



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RESEPTÖRLE ETKİLEŞEN SERİN TREONİN
KİNAZ 4 (RIPK4)'Ü SÜREKLİ EKSPRESE
EDEN HaCaT HÜCRE HATTI
OLUŞTURULMASI**

Eda GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Tuba DİNÇER

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../...../....
Eda GÜNEŞ

İthaf

Yüksek lisans tezimi, hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, çalışma disiplinine hayran olduğum ve her zaman örnek aldığım babam Niyazi GÜNEŞ'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübe ve bilgisini esirgemeyen, her türlü sıkıntıda bana destek olan ve yol gösteren, TÜBİTAK projesinde çalışma ve burs imkânı sunan, beraber çalışmaktan son derece keyif aldığım sevgili danışman hocam Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e sonsuz teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca değerli deneyimlerinden ve bilgisinden faydalandığım, her ihtiyaç duyduğumda destek olup beni yüreklendiren, ufkumu genişleten sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları esnasında yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, zorlu süreçleri paylaştığım, birlikte aynı projede çalışmaktan keyif aldığım değerli arkadaşım Ümit UZUN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yol gösteren ve manevi destek veren kıymetli abim Arş. Gör. İdris ER'e, en zor zamanlarımda yanımda olan ve desteklerini sunan, beraber zaman geçirmekten keyif aldığım kıymetli bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Fikret YANAR, Fatimatüzzehra ŞİPŞAK, Gamze ZEHİR KIRKBİR, Cansu KAYA, Burak KASAP, Ferhat UZUN ve Soner KARABULUT'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, beni yüreklendiren ve varlığı ile huzur veren Ünal DEMİR'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her koşulda bana destek olan, şevkatini esirgemeyen ve sevgilerini her an yanımda hissettiğim her şeyden kıymetli canım annem Sadiye GÜNEŞ, babam Niyazi GÜNEŞ ve kardeşim Didem GÜNEŞ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmayı Doç. Dr. Tuba DİNÇER tarafından yürütülen 118Z124 No'lu proje ile destekleyen ve burs imkânı sunan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Eda GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Deri	2
2.2. Epidermis ve Epidermal Farklılaşma	2
2.3. RIPK Ailesi	3
2.3.1. Reseptörle Etkileşen Serin/Threonin Kinaz 4 (RIPK4)	5
2.3.1.1. RIPK4'ün Epidermal Farklılaşma ve Gelişimdeki Rolü	5
2.4. Keratinositlerin İncelenmesinde Kullanılan Keratinosit Hücre Hattı HaCaT	7
2.4.1. HaCaT Hücrelerinde Geçici ve Kalıcı Transfeksiyon	9
2.4.1.2. Rekombinaz Aracılı Kaset Değişimi Yöntemi (RMCE)	10
2.4.1.2.1. Flp-In™ Sistemi	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Kimyasallar	17
3.1.2. DNA ve Protein Markırlar	18
3.1.3. Antikorlar	18
3.1.3.1. Primer Antikorlar	18
3.1.3.2. Sekonder Antikorlar	18
3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler	19

3.1.5. Enzimler	19
3.1.6. Membranlar	19
3.1.7. Kitler	19
3.1.8. Sarf Malzemeler	20
3.1.9. Cihazlar	20
3.1.10. Bakteri Suşları	21
3.1.11. Kullanılan Vektörler	21
3.1.12. Kullanılan Hücre Hatları	22
3.1.13. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	22
3.2. Yöntem	30
3.2.1. pFRT/LacZeo, pFRTDEST/FLAG/HA, pcDNA5/FRT, pOG44 ve pCDNA5/FRT-3xFlag-RIPK4 Vektörlerinin Çoğaltılması	30
3.2.1.1. Kompedan Hücre Hazırlama	30
3.2.1.2. <i>E.Coli</i> Transformasyonu	30
3.2.1.3 Plazmit İzolasyonu	31
3.2.2. Zeosin TM ve Higromisin TM Dozlarının Belirlenmesi	32
3.2.2.1. Genomuna FRT Kaseti Alan Hücrelerin Seçilimi için Uygun Zeosin TM Dozunun Belirlenmesi	32
3.2.2.2. RIPK4'ü Sürekli Eksprese Eden Flp-In-HaCaT Hücrelerinin Seçilimi için Uygun Higromisin TM B Dozunun Belirlenmesi	32
3.2.3. FRT Kaset İçeren pFRT/LacZeo Vektörünün Linearize Edilmesi	33
3.2.3.1. Kesim Reaksiyonu Sonrası Örneklerin Saflaştırılması	33
3.2.4. Hücre Kültürü	33
3.2.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	33
3.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması	34
3.2.4.3. Hücrelerin Dondurulması	34
3.2.5. Memeli Hücrelerinin Geçici Transfekte Edilmesi	35
3.2.5.1. Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon	35
3.2.5.2. HaCaT Hücrelerinin Lipozom Bazlı Kimyasal Ajanlarla Transfeksiyonu	35
3.2.6. Flp-In-HaCaT Hücrelerinin Oluşturulması	36
3.2.6.1. HaCaT Hücrelerine pFRT/LacZeo Kalıcı Transfeksiyonu ve Zeosin TM ile Seçilimi	36

3.2.6.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Hücrelerinde FRT Kasetinin Varlığının PCR ile Doğrulanması	36
3.2.6.3. Genomuna FRT Kaseti Giren Klonların Transkripsiyonel Olarak Aktif bir Bölgeye Girip Girmemesinin β -galaktosidaz Ekspresyon Analizi ile Belirlenmesi	38
3.2.6.4. Oluşturulan HaCaT Flp-In Klonlarda Southern Blot ile Kopya Sayısının Belirlenmesi	38
3.2.6.5. Oluşturulan HaCaT Flp-In Klonlarda Real-Time PCR ile Kopya Sayısının Belirlenmesi	42
3.2.7. Hücrelerin İkiye Kesenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi	43
3.2.8. Hücrelerin Hücre Döngüsü Analizinin Belirlenmesi	43
3.2.9. Gateway Klonlama Sistemi Kullanılarak RIPK4'ün pFRT/DEST/FLAG/HA Vektörüne Klonlanması	44
3.2.9.1. Klonlamaların Dizilenerek Kontrolü	44
3.2.10. RIPK4'ün Restriksiyon Enzimleri ile Klonlamaya Dayalı pcDNA5/FRT Vektörüne Klonlanması	45
3.2.10.1. RIPK4'ün PCR ile Amplifikasyonu	45
3.2.10.2. Vektör ve Hedef DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi	46
3.2.10.3. Ligasyon Reaksiyonu	46
3.2.11. RIPK4'ü Sürekli Eksprese Eden Flp-In-HaCaT RIPK4 Hücre Hattının Oluşturulması	47
3.2.12. Sürekli Eksprese Ettirilen Proteinlerin İmmünblot ile Analizi	48
3.2.12.1. Protein İzolasyonu	48
3.2.12.2. SDS-PAGE Hazırlanması ve Örneklerin Yürütülmesi	48
3.2.12.3. SDS-Poliakrilamid Jelin Nitrosellüloz Membrana Transferi ve Protein Görüntülemesi	50
3.2.13. Proteinlerin Hücresel Lokalizasyonlarının İncelenmesi	51
3.2.13.1. İmmüno Floresan Deneylerinde Kullanılacak Lamellerin Hazırlanması	51
3.2.13.2. İmmüno Floresan Yöntemi	51
4. BULGULAR	53
4.1. HaCaT Hücrelerinin Genomuna FRT Kaseti Yerleştirilmesi	53
4.1.1. FRT Kaset İçeren pFRT/LacZeo Vektörünün Linearize Edilmesi	53

4.1.2. Zeosin Direnç Geni Taşıyan pFRT/LacZeo Vektörünün HaCaT Hücrelerine Entegrasyonun Seçilimi için Zeosin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	54
4.1.3. FRT Kaset İçeren Linearize pFRT/LacZeo Vektörünün Konak HaCaT Hücrelerine Transfeksiyonu	55
4.1.4. Genomuna FRT Kaset Yerleşen Klonlarda FRT Kasetinin PCR ile Doğrulanması	56
4.1.5. Genomuna FRT Kaseti Giren Klonların Transkripsiyonel Olarak Aktif Bölgeye Yerleşiminin Analizi	57
4.1.6. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarda FRT Kaseti Kopya Sayısının Belirlenmesi	58
4.1.6.1. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarında FRT Kaseti Kopya Sayısının Southern Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	58
4.1.6.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarda FRT Kaseti Kopya Sayısının RT-PCR ile Belirlenmesi	62
4.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının Karakterizasyonu	63
4.2.1. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının İkilenme Zamanlarının Analizi	64
4.2.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının Hücre Döngüsü Analizi	64
4.3. RIPK4'ün pFRT/DEST/Flag/HA Vektörüne Klonlanması	65
4.4. Flp-In-RIPK4 Hücrelerinin Oluşturulması	67
4.4.1. Higromisin Direnç Geni Taşıyan Vektörün Flp-In-HaCaT Hücrelerine Entegrasyonun Seçiliminde Kullanılacak Higromisin TM Konsantrasyonunun Belirlenmesi	67
4.4.2. Flp-In-HaCaT Hücrelerine pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4 Kalıcı Transfeksiyonu	67
4.4.3. Flp-In-HaCaT Hücrelerinde RIPK4'ün Sürekli Ekspresyonunun İmmüno blot ile Gösterilmesi	68
4.5. RIPK4'ün pcDNA5/FRT Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	71
4.5.1. pcDNA5/FRT-RIPK4 Klonlarının Geçici Transfeksiyon ile Ekspresyon Analizi	75
4.6. Flp-In-HaCaT Hücrelerine pcDNA5/FRT- RIPK4'ün Kalıcı Transfeksiyonu	75

4.6.1. HaCaT Hücrelerinde RIPK4'ün Sürekli Ekspresyonunun İmmüno­blot ile Gösterilmesi	76
4.6.2. Flp-In-HaCaT Klonlarında RIPK4'ün Sürekli Ekspresyonunun Baskılanan β -Galaktosidaz Ekspresyonu ile Doğrulanması	77
4.6.3. Flp-In-RIPK4 Hücrelerinde RIPK4 Ekspresyonunun İmunofloresan ile Analizi	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	80
6. KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	93



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Kullanılan primerlerin listesi	38
Tablo 2.	%7,5'lik ayırma jeli içeriği	49
Tablo 3.	%5'lik yükleme jeli içeriği	49
Tablo 4.	İmmünoblotlama koşulları	51
Tablo 5.	İmmüno Floresan koşulları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Epidermisin yapısı	3
Şekil 2. RIP Ser/Thr kinaz ailesi	4
Şekil 3. RIPK4 yabanıl ve nakavt fare fenotipi	6
Şekil 4. Çeşitli sendromlarla ilişkilendirilen RIPK4 üzerindeki mutasyonların şeması	7
Şekil 5. Kalıcı ve geçici transfeksiyon ile DNA'nın hücre çekirdeğine girişi	9
Şekil 6. Ser ve Tyr rekombinazların bölgeye özgü rekombinasyonu	10
Şekil 7. FRT sekansı	12
Şekil 8. FLP-In TM sistemi çalışma mekanizması	13
Şekil 9. pFRT/LacZeo vektör haritası	14
Şekil 10. pcDNA TM 5/FRT vektör haritası	15
Şekil 11. pOG44 vektör haritası	15
Şekil 12. FRT kasetinin konak hücre genomundaki yerleşimi	53
Şekil 13. DIG işaretli LacZ probunun pFRT/LacZeo vektörü üzerindeki yerleşimi	58
Şekil 14. Ekspresyon kasetinin HaCaT hücrelerindeki FRT kasetine girmesi sonrasında FRT kasetinde beklenen yerleşim	77

