemesi beklenmektedir. Klasik protein taşınma yolağı hücre çekirdeği dışında başlayan protein sentezinin birinci aşamada ERa oradan da golgi organeline taşınması ile gerçekleşir. Daha sonra ise hücre içi veziküller yardımı ile aynı proteinin hücre dışına taşınmasını gerektirir. Aşağıda verilen floresan

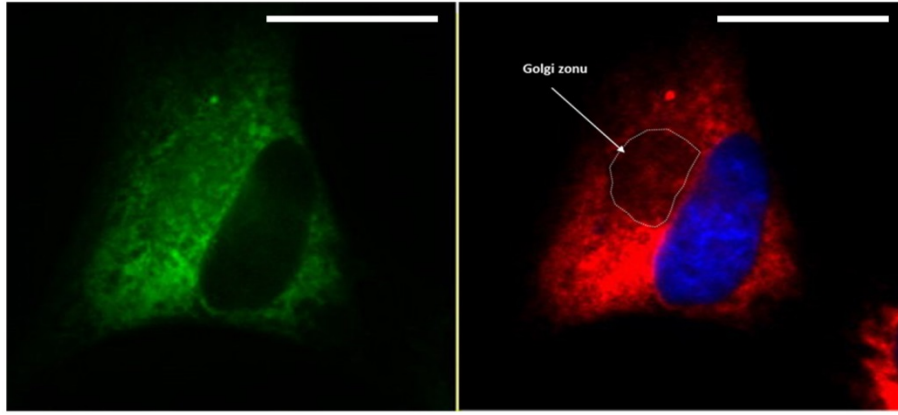
mikroskopi görüntüleri zamana karşı rekombinant EGFP'nin klasik protein taşıma yolağını takip ederek hücre dışına taşındığını kanıtlamaktadır. Bu görüntüden de anlaşılacağı gibi, EGFP hücre içinde özgül olarak sitoplazmada ve daha çok da hücre çekirdeğinde yerleşim gösterme eğilimindedir.



Şekil 4.5. Öncü dizisi içeren EGFP sinyalinin transfeksiyonun 18. saatinde yerleşimi. PAI öncü dizisi içeren EGFP sinyalinin (A) ve ER kompartmanı (B) transfeksiyonun 18. saatinde hücre içinde yerleşimi gösterilmiştir. ER kompartmanı ve EGFP molekülünün görüntülerinin çakıştırıldığı resimlerde (C ve D) birliktelik kendini sarı renk ile ifade etmektedir (GFP-yeşil, ER-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 10 µm).

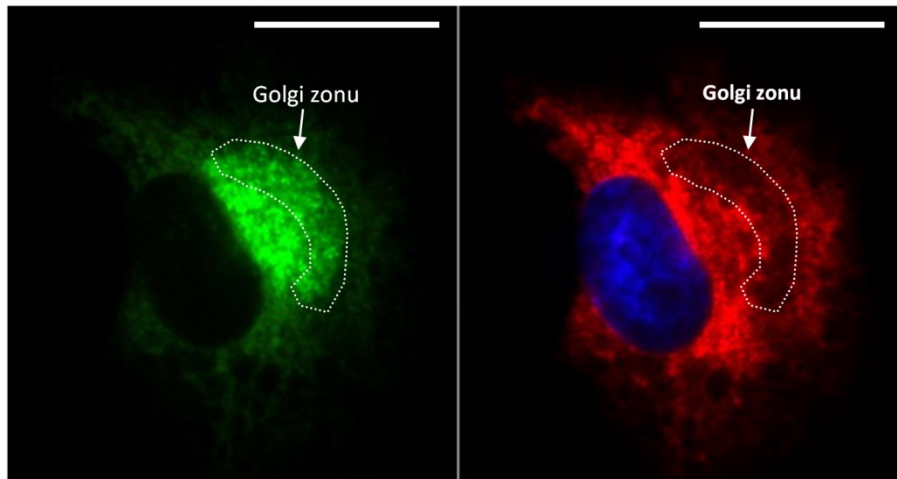
Öncü sinyali ilavesi ile yağ öncülü hücrelerde zamana karşı EGFP molekülünün dağılım morfolojisi büyük değişiklik sergilemektedir (Şekil 4.5.). İlk 12-24 saat içinde sinyal, öncelikle ER'da lokalizedir. Daha sonraki saatlerde ise EGFP sinyalinin golgi bölgesine lokalize olduğu saptanabilmektedir. Çekirdek ve içeriği EGFP sinyali içermemektedir. EGFP sitoplazmaya yayılmamakta, sadece membran içi kompartmanda kalmaktadır. Şekil 4.5.'te yer alan görüntülerde ER görüntüleri ile EGFP'ye ait özgül yeşil rengin bir arada bulunmadığı ve dolayısı ile EGFP sitoplazmada dağınık şekilde bulunmadığı gösterilmiştir.

Aşağıda yer alan Şekil 4.6.'da daha büyük büyütmede transfeksiyonun 18. saatinde, PAI öncü sinyali içeren yeni sentezlenmekte olan GFP molekülünün adiposit öncülü hücrede öngörülen golgi bölgesine değil, ER'ye lokalize olduğu anlaşılmaktadır. Aynı görüntüde hücre çekirdeği ve periferi EGFP sinyali içermemektedir.



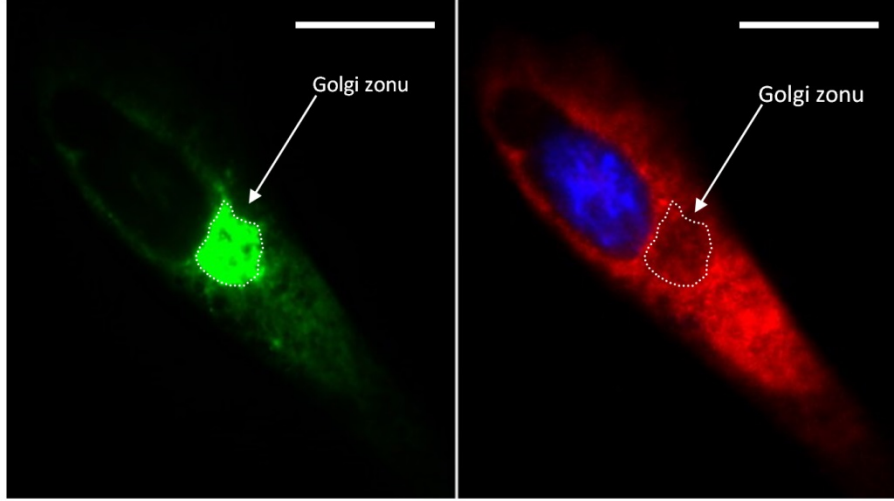
Şekil 4.6. Transfeksiyonun 18. saatinde, PAI öncü sinyali içeren EGFP molekülünün yerleşimi. Sentezlenen EGFP, ER'ye lokalize olmakta ve henüz öngörülen golgi bölgesine geçememektedir (GFP-yeşil, ER-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 8 μ m).

Transfeksiyonun 24. saatinde EGFP, ER'dan golgiye geçiş göstermektedir. Aşağıda Şekil 4.7.'de PAI öncü dizisi içeren EGFP molekülünün 24. saatte ER'dan golgiye doğru lokalizasyonu açıkça gözlenmektedir.



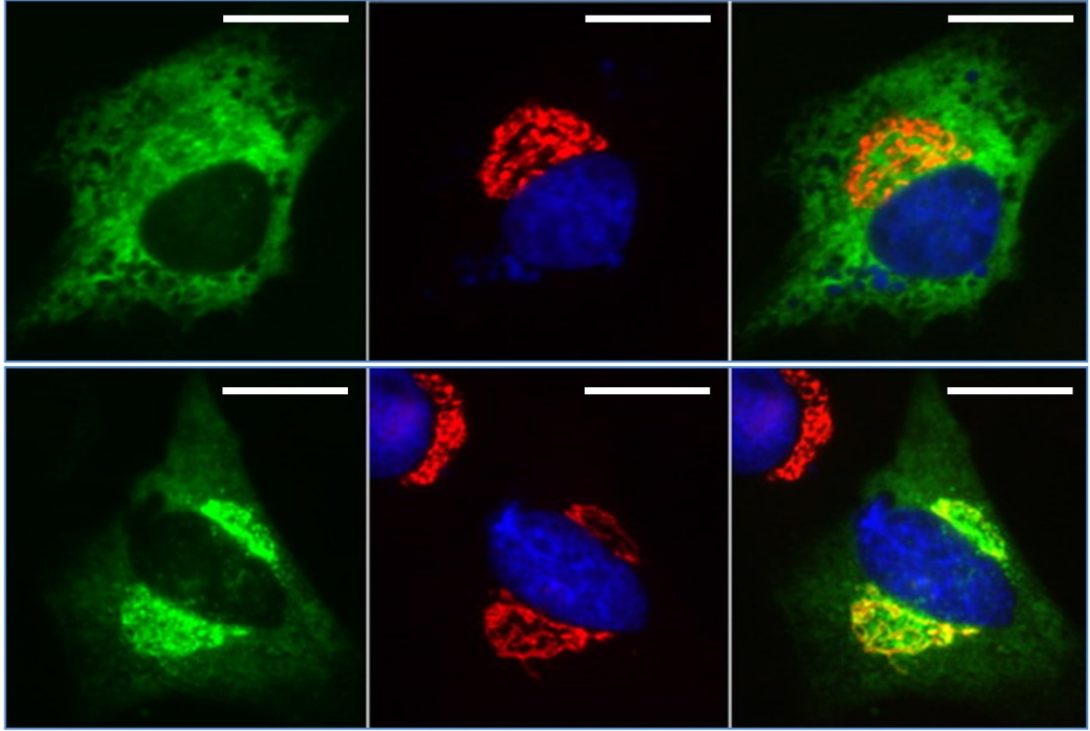
Şekil 4.7. Transfeksiyonun 24. saatinde EGFP sinyalinin ER'den golgiye geçişi. Transfeksiyonun 24. saatinde golgi zonu olduğu öngörülen bölgede EGFP sinyali yoğunlaşmaya başlamaktadır (GFP-yeşil, ER-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 8 μ m).

24. saati takip eden süreçte yapılan golgi incelemesinde, salgısal öncü sinyal içeren EGFP molekülünün Şekil 4.8.'deki görüntülerde açık şekilde golgi bölgesine lokalize olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Transfeksiyonun 30. saatinde EGFP molekülünün hücre içinde golgi organeline yerleşimi. 24 saati takip eden zaman sürecinde EGFP molekülünün golgi zonunda birikmeye başladığı gösterilmiştir (GFP-yeşil, ER-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 8 μ m).

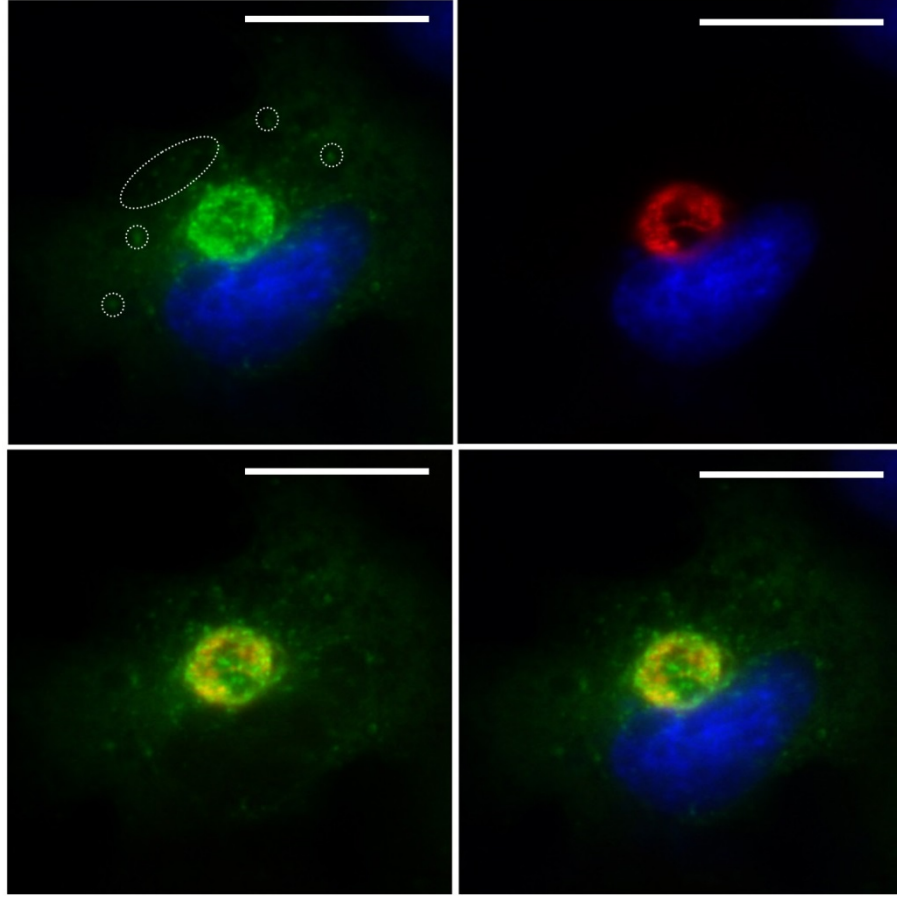
24. saat ve sonrasına ait görüntülerde izlenen floresan sinyal yoğunluğunun özgül olarak golgiye lokalize olduğunu göstermek amacıyla, anti-golgi antikoruna ile immün boyama gerçekleştirilmiştir ve bu bulgu doğrulanmıştır. Aşağıda Şekil 4.9.'da PAI öncü sinyali içeren EGFP molekülünün golgide toplandığı aşama gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Transfeksiyonun 12. ve 30. saatinde EGFP sinyalinin golgiye lokalizasyonu. Üst panel transfeksiyonun 12. saati, alt panel ise 30. saatinde tesbit edilen hücre görüntüleridir. Transfeksiyonun 12. saatinde (üst panel) EGFP sinyalinin ER'a dağılımı gözlenmektedir. Transfeksiyonun 24. saatini geçen örneklerde ise, EGFP sinyalinin golgide toplandığı aşama belirgindir (GFP-yeşil, Golgi-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk = 6 μ m).

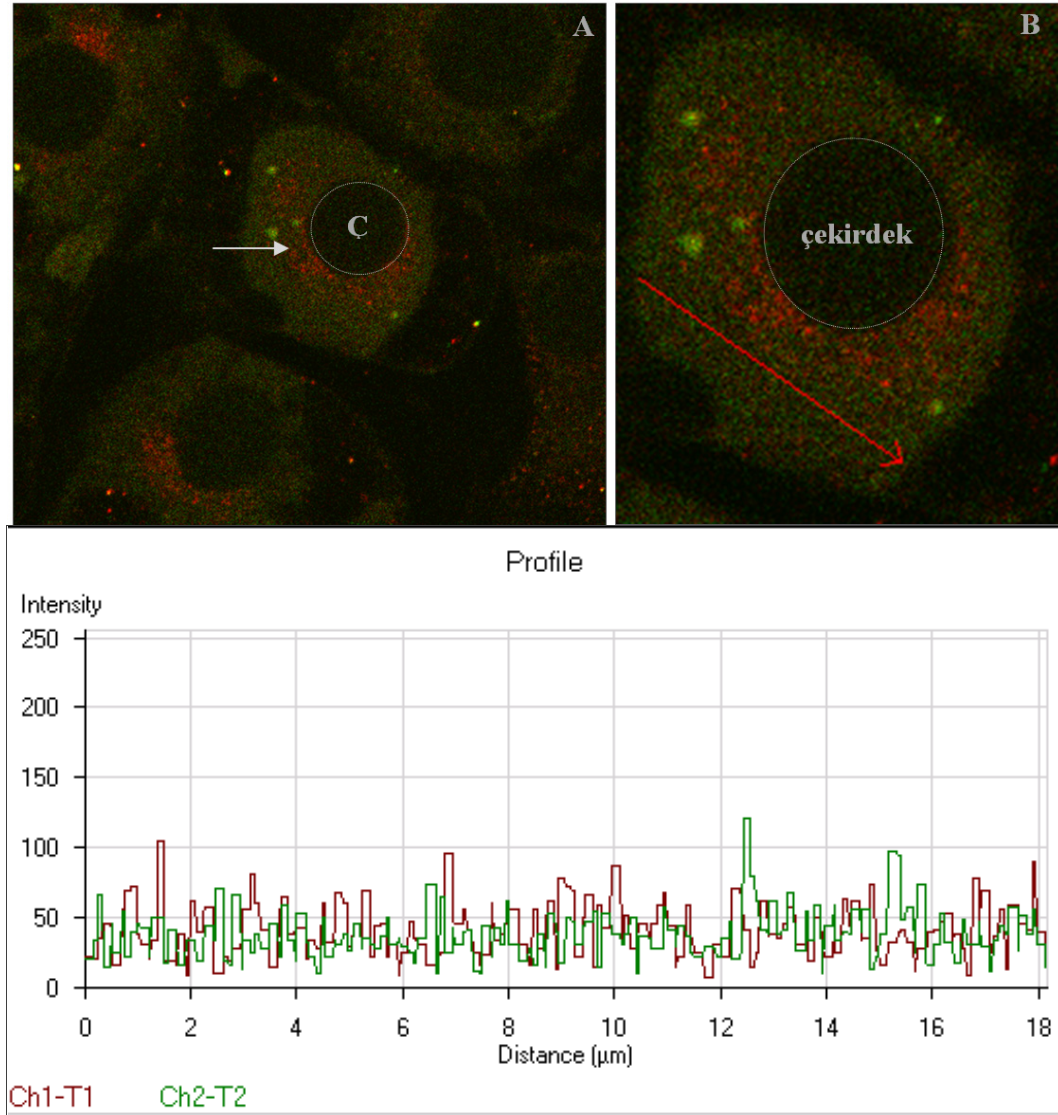
24. saat ve sonrasındaki zaman dilimlerinde ise öncü sinyali içeren EGFP sinyali tamamen golgi bölgesinde yoğunlaşmakta bazı hücrelerde, büyük veziküler yapılar halinde gözlenmektedir. 30. saate ait bir görüntü, Şekil 4.10.'da verilmiştir.

Bu vezikül benzeri yapıların golgiden ayrılan klatrin kaplı salgısal veziküller olduğunu doğrulamak amacıyla transfeksiyonun 36. saatinde anti-klatrin antikoru ile immünboyama uygulandı ve konfokal mikroskop altında gözlendi (Şekil 4.11.). Konfokal görüntü, EGFP sinyali ve klatrin sinyallerinin bir arada bulduklarını göstermek amacıyla profil eğrisi ile analiz edildi.



Şekil 4.10. Transfeksiyonun 30. saatinde EGFP sinyalinin hücre içerisinde golgi cisimciğine lokalize olmakta ve yer yer veziküller halinde görünüm sergilemektedir (EGFP-yeşil, Golgi-kırmızı, Çekirdek-mavi, Çubuk= 8 μm).

Profil eğrisi, iki farklı kaynaktan gelen sinyallerin yoğunluklarını seçilen mesafe boyunca gösteren bir analiz eğrisidir. Bu nedenle bu eğriler “şiddet ve yer profili” olarak da adlandırılmaktadır. Her iki kaynak aynı bölgede yoğun sinyal içeriyorsa, eğrinin o bölgesinden gelen sinyaller çakışmaktadır. Bu durum iki kaynağın aynı bölgede eşit sinyal verdiğini gösterir. Kaynakların farklı yerlerde, birbirlerinden bağımsız yerleşim göstermesi halinde, eğri tek bir sinyal kanal bölgesinde yoğunlaşır ya da dağınık bir profil gösterir.



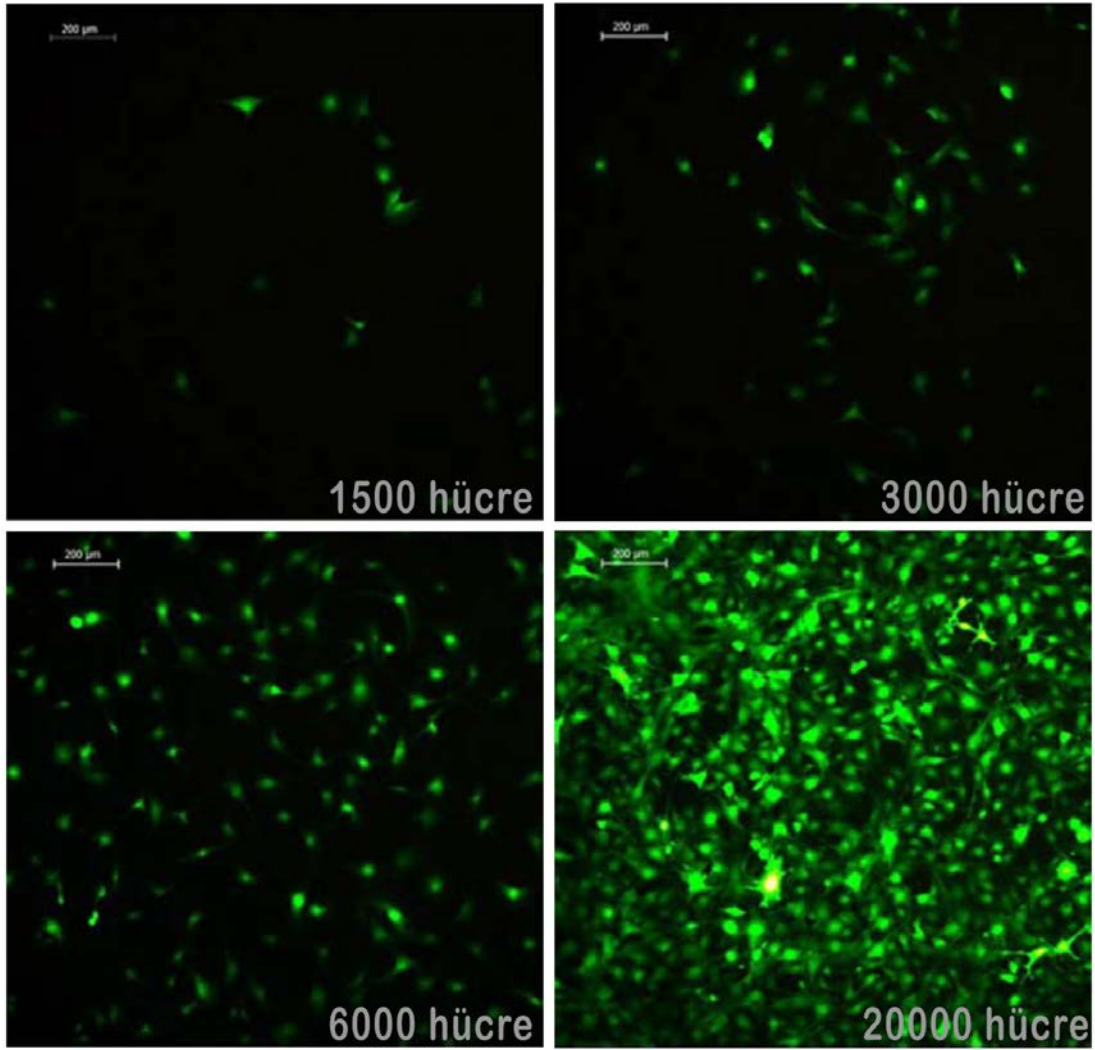
Şekil 4.11. Transfeksiyonun 36. saatinde EGFP ve klatriin proteinlerinin hücre içinde yerleşimi ve profil eğrisi. Transfeksiyonun 36. saatinde sitoplazmada yeşil renkli GFP sinyali, ve kırmızı renkli klatriin sinyali bir arada gösterilmiştir. Her iki sinyalin çakışması ise sarı renk oluşturmaktadır. Beyaz renkli ok ile gösterilmiş olan çekirdek komşuluğundaki bölge, golgi aygıtı işaret etmektedir (A). Klatriin ve EGFP moleküllerinin bir arada yerleşimini göstermek için kırmızı renkli ok doğrultusunda profil eğrisi analizi yapılmıştır (B). Profil eğrisi sonuçları alt panelde verilmiştir. Yeşil (Klatriin) ve kırmızı (EGFP) kanallardan gelen sinyallerinin çakışması bu birlikteliği doğrulamaktadır (GFP-kırmızı, Klatriin-yeşil).

Şekil 4.11.'de profil eğrisi analizi yapılan hücrede, yeşil (klatrin) ve kırmızı (EGFP) kanallardan gelen sinyaller çakışmakta ve seçilen mesafe boyunca aynı şiddette olduğu sergilenmektedir. Bu analizde kullanılan görüntünün, z-eksenindeki kesit kalınlığı, 0,3 µm olarak belirlenmiştir. Konfokal görüntüleme için kullanılan rutin z-ekseni kesit kalınlığı 1 µm dir. Bu çalışmada, incelenmesi amaçlanan klatrin kaplı veziküllerin 60-100 nm çapında olması nedeni ile konfokal mikroskopisinin teknik sınırlarında çalışılmış ve ölçüm sonuçlarının güvenilirliği güvence altına alınmaya çalışılmıştır.

EGFP bildirici molekülü N-terminaline yerleştirilen ve test edilen yedi salgısal öncü dizinin de başarı ile ifade olduğu ve EGFP molekülünün salgısal yolağı takip ettiği görsel olarak kanıtlanmıştır. Gözlemlerde, yağ hücrelerinde farklı taşıma sinyalleri arasında klasik salgı yolağı bakımından belirgin bir fark sergilemedikleri anlaşılmıştır. Bu sonuçlar kalitatif olarak, tüm salgı dizilerinden beklendiği üzere klasik salgı yolağı aracılığı ile rekombinant EGFP'nin hücre dışına salgılandığını kanıtlamaktadır. PAI dışındaki öncü sinyallerine ait görsel bulgular, EK-1'de sunulmuştur.

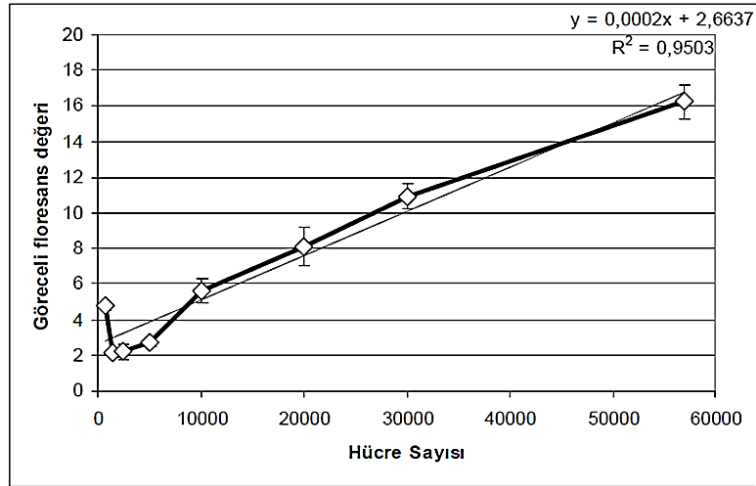
4.3. EGFP Salgı Etkinliğinin Kantitatif Analizi

EGFP proteininin florimetrik kantitasyon ile ölçülebilir nitelikte oluşu, hücre kültüründe, yağ hücreleri tarafından hücre dışına (ortama) salgılanan EGFP protein miktarının kantite edilebilmesini sağlamaktadır. Florimetrik kantitasyonun değerlendirme sınırlarını belirleyebilmek amacıyla standardizasyon deneyleri yapılmıştır. Transfekte olan hücre sayısı ile orantılı floresan ölçümünü sağlayabilecek uygun bir standart eğri çizilerek en sağlıklı ölçüm aralığı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla farklı sayılarda hücrelere EGFP.C1 plazmidi transfecte edilerek hücreler kültür şartlarında 48 saat idame ettirildi. 48 saat sonrasında, hücreler patlatılarak lizatları elde edildi ve iki bağımsız cihaz aracılığı ile florimetrik ölçümler yapıldı. Hücre lizatı ölçümleri en az 750 ve en fazla 60000 hücre sınırları arasında gerçekleştirildi. Şekil 4.12'de ölçüm yapılan farklı sayılardaki hücrelerin temsili yoğunluk görüntüleri verilmiştir.



