

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA
RESEPTÖR-1' İN (TNFR 1) KLONLANMASI VE
TİROZİN FOSFORİLASYONUNUN
GÖSTERİLMESİ**

Derya ÖZEŞ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA
RESEPTÖR-1' İN (TNFR 1) KLONLANMASI VE
TİROZİN FOSFORİLASYONUNUN
GÖSTERİLMESİ**

Derya ÖZEŞ

Yüksek lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özgül ALPER**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 27/ 12 / 2013

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Özgül ALPER**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Nuray ERİN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../.... tarih ve/.... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Tümör Nekrosiz Faktör Alfa (TNF- α) bir sitokin olup kanser gelişimi gibi patolojik durumlar, bakteriyal veya viral enfeksiyon sırasında ağırlıklı olarak aktive edilen makrofajlar ve T-hücreleri tarafından sentezlenerek vücuda salınan bir proteindir. TNF- α , trimerik yapısı ile yine trimerik olan iki farklı reseptöre bağlanarak biyolojik etkinliğini gösterir. Bu reseptörlerden biri TNFR1 olup (Tümör Necroz Faktör Reseptör-1) 454 amino asitten meydana gelir ve intrasitoplazmik ölüm domeynini (Death Domain-DD) oluşturur. TNF- α TNFR1'e bağlandığı zaman DD domeynleri aracılığı ile kaspaz-8 aktivasyonu yaparak apoptoz indüksiyonunu sağlar. Apoptozu indüklemesinin yanı sıra TNFR1 aktivasyonu bu reseptörün intrasitoplazmik bölgesinde oluşan NIK-IKK kompleksi aracılığı ile NF-kB (Nükleer Faktör Kappa-B) transkripsiyon faktörünü de aktive eder. DD ihtiva etmeyen TNFR2 ise sadece NF-kB aktivasyonu yapar.

TNF- α bilinen bu fonksiyonlarının yanı sıra JAK1, JAK2, c-SRC, JNK, ERK, p38, AKT, STAT1 ve STAT3 gibi sinyal iletim enzimlerini ve transkripsiyon faktörlerini de aktive eder. Her ne kadar bunlar bilinmesine rağmen bu aktivasyonların moleküler temelini oluşturan ana mekanizma, halen tam olarak bilinmemektedir.

Projemizin amacı yukarıda bahsettiğimiz sinyal ileticilerinin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon temelini oluşturabilecek TNFR1 modifikasyonların olup olmadığının aydınlatılmasıdır. Bu bağlamda, TNFR1'in intrasitoplazmik bölgesinin amino asit dizilimine baktığımızda bu reseptörün C-terminalinde 359 ve 399 nolu amino asitlerin tirozin fosforilasyon noktaları olabilecek Y₃₅₉AVV ve Y₃₉₉SML dizileri içinde olduğu gösterilmektedir. TNFR1'in bu Tirozinler üzerinden fosforile olması yukarıda bahsettiğimiz sinyal ileticilerinin aktivasyonu için bir başlangıç noktası olabilir. Bu yüzden, TNF- α muamelesinin ardından TNFR1'in Tirozin fosforilasyonuna uğrayıp uğramadığını araştırılmıştır.

Elde ettiğimiz verilere göre, TNF- α zamana bağlı olarak TNFR1'in Tirozin fosforilasyonunu indüklemektedir. Bu sonuç ile TNFR1 üzerinde gözlenen Tirozin fosforilasyonunun mekanizması açıklanmamış sinyal ileticilerinin aktivasyonu için başlangıç bölgesi olabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: TNF- α , TNFR1, Apoptosis, Sinyal İletimi, Fosforilasyon, Ölüm Domeyni

ABSTRACT

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) is a cytokine produced during pathological conditions like cancer, viral or bacterial infection mainly by activated macrophages and T-cells and secreted into the body. TNF- α shows its biological activity by binding to trimeric receptors. One of these receptors is TNFR1, composed of 454 amino acids and contains intracytoplasmic death domain (DD). After binding to TNFR1, TNF- α induces apoptosis by activating caspase-8 via DD. In addition to induction of apoptosis, activation of TNFR1 also activates NF- κ B pathway via formation of intracytoplasmic NIK-IKK complex. TNFR2, which does not contain DD, can only activate NF- κ B pathway.

In addition to these known functions, TNF- α also induces the activation of JAK1, JAK2, c-SRC, ERK, JNK, p38, STAT1 and STAT3. Although we know these, we dont know the molecular mechanism behind these activations.

The main purpose of our study was to elucidate modifications of TNFR1 which would explain the mechanism of activation of the above mentioned signal transducers and transcription factors. In this respect, when we look at the amino acid sequence of the intracytoplasmic domain of TNFR1 we found two possible Tyrosine phosphorylation sites in the sequence of Y₃₅₉AVV ve Y₃₉₉SML. Tyrosine phosphorylation of TNFR1 at these sites could be basis of activation of above mentioned signal transducers. For this reason, we tested the tyrosine phosphorylation of TNFR1 after TNF- α stimulation.

According to our results, TNF- α causes Tyrosine phosphorylation of TNFR1 in a time dependent manner. With this result, we think that Tyrosine phosphorylation sites of TNFR1 could serve as a point of initiation for activation of above mentioned proteins.

Key words: TNF- α , TNFR1, Apoptosis, Signal Transduction, Phosphorylation, Death Domain.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin, çalışmalarını ve yazımını aşamasında emeği ve desteği geçen, sayın danışman hocam Prof. Dr. Özgül ALPER' e,

Yüksek lisans eğitimin süresince yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nde görevli personele,

Hayatımın her aşamasında sevgisini, desteğini, ve emeğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. TNFa Sinyal İletim Yolağı	3
2.2. TNFa Patolojisi	3
MATERYAL VE YÖNTEMLER	
3.1. 293 T Hücrelerin Kültürasyonu	7
3.2. TNFR1 cDNA'sının PCR Yöntemi ile Amplifikasyonu	7
3.2.1. TNFR1 cDNA'sının Klonlanmasında kullanılan Primerler	7
3.2.2. PCR Reaksiyon Karışımı	7
3.2.3. PCR Amplifikasyon Şartları	7
3.3. BamHI Enzimi İle Doğrusal Hale Getirilen Pcdna3a Vektörünün Yapışkan Uçlarının Alkalın Fosfataz Enzimi İle Traşlanması	7
3.3.1. TNFR1 cDNA'sının pcDNA3A Vektörüne Ligasyon İle Klonlanması	8
3.4. Bakteriyel Transformasyon Yöntemi	8
3.4.1. Amfisilin içeren, LB besiyeri ile hazırlanan Agar Petrinin Hazırlanması	8
3.4.2. Agar Petride Büyüyen Ve Seçilen Kolonilere,Miniprep Plasmit İzolasyon Protokol Uygulaması	9
3.4.3. Miniprep Plasmit İzolasyon Solusyonları	9
3.5. TNFR1 Ekspresyon Vektörünün 293T Hücrelerine Transfeksiyonu	9
3.6. Elektroforez için % 1 'lik Agaroz Jel Hazırlanması	10
3.6.1. Elektroforezinde Kullanılan Solusyonlar	10
3.7. Protein Hücre Lizatı Hazırlanması	10
3.7.1. HEPES Lizis Tamponu İçeriği	10
3.7.2. 2X HEPES Tamponu	11
3.8. Protein İmmunoprepisitasyon Amacı	11

3.8.1.	TNFR1 Proteininin İmmünopresipitasyon yöntemi	11
3.8.2.	Protein Miktar Tayini	11
3.9.	Western Blot Deneyin amacı	12
3.9.1.	Western Blot Kullanılan Solusyonlar	12
3.9.2.	Western Blot Deneylelerinin Yapılışı	12
3.9.3.	SDS-PAGE Elektforezi ve Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	13
3.9.4.	PVDF Membranın Antikorla İşaretlenmesi	13
4.2.	TNFR1 cDNAsının PCR ile Amplifikasyonu	21
4.3.	pcDNA3.A Vektörünün BamHI Enzimi ile Kesimi	21
4.4.	TNFR1 cDNA'sının T4 Ligaz Kullanarak Klonlanması	22
4.5.	TNFR1 cDNA'sının PcDNA3a Vektörüne Klonlanmasının Gösterilmesi	22
4.6.	Klonlanan TNFR1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi	23
4.7.	TNFR1 Proteininin TNF- α muamelesinin ardından Tirozin Fosforilasyonuna Uğradığının Gösterilmesi	24

BULGULAR

4.1	TNFR1 cDNA'sının PCR ile Amplifikasyonu	14
4.2.	TNFR1 cDNAsının PCR ile Ampfikasyonu	21
4.3.	pcDNA3.A Vektörünün BamHI Enzimi ile Kesimi	21
4.4.	TNFR1 cDNA'sının T4 Ligaz Kullanarak Klonlanması	22
4.5.	TNFR1 cDNA'sının pcDNA3-A Vektörüne KlonlanmasınınGösterilmesi	22
4.6.	Klonlanan TNFR1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi	23
4.7.	TNFR1 Proteininin TNF- α muamelesinin ardından Tirozin Fosforilasyonuna Uğradığının Gösterilmesi	25

TARTIŞMA

SONUÇLAR

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

EKLER

Ek-1: Plasmid izolasyonları ve EcoR1 kesimleri

Ek-2: Plasmidlerin BamH1 kesimleri ve fenol ekstraksiyon sonuçları

Ek-3: CIP'lenmiş ve CIP'lenmemiş vektörler

Ek-4: TNFR1 Amplifikasyon Jel Elektforez görüntüsü

Ek-5: PcDNA 3A BamH1 kesimi

Ek-6: Insertsız plasmid izolasyon sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. TNF- α Aracılı, Kaspaz 8 Aktivasyon Yolağı	4
2.2. TNFR1 Ve TNFR2 İndüklediği Apoptoz Ve Hücresele Yaşamını Sağlayan Yolaklar	6
4.1. pcDNA3-A Vektörün Ana Omurgası Ve Klonlama Bölgesinin Detaylı Nükleotit Dizini	19
4.2. PCR Amplifikasyonu Sonucu Elde Edilen TNFR1 cDNA'sının Görüntüsü	21
4.3. BamH1 Enzimi İle Doğrusal Hale Getirilmiş pcDNA3-A Plazmitinin Görüntüsü	21
4.4. Transformasyon Sonrası Oluşan 10 Koloniden Elde Edilen Plazmitlerin Görüntüsü	22
4.5. Ecor1 İle Kesilen Plazmitlerden Elde Edilen TNFR1 cDNA'sının Uzaklaştırılması	23
4.6. TNFR1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi	23
4.7. TNF- α Muamelesinin Ardından 55 Kdal'luk TNFR1'de Gözlenen Tirozin Fosforilasyonu	25
4.8. TNF- α İle Muamele Edilen 293T Hücre Lizatında TNFR1 Tirozin Fosforilasyonu	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
4.1. İnsan TNFR1 cDNA'nın Nükleotit Dizisi	14
4.2. İnsan TNFR1 cDNA'sının Pubmed'den Elde Edilen ORF Bölgesi Ve Bu Bölgenin Kodladığı Proteininin Amino Asit Dizisi	15
4.3. İnsan TNFR1 cDNA'sının "Restriction Mapper" Programına Göre Belirlenen Restrüksiyon Enzim Kesim Profili Ve Fragman Uzunlukları	16
4.4. pcDNA3-A Vektörünün Ana Omurgası Ve Klonlama Bölgesinin Detaylı Nükleotid Dizisi	20

SİMGELER ve KISALTMALAR

LB	:	Luria Besiyeri
DMEM	:	Dulbecco's Medium (Besiyeri)
TBE	:	Tris-Borik asit- Edta
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
SDS	:	Sodium Dodsil Sülfat
NaCl	:	Sodyum Klorür
NaFl	:	Sodium Florür
PMSF	:	Fenil Metil Sülfonil Florür
EGTA	:	Aminopolikarboksilik asit
TRIS	:	Trisaminometin
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin
cAMP	:	SiklikAdenozin Mono Fosfat
sTNFa	:	Sistolik TNFalpha
mTNFa	:	Membran bağlı TNFa
DD	:	Death Domain (Ölüm Domeyn)
TRADD	:	TNFReceptor Associated DD (TNF Reseptör Asosye Ölüm Domeyni)
FADD	:	Fas-Assosiyeye Ölüm Domain
RIP	:	Reseptör Interaksiyonlu Protein
NF-kB	:	Nükleer Faktör Kappa-B
TRAF1/2	:	TNF-Reseptör Assosyeye Faktör1/2
SDS-PAGE	:	SDS-Poli akrilemid jel elektroforaz
APS	:	Amoniyum Persulfat
TEMED	:	Tetra-metil-etil-diamine

BSA	:	Bovin Serum Albumin
PVDF	:	Polivinilidin di-florit
PBST	:	PBS Tween-20
CaCl₂	:	Kalsiyum Klörür
MgCl₂	:	Magnezyum Klörür

GİRİŞ VE AMAÇ

TNF'in varlığı ile ilgili ilk gözlem 1868 yılında Brunes tarafından yapılmıştır. Brunes, bakteriyel enfeksiyon geçiren bir hastasının tümör kitlesinin kendiliğinden gerileme gösterdiğini fark etmiş ve enfeksiyona bağlı olarak vücudun ürettiği molekül veya moleküllerin anti-tümör aktiviteye sahip olabileceğini iddia etmiştir. Bu gözlemden yıllar sonra Dr.Colley filtrasyonla sterilize edilmiş gram-negatif bakteri ekstraktının tümör dokularına verdiğinde bu ekstraktın tümör hücrelerini öldürdüğünü göstermiştir. Bundan dolayı bu ekstrakt "Colley'nin Zehiri" olarak tanımlanmıştır (2).

Bu çalışmalardan haberdar olan Dr.Shear ve arkadaşarı 1944 yılında gram-negatif bakterilerin tüm ekstraktını kullanmak yerine bu bakterilerin hücre duvarından izole ettiği ve LPS (lipopolisakrit) yapısında olan molekülü saflaştırmışlar ve bu molekülü tümör bulunduran farelere enjekte etmişlerdir. Enjeksiyondan günler sonrası, fare tümörlerinin küçüldüğünü gözleyen Dr.Shear, izole ettikleri LPS yapısındaki molekülü "endotoksin" olarak isimlendirmiştir (3). Bu çalışmaları takip eden Dr.Malley ve arkadaşları 1962 yılında LPS ile muamele edilmiş farelerin serumunu tümör taşıyan farelere vermiş ve günler içinde bu farelerin tümör dokularının nekroza uğradığını saptamışlardır (4). 1975 yılında ise, Loyd Old ve Carswell LPS ile muamele edilen farelerin serumundan izole ettikleri molekülleri tümör hücreleri üzerinde tek tek test ederken tümör nücrelerinin nekrozuna sebep olan örneği Tümör Nekrozis Faktör olarak isimlendirmişlerdir (5).