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. RIPK4 yabancı ve nakavt fare fenotipi	6
Resim 2. pFRT/ <i>LacZeo</i> 'nun vektörünün enzimle kesilmemiş ve <i>ScaI</i> enzimiyle kesildikten sonra saflaştırılmış hali	54
Resim 3. Zeosin TM muamelesi sonrasında farklı günlerde HaCaT hücrelerinin morfolojileri	55
Resim 4. Transfeksiyondan sonra 2 hafta boyunca Zeosin TM verilen hücrelerde oluşan Zeosin-dirençli koloni	56
Resim 5. FRT kaseti yerleştirilen klonlarda <i>LacZ</i> geninin PCR ile test edilmesi	56
Resim 6. FRT kaseti yerleştirilen klonlarda <i>LacZ</i> gen ekspresyonunun β -galaktosidaz substratı olan ONPG kullanılarak kantite edilmesi	57
Resim 7. <i>LacZ</i> probunun DIG ile işaretlenmesi	59
Resim 8. Genomik DNA'nın HindIII ile kesiminin kontrolü	59
Resim 9. Southern blot membran görüntülemesi	60
Resim 10. Farklı miktarlarda pFRT/ <i>LacZeo</i> kullanılarak <i>LacZ</i> prob bağlama ve görüntülenme koşullarının test edilmesi	61
Resim 11. Southern blot membran görüntülenmesi	62
Resim 12. Flp-In-HaCaT klonlarında FRT kaseti kopya sayısının kantitatif real- time PCR ile belirlenmesi	63
Resim 13. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri	64
Resim 14. HaCaT ve Flp-In-HaCaT klonlarının hücre döngüsü analizi	65
Resim 15. pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonlanan RIPK4 açık okuma çerçevesinin dizileme reaksiyonu ile doğrulanması	66
Resim 16. Higromisin TM muamelesi sonrasında farklı günlerde HaCaT hücrelerinin morfolojileri	67
Resim 17. 3.7 Flp-In-HaCaT hücrelerinde RIPK4'ün sürekli ekspresyonunun gösterilmesi	69
Resim 18. HaCaT hücrelerinde gerçekleştirilen geçici transfeksiyonların anti-mouse-FLAG antikoru kullanılarak immünoiblot ile analizi	70
Resim 19. Flp-In-HaCaT klonlarında Y ekspresyonu	71

Resim 20.	RIPK4 ve pcDNA5/FRT'nin kesim sonrası görüntülenmesi ve ligasyon için kantite edilmesi.	72
Resim 21.	RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının koloni PCR ve restriksiyon enzimleri ile doğrulanması	73
Resim 22.	RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının dizileme reaksiyonu ile doğrulanması	74
Resim 23.	pcDNA5/FRT- RIPK4 klonlarının CaCl ₂ ile HEK293T hücrelerine transfeksiyon sonrası immünblot ile ekspresyon analizi	75
Resim 24.	HaCaT hücrelerinde RIPK4'ün kalıcı ekspresyonunun gösterilmesi	76
Resim 25.	Flp-In-HaCaT hücrelerine RIPK4'ün kalıcı transfeksiyonu sonrası oluşan 5.7. Flp-In-RIPK4 klonlarda β -Gal ekspresyon seviyeleri	78
Resim 26.	Flp-In-HaCaT, Flp-In-RIPK4 ve geçici transfekte Flp-In-HaCaT RIPK4 klonlarının hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesi	79

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
AEC-Like	Ankilobefaron- ektodermal bozuklukları- dudak/damak yarıkları- benzeri
BPS	Bartsocas-Papas sendromu
DIG	Digoksigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilden diamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
FBS	Fetal bovin serum
FL	Full length-tam uzunlukta
FRT	Flp rekombinaz hedef dizi
g	Gram
GAL	Galaktozidaz
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
IB	İmmünblot
IF	İmmünfloresan
IRF6	İnterferon regülatör faktörü 6
kDa	Kilodalton
L	Litre
LB	Luria Bertani
M	Molar
MA	Moleküler ağırlık
MG-132	Z-Leu-Leu-Leu-al
NaPPi	Sodyum pirofosfat
NaVan	Sodyum orthovanadate
NFκβ	Nükleer faktör kappa β
ONPG	o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pen	Penisilin
PFA	Paraformaldehit
PLAGL2	Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri 2
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PPS	Popliteal Pterygium Sendromu
RIP	Reseptör ile etkileşen protein kinaz
RIPK4	Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz 4
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser/Thr	Serin/treonin kinaz
TBS	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi
TBST	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi-tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
TNTE	Tris sodyum triton EDTA
UV	Ultraviyole
TNFR1	Tümör nekroz faktör reseptör 1

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mikro
μm	Mikron

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum klorür
C₄H₁₀O₂S₂	DTT
C₄H₁₁NO₃	Tris Baz
C₄H₁₂ClNO₃	Tris HCl
C₆H₁₂O₆	Glukoz
C₆H₁₆N₂	TEMED
C₈H₁₈N₂O₄S	HEPES

C₁₂H₁₅NO₈	ONPG
C₁₂H₂₀N₃Br	Etidyum bromür
C₁₈H₂₀ClO₇PNa₂	CSPD
C₂₀H₃₇N₃O₁₃	Higromisin
C₂₆H₄₁N₃O₅	MG-132
C₅₅H₈₆N₂₀O₂₁S₂	Zeosin
HCl	Hidroklorik asit
HO(CH₂O)_nH	Paraformaldehit
H₂O	Su
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
(NH₄)₂S₂O₈	Amonyum persülfat
MgCl	Magnezyum klorür

ÖZET

Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz 4 (RIPK4)'ü Sürekli Eksprese Eden HaCaT Hücre Hattı Oluşturulması

Deride koruyucu bariyer rolünü üstlenen epidermis çok katmanlı bir yapıdır. En alt katmanda bulunan bazal tabakadaki kök hücreler dermisten gelen komutla asimetrik bölünerek bazal tabakadan uzaklaşmaya başlar ve farklılaşarak subrabazal katmanları oluşturur. Epidermal farklılaşma olarak adlandırılan bu süreç çok hassas bir şekilde düzenlenirken süreç esnasında oluşabilecek bazı aksaklıklar konjenital anomalilere neden olabilmektedir. Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz 4 (RIPK4), epidermal farklılaşmayı düzenleyen öncül proteinler arasındadır. Fonksiyonu ile ilişkili olarak patolojik RIPK4 varyasyonları konjenital ektoderm gelişim bozuklukları olan Bartsocas-Papas, Popliteal Pytergium, AEC-Like ve CHAND sendromları ile ilişkilendirilmiştir.

Keratinosit hücre hatlarının kullanıldığı laboratuvar koşullarında epidermal farklılaşma süreci iki ila üç hafta arasındadır. Laboratuvar analizleriyle epidermal farklılaşmanın araştırıldığı çalışmalarda normal insan keratinositlerine (NHK) alternatif olarak büyüme koşulları daha kolay olan ölümsüz HaCaT insan keratinosit hücre hattı kullanılmaktadır. HaCaT hücrelerine çalışılmak istenen geni transfekte etmek oldukça zordur. Ayrıca, transfekte edilen HaCaT hücrelerinde istenilen genin ekspresyonu ancak birkaç gün sağlanabilir. Yaklaşık 14 gün süren epidermal farklılaşmanın araştırıldığı çalışmalarda ise incelenecek genin hücrelerde sürekli ekspresyonunun sağlanması gerekmektedir. Bu tez çalışması ile amaçlanan uzun süreli analizlerde kullanılmak üzere araştırılacak genin sürekli ekspresyonuna olanak veren transgenik HaCaT hücrelerini oluşturmak ve bu hücrelerde RIPK4'ün sürekli ekspresyonunu sağlamaktır.

Bu amaç doğrultusunda ilk olarak Flp-In™ Sistemi kullanılarak istenilen genin HaCaT genomuna entegrasyonuna olanak veren FRT kaseti hücrelerin genomuna entegre edildi. FRT kasetinin genomda transkripsiyonel olarak aktif bölgeye tek kopya olarak yerleştiği ve hücrenin yaşamsal fonksiyonlarına etkilemediği doğrulandı. Sonrasında *RIPK4* geni HaCaT genomuna yerleşmiş FRT kasetine entegre edilerek *RIPK4*'ü sürekli eksprese eden HaCaT hücreleri oluşturuldu. Oluşturulan bu hücreler ile epidermal farklılaşma süreci gibi uzun süreli hücresel süreçlerin çalışılacağı deneylerin tasarlanması mümkün olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Epidermal farklılaşma, Flp-In sistemi, HaCaT, Kalıcı Transfeksiyon, RIPK4.

ABSTRACT

Generation of HaCaT Cell Line That Continually Express The Receptor Interacting Serine-Threonine Kinase (RIPK4)

The multilayered epidermis acts as a protective barrier of the skin. Upon dermis originated differentiation signal, basal layer localized stem cells start to divide asymmetrically and the daughter cells that move apart from stem cells enters differentiation process to form epidermal suprabasal layers. This process, known as epidermal differentiation, is regulated very precisely and failures can cause congenital anomalies. Receptor Interacting Serine Threonine Kinase 4 (RIPK4) is one of the leading proteins that regulate epidermal differentiation. Regarding its function, *RIPK4* variations have been associated with congenital ectodermal development defects such as Bartsocas-Papas, Popliteal pytergium, AEC-Like and CHAND syndromes.

In laboratory conditions in which keratinocyte cell lines are used, the epidermal differentiation process is between two and three weeks. In studies investigating epidermal differentiation by laboratory analysis, HaCaT cells, which can grow in simple conditions and easy to handle, are generally used instead of normal human keratinocytes (NHC). However, the transfection efficiency of the gene of interest to HaCaT cells is very low. In addition, in these transfected cells the expression of the gene of interest can last only couple days. However, in epidermal differentiation-based studies the expression of the gene of interest should last for at least 14 days. Therefore, the aim of this thesis is to establish transgenic HaCaT cells that allow stable integration of gene of interest into their genome and to over express *RIPK4* continuously by using these established HaCaT cells.

Within this scope firstly FRT cassette, which allows the integration of gene of interest into the HaCaT cells genome, was integrated to the genome of HaCaT cells genome by using Flp-InTM system. The integration of single copy FRT cassette to the transcriptionally active site of the genome without disturbing the vital cellular functions was confirmed. After that, *RIPK4* was integrated to the HaCaT cell genome through FRT cassette to provide continuous expression of *RIPK4*. With these transgenic cells, it will be possible to design long-term experiments such as epidermal differentiation.