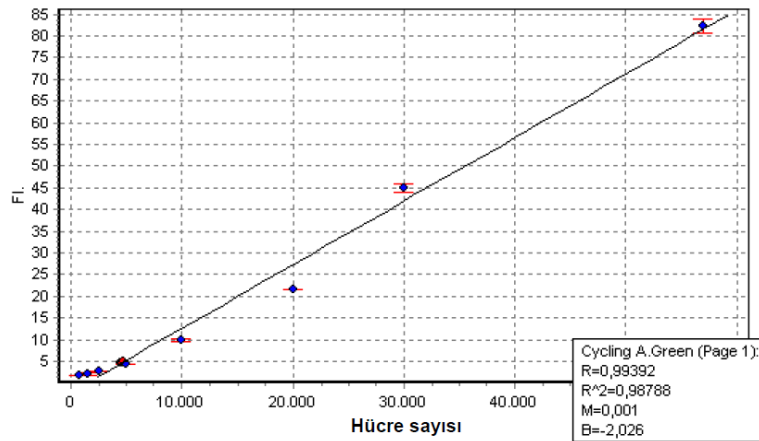
Şekil 4.12. Hücre kültürü ortamından florometrik ölçüm yapılan farklı sayılarda transfekte hücrelerin hücre kültürü kabındaki görüntüleri verilmiştir (Çubuk = 20 µm).

Versamax floreskopi cihazında gerçekleştirilen ölçüm sonuçları hücre sayısına karşılık gelen göreceli floresan değerleri ile birlikte Şekil 4.13.'te verilmiştir. Bu ölçüm yaklaşımı ile en az 5000 hücreye ait floresan değeri sağlıklı şekilde kantite edilebilmiştir.



Şekil 4.13. Versamax floreskopi cihazında EGFP transfekte hücre sayısına karşılık gelen göreceli floresan değeri çizilmiştir. Üçlü bağımsız deney tekrarları hata çizgileri ile verilmiştir.

Aynı deneyin, Rotorgene 6000 florimetrik ölçüm cihazında tekrarı daha yüksek hassasiyette sonuçlar sağlamıştır. Aşağıda Şekil 4.14.'te Rotorgene 6000 göreceli floresan ölçüm sonuçları verilmiştir. Bu cihaz, 1500-2500 hücreye kadar sağlıklı floresan ölçüm imkanı sağlamıştır.



Şekil 4.14. Rotorgene 6000 floreskopi cihazında EGFP transfekte hücre sayısına karşılık gelen göreceli floresan değeri çizilmiştir. Üçlü bağımsız deney tekrarları hata çizgileri ile verilmiştir.

Bu sonuçlar, GFP protein miktarının transfekte hücre sayısı ile orantılı şekilde başarı ile kantite edilebileceğini göstermiştir ve deneysel kavram kanıtı niteliğindedir. Direk floroskopi yöntemi ile ölçülebilen en az sayıda hücre sayısı 1500'dür. Bir sonraki deneysel adım, kültür ortamına (supernatan) salgılanan EGFP protein miktarını ölçmeye yöneliktir.

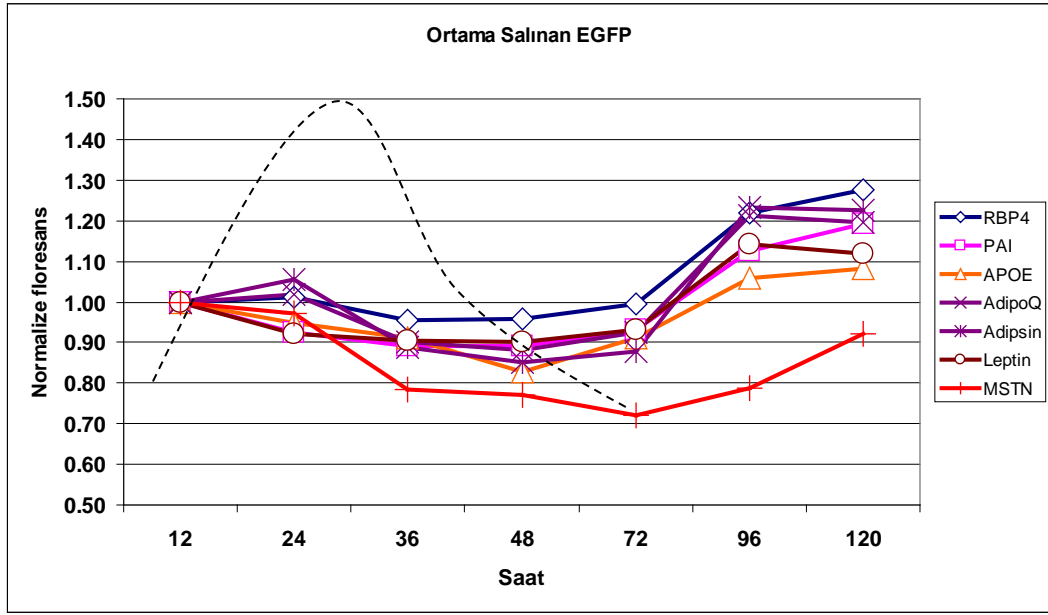
4.4. Doku Kültüründe Hücre Tarafından Sentezlenen EGFP Proteininin Kantitasyonun Sonucuna Göre Öncü Sinyallerinin Karşılaştırılması

4.4.1. Doku Kültürü Ortamına Salınan EGFP Proteininin Kantitasyonu

EGFP bildirici gen ürününün yukarıda, 4.3'te açıklanan sonuçlarla kantite edilebilmesi ekspresyon kinetiğinin ve hücre dışına salgılanan miktarının ölçülebilmesi için uygun imkanları sağlamaktadır.

EGFP salgı kinetiğinin ölçümü, transfeksiyon ortamından gözlem süresince alınan örneklerde 12, 24, 36, 48, 72, 96. ve 120. saatlerde yapılmıştır. 48. ve 72. saatlerde ise transfekte hücreler toplanmış ve sonike edilerek hücre lizatında bulunan GFP miktarı da kantite edilmiştir. Geçici transfeksiyon yöntemi ile uygulanan bu yaklaşımla farklı öncü sinyalleri taşıyan EGFP molekülünü ne oranda hücre dışına salgılandığı ölçülmüştür. Florimetrik yöntemle yapılan EGFP ölçüm sonuçları β -gal ifade sonuçlarına normalize edilmiştir. Ölçüm sonuçları daha sonra ilk ölçüm zaman noktası olan 12. saat değerine normalize edilerek ortama salınan EGFP ifadesi zamana karşı "kat artışı" olarak Şekil 4.15.'te sunulmuştur.

Geçici transfeksiyon ile sağlanan EGFP ifadesi zamana bağlı olarak değişim sergilemektedir. Transfer edilen vektör üzerinde mRNA ekspresyonu, 12. saatte başlamakla birlikte, 24 ila 36. saatler arasında en yüksek seviyeye erişmekte, daha sonraki zaman diliminde ise azalarak, 72. saat sonrasında kaybolmaktadır. Bu durum, geçici transfeksiyonun doğasından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.15.'te transgen üzerinden gerçekleşen mRNA ekspresyon kinetiği kesikli çizgi ile ifade edilmiştir.



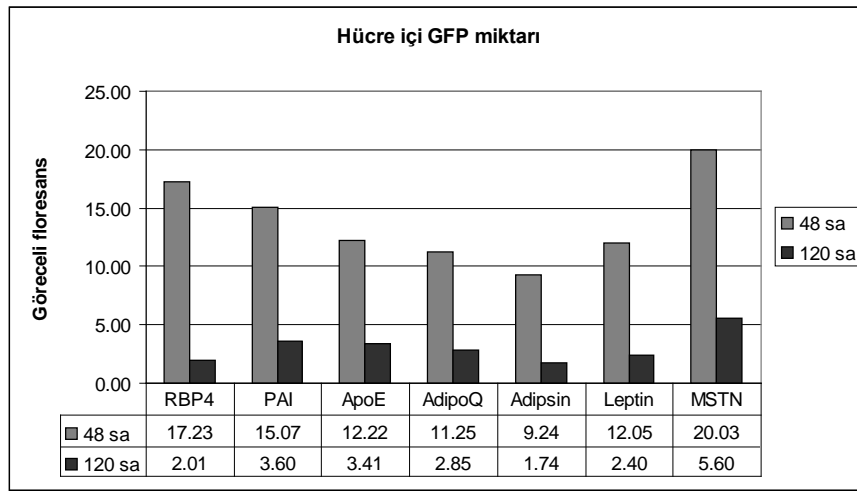
Şekil 4.15. Zamana karşı, hücre dışından yapılan EGFP ölçüm sonuçları. Y eksen, göreceli floresan değişimini göstermektedir. Kesik çizgi eğrisi ise, geçici transfeksiyon sonrası transkripsiyon aktivitesini göstermektedir.

Gen transferini takiben zamana karşı, ortama salınan EGFP miktarı ölçülerek, gen transferi etkinliğine normalize edilmiştir. Bu ölçümlerin sonuçları ve ölçüm grafikleri Şekil 4.16.'da verilmiştir. Protein öncü mekanizması ile ilintili olarak aşağıda detaylandırılacağı üzere transfeksiyon sonrası EGFP molekülünün translasyonu, ER dan golgiye geçişi ve daha sonra da hücre dışına salınımı 48. saat ve sonrasında gerçekleşmektedir. 24. ve 72. saatlerde hücre kültürüne yeni besi ortamı ilave edilmiş, bunun sonucunda ölçülen EGFP miktarlarında düşüş beklenmiştir. 24. saati takip eden zaman noktası olan 36. saate bu düşüş gerçekleşmiş, ancak 72. saati takiben hızla artan protein salgı nedeni ile bu azalma gözlenmemiştir. Şekil 4.15.'deki grafikten de anlaşılacağı üzere hücre süpernatantında en yüksek göreceli EGFP ifadesi **Retinol bağlama proteini-4 (RBP4)** ve **Adipsin** öncü dizileri ile gözlenmiştir. Farklı öncü sinyalleri ile hücre dışına salınan EGFP miktarları aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

RBP4>Adipsin>AdipoQ>PAI>Leptin>ApoE> MSTN

4.4.2. Transfekte Hücre Lizatında EGFP Proteininin Kantitasyonu

Yukarıda açıklanan şekilde transfekte adiposit öncülü hücreler 48. ve 120. saatlerde toplanarak hücre ortamından arındırılmış, sonikasyonla hücre lizati elde edilmiş ve EGFP miktarları kantite edilmiştir. Ölçüm değerleri gen transferi etkinliğine normalize edilmiştir. Bu inceleme, hücre dışına salınan proteinlerin ne kadar miktarının hücre içinde tutulduğunu göstermektedir. Bu çalışma sonucunda Şekil 4.16.'da yer alan bulgulara ulaşılmıştır.



Şekil 4.16. Olgun yağ hücrelerince hücre içi EGFP miktarı değişimi.

Şekil 4.16.'da gözleneceği üzere 120. saatin sonunda en düşük EGFP miktarı RBP4 ve Adipsin öncü sinyali ile alınmıştır. 48. ve 120. saatler arasındaki ifade düşüşü geçici transfeksiyonun zamanla kaybolmasına bağlıdır. Bu sonuçlar doku kültürü ortamına salınan EGFP moleküllerinden elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldığında EGFP proteinini hücre içinde en az tutan ve en hızlı hücre dışına salgılayan öncü dizilerin **RBP4** ve **Adipsin** olduğu sonucunu göstermiştir.

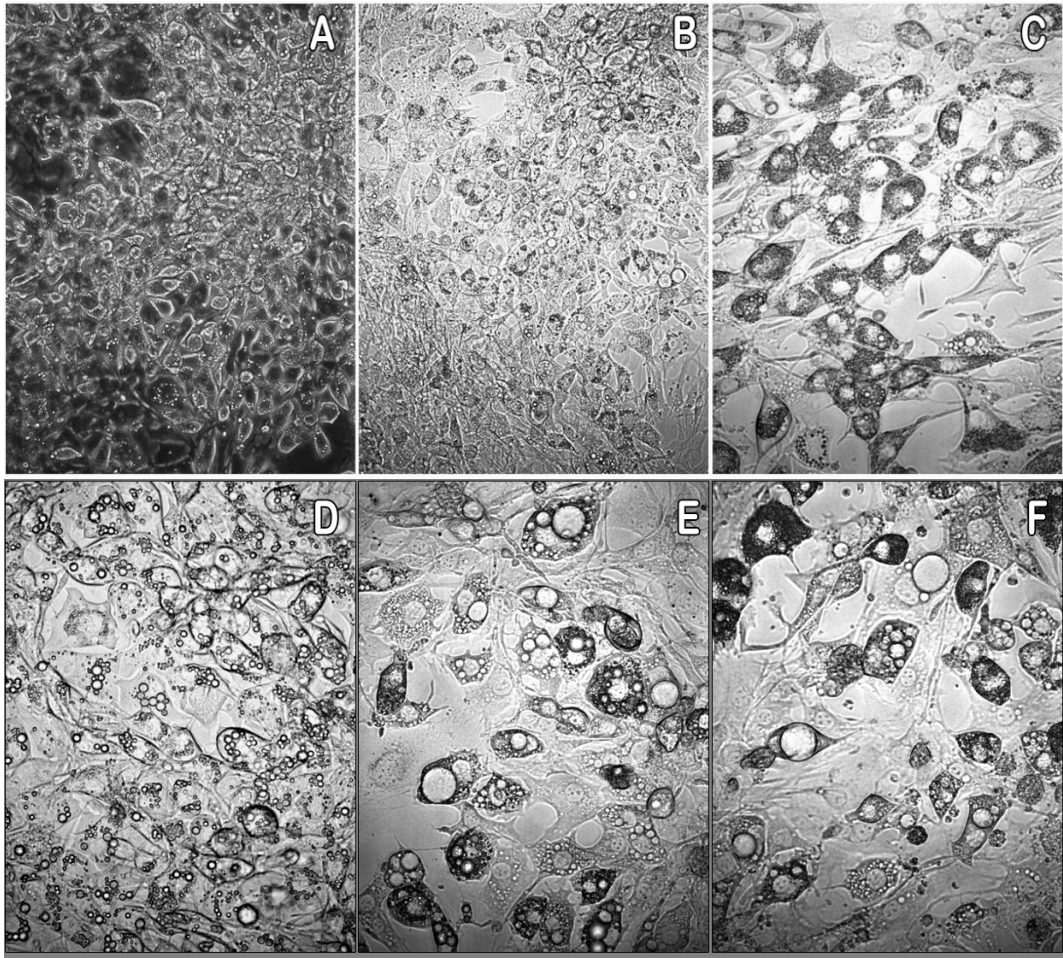
Sonuç olarak **RBP4** öncü dizisi diğer dizilere oranla rekombinant protein salınımında en işlevsel diziyeye sahiptir.

4.5. Hücre Kültürü Çalışmalarında Sıçan Primer Yağ Öncülü ve 3T3-L1 Fare Hücre Hattı Hücrelerinde Farklılaşma ve Gen Transferinin Standardizasyonu

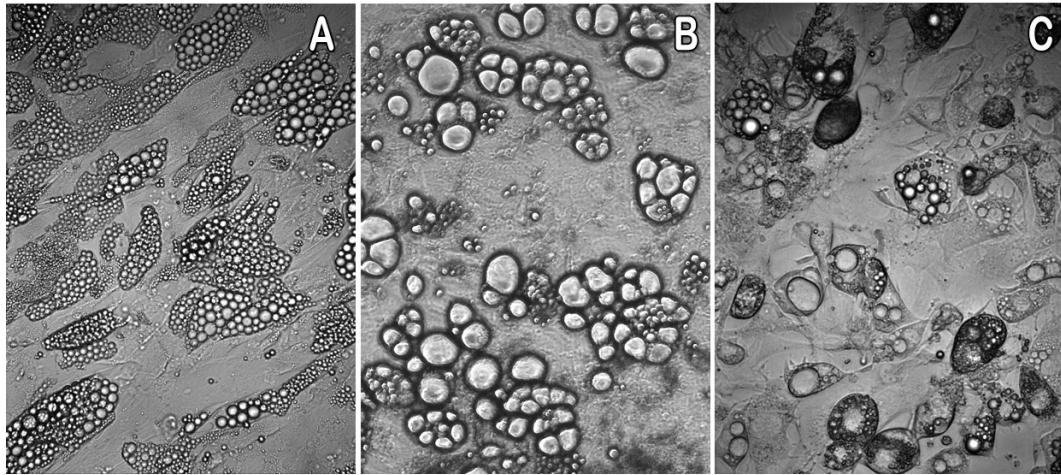
4.5.1. Farklılaşma Süreçlerinin Karşılaştırılması

Bu tez çalışmasında, yağ dokusu hücre kültürü modeli olarak iki farklı hücre kullanıldı. Bu hücreleri sıçan yağ dokusundan elde edilen primer yağ-öncülleri (preadipositler) ve 3T3-L1 hücre hattıdır. Bu hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma morfolojilerini göstermek ve doğrulamak amacıyla 30 gün boyunca farklılaşma ortamında takip edildi. Morfolojik gözlemlere ve farklılaşma kinetiğine göre protokol optimizasyonu yapıldı.

Yağ farklılaşma morfolojisi ve süreci bakımından karşılaştırıldığında, 3T3-L1 hücreleri farklılaşma hızı primer yağ öncülü hücrelerden daha hızlı seyretmektedir. 3T3-L1 hücrelerinde, 17. günde gözlenen monolüküler (*monolocular*) yağ hücresi fenotipinin, primer yağ öncülü hücrelerinde aylar gerektirmekte olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.17.). Farklılaşma süreci ile ilgili bu temel bulgunun yanında, farklılaşma ortamında 3T3-L1 hücrelerinin tamamına yakınının yağ hücre morfolojisi kazandığı görülmektedir. Primer yağ öncülü hücrelerde ise hücrelerin yalnızca belirli bir kısmının farklılaşma sergilediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. 3T3-L1 hücrelerin farklılaşma süreci. Farklılaşmanın 5. gününde (A-faz kontrast ve B) hücrelerde yağ damlacıkları görünmeye başlamıştır. Farklılaşmanın 7. gününde (C) damlacıklar daha belirgin olmaya başlamıştır. Farklılaşmanın 13. ve 15. günlerinde (D ve E) yağ damlacıkları birleşerek daha büyük yağ damlacıkları oluşmaktadır. Farklılaşmanın 17. günde ise (F) çok sayıda monoloküler tek damlacık içeren hücreler görülmektedir.

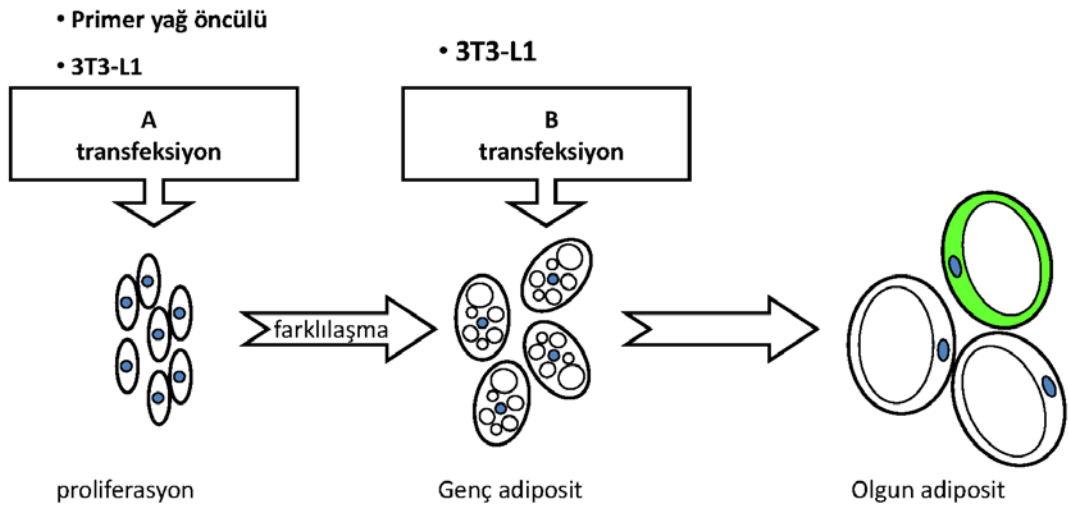


Şekil 4.18. Sıçan yağ öncülü ve 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinin karşılaştırılması. Sıçan primer yağ öncülü hücrelerinde farklılaşmanın 17. günü (A) ve 7.5 ayında (B) görüntüleri verilmiştir. 3T3-L1 hücreleri, aynı monoküler görünüme, farklılaşmanın 17. gününde ulaşabilmektedir.

4.5.2. Transfeksiyon Standardizasyonu ve Verimliliklerinin Karşılaştırılması

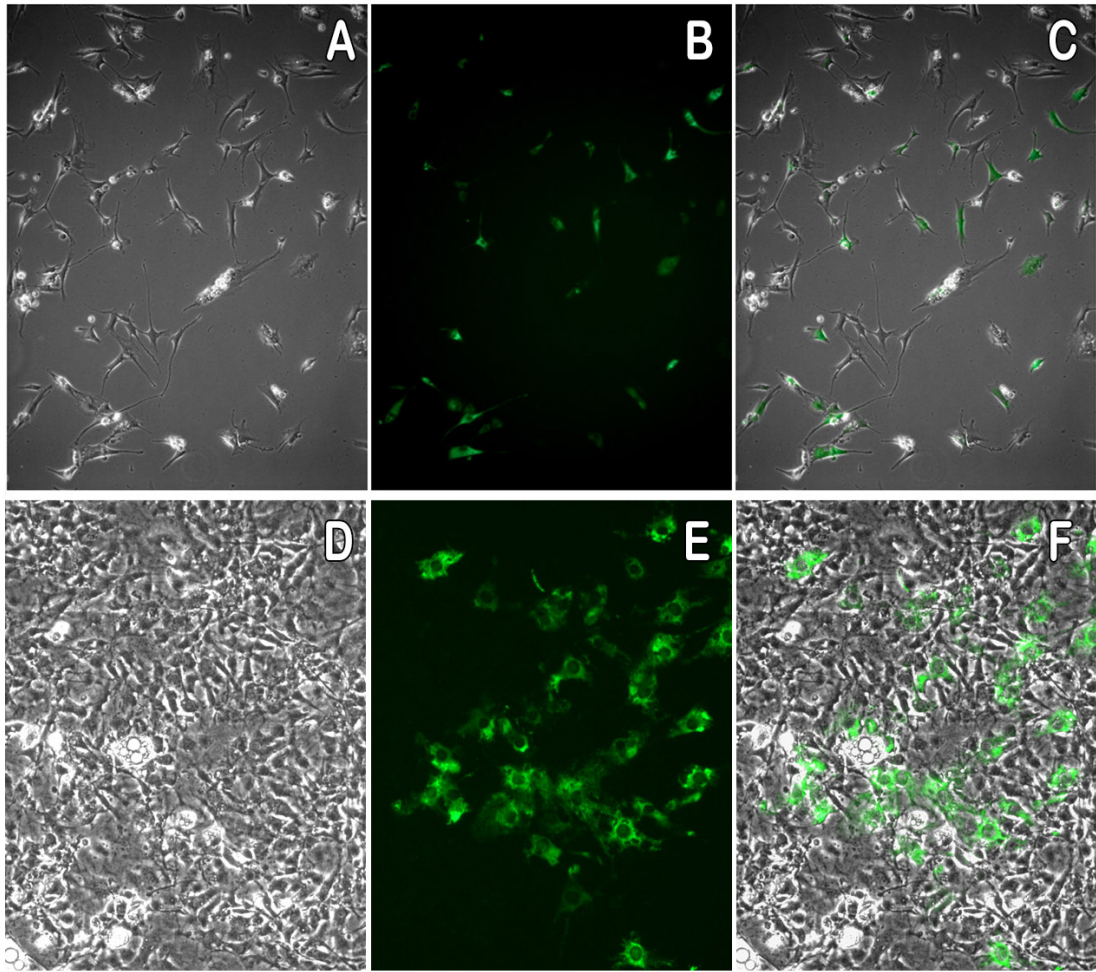
Sıçan primer yağ öncülü hücreleri ve 3T3-L1 hücre hattı için transfeksiyon şartları optimize edildi ve karşılaştırıldı. Gen transferi için elektroporasyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için, hücrelerin tripsin ile kaldırılarak suspansiyon haline getirilmeleri gerekmektedir. Primer yağ öncülü hücreler farklılaşma indüksiyonundan sonra tripsinize edildiklerinde ölmektedirler. Diğer yönden, 3T3-L1 hücreleri farklılaşma süreci başladıktan 5 gün sonra dahi tripsin yardımı ile kaldırılabilen ve transfekte edilebilir özelliğini korumaktadır. Bu nedenle, 3T3-L1 hücreleri yüksek transfeksiyon verimliliği ve farklılaşma oranı sunması yönünden primer yağ öncülü hücrelerden daha avantajlı bulunmuştur. 3T3-L1 hücreleri ile uygulanan bu yaklaşım da transfeksiyon etkinliği karşılaştırılma deneyine dahil edilmiştir.

Gen transferi optimizasyonu denemelerinde kullanılan yaklaşım Şekil 4.19.'te şematize edilmiştir.



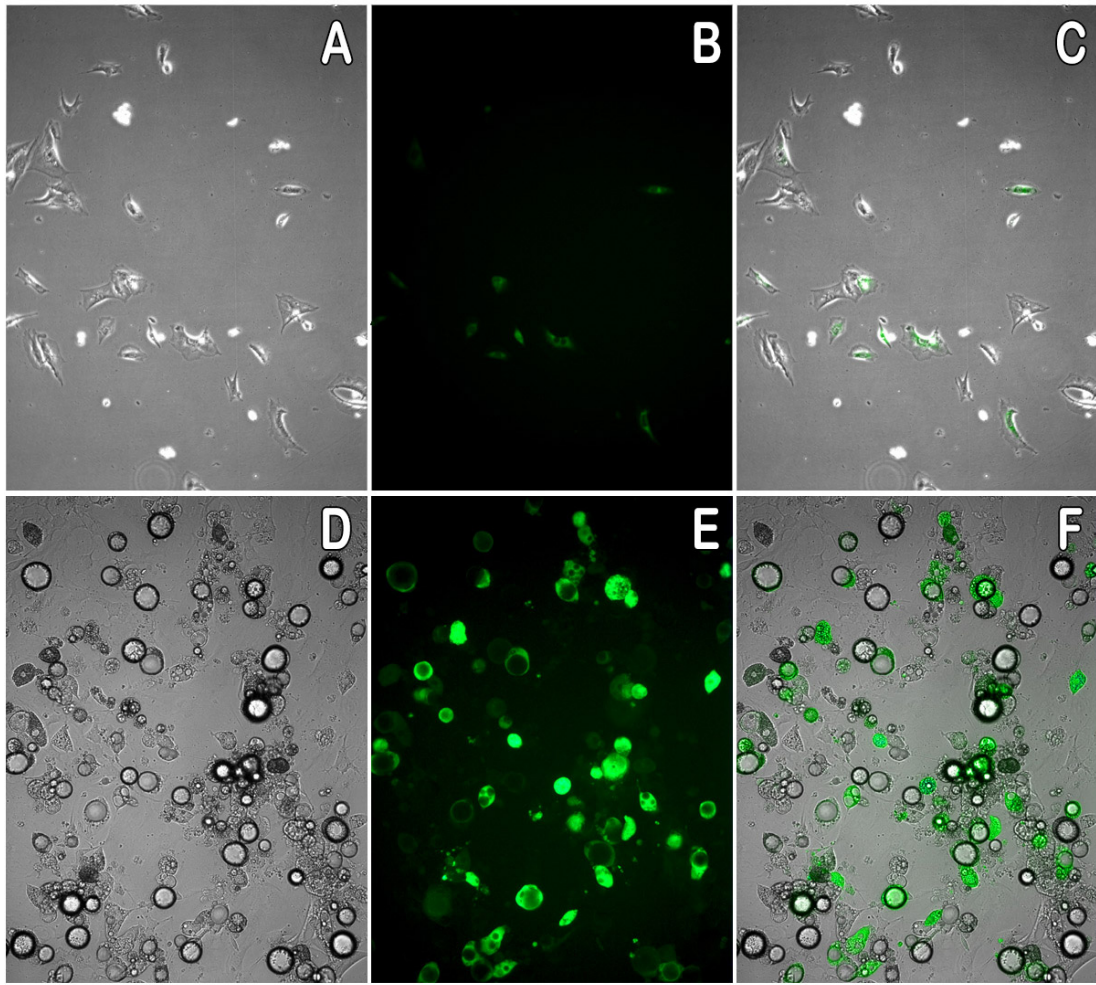
Şekil 4.19. Primer yağ öncülü ve 3T3-L1 hücrelerinin transfeksiyon optimizasyonu değerlendirme şeması. Bu çalışmada transfeksiyon oranı, iki farklı grupta değerlendirildi. A transfeksiyon grubunda iki farklı hücre tipi (primer yağ öncülü ve 3T3-L1 hücreleri) bulunmaktadır. Bu hücreler, çoğalma şartlarında tripsin yardım ile toplanıp RBP4 öncü sinyali ve EGFP içeren vektör omurgası ile transfekte edildi. B transfeksiyon grubunda ise 3T3-L1 hücreler, farklılaşmanın indüklenmesinden beş gün sonra tripsin ile toplanarak transfeksiyon işlemi yapılmıştır.