1984 yılında Pennica ve arkadaşları ile David Goeddel grubu insan TNF- α proteinini saflaştırdıktan sonra amino asit dizilimini belirlemişler ve bunu temel alarak hazırladıkları DNA primerlerini kullanarak insan cDNA kütüphanesinden TNF- α 'nın cDNA'sını klonlamışlardır. Ekspresyonu yapılan TNF α 'nın 26 kDa büyüklüğünde olduğu ve membran bağlı olarak hücrenin dışında yer alacak şekilde koşullandığı gösterilmiştir (6,7). TNF- α sinyal peptit içermediğinden TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından kesilerek kana salınır. 1985 yılında Aggarwal ve arkadaşları TNF- α 'nın TNFR1 olarak tanımlanan reseptöre bağlanarak biyolojik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (8). Hem membran bağlı, hem de kana salınan çözünür TNF- α molekülleri trimer yapısı oluşturarak trimer'li yapı dahi reseptörüne bağlanır (53). Ancak, aynı reseptöre bağlanmalarına rağmen çözünür TNF- α ile membran bağlı TNF- α 'nın farklı sistemleri aktive ettikleri de gösterilmiştir (40). Örneğin, Kollias grubu sadece mTNF α sentezleyen fare modeli yarattıklarında bu hayvanlarda hızla romatoid artrit gelişirken kanda dolaşan çözünür TNF- α 'nın romatoid artrit geliştirme özelliğinin çok daha zayıf olduğunu saptamışlardır (9,10).

TNF- α 'nın ve Aggarwal tarafından 55 kDa büyüklüğündeki TNFR1'e bağlandığının gösterilmesinin ardından aynı grup TNF- α 'nın bağlandığı ve 75 kDa büyüklüğünde olan TNFR2 olarak isimlendirilen reseptöre de bağlandığını belirlemişlerdir (43,47). Her iki reseptör de glikozillenen reseptörler olup TNF- α bağlayan hücre dışındaki bölümü daha fazla amino asit benzerliği gösterirken hücre sitoplazmasında kalan kısımları çok farklıdır (40). Bu iki reseptör arasındaki en önemli fark "ölüm domaini" olarak bilinen, 80 amino asitten oluşan ve "juxta membran" bölgesinde yer alan bölge TNFR1'de mevcut iken TNFR2'de bu bölge

yoktur. Ölüm Domeyninin olmayışı TNFR2'nin apoptosis indükleme yeteneğini de ortadan kaldırır (11,12).

TNFR1 ve TNFR2'nin klonlanmalarının ardından devam eden klonlama çalışmalarında bu reseptörlere benzeyen ve özellikle intrasitoplazmik bölgeleri bakımından birbirine çok benzeyen 29 farklı reseptör ve bu reseptörlere bağlanan 19 farklı ligant keşfedilmiştir. Bu durum "TNF-Super Family" olarak adlandırılan bir aileyi ortaya çıkarmıştır (13). Bu aile üyelerinden bazıları CD27, CD27L, CD30, CD30L, CD40, CD40L, LT-Rb, Fas/APO-1/CD95, FasL olarak bilinirler. TNFR1 ve TNFR2 ekspresyon noktaları bakımından farklılık gösterir. TNFR1 hemen hemen her dokuda ifade olurken TNFR2 özellikle lenfoid orijinli hücrelerde, CD4+ ve CD8+ T-lenfositlerinde, endotel hücrelerinde, mikrogliyalarda, oligodendrositlerde, timositlerde, kardiyak miyositlerde ve embriyonik mezenkimal hücrelerde ekspresyon gösterir (14-19).

Indiana Üniversitesinden Dr.Donner'ın laboratuvarı 1998 yılında DanQun Guo ve arkadaşları TNF-'nın JAK/STAT1 sinyal yolağını da aktive ettiğini bulmuşlardır (31). Bu çalışma TNF- α 'nın sadece apoptoz ve NF-kB indüksiyonu yapan bir molekül değil içinde aynı zamanda STAT1 transkripsiyon faktörünü aktive edebildiğini gösterirken aynı zamanda transkripsiyonu STAT1 tarafından indüklenen genleri de bir anlamda TNF- α 'nın hedef genleri arasına koydu. Bu yayının üzerinden yaklaşık 15 yıl geçmesine rağmen bu konuda yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. 2002 yılında Mincia ve arkadaşları (32) B-hücrelerinde TNF- α 'nın TNFR1 üzerinde JAK1/STAT3/STAT5 aktivasyonu yaptığını gösterdiler. 2008 yılında yine Donner'ın laboratuvarı, TNF- α -aracılı ERK, AKT, JNK ve p38 yolaklarının aktivasyonlarının PI3K ve c-SRC yolakları üzerinden olduğunu gösterilmiştir (32).

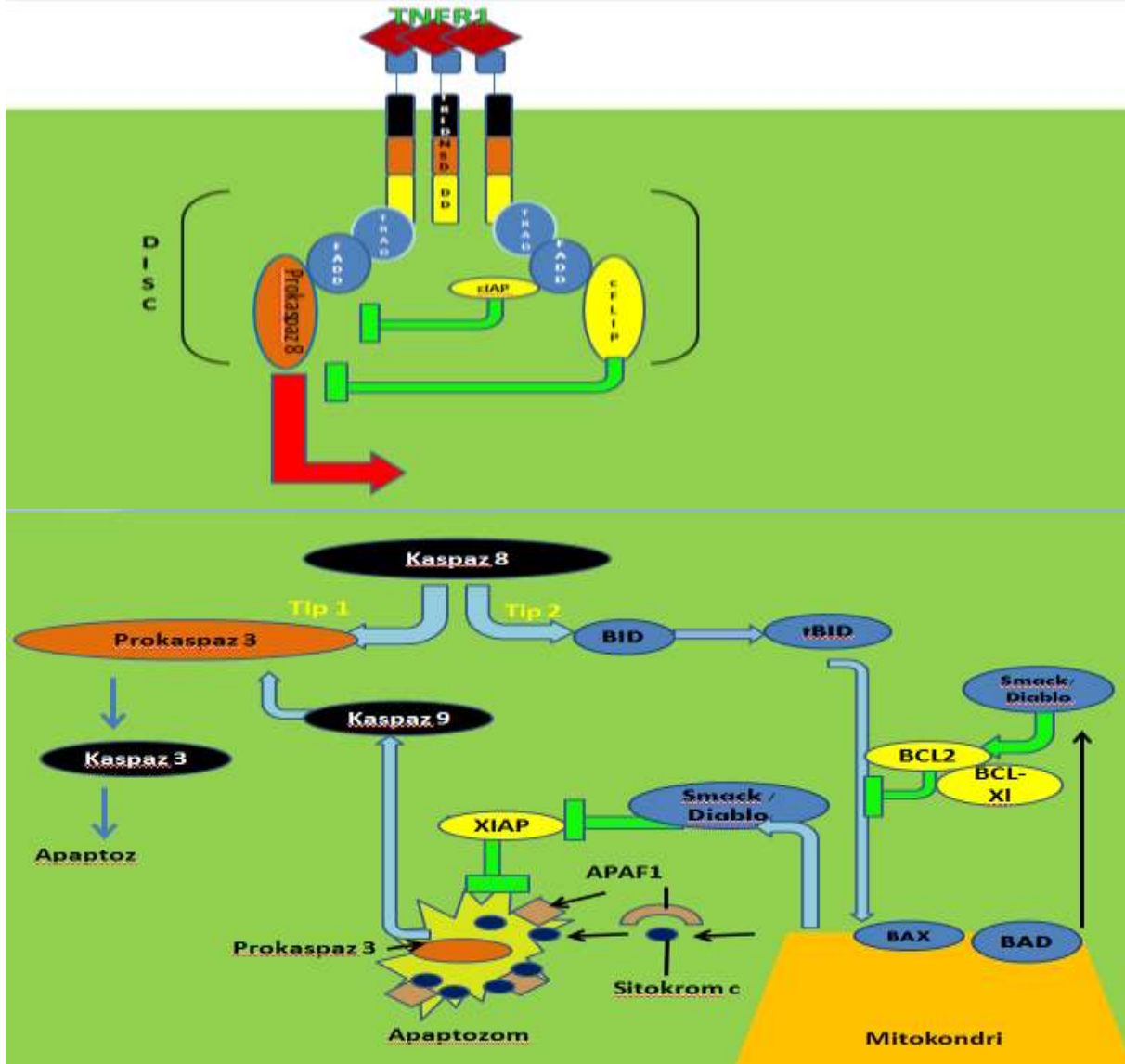
Yayınlanan 3 ayrı makaleye rağmen TNFR1 üzerinden başlayan PI3K, c-SRC, ERK, AKT, JNK ve p38 enzimlerinin aktivasyonu ile sonlanan olayları başlatan TNFR1 modifikasyonları halen bilinmemektedir. Bu soruya cevap bulmak amacı ile yaptığımız bu çalışmada, yukardaki son 5 enzimin aktive edilebilmesi için TNFR1'in mutlaka tirozin fosforilasyonuna uğraması gerektiğini düşülmüş ve gösterilmeye çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

TNF- α ile ilgili yapılan ilk çalışmalar 1991 yılında fare modelinden elde edilen sonuçlara dayanır (34). Bu modelin yaratılmasının ardından aynı transgenik farelerle yapılan çalışmaların sonuçlarına göre TNF- α sentezleyen farelerde sentezlemeyenlere göre çok daha kısa süre içinde Romatoid Artrit gelişimi gözlenmiştir (47). Romatoid Artrit kronik ve otoimmün bir hastalık olup tüm populasyonların %1'inde gözlenir. Kadınlarda erkeklere göre 3 kat daha fazla saptanır. Aynı hayvanların ilerleyen yıllarda kullanımı ile farklı araştırmacılar sinovial bölgede biriken TNF- α 'nın özellikle NF-kB sinyal yolağını aktive ederek enflamatuar sitokinler olan IL1, IL6, TNF- α ve GM-CSF başta olmak üzere çok sayıda İnterlökin ve Kemokinlerin bu bölgede bolca üretilmesine neden olduğunu göstermişlerdir (41,42). Primer olarak sentezlenen sitokinler inflammatuar kan hücrelerinin özellikle CD8+ T-hücreleri, B-hücreleri, dentritik makrofajlar, makrofajlar ve plazma hücrelerinin bölgede birikmesine ve bu bölgede kronik inflamasyonun devamlı olmasına sebep olduklarını ve kemik hücreleri osteoblastların parçalanmasına sebep olarak kemik harabiyetine neden oldukları gösterilmiştir (35- 39).

2.1. TNFa Sinyal İletim Yolağı

TNF- α biyolojik etkinliğini her iki reseptörü üzerinden gerçekleştirir. Ancak, her iki reseptörün intrasitoplazmik bölgeleri çok farklı olduğundan TNF- α bağlanmasının ardından bu reseptörlerden salınan sinyal çok farklıdır. Şekil 2.1.'de, gösterildiği gibi, TNFR1'de ligant bağlanmasından sonra gerçekleşen en etkin sinyal yolağı Kaspaz-8 (FLICE) aktivasyonu dur. TNF- α ligantının bağlanmasının ardından konformasyonel değişime uğrayan trimerik reseptör "Juxta Membran" bölgesinde yer alan DD aracılığı ile yine aynı bölgeyi bulunduran TRADD isimli adaptör proteine bağlanır. TRADD, DEAD, aracılığı ile FADD'a ile bağlanır ve FADD da DD bölgesi ile Kaspaz-8'in DD bölgesine bağlanarak klasik DISC kompleksini oluştururlar (55). Bu komplekte FLICE kesilerek aktif hale getirilir ve olgun Kaspaz-8 oluşur. Aktifleşen Kaspaz-8 pro-kaspaz-3 ve Bid kesimi yaparak bu molekülleri aktifleştirir ve apoptosis süreci aktive edilmiş olur. Apoptoz indüksiyonuna sebep olan kaspaz-8 aktivasyonunun yanı sıra FADD ile bağlanan TRADD aynı zamanda farklı bir bölgesi ile de RIP ile bağlanarak RIP aktivasyonu üzerinden NF-kB ve MKK3 aktivasyonu da yapar. Dolayısı ile TNFR1 üzerinden yayılan sinyaller hem Kaspaz-8 üzerinden hücre ölümüne sebep olurken aynı zamanda NF-kB aktivasyonu ile de yaşamsal veya anti-apoptotik yolların da aktive olmasına sebep olur.