Keyword: Epidermal differentiation, Flp-In system, HaCaT, Stable transfection, RIPK4.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Embriyonal olarak mezoderm ve ektodermden köken alan deri epidermis, dermis ve subkutanöz katmanlardan oluşur (1). Deriye esneklik kazandıran dermis, çoğunlukla fibroblastlardan salgılanan kollajen ve elastin fibrilleri içeren bir yapıya sahipken, epidermisin çoğunluğunu keratinositler oluşturur (2, 3). Sürekli olarak dış etkilere maruz kalan epidermisin, bariyer fonksiyonunu sürdürebilmesi için sürekli yenilenmesi gereklidir. Süreklilik, bazal tabakadaki kök hücreler ile sağlanır. Bu kök hücreler dermisten iletilen sinyal sonrasında asimetrik hücre bölünmesi geçirerek derinin farklı katmanlarını oluşturur (4, 5). Epidermal farklılaşma olarak adlandırılan ve bünyesinde hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi birçok hücreSEL işleyişi barındıran bu süreç çok sıkı bir denetim altındadır. Süreci düzenleyen proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılması süreçle ilişkili ektoderm kaynaklı hastalıkların ve yara iyileşmesinin anlaşılmasına da katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışması, epidermal farklılaşmada yer aldığı düşünülen proteinlerin işleyişinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik 118Z124 No'lu "PLAGL2'nin Epidermal Farklılaşmadaki Rolü" başlıklı TÜBİTAK 1001 projesinin ikinci iş paketinin bir parçasını oluşturmaktadır. Proje kapsamında yaklaşık 14 gün süren epidermal farklılaşma sürecinde düzenleyici rol üstlenen RIPK4 ve süreçteki rolü araştırılan transkripsiyon faktör PLAGL2 tarafından düzenlenen gen ekspresyonu analiz edilecektir. Bundan dolayı bu proteinlerin keratinositlerde sürekli ekspresyonuna ihtiyaç duyulmuştur.

Tez çalışması araştırılması istenilen genlerin sürekli ekspresyonuna olanak veren transgenik HaCaT keratinosit hücre hattı oluşturulup bu hücrelerde RIPK4'ün sürekli ekspresyonu sağlanabilir mi hipotezi üzerine kurulmuştur.

Kalıcı transfeksiyona olanak veren transgenik HaCaT hücrelerini ticari olarak temin etmek mümkün olmakla beraber bu oldukça maliyetlidir. Tez çalışmamız sayesinde bu hücreler laboratuvarımızda üretilmiş olup bu süreçte oluşturulan alt yapı farklı hücrelere uygulanabilir hale gelmiştir. Ayrıca, oluşturulan transgenik HaCaT hücreleri epidermal farklılaşmasının yanında yine uzun süreli analizlere ihtiyaç duyulan yara iyileşmesi ve üç boyutlu deri organoidlerinin oluşturulması gibi çalışmalarda da kullanılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

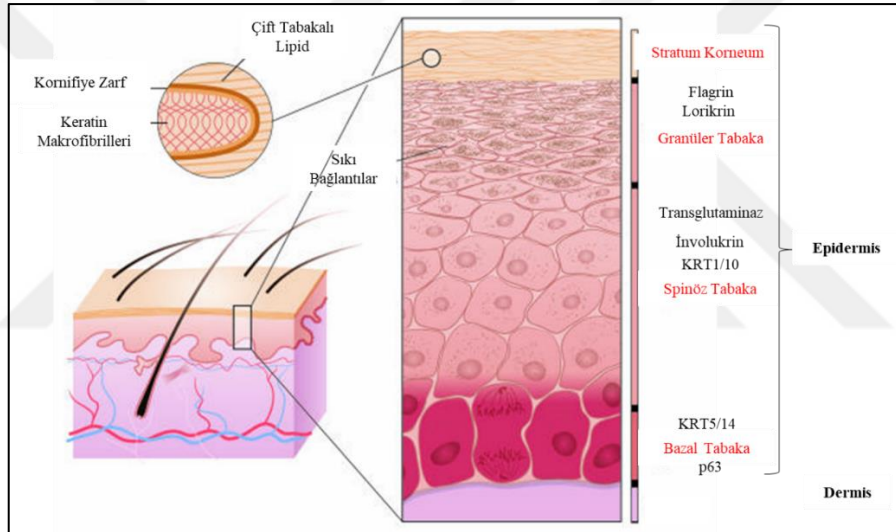
Deri, sıvı kaybını önleme, vücut ısını stabilize etme ve olası enfeksiyon ve yaralanmalara karşı vücudu koruma görevi olan karmaşık bir organdır (2, 6, 7). Deri; epidermis, dermis ve subkutanöz katmanlardan oluşur (1). Koruyucu bir bariyer görevi gören çok katmanlı epidermis, derinin en dış katmanı olup bazal tabakadaki kök hücreler tarafından devamlılığı sağlanır. Epidermisin altında, kolajenleri ve hücre dışı matriksin elastik liflerini içeren ve deriye elastikiyetini veren dermis bulunur (8). Dermisin altında ise koruyucu dolgu, yalıtım, enerji deposu ve ısı düzenleyici görevi gören deri altı yağ dokusundan oluşan hipodermis bulunur (9, 10). Epidermis ektodermal dokudan, dermis ve hipodermis ise mezodermal dokudan köken alır (11).

2.2. Epidermis ve Epidermal Farklılaşma

Derinin en dış tabakası olan epidermis; melanositler, Merkel, Langerhans ve keratinosit hücre tiplerinden oluşur. Melanositler, sentezledikleri melanin pigmenti ile cildi ultraviyole (UV) hasarından korurlar (7). Merkel hücreleri, derideki serbest sinir uçlarıyla etkileşen, dokunma duyusuna yardımcı olan oval modifiye hücrelerdir. Langerhans hücreleri ise antijen sunan dendritik hücreler olarak görev yapan cildin bağışıklık sisteminin bir parçasıdır (12). Bununla birlikte, cilt bariyerini oluşturan keratinositler, epidermal hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturan baskın hücre tipidir. Bazal tabakadan köken alan keratinositler ürettikleri keratin ve lipidlerle epidermal su bariyerini oluşturur (13).

Epidermis, farklı morfoloji ve biyokimyasal içerikteki keratinositlerin oluşturduğu, bazal, spinoz , granüler ve korneosit olmak üzere dört tip hücre tabakasından oluşur (Şekil 1) (14). Sürekli olarak dış etkilere maruz kalan epidermisin, bariyer fonksiyonunu sürdürebilmesi için sürekli yenilenmesi gereklidir. Süreklilik, bazal tabakadaki kök hücreler ile sağlanır. Bazal tabaka hücreleri p63, KRT5 ve KRT14 proteinlerini eksprese eder. Dermisten gelen uyarılarla asimetrik hücre bölünmesi sonucu bu bazal kök hücreler, yavru kök hücrelere ve geçici çoğalan hücrelere dönüştürülür. Yavru kök hücreler kök hücre havuzuna katılırken, geçici çoğalan hücreler birkaç bölünme sonunda, hücre döngüsünden çıkar ve bazal tabakadan spinoz tabakaya doğru göç ederek, farklılaşmaya başlar (4, 15). Bazal tabakadaki kök hücreler tek sıra silindirik hücrelerden oluşurken spinoz tabakaya yerleşen keratinositler ürettikleri farklı makromoleküllerle daha yassı bir görünüm alır (16). Spinöz tabakada KRT5/14 ekspresyonu sonlanırken diğer bir keratin çifti KRT1/KRT10,

yapısal bir protein olan involikrin ve transglutaminaz enzimi eksprese olur. Hücreler bir üstteki granüler tabakaya göç ederken aralarındaki sıkı bağlantılar artar (17). Granüler tabakada granüller arasında geç farklılaşma markırları olan lorikrin ve flagrin ekspresyonu gerçekleşir. Bu farklılaşma süreci stratum korneum oluşumuna kadar devam eder. Stratum korneum, çekirdeklerini tamamen kaybetmiş, korneosit olarak isimlendirilen metabolik olarak inaktif ölü keratinositlerden oluşur. Farklılaşma süreci plazma zarının keratin makrofibrillerinin çift tabakalı lipidlerle çevrildiği korneosit zarına dönüşmesiyle sonlanır. Katmanlara özgün farklılaşma markırları korneosit zarının oluşumu ve olgunlaşmasına katılır (18). Zaman içerisinde yıpranan korneositlerin yerini alttan farklılaşarak gelen yeni korneositler alır. Tüm bu farklılaşma süreci iki ila üç hafta sürer (19).

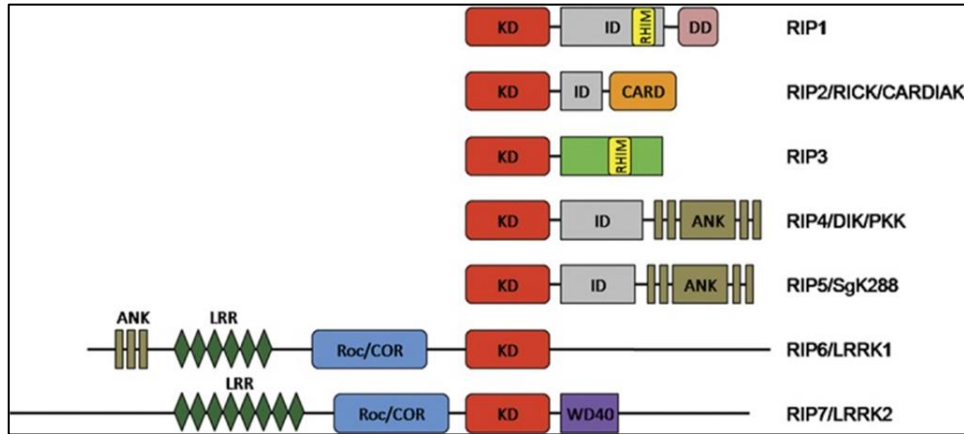


Şekil 1. Epidermin katmanları (Segre'den 14)

2.3. RIPK Ailesi

Reseptör-etkileşimli protein (RIP) kinazlar, yedi üyeli bir Ser/Thr protein kinaz ailesidir. Tüm üyelerinde yüksek homoloji gösteren nispeten korunmuş N-terminal kinaz domaini bulunmakla birlikte C-terminalde farklı fonksiyonel alanlar bulundurulur (Şekil 2). RIPK'lar genel olarak sitokin uyarımı, patojen enfeksiyonu, DNA hasarı ve tamiri, enflamasyon, hücre farklılaşması, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ve hücre ölümü gibi hücresel süreçlerde rol alırlar (20-22). RIPK1, NF- κ B (Nuclear Factor κ B) sinyal yolağını aktif edilmesinde yer alsa da en önemli rolü TNF (Tumor Necrosis Factor) aracılı inflamatuvar genlerin ekspresyonunun indüklenmesidir. Bunun yanı sıra, RIPK1, nekroptoz,

apoptoz ve piroptoz dahil olmak üzere farklı hücre ölüm yollarının düzenlenmesinde de önemli rol üstlenir (23, 24). RIPK2 ise, C-terminalinde bulunan CARD domaini üzerinden konak savunması ve enflamasyonda rol oynayan bağışıklık proteinleri NOD1-2 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein) aracılığıyla NF- κ B ve MAPK (Mitogen activated protein kinase) sinyal yollarını aktive eder (25, 26). RIPK3, RIPK1 ile sinyalleşerek nekroptozda ve MAPK sinyal yolağının aktive edilmesiyle tetiklenen enflamasyonda rol oynar (27, 28). Dördüncü üye, RIPK4 diğer üç üye gibi NF- κ B yolağını indüklemekle birlikte epidermal farklılaşma ve derinin bariyer fonksiyonunun korunmasında üstlendiği anahtar rolüyle diğerlerinden farklı bir aktiviteye sahiptir (29, 30). RIPK4, epidermal farklılaşma ve homeostazinin sağlanmasında NF- κ B sinyal yolağının yanında Wnt, PKC, JNK, Ras/Raf/Erk sinyal yollarıyla ilişkisi gösterilmiştir (31-35). RIPK4'ün yara iyileşmesinde görevli TGF- β sinyal yolağını baskıladığı ana bilim dalımızda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (36). RIPK5, kaspaz bağımlı ve bağımsız hücre ölümünü indükler (37). Diğer beş üyeye daha uzak olan son iki üye RIPK6 (LRRK) ve RIPK7 (LRRK2)'nin fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte RIPK7'nin Parkinson hastalığının etiyolojisinde merkezi bir protein olduğuna dair veriler bulunmaktadır (38, 39).