Farklılaşma gruplarının transfeksiyon oranları karşılaştırıldığında (Şekil 4.20. ve 4.21.). Yukarıda açıklanan A grubunda yer alan sıçan primer yağ öncülü hücrelerinde transfeksiyon oranı % 38,8, 3T3-L1 hücrelerinde ise % 27,7 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. Sıçan yağ öncülü hücrelerinde transfeksiyon standardizasyonu. Elektroporasyon sonucunda en optimal şartlarda % 38.8 transfeksiyon oranı elde edilmiştir (A-C). Transfekte hücrelerin farklılaştırılması halinde 30. güne dek gen ifadesi gözlenebilmiştir (D-F).

Transfeksiyon sonrasında farklılaşmaya bırakılan sıçan yağ öncülü hücrelerinin 30 günlük takibi sürecinde adipojenik farklılaşmanın yavaş ve çok sınırlı olduğu gözlenmiştir. Transfekte hücrelerde yağ birikimi gözlenememiş veya çok sınırlı miktarda gözlenebilmiştir. Gözlem süresinde, az sayıda gözlenebilen farklılaşmış hücrelerin sayılarının da azaldığı anlaşılmıştır.

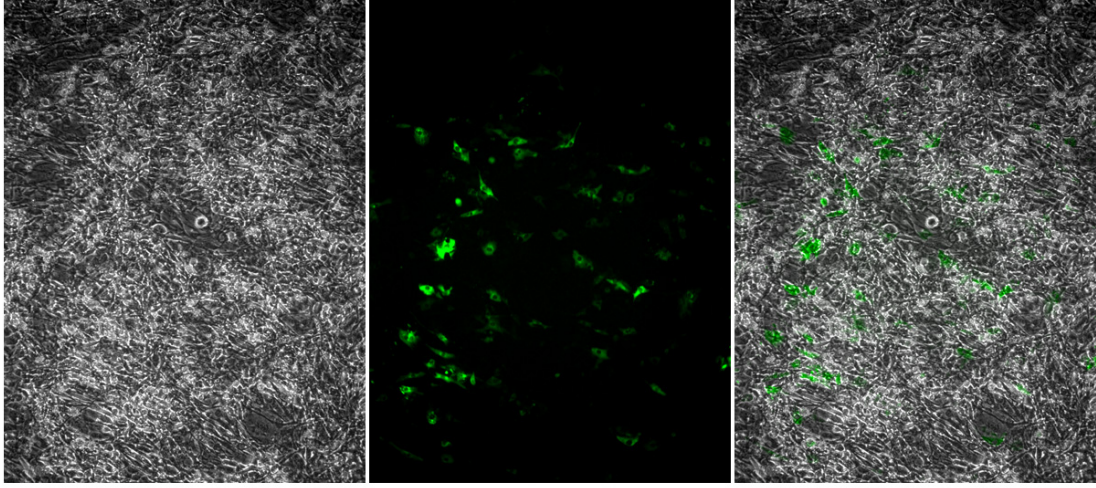


Şekil 4.21. 3T3-L1 hücrelerinde transfeksiyon standardizasyonu. Elektroporasyon sonucunda en optimal şartlarda %27.7 transfeksiyon oranı elde edilmiştir (A-C). Transfekte hücrelerin farklılaştırılması halinde 60. güne dek gen ifadesi gözlenebilmiştir (D-F).

3T3-L1 hücrelerinde elektroporasyon sonrasında, primer hücelere oranla daha düşük bir transfeksiyon oranı elde edilmiştir. Ancak, primer yağ öncülü hücrelerinin aksine, başarıyla transfekte edilen bu hücrelerin iyi farklılaştıkları gözlenmiştir. Yağ veziküllerinin birikimini sağlayan ve iyi farklılaşan bu hücrelerde vektör omurgasından sağlanan protein ifadesinin daha kalıcı olduğu gözlenmiştir. 60. güne dek yapılan gözlemlerde, gen ifadesinin sürdüğü anlaşılmıştır.

Gen transferinin standardizasyonu çalışmalarında, son adım olarak, 3T3-L1 hücrelerinde yağ farklılaşma programının başlatılmasını takiben, 5. günde hücreler

toplanarak elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi ve tekrar farklılaşma ortamına aktarıldı (Şekil 4.22.).

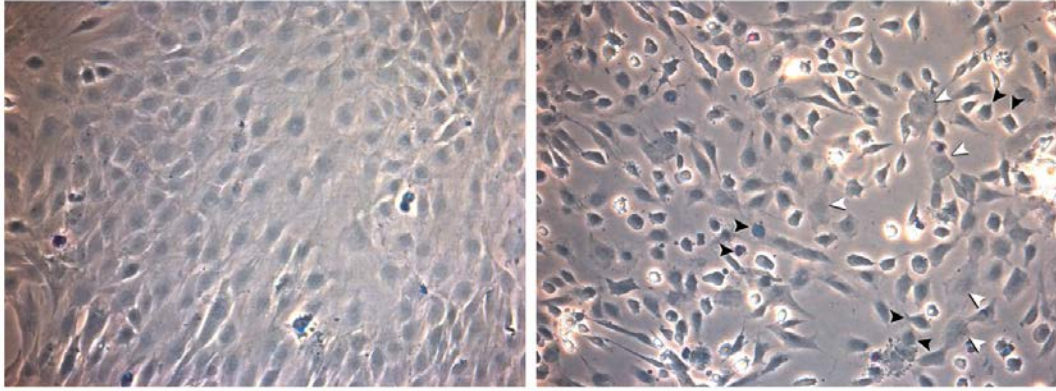


Şekil 4.22. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmanın 5. gününde yapılan elektroporasyon işlemi sonrasında 7. gün görüntüsü.

3T3-L1 hücrelerin farklılaşma öncesi ve sonrasında uygulanan transfeksiyon sonuçları karşılaştırıldı. Farklılaşma sonrası uygulanan transfeksiyonda başarı oranı çok daha düşük saptandı ve transfekte olan hücrelerde yağ birikimi gözlemlendi. Farklılaşmadan önce transfekte edilen hücreler başarı ile farklılaştıkları ve farklılaşmanın 60. günde dahi güçlü gen ekspresyonu sergiledikleri gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında sürdürülen çalışmalarda, 3T3-L1 hücrelerine gen aktarımı sonrasında farklılaşma işlemi uygulandı.

4.5.3. Elektroporasyon ile Gen Transferi Sonrasında Canlılık Testi

Elektroporasyon aracılığı ile gen transferi memeli hücrelerinde önemli bir hücresel stres etkenidir. Elektroporasyon sonrasında takip edilen floresan sinyalin özgülüğünün kanıtlanabilmesi için, bu hücrelere tripan mavisi aracılığı ile canlılık testi uygulanmıştır. Elektroporasyon sonrasında çoğalma ortamına bırakılan 3T3-L1 hücreleri serum açlığı ile hücre ölümü indüklenen hücrelerle karşılaştırılmıştır. Sonuçta, elektroporasyon sonrasında tekrar hücre kültür kabına tutunabilen hücrelerin % 100 canlılığa sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. Tripan mavisi ile hücre canlılık testi. Elektroporasyon işlemi sonrasında hücre kültür kabına tutunan 3T3-L1 hücrelerinde tama yakın canlılık saptanmıştır (sol). Serum açlığı aracılığı ile oluşturulan hücresel stres, canlılık testinin pozitif kontrolünü oluşturmaktadır (sağ panel). Siyah oklar ile gösterilen hücreler tripan mavisi ile boyanan ölü hücrelerdir, beyaz ok ile gösterilen hücreler ise tripan mavisi ile boyanmayan sağlıklı hücrelerdir.

4.6. Epizomal Gen İfadesinin Sürdürülebilmesi Amacıyla Vektör Yapılarına S/MAR Dizilerinin Aktarılması

S/MAR dizileri epizomal vektörlerin hücre çekirdeği iskelesine tutunarak gen ifadesinin sürdürülebilmesine katkıda bulunur. Bunu iki şekilde yapar. Bunlardan ilki, vektörün fiziksel olarak hücre çekirdeği içinde kalmasını, hücre bölünmesi veya çekirdek içi trafikle kaybını engeller. İkincil olarak vektörün metillenerek işlev kaybını önler. S/MAR dizilerinin doku veya hücre tipine göre etkinliğinin değiştiği bilinmektedir. Bu nedenle yağ hücrelerine transfer edilecek bir DNA vektörünün de bu hücrelerde işlevsel olacak bir S/MAR dizisi içermesi gerekmektedir. Bu gerekçe ile aşağıda detaylandırıldığı üzere tez çalışmasına *IFN β* ve *APOB* genlerine ait S/MAR dizileri dahil edilmiştir. *IFN-B* geninin 5' sınırında yer alan S/MAR bölgesi, 2.2 kb uzunluğundadır (118, 119) . *IFN β* S/MAR bölgesi içinde yer alan farklı işlevsel kısımlar klonlama çalışmaları ile bir araya getirilmiştir. *APOB* geninde üç farklı S/MAR bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler genin 3', 5' ve distal 5' bölgelerinde yer alır (120) . Tez çalışması kapsamında 3' S/MAR bölgesinin yaklaşık

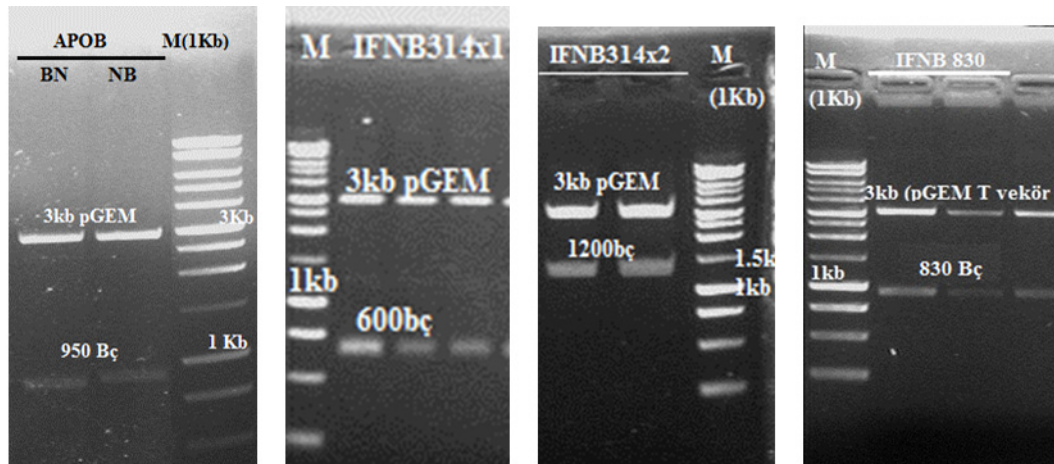
700 bç'lik kısmı seçilmiştir. S/MAR dizileri ile ilgili olarak gerçekleştirilen altı farklı yapı ve klonlama çalışmaları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. S/MAR dizilerinin RBP4 ve EGFP dizisi içeren pcDNA3.1 vektör omurgasına eklenen plazmit dizileri.

Kısaltılmış İsim	Vektör Omurga Dizisi
<i>IFN</i> β 830 (830bç)	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ IFNB-830
<i>IFN</i> β 314 (600bç)	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ IFNB-314
<i>IFN</i> β 314-BNBN (1.2 Kb) (ardışık)	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ IFNB314-BNNB
<i>IFN</i> β 314-BNNB (1.2 Kb) (ardışık)	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ IFNB314-BNBN
<i>APOB</i> – 950 bç BN	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ <i>APOB</i> -BN
<i>APOB</i> – 950 bç NB	RBP4+ EGFP+ pcDNA3.1+ <i>APOB</i> -BN

4.6.1. *APOB* ve *IFN* β S/MAR Dizileri Klonlama Sonuçları

PZR aracılığı ile çoğaltılarak pGem-T-Easy klonlama vektörüne aktarılan *APOB* ve *IFN* β S/MAR dizilerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri aşağıda Şekil 4.24.'te verilmiştir.



Şekil 4.24. Klonlanan S/MAR dizilerinin jel görüntüleri. Klonlama çalışmalarına dahil edilen S/MAR dizilerinin pGem-T-Easy klonlama vektörü ile birlikte enzim kesim analiz sonuçları gösterilmiştir. Soldan sağa *APOB*, *IFN* β , *IFN* β x2, *IFN* β 830 dizileri.

4.6.2. *IFN β* ve *APOB S/MAR* Dizilerin Karşılaştırılması

S/MAR dizilerinin plazmit omurgalarına eklenmesi ile beraber, plazmidlerin yağ hücrelerinde kalıcılığının artırılması planlanmıştır. Bu kalıcılığı test etmek için birbirinden farklı iki deney yaklaşımı uygulanmıştır. Bunlardan ilkinde, gen aktarımını takiben, hücreler çoğaltıma bırakıldı. EGFP protein ifadesi floresan mikroskop aracılığı ile gözlemlendi ve görüntüldü. Çoğalan hücreler, yüksek yoğunluğa ulaştığında (3 ila 4 gün) bu kültürler, 1/3 oranında pasajlanarak ilerleyen pasajlar boyunca da vektör omurgasının varlığı ve ifadesi takip edildi. İkinci yaklaşımda ise, yukarıda bahsedilen ve yüksek yoğunluğa ulaşan kültürler pasajlanırken 1/3 oranında donduruldu ve tekrar çözülerek çoğaltıma bırakıldı. Bu ikinci yaklaşım, hücresel stresin indüklenmesine karşılık olarak vektör omurgasının kalıcılığını takip etmeyi de amaçlamaktadır.

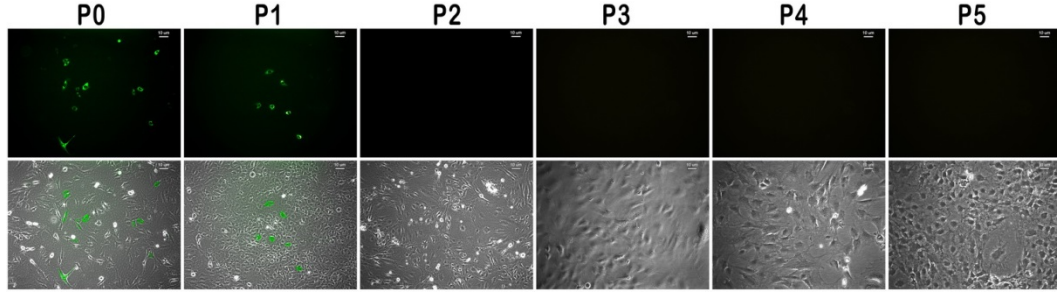
Klonlanan farklı S/MAR dizilerini içeren vektör omurgaları ile transfekte edilen, sürekli çoğalmakta olan veya dondur-çöz sonrası çoğaltıma bırakılan hücrelerde kantitatif ve kalitatif analizler yapılmıştır.

Kalitatif analizler, 6. pasaja kadar GFP ifadesinin gözlenmesine dayalı olup, vektör omurgasının transkripsiyon etkinliğini göstermektedir. Kantitatif analizler ise, pasajlar ilerledikçe vektör omurgasının bölünmekte olan hücrelerde kalıcılığını göstermektedir.

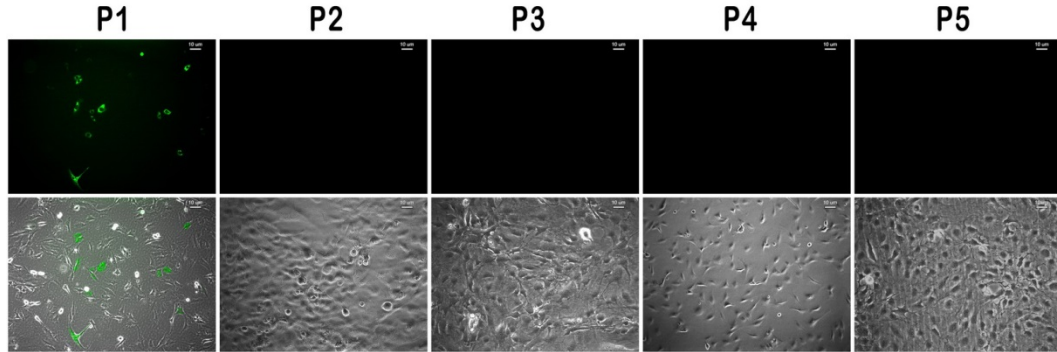
Kalitatif Gözlem Sonuçları

Yukarıda açıklandığı üzere, 5. pasaja kadar takip edilmeye çalışılan EGFP protein ifadesi S/MAR dizisi içermeyen kontrol plazmidinde yalnızca birinci pasajda gözlemlenmiştir. Daha sonraki pasajlarda EGFP protein ifadesine rastlanmamıştır. Bu bulgu, bölünen hücrelerde beklenen vektör kaybı olarak değerlendirilmiştir. Altı farklı S/MAR dizisi içeren vektör omurgalarında ise EGFP protein ifadesi değişen oranlarda olmakla birlikte pasajlar boyu izlenebilmiştir. Bu gözlem, S/MAR dizilerinin işlevselliğini kanıtlamaktadır. Farklı S/MAR dizileri içeren vektörlerle transfekte olan 3T3-L1 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.25-31.'de gösterilmiştir.

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (SMAR içermeyen):

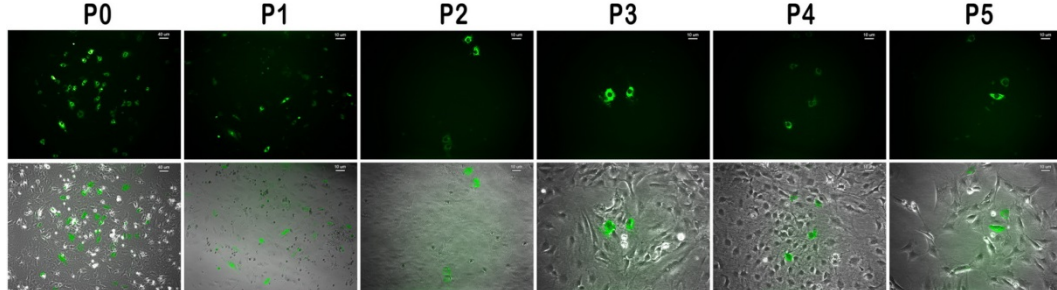


Dondur-çöz sonrası pasajlar (SMAR içermeyen):

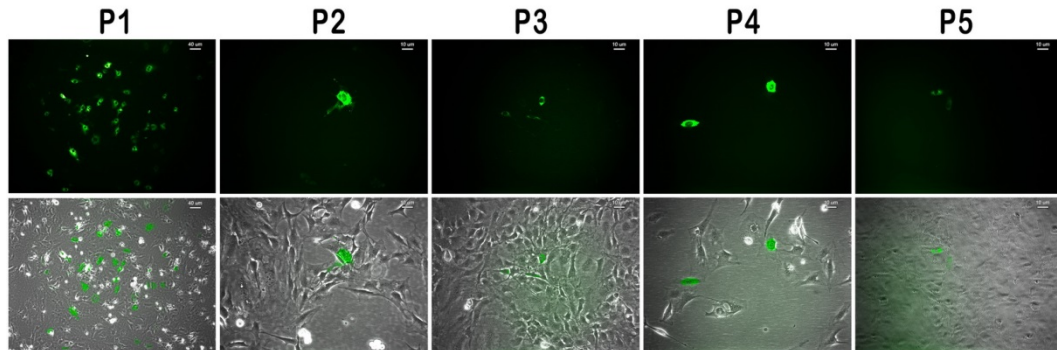


Şekil 4.25. S/MAR içermeyen vektör omurgası (Negatif kontrol).

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (IFNB 830):

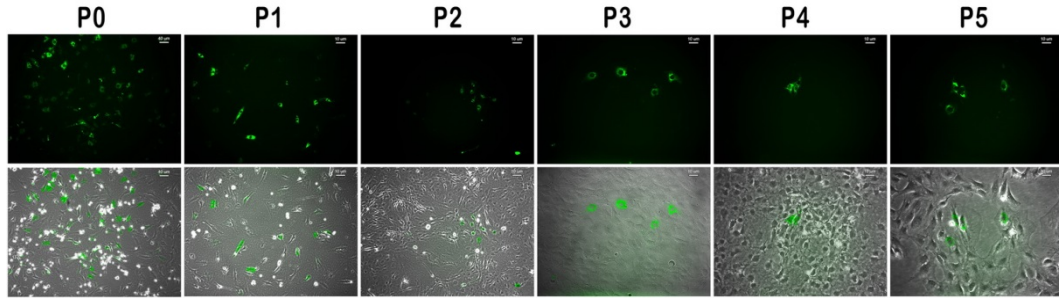


Dondur-çöz sonrası pasajlar (IFNB 830):

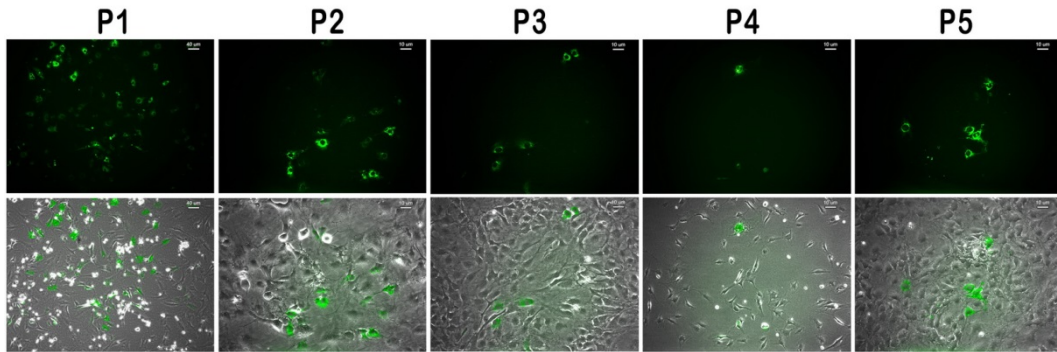


Şekil 4.26. IFNB 830 içeren vektör omurgası.

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (IFNB 314x1):

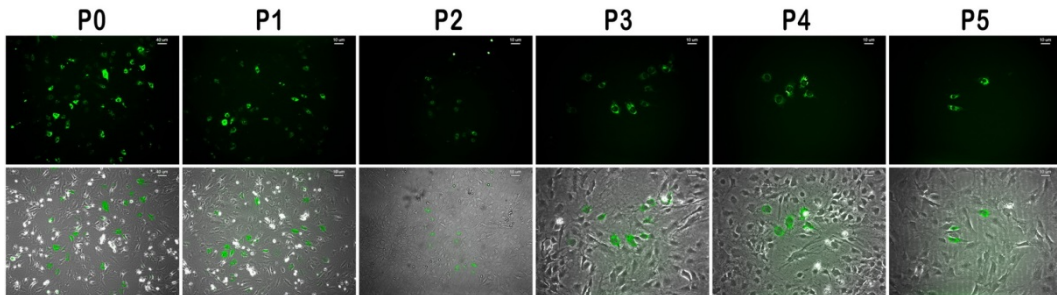


Dondur-çöz sonrası pasajlar (IFNB 314x1):

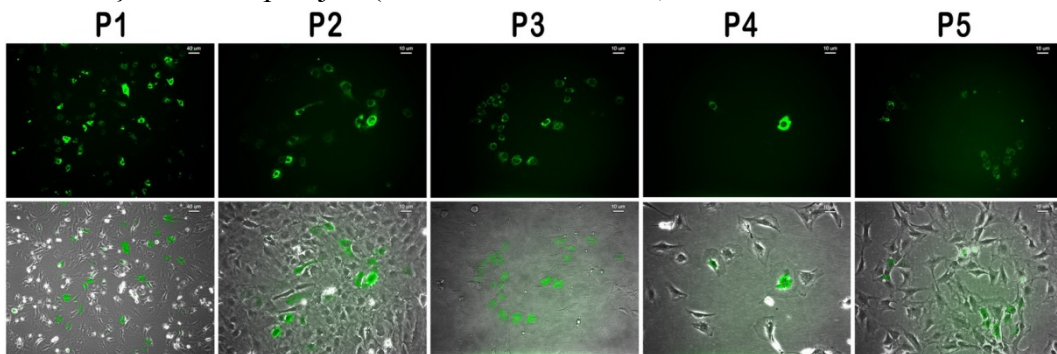


Şekil 4.27. IFNB 314x1 içeren vektör omurgası.

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (IFNB 314x2 - BNBN):

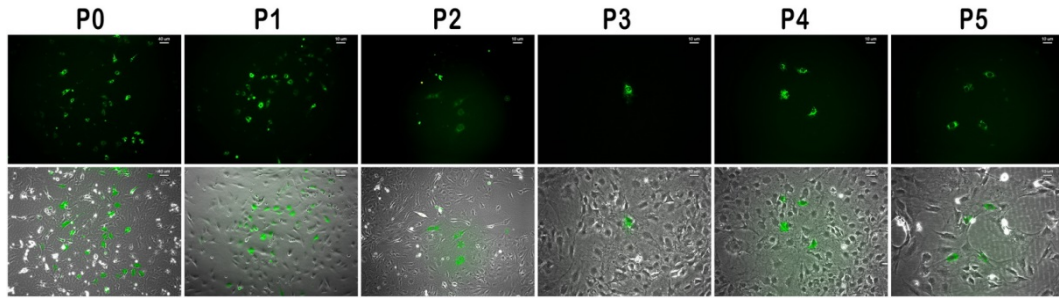


Dondur-çöz sonrası pasajlar (IFNB 314x2 - BNBN):

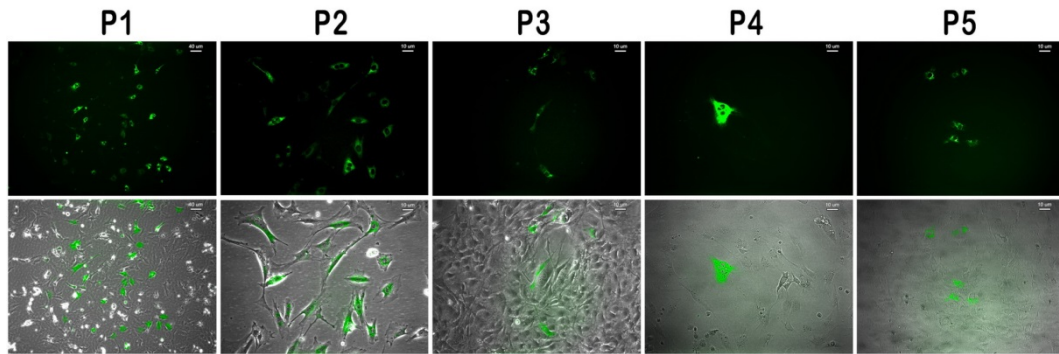


Şekil 4.28. IFNB 314x2 - BNBN içeren vektör omurgası.