Şekil 2.1. TNF- α aracılı, kaspaz 8 aktivasyon yolağı

TNFR1 üzerinden yaratılan sinyalin aksine TNF- α 'nın TNFR2'e bağlanması ile daha farklı bir sinyal yolağı açılır. Burada, ligant bağlı TNFR2'e ilk bağlanan proteinler TRAF1/2(TNF-Receptor Associating Factor) kompleksidir. Bu kompleksde TRAF2'ye bağlanan RIP NEMO'ya bağlanarak IKK α /IKK β kompleksini aktive eder. Aktive olan IKK α /IKK β kompleksi inhibitör proteinler I κ B α ve I κ B β 'yı fosforile ederek bu proteinlerin parçalanmasına neden olur. Uyarılmamış şartlarda I κ B α proteinleri NF- κ B (p65)'e bağlanarak bu transkripsiyon faktörünün proteinin sitoplazmada tutuklanmasına sebep olur, ancak, TNF α varlığında fosforilasyona uğrayan I κ B α / β ubikinyona uğrayıp 26S Proteozomlarda parçalanır. Böylece sitoplazmada serbest kalan p65(RelA), p50 ile heterodimer oluşturarak hücre çekirdeğine göç eder ve genomik DNA'da 500'den fazla genin promotörüne bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarını indükler. TNFR2 üzerinden yayılan tek sinyal yolağı NF- κ B aktivasyonu değildir. Aktive olan TRAF2 aynı zamanda bağladığı CIAP2 üzerinden de MEKK1/7 ile bağlanarak bu enzimleri aktive eder. Aktifleşen MKK7 doğrudan JNK1 fosforilasyonu yaparak bunun aktivasyonuna sebep olur. Aktifleşen JNK1 ise başta cJUN/cFOS (AP1) olmak üzere çok sayıda proteini fosforile ederek bunları aktive eder. AP1 aktivasyonu genel olarak yaşamsal yolakların aktivasyonuna yol açar. Son olarak TNFR2

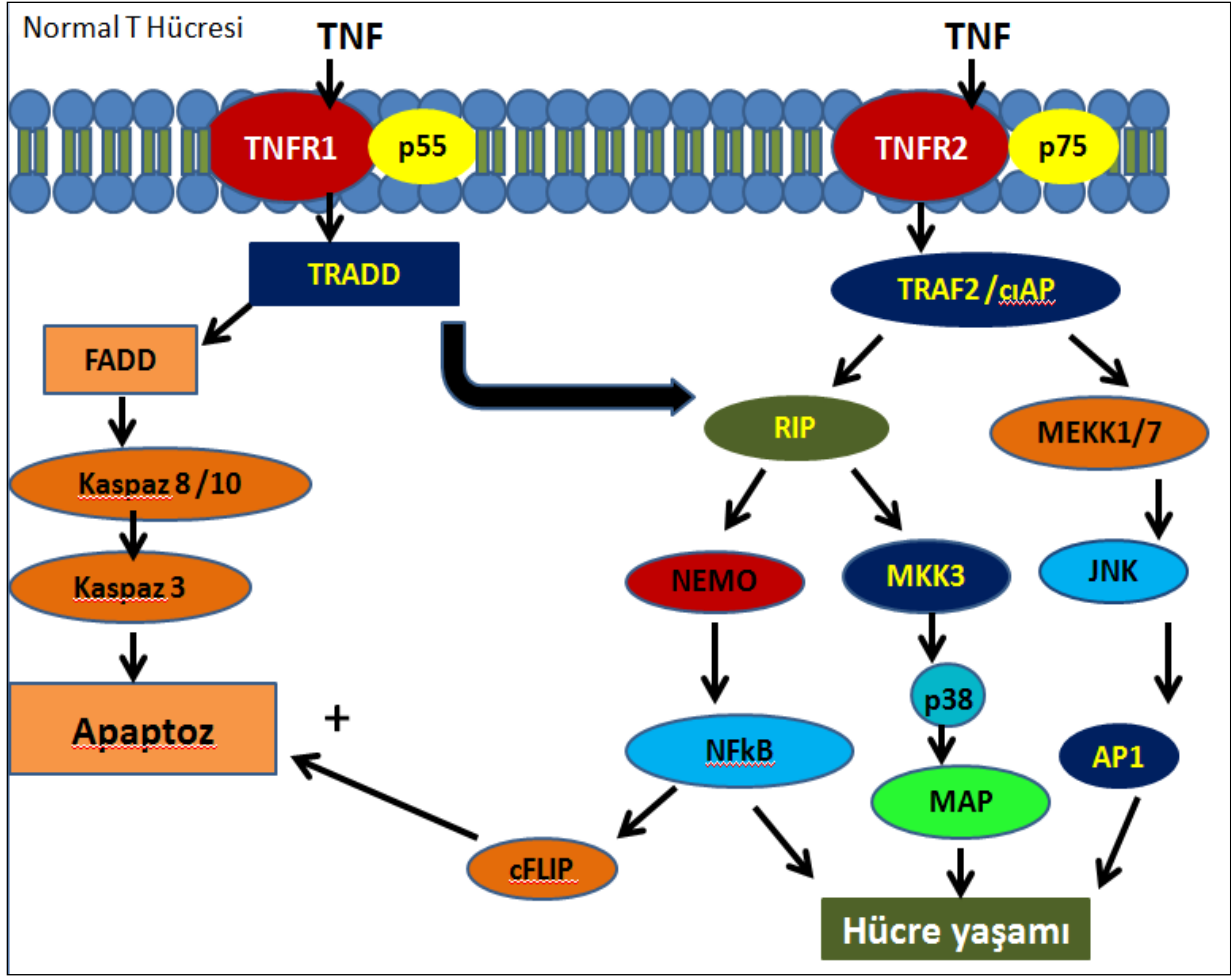
aktivasyonu RIP'e bağlanarak aktive olan MKK3 enzimini kullanarak p38 enziminin de aktivasyonuna sebep olur (26-30).

Tüm bu açıklanan yolların yanı sıra özellikle TNFR1 üzerinden yayılan başka bir sinyal yolağının da olduğu Dr.Donner grubu tarafından tekrar tekrar gösterilmiştir (31). Bu grup ilk olarak TNFR1'in intra-sitoplazmik bölgesine devamlı şekilde bağlanan JAK1 Tirozin kinaz enziminin transkripsiyon faktörü STAT1 aktivasyonu yaptığını ilk kez 1998 yılında göstermişlerdir. Aynı grup ilerleyen yıllarda TNFR1'in sitoplazmik kısmına JAK1'in yanısıra c-SRC ve PI3K alt ünitesinin de bağlandığını ve bu sayede TNFR1'in RAS üzerinden ERK ve PI3K aktivasyonu ile de AKT yolağını açtığını göstermişlerdir (32). Bu çalışmalar 2002 yılında Miscia ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile de doğrulanmıştır (33).

2.2. TNF α 'nın Patolojisi

1998 yılında Feldman ve arkadaşları römatoit artrit oluşumundan TNF- α 'nın ne kadar sorumlu olduğunu saptamak için sinovial bölgede biriken ve adeta infiltratuvar sitokinleri sentezlemeye programlanmış hücreleri doku kültürü ortamına aldıklarında bu hücrelerin yedi gün boyunca ilgili sitokin ve kemokinleri sentezlemeye devam ettiklerini bulmuşlardır (41). Araştırmacılar ortama nötralize edici anti-TNF- α antikoru ilave ettiklerinde ise kemokin ve sitokin sentezinin hemen azalmaya başladığını saptamışlardır (42,45). TNF- α 'ya bağlı olduğu düşünülen tek hastalık römatoit artrit değildir. TNF- α salgılanmasına sebep olduğu inflamatuvar sitokinlerden dolayı yaygın inflamasyona neden olduğundan inflamasyona bağlı olarak gelişen Chron hastalığı, infiltratuvar bağırsak sendromu ve demiyalinosyon sonucu ortaya çıkan Multiple Skleroz (MS) hastalıklarının gelişiminden de TNF- α sorumlu tutulmaktadır (40).

Tüm bunlar göz önüne alındığında TNF- α sistemik rahatsızlıklara sebep olma potansiyeli olan bir sitokin olarak karşımıza çıkmaktadır. TNF α sentezinin kontrolü çoklu faktörlere bağlı olduğundan TNF- α 'ya karşı geliştirilecek en etkin başa çıkma yönteminin TNF- α molekülünün veya reseptörünün doğrudan hedeflenmesi ile mümkün olduğu düşünüldüğünden çok sayıda biyoteknoloji firması bu molekülü veya reseptörlerini nötralize edecek antikolar geliştirmişler ve insanlığın kullanımına sunmuşlardır (41,42). TNF'in etkilediği bu hücrel yaşam ve apoptoz yolağı, şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. TNFR1 ve TNFR2 indüklediği Apoptoz ve Hücreyel Yaşamını sağlayan yollar

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Moleküler klonlamada, kullanılacak konukçu hücreyi, vektör DNA'yı, ve klonlanacak DNA'yı hazırlamak için, birden farklı metodları denedikten sonra, en açık sonuçları elde etmemizi sağlayan sonuçları destekleyen yöntemleri uyguladık.

3.1. 293T Hücrelerinin Kültürasyonu

Çalışmamızda kullandığımız insan embriyonik böbrek epiteli hücre hattı DMEM besi ortamında kültüre edilmiştir. Steril olarak alınan 500 ml'lik besi ortamına Steril kabin içinde ısı ile inaktive edilmiş 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum) ve 5 ml 100X PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B) solusyonlarından ilave edilerek besi ortamı hazırlanmıştır. 293T hücreleri bu besi ortamında kültüre edilmiş ve her 2-3 günde bir hücrelerin besi ortamı değiştirilerek sürekli proliferatif aşamada kalmaları sağlanmıştır.

3.2. TNFR1 cDNA'sının PCR Yöntemi ile Amplifikasyonu

3.2.1 TNFR1 cDNA'sının Klonlanmasında kullanılan Primerler

Forward Primer: 5'- cgc ggatcc gcc gcc atg ggc ctc tcc acc gtg cct gac ctg- 3'

Reverse Primer: 5'- cgc-ggatcc tct gag aag act ggg cgc ggg cgg gag ggc ggc-3'

3.2.2 PCR Reaksiyon Karışımı

10 x PFU Polimeraz Tampon: 5 ul

MgCl₂ : 2.5 µl

dNTP (10 mM): 1 µl

İleri primer (10 mM): 1 µl

Geri primer (10 mM): 1 µl

Q solusyon: 5 µl

Plasmit: 2 ul (100 ng)

Steril distile su:27 µl

PFU Polimeraz: 0.5 µl

3.2.3. PCR Amplifikasyon Şartları

Hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki programa göre Amplifiye edilmiştir.

94°C' de 5 dakika

94 °C' de 45 saniye

60°C'de 1 dakika

72°C' de 3 dakika 35 Döngü

72°C'de 5 dakika 1 Döngü

4°C'de ∞

3.3. BamH1 Enzimi İle Doğrusal Hale Getirilen pcDNA3-A Vektörünün Yapışkan

Uçlarının Alkalın Fosfataz Enzimi İle Traşlanması:

BamHI enzimi ile kesildikten sonra yapışkan uç oluşturan pcDNA3-A vektörünün Ligasyon işlemi sırasında kendi kendine kapanması söz konusu olacağından bunu önlemek için BamHI ile kesilerek doğrusal hale getirilmiş olan vektörün tamamı 44 mikrolitre steril saf su içinde çözüldükten sonra 5 mikrolitre 10X Sığır Alkalın Fosfatazı (CIP-Calf Intestinal Phosphatase) enzim tamponu ve 1 mikrolitre CIP ilavesinin ardından gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün CIP aktivitesini inhibe etmek için reaksiyon tüpü 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve örneğin üzerine 100 mikrolitre Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:10 v/v) karışımından konarak örnek vortekslenmiş ve buz içinde 30 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. İçinde vektör DNA'sının bulunduğu üst faz steril bir tüpe alındıktan sonra toplam hacmin 1/10'u kadar pH'ı 4.2 olan 3 M Sodyum aseta solusyonu ilave edilmiş ve oluşan toplam hacmin 2 katı saf etanol ilavesinin ardından örnek -20°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek traşlanmış vektör DNA'sı çöktürülmüştür. Steril su içinde çözünen vektör klonlamada kullanılmıştır.

3.3.1. TNFR1 cDNA'sının pcDNA3-A Vektörüne Ligasyon ile Klonlanması

pcDNA3.A Vektörü: 1 µl (100 ng)

TNFR1 cDNA'sı: 1 µl (300 ng)

T4-Ligaz Tamponu (5X): 4 µl

T4-Ligaz: 1 µl

Steril Su: 13 µl

Toplam reaksiyon 20 mikrolitre olarak hazırlandıktan sonra örnek 16 derecede geceboyu inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon ürününe başka bir işlem yapmadan bunun tamamı 50 mikrolitre "transformasyon kompetent" E.coli DH5- suşuna transform edilmiştir.

3.4. Bakteriyel Transformasyon Yöntemi

Ligasyon işleminin ardından TNFR1 cDNA'sını bulduran plazmitleri seçebilmek amacı ile 20 mikrolitre ligasyon ürünü E.coli'nin DH5- α suşuna transform edilmiştir. Bunun için stokları daha önce hazırlanmış 50 mikrolitre "transformasyon kompetent" DH5-α bakterileri -80'den alınmış ve buz içinde çözünmesi sağlandıktan sonra Ligasyon ürününün 10 mikrolitre'si bakterilere ilave edilmiş ve örnek 30 dakika buz içinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda bakteriler su banyosunda 42°C'de 1 dakika ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra tekrar buz içine alınmış ve üzerine 1 ml Amfisilin içermeyen normal LB besiyeri konulduktan sonra çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, bu bakterilerin 50 mikrolitresi 50 ng/ml Amfisilin içeren LB-agar petrilere ekilmiş ve gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda petride gözlenen koloniler plazmit izolasyonunda kullanılmıştır.

3.4.1. Amfisilin içeren, LB besiyeri ile hazırlanan Agar Petrinin Hazırlanması

Bir Litre suya 25 gm LB powder konularak otoklav edilmiş ve kullanıma kadar buzdolabında 4 derecede tutulmuştur. Amfisilin içeren Agar'lı petrilere hazırlanırken 1 LT suya 25 gram LB powder ve 10 gram Bacto Agar konulmuş ve aynı şekilde otoklav edildikten sonra örnek laminar flowda soğumaya bırakılmıştır. Donmadan hemen önce 50 mikrogram/ml olacak şekilde steril Amfisilin ilavesi yapılmış ve besiyeri laminar flow içinde steril petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri tamamen donduktan sonra petri kenarları parafilm ile kapatılarak kullanılabilece kadar buzdolabında 4°C'de tutulmuştur.

3.4.2. Agar Petride Büyüyen Ve Seçilen Kolonilere, Miniprep Plasmid İzolasyon Protokol Uygulaması

Seçilen tek kolonilerden alınan bakteriler 50 mikrogram/ml Amfisilin içeren LB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de gece boyunca inkübe edildikten sonra 15 ml'lik tüplere alınmış ve 15 dakika 4,500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pelet üzerine 300 mikrolitre Solusyon 1 ilave edilmiş ve örnek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Bunun üzerine 300 mikrolitre Solusyon 2 eklendikten sonra örnek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. İkinci solusyonun ilavesinden sonra örnek berrak bir görünüm alana kadar yavaş yavaş ters-düz edilerek karıştırılmış ve berrak görüntü elde edildikten sonra 300 mikrolitre Solusyon 3 eklenmiş ve hızlıca karıştırıldıktan sonra örnek buz içinde 30 dakika bekletilmiştir. Plazmid solusyon örneği ependorf tüpe alınmış ve 4°C'de 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir ependorfa alınmış ve üzerine eşit volümde Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:10 v/v) konarak örnek vortekslenmiş ve buz içinde 30 dakika tutulduktan sonra 10.000 rpm'de santrifügasyon yapılmıştır. Üstfaz temiz bir tüpe alındıktan sonra üzerine 1/10 hacminde pH:4.2 olan 3 M Sodyum asetat solusyonundan konmuş ve ardından toplam hacmin iki katı saf etanol ilave edilmiştir. Örnekler -20°C'de 1 saat tutulduktan sonra 10.000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiş ve çöken pelet TE (10 mM Tris pH:8; 1 mM EDTA) tamponunda çözülmüş ve elektroforez için kullanılmıştır.