Şekil 2. RIP Ser/Thr kinaz ailesi. KD: Kinaz Domaini, ID: Intermediate Domain (Ara Domain), RHIM: RIP Homotypic Interaction Motif (RIP Homotipik Etkileşim Motifi), CARD: Caspase Recruitment Domain (Kaspaz Getiren Domain), LRR: Leucine Rich Repeats (Lösince Zengin Tekrarlar), Roc/COR: Ras of complex proteins/C terminal of Roc, WD: WD40 tekrarları. (Zhang'dan 22).

2.3.1. Reseptörle Etkileşen Serin/Threonin Kinaz 4 (RIPK4)

RIPK ailesinin bir üyesi olan RIPK4, ilk olarak protein kinaz C (PKC) δ 'nın yem olarak kullanıldığı maya ikili hibrit tabanlı taramalar sonucunda ortaya çıkmış ve bundan ötürü DIK (PKC-delta-etkileşimli protein kinaz) olarak isimlendirilmiştir (40). Yine maya ikili hibrite dayalı farklı bir çalışmada DIK'nin fare ortologunun başka bir PKC izoformu olan PKC β ile etkileşime girdiği gösterilmiş ve başka bir grup tarafından PKK (protein kinaz C ile ilişkili kinaz) olarak adlandırılmıştır (41). Protein homologlarından gidilen başka bir çalışmada bu proteinin reseptör ile etkileşen protein kinaz (RIP) ailesinin bir üyesi olduğu ortaya çıkarılmış ve RIPK4 olarak adlandırmıştır (29).

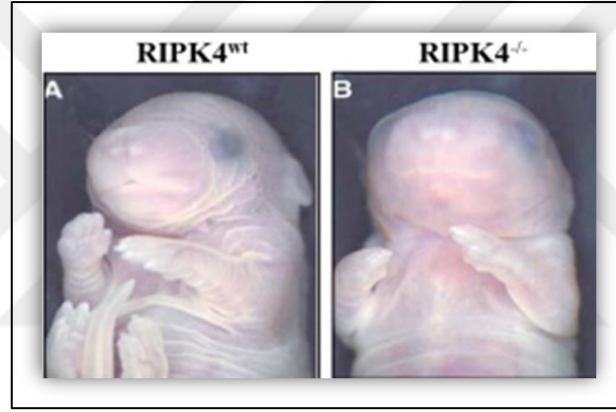
Sekiz ekzon ve yedi introndan oluşan *RIPK4* 21q22.3 kromozomunda yer alır. *RIPK4*, 784 aminoasitten oluşan ve 87 kDa büyüklüğünde olan RIPK4 proteinini kodlar. RIPK4 amino ucunda bir kinaz domaini, karboksil ucunda 11 ankirin tekrarı ve iki bölge arasında Ser/Thr açısından zengin ara bölge bulunduran bir Ser/Thr kinazdır (Şekil 2) (29, 40).

RIPK4 çeşitli embriyonik ve olgun dokularda (deri, kalp, beyin, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek, testis gibi) yaygın olarak eksprese edilirken, dalakta düşük seviyeli ekspresyonu görülür (41). *RIPK4*'ün çeşitli kanser dokularında da anormal ekspresyonu görülmüştür (42-45). Deride ise *RIPK4* ekspresyonu en fazla epidermisin bazal ve suprabazal katmanlarında görülür (30). Epidermisin dış tabakasına doğru *RIK4*'ün ekspresyon seviyesi azalmaktadır (46). Hücre içerisinde RIPK4'ün çeşitli sitozolik ve zarla ilişkili kompartmanlarda yerleştiği gösterilmiştir (41).

2.3.1.1. RIPK4'ün Epidermal Farklılaşma ve Gelişimdeki Rolü

Epidermal farklılaşmanın herhangi bir aşamasında ortaya çıkan sorunlar ciddi konjenital malformasyonlara neden olmaktadır (47). RIPK4'ün yalnızca deride değil, ektodermal dokudan köken alan kol, bacak, göz kapağı, yüz ve kafa gibi organların oluşumunda da görev aldığı gösterilmiştir. RIPK4^{-/-} farelerde ciddi deri kusurlarının olduğu, deri kıvrımlarının azaldığı, arka bacakların ve kuyruğun vücut boşluklarına yapıştığı, burun, ağız, yutak ve anüs gibi vücut deliklerinin oluşmadığı, bundan dolayı farelerin nefes alamayıp doğumdan kısa bir süre sonra öldükleri belirtilmiştir (Resim 1) (30). RIPK4'ün özellikle deri gelişimindeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada RIPK4^{-/-} farelerin derisinde epidermal farklılaşmanın gerçekleşmediği, bu farelerin epidermisinde çekirdeğini/organelerini kaybetmiş skuamöz hücreler yerine en dışta bir perakeratotik hücre

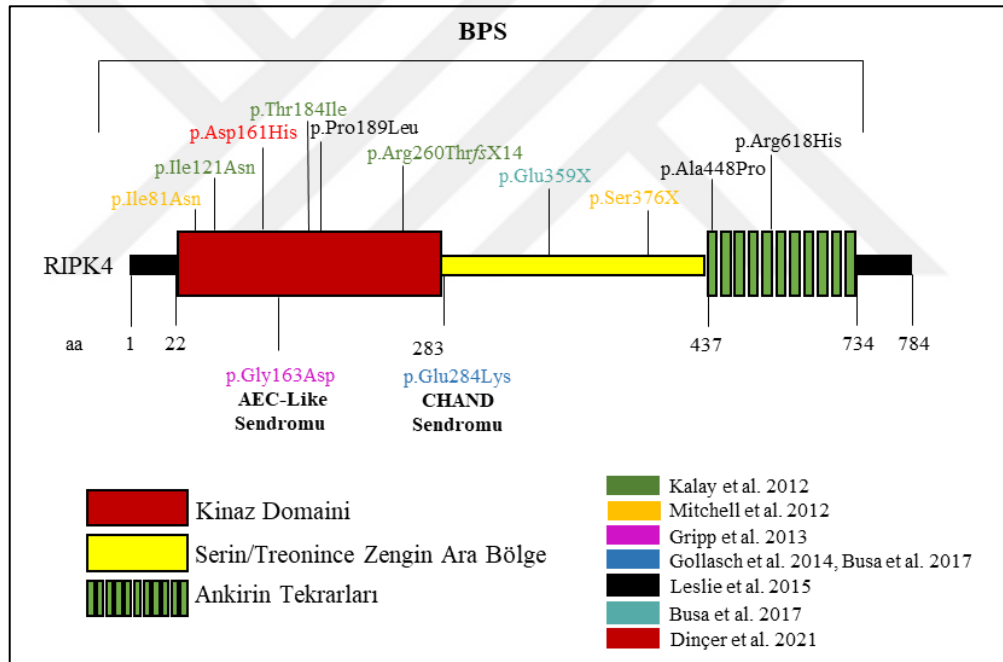
tabakası olduğu ve hem spinüler hem de granüler katmanların belirgin hiperplazi ile kalınlaştığı görülmüştür (48). Ayrıca $RIPK4^{-/-}$ farelerde embriyonik gelişim esnasında epiderminin üzerinde bulunan katlı tabaka oluşuncaya dek epidermisi koruyan geçici tek tabakalı peridermin kaybolmadığı, suprabazal katman hücrelerinde E-kaderin proteininin hücre-hücre yan bağlantılardan ayrılıp peridermal hücre yüzeyine yerleştiği gösterilmiştir. E-kaderinin bu anormal yerleşiminin, hücreleri yapışkan hale getirerek fare ve insanda $RIPK4$ eksikliğinde görülen, ağız içi, özofagus gibi vücut boşluklarının yapışması ve dizardı ağlarının oluşması gibi fenotiplerden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (49-51). Epidermal farklılaşmanın önemli düzenleyicisi olan $RIPK4$, bu rolüyle ilişkili olarak kutanöz inflamasyonun ve kutanöz yara onarımında da önemli bir rol üstlenmektedir (48, 52, 53).



Resim 1. $RIPK4$ yabanıl ve nakavt fare fenotipi (Holland'dan 30)

Moleküler genetik çalışmaları ile farklı $RIPK4$ mutasyonları ektodermal gelişim anomalilerinden kaynaklanan sendromlarla ilişkilendirilmiştir. $RIPK4$ 'ün kinaz domainindeki mutasyonların ektodermal gelişim bozukluğu olan Bartsocas-Papas sendromu (BPS; OMIM: 263650) ile ilişkilendirilmesi ilk olarak bölümümüzde yapılan genetik haritalama çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır (54). Yine bölümümüzde yapılan çalışmalar ile $RIPK4$ 'ün kinaz domainindeki yeni bir mutasyon BPS ile ilişkilendirilmiştir (53). Bugüne değin, $RIPK4$ 'ün kinaz domaininde altı, linker ve ankirin domainlerinde ikişer adet olmak üzere toplam on varyasyon BPS ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4). BPS, diz arkası pterigiumlarda diz hareketlerini kısıtlayan kanatsız deri çıkıntıları (popliteal pterigium), dudak-damak yarığı, genital anomaliler ve kol-bacak şekil bozuklukları fenotipleriyle ilişkilendirilen otozomal dominant bir hastalık olan Popliteal Pityerjium Sendromunun

(PPS; OMIM: 119500) otozomal resesif letal formudur (55). PPS'e göre daha ağır seyreden BPS vakalarının çoğunda prenatal ya da neonatal dönemde ölümler rapor edilmiştir. BPS'te popliteal pityerjiumlara ilave olarak ağızda telsi bantlar, yapışık göz kapağı, yarık dudak-damak, oral boşukta darlık, kol-bacak anomalileri, kirpik ve tırnak eksikliği, parmaklar arasında sindaktili görülmektedir (54-57). RIPK4'de tanımlanan mutasyonların çoğu BPS ile ilişkilendirilmesine rağmen biri RIPK4'ün kinaz domaininin içerisinde diğeri de kinaz domain bitiminde yer alan iki patolojik varyasyon (Şekil 4) sırasıyla CHAND Sendromu (OMIM: 214350) ve Ankiloblefaron-ectodermal defects-cleft lip/palate (AEC; OMIM: 106260) ile ilişkilendirilmiştir. Her iki hastalıkta BPS'ye kıyasla oldukça hafif seyreden ektodermal displazi ve dudak damak yarıkları gibi fenotiplere neden olur (58, 59).