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (IFNB 314x2 - BNNB):

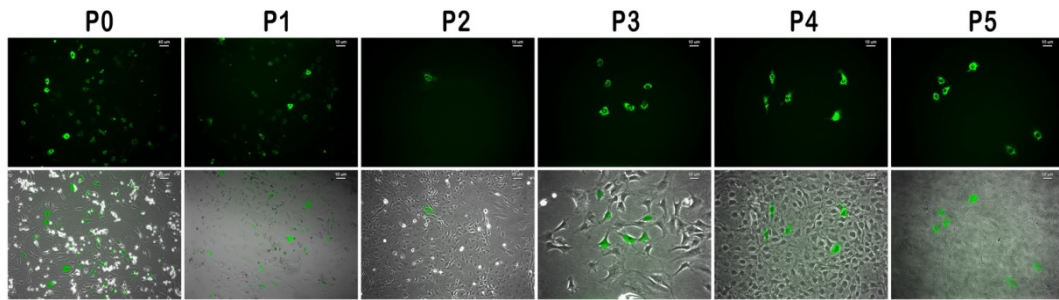


Dondur-çöz sonrası pasajlar (IFNB 314x2 - BNNB):

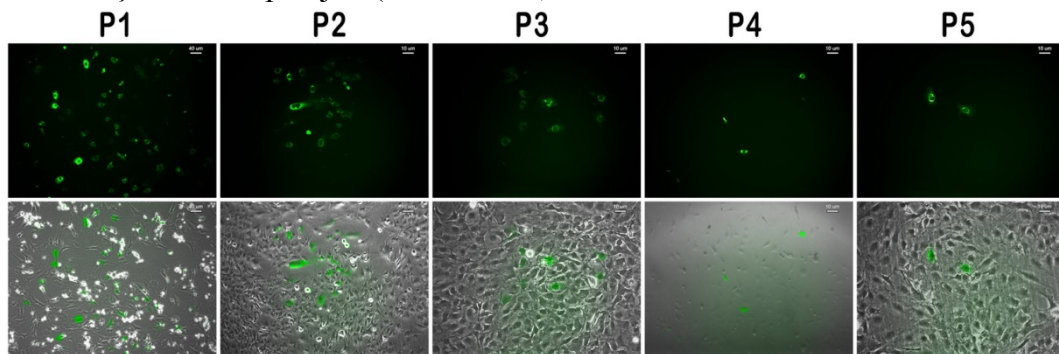


Şekil 4.29. IFNB 314x2 - BNNB içeren vektör omurgası .

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (APOB -BN):

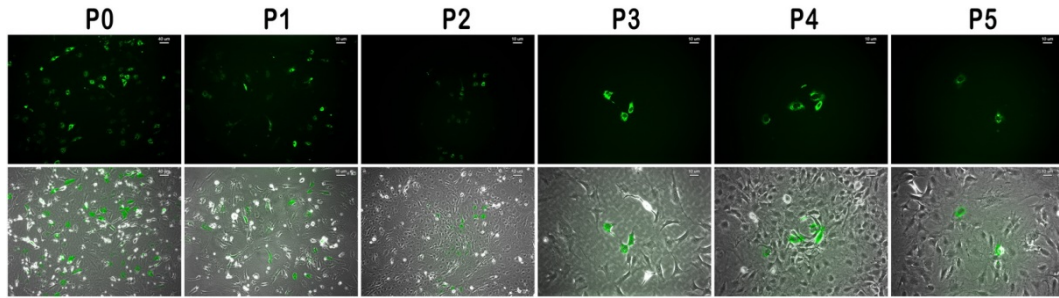


Dondur-çöz sonrası pasajlar (APOB - BN):

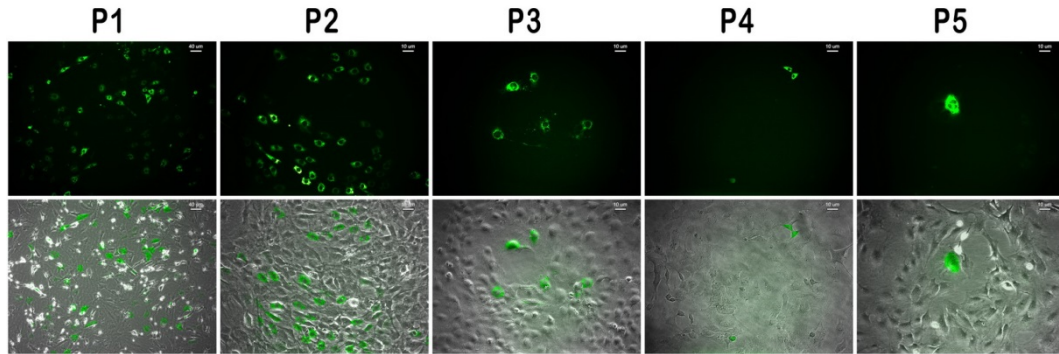


Şekil 4.30. APOB - BN - içeren vektör omurgası.

Devamlı çoğalmakta olan pasajlar (APOB –NB):



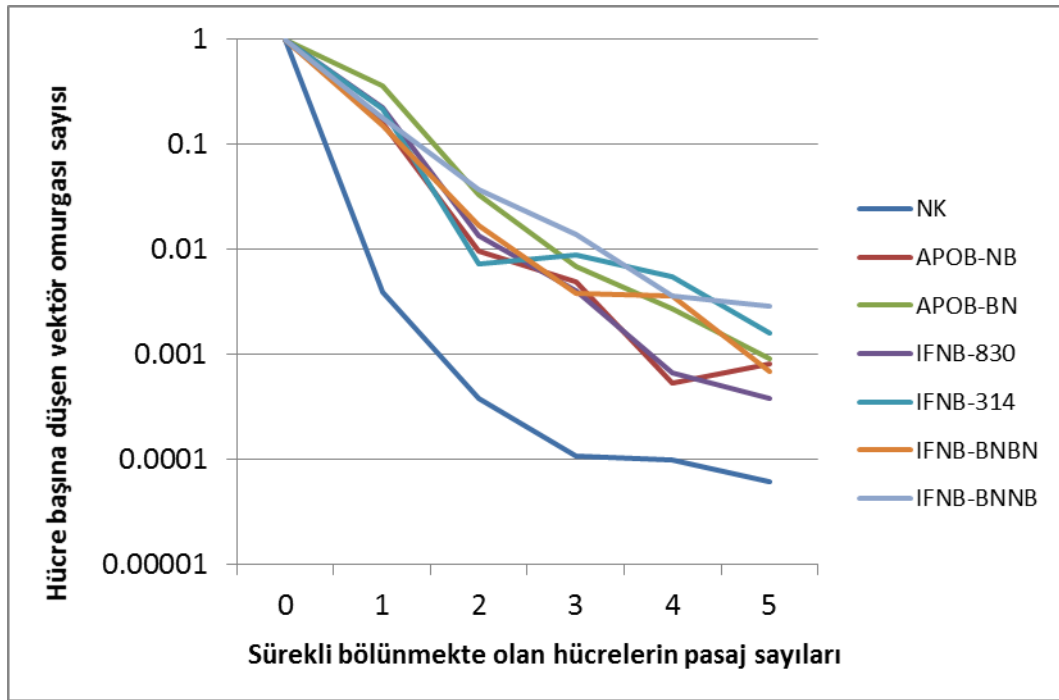
Dondur-çöz sonrası pasajlar (APOB - NB):



Şekil 4.31. APOB – NB içeren vektör omurgası.

Kantitatif Analiz Sonuçları

Farklı S/MAR dizileri içeren vektör omurga yapıları ile transfekte edilen, devamlı çoğalmakta olan ve dondurularak yeniden çözülen 3T3-L1 pasajlarında kantitatif analizler yapılmıştır. Pasajlar boyunca alınan örneklerde, hücre başına düşen plazmid vektör omurga sayısı gerçek zamanlı PZR aracılığı ile kantite edilmiştir. Bölünen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı Şekil 4.32.'de grafik halinde verilmiştir.



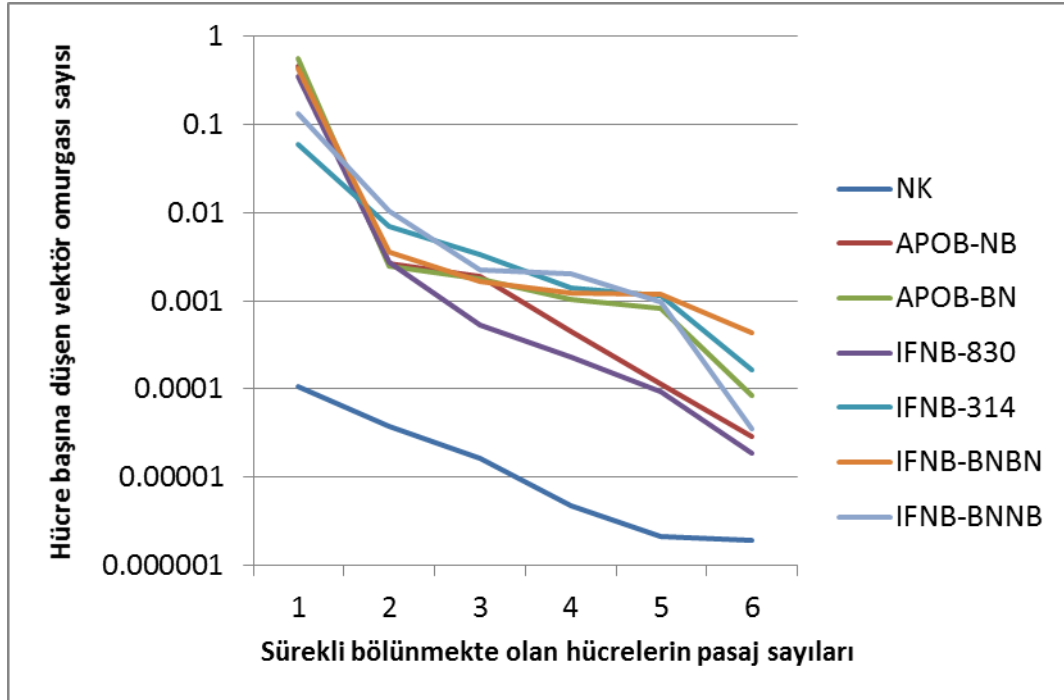
Şekil 4.32. Bölünen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı.

Sürekli bölünen pasajlarda S/MAR dizisi içermeyen vektör omurgası taşıyan negatif kontrol örneğinin 5. pasajında her 10000 hücrede tek bir plazmit var olduğu hesaplanmıştır. S/MAR dizisi içeren örneklerde ise bu miktar değişkenlik göstermekle birlikte en az 100 hücreye bir plazmid kadardır. Plazmid transfeksiyon başarısının yaklaşık olarak % 30 olduğu göz önüne alındığında, 5. pasajın sonunda, her 30 hücreden birinde vektör omurgasının bulunduğu ortaya çıkmaktadır.

S/MAR dizileri içeren vektör omurgaları ile transfekte olan tüm örneklerin 5. pasajındaki plazmit kopya sayıları birbirine yakın olmakla birlikte, IFNB-BNBN S/MAR dizisi içeren plazmit en yüksek kopya sayısına sahiptir.

Dondurularak yeniden çözülen pasajlarda bulunan vektör omurga sayılarının kantitasyonu sonucunda, S/MAR dizisi içermeyen negatif kontrol vektörü ile transfekte hücrelerde, 6. pasajda her bir milyon hücrede tek bir kopya plazmid bulunduğu hesaplanmıştır. 25 cm²'lik hücre kültürü kabında 3 milyon 3T3-L1 hücresi bulunduğu ve transfeksiyon başarısının da yaklaşık % 30 olduğu göz önüne alındığında, 6. pasaj sonunda, her kültür kabında yalnızca tek bir plazmid kalmış

olduğu sonucuna varılabilir. S/MAR dizisi içeren örneklerde bu miktarın 1000 katı kadardır. Dondurularak yeniden çözülen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı Şekil 4.33.'te grafik halinde verilmiştir.

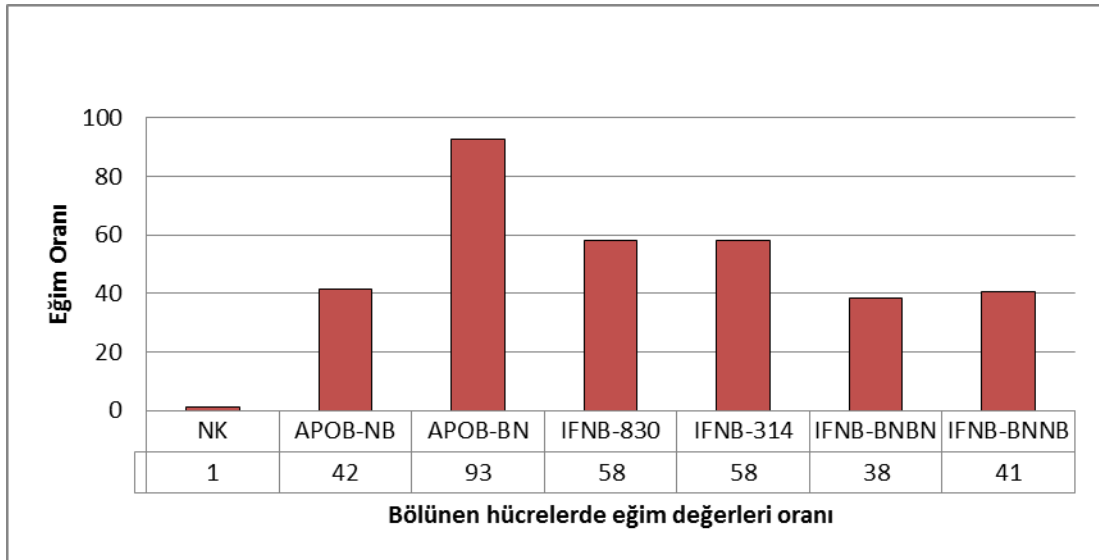


Şekil 4.33. Dondurularak yeniden çözülen pasajlar boyunca her hücre başına düşen vektör omurga sayısı.

Yukarıda verilen iki işlevsel analiz sonuçları, zamana karşı vektör omurga kaybını bir kesir olarak sağlamaktadır. Bu vektör omurga kaybı hızının tüm zaman noktaları dikkate alınarak karşılaştırılabilmesi amacıyla sayısal bir nicel analize gerek duyulmaktadır. Bu amaçla, farklı S/MAR miktar eğrilerinin eğimleri hesaplanmış ve birbirleri ile oranlanmıştır. Eğim, y ekseninde azalmayı ifade eden, 0 ile 1 arasında bir sayısal değerdir. Farklı S/MAR dizilerine ait eğimler, 1 değerine ne kadar yakın ise S/MAR kaybı o denli az, 0'a ne denli yakınsa o derece hızlı vektör kaybı anlamına gelmektedir. Bölünen pasajlar boyunca farklı S/MAR dizilerinin vektör omurga kaybı eğimleri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Bu değerler, S/MAR dizisi içermeyen negatif kontrol örneği eğimine oranlanarak Şekil 4.34.'te grafik olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Bölünen örneklerde farklı S/MAR dizilerinin pasajlar boyunca vektör omurga kaybı eğim değerleri.

NK	APOB-NB	APOB-BN	IFNB-830	IFNB-314	IFNB-BNBN	IFNB-BNNB
-702.0	-16.9	-7.6	-12.1	-12.1	-18.3	-17.3

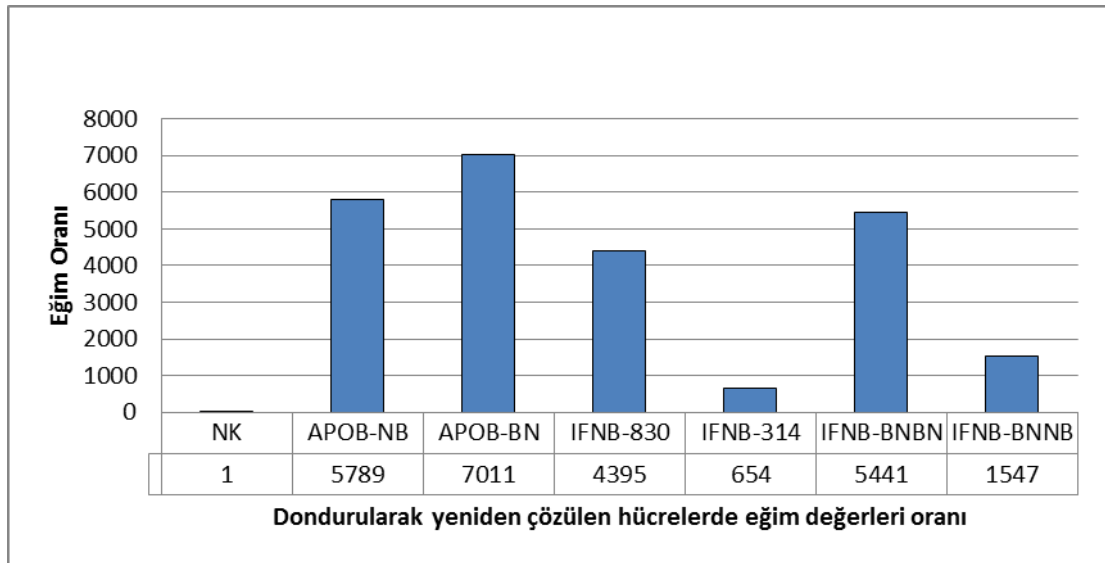


Şekil 4.34. Bölünen pasajlarda S/MAR dizileri eğim değerleri oranı. Vektör omurga kaybı eğim değerleri S/MAR dizisi içermeyen negatif kontrol (NK) vektör eğimine oranlanmıştır.

Dondurularak yeniden çözülen pasajlar boyunca farklı S/MAR dizilerinin vektör omurga kaybı eğimleri Tablo 4.3.'te verilmiştir. Bu değerler, S/MAR dizisi içermeyen negatif kontrol örneği eğimine oranlanarak Şekil 4.35.'te grafik olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. Dondurularak yeniden çözülen örneklerde farklı S/MAR dizilerinin pasajlar boyunca vektör omurga kaybı eğim değerleri.

NK	APOB-NB	APOB-BN	IFNB-830	IFNB-314	IFNB-BNBN	IFNB-BNNB
-38281.0	-6.6	-5.5	-8.7	-58.5	-7.0	-24.7



Şekil 4.35. Dondurularak yeniden çözülen pasajlarda S/MAR dizileri eğitim değerleri oranı. Vektör omurga kaybı eğitim değerleri S/MAR dizisi içermeyen negatif kontrol (NK) vektör eğitimine oranlanmıştır.

Yukarıda sonuçları verilen eğitim analizleri, S/MAR içeren vektör omurgalarının içermeyen negatif kontrole oranla kalıcılığının bölünen hücrelerde 100 kata kadar, dondurularak çözülen pasajlarda ise 10000'e kadar fark ortaya koyduğu anlaşılmaktadır. Bu fark, vektör omurgasında gözlenen kayıp hızına ait bir karşılaştırmadır. Genel sonuç olarak S/MAR kullanılmadığı zaman ortaya çıkan kayıp hızı göz önüne alındığında, farklı S/MAR dizileri arasında kayda değer bir fark olmadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, tez çalışmasında klonlanan ve analiz edilen S/MAR dizilerinin hepsinin yer aldığı vektör omurgalarının kalıcılığını arttırdığını ortaya koymaktadır. Dondurularak çözülen pasajlardan elde edilen değerler, beklentilere daha yakın sonuç vermiştir. Sonraki aşamalarda vektör omurga uygulamalarında kullanılmak üzere APOB-BN ve IFNB 314x2 (BNBN) dizilerini içeren yapılar seçilmiştir.

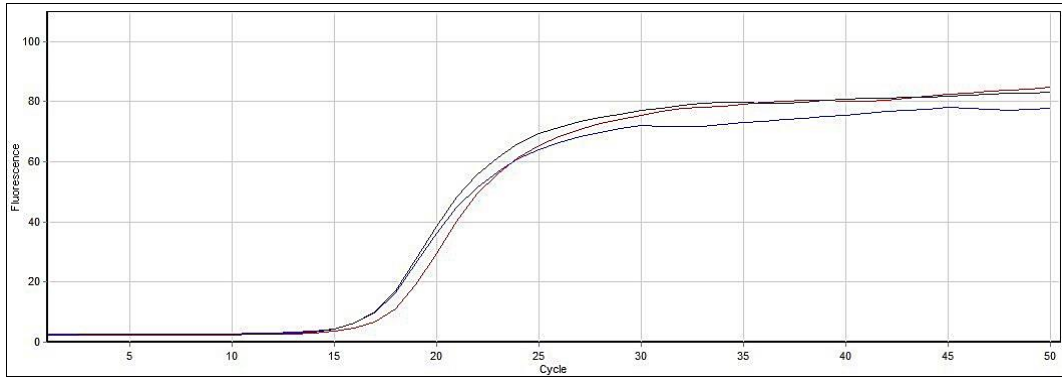
4.7. Rekombinant Protein İfadesi Modeli Olarak Kullanılmak Üzere Miyostatin ve Dominant Negatif Miyostatin cDNAsının Eldesi, Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Olgun yağ hücrelerinde rekombinant protein üretimi etkinliğinin gösterilmesi amacıyla miyostatin sinyal molekülü bir model protein olarak seçilmiştir. Miyostatin, kas dokusu farklılaşma yolağının bir negatif regülatörüdür (119) . Kas dokusu farklılaşmasını sınırlayıcı yönde fizyolojik etkiye sahiptir. Dominant negatif etkiye sahip miyostatin izoformu ise bu inhibitör etkiyi ortadan kaldıracı yönde etkilidir. Model olarak seçilen dominant negatif etkili miyostatin izoformunun yağ hücrelerinden salgılanarak, C2C12 miyoblast hücre farklılaşmasını pozitif yönde etkilemesi beklenmektedir.

4.7.1. Miyostatin cDNAsının Sentezlenmesi ve Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

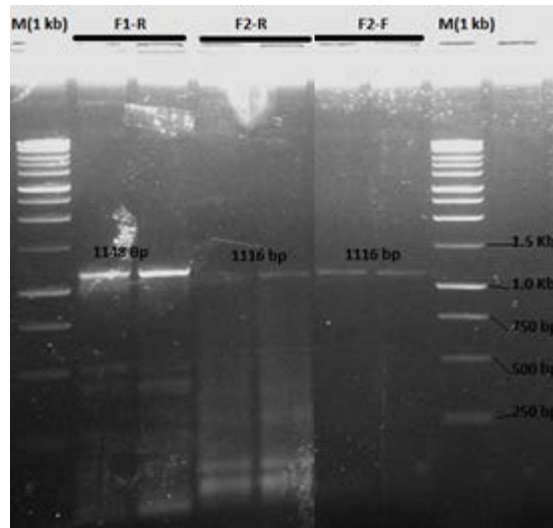
Miyostatin en yüksek seviyede kas, kalp ve rahim dokularında ifade edildiği gibi yağ dokusunda da sınırlı miktarda sentezlenerek salgılanmaktadır (99) . Miyostatin cDNAsının klonlanabilmesi için 2 günlük sıçandan kalp, bacak kasları, ve supraskapular yağ dokuları alındı. Bu dokulardan total RNA izolasyonu yapıldı. Uygun kalite kontrolü sonrasında cDNA sentezi yapıldı ve gerçek zamanlı PZR ile miyostatin mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Kalp, kas ve yağ dokularında miyostatin amplifikasyon eğrisi Şekil 4.36.'da verilmiştir. Amplifikasyon eğrilerinden de anlaşılacağı üzere, dokular arasında gen ifadesi bakımından bir fark görülmemiştir.

Yağ dokusundan izole edilen cDNA kütüphanesinden klonlama primerleri ile tam uzunlukta miyostatin cDNA amplifikasyonu yapılmıştır. MSTN cDNAsı, pGEM-T easy klonlama vektörüne ve sonrasında da pcDNA3.1(+) memeli ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Klonlama aşamaları tamamlanan bu bu MSTN cDNAsı, MSTN genine özgül öncü diziyi de içermektedir. Bu öncü dizinin değiştirilebilmesi amacıyla 5' ve 3' uclarında, sırasıyla, *EcoRI* ve *ApaI* enzim kesim bölgeleri bulunan klonlama primerleri kullanılmıştır.



Şekil 4.36. Kalp, kas, ve yağ dokularından elde edilen cDNA'lardan MSTN gen ifadesinin karşılaştırılması. Her üç dokuda da birbirlerine çok yakın miktarlarda MSTN mRNA ifadesi gözlenmiştir.

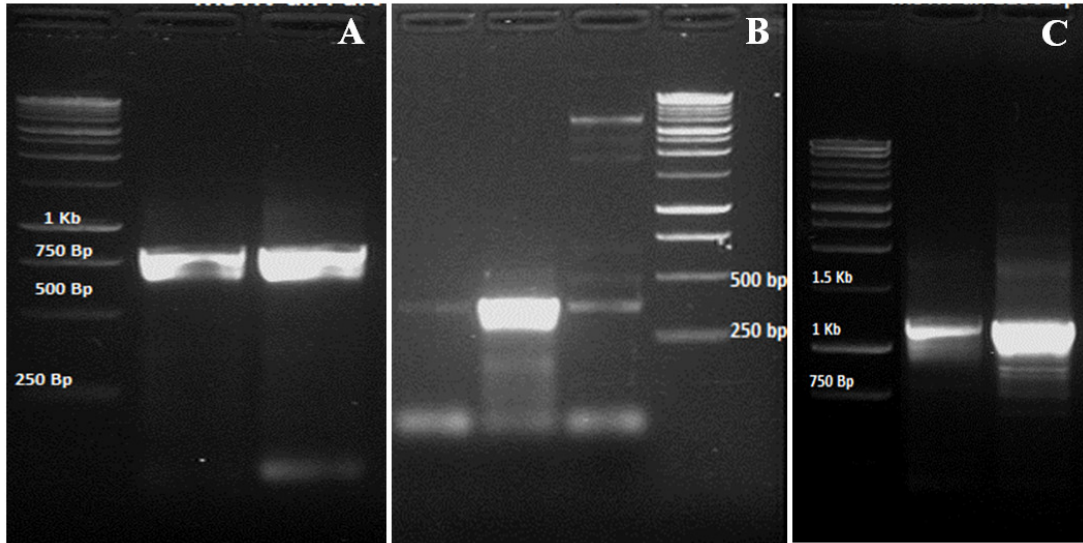
Bu klonlama çalışmalarında yürütülen MSTN PZR sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4.37.). Klonlama çalışmasını takiben, DNA dizi analizi ile cDNA kalite kontrolü yapılmıştır.



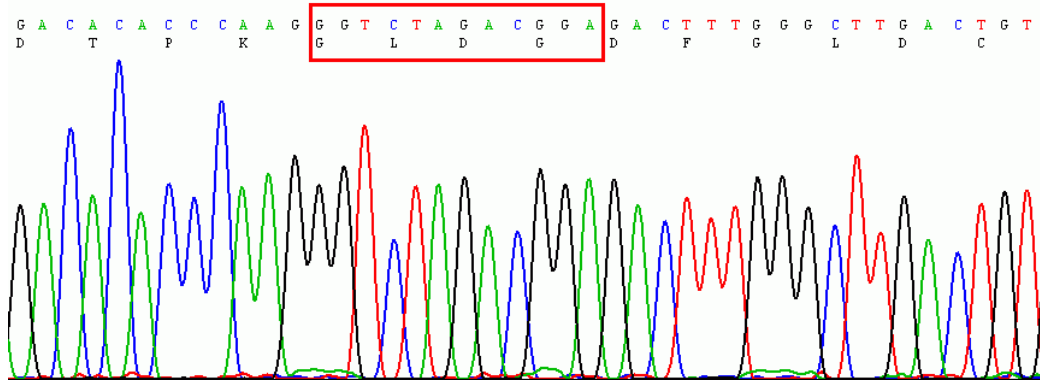
Şekil 4.37. MSTN cDNA sentezi. Lider dizisi içeren (F1R – 1148 bç) ve içermeyen (F2R ve F2F, 1116 bç) MSTN cDNA ampliconları agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Marker: 1Kb).

4.7.2. Dominant Negatif Etkili Miyostatin cDNAsının Sentezlenmesi ve Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Dominant Negatif Etkili Miyostatin (MSTNdn) bloke edici anti-miyostatin antikoları gibi etki göstermektedir (7) . Bu proteinin sentezlenmesi için Zhu ve ark. tarafından uygulanan yaklaşım kullanıldı (7) . Bu deneyde miyostatin cDNAsını sentezlemek için tasarlanan primerler ile birlikte yeni PZR aracılıklı mutagenез yaklaşımı uygulanarak MSTN proteininin 4X-4YY amino asitlerinde yer alan RSRR dizisi, mutasyon yaratarak DLDG dizisine dönüştürüldü. *Gene SOEing* yöntemi ile gerçekleştirilen PZR aracılıklı mutagenезde, cDNA'nın 5' ve 3' fragmanları mutagenik primerlerle çoğaltıldı ve iki kısım PZR aracılığı ile birleştirildi. (Şekil 4.38.). Elde edilen MSTNdn cDNAsı pcDNA3.1 (+) memeli ifade vektörüne klonlanarak DNA dizi analizi ile kalite kontrolü yapıldı. Bu şekilde mutagenезin başarılı olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 4.39.).