3.4.3. Miniprep Plasmid İzolasyon Solusyonları

Solusyon 1: 100 ml

- 0.9 gm Glukoz
- 2.5 ml (1 Molar Tris)
- 10 ml (100 mM EDTA)
- 87.5 ml distile H₂O

Solusyon 2: 100 ml

- 0.2 ml (10 N NaOH)
- 10 ml (%10 SDS)
- 90 ml distile H₂O

Solusyon 3: 100 ml

- 11.5 ml Glacial Asetik Asit
- 28.6 ml Steril H₂O
- 60 ml, 5M Potasyum Asetat

3.5. TNFR1 Ekspresyon Vektörünün 293T Hücrelerine Transfeksiyonu

Klonlama işleminin ardından TNFR1 vektörü Kalsiyum-Fosfat transfeksiyon yöntemi ile 293T hücrelerine transfekt edilmiştir. Bunun için %70 konfluent olan hücreler kullanılmıştır. 30 mikrogram TNFR1 ekspresyon vektörü 1 ml 2XHEPES Tamponu içinde 15 ml'lik steril tüpde çözüldükten sonra oda ısısında 5 dakika tutulmuş ve bunun üzerine 1 ml 0.25 M CaCl₂ solusyonu damlalar halinde ilave edilmiştir. Kalsiyum klorür ilavesi sırasında pipet tabancası kullanarak örnek hava kabacıkları yardımı ile karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin sonunda hazırlanan DNA karışımı oda ısısında 30 dakika bekletilmiş ve çökelti oluştuktan sonra örnekler maksimum hızda 1 dakika vortekslenmiştir. Ardından, DNA örneği 10 ml besiyeri içinde olan hücreler üzerine damlalar halinde verilmiş ve gece boyu DNA-Kalsiyum fosfat kompleksinin hücrelerin üzerine bağlanması sağlanmıştır. Ertesi

gün besiyeri tünden uzaklaştırılmış ve hücreler 10 ml %10 gliserol içeren DMEM ile 1 dakika inkübe edilmiştir. Bu şoklamanın ardından bu ortam da uzaklaştırılmış ve hücreler 10 ml steril PBS ile yıkandıktan sonra 10 ml serum ve antibiyotik içeren 10 ml DMEM hücreler üzerine verilmiş ve hücreler inkübasyona alınmıştır.

3.6. Elektroforez için % 1 'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Cam beher içinde 1 gram agaroz (Sigma) ve 100 ml 1XTBE tamponu içinde çözülmüş ve karışım mikrodalga fırında 2 dakika kaynatılmıştır. Tamamen eriyen agaroz üzerine çeker baca içinde 10 mg/ml konsantrasyondaki Etidyum Bromid solusyonundan 5 mikrolitre ilave edilerek örnek jel tankına dökülmüş ve 30 dakika katılaşması için beklenmiştir. Ardından, plazmit örneğinden yaklaşık 1 mikrogram 5 mikrolitre 2x yükleme tamponu ile karıştırılmış ve örnek jele yüklenmiş ve 120 volt'da 30 dakika elektroforeze tabii tutulmuştur. Elektroforez sonunda DNA örnekleri UV-transilluminatör yardımı ile görüntülenmiştir.

3.6.1. Elektroforezinde Kullanılan Solusyonlar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Tampon hazırlanışı

- 108 gm TrisBaz
- 55 gm Borik Asit
- 7.44 gm EDTA + Na

1 Lt suda çözüldükten sonra solusyonun pH'ı 8.0'e ayarlandı.

3.7. Protein Hücre Lizatı Hazırlanması

Western Blot ve immünoçöktürme için hücre lizatı HEPES tamponu içinde hazırlanmıştır. Hücre lizatı hazırlanacağı zaman TNF- α ile muamele edilmiş veya edilmemiş hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 10 ml 1xSteril PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml HEPES-Lizis tamponu hücrelerin üzerine verilmiş ve steril kazıyıcı yardımı ile tüm hücreler bu lizatını içine alınmıştır. Örnek daha sonra 1 dakika vortekslenmiş ve hücrelerin tamamen lizise uğramaları sağlanmıştır. Ardından, örnek 4 derecede 10.000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücresel atıklar çöktürülmüş ve süpernatant temiz bir ependorfa alınarak kullanıma kadar -80°C'de derecede tutulmuştur.

3.7.1. HEPES Lizis Tamponu İçeriği

100 mM NaF
50mM HEPES pH:7.00
150 mM NaCl
1 mM MgCL₂
1 mM EGTA
1 mM PMSF
1 mM Sodyum Orto-Vanadate
10 mikroM Pirofosfat
10 mikrogram/ml Leupeptin
10 mikrogram/ml Aprotinin
1 mikrogram/ml Pepstatin
1.2% Triton-X

3.7.2. 2X HEPES Tamponu

280 mM NaCl
1.5 mM Na₂HPO₄.2H₂O
12 mM Glukoz
50 mM HEPES)

3.8. Protein İmmunopresipitasyon Amacı

Lizatlar'da kompleks miks olarak, proteinler, lipitler, karbonitratlar, nükleik asitler, bulunduğu için, bunların arasından hedef proteinimizi uzaklaştırmak için, ilk önce, ön temizleme metodu uygularız. Ön temizlemede, Lizatı immunopresipitasyonda kulanacağımız solusyonların aynısı, kullanacağımız antikoru aynı sınıfında, ancak ilgisiz bir antikor ile inkübe ederiz. Buradaki amaç, hedef proteinin dışında olabilecek diğer non-spesifik proteinleri yakalamaktır.

IP deneyin amacı, hedef protein antijenimizi (TNFR1) çöktürmektir. Çöktürerek hedef proteinin yüksek konsantrasyon halini elde ederiz. IP'de hedef proteinimizi tanıyan ve bağlanan spesifik antikor kullanılır. Sonra protein miktar tayini yaparak, protein miktarını ölçülerek, western blot uygun konsantrasyonda proteini yüklenebilir.

3.8.1. TNFR1 Proteininin İmmünopresipitasyon yöntemi

TNF- α muamelesi ile hazırlanmış hücre lizatından 1 miligram lizat steril ependorfa alındıktan sonra örneğin hacmi Lizis tamponu ile 900 mikrolitre'ye tamamlanmıştır. Bu örneğin üzerine 50 mikrolitre Protein A/G-Agaroz (Santa Cruz: sc-2003) ilave edilmiş ve Nutator kullanarak 4°C'de 1 saat çalkalanması sağlanmıştır. Ardından, örnekler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe alınmış ve üzerine 1 mikrogram anti-TNFR1 (Santa Cruz: sc-8436) antikoru ilave edilmiş ve örnek 4 saat buzdolabında Nutator kullanarak çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler 100 mikrolitre Protein A/G-Agaroz ilave edildikten sonra örnekler gece boyunca 4 derecede çalkalanmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve pelet 1'er ml Lizis tamponu kullanarak 3 kez yıkanmıştır. Ardından peletin üzerine 100 mikrolitre SDS-yükleme tamponunu ilave edilmiştir. Örnekler kaynar su içinde 5 dakika bekletildikten sonra vortekslenmiş ve tekrar santrifüj edilerek agarozun çökmesi sağlandıktan sonra üst örnekten 50 mikrolitre alınarak yukarıda açıklandığı gibi elektroforeze tabi tutulmuş, bloklanmış ve antikor ile işaretlenmiştir.

3.8.2. Protein Miktar Tayini

Hepes tamponu içinde hazırlanmış hücre lizatı örneklerinden 1 mikrolitre lizat 3 tekrarlı olacak şekilde 96-well petrilere konulduktan sonra 1/5 (1 Reagent 4 distile su) sulandırılması yapılmış Bradford (BioRAD) solusyonundan 100 mikrolitre örnekler üzerine konulmuş ve 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 590 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen O.D değerleri 0-1-3-5-7-9-11 ve 13 mikrogram BSA standartının okuma değerlerine göre lizatların protein miktar tayini yapılmıştır.

3.9. Western Blot Deneyin Amacı

Hücre örneklerimizde hedef proteinlerin varlığını gözlemek için hücre lizatları SDS PAGE jel elektroforez'de yürütürüz. Lizatlardaki proteinler, 3-D yapılarına göre, ve yada denatüre olmuş proteinleri, protein polipeptit uzunluklarına göre ayırır. Sonra, hedef proteinimizi işaretlemek için, jel'i PVDF membran'a aktarırız; bu membranı, proteinimize hedeflenmiş antikorlar ile, Blotlama adlı basamakta işaretleriz.

3.9.1. Western Blot Kullanılan Solusyonlar

- 1-Akrilamit-29:08, (29 gram akrilamit: 08 gram Bis-Akrilamit 100 ml içinde çözülmüştür)
- 2-Alt (Resolving) Tamponu: 1.5 Molar Tris pH:8.8
- 3-Üst (Stacking) Tamponu: 0.5M Tris pH:6.8
- 4-Elektroforez Tamponu (10X): 15 gram Trizma-base, 94 gram glisin ve %10'luk 50 ml SDS solusyonu 1 litre içinde çözüldükten sonra solusyonun pH'ı 8'e dengelenmiştir.
- 5-Transfer Tamponu: 3.75 gram Glisin ve 7.25 gram Trizma-base 1 litre suda çözüldükten sonra 250 ml metanol ilavesi yapılmış ve tampon kullanıma kadar buzdolabında 4°C'de tutulmuştur.

3.9.2. Western Blot Deneylerinin Yapılışı

Çalışmamız boyunca %10'luk SDS-PAGE kullanılmış olup jel şöyle hazırlanmıştır.

20 ml Alt (Resolving) Jel için

- 8 ml Akrilamit:Bis-akrilamit solusyonu
- 5 ml 'Resolving' tamponu
- 200 mikrolitre %10'luk APS
- 200 mikrolitre %10 SDS
- 20 mikrolitre TEMED
- 7.7 ml distile su

Bunların hepsi cam beherde karıştırıldıktan sonra 20x20 cm boyutlarındaki cam plakalar arasına dökülmüş ve 1 saat süreyle polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon sonunda 10 ml Stacking jel hazırlanmış ve tarak yerleştirilerek Stacking Jel dökülmüştür.

10 ml Üst (Stacking) Jel İçeriği

- 0.625 ml Akrilamit solusyonu
- 1.25 ml Stacking Jel Tamponu
- 50 mikrolitre %10'luk APS
- 50 mikrolitre %10 SDS
- 10 mikrolitre TEMED
- 3 ml distile su

3.9.3. SDS-PAGE Elektforezi ve Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Jelin polimerizasyonunun ardından tarak uzaklaştırılmış ve kuyucuklar distile su ile yıkandıktan sonra jel tankına yerleştirilmiştir. Örnekler jele yüklenmeden önce miktar tayini yapılmış olan hücre lizatlarından 100 mikrogram protein lizatı ve alınan hacmin yarısı kadar SDS-yükleme tamponu ile karıştırılmış ve örnek kaynar su içinde 5 dakika denatürasyona bırakılmıştır. Ardından, oda ısısında soğutulan lizat jele yüklenmiş ve örnekler resolving jele geçene kadar 100 volt'da yaklaşık 30 dakika elektforeze tabi tutulmuştur. Resolving jele geçişten sonra voltaj 150'e çıkarılmış ve elektforeze 2 saat daha devam edilmiştir. Elektforezi tamamlanmış jeldeki proteinlerin PVDF membran transferi gece boyunca yapılmıştır. Bunun için transferden önce PVDF membran jel büyüklüğünde kesilmiş ve saf metanol içinde 5 dakika bekletildikten sonra Hooper marka protein transfer cihazı kullanılarak transfer solusyonu içinde gece boyu 40 volt'ta transfer gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda proteinlerin üzerine geçirildiği PVDF membran transfer cihazından alındıktan sonra saf metanol içinde 1 dakika bekletilerek membrana bağlanan proteinlerin kalıcı şekilde membran üzerine sabitlemeleri (fiksasyon) sağlanmıştır.

3.9.4. PVDF Membranın Antikorla İşaretlenmesi

Üzerine protein transferi yapılmış PVDF membran %1 BSA içeren PBST (1x PBS ve %0.1 Tween 20) solusyonu içinde 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bloklanmıştır. Bu işlemin ardından membran fosfotirozin spesifik monoklonal PY20 antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve membran PBST solusyonu ile her biri 30'ar dakikadan iki kez yıkanmıştır. Ardından, anti-mouse sekonder antikor'un 1/2000 dilüsyonu ile membran oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. Bu işaretlemenin ardından membran PBST ile her biri 30'ar dakikadan iki kez daha yıkanmıştır. Yıkamanın ardından membran üzerine ECL solusyonu konmuş ve 1 dakika inkübe edildikten sonra karanlık odada membran üzerine kemilüminasans'a duyarlı film kullanılarak sinyal elde edilmiştir.

BULGULAR

4.1. TNFR1 cDNA'sının PCR ile çoğaltılması

Çalışmamızda, pTNFR1p55 olarak isimlendirilmiş plazmit ile başlanmıştır. Bu plazmit TNFR1 cDNA'sını içeren bir "klonlama vektörü" olup bu vektörden protein ekspresyonu yapılmamaktadır.

Biz çalışmamızda bu cDNA'yı amplifiye ederek ökaryotik bir ekspresyon vektörü olan pcDNA3a vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla uygun restriksiyon klonlama enzimlerini tanımlamak için bu cDNA'nın restriksiyon profilini "Restriction Mapper" programını kullanarak belirledik. Çizelge 4.1.'de ORF'e karşılık gelen TNFR1 dizisi, Çizelge 4.2.'de ise bu diziyeye karşılık gelen "restriksiyon enzim kesim profili" verilmektedir. Bu dizilere göre ORF'de BamHI kesim noktası (GGATCC) yoktur, bu yüzden klonlama için klonlama primerlerimize bu diziyi koyduk.