Şekil 4. Çeşitli sendromlarla ilişkilendirilen RIPK4 üzerindeki mutasyonların şeması

2.4. Keratinositlerin İncelenmesinde Kullanılan Keratinosit Hücre Hattı HaCaT

Hücre hatları, biyolojik süreçlerin hücre bazındaki etkilerini araştırmak için başvurulan önemli araçlardır. Epidermin temel hücresi olan keratinositler, oluşturdukları katmanlarla üstlendikleri bariyer görevinin yanısıra patojenlere karşı enflamatuvar ve immünolojik yanıtta ve bu süreçle ilişkili yara onarımında rol almaktadırlar (60).

Keratinositlere yönelik hücresel süreçlerin incelenmesinde laboratuvar koşullarında çalışmaya uygun keratinosit hücre hatlarının oluşturulması önemlidir.

İnsan keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücre hattı, primer yetişkin insan deri keratinositlerinin sürekli pasajlanarak kendiliğinden ölümsüzleştirilmesiyle oluşturulmuştur (61). Yapılan genom analizleri, HaCaT hücrelerinin ölümsüz olması genomun gardiyanı olarak bilinen tümör supressör p53 proteinini kodlayan *p53* geninin her iki alelinde bulunan patolojik varyasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (62). Ölümsüz olan HaCaT hücreler tümörejenik değildir (61, 63). Büyüme ortamında büyüme ve farklılaşma faktörlerinin varlığına ihtiyaç duyan ölümlü normal insan keratinositlerinin (Normal human keratinocyte, NHK) aksine, HaCaT hücreleri standart DMEM besiyerinde büyütülebilir. Sınırsız çoğalma potansiyeli vardır ve pasaj sayısından bağımsız olarak stabil fenotip gösterir. Bu avantajlar HaCaT hücrelerinin hücre biyolojisi çalışmalarında NHK analogu olarak kullanılmasını sağlar (64-66). HaCaT hücrelerinin ortamdan kalsiyum çekilerek bazal laminada yerleşik keratinosit öncülleri olan bazal kök hücrelere dönüştürülmesi ve kalsiyum eklenmesi ile farklılaştırılmaları mümkündür (67). Ayrıca, NHK'lar gibi uygun mikro çevre, hücre dışı matriks ve iskelet sağlandığında HaCaT hücrelerinin deri organoidlerini oluşturulabilme kapasiteleri de bulunur (68). Tüm bu özellikleri HaCaT hücrelerinin keratinosit farklılaşması ve çok katmanlı epidermin oluşumunda yer alan hücresel olayların anlaşılmasına yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır.

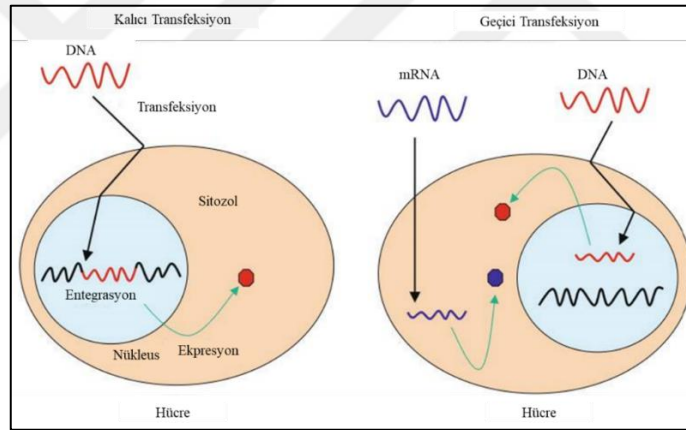
KTÜ Tıp fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Tuba DİNÇER yürütücülüğünde gerçekleşen, bursiyer olarak görev aldığım 118Z124 no'lu "PLAGL2'nin Epidermal Farklılaşmadaki Rolü" adlı TÜBİTAK 1001 projesinin 2. iş paketini oluşturan bu tez çalışması, epidermal farklılaşma mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılmak üzere ilk olarak HaCaT hücre genomunun kalıcı gen ekspresyonuna olanak tanıyacak şekilde rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak değiştirilmesi, ikinci olarak da oluşturulan HaCaT hücrelerinde epidermal farklılaşmanın kilit proteinlerinden biri olan RIPK4'ün kalıcı olarak sürekli ekspresyonunu amaçlamaktadır.

2.4.1. HaCaT Hücrelerinde Geçici ve Kalıcı Transfeksiyon

Yabancı genetik materyalin ökaryotik bir hücreye yerleştirme işlemi olan transfeksiyon, gen ekspresyonunun hücre fizyolojisi üzerindeki etkilerini incelemek için başvuru olan önemli bir araçtır. Transfeksiyon fiziksel yöntemler, biyokimyasal ajanlar ve

virüsler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Hangi transfeksiyon yönteminin kullanılacağı hücre tipine ve deneyin amacına göre değişkenlik gösterebilir.

Yabancı genetik materyalin genoma entegre olmadığı geçici transfeksiyonda genetik materyal her hücre bölünmesinde gitgide seyrelererek kaybolur. Geçici transfeksiyonda dışardan verilen genin ekspresyon süresi hücrenin ikiye katlanma zamanı ile ilişkilidir (69). Çalışmalarımızda ikiye katlanma zamanı yaklaşık olarak 24 saat olan HaCaT hücrelerinde geçici gen ekspresyonunun en verimli olduğu zaman 20-24 saat aralığı olarak belirlenmiştir. İlerleyen zamanlarda ekspresyon düşmeye başlamaktadır (Yayınlanmamış veri). Bundan dolayı, bir defalık gen ekspresyonu ve kısa süreli deneyler için başvurulabilecek geçici transfeksiyon uzun süreli hücresel fonksiyonların (keratinosit farklılaşması, yara iyileşmesi gibi) incelenmesi için uygun değildir. Geçici transfeksiyonunun tersine, kalıcı transfeksiyonda eksprese edilmek istenen yabancı DNA'nın konak hücrenin nüklear genomuna entegre edilmesi ile sürekli olarak ekspresyonu sağlanır (Şekil 5) (70).



Şekil 5. Kalıcı ve geçici transfeksiyon ile DNA'nın hücre çekirdeğine girişi (Kyung Kim'den 71).

İstenilen geni sürekli olarak ifade eden kalıcı hücre hatları oluşturmak için rekombinaz aracılı kaset değişimi yönteminin yanında, faj, lentivirüs, ve transpozonların genoma entegrasyon için kullanılması diğer yaklaşımlar arasında yer almaktadır (72).

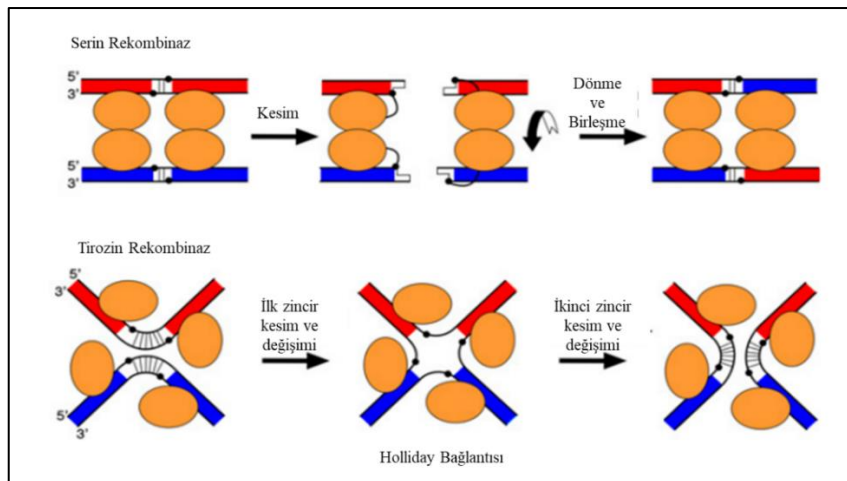
2.4.1.2. Rekombinaz Aracılı Kaset Değişimi Yöntemi (RMCE)

Bölgeye özgü rekombinasyon ilk olarak bakterilerde tanımlanmış olup sonrasında arke ve mikrobiyal ökaryotlarda -özellikle mayalar- da tanımlanmıştır (73). Bölgeye özgü rekombinasyonda, tek veya ayrı DNA molekülü içerisinde ayrı konumlarda bulunan iki kısa

DNA dizisi (bölgesi) bir araya getirilir; daha sonra DNA zincirleri bölgeler içindeki spesifik fosfodiester bağlarından kırılır ve kırılan uçlar, rekombinantlar oluşturmak için yeniden birleştirilir. Bu işlemin dizi tanıma ve kimyasal kataliz adımları, sistemin özel bir enzimi olan bölgeye özgü rekombinaz (Site-specific recombinase, SSR) tarafından gerçekleştirilir. Protein ve DNA arasında oluşan fosfodiester bağ enerjisi sayesinde ATP, polimeraz ve ligaz gibi kofaktörlere ihtiyaç duymadan rekombinant zincirler yeniden birleştirilmiş olur (74, 75).

Bölgeye özgü rekombinazlar, nükleofilik aktif bölgedeki aminoasit rezidülerine göre tirozin rekombinazlar ve serin rekombinazlar adlı iki aileye ayrılır. Serin rekombinazlar aktif bir serin rezidüsünün hidroksi grubu ile fosfodiester bağını kırarak DNA'da çift zincir kırıkları oluşturur ve ardından rekombinaz DNA 5' ucuna kovalent olarak bağlanır. Rekombinasyon, kesilen DNA uçlarının pozisyonlarını değiştiren transesterifikasyon (fosfodiester bağının bir başka yer ile değiştirilmesi) denilen bir alt birim döndürme mekanizması tarafından gerçekleştirilir (Şekil 6) (76, 77).

Bölgeye özgü rekombinasyon işlemini iki adımda gerçekleştiren tirozin rekombinazlar, DNA zincir çiftlerini birer birer kırar, değiştirir ve yeniden birleştirir. DNA zincir çiftlerinin ilk kırılıp değiştirilmesinde iki ipliğin rekombinant ve diğer ikisinin rekombinant olmadığı bir 'Holliday bağlantısı' oluşur. İkinci DNA zinciri çiftinin kesilip ve değiştirilmesiyle de rekombinasyon sağlanır (Şekil 6) (77, 78).