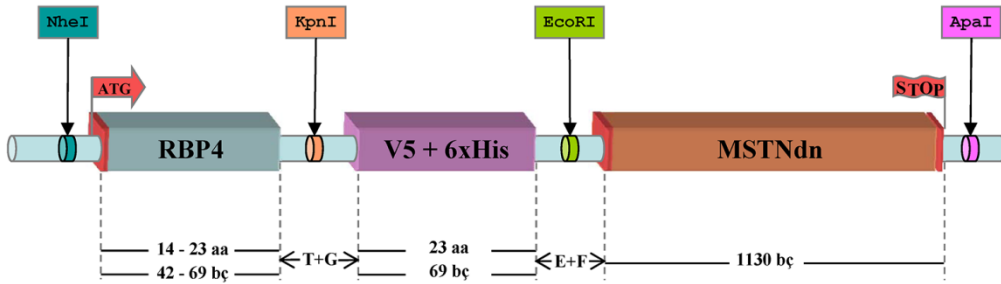


Şekil 4.38. PZR aracılıklı mutagenез ile MSTNdn eldesi. *Gene SOEing in vitro* mutagenез tekniği uygulanarak miyostatin cDNAsından 5' ve 3' kısımları halinde sırasıyla 750 bç ve 370 bç'lik mutasyon taşıyan fragmanlar çoğaltılmıştır. (A ve B) Safılaştırmayı takiben, bu iki kısmın birleştirilmesi ile yaklaşık 1100 bç uzunluğunda MSTNdn cDNAsı elde edilmiştir (C), (Marker:1 Kb).



Şekil 4.39. MSTNdn DNA dizi analizi sonucu. PZR aracılıklı mutagenез ile MSTN cDNA üzerinde yer alan RSRR dizisi, mutasyon yaratarak DLDG dizisine dönüştürüldü.

Çalışmada işlevsel model olarak kullanılmak üzere yukarıda oluşturulan MSTNdn cDNAsı, *EcoRI* ve *ApaI* restriksiyon enzim kesimi yardım ile vektör omurgasına aktarıldı. Bu vektör omurgası okuma çerçevesi, 5'→3' yönünde sırasıyla, RBP4 öncü dizisi, V5 epitopu, 6xHis dizisi ve öncü dizisi olmayan MSTNdn cDNAsı içermektedir. Bu yapı aşağıda Şekil 4.40.'ta şematize edilmiştir.

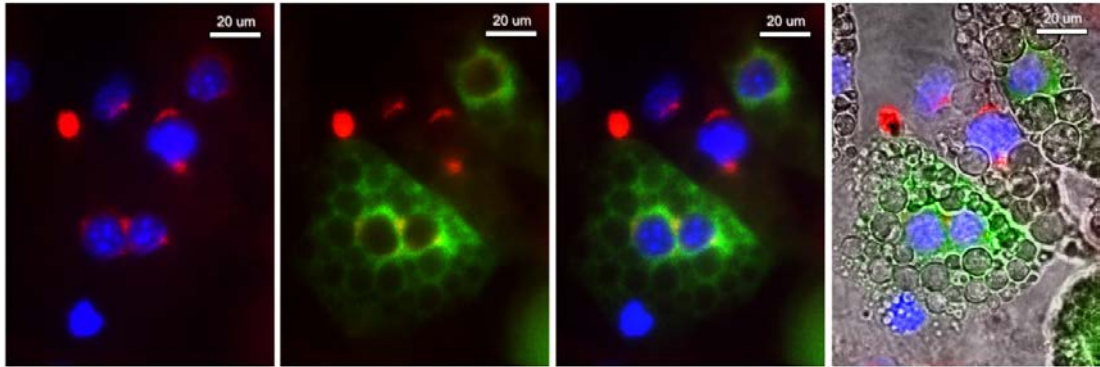


Şekil 4.40. İşlevsel analiz için rekombinant gen modeli. Yağ hücrelerine ait RBP4 salgısal öncü diziyeye ardışık olarak yerleştirilen V5 ve 6x histidin dizileri yeni rekombinant proteinin N ucunda bulunmaktadır. Bu iki sentetik gen parçasının C-terminalinde ise öncü dizisinden arındırılmış MSTNdn cDNAsı yerleştirilmiştir (1130 bp).

4.8. Olgun Yağ Hücrelerinde MSTNdn Protein İfadesinin Sağlanması ve Takibi

Yukarıda sıralanan ve EGFP rekombinant proteininin üretim ve salgı kinetiğini içeren sonuçlar, çoğalmakta olan yağ öncülü hücrelerde (preadipositler) gösterilmiştir. Rekombinant protein üretimi ve salgısının farklılaşmış ve olgun yağ hücrelerinde daha kalıcı olması beklenmektedir. Bu kalıcılığın nedenleri arasında bu hücrelerin bölünmemesi de sayılabilir. Bölünmeyen ve farklılaşmış hücrelerde epizomal gen ifadesinin süresinin takibi amacıyla tasarlanan MSTNdn içeren yapı, olgun yağ hücrelerine aktarılmıştır.

Hazırlanan rekombinant protein içeren vektörün hücrede ifadesinin kalıcılığının takibi için 3T3-L1 hücrelerine RBP4+ V5+ MSTNdn içeren pcDNA3.1 transfekte edildi ve farklılaştırıldı. Transfeksiyon sonrası farklılaştırma işlemi 4.5.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Olgun yağ hücrelerinin 21 günlük takip süresinin sonunda tespit edilerek MSTNdn ifadesinin gösterilmesine yönelik olarak V5 epitopuna hedefli immünfloresan boyama yapıldı. Bu görüntüleme çalışmasında V5 epitopu yanında golgi ve çekirdek de gösterilmiştir (Şekil 4.41.).

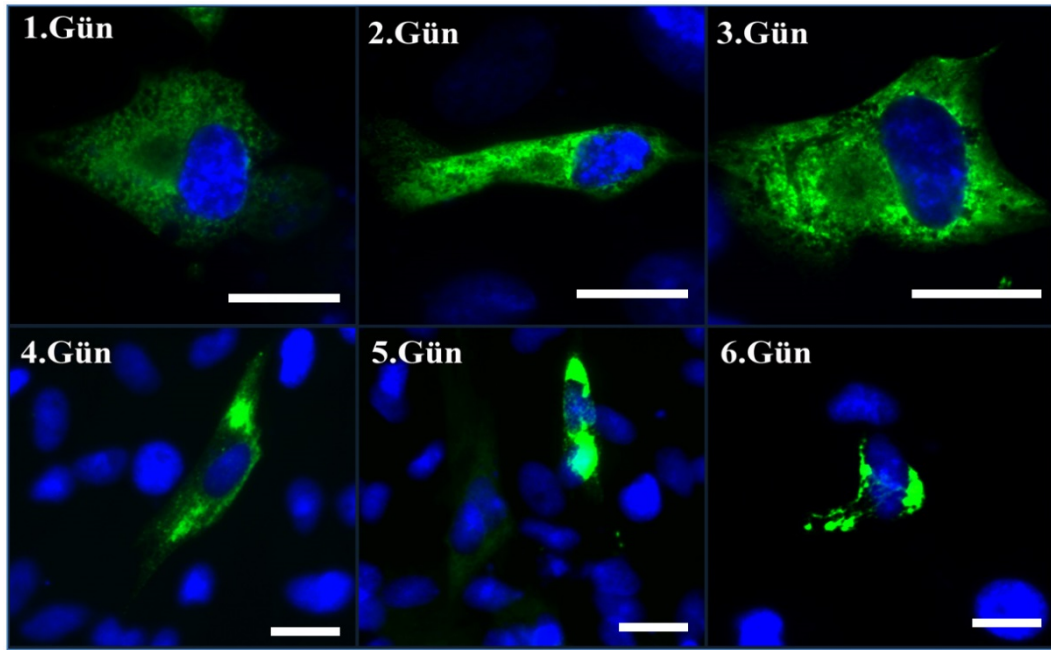


Şekil 4.41. Olgun yağ hücresinde MSTNdn ifadesinin sağlanması. 3T3-L1 adiposit hücrelerine gen transferi uygulandıktan sonra farklılaşma indüklenerek 21 gün boyunca olgun yağ hücrelerinin takibi yapıldı. Süreç sonunda olgun yağ hücreleri içinde MSTNdn protein ifadesi görüntüledi (yeşil: V5, kırmızı: golgi, mavi, çekirdek, Çubuk = 20 µm).

V5 antikoru ile yapılan boyama, rekombinant proteinin olgun yağ hücreleri içinde ifadesinin devam ettiğini göstermektedir. 3T3-L1 hücrelerinde epizomal gen transferi sonrasında rekombinant protein ifadesinin bölünmekte olan hücrelerde 72. saat ve sonrasında azalarak kaybolması beklenirken, olgun yağ hücrelerinde transfeksiyonun üçüncü haftasında halen devam etmektedir.

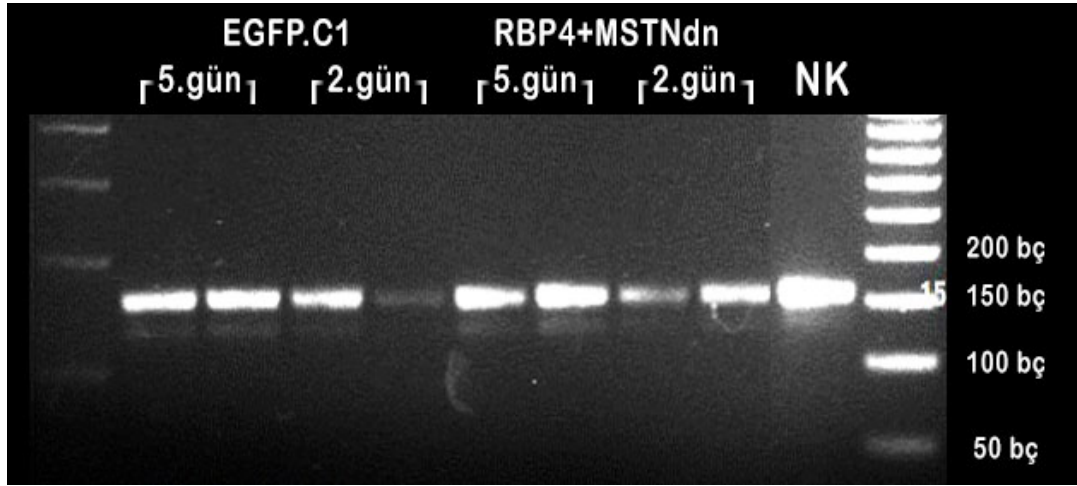
4.9. Salgısal Protein Yolağı Aracılığı ile Rekombinant Protein İfadesine Bağlı Olası ER Stres Oluşumunun İncelenmesi

Tez çalışması amacı olan hücresel salgı yolağı kullanımı aracılığı ile yağ hücrelerinde rekombinant protein üretimi ve salgılanmasının sağlanması, hücre içinde ER/golgi klasik salgı yolağının işlevsel başarısına bağlıdır. Yağ öncülü hücrelerde yapılan gen transferi çalışmalarında, zamana karşı gözlemlerde, transgeni yüksek miktarda ifade eden bazı hücrelerde rekombinant proteinin hücre içinde biriktiği yönünde bulgular edinilmiştir (Şekil 4.42.).



Şekil 4.42. Öncü sinyali ve MSTNdn içeren yapıları ifade eden hücrelerde gözlenen bazı morfolojik değişimler. Zamana karşı yapılan protein ifadesi takibi çalışmalarında, gen transferinin ikinci gününde görüldüğü üzere retiküler ER yapısı izlenmekte ve ifade olan protein yaygın şekilde ER'ye lokalize olmaktadır. dördüncü gün görüntüsüne sahip hücrede rekombinant proteini ER'de yoğun şekilde bulunmakla birlikte perinükleer golgi bölgesine geçişi gözlemlenmektedir. Protein ifadesinin dördünü ve beşinci gününde yoğun protein agregatlarını andıran bir görüntü izlenmektedir. Ancak, bu görüntü yalnızca yüksek miktarda protein ifade eden hücrelerde görülmektedir. Beşinci güne ait görüntüde seçileceği üzere sağlıklı morfolojide hücreler de yaygın olarak seçilmektedir (Çubuk = 8 μ m).

Yukarıda yer alan gözlemden yola çıkarak hazırlanan vektör yapılarının hücrelerde ER stresi oluşumuna yol açıp açmadığı incelendi. Bu amaçla hücresel ER stres algısını başlatan XBP1 mRNA'sının sitoplazmik kırılma durumu incelendi. XBP1 mRNA'sına ait PZR sonuçları aşağıda Şekil 4.43.'te verilmiştir.



Şekil 4.43. Transfeksiyona bağlı ER stresinin değerlendirilmesi. Transfeksiyon işleminin 2. ve 5. günlerinde hücrelerde XBP1 ER stres belirteci PZR ile analiz edilmiştir. NK= transfeksiyon uygulanmayan hücre, EGFP.C1, salgısal yolağa girmeyen EGFP ifade eden bir vektördür. İki vektör arasında ER stresi gelişimi bakımından bir fark bulunmamıştır (Marker: 50bç).

Kullanılan yöntem ER stresi oluşumuna neden olmamaktadır. Şekil 4.42.'de 5. güne ait görüntüde de görüleceği üzere yalnızca bazı hücrelerde görülmektedir. Bu durumun gen transferinin doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek kopya sayısında gen alan hücreler daha fazla protein ifadesi yapmakta, diğer yünden, düşük kopya sayısında vektör yapısı alan hücreler ise daha az miktarda rekombinant protein üretmektedir. Şekil 4.43.'te yer alan ve daha az kopya gen almış (silik görünümlü) olduğu düşünülen adiposit öncülü hücrenin sitoplazmasının retiküler ER yapısını koruduğu gözlenmektedir. 6. güne gelindiğinde yaygın sitoplazmik agregatlar sergileyen hücrelerin çekirdek morfolojileri sağlıklı görülmekte, apoptoz ile ilgili bir bulguya rastlanmamaktadır.

4.10. MSTNdn Yapısının C2C12 Miyoblast Hücrelerinde Etkinliğinin Gösterilmesi

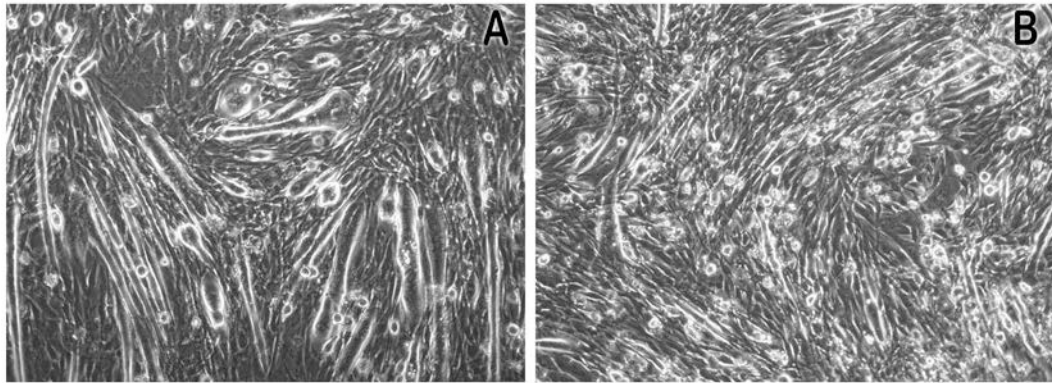
Çalışma kapsamında, olgun yağ hücreleri tarafından üretimi sağlanmak üzere seçilen dominant-negatif etkili miyostatin yapısının etkinliğinin C2C12 miyoblast hücrelerinde gösterilmesi amaçlanmıştır. C2C12 miyoblast hücrelerinin farklılaşma

kinetiğini etkilemesi beklenen gen yapısı, bu hücelere aktarılarak işlevsel özellikleri incelenmiştir.

Hücre kültürü şartlarında, çoğalmakta olan C2C12 hücelerine S/MAR dizileri içeren MSTNdn cDNA'sı pcDNA3.1 vektörü üzerinde elektroporasyon yolu ile aktarılmıştır. Gen transferi sonrasında C2C12 hüceleri farklılaşmaya bırakılmış ve yedi gün boyunca morfolojik değişimleri takip edilmiştir. Bu sürecin sonunda hücre kültürlerinden mRNA izolasyonu yapılarak kas farklılaşma sürecinin moleküler belirteçlerinin gen ifadeleri incelenmiştir.

4.10.1. MSTNdn Yapısının C2C12 Farklılaşma Sürecine Morfolojik Etkisi

C2C12 hüceleri MSTNdn ile transfeksiyon sonrasında farklılaşmanın yedinci gününe dek izlendi. MSTNdn ile transfekte C2C12 hücelerinde miyotüp oluşumunun daha hızlı gerçekleştiği gözlemlendi. Kontrol (transfekte edilmemiş C2C12) hücelerine oranla daha uzun miyotüp yapıları izlenmekle birlikte, miyotüp yapılarının içinde yer alan çekirdek sayılarının da daha fazla olduğu gözlemlendi. MSTNdn ile transfekte C2C12 hücelerinin daha fazla füzyon gerçekleştirdiği gözlemlendi (Şekil 4.44.)

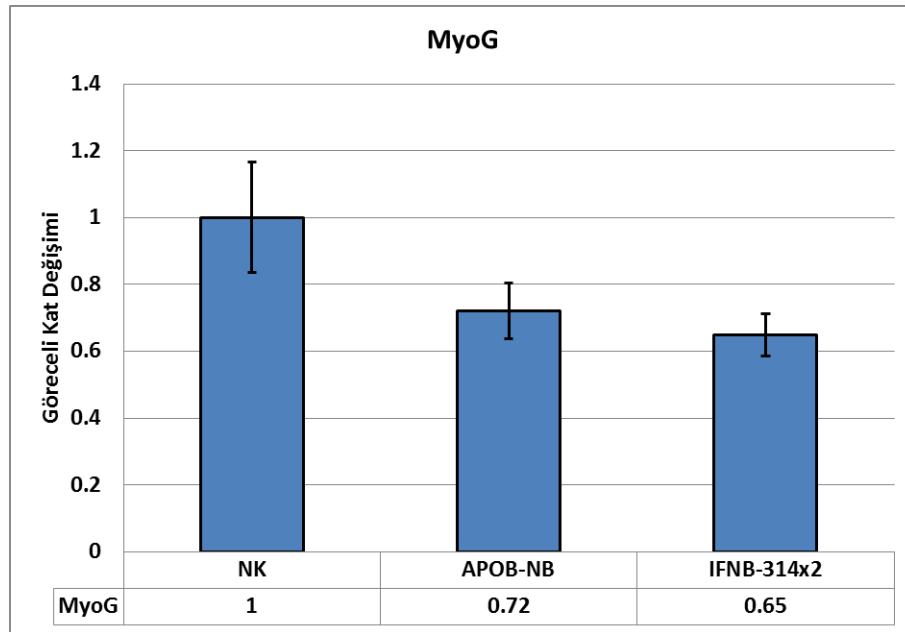


Şekil 4.44. MSTNdn yapısının C2C12 hücelerinde farklılaşma morfolojisi üzerine etkileri. *IFN β* S/MAR dizisi içeren MSTNdn vektör yapısı ile transfekte olan C2C12 hücelerinin (A) kontrol hücelere göre (B) daha uzun ve daha fazla miyotüp oluşturdukları gözlemlendi.

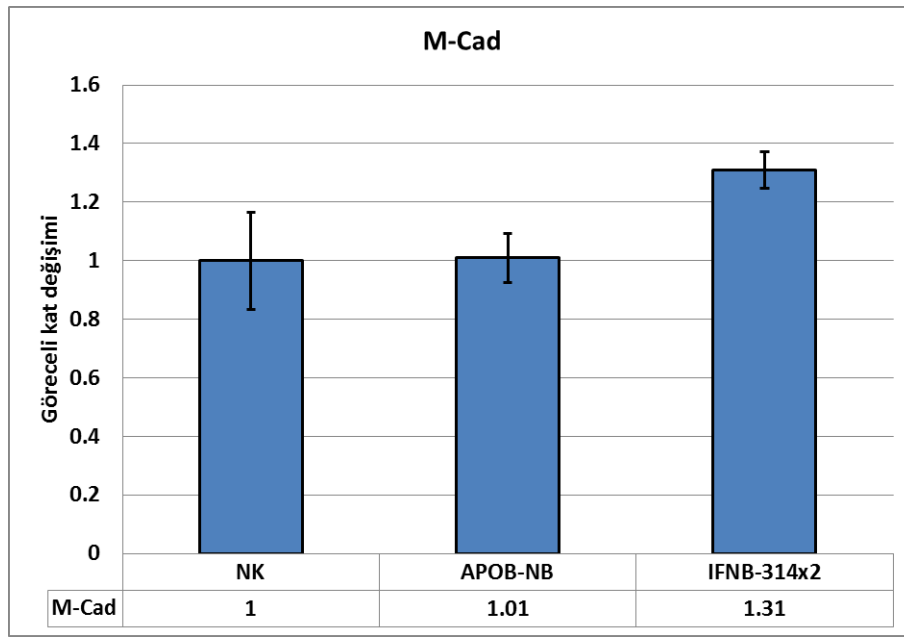
4.10.2. Mstndn Yapısının C2C12 Hücrelerinde Kas Farklılaşma Belirteçleri Üzerine Etkisi

MSTNdn ile transfekte edilen ve kontrol C2C12 hücrelerinden farklılaşmanın 7. gününde mRNA izole edilerek kas farklılaşma sürecinin temel belirteçlerinin gerçek zamanlı PZR ile karşılaştırması yapıldı.

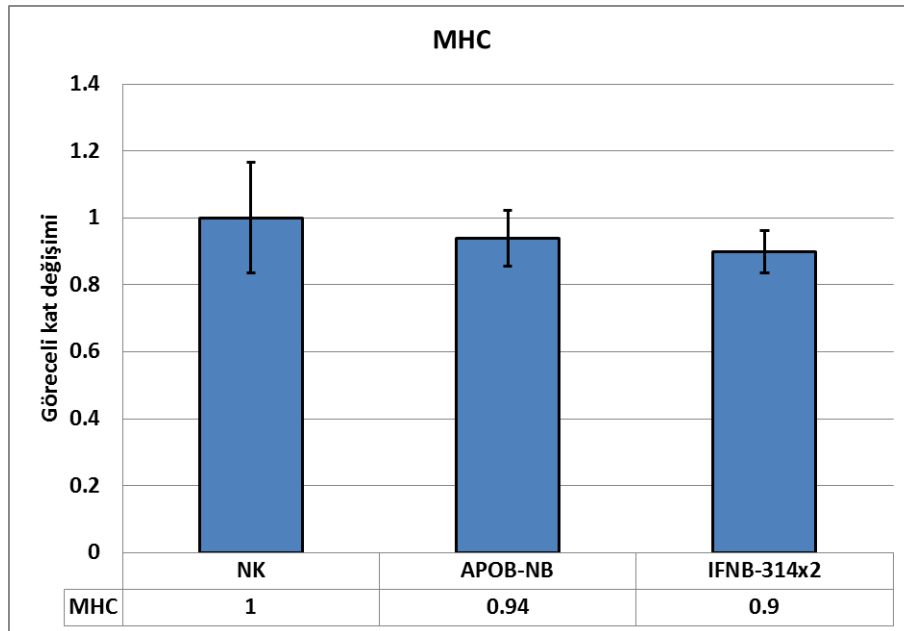
Kas farklılaşma programı sürecinde miyotüp olgunlaşmasının belirteci niteliğinde olan myogenin ifadesi analiz edildi. MSTNdn ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde myogenin ifadesinin kontrol C2C12 hücrelerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.45.). Myogenin yanında, ifadesi incelenen ve bir füzyon belirteci olan M-kaderin (*M-Cad*) gen ifadesinin *IFN β* S/MAR dizisi içeren örneklerde artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.46.). Bu bulgu, morfolojik gözlemleri destekler niteliktedir. Kas farklılaşma sürecinin en önemli belirteçlerinden biri olan miyozin ağır zincir (*MHC*) ifadesi ise örnekler arasında bir farklılık sergilemedi (Şekil 4.47.).



Şekil 4.45. MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde miyogenik regülatör faktörlerinden miyogenin ifadesi.



Şekil 4.46. MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde füzyon belirteci olan M-Kaderin ifadesi.

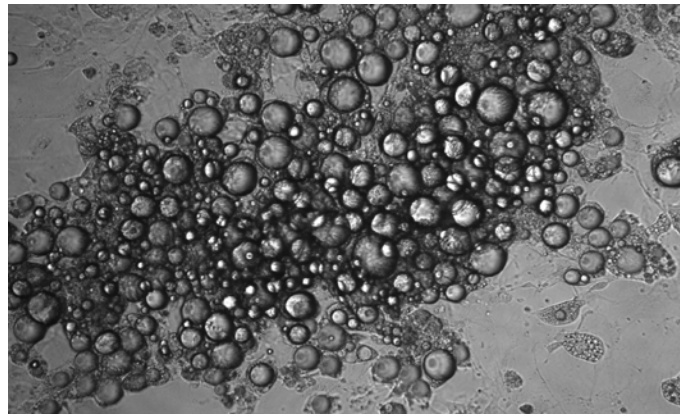


Şekil 4.47. MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilen C2C12 hücrelerinde ve kontrol hücrelerde farklılaşmanın 7. gününde miyozin ağır zincir ifadesi.

Gen ifade analizlerinin sonuçları gözlenen morfolojik sonuçlarla tam bir uyum sergilememektedir. Morfolojik olarak MSTNdn etkisi ile gözlenen miyotüp oluşumu ve füzyon artışı bir füzyon belirteci olan M-kaderin ifadesi ile uyumludur. Ancak, MSTNdn nin hücre fizyolojisinde oluşturması beklenen etki doğrultusunda gerçekleşmesi gereken myogenin artışı gözlenmemiştir.

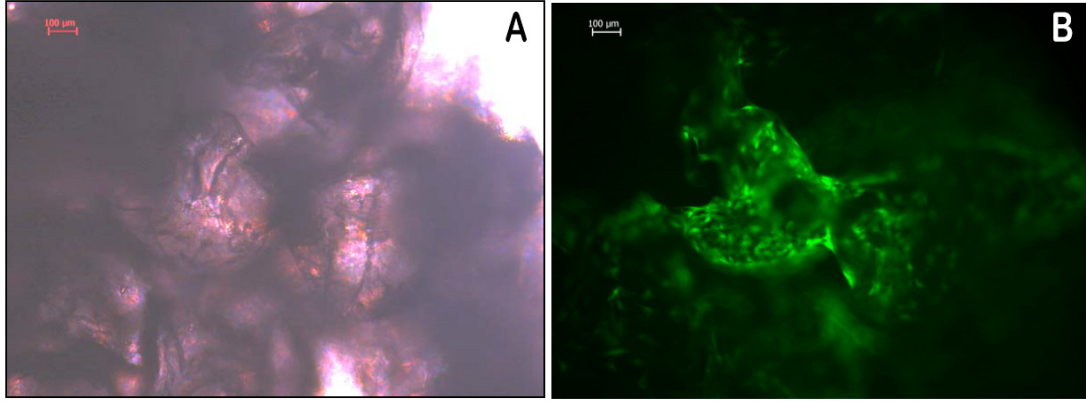
4.11. Olgun Yağ hücrelerinin Rekombinant Protein Üretim Etkinliğinin Gösterilmesi

Yağ hücrelerinin rekombinant protein üretimi, salgısı ve işlevsel etkinliğinin gösterilmesi amacıyla 3T3-L1 hücreleri kullanıldı. 3T3-L1 hücrelerinin hazırlanan vektör omurgası aktarımı sonrasında C2C12 hücreleri ile bir arada kültür edilmesi planlandı. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sonrasında C2C12 hücrelerinin bulunduğu ortama aktarılabilmesi gerekmektedir. Ancak yağ hücreleri farklılaşma sonrasında enzim veya mekanik yolla buldukları ortamdan kaldırılamazlar. Benzer nedenle, farklılaşan 3T3-L1 adipositleri olgunlaştıkça yağ içeriklerinin de artmasına bağlı olarak tutunma özellikleri azalmaktadır (Şekil 4.48.). Bu engeli aşmak ve hücrelerin maruz kalabilecekleri travma riskini en aza indirmek amacıyla gen transferi sonrasında 3T3-L1 hücreleri biyouyumlu iskelet yapıları içinde (PLGA *scaffold*) farklılaştırılmıştır.



Şekil 4.48. 3T3-L1 hücrelerin farklılaşmanın birinci ayında morfolojileri. 3T3-L1 hücreleri, farklılaşmanın birinci ayının sonunda monolokuler yağ damlacıkları içermekte ve kültür kabına tutunma nitelikleri de hızla azalmaktadır.