Çizelge 4.1. İnsan TNFR1 cDNA'nın nükleotit dizisi

ATGGGCCTC TCCACCGTGC CTGACCTGCT GCTGCCGCTG GTGCTCCTGG
AGCTGTTGGT-60
GGGAATATAC CCCTCAGGGG TTATTGGACT GGTCCCTCAC CTAGGGGACA
GGGAGAAGAG
AGATAGTGTG TGTCCCAAG GAAAATATAT CCACCCTCAA AATAATTCGA
TTTGCTGTAC-180
CAAGTGCCAC AAAGGAACCT ACTTGTACAA TGACTGTCCA GGCCCGGGGC
AGGATACGGA
CTGCAGGGAG TGTGAGAGCG GCTCCTTCAC CGCTTCAGAA AACCACCTCA
GACTGCCT-300
CAGCTGCTCC AAATGCCGAA AGGAAATGGG TCAGGTGGAG ATCTCTTCTT
GCACAGTGGA
CCGGGACACC GTGTGTGGCT GCAGGAAGAA CCAGTACCGG CATTATTGGA
GTGAAAACCT-420
TTTCCAGTGC TTCAATTGCA GCCTCTGCCT CAATGGGACC GTGCACCTCT
CCTGCCAGGA
GAAACAGAAC ACCGTGTGCA CCTGCCATGC AGGTTTCTTT CTAAGAGAAA
ACGAGTGTGT-540

CTCCTGTAGT AACTGTAAGA AAAGCCTGGA GTGCACGAAG TTGTGCCTAC
CCCAGATTGA
GAATGTTAAG GGCAGTGAAG ACTCAGGCAC CACAGTGCTG TTGCCCCTGG
TCATTTTCTT-660
TGGTCTTTGC CTTTTATCCC TCCTCTTCAT TGGTTTAATG TATCGCTACC
AACGGTGGAA
GTCCAAGCTC TACTCCATTG TTTGTGGGAA ATCGACACCT GAAAAAGAGG
GGGAGCTTGA-780
AGGAACTACT ACTAAGCCCC TGGCCCCAAA CCCAAGCTTC AGTCCCCTC
CAGGCTTCAC
CCCCACCCTG GGCTTCAGTC CCGTGCCCAG TTCCACCTTC ACCTCCAGCT
CCACCTATAC-900
CCCCGGTGAC TGTCCCAACT TTGCGGCTCC CCGCAGAGAG GTGGCACCAC
CCTATCAGGG
GGCTGACCCC ATCCTTGCGA CAGCCCTCGC CTCCGACCCC ATCCCCAACC
CCCTTCAGAA-1020
GTGGGAGGAC AGCGCCACA AGCCACAGAG CCTAGACACT GATGACCCCG
CGACGCTGTA
CGCCGTGGTG GAGAACGTGC CCCCCTTGCG CTGGAAG**GAA TTC**GTGCGGC
GCCTAGGGCT-1200
GAGCGACCAC GAGATCGATC GGCTGGAGCT GCAGAACGGG CGCTGCCTGC
GCGAGGCGCA
ATACAGCATG CTGGCGACCT GGAGGCGGCG CACGCCGCGG CGCGAGGCCA
CGCTGGAGCT-1320
GCTGGGACGC GTGCTCCGCG ACATGGACCT GCTGGGCTGC CTGGAGGACA
TCGAGGAGGC-1380
GCTTTGCGGC CCCGCCGCC TCCCGCCCGC GCCCAGTCTT CTCAGA**TGA-1429**

Çizelge 4.2. İnsan TNFR1 cDNA'nın nükleotit dizisi.

MGLSVPDLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNN
 ICCTKCHKGTLYNDPCPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEM
 GQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKK
 NTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTVLLPLV
 IFFGLCLLSLLFIGLMYRYQRWWSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPS
 FSPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPREVAPPYQGADPILATAL
 ASDPIPPLQKWEDSAHKPQSLDTPATLY₃₅₉AVVENVPPLRWKEFVRRRLGLSD
 HEIDRLELQNGRCLREAQY₃₉₉SMLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGC
 LEDIEEALCGPAALPPAPSLLR-454

Çizelge 4.3. İnsan TNFR1 cDNA'sının "Restriction Mapper" programına göre belirlenen Restriksiyon Enzim Kesim Profili ve fragman uzunlukları

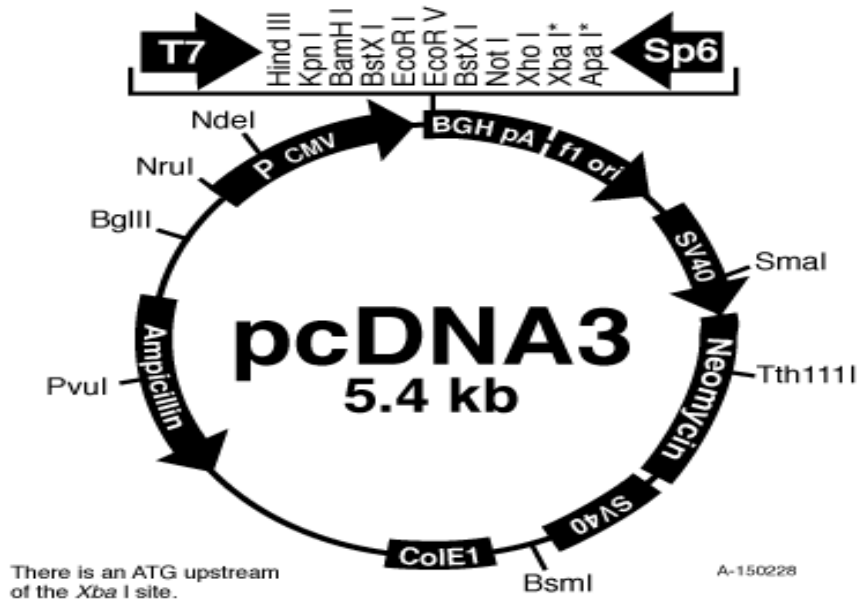
TNFR1 cDNA'sını Kesmeyen Enzimler: AatII, AbsI, AccI, AclI, AfIII, AgeI, AjuI, AloI, ApaI, ArsI, AscI, AsuII, BaeI, Ball, BamHI, BcgI, BclI, BdaI, BglI, BsaAI, BsaBI, BsePI, BsgI, BsmI, BspHI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtrI, CfrI, CspCI, DraII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, EcoRV, Esp3I, Fall, FseI, FspAI, HaeIV, HindII, HpaI, KpnI, MauBI, NaeI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, PacI, PflMI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PstI, PI-PspI, PspXI, PsrI, RsrII, SacI, SalI, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmlI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TfiI, TsoI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI

Restriksiyon Enzimi	Tanıdığı Dizi	Uzunluk	Kesim şekli	Sıklığı	Kesme Pozisyonu
BsrBI	CCGCTC	6	blunt	1	257
MslII	CAYNNNNRTG	6	blunt	1	631
OliI	CACNNNNGTG	6	blunt	1	631
PvuII	CAGCTG	6	blunt	1	302
SmaI	CCCGGG	6	blunt	1	224
XmnI	GAANNNTTC	6	blunt	1	1117
AarI	CACCTGC	7	five_prime	1	508
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	1	1128
AflIII	ACRYGT	6	five_prime	1	1266
ApoI	RAATTY	6	five_prime	1	1117
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	1	222
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	1	298
BglII	AGATCT	6	five_prime	1	338

Bpu10I	CCTNAGC	6	five_prime	1	298
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	1	543
Bsp1407I	TGTACA	6	five_prime	1	203
Cfr10I	RCCGGY	6	five_prime	1	395
ClaI	ATCGAT	6	five_prime	1	1154
EcoRI	GAATTC	6	five_prime	1	1117
HindIII	AAGCTT	6	five_prime	1	813
MfeI	CAATTG	6	five_prime	1	432
MluI	ACGCGT	6	five_prime	1	1266
NarI	GGCGCC	6	five_prime	1	1128
PasI	CCCWGGG	7	five_prime	1	846
PfoI	TCCNGGA	6	five_prime	1	44
PleI	GAGTC	5	five_prime	1	613
TatI	WGTACW	6	five_prime	1	203
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	1	904
XhoII	RGATCY	6	five_prime	1	338
BciVI	GTATCC	6	three_prime	1	225
BtsI	GCAGTG	6	three_prime	1	291
Hpy99I	CGWCG	5	three_prime	1	1074
MmeI	TCCRAC	6	three_prime	1	1016
NspI	RCATGY	6	three_prime	1	1209
PvuI	CGATCG	6	three_prime	1	1158
SacII	CCGCGG	6	three_prime	1	1237
SphI	GCATGC	6	three_prime	1	1209
TspDTI	ATGAA	5	three_prime	1	675
TspGWI	ACGGA	5	three_prime	1	250
AvrII	CCTAGG	6	five_prime	2	99, 1131
BccI	CCATC	5	five_prime	2	976, 1006
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	2	1260, 1290
EcoNI	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	2	98, 1189
EcoP15I	CAGCAG	6	five_prime	2	1230, 1260
FokI	GGATG	5	five_prime	2	955, 985

HgaI	GACGC	5	five_prime	2	1080, 1274
AgsI	TTSAA	5	three_prime	2	432, 778
AlfI	GCANNNNNNTGC	6	three_prime	2	615, 649
AlwNI	CAGNNNCTG	6	three_prime	2	293, 443
BarI	GAAGNNNNNTAC	7	three_prime	2	376, 408
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	2	860, 1346
BsaXI	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	2	1256, 1286
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	2	670, 1327
DraIII	CACNNNGTG	6	three_prime	2	371, 494
TstI	CACNNNNNTCC	6	three_prime	2	355, 387
ApaLI	GTGCAC	6	five_prime	3	460, 495, 570
StyI	CCWWGG	6	five_prime	3	99, 135, 1131
PstI	CTGCAG	6	three_prime	3	244, 382, 1172
AvaII	GGWCC	5	five_prime	4	90, 357, 455, 1284
BspMI	ACCTGC	6	five_prime	4	32, 499, 508, 1295
BpII	GAGNNNNNCTC	6	three_prime	4	244, 276, 523, 555
Eco57I	CTGAAG	6	three_prime	4	257, 801, 837, 997
HaeII	RGCGCY	6	three_prime	4	1034, 1131, 1182, 1321
Hin4I	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	4	281, 313, 1256, 1288
FauI	CCCGC	5	five_prime	5	937, 1074, 1338, 1349, 1353
BsrI	ACTGG	5	three_prime	5	92, 390, 423, 866, 1352
HphI	GGTGA	5	three_prime	5	88, 258, 828, 870, 916
MboII	GAAGA	5	three_prime	5	126, 335, 396, 675, 1348
BseMII	CTCAG	5	three_prime	6	86, 300, 312, 605, 635, 1129
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	6	464, 499, 574, 613, 866, 1100
TspRI	CASTG	5	three_prime	6	298, 359, 430, 618, 638, 1062

GsuI	CTGGAG	6	three_prime	8	67, 586, 812, 867, 1183, 1239, 1273, 1321
SduI	GDGCHC	6	three_prime	8	44, 464, 499, 574, 613, 866, 1100, 1274
BbvI	GCAGC	5	five_prime	9	14, 17, 289, 364, 449, 1154, 1168, 1244, 1282
TseI	GCWGC	5	five_prime	9	27, 30, 302, 377, 437, 1167, 1181, 1257, 1295
TauI	GCSGC	5	three_prime	9	36, 260, 925, 1128, 1227, 1236, 1239, 1328, 1336
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	10	44, 216, 473, 563, 644, 797, 828, 845, 1216, 1298
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	12	67, 257, 586, 801, 812, 837, 867, 997, 1183, 1239, 1273, 1321



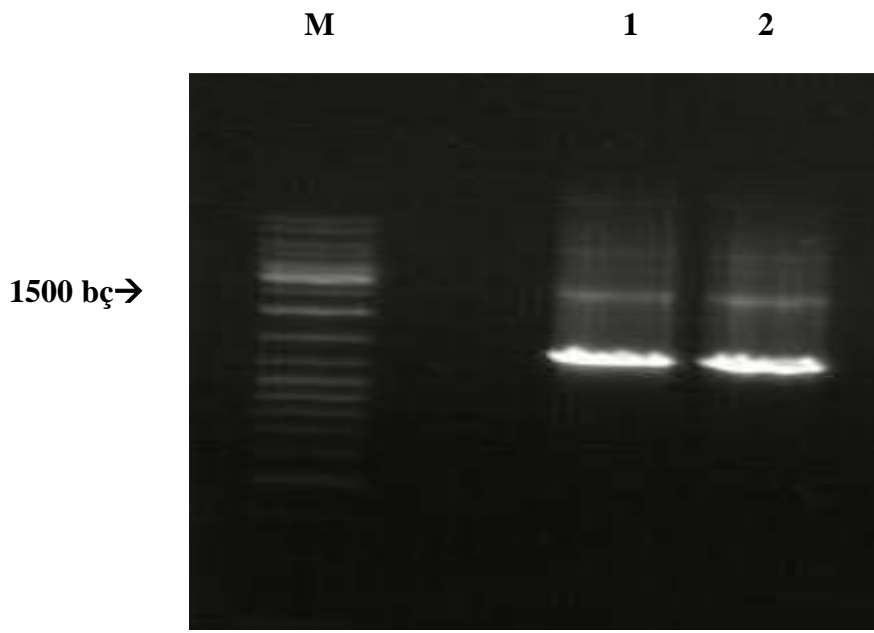
Şekil 4.1. pcDNA3A vektörün ana omurgası ve klonlama bölgesinin detaylı nükleotit dizini

Çizelge 4.4. pcDNA3A vektörünün ana omurgası ve klonlama bölgesinin detaylı nükleotit dizisi