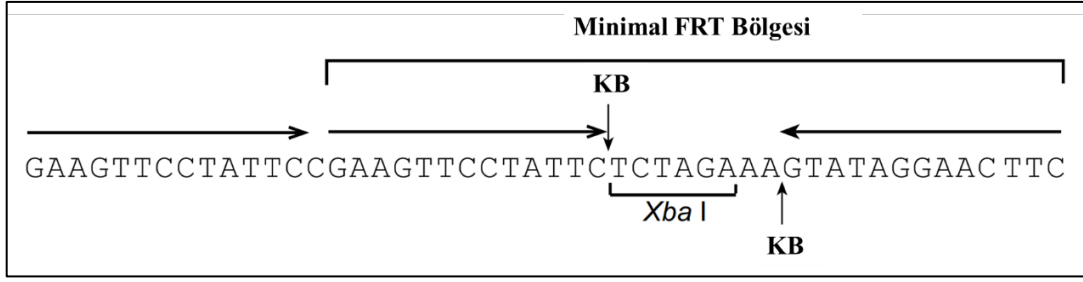
Şekil 6. Serin ve Tirozin rekombinazların bölgeye özgü rekombinasyonu (Olorunniji'den 77)

En yaygın kullanılan Tirozin rekombinazlar arasında Cre enzimi ve Flp rekombinaz bulunmaktadır. Cre, *Escherichia coli* bakteriyofaj P1'den elde edilen ve 34-bp loxP bölgeleri üzerinde etkili olan 38 kDa'lık bir tirozin rekombinazdır (79). FLP ise, 34-bp FRT bölgelerinde etkili olan *Saccharomyces cerevisiae* 2µ plazmidi tarafından kodlanan 45 kDa'lık bir tirozin rekombinazdır (79, 80). Rekombinaz aracılı kaset değişimi (RMCE) Flp rekombinaz yaklaşımında, genomunda rekombinaz hedef bölgelerine (Flippase recognition target (FRT)) sahip olan bir hücre hattı havuzu oluşturulur. FRT kaseti genoma bir seleksiyon belirteci olan antibiyotik direnç geni ile birlikte entegre edilir (81). Böylelikle, genomunda FRT kaseti barındıran hücreler antibiyotik seçilimi ile belirlenebilir. Oluşturulan bu hücrelerde FRT kasetinin tek kopyasının transkripsiyonel olarak aktif genomik lokusa yerleşmesi ve yerleşme esnasında mutagenезinin olmaması gözetilir (82). FRT kasetini genomunda barındıran bu hücreler daha sonra biri hedef geni taşıyan diğeri de rekombinaz enzimini ifade eden iki vektörle transfekte edilir. İlgili rekombinazın geçici ifadesi, hedef genin önceden belirlenmiş FRT kasetine integrasyonunu sağlar (83). Çalışmamızda keratinositlerde sürekli gen ekspresyonunun sağlanması için FRT kaseti ve Flp rekombinaza dayalı Flp-In™ sistemi kullanılacaktır.

2.4.1.2.1. Flp-In Sistemi

S. cerevisiae maya türü, "iki mikronluk plazmit" adı verilen DNA'lar içerir. Bu DNA'ların amplifikasyonu "flippase" veya "Flp" adı verilen bir tirozin rekombinaz tarafından sağlanır. Flp amplifikasyonu, DNA replikasyonu sırasında 2 µm plazmit üzerindeki iki özdeş ancak zıt yönlü FRT arasında rekombinasyona neden olarak yapar. Rekombinasyon konservatiftir ve DNA sentezi gerektirmez. Rekombinasyon ile plazmit çift yönlü replikasyondan dönen çember replikasyona geçerek kopya sayısını artırır. FRT bölgeleri rekombinasyonun ardından korunur, mutasyon ihtimali düşüktür (84, 85).

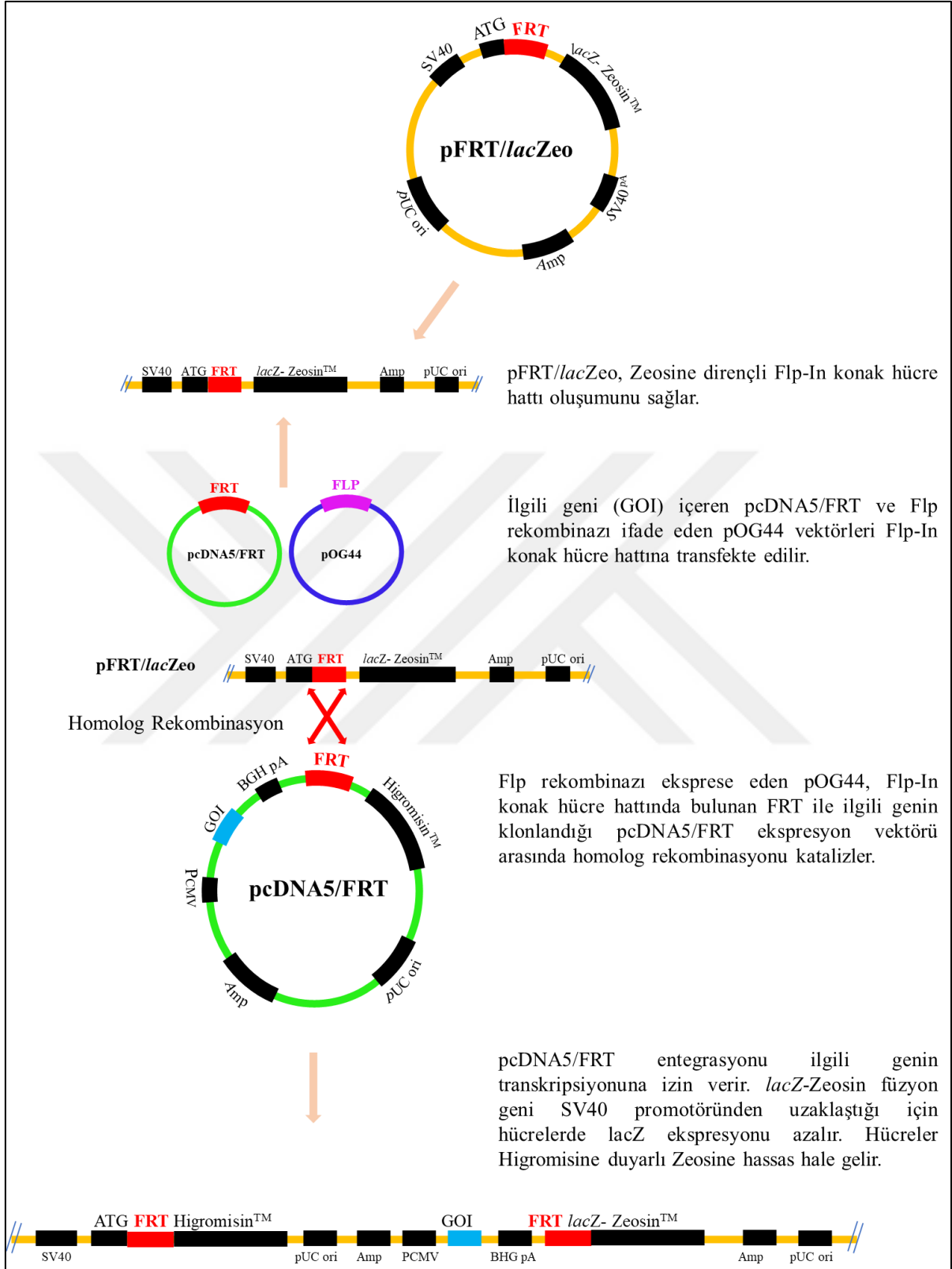
2 µm plazmidine ait Flp sistemi kullanılarak ilgilenilen gen genoma yerleşik FRT bölgesine entegre olarak sürekli eksprese olur (86). Bu sistem memeli hücre hatlarında sürekli ekspresyon için Invitrogen tarafından geliştirilip ticarileştirilmiştir (Flp-In™ Invitrogen katalog K6010-01, K6010-02). Bir minimal FRT kaseti iki tane 13 bp'lik reverse tekrarlardan ve 8 bp'lik XbaI restriksiyon bölgesi olmak üzere 34 bp'lik bir diziden oluşur (Şekil 7) (87).



Şekil 7. FRT sekansı (Flp-In™ Invitrogen'den 88) (KB:Kesim Bölgesi)

Flp-In™ sistemi üç temel adımdan oluşmaktadır; (Şekil 8).

1. Flp-In konak hücre hattı oluşturmak için çalışılmak istenilen memeli hücresinin genomuna Flp rekombinazın hedefi olan FRT kaseti yerleştirilmesi,
2. Çalışılmak istenilen genin açık okuma dizisinin FRT kaseti içeren bir vektöre klonlanması,
3. Hücrede geçici olarak eksprese ettirilen Flp rekombinaz sayesinde istenilen genin genomdaki FRT kasetine kalıcı entegre olmasıdır.

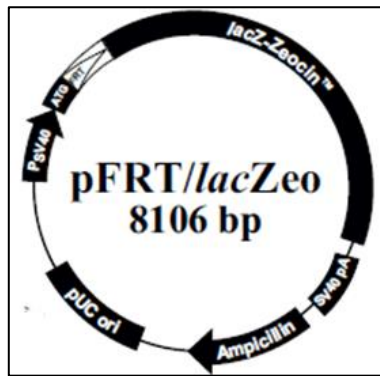


Şekil 8. Flp-In™ çalışma sistemi mekanizması.

Bu süreçte üç temel vektör kullanılmaktadır.

1. pFRT/LacZeo vektörü (Şekil 9), konak hücrenin genomuna FRT kaseti yerleştirilmesinde kullanılır. Vektörün genoma entegrasyonu ATG başlatma kodonunun hemen altında bulunan FRT bölgesi ile sağlanır. SV40 promotörü altında Zeosin direnç-β-galaktosidaz (*LacZ*) füzyon geni bulunur. Kalıcı transfeksiyon yapılan hücreleri diğer hücrelerden ayırmak için değişik ilaç direnç genleri kullanılabilir. İlaç direnç genleri genellikle transfeksiyon için kullanılan plazmit vektörlerine klonlanmıştır. FRT kaseti entegre olan klonların seçilimini sağlayan Zeosin, bakır şelatlı bir glikopeptid olan Fleomisin D1'in bir formülasyonudur. Zeosin'e mavi rengini veren bakır formu aktif değildir. Zeosin hücreye girdiğinde bakır Cu^{+2} 'den Cu^{+1} 'e indirgenir ve hücredeki sülfhidril bileşenleri tarafından uzaklaştırılır. Aktive olan Zeosin DNA'ya bağlanır ve DNA'nın çift sarmallı kırıklarını indükleyerek hücre ölümüne neden olur (89, 90). Zeosin'e direnç *Sh-ble* geni (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin geni) ile sağlanır. Bu genin 13.7 kDa'lık protein ürünü Zeosin'e bağlanarak DNA kırığı oluşturmamasını engeller (91). *Sh-ble* geninin ökaryotik ve prokaryotik konaklarda ekspresyonu, Zeosin'e direnç sağlar.

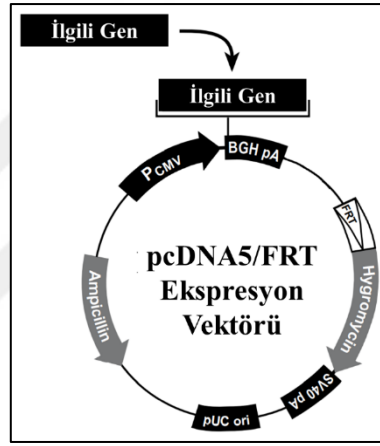
pFRT/*lacZeo* vektörünün genom içine entegrasyonu rastgeledir. Yabancı DNA'nın kromozomal genoma entegrasyonunda, hücre kendi endojen DNA modifikasyon ve tamir mekanizmasını kullanır. Doğrusallaştırılmış ekspresyon vektörü, rastgele bir kromozom kırılması konumunda konakçı hücre genomuna homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end joining, NHEJ) mekanizması ile entegre edilir (92).