PLGA biyouyumlu iskele içinde farklılaştırılan 3T3-L1 hücrelerinin taşınabilmeleri ve fiziksel dayanıklılığı çok daha fazladır. Şekil 4.49.'da PLGA iskelesi içinde farklılaştırılmış ve EGFP geni ifade eden olgun 3T3-L1 yağ hücreleri görülmektedir.

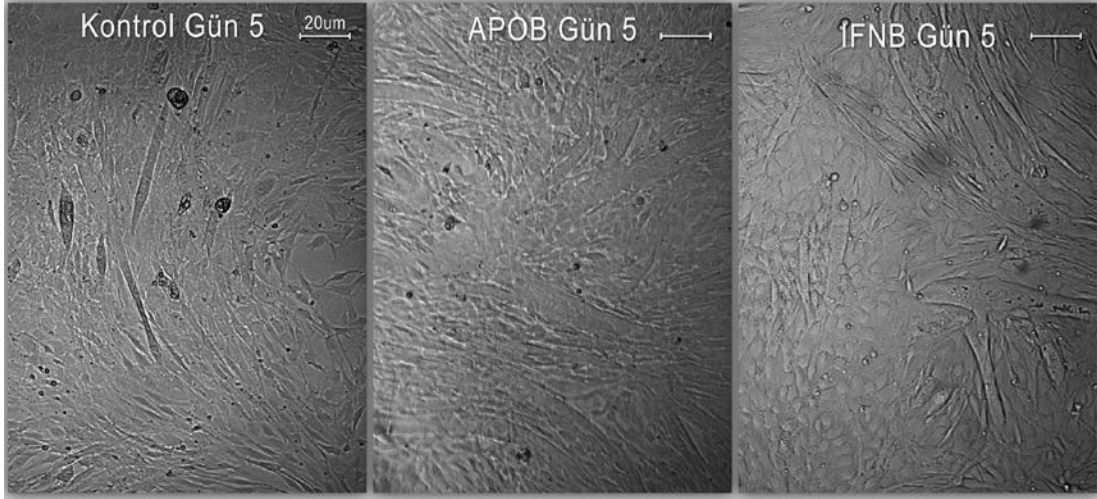


Şekil 4.49. PLGA yapıları içinde farklılaştırılmış yağ hücreleri. 3T3-L1 adipositlerin EGFP.C1 plazmid vektörü aktarımından sonra PLGA iskeletleri üzerine aktarılmış ve hücre kültüründe farklılaşmaya bırakılmıştır. Farklılaşma süreci sonunda fikse edilen yapılar yağ veziküllerinin gösterilebilmesi amacıyla *Red Oil O* ile boyanmıştır (A). Aynı hücrelerin içermekte oldukları EGFP proteini floresan mikroskopisi ile gösterilmiştir (B).

4.11.1. Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen C2C12 Hücrelerinin Morfolojik Farklılaşma Bulguları

MSTNdn vektör yapıları ile transfekte edilerek farklılaştırılan 3T3-L1 hücreleri C2C12 miyoblast hücreleri ile birlikte PLGA iskeletlerin içinde kültüre edilmiştir. Her farklılaşma deney seti 7 gün sürdürülmüştür. MSTNdn vektörü içeren 3T3-L1 hücreleri, farklılaşmakta olan C2C12 hücreleri ile birlikte kültüre edilmiş, farklılaşmanın 7. günü, 3T3-L1 hücreleri yeni bir C2C12 kültürüne aktararak, farklılaşma tekrar indüklenmiştir. Bu şekilde 4 hafta boyunca 4 ardışık C2C12 kültürü aynı 3T3-L1 hücreleri ile farklılaştırılmıştır. Bu ko-kültür deneyleri sunucunda C2C12 miyoblastlarının farklılaşma morfolojileri incelenmiş ve görüntülenmiştir. Deney sonucunda C2C12 miyoblastlarında farklılaşma sürecinin

etkilendiği, ve daha büyük ve uzun miyotüp yapıları oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.50.).



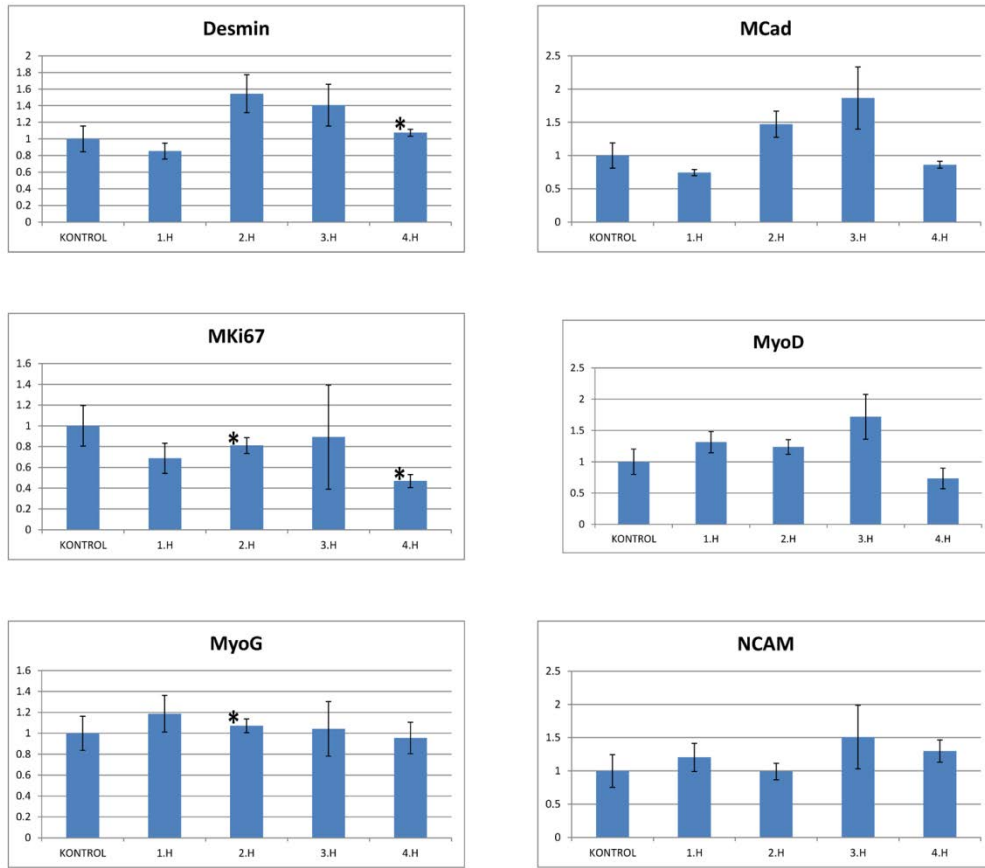
Şekil 4.50. Transfekte olgun yağ hücreleri ile birlikte kültüre edilen C2C12 hücrelerinin morfolojik farklılaşma bulguları. 3T3-L1 hücreleri RBP4+APOB-NB+MSTNdn+pcDNA3.1 ve RBP4+IFNB-314x2+MSTNdn+pcDNA3.1 plazmidleri ile transfekte edildi, ve kontrol 3T3-L1 hücreleri ile birlikte C2C12 hücreleri farklılaşmaya bırakıldı. Bu sürecin 5. gününe ait görüntüler sunulmuştur. Transfekte olmayan kontrol grubunda ince ve kısa miyotüpler bulunmasına karşın, MSTNdn yapıları ile transfekte 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilen C2C12 hücrelerinde daha kalın ve büyük miyotüpler gözlenmiştir.

4.11.2. Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen C2C12 Hücrelerinin Farklılaşma Programı Bulguları

Olgun 3T3-L1 hücrelerinden salınan dominant negatif miyostatin izoformunun C2C12 hücreleri farklılaşma sürecine olan etkilerinin gösterilebilmesi amacıyla miyojenik farklılaşma yolağı moleküler belirteçleri gen ifade analizi ile incelendi. 4 hafta boyunca 4 farklı C2C12 kültürü aynı 3T3-L1 hücreleri ile farklılaşmaya bırakılmıştır. Yedinci günün sonunda C2C12 hücrelerinden mRNA

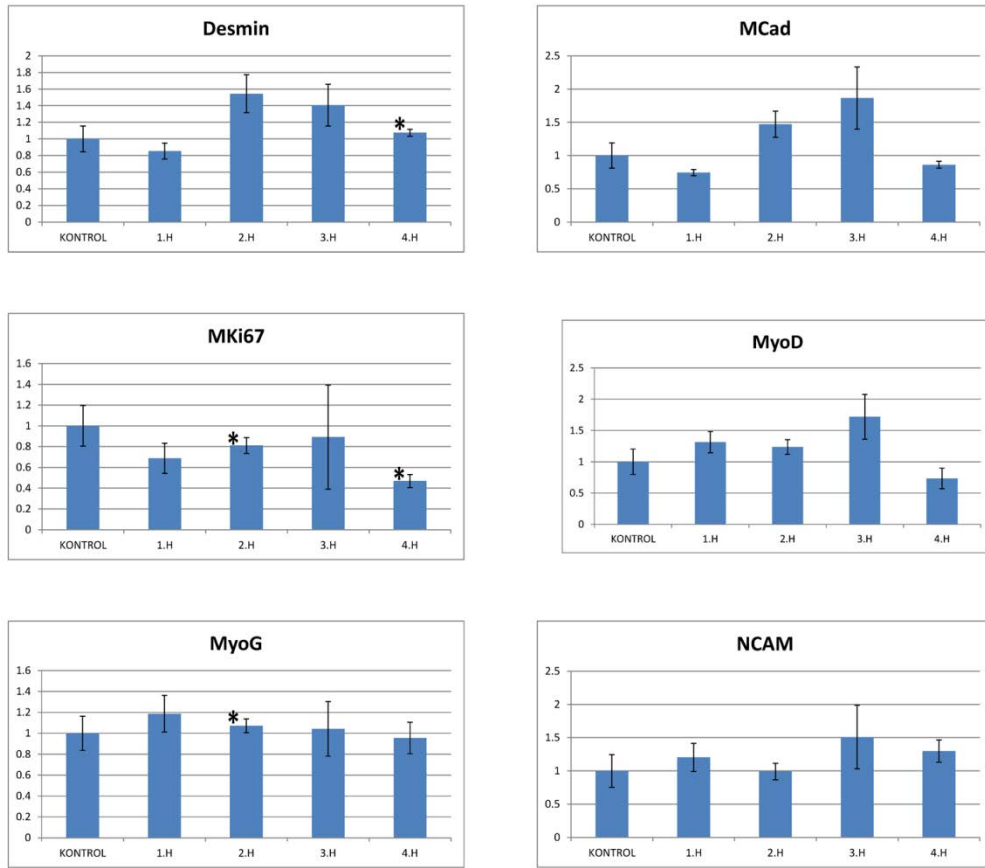
izolasyonu yapılarak desmin, M-kaderin, *MKI67*, *MyoD*, Miyogenin ve *NCAM* ifadeleri kantite edildi. Kontrol olarak kullanılan kültür setinde 3T3-L1 hücreleri boş vektör ile transfekte edildi.

APOB S/MAR dizisi içeren kinetik deneyde, kontrol örneğine oranla MSTNdn salgısı yapan 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilen C2C12 hücrelerinde farklılaşma belirteçlerinde gözlenen artış dikkat çekmektedir. Bu artış, özellikle 3. hafta deney setinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar sağlamıştır. Miyostatin yolağı etkilerinin doğrudan gözlenebildiği miyojenik regülatör faktörlerden *MyoD* ve myogenin de sınırlı olmakla birlikte artış gözlenmektedir. *NCAM* ve *MCAd* füzyon belirteçleride MSTNdn etkisi ile artış sergilemektedir. MSTN etkisinden negatif yönde etkilendiği bilinen proliferasyon belirteci olan *MKI67* ise azalma sergilemektedir. Şekil 4.51.'de istatistiksel anlamlılık eşiğini geçen deney noktaları (*) ile gösterilmiştir. S/MAR dizileri içeren 3T3-L1 yağ hücrelerinin C2C12 farklılaşma kinetiğine olan etkileri 4 hafta boyunca gözlenebilmiştir.



Şekil 4.51. RBP4+APOB-NB+MSTNdn+pcDNA 3.1 vektör yapıları taşıyan 3T3-L1 hücrelerinin C2C12 farklılaşma belirteçleri üzerine etkisi. MSTNdn salgılayan 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilerek farklılaştırılan C2C12 miyoblastlarında 7. günün sonunda kas farklılaşma belirteçleri analizi yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan C2C12 örnekleri boş vektör içeren 3T3-L1 hücreleri ile birlikte kültüre edilmişlerdir. Miyogenin (MyoG), *MyoD*, M-Kaderin (MCad), Desmin (DES), *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM), ve MKi67 (*:p<0.05).

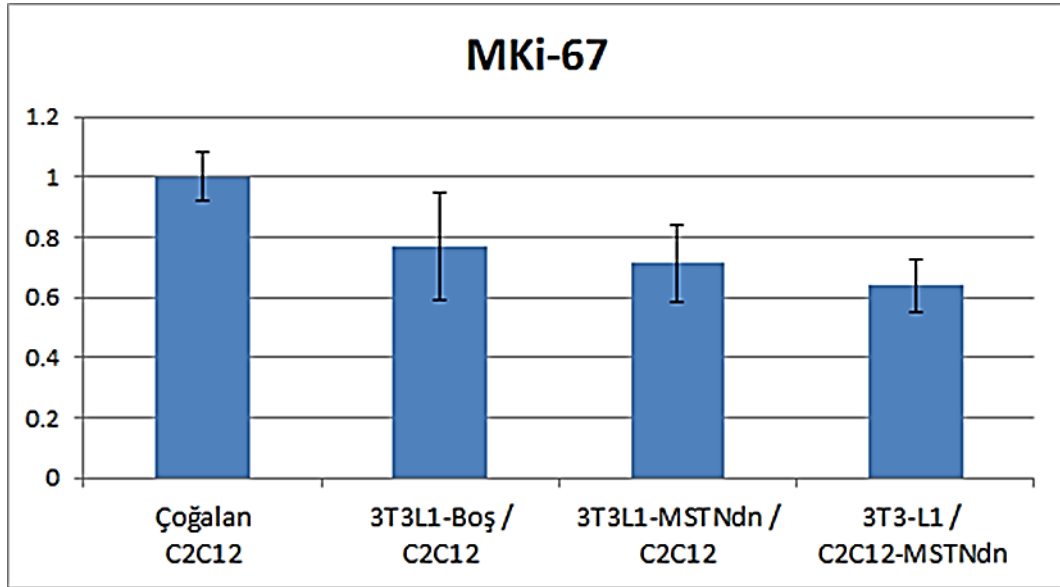
IFN β S/MAR dizisi içeren MSTNdn yapıları ile uygulanan deney sürecinde *APOB* ile yapılan deneylere çok benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.52.).



Şekil 4.52. RBP4+IFNB-NB+MSTNdn+pcDNA 3.1 vektör yapıları taşıyan 3T3-L1 hücrelerinin C2C12 farklılaşma belirteçleri üzerine etkisi. MSTNdn salgılayan 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilerek farklılaştırılan C2C12 miyoblastlarında 7. günün sonunda kas farklılaşma belirteçleri analizi yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan C2C12 örnekleri boş vektör içeren 3T3-L1 hücreleri ile birlikte kültüre edilmişlerdir. Myogenin (*MyoG*), *MyoD*, M-Kaderin (MCad), Desmin (DES), *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM), ve MKi67 (*:p<0.05).

Miyostatin yolağı üzerinde gözlenmesi beklenen en yüksek etkinin ölçülebilmesi amacıyla C2C12 myoblast hücrelerine de MSTNdn aktararak hücre proliferasyonu belirteci olan MKi67 ifadesine etkileri, 3T3-L1'e aktararak ko-kültür yapılan hücrelerle karşılaştırıldı (Şekil 4.53.). Bu deneyde, boş vektör ile transfekte

edilen 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilen C2C12 hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı.

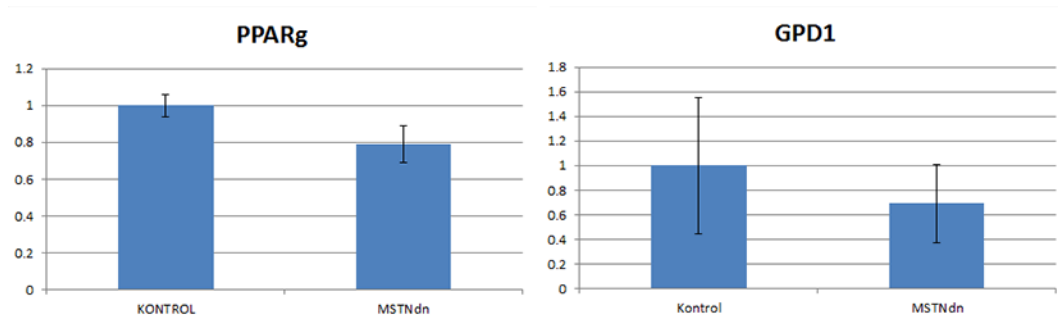


Şekil 4.53. MSTNdn'nin farklılaşma sürecindeki C2C12 hücre döngüsünde doğrudan etkisi. C2C12 hücrelerine doğrudan MSTNdn vektörü aktarılarak boş 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültür yapıldı. Yedi günlük farklılaşma süreci sonunda MKi67 ifadesi ölçüldü.

Bu deney, MSTNdn'nin C2C12 hücrelerinde oluşturabileceği en yüksek cevabı sağlamaktadır. Proliferasyon sürecinde C2C12 hücrelerinden alınan MKi67 ifadesi 1 olarak kabul edilmiştir. 7 günlük farklılaşma süreci sonunda C2C12 hücrelerinde MKi67 ifadesi 0.78 olarak ölçülmüştür (% 22 azalma). MSTNdn ile transfekte 3T3-L1 hücreleri ile ko-kültüre edilen C2C12 hücrelerinde ise 0.71 olarak bulunmuştur. Bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan ve doğrudan MSTNdn ile transfekte edilerek karşılaştırılan C2C12 hücrelerinde ise MKi67 ifadesi 0.64 olarak saptanmıştır (proliferasyon sürecine göre % 36 azalma.)

4.11.3. Transfekte Olgun Yağ Hücreleri ile Birlikte Kültüre Edilen 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaşma Programı Bulguları

Miyostatin yolağının adipojenik farklılaşma üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla, MSTNdn salgılayan olgun 3T3-L1 hücreleri ile farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ko-kültüre edildi ve adipojenik farklılaşma yolağı belirteçleri yönünden gen ifade analizi yapıldı. Bulgular Şekil 4.54.'te verilmiştir.



Şekil 4.54. MSTNdn varlığının 3T3-L1 adipojenik farklılaşması üzerine etkisi. MSTNdn ile transfekte edilmiş olgun 3T3-L1 hücreleri, ile birlikte ko-kültüre edilen 3T3-L1 hücrelerinde adipojenik farklılaşma belirteçleri incelenmiştir. Farklılaşma ortamında MSTNdn varlığında adipojenik farklılaşmanın olumsuz yönde etkilendiği anlaşılmıştır.

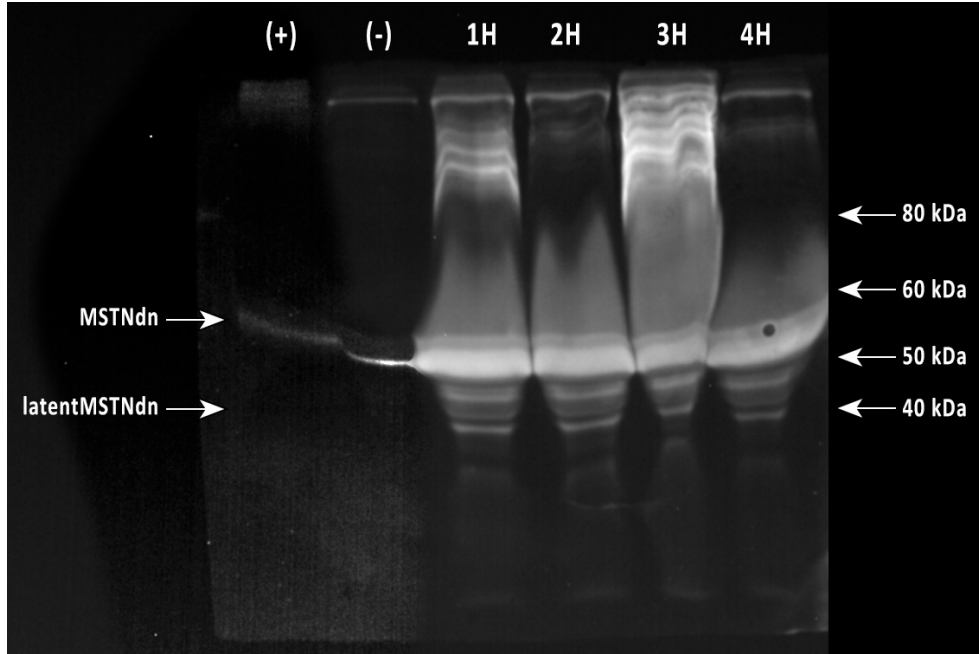
Adipojenik farklılaşmanın en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri olan PPAR γ ifadesinin MSTNdn varlığında % 20 azalmış olduğu saptandı. Benzer şekilde, adipogenezin biyokimyasal belirteci olan *GDPI* enzimi de % 30 azalma sergilemektedir. Bu bulgular beklenen yönde MSTNdn varlığında adipojenik farklılaşmanın olumsuz yönde etkilendiğini göstermektedir.

4.11.4. Olgun 3T3-L1 Hücrelerinden Salınan Rekombinant Protein İfade Analizi

Tez çalışmasının temel amacı, vektör omurgasına eklenen rekombinant proteinin N-terminalinde bulunan öncü dizi yardımı ile yağ hücrelerin salgısal sistemini kullanarak hücre dışına salınmasını sağlamaktır. Yukarıda sıralanan bulgularda, hücre kültürü koşullarında besi ortamına salgılanan rekombinant MSTNdn molekülü

tarafından C2C12 ve 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma işlevinin değıştiren bildiği gösterilmiştir. Olgun yağ hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan bu rekombinant proteinin hücre dışı ortamdaki varlığının doğrudan gösterilebilmesine yönelik protein ifade analizi çalışmaları yapılmıştır.

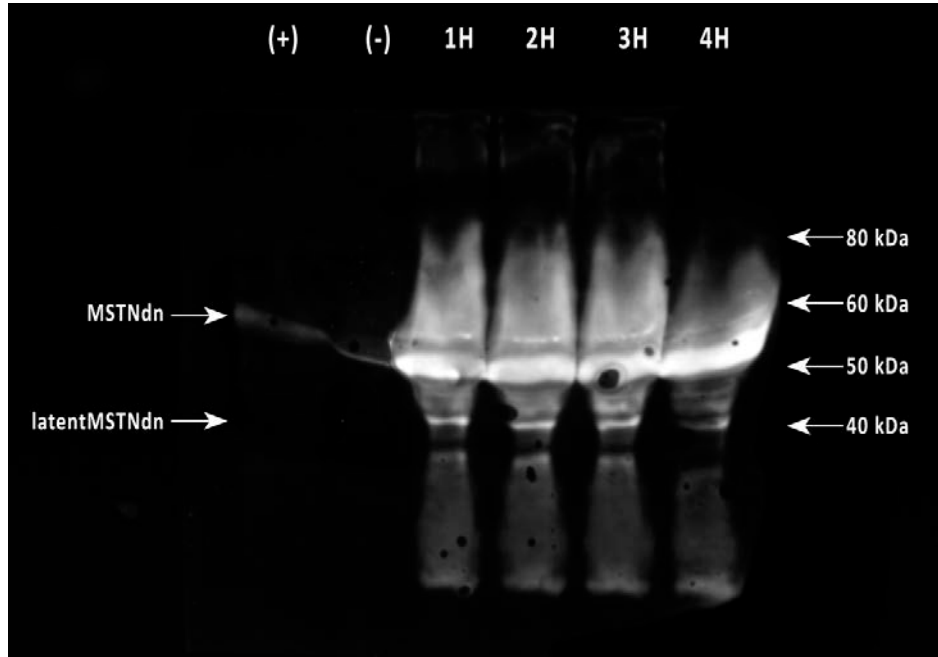
Farklılaşma işlevinin gösterildiği ko-kültür deneyinde toplanan ve konsantre edilen besi ortamlarından western blot çalışması yapıldı. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere vektor omurgası (RBP4, V5 epitopu, 6xHis dizisi, ve MSTNdn içeren pcDNA3.1) ile transfekte edilen 3T3-L1 hücre lizatları hazırlandı. Western blot sonuçları Şekil 4.55. ve 4.56.'da verilmiştir.



Şekil 4.55. *APOB* S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında MSTNdn proteinlerin ifadesi.

3T3-L1 hücrelerinden salgılanan MSTNdn rekombinant proteini üç farklı izoformda bulunma ihtimali vardır. Bunlardan birincisi, 75kDa ağırlığında propeptid izoformunda bulunan kesilmemiş MSTNdn proteindir. MSTN'nin metalloproteinaz işlevine sahip enzimler tarafından kesilmesi durumunda ise, iki peptide bölünmektedir. Bunlardan biri, aktifleşmiş MSTN izoformu olan 25 kDa ağırlığında olan C-terminal kısmı ve geri kalan latent kısmıdır. Miyostatin, proteinin C-terminal

bölgesinde bulunan dokuz sistein amino asit aracılığı ile dimer oluşturmaktadır (129) . V5 epitopunun MSTN dn rekombinant proteininin N terminalinde olmasından dolayı, 75 kDa ağırlığındaki pro-MSTNdn veya kırılacak olursa, 25 kDa ağırlığında latent formu gözlenebilecektir.



Şekil 4.56. *IFNB* 314x2 S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında MSTNdn proteinlerin ifadesi.

Şekil 4.55. ve 4.56.'da gösterildiği gibi, besi ortamında rekombinant MSTNdn protein ile beraber (57 kDa ağırlığında) yaklaşık 40 kDa ağırlığında olan latent formu da bulunmaktadır. Bununla birlikte, her iki bant tüm dört hafta boyunca görünmektedir. Sonuç olarak, RBP4 öncü dizisi ile beraber pcDNA3.1 vektör omurga yapısına eklenen MSTNdn rekombinant proteininin dört hafta ko-kültür süresince transfekte edilen 3T3-L1 hücreleri tarafından üretildiği ve besi ortamına salgılandığı gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Rekombinant DNA teknolojisi 1980'lerin başında ortaya atılan bir biyoteknoloji kavramıdır. Temelde, farklı proteinlere ait olan çeşitli parçaların kırılarak bir araya getirilmesi işlemi olarak da tanımlanır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanımı ile çeşitli genlerin üzerinde yapılan değişiklikler sonucunda doğal olandan farklı protein ürünleri elde etme işlemi ise gen mühendisliği olarak tanımlanır. Burada amaç, biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen çeşitli hedef proteinlerin değiştirilerek daha dayanıklı hale getirilmeleri, yıkımlarının engellenmesi, fiziksel kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değiştirilmesidir.

Bu tez çalışmasının temelinde gen mühendisliği yaklaşımının kullanılması ile birlikte istenilen herhangi bir proteinin N-terminaline eklenen öncü diziler sayesinde üretildiği hücreden dışarı salgılanmasıdır. Bu şekilde çeşitli hücresel proteinlerden ve diğer moleküllerden arındırılmış halde protein eldesi mümkündür.

Bu tez konusu kapsamında olan rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları ile oluşturulan sentetik diziler çeşitli gen parçalarına eklenerek yağ hücrelerinin kullanımıyla yeni bir protein üretim yöntemi geliştirilmiştir. Bu yeni yaklaşım *in vitro* koşullarda her türlü rekombinant protein ihtiyacı ve üretimi için kullanılabilirdiği gibi, canlıda, işlevsel rekombinant protein üretimi için de kullanılabilir niteliktedir. Bu yaklaşımın sağlayacağı yararlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Rekombinant protein üretiminde, hedef proteinin hücre içinde birikimi, üretimin gerçekleştirildiği hücre için çeşitli sorunlar yaratmaktadır. Bunlar içinde, ilk sırada birikiminin yaratacağı hücresel işlevler üzerindeki olumsuz etkileşime bağlı olarak üretim kapasitesinin sınırlı oluşudur. Hedef protein açısından bakıldığında rekombinant proteinin uygun şekilde işlenme ve katlanmasının güçlükleri de üretim sürecini olumsuz yönde etkilemektedir. Tanımlanan yöntem sürecinde üretilen hedef proteinin sürekli yapım ve salgılanması, hücre içinde birikimin engellenmesi ve daha uygun şartlarda işlenerek eldesini sağlamaktadır.
2. Hücre dışına salgılama rekombinant protein üretimi söz konusu olduğunda önemli avantajlar getirebilmektedir. Supernatana salınan proteinin hücresel

proteinlerden uzaklaştırılması, bu hücrenin lizis yolu ile patlatılarak ürünün eldesinden daha kolay ve uygulanabilir niteliktedir.