Cloning into pcDNA3.1(-)/Myc-His A, B, and C, continued	
Multiple Cloning Site of Version A	Below is the multiple cloning site for pcDNA3.1(-)/Myc-His A. Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The boxed nucleotides indicate the variable region. Please note that there is a stop codon after the <i>Xba</i> I site. The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing.
741	AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG <u>CAAT</u> CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
801	<u>TATA</u> GCAGAGCTCT CTGGCTAACT <u>putative transcriptional start</u> AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA
861	<u>T7 promoter/priming site</u> ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGG <u>Nhe I</u> CTA GCG TTT AAA CGG GCC CTC Leu Ala Phe Lys Arg Ala Leu
917	<u>Xho I</u> <u>Nor I</u> <u>BstX I</u> <u>EcoR V</u> <u>EcoR I</u> <u>BstX I</u> TAG ACT CGA GCG GCC GCC ACT GTG CTG GAT ATC TGC AGA ATT CCA CCA CAC *** Thr Arg Ala Ala Ala Thr Val Leu Asp Ile Cys Arg Ile Pro Pro His
968	<u>BamH I</u> <u>Asp718 I</u> <u>Kpn I</u> <u>Hind III</u> <u>Apa I*</u> <u>myc epitope</u> TGG ACT AGT <u>GGA</u> <u>TCC</u> GAG <u>CTC</u> <u>GGT</u> <u>ACC</u> <u>AAG</u> <u>CTT</u> <u>GGG</u> <u>CCC</u> <u>GAA</u> <u>CAA</u> <u>AAA</u> <u>CTC</u> Trp Thr Ser Gly Ser Glu Leu Gly Thr Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu
1019	<u>Pme I</u> <u>pcDNA3.1/BGH Reverse priming site</u> <u>Polyhistidine tag</u> ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
1070	<u>Pme I</u> <u>pcDNA3.1/BGH Reverse priming site</u> TGA GPTTAAACCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCAT ***

4.2. TNFR1 cDNAsının PCR ile Amplifikasyonu

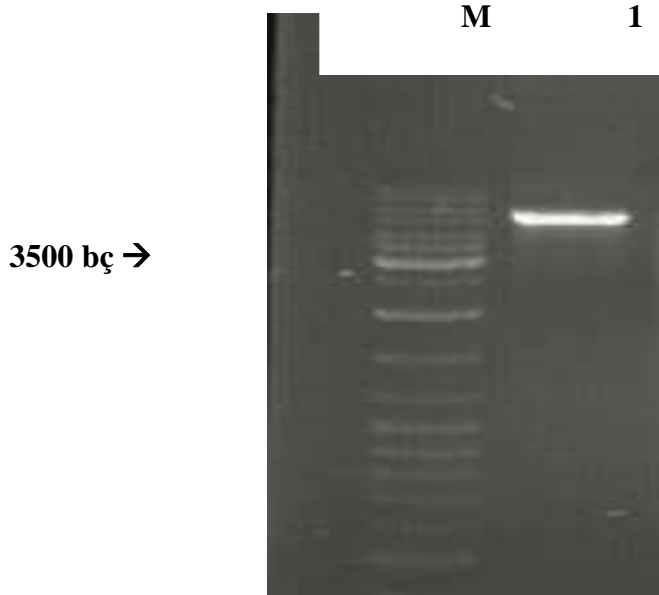
PCR reaksiyonu Materyal ve Yöntemler bölümünde tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. İki ayrı tüpde aynı anda yapılan PCR reaksiyonu sonunda elde edilen 50 ul'lik PCR ürününün 5 mikrolitresi %1'lik agaroz Jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Şekil 4'de görüldüğü gibi PCR reaksiyonu TNFR1 cDNA'sına karşılık gelen yaklaşık 1450 nükleotit uzunluğunda DNA fragmenti oluşturmuştur, Şekil 4.



Şekil 4.2. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen TNFR1 cDNA'sının görüntüsü.

4.3. pcDNA3.A Vektörünün BamHI Enzimi ile Kesimi

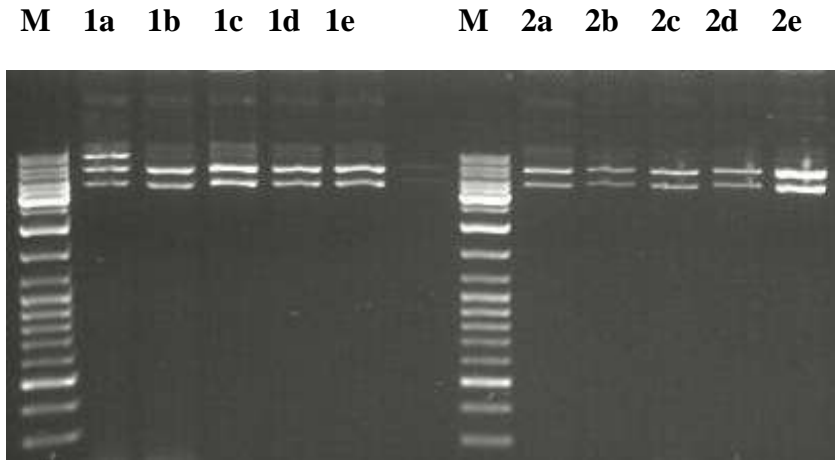
PCR ürünü TNFR1 cDNA'sının pcDNA3A omurgasına klonlanabilmek için pcDNA3.A vektörünün omurgasının aynı enzim ile açılması gerektiğinden vektör BamHI enzimi ile kesilmiş ve tam kesime uğrayan ve doğrusal hale gelen vektör %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülenmiştir. Bu jel elektroforez görüntüsü, şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. BamHI enzimi ile doğrusal hale getirilmiş pcDNA3A plazmitinin görüntüsü

4.4. TNFR1 cDNA'sının T4 Ligaz Kullanarak Klonlanması

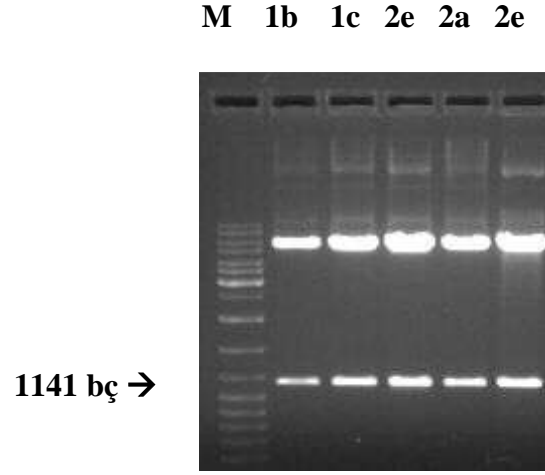
PCR amplifikasyonu ile çoğaltılan ve BamHI enzimi ile kesilen TNFR1 cDNA'sı ve aynı enzimle kesilip CIP ile traşlanan pcDNA3-A vektörü yöntemde belirtildiği gibi ligasyon işlemine tabi tutulmuş ve ligasyon ürünü E.coli'nin DH5- α suşuna transform edilmiştir. Transformasyon sonrası 50 mikrogram/ml amfisilin içeren 2 adet LB-agar petrilere ekilen transformatlar bir gece boyu 37°C'de inkübe edildikten sonra her petriden 5'er koloni alınmış ve 15 ml Amfisilin içeren LB besiortamına ekilerek gece boyu 37°C'de 150 rpm'de kültürasyon yapılmıştır. Ertesi gün bakterier santrifügasyonla toplanmış ve elde edilen pelletlerden Miniprep yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitler %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur, ve şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Transformasyon sonrası oluşan 10 koloniden elde edilen plazmitlerin jel görüntüsü

4.5. TNFR1 cDNA'sının pcDNA3A vektörüne klonlanmasının gösterilmesi

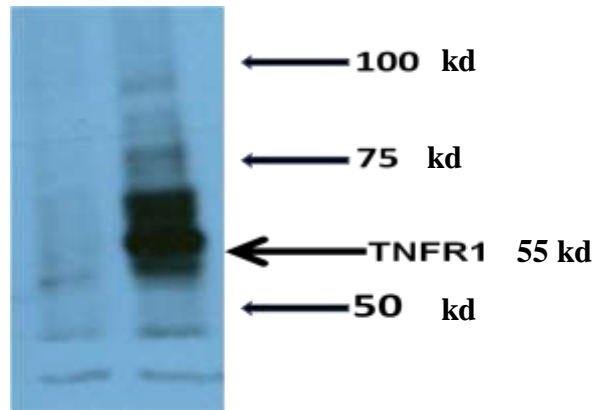
İzolasyonu yapılan plazmitlerin TNFR1 cDNA'sını içerip içermedikleri BamHI kesimi ile gösterilebileceği gibi vektör içinde ve TNFR1 cDNA'sında tek kesim noktası olan EcoRI enzimi kullanılarak da gösterilebilirdi. EcoRI kesim bölgesi cDNA'da 1117.pozisyonda bulunan GAATTC dizisidir. Aynı dizi vektör omurgasında klonlamada kullanılan BamHI bölgesinden 24 nükleotit önce gelmektedir. Bu durumda, eğer TNFR1 cDNA'sı vektöre anlamlı "sense" pozisyonda klonlanmış ise izole edilen plazmitlerin EcoRI ile kesiminden yaklaşık $1117+24=1141$ bp uzunluğunda bir DNA fragmentinin oluşması gerekir. Çalışmamız için sadece 1 "Sense" klona ihtiyacımız olduğundan ilk olarak sadece 5 plazmitin EcoRI kesimi yapılmıştır. Bu kesim ürünleri, agaroz jelde yürütüldüğünde klonların tamamının TNFR1 cDNA'sını "sense" orientasyonda içerdiği saptanmış gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuç, şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. EcoRI ile kesilen plazmitlerden elde edilen TNFR1 cDNA'sının uzaklaştırılması

4.6. Klonlanan TNFR1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi

TNFR1 cDNA'sını "sense" orientasyonda içeren plazmitlerden protein ekspresyonunun olup olmadığını göstermek için bu plazmitlerden bir tanesinin 30 mikrogramı Kalsiyum-Fosfat transfeksiyon yöntemi ile 293T hücrelerine verilmiş ve 72 saat inkübasyonun ardından toplam hücre lizatı hazırlanmış ve 100 mikrogram total lizat %10'luk SDS-PAGE'de yürütüldükten ve PVDF membrana transfer edildikten sonra anti-mouse anti TNFR1 antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile işaretlenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi transformasyona uğratılmamış 293T hücre lizatı ile yan yana yüklendiğinde ekspresyon vektörünü bulunduran hücrelerde 55 kDa büyüklüğünde TNFR1 proteininin ekspresyonu açık şekilde görülmektedir. Western Blotting sürecinde her iki kuyucukta eşit miktarda protein olduğunu göstermek için "internal" kontrol olarak yine bir anti-mouse antikor olan anti-beta aktin antikoruna da işaretlemede aynı anda kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 42 kDa olan beta-aktin proteininin miktarlarının her iki kuyucukta da aynı olduğu görülmektedir.

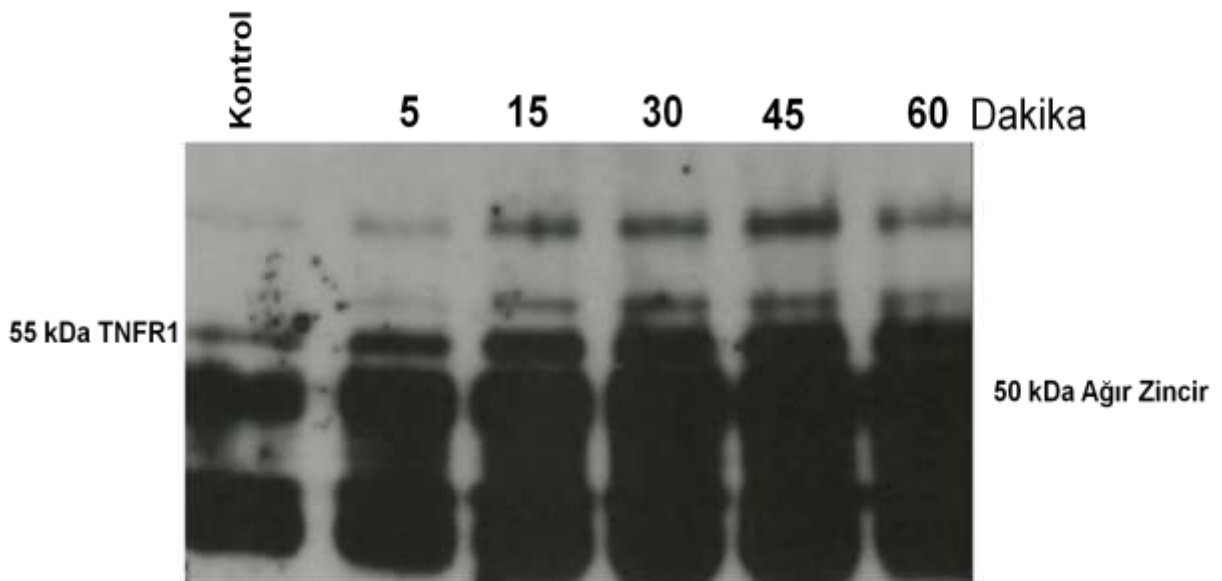


Şekil 4.6. TNFR1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

4.7. TNFR1 Proteininin TNF- α muamelesinin ardından Tirozin Fosforilasyonuna Uğradığının Gösterilmesi

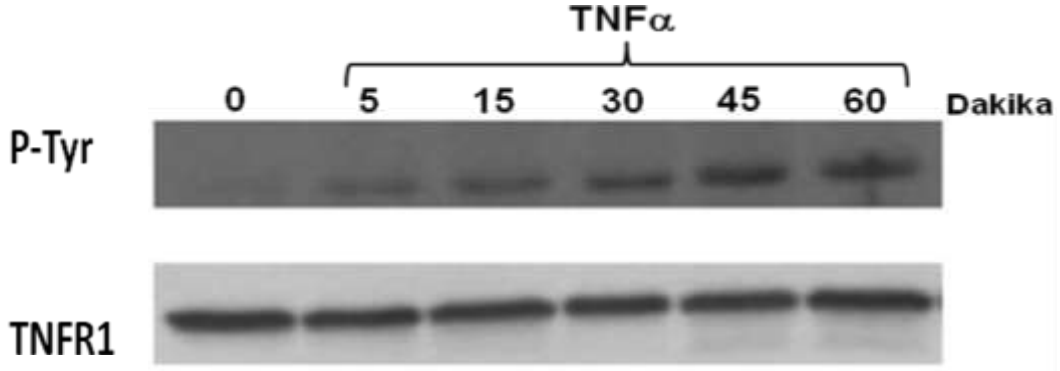
İnsan TNFR1 proteininin amino asit dizilimine bakıldığında C-terminalin sonuna doğru 2 adet muhtemel Tirozin (Y) fosforilasyon noktası YAVV ve YSML dizileri içinde bulunmaktadır. Konsensus Tirozin fosforilasyon motifi YxxL dizisidir. Bu durumda YSML dizisi konsensus diziye tam uyan bir dizidir. Literatüre bakıldığında TNF- α muamelesinin ardından RAS/RAF/ERK ve PI3K/AKT yollarının TNF- α tarafından aktive edilmesi ve bu yolların klasik NF- κ B ve Apoptosis yolağı ile bir ilgilerinin olmaması TNF- α 'nın TNFR1 reseptöründe tirozin fosforilasyonunu indüklemesi ile bunun mümkün olabileceğini düşündük. Bu düşünceden yola çıkarak da TNF- α muamelesinin TNFR1'de tirozin fosforilasyonu yapıp yapmayacağını cevaplamak istedik.