Şekil 9. pFRT/LacZeo vektör haritası (Flp-In™ Invitrogen'den 88)

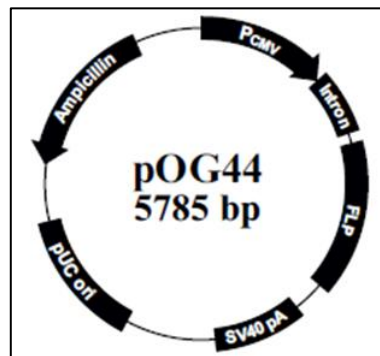
2. pcDNATM5/FRT vektörü (Şekil 10), hücrede sürekli eksprese ettirilmek istenen hedef DNA'nın klonlanmasında kullanılır ve Higromisin direnç geni içerir. Higromisin B,

Streptomyces hygroscopicus tarafından üretilen bir aminosiklitol antibiyotiktir (93). Higromisin B, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda protein sentezini inhibe ederek hücrelerin ölümüne sebep olur (94, 95). pcDNATM5/FRT vektörüne klonlanan ilgili genin ifadesi CMV (Cytomegalovirus) promotörü tarafından kontrol edilir. Vektörde Higromisin'e direnç geninin 5' kodlama kısmında FRT kaseti bulunur. Higromisin direnç geninin önünde promotör ve ATG başlangıç kodonu bulunmaz. FRT aracılığıyla bu vektör genoma entegre olduğunda Higromisin direnç geni FRT kasetinde bulunan SV40 promotörünün ve başlangıç kodonunun yanına gelecektir. Böylelikle FRT kasetine pcDNATM5/FRT vektörün entegre olduğu hücreler Higromisin direnç genini eksprese etmeye başlar. Bu hücreler Higromisin verilen ortamda hayatta kalır ve çoğalarak klon oluşturur.



Şekil 10. pcDNATM5/FRT vektör haritası (Flp-InTM Invitrogen'den 88)

3. pOG44 vektörü (Şekil 11), Flp rekombinazı sürekli olarak eksprese eden vektördür (96).



Şekil 11. pOG44 vektör haritası (Flp-InTM Invitrogen'den 88)

Bölümümüzde çok uzun süredir keratinositlerde hücresel fonksiyonların anlaşılmasına yönelik çalışmalar HaCaT keratinosit hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalarda ilgilenilen genlerin sürekli olarak eksprese ettirilememesi deney kurgularımızda kısıtlamalar getirmektedir. Ayrıca, HaCaT hücrelerinde transfeksiyon ajanlarına dayalı geçici transfeksiyon verimi oldukça düşüktür. Bu projede amaçlanan, HaCaT keratinosit hücrelerinde istenilen genin sürekli ekspresyonunu sağlayacak sistemi oluşturmaktır. Bu hedefe yönelik Flp-InTM sistemine (Invitrogen) başvurulmuştur. Bu doğrultuda ilk olarak HaCaT hücrelerinin genomuna FRT kaseti yerleştirilecektir. Flp-In-HaCaT hücrelerini oluşturduktan sonra bu hücrelerin genomlarına FRT kaseti aracılığıyla farklı genler yerleştirilerek bu genlerin sürekli ekspresyonlarının hücresel fonksiyonlar üzerine etkisine dayalı çalışmalar gerçekleştirilebilecektir. Bu tez TÜBİTAK 118Z124 No'lu proje kapsamında yürütüldüğünden proje hedefi doğrultusunda keratinosit farklılaşmasında önemli bir rol üstlenen *RIPK4* geni Flp-In-HaCaT hücrelerinin genomuna kalıcı olarak yerleştirilecektir. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında ilk olarak Flp-In-HaCaT rekombinant hücre hattı oluşturulmuştur. Sonrasında *RIPK4* geni pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmış ve Flp rekombinazı eksprese eden pOG44 vektörüyle birlikte, oluşturulan Flp-In-HaCaT genomuna kalıcı olarak yerleştirilmiştir. Böylelikle, *RIPK4*'ü sürekli olarak eksprese eden HaCaT hücreleri elde edilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Agaroz	Lonza, 50004
Akrilamid (29:1) %40	Bio-Rad, 161-0146
Amonyumpersülfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Ampisillin	Sigma, A9518-5G
Beta merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma, 112553
Deoksinukleotid triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
Dithiothreitol (DTT- C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo scientific, R0861
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	AppliChem, A 8075,1000
Glisin	Chemcruz, sc-29096
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
İzopropanol	Appllichem, A3928,0500PE
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Lipofektamine-2000	Thermo Fisher,11668027
Lipofectmax™	ABP Bioscience, FP310
MG-132	Selleckchem, 02619
Orange G	Sigma, O-1625
Oligonucleotid primer	Macrogen
ONPG	Sigma, 101526379
Paraformaldehit (HO(CH ₂ O) _n H)	Sigma, P6148
PEI	Polysciences, 24765-1
Penisilin/Streptomisin	Thermo, 15140-122
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Sigma, 1741932998611
ProLong gold mounting media (DAPI)	Thermo scientific, 36935
Proteinaz K	Promega, V3021
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G

Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum pyrophosphate (NaPPi-Na ₄ O ₇ P)	Sigma, P8010
Sodyumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, 106392
TEMED	AppliChem, A1148
Tris-baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, T6791
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Sigma, 93363
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween 20	J. T. Baker, 73-74
Yeast extract	Merck, VM445253 22
3.1.2. DNA ve Protein Markırlar	
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
DIG labeled DNA molecular weight marker II	Roche, 11218590910
Gene ruler 1 kb DNA ladder	Thermo scientific, SM0311
Precision plus protein™ dual color standards	Bio-Rad, 1610374
3.1.3. Antikorlar	
3.1.3.1. Primer Antikorlar	
Anti-FLAG M2- mouse monoclonal	Sigma-Aldrich, F3165-1MG
Anti-RIPK4 rabbit polyclonal	Santa Cruz, sc-83320
3.1.3.2. Sekonder Antikorlar	
Anti- mouse- Alexa fluor 488	Abcam, ab150117
Anti-mouse-Cy3	Abcam, ab97035
Anti-mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-rabbit- Alexa Fluor 488	Abcam, ab150061
Anti- rabbit -Cy3	Abcam, ab6939
Anti-rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045
Prolong gold mounting media (DAPI)	Life Technologies, P36935
3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler	
DMEM (4.5 g/L Glukoz)	Thermo, 41966029
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco, 10500064

Higromisin™	Biomatik, A218
Opti-MEM	GIBCO, 31985-062
Penicillin/Streptomycin	Thermo, 1514022
Zeosin™	Genoxxon, M34460250

3.1.5. Enzimler

HindIII (20U/ µL)	NEB, R0104S
NheI-HF (20U/ µL)	NEB, R3131S
ScaI X 4-12U/ µL	TAKARA, 1084A
XhoI (20U/ µL)	NEB, R0146S
BamHI-HF (20U/µL)	NEB, R0136S

3.1.6. Membranlar

Nitroselüloz membran(0,45µm)	BIORAD,1620115
Naylon membran	Roche, 11209299001

3.1.7. Kitler

Brillant Dye Terminör v3.1 Cycle Sequencing Kit	NimaGen, BRD3-100
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad, 1705060
ClonJET PCR Cloning Kit	Termo Fisher, K1231
Cycle Test Plus DNA Reagent Kit	BD,340242
DIG Luminescent Detection Kit	Thermo Fisher, 11363514910
DIG Probe Synthesis Kiti	Thermo Fisher, 11636090910
E.Z.N.A.® Total RNA Kit	Omegabiotek, R6834-00
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6950-01
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6915-03
Flp-In™ System	Invitrogen, K6010-01-02
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermo Fisher, 11791-100
Mycoplasma Detection Kit	ABM, G238
Nucleospin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel,740609.50
Phusion Hot Start Taq DNA Polimeraz	Thermo- F-549S
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, 28704
RapidLyse DNA İzolasyon kiti	Macherey-Nagel, - 740100.50

3.1.8. Sarf Malzemeler

Falkon tüpler (15 ve 50 ml)	Isolab, Fransa
Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 ml)	Eppendorf, Almanya
Pipet uçları	Axygene, ABD
Serolojik pipetler (5,10 ve 25 ml)	SPL, Güney Kore
Steril pastör pipeti	Isolab, Fransa
Whatman kâğıdı 3MM	GE-Healthcares, 3030-861
Whatman kâğıdı GB004	GE-Healthcares, 10427904
6 kuyulu tabak	Corning, ABD
60 mm petri kabı	Corning, ABD
100 mm petri kabı	Corning, ABD

3.1.9. Cihazlar

Accuri C6 Flow Sitometri	Becton Dickinson, ABD
Bulaşık makinesi	Bosch, Almanya
Buzdolabı (4 °C)	Bosch, Almanya
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
ChemiDoc MP görüntüleme sistemi	BIO-RAD, ABD
CO ₂ 'li etüv	Heraeus, Almanya
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	BIORAD, ABD
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	BIORAD, ABD
Floresan mikroskop	Nikon E80, Japonya
Genetik analizör cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	ASHAUS, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, Kodak
Sınıf II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi	Leica, Germany
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD

Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Sıcak su banyosu	Stuart, İngiltere
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R
Sonikatör VCX500	Sonics-Vibracell, ABD
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Thermal cycler	Gene Amp 9700, ABD
Thermal cycler	Techne TC512, İngiltere
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere
-80 °C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.1.10. Bakteri Suşları

Tüm vektörlerin çoğaltılmasında DH5α bakteri suşu kullanıldı.

DH5α Genotipi

F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1

3.1.11. Kullanılan Vektörler

Memeli hücrelerinde ekspresyon için kullanılan p3xFLAG-CMV/DEST (FLAG), Dr. Hannie Kremer'den (Department of Human Genetics- Radboud University Nijmegen Medical CentrQe, Hollanda) temin edilmiştir. Konak hücre genomuna FRT kaseti yerleştirmek için kullanılan pFRT/LacZeo vektörü, hedef genin klonlandığı

pFRT/DEST/FLAG/HA (Addgene, Kat. No. 2360) ekspresyon vektörü ve FLP rekombinazı eksprese eden pOG44 vektörü Invitrogen'den temin edilmiştir. Kozak dizisi ve FLAG epitopu sonradan eklenen ekspresyon vektörü pcDNA5/FRT Prof. Dr. Ersan Kalay'dan (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) temin edilmiştir. pJET vektörü (Thermo-K1232) ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.12. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan HaCaT ve HEK293 hücre hatları sırasıyla Alman Kanser Araştırmaları Merkezi (DKFZ) ve ATCC (CRL-1573)'den temin edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Flp-In 293TM (Thermo Fisher Scientific, R75007) ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.13. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

Bakteri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözüldü. pH 1N NaOH ile 7'ye ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı. 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

Düşük Tuzlu Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 5 g sodyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözüldü. pH 1N NaOH ile 7'ye ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı. 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

LB sıvı besiyerine %2 oranında agar eklenerek hazırlandı. LB agar besiyeri 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Kullanılacağı zaman mikrodalganın defrost ayarında eritildikten sonra sıcaklığı su banyosunda 50-55 °C'ye getirilerek soğutuldu. Çoğaltılacak vektörün antibiyotik seçilimine göre besiyerine 100 µg/mL Ampisilin veya 50 µg/mL Kanamisin eklendikten sonra 60 mm çapında petri kaplarına 10'ar mL olacak şekilde dağıtıldı.