3. Ökaryotik hücresel protein üretim sistemlerinde, yukarıda da açıklandığı gibi canlıdan elde edilen serumlara bağımlılık söz konusudur. Memeli hücrelerinin bölünmesi ve idamesi için serumda bulunan büyüme ve çoğalma faktörlerine ihtiyaç vardır. Bu durum, protein ürünlerinin serum kontaminasyonu riskini de beraberinde getirmektedir. Bu çalışma kapsamında kullanılan 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sonrasında bölünmemesi ve uygun şartlarda serumsuz idamelerinin mümkün olması, gereği halinde serum ürünleri kullanmadan protein üretimini mümkün hale getirmektedir.
4. Geliştirilen bu yaklaşım, *in vitro* koşullarda rekombinant protein üretim ve eldesi kadar *in vivo* şartlarda, “işlevsel” rekombinant protein üretimine de uyarlanabilir niteliktedir.

Adipokinlere Ait Öncü Dizilerin Karşılaştırılması

Bu çalışmada vektör yapılarına çeşitli işlevsel özellikler kazandırmak amacıyla bir grup klonlama yaklaşımı uygulanmıştır. Bu işlevsel özellikler, ifadesi amaçlanan rekombinant protein niteliklerini değiştirmek ve transfer edilen gen vektörünün niteliklerini değiştirme amaçlarını taşımaktadır.

Sınanan ilk nitelik, yağ hücrelerine ait farklı adipokinlerin salgısal kapasitelerinin karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla EGFP bildirici proteininin hazırlandığı bir gen ifade yapısında, sentetik genin 5' ucuna (proteinin N-terminali) yedi farklı adipokine ait öncü diziler yerleştirilerek salgısal etkinlikleri karşılaştırılmıştır (bkz. Şekil 4.3). Öncü dizilerin uygun şekilde belirlenmesi (kullanılan biyoinformatik yaklaşım), klonlama yaklaşımının doğrulanması, üretilen proteinin hücre dışına salınabilmesi ve üretimin idamesinin sağlanabilmesi temel öneme sahip teknik konulardır. Hazırlanan sentetik DNA dizileri, ifade vektörü içinde (pcDNA3.1) memeli hücrelerine (sıçan yağ öncülü hücreler) aktarıldı ve bildirici gen yardımı ile salgı yolağının takibi yapıldı. Sonuçlar, EGFP molekülünün transfeksiyonun 18. saatinde ER'de bulunduğunu, golgi bölgesine geçemediğini gösterdi (bkz. Şekil 4.6.). Transfeksiyonu takip eden 24. saatte bildirici proteinin golgi zonunda

toplanmaya başladığı görüntülendi (bkz. Şekil 4.7. ve 4.9.). Transfeksiyonu takip eden 24. saat ve sonrasında golgide yoğunlaşan proteinin veziküller halinde hücre membranına doğru göç etmekte olduğu gösterildi (bkz. Şekil 4.8.). Özet olarak, N-terminalinde öncü dizisi bulunmayan EGFP molekülü, hücre dışına çıkmaksızın çekirdek ve sitoplazma arasında hareket ederken (bkz. Şekil 4.5.), öncü diziler içeren EGFP molekülünün, sitoplazma ya da çekirdekte bulunmaksızın klasik protein salgı yolağı aracılığı ile ER'den golgi bölgesine geçerek klattrin ile kaplı veziküller yardımı ile hücre dışına salgılandığı gösterildi (bkz. Şekil 4.10.).

Yukarıda tartışılan nitel özelliklerin yanında, yedi farklı öncü dizi için nicel karşılaştırma yapıldı. Bildirici proteinin N-terminaline yerleştirilen yedi farklı öncü dizi için hücre dışı ortam ve hücre içi protein içeriğinden EGFP ölçümleri yapıldı. Bu şekilde öncü dizilerin verimliliği karşılaştırıldı. Hücre dışına salgılanan göreceli karşılaştırma verileri, en yüksek salgının, **Retinol bağlama proteini-4 (RBP4)** ve **Adipsin** öncü dizileri içeren yapılarda bulunduğunu gösterdi (bkz. Şekil 4.15.). Aynı yapıları içeren hücrelerin lizatından elde edilen ölçümler de bu verileri destekler nitelikte, en düşük EGFP içeriğini sergiledi. Bu iki öncü dizinin, rekombinant proteinleri hücre içinde en az tutan ve en hızlı şekilde salgılayan kinetiğe sahip olduğu gösterildi (bkz. Şekil 4.16.). Bu karşılaştırma sonucunda, RBP4 öncü sinyalinin diğer öncü sinyallerine oranla rekombinant protein salınımında daha işlevsel olduğu anlaşıldı. Bu bulgu, öncü dizi işlev ve etkinliklerinin karşılaştırılması yönünden orijinaldir. Literatüründe öncü dizi etkinliklerini sorgulayan herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

Yağ Hücrelerine Gen Aktarımı ve İfade Süresinin Takibi

Tez kapsamında sorgulanan hipotezlerden biri de gen aktarımı sonrasında bölünmeyen hücrelerin transfer edilen geni bölünen hücrelere göre daha uzun süre koruyarak daha uzun süre ifade edecekleri öngörüsüdür. Yağ hücreleri bu hipotezin sınanması için en uygun hücre adaylarından biridir. Farklılaşmanın başlamasını takiben, yağ öncülü hücreler p21 ve p27 gibi hücre döngüsü durdurucu proteinleri ifade etmektedir. Bunun sonucunda, yağ hücreleri G1 fazına geçerek hücre döngüsünden çıkmakta, hızla yağ depolamaya başlamaktadır (130) . Bu hipotez, tez çalışmaları ile deneysel olarak kısmen doğrulanmıştır. Kemik iliği kök hücreleri veya

karaciğer hücreleri gibi yüksek bölünme kapasitesine sahip hücrelerde *in vitro* koşullar altında gen transferi sonrasında en fazla 5. güne kadar transgen ifadesi gözlenebilmektedir (131) . Benzer şekilde bölünmekte olan adiposit öncülü hücrelerde de bir pasaj sonrasında transgen ifadesi gözlenemez hale gelmektedir (bkz. Şekil 4.25.). Diğer yönden, gen transferi sonrasında farklılaştırılan olgun yağ hücrelerinde, 60. güne dek uzatılan gözlemlerde transgen ifadesinin devam etmekte olduğu gözlenmiştir (bkz. Şekil 4.21.). Bu gözlemin pek çok olası nedeninden en önemlisi, mitoz sırasında transgenin kaybı ve tekrar çekirdek içinde yer alamamasıdır. Bölünmeyen bir hücrenin genomuna entegre olmadan da transgenin çekirdek içinde kalması ve ifade olması beklenmektedir. Bu çalışmada yağ hücreleri ile ilgili bu önemli kavramsal dayanak doğrulanmıştır.

Tez kapsamında sıçan yağ öncülü hücreler ve 3T3-L1 hücre hattı arasında bir karşılaştırma yapıldı. 3T3-L1 hücrelerinin olgun yağ hücresi fenotipi olarak tanımlanan monoküler tek bir yağ damlacığı içeren morfolojiye 17 gün içerisinde ulaştıkları gözlemlendi. Sıçan yağ öncülü hücrelerin ise bu duruma ancak aylar sonra gelebidlikleri gösterildi (bkz. Şekil 4.18.). Bununla birlikte, bu iki hücre tipinin transfeksiyon etkinliği oranları karşılaştırıldı. 3T3-L1 hücrelerinin transfeksiyon oranı sıçan yağ öncülü hücrelerine göre daha düşük bulundu (sırasıyla % 27,7 ve %38,8). Ancak, 3T3-L1 hücrelerinin transfeksiyon sonrası farklılaşmaya devam ederek gen ifadesini sürdürme başarısı sıçan olgun yağ hücrelerinden çok daha yüksek olarak gözlemlendi (bkz. Şekil 4.21.). Transfekte olan primer sıçan yağ öncülü hücreleri farklılaştırma ortamına maruz bırakıldıklarında, transfekte olan ve bildirici gen ifade eden hücrelerin yağ toplamadıkları ve farklılaşmadıkları gözlemlendi. Ayrıca transfekte olan bu hücrelerin zamanla sayılarının azaldığı da gözlemlendi (bkz. Şekil 4.20.). 3T3-L1 hücreleri saf bir hücre hattıdır. Diğer yönden, primer sıçan yağ öncülü hücreler ise *in vitro* çalışmalar için dokudan izole edilen karışık bir hücre topluluğudur. İçerinde yağ öncülü hücreler ile birlikte fibroblast, vasküler endotel hücreleri ve perisitler gibi çeşitli diğer hücreleri de içermektedir (23,132) . Bu durum göz önünde bulundurulacak olursa, primer yağ öncülü hücrelerden çok, bu toplulukta yer alan fibroblast ve benzeri diğer hücrelerin transfekte edilebildiği anlaşılmaktadır. Kısa zamanda ortadan kaybolan bildirici gen ifadesi de bu bulguyu desteklemektedir. Bölünmeye devam etmekte olan fibroblast ve benzeri hücrelerin transgen ifadesinin

geçici olması beklenmekle birlikte yağ farklılaşması da gözlenmeyebilir. Diğer yönden, gen transferi uygulanan sıçan yağ öncülü hücrelerde, vektör yapısında bulunan CMV promotorunun güçlü etkisi ile hücre transkripsiyon makinesinin işlevselliği azalmakta ve farklılaşma sürecinin yavaşlanmasına sebep olabilmektedir. Yukarıda açıklanan kanıtlar ışığında, olgun yağ hücresi eldesini gerektiren çalışmalar için 3T3-L1 hücreleri tercih edildi.

3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma ve gen transferi kinetikleri de ayrı bir çalışma ile karşılaştırılmıştır. Transfeksiyonu takip eden farklılaşma yaklaşımı ile önce farklılaşma sonra transfeksiyon uygulaması karşılaştırılmış, bunlardan ilkinin çok daha başarılı sonuç verdiği anlaşılmıştır (bkz. Şekil 4.22.).

Yukarıda da açıklandığı üzere, 3T3-L1 hücrelerinde gen transferi ve ardışık olarak uygulanan farklılaştırma sonrasında bildirici gen ifadesi kalıcı nitelikte olmaktadır. Bu yaklaşımla sağlanan gen ifadesi farklılaşmış hücrelerde yapılan 60 günlük gözlem süresince takip edilebilmiştir (bkz. Şekil 4.21.). Transfekte olan hücrelerin morfolojileri ve sayıları gözlemdiğinde, olgunlaşan hücrelerin sitoplasmasında toplanan yağ damlacıklarından dolayı kırılğan hale geldiği, mekanik basınç veya travma sonucunda kültür kabından kaybolmaktadır. Transfekte edilen ve farklılaşan yağ hücreleri, bir mekanik etki ve stresten korunabildiği sürece, hücre içine gönderilen plazmidin ifadesini sürdürülebildiği gösterilmiştir (17) .

Elektroporasyon aracılığı ile transfeksiyon uygulaması *ex vivo* gen transferi amacıyla uygulanan yaygın bir yöntemdir. Diğer yöntemlere oranla, toksik kimyasallardan ve benzeri bileşiklerden arındırılmış olarak uygulanması bir avantajdır. Diğer yönden, elektrik akımının hücre canlılığı üzerine olumsuz etkileri de aşikardır. Elektroporasyon sonrasında tutunan hücrelerde gen transferine bağlı hücre ölümünü incelemek amacı ile tripan mavisi yöntemi seçildi. Elektroporasyon yöntemi ile gen transferi, hücreleri belirli şartlar ve süreçte elektrik şokuna maruz bırakarak hücre zarın üzerine *electropore* olarak bilinen gözeneklerin oluşmasını (133) ve bu gözeneklerden aktarılan genin hücre içine girmesini sağlar. Kullanılan elektrik akımının şiddeti ve süresi hücre zarının özelliklerine göre optimize edilmelidir. Oluşan gözenekler, hücre bütünlüğünü bozmamak ve kısa zamanda hücre tarafından kapatılabilmelidir. Aksi halde hücre ölümü gerçekleşir. Tripan mavisi ile yapılan inceleme sonucunda adiposit öncülü hücreler için uygulanan

elektroporasyon şartlarının tutunan hücrelerde kayda değer ölüme neden olmadığını göstermiştir (bkz. Şekil 4.23.).

Gen transferi sonrasında genoma entegre olmaksızın geçici gen ifadesinin süresinin uzatılabilmesi bu çalışmada varılması amaçlanan sonuçlardan bir diğeridir. Bu amaçla S/MAR dizilerinin kullanımı tercih edilmiştir. S/MAR dizilerinin genom fizyolojisinde birden fazla önemli işlevi vardır. Bunlardan ilki, yapısal olarak dizinin çekirdek iskelesine tutunmasını sağlamaktır. Bu şekilde, vektör yapılarına ilave edilen S/MAR dizileri, vektörün çekirdek dışına çıkarak etkinliğinin kaybolmasına engel olmaktadır (2). İkinci olarak, S/MAR dizisi içeren DNA yapıları epizomal olarak kalmakla birlikte hücre döngüsü ile beraber bölünmektedir. Bu durum, gen transferi uygulamaları için önem oluşturmaktadır. Üçüncü olarak, S/MAR dizileri, metilasyon aracılığı ile vektör yapısının sessizleştirilmesine engel olmaktadır (119) . S/MAR dizilerinin doku ve hücre tipine özgül işlevsellik sergiledikleri bilinmektedir (2) .

Transfer Edilen Vektörün Kalıcılığının ve İfade Süresinin Arttırılması

Tez çalışması kapsamında, *APOB* ve *IFN β* genlerine ait iki S/MAR dizisi seçilmiştir. *IFN β* , her hücrede ifade olabilen bir gendir (*ubiquitous*). Benzer şekilde *APOB*, yağ hücrelerinde açık şekilde ifade edilen bir proteindir (2) . Bu nedenle bu iki S/MAR dizisinin yağ hücrelerinde işlevsel olması öngörülmektedir. Yağ hücrelerine uygulanan klonlama yaklaşımlarında, seçilen iki farklı S/MAR dizilerinden çeşitli uzunluk ve yapıda farkı dizileri hazırlanarak RBP4 + EGFP içeren pcDNA3.1 vektör yapısına eklendi. Altıncı pasaja kadar sürdürülen bildirici protein takibinde, nitelik ve nicelik bakımından karşılaştırma yapıldı. Bu deneyin en önemli sonucu, vektörlere S/MAR dizileri eklenmesi ile kalıcılık etkinliğinin 100 ila 1000 kat arttırılabildiği ve ifade avantajı sağladığı anlaşılmıştır (bkz. Şekil 4.32-4.35.). Bu yönden, incelenen tüm S/MAR dizileri birbirlerine benzer etkinlik göstermiştir. S/MAR dizileri arasında kalıcılık bakımından gözlenen varyasyonun doğal sürecin bir sonucu olduğu izlenimi edinilmiştir. Aynı S/MAR dizisinin farklı yönelimde klonlanması sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiş olması da bu sonucu desteklemektedir. S/MAR dizilerinin birbirleri arasında yapılan sayısal karşılaştırma

kesin sonuçlar sağlamamaktadır. Bunun sonucunda işlevsel çalışmalar için her iki S/MAR dizisinden de (*APOB* ve *IFN β*) birer tane seçilmiştir.

Olgun Yağ Hücrelerinden Rekombinant Protein Salgısı

Yağ hücrelerinin protein salgı yolağı kullanımı ile rekombinant protein üretimi hipotezinin işlevsel olarak incelenebilmesi için kas ve yağ hücrelerinde farklılaşma mekanizması ile etkileşime giren bir *TGF β* ailesi üyesi olan miyostatin sinyal molekülü ele alınmıştır. Miyostatin, kas, kalp ve yağ dokusundan salgılanarak dolaşımda bulunan bir sinyal molekülüdür. Etkisini aktivin IIR reseptörleri üzerinden göstermektedir. Dominant negatif miyostatin molekülü, bir gen mühendisliği ürünüdür. Miyostatinin kas farklılaşma yolağı üzerindeki inhibitör işlevini ortadan kaldıracı (miyostatinin nötralize edebilen) tasarlanmış bir proteindir. Miyostatin işlevini ortadan kaldırma konusunda bloke edici antikorlarla aynı etkinliğe sahiptir (119) . Tasarlanan MSTNdn'nin endojen MSTN'den ayrılabilmesi ve takibi tasarlanan rekombinant molekül içine eklenen V5 epitopu aracılığı ile mümkün olmuştur.

Olgun yağ hücrelerinin MSTNdn üretim etkinliğinin gösterilebilmesi amacıyla RBP4 öncül dizisi içeren V5+MSTdn içeren vektör (pcDNA3.1) 3T3-L1 hücrelerine aktarıldı ve hücreler farklılaştırılarak uzun süre takip edildi (3 hafta). Bu hücrelerde uygulanan immünboyama çalışmalarında MSTNdn proteininin, beklendiği üzere, farklılaşmış 3T3-L1 hücreleri içinde ve yağ damlacıklarının arasında bulunduğu gözlemlendi (bkz. Şekil 4.41.). Olgun yağ hücrelerinde rekombinant MSTNdn ifadesinin hücresel stres oluşturmadığı, iyi tolere edildiği, farklılaşma ile etkileşmediği, transfekte hücrelerin farklılaşma sürecinin transfekte olmayanlardan fark sergilemediği gözlemlendi.

Tez çalışması amacı olan hücresel salgı yolağı kullanımı aracılığı ile yağ hücrelerinde rekombinant protein üretimi ve salgılanmasının sağlanması, hücre içinde ER/golgi klasik salgı yolağının işlevsel başarısına bağlıdır. Tez çalışmasında rekombinant protein üretimi amacıyla hazırlanan vektör yapıları sitomegalovirüs (CMV) promotörü içermektedir. CMV gibi viral promotörler, hücrede genel transkripsiyon mekanizmasını yüksek miktarlarda kendi üzerine toplamaktadır. Bu nedenle, viral promotörler aracılığı ile oluşturulan “aşırı” ifade durumunda (*forced*

expression) hücre içinde yeni sentezlenen proteinlerin çok büyük bir kısmı vektör ifadesine aittir. Bu çalışmada oluşturulmaya çalışılan işlev, salgısal mekanizmanın aşırı çalışmasını gerektirmektedir. Bu durum, programlanan hücre içinde, ER'ye rekombinant protein taşınması, ER içinde rekombinant proteinin hızlı ve etkin şekilde katlanması ve golgiye taşınarak salgılanmasını gerektirmektedir. Bu durumun başarı ile sağlanamaması, hücre içinde ER stresi durumunun ortaya çıkması ve buna bağlı temel hücresel işlevlerin bozulması ve hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, transfeksiyon uygulanan hücrelerde protein ifadesinin 2. ve 5. günlerinde ER stresi durumu incelendi (bkz. Şekil 4.42. ve 4.43.). ER içinde katlanmamış protein cevabı sinyal iletiminin en önemli belirteçlerinden biri olan XBP1 mRNA'sının kırılma durumu bu hücrelerde gösterildi. Öncü dizi içermeyen ancak CMV promotörü bulunan pEGFP.C1 vektörü negatif kontrol olarak kullanıldı ve bu vektör yapısının oluşturduğu XBP1 kırılma miktarının lider dizi içeren vektörden farklı olmadığı gösterildi. Bu şekilde uygulanan yöntemin hücrelerde ER stresi etkisi olmadığı kanıtlandı.

Salgılanan Rekombinant Protein Modelinin İşlevsel Analizi

Tez çalışması amacı alan hücresel salgı yolağı kullanımı aracılığı ile yağ hücrelerinde rekombinant protein üretimi ve salgılanması için seçilen MSTNdn modeli ko-kültür deney sisteminde işlevsel olarak analiz edilmiştir. Dört hafta boyunca sürdürülen gözlemlerde, olgun yağ hücrelerinden yapılan MSTNdn salgısının etkinliği C2C12 hücrelerinde gözlemlendi.

Olgun 3T3-L1 adipositlerinden sağlanan MSTNdn protein ifadesi dört hafta boyunca toplanan kültür ortamlarında gösterilmiştir. Protein analizlerinde pro-MSTNdn yapıları dört hafta boyunca takip edilmiş, gözlem sürecinde dört hafta boyunca *APOB* ve *IFN β* S/MAR dizisi içeren vektör yapıları arasında bir fark olmadığı da anlaşılmıştır. Bu bulgular, MSTNdn proteinin, olgun 3T3-L1 hücreleri tarafından sentezlenerek hücre dışına salgılandığı sonucunu göstermiştir (bkz. Şekil 4.55. ve 4.56.).

MSTNdn yapısı, doğal MSTN proteininin bir antagonisti olup, aktivin reseptörlerine bağlanmasına engel olmaktadır. MSTN sinyalinin kas farklılaşmasını sınırlayıcı etkisinin ortadan kalkması ile birlikte, C2C12 hücrelerinin daha büyük ve

daha çok sayıda çekirdek içeren miyotüp oluşumunu sağlamaktadır (7) . Miyostatin, miyojenik farklılaşma yolağının bir inhibitörü olması nedeni ile miyogenin ve *MyoD* gibi miyojenik regülatör faktörlerin ifadesini inhibe etmektedir. MSTNdn varlığında ise bu işlevin aksinin gelişmesi beklenmektedir.

Miyostatin sinyalinin inhibisyonu sonucunda, miyotüp farklılaşma yolağında bulunan *MyoG* ve *MyoD* genlerinin ifadeleri yükselirken hücre çoğalmasının bir belirteci olan *Mki67* genin ifadesinin azalması gözlenir. Bu gen ifade değişikliklerinin bir sonucu olarak farklılaşan C2C12 miyotüp yapılarında hiperplazi gerçekleşir (113,117) . MSTNdn salgılayan olgun adipositlerle ko-kültüre edilmiş C2C12 hücrelerinin farklılaşma süreci incelendiğinde, çok çekirdekli, dev miyotüplerin varlığı Şekil 4.50’de gözlenmektedir. Bu süreçte miyotüp farklılaşma ve proliferasyon genlerin ifadesine bakıldığında, miyotüplerin terminal farklılaşma belirteci olan miyogenin ifadesinin değişmediği, ancak *MyoD* ifadesinin beklendiği üzere arttığı gözlemlendi. *MyoD* ifadesi ile ters orantılı olarak *Mki67* gen ifadesinin ise azaldığı gözlemlendi (bkz. Şekil 4.51.- 4.53.). Bu bulgular, MSTNdn varlığında C2C12 hücrelerinin daha az çoğalma sergileyerek, miyojenik farklılaşmasının da artmış olduğunu göstermektedir. Gözlenen bu değişiklikler, %5-20 arasında gözlenmektedir. Genetiği değiştirilmiş fare modelinde de (MSTNdn transgenik fare) gözlenen miyojenik farklılaşma artışı %20-25 arasındadır. Bu doğrultuda, bu hücre kültürü gözlemleri de beklenen sınırlar içinde kabul edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, 3T3-L1 olgun adipositleri tarafından sentezlenerek ortama salgılanan MSTNdn molekülünün C2C12 hücrelerinin farklılaşma sürecini olumlu yönde etkilemiş olduğu kanıtlanmıştır.

Yukarıda, MSTNdn rekombinant molekülü aracılığı ile C2C12 miyoblast hücrelerinin farklılaşma sürecinin modüle edilebildiği gösterilmiştir. Miyostatin sinyal yolağının yalnızca miyojenik farklılaşmayı değil adipojenik farklılaşma yolağını da etkilediği bilinmektedir (109, 110) . MSTN, adipojenik farklılaşma yolağının da bir inhibitörüdür. Bu nedenle, benzer bir yaklaşımla olgun 3T3-L1 hücrelerinden salgılanan MSTNdn molekülü ile ko-kültür yapılan farklılaşmamış 3T3-L1 hücrelerinin adipojenik farklılaşma süreci incelenmiştir. Adipojenik farklılaşmanın erken döneminde miyostatine maruz kalan adiposit öncüllerinin farklılaşma sürecinin yavaşladığı ve farklılaşma faktörlerinden PPAR γ , farklılaşma

belirteçlerinden *GPD1* ve *Adiponektin* genlerinin ifadesinin de azaldığı bilinmektedir (109, 110) . Bu bilgilerin ışığında yapılan ko-kültür çalışmalarında, *APOB* ve *IFN β* S/MAR dizileri içeren plazmidler ile transfekte edilen 3T3-L1 hücreler, transfekte edilmeyen 3T3-L1 hücreler ile birlikte ko-kültüre edildi. Farklılaşmaya bırakılan 3T3-L1 hücrelerinin gen ifade sonuçlarına bakıldığında (bkz. Şekil 4.54.), *GPD1* ve *PPAR γ* gen ifadelerinin kontrol grubuna oranla artış gösterdiği anlaşılmıştır. Bu sonuç, tasarlanan rekombinant MSTNdn proteininin yağ farklılaşma programı üzerinde de işlevsel olduğunu kanıtlamaktadır.

Yukarıda sıralanan ve MSTNdn etkinliğinin incelendiği birbirinden bağımsız iki farklı farklılaşma programı aynı zamanda yağ hücrelerinden salınan diğer adipokin ve benzeri faktörlerin de etkisi altındadır. Süzgeç içinde yer alan PLGA yapıları içinde bulunan 3T3-L1 hücrelerinin sayısı (1×10^6), ko-kültür edilen ve tek katman halinde bulunan C2C12 hücre sayısının (6500) en az 100 fazlasıdır. Bu nedenle, yağ hücrelerinden salınan follistatin, *IGF*, *GDF11*, *bFGF* gibi miyojenik farklılaşma üzerinden çeşitli etkileri olan sinyal moleküllerinin yapılan gözlemler üzerindeki etkisi gözardı edilemez.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlar:

Protein salgı yolu olarak da adlandırılan ve salgı amaçlı hücre içi protein üretimi trafiğini düzenleyen mekanizmanın kullanımı ile insan ve hayvan (memeli) hücrelerinde istenen her türlü ve herhangi bir protein yapısında biyomolekülün üretimi ve salgısının bu tez çalışmasında tariflenen yöntem ile gerçekleştirilmesi mümkündür. Bu biyoteknolojik yöntem, laboratuvar şartlarında istenen herhangi bir proteinin üretimi amacıyla kullanılabilir. Bu yöntem yapısal bir protein veya benzeri enzim eksikliği gibi genetik olarak eksikliği bulunan herhangi bir proteinin yapımı ve bu eksikliğin giderilmesi amacıyla kullanılabilir.

Tez kapsamındaki çalışmalar, üç önemli yönde bilime yenilik getirmektedir:

- Bu çalışma, yağ hücrelerine ait yedi farklı proteinin hücre dışına taşınmasını sağlayan öncü dizilerinin kullanımı ile bir proteinin yağ hücrelerinde üretilerek yapımının mümkün olduğunu göstermiştir. Bu noktada yağ hücrelerine özgü RBP-4 öncü dizisinin, hücre içinde stres oluşturmada yüksek verimlilikle rekombinant proteinleri hücre dışına taşıyabilmekte olduğunu göstermektedir. Bu yönü ile bu çalışma orijinaldir.

- Rekombinant protein ifadesi ve üretimi için yağ hücrelerinin bir protein üretim fabrikası olarak kullanılabilmesi tez çalışması kapsamında gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem *in vitro* koşullarda yağ hücrelerinin bölünmemeleri nedeni ile içerdikleri vektör yapılarını bölünen hücrelerden çok daha uzun süre tutabildiklerini göstermiştir.

- Elektroporasyon yöntemi kullanarak yağ hücrelerine gönderilen ve viral olmayan DNA vektörleri ile uzun süreli bir gen transfer etkisi elde edilebileceği gösterilmiştir. Hazırlanan plazmidlerin yapısına S/MAR dizilerin eklenmesi ile birlikte, hücre genomuna entegre olmadan kromatine bağlanarak hücre döngüsü kontrolü altında çekirdek içinde kalarak uzun süreli kalıcılık sağlanmıştır. Bununla birlikte, S/MAR dizilerin varlığı sayesinde, plazmidin içinde bulunan rekombinant genin metilasyon aracılığı ile sessizleşmesine engel olunarak, gen ifadesinin devamlılığının sağlanması sağlanmıştır. Bu iki durumun (yağ hücrelerinin ve S/MAR

dizilerin kullanımı) bir araya getirerek rekombinant proteinlerinin DNA dizilerinin viral olmayan vektörlere eklenerek, uzun süreli protein ifadesinin ve salgısının sağlanabileceği gösterilmiştir.