Çalışacağımız 293T hücreleri çok az miktarda TNFR1 ekspresyonu yaptığından bu reseptörün ökaryotik ekspresyon vektörünü yaparak bu hücrelerde bol miktarda sentezlenmesini sağladık. On santimetrelik petrielerde üretilen ve yaklaşık %70 konfluent olan 293T hücreleri transfeksiyondan 1 gün önce tripsinize edilip 6 ayrı petriye ekildikten sonra ertesi gün yine %70 konfluent düzeye gelmeleri sağlanmıştır. Bu petrielerin her birine Kalsiyum-Fosfat yöntemi ile 30 mikrogram TNFR1 vektörü transfect edilmiş ve ertesi günkü şoklamanın ardından 24 saat serum içeren besiyerinde inkübe edilmişlerdir. Bu hücreler gece boyu serumsuz ortama alındıktan sonra ertesi gün 10ng/ml TNF- α ile muamele edilmiş ve hücre lizatları 0-5-15-30-45-ve 60.cı dakikalarda toplanmıştır. Hücre lizatının protein konsantrasyonu belirlendikten sonra her lizatın 1 miligramı 1 mikrogram anti-TNFR1 antikoru kullanımı ile IP yöntemi ile çöktürülmüştür. Final peletin üzerine 100 mikrolitre SDS-yükleme tamponu konup kaynayan suda 5 dakika inkübe edildikten sonra örnekler santrifüj edilmiş ve üst fazın 50 mikrolitresi %10 SDS-PAGE kullanarak elektroforeze tabii tutulduktan sonra PVDF membran transfer yapılmış ve membran Yöntem kısmında açıklandığı gibi anti-fosfotirozin antikoru (sc-7020) ile işaretlenmiştir. Şekil 9'da açıkça görüldüğü gibi 50 kDa'luk IgG bantının hemen üzerinde 55 kDa büyüklüğünde bantın zamana bağlı olarak tirozin fosforilasyonuna uğradığı açıkça görülmektedir. "Sıfır" noktasında bile hiç görünmeyen Tirozin fosforilasyonu TNF- α ilavesinden 5 dakika sonra ortaya çıkmakta ve 45.cı dakikaya kadar artarak devam etmekte ve 60.cı dakikadan itibaren azalmaya başlamıştır.



Şekil 4.7. TNF- α muamelesinin ardından 55 kDa'luk TNFR1'de gözlenen Tirozin Fosforilasyonu

TNFR1'in IP ile saflaştırılmış formunda tirozin fosforilasyonunun gösterilmesinin ardından aynı fosforilasyonun sadece lizat kullanımı ile de gösterilip gösterilemeyeceğini test etmek için aynı örneklerin 100 mikrogram lizatları %10 SDS-PAGE ile elektroforeze tabi tutulduktan ve PVDF mebrana transfer edildikten sonra membran anti-fosfotirozin antikoru ile işaretlenmiştir. Bu işaretlemeden sonuç alındıktan sonra membran "strip off" edilmiş ve anti-TNFR1 antikoru ile tekrar işaretlenmiştir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi TNFR1'in tirozin fosforilasyonu sadece lizat kullanıldığında da görünmektedir. Her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklendiğini göstermek için blot daha sonra anti-GAPDH (sc-47724) antikoru ile de işaretlenmiştir.



Şekil 4.8. TNF- α ile muamele edilen 293T hücre lizatında TNFR1 Tirozin Fosforilasyonu.

TARTIŞMA

Tümör nekrosis faktör-alfa genetik temelde ilk kez 1975 yılında Carswell ve arkadaşları tarafından bakteriyel lipopolisakkaritlerin indüklediği bir serum faktörü olarak tanımlanmıştır(5). Bu tarihten tam 10 yıl sonra ilk insan TNF- α molekülünün cDNA'sı klonlanmış ve bakterilerde ekspresyonu gösterilmiştir (6). Tümör'ü nekroza uğratan bir protein olarak akıllarda yer ettiği için klonlandığı günden bu yana da onkolojide tedavi amaçlı kullanılabilecek moleküllerin başında gelmiştir (47,54). TNF- α 'nın tümör hücrelerini nasıl öldürdüğünün anlaşılması yönünde yapılan çalışmalarla bugün "ölüm domeyni" olarak bilinen yapı TNF- α 'nın bağlandığı TNFR1 reseptöründe yeni bir domeyn olarak ilk kez gösterilmiştir (11,12). Bu yapının belirlenmesi ve homologlarının aranması sonucunda da TNFR1'in yalnız olmadığı aslında "TNF süper ailesi" olarak adlandırılan bir grubun üyesi olduğu anlaşılmıştır. Bu grubun en önemli ortak yanı "ölüm domeynidir" dir (21). Ölüm domeynin bulunmasından sonra bu aile üyeleri ile yapılan çalışmaların tamamının vardığı ortak sonuç bu aile üyelerinin hücre ölümüne sebep olduğunun anlaşılmasıdır (43). Bu "ölüm domeynin"nin hücre ölümü ile nasıl bağdaştırıldığını bulmak için yapılan çalışmalar aynı domeyni içeren kaspaz-8 aktivasyonunun bulunması ile sonlanmış ve bir anlamda TNF- α 'nın tümörleri neden ölüme götürdüğünün de moleküler temeli anlaşılmıştır (24). Bu buluş ile TNF- α 'ya atfedilen hücre öldürücü özelliklerinin moleküler temeli de anlaşılmıştır.

TNF- α 'nın rolü, artrit ve akciğer kanserin, hem apoptotik hemde anti-apoptotik özeliği ile önem taşımaktan yanı sıra, günümüzde, hız ile artan, meme kanseri ve diabet hastalığındaki araştırılan rolü, TNF- α ilgili çalışmaların daha ön planda tutulma gerektiğini düşünmekteyiz.

Pek çok çalışmada, insülin proteini kodlayan, IRS1 genin tirozin fosforilasyonuna uğratıldığı gösterilmiştir (45). Bu tirozin fosforilasyonu ile, insulin veya IGF1 reseptörün tirozin fosforilasyonu, TNF- α 'nın insülin çalışmaları ile ön plana çıkan protein olarak kabul edilmiştir. Bu sebepten dolayı, TNF- α 'nın tetiklediği downstream sinyal yolları: PI3 Kinaz, Akt, Erk MAP kinaz mekanizması anlaşılması için çalışmalar yapılmıştır. Insulin reseptörü ve IGF-1 reseptörün, hücre dışı ligant bağlanmasından kaynaklanan tirozin fosforilasyonu, sitoplasmik IRS-1'in, bu reseptörlerin SH2 domainlerine bağlanmasına izin verildiği gösterilmiştir. Bu, IRS-1'in birden fazla sinyal yollarını aktiveleştirme özelliğini sağlamaktadır, PI3K ve MAPK gibi. Fare deneylerinde, IRS1 geninde defekt ve yetersizliğin, diabet fenotipi oluştururken; IRS1'in kanserde çok önemli bir rolluda vardır. IRS1 genin overekspresyonu, fare modellerinde, meme kanserin oluşum riskin artığıda gösterilmiştir.

Insan endotal hücrelerindeki (HUVECS) proliferasyon yollarında aktif rol aldığını gösterilmiş yayınlarda, TNF'in, anjiogenezdaki rolünü, VEGF'i tetikliyerek göstermişlerdir. Bundan sonra sebep olan yollar, SHP-1 ve KDR aktivasyon sayesinde, angiogenazın dahada artığı gösterilmiştir. TNF'in göbek bağı hücre proliferasyonunu desteklediğini bilmek,günümüzde ve gelecekteki geniş kök hücre bilimlerinde, TNFR1 üzeri yapılan çalışmaların büyük bir katkı sağlayacağını tahmin ediyoruz.

SONUÇLAR

Anti-tümör özelliğini test etmek için TNF- α kanser hastalarında denendiğinde çok ciddi bir immün yanıtın oluştuğu, makrofaj aktivasyonları ile interlökinlerin sentezinin çok yükseldiği görülür (13). Bu gözlenen özellikler ölüm domeyni ile açıklanamayınca sentezi indüklenen genlerin promotor analizleri ile bu genlerin çoğunun transkripsiyon faktörü NF- κ B tarafından indüklendikleri anlaşılmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalar sonunda da TNF- α 'nın NF- κ B'yi aktive ettiği bulunmuştur (20-22). Moleküler immünoloji alanının en önemli transkripsiyon faktörünün TNF- α tarafından indüklendiğinin gösterilmesi ile bu molekülün önemi daha da artar ve son 20 yılda bu konuda yüzlerce makale yayınlanmaktadır.

Bunu düşünmemizin ardındaki temel sebep ise bu reseptörün konsensus Tirozin fosforilasyon motifinden (YxxL) en az bir tane içermesidir. Bu dizi olabilecek en uygun yerde reseptörün C-terminalinin sonuna yakın bir bölgede yer almaktadır. Bunu göstermek için yaptığımız çalışmada ilk olarak TNFR1'in ekspresyon vektörünü yapıp bunun ekspresyonunu 293T hücrelerinde gösterdikten sonra TNF- α muamelesi ile bu reseptörün gerçekten tirozin fosforilasyonuna uğradığını ilk kez göstermiş bulunmaktayız.

Bize göre yaratılan bu fosforilasyon noktası SH2 domeyni içeren GRB2 gibi adaptör proteinlerin veya c-SRC gibi tirozin kinazların doğrudan bağlandığı bölge olabilir. Bundan sonra yapılacak mutasyon çalışmaları ile TNFR1 üzerindeki Y₃₉₉SML dizisi ve muhtemelen Y₃₅₉AAV dizilerindeki tirozin amino asitleri değiştirilerek bunların ERK, STAT1, c-SRC, PI3K, JNK, PI3K ve p38 aktivasyonlarına olan etkisi araştırılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Bruns, P. Die. *Heilwirkung Des Erysipels auf Geschwulste. Beitr. Klein.. Chir*, 1868. (3) p 443-446.
2. W.B, Coley, *Contribution to the knowledge of Sarcoma. Ann.Surg.* 1891. (14) p 199-220.
3. Shear, MC, Turner, *Chemical treatment of tumors with V.Isolation of hemorrhage-producing fraction from Serratia marcenses (bacillus prodigosus) culture filtrate.* J.National Cancer Institute, 1943. (4) p 81-97.
4. O'Malley et al. *Action of bacterial polysaccharide on tumors. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice-treated with Serratia marcences polysaccharide and induced tolerance.* J.National Cancer Institute, 1962. (29) p1169-1175.
5. Carswell, E. A. et al. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc. National Academy of Science, 1975.(72) p 3666–3670.
6. Pennica, D.et al. *Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor.* Proc. National Academy of Sciences, 1985. (82), 6060–6064
7. Pennica, D. et al.. *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.* Nature, 1984. **312**, 724–729.
8. Aggarwal BB et al. *Human lymphotoxin production by lymphoblastoid cell line: purification and initial characterization.* J.Biol Chemistry, 1984. **259**, 6896-691.
9. Kriegler, M.et al. *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.* Cell, 1988. **53**, 45–53.
10. Ware, C. F. et al. *Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells.* J. Immunol. 1991. **147**, 4229–4238.
11. Tartaglia, L. A. et al. *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.* Proc. National Academy of Sciences. 1991, **88**, 9292–9296.
12. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. & Goeddel, D. V. *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.* Cell, 1993. **74**, 845–853.

13. Aggarwal BB.. *Signaling pathways of the superfamily: A double-edged sword*. Nature Reviews/Immunology. 2003 (3): p 745-756.
14. Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R. & Shen, Y. *Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways*. Journal of Neuroscience, 2002. (22) 3025–3032.
15. McCoy, M. K. & Tansey, M. G. *TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease*. Journal Neuroinflammation, 2008. (5), 45.
16. Arnett, H. A. et al. *TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination*. Nature Neuroscience, 2001. 4: p. 1116–1122.
17. Dopp, J. M. et al. *Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NF- κ B translocation and oxyradical neutralization in glial cells*. Neurochemical. Res. 2002. (27), 1535–1542.
18. Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N. & Scheurich, P. *TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1*. European Journal of Immunology, 1998. 28, p: 257–263.
19. Irwin, M. W. et al. *Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium*. Circulation 1999. p: 1492–1498.
20. Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation*. Cell, 1995. (81), p: 495–504.
21. Wilson, N. S., Dixit, V. & Ashkenazi, A. *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks*. Nature Immunology, 2009. (10), p: 348–355.
22. Rothe, M. Et al. *TRAF2-mediated activation of NF-kappaB by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1996. 269: p. 1424–1427.
23. Hsu, H. et al. *TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell., 1996. 84, 299–308.
24. Kischkel, F. C. et al. *Cytotoxicity-dependent APO -1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J. 1995. (14): p. 5579–5588.
25. Scaffidi, C. Et al. *FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase -8/a and caspase -8/b*. J. Biol. Chemistry, 1997. 272: p. 26953–26958.
26. Stanger, B. Z., et al. *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death*. Cell , 1995. 81: p. 513–523.

27. Hsu, H. et al. *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. *Immunity*, 1996. (4): p. 387–396.
28. Zheng, L. et al., *Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1*. *Molecular Cell Biology*, 2006. 26: p. 3505–3513 .
29. Kelliher, M. A. et al. *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal*. *Immunity*, 1998. 8, 297–303.
30. Devin, A. et al. *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation*. *Immunity*, 2000. 12: p. 419–429.
31. Guo, DanQun., Dunbar, Jame.s, Yang, Chuan., Pfeffer, Lawrance, and Donner, David. *Induction of Jak/STAT Signaling by Activation of the Type 1 TNF Receptor1*. *The Journal of Immunology*, 1998. 160: p. 2742–2750.
32. Pincheira, Roxana., Castro, Ariel., Ozes, Osman., Idumalla, Prema., and Donner, David. *Type 1 TNF Receptor Forms a Complex with and Uses Jak2 and c-Src to Selectively Engage Signaling Pathways That Regulate Transcription Factor Activity1*. *The Journal of Immunology*, 2008. 181: p. 1288–1298.
33. Miscia, Sebastiano., Marchisio, Marco., Grilli, Alfredo., Valerio, Valentina., Lucia Centurione, Sabatino., Giuseppe., Garaci, Francesco., Zauli, Giorgio , Bonvini, Giorgio., and Baldassarre. Angela., *Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) Activates Jak1/Stat3-Stat5B Signaling through TNFR-1 in Human B Cells1*. *Cell growth and Differentiation*, 2002. (13): p. 13-18.
34. Keffer J. Et al. *Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis*. *EMBO Journal*, 1991. 10(13): p. 4025-31
35. Aloe L et al. *Level of nerve growth factor and distribution of mast cells in the synovium of tumour necrosis factor transgenic arthritic mice*. *Int J Tissue React.*, 1993.15(4): p. 139-43.
36. Probert L. Et al. 1995. *The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice*. *European Journal of Immunology*, 1995. 25(6):1794-7.
37. Fiore M et al. *Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF- α in the brain*. *Brain Behavior Immunology*, 1996. 10(2):p. 126-38.
38. Redlich K et al. *Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction*. *Journal Clinical Investigations*, 2002. 110(10):p. 1419-27.

39. Kassiotis G, Kollias G. *Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination.* J Experimental Medicine, 2001. **193**(4): p. 427-34.
40. Edwards CJ et al. *Molecular profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis.* Mol Med. 2007. **13**(1-2): p. 40-58.
41. Feldman M. Et al. *Anti-TNF alpha Therapy is useful in Rheumatoid Arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases* Transplant Proc. 1998. **30**(8): p. 4126-7.
42. Feldmann, Mark. *Development of anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis.* Nature reviews/Immunology, 2002. **2**: p. 364-371.
43. Ashkenazi. Avi. *Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumornecrosis Factor Superfamily.* Nature Reviews/Cancer, 2002. **2**: p. 420-430.
44. Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, Nuno L, Bonilla G, Nagore D, Ruiz Del Agua A, Martínez A, Aarden L, Martín-Mola E, Balsa A: *Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**: p. 1445-1452.
45. Arends S, Brouwer E, van der Veer E, Groen H, Leijnsma MK, Houtman PM, Griep EN, Limburg PC, Kallenberg CG, Wolbink GJ, Brouwer E: *The formation of autoantibodies to TNF- α blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis.* Clin Exp Rheumatol, 2010.
46. Chamaida Plasencia: *The immunogenicity to the first anti-TNF therapy determines the outcome of switching to a second anti-TNF therapy in spondyloarthritis patients* Rheumatology Department, La Paz University Hospital-Idipaz, 2013.
47. Ying-jie Guan, Zhe Zhang, Chen Yu. *Phospho SXXED Motif Mediated TNF Receptor 1 TRADD Death Domain Complex formation for T Cell activation and Migration.* Journal of Immunology. 2013.
48. Dr. J.P. Dutz, *Tumor Necrosis Factor- α Inhibition and Palmoplantar Pustulosis: Janus-Faced Therapy?* Journal of Rheumatolog. 2013.
49. Baraliako, Xenofon *Vertebral Erosions Associated with Spinal Inflammation in Patients with Ankylosing Spondylitis Identified by Magnetic Resonance Imaging: Changes After 2 Years of Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy.* J Rheumatol, 2013.
50. Tanabe A, Konno J, Tanikawa K, Sahara H. *Transcriptional machinery of TNF- α -inducible YTH domain containing 2 (YTHDC2) gene.* Gene, 2013.
51. Ali M, Fritsch J, Zigdon H, Pewzner-Jung Y, Schütze S, Futerman AH. *Altering the sphingolipid acyl chain composition prevents LPS/GLN-mediated hepatic failure in mice by disrupting TNFR1 internalization.* Cell Death Dis, 2013.

52. Watanabe T, Takahashi A, Suzuki K, Kurusu-Kanno M, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M. *Epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- α -inducing protein of Helicobacter pylori.* .Int J Cancer, 2013.
53. Linderoth E, Pilia G, Mahajan NP, Ferby I .*Activated Cdc42-associated Kinase 1 (Ack1) Is Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor Recruitment to Lipid Rafts and Induction of Cell Death.* J Biol Chem, 2013.
55. Dhruv H, Loftus JC, Narang P, Petit JL, Fameree M, Burton J, Tchegho G, Chow D, Yin H, Al-Abed Y, Berens ME, Tran NL, Meurice N. *Structural Basis and Targeting of the Interaction between Fibroblast Growth Factor-inducible 14 and Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis.* J Biol Chem.. 2013.

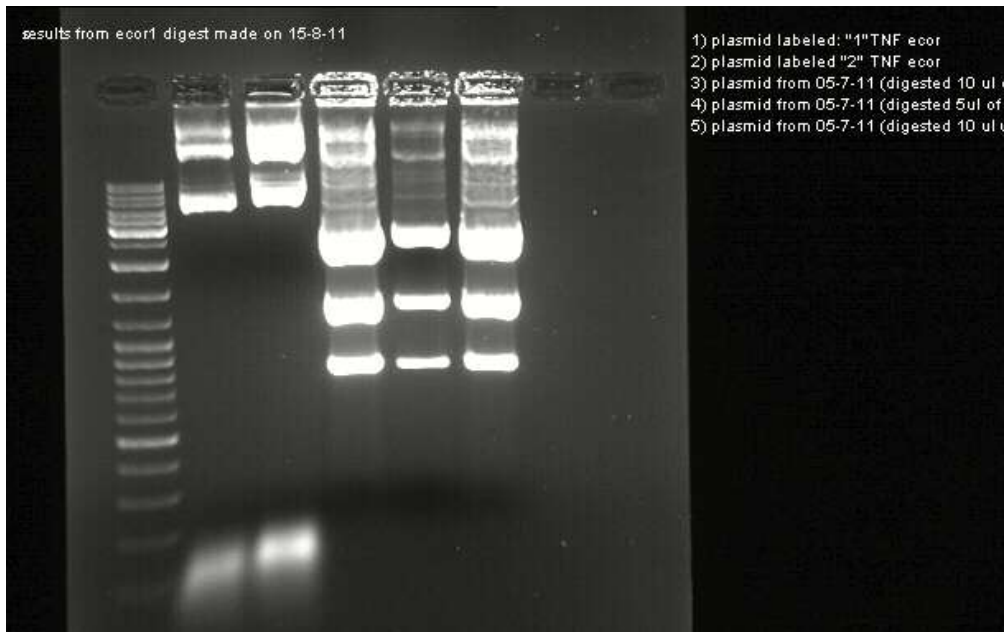
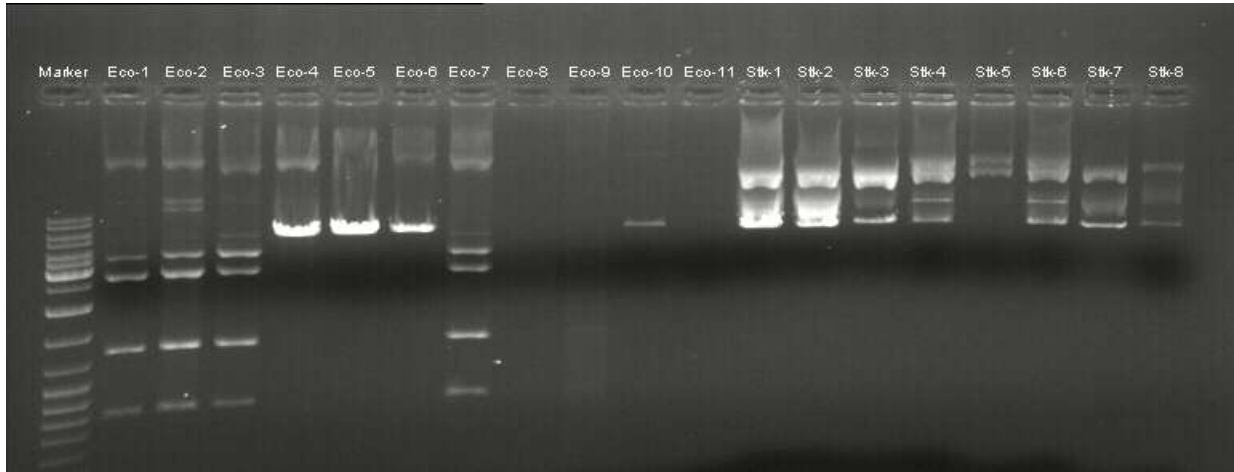
ÖZGEÇMİŞ

Derya Özeş, 24 Mart 1988, Ankara, Hacettepe Hastanesinde doğdu, ilk ve orta okul eğitimini, Amerika, Indianapolis şehrinde, Westlake Elementary School, ve Ben Davis Junior High School'da tamamladı; lise eğitimini, San Francisco ilçesinde, Capuchino High School'da, ayrıcalıklı, International Bacchalaureite Diploma programı ile mezun oldu. Üniversite eğitimini, California şehrinde, University of California Davis'den Biological Sciences/Neurobiology Physiology, Behavior Emphasis, derecesi ile mezuniyetini aldı.

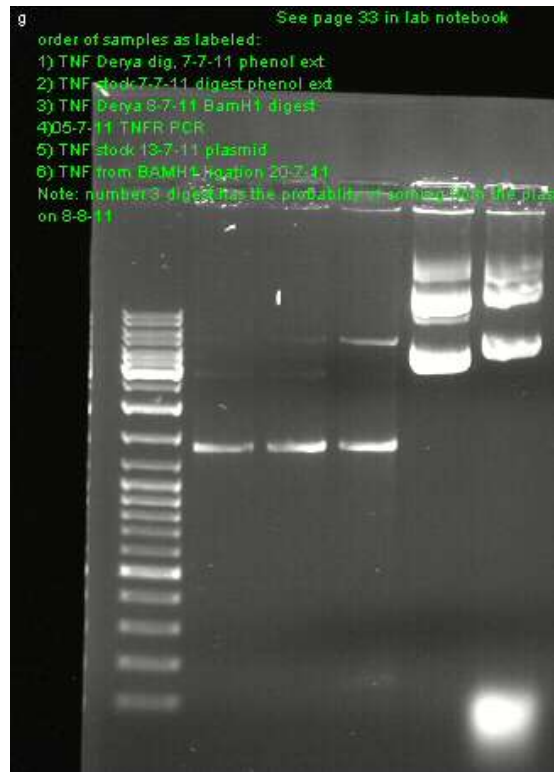
Lisans döneminde 2 yıl süresince Mikrobiyoloji ve Biokimya departmanında, Dr. Heyer'in laboratuvarında, DNA tamirinde rol alan genlerin mutagenезisine yönelik deneylerde asiste etti, aynı zamanda, UC Davis, M.I.N.D (Medical Investigation of Neurodevelopmental Disorders)'da, genetik uzmanı, Dr. Moghaddam'ın yanında genetik hastalıkların tanımlanması üzerine yapılan çalışmalarda stajyer olarak çalışmıştı. SCI de yayınlanmış 3 araştırma makalesi bulunur.

EKLER

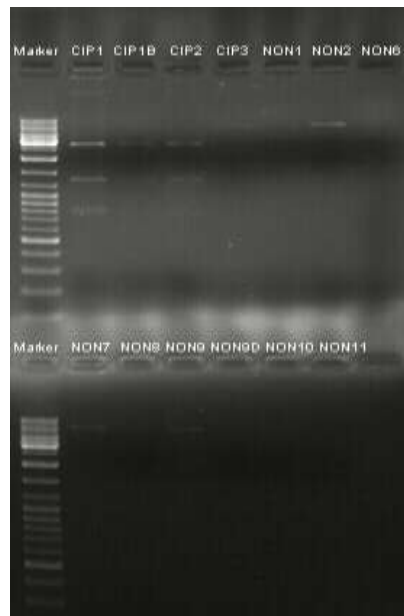
Plasmit izolasyonları ve ECOR1 ile kesimleri



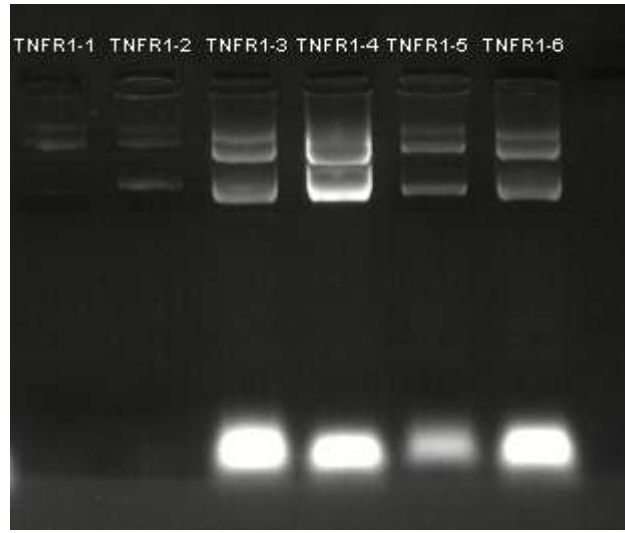
Plasmitlerin BAMH1 kesimleri ve fenol ekstraksiyon sonuçları



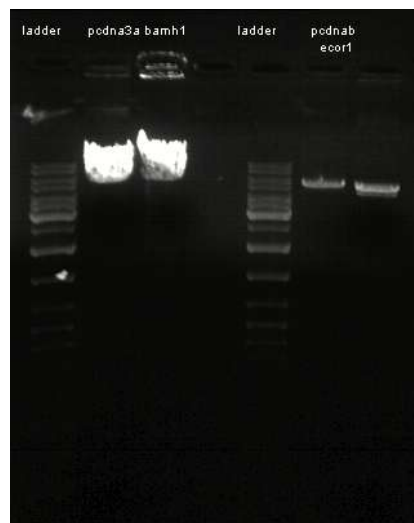
CIP'lenmiş ve CIP'lenmemiş vektörler



TNFR1 Amplifikasyon Jel Elektroforez görüntüsü



PcDNA 3A BAMH1 kesimi



Insertsız plasmid izolasyon sonuçları