Özet olarak, yukarıda da açıklandığı şekilde, ilgilenilen bir proteinin “N” ucuna yerleştirilen ve yağ hücrelerine ait salgı sinyali yardımı ile temelde yağ hücreleri olmak üzere hücre içinde üretilerek salgılanması süreci bu tez çalışması kapsamında tanımlanan yöntemle sağlanabilir. Bu şekilde gerçekleştirilen protein üretimi aşağıda sıralanan çeşitli alan ve uygulamalara uyarlanabilir:

1. Endüstriyel düzeyde ihtiyaç duyulan her hangi bir enzim veya proteinin orta ve yüksek ölçek kapasitede üretimi.
2. Biyoteknolojik ilaç olarak kullanılmak üzere insan veya hayvan sağlığında uygulama alanı bulunan çeşitli enzim veya proteinlerin üretimi.
3. Aşı geliştirme amacıyla herhangi bir patojen mikroorganizma veya virüsün bağışıklık sistemi cevabını uyaracak olan kısmının (epitop) veya özgün bir proteininin saf olarak orta ve büyük ölçekli olarak üretimi.
4. Genetik kökenli protein eksikliklerinin tedavisinde eksik yapısal protein veya bir enzimin yerine konabilmesi amacıyla yağ hücrelerinin yeniden programlanarak sağlıklı enzim veya proteinin hasta kişinin yağ hücreleri tarafından yapılarak dolaşıma salınımının sağlanması.

Öneriler:

Bu çalışmada viral olmayan gen transferi yöntemi yağ hücrelerinde sağlanan gen ifadesinin kalıcı gen transferinde olduğu gibi uzun süreli bir protein sentezi ve salgısını sağlayabileceği gösterilmiştir. Kullanılan plazmit yapıları, bakteri ve memeli hücrelerine özgül gen yapıları içermektedir. Bakteriyel ifade yapıları sayesinde, hazırlanan plazmit bakteriler içerisinde çoğaltılabilmektedir. Aynı plazmit yapısı, hücre kültürü şartların altında memeli hücrelerine transfer edildiğinde, içerdiği memeli hücrelere özgül yapılar sayesinde hücre transkripsiyon sistemini kullanarak protein sentezi yapabilme özelliğine sahiptir. Memeli hücrelerinde bakteriyel dizilerin işlevsiz olmaları nedeniyle klinik uygulamalara yönelik olarak çeşitli riskler içermektedir. Ayrıca, memelilerde sessiz kalan prokaryotik dizilerin

transfer edilen yapıların sessizleştirilmelerine neden olabileceği bilinmekte, bu durum başarı oranını sınırlamaktadır (134, 135) .

Bu çalışmanın devamında, hazırlanan plazmidin geliştirilerek, yapısında, yer alan bakteriyel ve memeli dizilerinin ayrıştırılmalarını sağlayan bir yaklaşımın geliştirilmesi mümkündür. Bu yaklaşım, bu iki gen grubu arasına özgül bir enzim kesim bölgesi eklenerek sağlanabilir. Bu şekilde, özellikle, “*parental plasmid*” adı ile bilinen plazmidin bakterilerce çoğaltıldıktan sonra “*minicircle*” ve “bakteriyel” olmak üzere iki kısma ayrılması sağlanabilir. Bakteriyel plazmit, bakteriye ait yapıları içerirken “*minicircle*” sadece klonlanan geni ve memeli hücelere ait yapıları içerecektir (136) . Bu yaklaşım, yapıların güvenliğinin artırılmasını sağlayacaktır.

Akraba evliliklerinin çok yüksek oranlarda gözlendiği ülkemizde, genetik hastalıkların insidansı Batı toplumlarına göre çok daha yüksektir. Bu çalışmanın son ve uzun dönem amaçları arasında Türkiye’de görülen genetik hastalıkların tedavisi için yeni bir yaklaşımın etkinliğinin ortaya konabilmesidir.

Günümüzde enzim replasman tedavileri artarak uygulamaya girmektedir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntem, memeli hücrelerinde rekombinant protein üretiminde yeni biyoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesine yönelik bir adım olarak da değerlendirilebilir. Yüksek ölçekli biyoreaktörler, günümüzde memeli hücrelerinin protein üretimi için kullanılmaktadır. Bu çalışma sonuçları, yağ hücrelerinin de bu amaçla kullanılan sınırlı hücre kaynağı içinde yer alabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma dahilinde hazırlanan vektör yapılarının *in vivo* şartlarda etkinliğinin gösterilmesi kıymetli ve önemlidir. Bu çalışmanın sonraki adımı olarak, MSTNdn aktarılmış donör yağ hücrelerinin farklılaştırılarak olgun yağ hücrelerine dönüştürülerek PLGA polimerleri içinde canlıya tekrar yerleştirilmesi ve bu süreçte MSTNdn etkisinin canlıda gösterimi en önemli basamağı oluşturmaktadır.

Yukarda bahsedilen önerilerin gerçekleşmesi için, hazırlanan *in vivo* deneyler planlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Chailurkit, L.O., Rajatanavin, R., Teerarungsikul, K., Ongphiphadhanakul, B., Puavilai, G. (1996) Serum vitamin D, parathyroid hormone and biochemical markers of bone turnover in normal Thai subjects. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 79 (8), 499-504.
2. Harraghy, N., Gaussin, A., Mermoud, N. (2008) Sustained transgene expression using MAR elements. *Current Gene Therapy*, 8 (5), 353-366.
3. Vierck, J.L., Dal Porto, D., Dodson, M.V. (2001) Induction of differentiation of adipofibroblasts using a defined treatment medium without DMI. *Basic Applied Myology*, 11 (2), 99-1004.
4. Boone, C., Mourrot, J., Gregoire, F., Remacle, C. (2000) The adipose conversion process: regulation by extracellular and intracellular factors. *Reproduction, Nutrition, Development*, 40 (4), 325-358.
5. Kocafe, Y.C., Israeli, D., Ozguc, M., Danos, O., Garcia, L. (2005) Myogenic program induction in mature fat tissue (with MyoD expression). *Experimental Cell Research*, 308 (2), 300-308.
6. McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387 (6628), 83-90.
7. Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G., McNally, E.M. (2000) Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Letters*, 474 (1), 71-75.
8. Lafontan, M., Berlan, M. (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal Of Lipid Research*, 34 (7), 1057-1091.
9. Feve, B. (2005) Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19 (4), 483-499.
10. Lago, F., Gomez, R., Gomez-Reino, J.J., Dieguez, C., Gualillo, O. (2009) Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 34 (10), 500-510.
11. Green, E.D., Maffei, M., Braden, V.V., Proenca, R., DeSilva, U., Zhang, Y. ve diğeri. (1995) The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Research*, 5 (1), 5-12.

12. Mahley, R.W., Ji, Z.S. (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research*, 40 (1), 1-16.
13. Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K. (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221 (2), 286-289.
14. Berkenpas, M.B., Lawrence, D.A., Ginsburg, D. (1995) Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *The EMBO Journal*, 14 (13), 2969-2977.
15. Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M. ve diğeri. (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436 (7049), 356-362.
16. Ronti, T., Lupattelli, G., Mannarino, E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, 64 (4), 355-365.
17. Nawrocki, A.R., Scherer, P.E. (2005) Keynote review: the adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discovery Today*, 10 (18), 1219-1230.
18. Vernon, R.G. (2000) Adipocyte studies: systems for investigating effects of growth hormone and other chronically acting hormones. *Biochemical Society Transactions*, 28 (2), 126-131.
19. Vierck, J.L., Dal Porto, D., Dodson, M.V. (2001) Induction of differentiation of adipofibroblasts using a defined treatment medium without DMI. *Basic Applied Myology*, 11 (2), 99-1004
20. Lane, M.D., Flores-Riveros, J.R., Hresko, R.C., Kaestner, K.H., Liao, K., Janicot, M. ve diğeri. (1990) Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care*, 13 (6), 565-575.
21. Sharafi, P. (2008). **The effect of mechanical forces on adipogenic differentiation.** MSc, Middle East Technical University.
22. Cinti, S. (2002) Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *Journal of Endocrinol Investment*, 25 (10), 823-835.
23. Schipper, H.S., Prakken, B., Kalkhoven, E., Boes, M. (2012) Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends in Endocrinology And Metabolism: TEM*, 23 (8), 407-415.

24. Todaro, G.J., Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17, 299-313.
25. Green, H., Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5 (1), 19-27.
26. Nickel, W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, 270 (10), 2109-2119.
27. Prudovsky, I., Mandinova, A., Soldi, R., Bagala, C., Graziani, I., Landriscina, M. ve diğ erleri. (2003) The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. *Journal of Cell Sciences*, 116 (Pt 24), 4871-4881.
28. Merrick, W.C. (2010) Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (28), 21197-21201.
29. Teasdale, R.D., Jackson, M.R. (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 27-54.
30. Pfeffer, S.R. (1996) Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 441-461.
31. Siders, W.M., Klimovitz, J.C., Mizel, S.B. (1993) Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 alpha and IL-1 beta secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (29), 22170-22174.
32. Hamon, Y., Luciani, M.F., Becq, F., Verrier, B., Rubartelli, A., Chimini, G. (1997) Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood*, 90 (8), 2911-2915.
33. Nickel, W. (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, 6 (8), 607-614.
34. Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M. (2004) Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science*, 305 (5680), 55-59.
35. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., Raposo, G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3 (5), 321-330.
36. Cleves, A.E., Kelly, R.B. (1996) Rehearsing the ABCs. Protein translocation. *Current Biology*, 6 (3), 276-278.
37. Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.M. (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*, 20, 22-27.

38. Simon, S.M., Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 65 (3), 371-380.
39. G, B. (1971) Ribosome-membrane interactions in eukaryotic cells. . *Biomembranes*, Vol. 2, 193-195.
40. Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of Cell Biology*, 67 (3), 835-851.
41. Hegde, R.S., Bernstein, H.D. (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, 31 (10), 563-571.
42. Ladunga, I. (2000) Large-scale predictions of secretory proteins from mammalian genomic and EST sequences. *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (1), 13-18.
43. von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, 184 (1), 99-105.
44. Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P., Stroud, R.M. (1998) Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell*, 94 (2), 181-191.
45. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340 (4), 783-795.
46. Chou, K.C., Shen, H.B. (2007) Signal-CF: a subsite-coupled and window-fusing approach for predicting signal peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357 (3), 633-640.
47. Emanuelsson, O., von Heijne, G. (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1541 (1), 114-119.
48. Klee, E.W., Ellis, L.B. (2005) Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics*, 6, 256.
49. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P. ve diğeri. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288 (5466), 669-672.
50. Nemunaitis, J., Cunningham, C., Buchanan, A., Blackburn, A., Edelman, G., Maples, P. ve diğeri. (2001) Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Therapy*, 8 (10), 746-759.

51. Malik, V.S. (1981) Recombinant DNA technology. *Advanced Applied Microbiology*, 27, 1-84.
52. Wang, Y.-W., Zhang, P., Chen, N. (1993) Recombinant DNA technology. *Tianjin Science and Technology Press, Tianjin*, 189-192.
53. Wang, W., Li, W., Ma, N., Steinhoff, G. (2013) Non-viral gene delivery methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14 (1), 46-60.
54. Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., Baker, J.R. (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (10), 4897-4902.
55. Gorman, C.M., Lane, D., Rigby, P. (1984) High efficiency gene transfer into mammalian cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 307 (1132), 343-346.
56. French, S.A., Jeffery, R.W., Pirie, P.L., McBride, C.M. (1992) Do weight concerns hinder smoking cessation efforts? *Addictive Behaviors*, 17 (3), 219-226.
57. Haase, R., Argyros, O., Wong, S.P., Harbottle, R.P., Lipps, H.J., Ogris, M. ve diğerleri. (2010) pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 10, 20.
58. Marie, C., Vandermeulen, G., Quiviger, M., Richard, M., Preat, V., Scherman, D. (2010) pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells. *The Journal of Gene Medicine*, 12 (4), 323-332.
59. Mayrhofer, P., Schleef, M., Jechlinger, W. (2009) Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods in Molecular Biology*, 542, 87-104.
60. Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M. ve diğerleri. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270 (5235), 475-480.
61. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E. ve diğerleri. (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 348 (3), 255-256.
62. Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. J. M. Coffin, S. H. Hughes & H. E. Varmus (Ed.). Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY).

63. Zsengeller, Z.K., Wert, S.E., Hull, W.M., Hu, X., Yei, S., Trapnell, B.C. ve diğeri. (1995) Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice. *Human Gene Therapy*, 6 (4), 457-467.
64. Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., Schiedlmeier, B. ve diğeri. (2011) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *Journal of Molecular Biology*, 407 (2), 193-221.
65. Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. ve diğeri. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *The EMBO Journal*, 17 (13), 3640-3650.
66. Baron, E., Narula, S. (1990) From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10 (3), 179-190.
67. Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., Porro, D. (2012) Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 824, 329-358.
68. Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22 (11), 1393-1398.
69. Recillas-Targa, F., Valadez-Graham, V., Farrell, C.M. (2004) Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26 (7), 796-807.
70. Recillas-Targa, F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34 (3), 337-354.
71. Kwaks, T.H., Otte, A.P. (2006) Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 137-142.
72. Pederson, T. (2000) Half a century of "the nuclear matrix". *Molecular Biology of the Cell*, 11 (3), 799-805.
73. Laemmli, U.K. (1978) Levels of organization of the DNA in eucaryotic chromosomes. *Pharmacological Reviews*, 30 (4), 469-476.
74. Gluch, A., Vidakovic, M., Bode, J. (2008) Scaffold/matrix attachment regions (S/MARs): relevance for disease and therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology* (186), 67-103.

75. Handeli, S., Klar, A., Meuth, M., Cedar, H. (1989) Mapping replication units in animal cells. *Cell*, 57 (6), 909-920.
76. de Moura Gallo, C.V., Vassetzky, Y.S., Targa, F.R., Georgiev, G.P., Scherrer, K., Razin, S.V. (1991) The presence of sequence-specific protein binding sites correlate with replication activity and matrix binding in a 1.7 Kb-long DNA fragment of the chicken alpha-globin gene domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179 (1), 512-519.
77. Schubeler, D., Mielke, C., Maass, K., Bode, J. (1996) Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry*, 35 (34), 11160-11169.
78. Klehr, D., Maass, K., Bode, J. (1991) Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry*, 30 (5), 1264-1270.
79. Bode, J., Benham, C., Knopp, A., Mielke, C. (2000) Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 10 (1), 73-90.
80. Goetze, S., Baer, A., Winkelmann, S., Nehlsen, K., Seibler, J., Maass, K. ve diğeri. (2005) Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Molecular Cell Biology*, 25 (6), 2260-2272.
81. Qiao, J., Oumard, A., Wegloehner, W., Bode, J. (2009) Novel tag-and-exchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties. *Journal of Molecular Biology*, 390 (4), 579-594.
82. Bode, J., Winkelmann, S., Gotze, S., Spiker, S., Tsutsui, K., Bi, C. ve diğeri. (2006) Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *Journal of Molecular Biology*, 358 (2), 597-613.
83. Antes, T.J., Namciu, S.J., Fournier, R.E., Levy-Wilson, B. (2001) The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry*, 40 (23), 6731-6742.
84. Chernov, I.P., Akopov, S.B., Nikolaev, L.G., Sverdlov, E.D. (2002) Identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in a one megabase locus of human chromosome 19q13.12: long-range correlation of S/MARs and gene positions. *Journal of Cell Biochemistry*, 84 (3), 590-600.

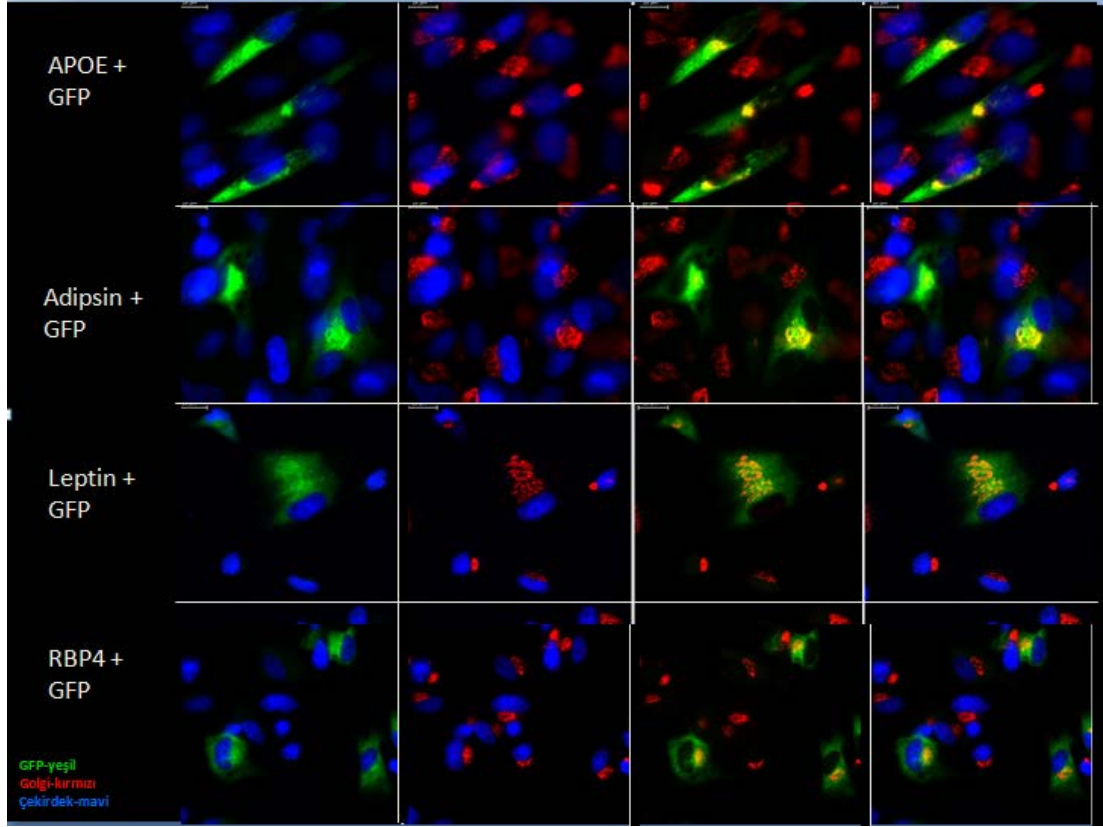
85. Auten, J., Agarwal, M., Chen, J., Sutton, R., Plavec, I. (1999) Effect of scaffold attachment region on transgene expression in retrovirus vector-transduced primary T cells and macrophages. *Human Gene Therapy*, 10 (8), 1389-1399.
86. Conese, M., Auriche, C., Ascenzioni, F. (2004) Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Therapy*, 11 (24), 1735-1741.
87. van Drunen, C.M., Sewalt, R.G., Oosterling, R.W., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C., van Driel, R. (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Research*, 27 (14), 2924-2930.
88. Girod PA, M.N. (2003). Use of scaffold/matrix-attachment regions for protein production. In *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*: Elsevier Science B.V.
89. Kramer, J.A., Singh, G.B., Krawetz, S.A. (1996) Computer-assisted search for sites of nuclear matrix attachment. *Genomics*, 33 (2), 305-308.
90. Singh, G.B., Kramer, J.A., Krawetz, S.A. (1997) Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Research*, 25 (7), 1419-1425.
91. Liebich, I., Bode, J., Frisch, M., Wingender, E. (2002) S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. *Nucleic Acids Research*, 30 (1), 372-374.
92. Charge, S.B., Rudnicki, M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiology Review*, 84 (1), 209-238.
93. Yaffe, D., Saxel, O. (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 7 (3), 159-166.
94. Lassar, A.B., Paterson, B.M., Weintraub, H. (1986) Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 47 (5), 649-656.
95. Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. ve diğeri. (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (14), 5434-5438.

96. Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.H., Jaenisch, R. (1992) Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*, 71 (3), 369-382.
97. Seale, P., Rudnicki, M.A. (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Developmental Biology*, 218 (2), 115-124.
98. Lee, S.J. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 61-86.
99. Shibata, M., Matsumoto, K., Aikawa, K., Muramoto, T., Fujimura, S., Kadowaki, M. (2006) Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Science*, 84 (11), 2983-2989.
100. McPherron, A.C., Lee, S.J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (23), 12457-12461.
101. Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N. ve diğ erleri. (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, 296 (5572), 1486-1488.
102. Huet, C., Li, Z.F., Liu, H.Z., Black, R.A., Galliano, M.F., Engvall, E. (2001) Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. *American Journal Of Physiology. Cell Physiology*, 281 (5), C1624-1634.
103. Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, 247 (4944), 836-838.
104. Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N. ve diğ erleri. (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (26), 15842-15846.
105. Flanagan, J.N., Linder, K., Mejhert, N., Dungner, E., Wahlen, K., Decaunes, P. ve diğ erleri. (2009) Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94 (8), 3003-3009.
106. Wu, Y., Zhou, S., Smas, C.M. (2010) Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mechanisms of development*, 127 (3-4), 183-202.

107. Lee, S.J., McPherron, A.C. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (16), 9306-9311.
108. Matzuk, M.M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D.R., Bradley, A. (1995) Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 374 (6520), 360-363.
109. Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., Attisano, L. (2003) Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular Cell Biology*, 23 (20), 7230-7242.
110. Kim, H.S., Liang, L., Dean, R.G., Hausman, D.B., Hartzell, D.L., Baile, C.A. (2001) Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281 (4), 902-906.
111. Allen, D.L., Cleary, A.S., Speaker, K.J., Lindsay, S.F., Uyenishi, J., Reed, J.M. ve diğerleri. (2008) Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism*, 294 (5), E918-927.
112. Nishi, M., Yasue, A., Nishimatu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M. ve diğerleri. (2002) A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293 (1), 247-251.
113. Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R. (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (51), 49831-49840.
114. Hsiao, S.P., Chen, S.L. (2010) Myogenic regulatory factors regulate M-cadherin expression by targeting its proximal promoter elements. *The Biochemical Journal*, 428 (2), 223-233.
115. Karsch-Mizrachi, I., Travis, M., Blau, H., Leinwand, L.A. (1989) Expression and DNA sequence analysis of a human embryonic skeletal muscle myosin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research*, 17 (15), 6167-6179.
116. Cabane, C., Englaro, W., Yeow, K., Ragno, M., Derijard, B. (2003) Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284 (3), C658-666.

117. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182 (3), 311-322.
118. Moreno, R., Martinez, I., Petriz, J., Nadal, M., Tintore, X., Gonzalez, J.R. ve diğeri. (2011) The beta-interferon scaffold attachment region confers high-level transgene expression and avoids extinction by epigenetic modifications of integrated provirus in adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 17 (3), 275-287.
119. Jenke, A.C., Stehle, I.M., Herrmann, F., Eisenberger, T., Baiker, A., Bode, J. ve diğeri. (2004) Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (31), 11322-11327.
120. Levy-Wilson, B., Fortier, C. (1989) The limits of the DNase I-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (35), 21196-21204.
121. Wang, D.M., Taylor, S., Levy-Wilson, B. (1996) Evaluation of the function of the human apolipoprotein B gene nuclear matrix association regions in transgenic mice. *Journal of Lipid Research*, 37 (10), 2117-2124.
122. Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., Bode, J. (1990) Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties *in vitro* and function *in vivo*. *Biochemistry*, 29 (32), 7475-7485.
123. Perry, S.W., Epstein, L.G., Gelbard, H.A. (1997) In situ trypan blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting. *BioTechniques*, 22 (6), 1020-1021, 1024.
124. Manfredi Romanini, M.G., Minazza, M., Capanna, E. (1971) Dna Nuclear Content in Lymphocytes from *Mus Musculus* L. and *Mus Poschiavinus* Fatio. *Bolletino Di Zoologia*, 38 (3), 321-326.
125. Andersen, D.C., Nielsen, C., Jensen, C.H., Sheikh, S.P. (2013) Horse serum reduces expression of membrane-bound and soluble isoforms of the preadipocyte marker Delta-like 1 homolog (Dlk1), but is inefficient for adipogenic differentiation of mouse preadipocytes. *Acta Histochemica*, 115 (4), 401-406.
126. Yuzbasioglu, A., Onbasilar, I., Kocaeefe, C., Ozguc, M. (2010) Assessment of housekeeping genes for use in normalization of real time PCR in skeletal muscle with chronic degenerative changes. *Experimental Molecular Pathology*, 88 (2), 326-329.

127. Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J. ve diğerleri. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37 (6), e45.
128. Welch, B.L. (1947) The generalisation of student's problems when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34 (1-2), 28-35.
129. Bish, L.T., Morine, K.J., Sleeper, M.M., Sweeney, H.L. (2010) Myostatin is upregulated following stress in an Erk-dependent manner and negatively regulates cardiomyocyte growth in culture and in a mouse model. *PloS one*, 5 (4), e10230.
130. Rosen, E.D., Spiegelman, B.M. (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 145-171.
131. Yew, N.S. (2005) Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (5), 769-780.
132. Cinti, S. (2005) The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 73 (1), 9-15.
133. Klenchin, V.A., Sukharev, S.I., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev Yu, A. (1991) Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophysics Journal*, 60 (4), 804-811.
134. Kobelt, D., Schleef, M., Schmeer, M., Aumann, J., Schlag, P.M., Walther, W. (2013) Performance of high quality minicircle DNA for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Molecular Biotechnology*, 53 (1), 80-89.
135. Gardlik, R., Palffy, R., Hodossy, J., Lukacs, J., Turna, J., Celec, P. (2005) Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor*, 11 (4), RA110-121.
136. Kay, M.A., He, C.Y., Chen, Z.Y. (2010) A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature Biotechnology*, 28 (12), 1287-1289.

EKLER**EK 1. PAI dışındaki öncü sinyallerine ait görsel bulgular.**

EK 2. Western Blot Çalışmalarında Transfer Sonrası Membranlardaki Toplam Protein Miktarlarının Ponceau S Boyası ile Görüntülenmesi



Şekil Ek.2.1. *APOB* S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında salgılanan proteinlerin transfer edildiği membranın Ponceau S ile görüntülenmesi. Transferin etkin gerçekleşmediği izlenmektedir.



Şekil Ek.2.2. *IFNB 314x2* S/MAR dizisi içeren vektör omurgası ile transfekte olan 3T3-L1 ve C2C12 hücrelerin ko-kültür besi ortamında salgılanan proteinlerin transfer edildiği membranın Ponceau S ile görüntülenmesi. Transferin etkin gerçekleşmediği izlenmektedir.

EK 3. Etik Kurul İzini**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

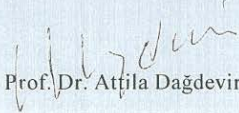
Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/2

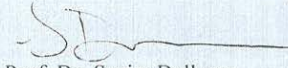
30./01/2007


DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI


TOPLANTI TARİHİ : 17.01.2007 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAYISI : 2007/1
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2007/1
KARAR NUMARASI : 2007/1 – 1
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof.Dr. Emir Baki Denkbaş, Parisa Sharafi, Rana Soylu,
 Tamer Çırak.
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 40 adet 5-D sıçan.

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Çetin Kocaepe'nin araştırma yürütücüsü olduğu 2007/1 kayıt numaralı ve **"Yağ Hücrelerinin Yeniden Programlanması ve Tedavide Kullanılabilir Potansiyelinin Araştırılması"** konulu çalışma; Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.


 Prof. Dr. Atilla Dağdeviren (Başkan)



 Prof. Dr. Sevim Dalkara (Üye)


 Prof. Dr. Hakan Orer

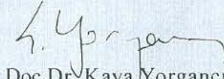

 Prof. Dr. Sema Çalış (Üye)

Doç.Dr. Nuket Örnek Büken (Üye)


 Dr. N. Böken


 Prof. Dr. Ömer Görduysus (Üye)

KATILMADI
 Doç.Dr. Nuray Er (Üye)


 Doç. Dr. Kaya Yorgancı (Üye)

Doç. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)

Dr. V. H. İlyas Onbaşlar (Üye)

Avukat Oya Soyuer (Üye)

ÖYLAMAYA KATILMADI