Kompetan Bakteri Oluşturma Transformasyon Tamponu (TB Buffer)

10 mM PIPES (MA: 302.37 g/mol), 15 mM CaCl₂ (MA: CaCl₂.2H₂O: 110.98 g/mol), 250 mM KCl (MA: %74.5513 g/mol), bir miktar su ile çözüldü ve KOH ile pH 6,7'ye ayarlandı. Ardından final hacimde konsantrasyonu 55 mM olacak şekilde MnCl₂ (MA: MnCl₂.4H₂O:197,91 g/mol) eklendi. Çözelti 0,45 mm filtreden geçirilerek steril edildi.

SOB Super Optimal Broth (1 Lt)

20 g Trypton, 5 g yeast extract, 0,5 g NaCl ve 0,186 g KCl son hacmi 1 L olacak şekilde distile suda çözüldü ve pH 3M NaOH ile 7'ye ayarlandı. 1,2 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavlandı. Ardından final hacimde konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde MgSO₄ ve MgCl₂ eklendi.

Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 500 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine 57.1 mL %100 glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) eklendi. pH 8.5'e ayarlandı ve çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı. Stok ve çalışma solusyonları oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum Bromür Solüsyonu

Toz haldeki etidyum bromürden deiyonize distile su ile konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde solüsyon hazırlandı. Işıktan korumak için koyu renkli bir şişede karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

20 g sükroz 40 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Ardından 100 mg orange G ilave edilerek deiyonize distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Beta Galaktozidaz Analiz Solüsyonları

Z tamponu

4.2 g NaH_2PO_4 (MA: 119.98 g/L), 8.52 g Na_2HPO_4 (MA: 141.96 g/L), 0.75 g KCl (MA: 74.55 g/L) ve 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MA: 246.47 g/L) tartılarak 800 mL distile suda çözdürüldü. HCl ile pH 7'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Southern Blot Solüsyonları

5 M NaCl

292.2 gr NaCl 800 ml ddH₂O içinde çözüldü ve son hacim 1 litreye tamamlanarak otoklavlandı.

2 M Tris (pH: 8.0)

242 gr Tris 800 ml ddH₂O içinde çözüldü ve 10 M'lık NaOH ile pH 8'e ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlanarak otoklavlandı.

10 M NaOH

100 gr NaOH 150 ml ddH₂O içinde çözüldü ve son hacim 250 ml tamamlanarak otoklavlandı.

0.5 M EDTA (disodyum dihidrat) (pH 8.0)

16.81 g Na_2EDTA (MA: 336.24 g/mol) ve 60 mL distile su ile çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 10 M'lık NaOH ile pH 8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı.

20 X SSC Stok Solüsyon (pH 7.0)

NaCl 175.3 g (3 M) ve $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodyum sitrat) 88,2 g (0.3 M) tartılarak 800 ml ddH₂O içinde çözüldü. pH 7.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

%10 SDS Stok Solüsyonu

20 gr SDS 150 ml ddH₂O içinde çözülerek 200 ml'e tamamlandı.

2 M Tris-HCl, (pH 7.5)

242.28 g Tris 800 mL ddH₂O içinde çözüldü. 1N HCl ile pH 7.5'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

Denatürasyon Solüsyonu

50 mL 10 M NaOH (0,5 M NaOH) ve 300 mL 5 M NaCl (1.5 M NaCl) otoklavlanmış distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Southern Nötralizasyon Solüsyonu

250 mL 2M Tris-HCl (0.5 M Tris HCL) (pH 7.5) ve 300 mL 5 M NaCl (1.5 M NaCl) otoklavlanmış distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Düşük Sertlikte Tampon

50 ml 20X SSC ve 5 mL %10 (w/v) SDS çift distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Yüksek Sertlikte Tampon (65 °C'de yıkama için)

12,5 mL 20X SSC ve 5 mL %10 (w/v) SDS çift distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Maleik Asit Tamponu (pH 7.5)

11.61 gr Maleik Asit (0.1 M/L) ve 8.7 gr NaCl (0.15 M/L) 600 mL çift distile su ile iyice çözülerek ve pH 7.5'e NaOH ile ayarlandı ve ardından son hacim 1 litreye tamamlandı.

Yıkama Tamponu

250 mL Maleik asit tamponu (pH 7.5) ve 750 µL Tween 20 (%0.3) karıştırıldı.

Stok Bloklama Solüsyonu (10X)

10 gr Blocking Reagent, maleik asit tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanan 10X bloklama solüsyonu -20 °C'de saklandı.

Bloklama Solüsyonu (1X)

10 mL (10X) Bloklama solüsyonu 190 mL maleik asit ile 1X konsantrasyona sulandırıldı. Daima taze hazırlanır.

Antikor Solüsyonu (2 h, 4°C)

Anti- AP (Roche, 11 093 274 910) her kullanım öncesinde 10 000 rpm'de 5 dakika kendi kabında santrifüj edilip gerekli miktar uygun pipet ile yüzeyden alındı. Digoksigenin (DIG)-AP 1:10 000 (75 mU/mL) oranında bloklama solüsyonu içinde sulandırıldı.

Belirleme (Detection) Tamponu (pH 9.5 (20°C))

25 mL 2 M Tris-HCL ve 10 mL 5 M NaCl pH 9.5'e ayarlanarak 500 mL'ye tamamlandı.

CSPD Solüsyonu

Her 100 cm² membran için 1 mL CSPD solüsyonu kullanılır. 10 µL CSPD, 990 µL Detection buffer ile karıştırıldı. 2-8 °C'de karanlıkta saklanır ve 1-2 kere kullanılır.

SDS-PAGE ve Western Blot Solüsyonları

Ayırma Jeli Tamponu, 1.5 M (pH 8.8)

36.33 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 180 mL çift distile suda çözüldü. 12 N HCl solüsyonu ile pH 8.8'e ayarlanarak son hacim çift distile su ile 200 mL'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

6.057 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 90 mL distile suda çözülerek 12 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Sonrasında toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (20 mL)

10 g SDS (MA: 288.37 g/mol) 100 mL distile su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

10X Tris Glisin Tamponu

30.3 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) ve 144 g glisin (MA: 75.07 g/mol) 1 L çift distile su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1 L) (1 X)

890 mL çift distile su üzerine 10X Tris-Glisin tamponundan 100 mL alınarak üzerine 10 mL %10'luk SDS (son konsantrasyon %0.01) eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

100 mg APS (MA: 228.18 g/mol) 1 mL çift distile suda çözüldü ve maksimum yedi güne kadar kullanılmak üzere solüsyon 4 °C'de saklandı.

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Son konsantrasyonları 0.25 M Tris-CI (pH: 6.8), %50 gliserol, %10 SDS, %0.01 bromofenol mavisi olacak şekilde solüsyon 10 mL hacimde hazırlandı ve -20 °C’de saklandı. Kullanılmadan önce final konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde DTT ilave edildi.

SDS-PAGE Transfer Tamponu

Sırası ile 800 mL distile su üzerine 100 mL 10X Tris Glisin tamponu ve son olarak 100 mL Metanol eklenerek son hacim 1 L olacak şekilde hazırlandı.

%20 Tween 20

20 mL stok Tween 20, 80 mL distile su ile çözüldü ve homojen hale gelen %20 Tween 20 solüsyonu +4 °C’de saklandı.

10X TBS Stoğu (1 L)

24 g Tris HCl (MA: 157.60 g/mol), 5.6 g Tris-base (MA: 121.14 g/mol), 88 g NaCl (MA: 58.44 g/mol), 800 mL distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 12N HCl ile pH: 7.6’ya ayarlandı. Distile su ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.

1X TBS-Tween 20 (TBST)

450 mL distile su ile 10X TBS’den 50 mL alınarak 1X TBS hazırlandı. Son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde %20’lik Tween 20 solüsyonundan 1 250 µL eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteaz ve Fosfotaz İnhibitörler

10X PI (Proteaz karışımı)

1 tablet proteaz inhibitör 10 mL çift distile su içinde çözüldü. Alikotlanarak -20 °C’de saklandı.

100X Sodyum Orthovanadate (200 mM) (NaVan)

3.68 g Na₃VO₄ (MA: 183.91 g/mol) 90 mL çift distile su ile çözüldü. Sarı renkli solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar soğuduktan sonra 1 N NaOH ile pH 10.0’a ayarlandı ve 100 mL’e tamamlandı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 2mM olacak şekilde kullanıldı.

50X Sodyum Florür (1M) (NaF)

4.2 g NaF (MA: 41,99 g/mol) 100 mL çift distile su ile çözülerek 1 M olarak hazırlandı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 50 kez seyreltilerek kullanıldı.

20X Sodyum PyroPhosphate (100 mM) (NaPPi)

4.44 g NaPPi (MA: 444.06 g/mol) 100 mL çift distile su ile çözülerek hazırlandı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde kullanıldı.

100X PMSF (100 mM)

0.174 g PMSF (MA: 174.19 g/mol) 10 mL Etanol ile çözdürüldü. Solüsyon alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde kullanıldı.

1 M Tris HCl (pH: 7.4)

24.22 g Tris baz 180 mL distile su ile çözüldü, pH’sı 12 N HCl ile 7.4’e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 200 mL’ ye tamamlandı. Solüsyon otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

TNTE (Tris, Na, Triton X-100, EDTA) Hücre Patlatma Tamponu

50 mM Tris-Cl (1 M Tris-Cl pH 7.4), 150 mM sodyum klorür (5 M NaCl) , %0.5 Triton X-100 (%20 Triton X-100), 1 mM EDTA (0.5 M EDTA pH 8.0), 5 mM NaPPi (100 mM), 1x PI (10x), 20 mM NaF (1 M), 2 mM NaVan (200 mM) ve 1 mM PMSF (100 mM) çift distile su içerisinde hazırlandı. Patlatma tamponu patlatma öncesi buzda bekletilerek soğutuldu.

İmmünofloresanda Kullanılan Tamponlar

10 mL %4 Paraformaldehit Çözeltisi

4 gr Paraformaldehit (PFA MA: 30.03 g/mol) 80 mL PBS içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 60 °C’de ısıtılarak çözüldü. pH 1N HCl ile 6.9’a ayarlandıktan sonra hacim 100 mL’e tamamlandı ve 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Dondurulduktan sonra hızlıca 37 °C’de çözülüp kullanıldı. Birden fazla dondur-çöz yapılmamasına özen gösterildi.

10 mL %0,2 Triton X 100 Çözeltilisi (Permeabilizasyon Solüsyonu)

100 µL % 20 Triton X 100 1X PBS ile 10 mL'e tamamlandı.

10 mL %10 Keçi Serumı (Bloklayıcı Solüsyonu)

Ticari olarak elde edilen keçi serumundan 1 mL alınarak 9 mL PBS ile 10 mL'e tamamlandı.

Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

%10 FBS-DMEM-1X Penisillin/Streptomisin/Amfoterisin B Besiyeri

Yüksek glukozlu DMEM besiyerine %10 Fetal Bovine serum ve %1 pen/strep/amfoterisin solüsyonu (100 U/mL penisilin-100 U/mL streptomisin 100 U/mL amfoterisin b) olacak şekilde eklendi. Besiyeri 4 °C'de saklandı.

10X PBS Stoğu

1.37 M NaCl (MA:58.44 g/mol), 26.8 mM KCl (MA 74.56 g/mol), 0.1 M Na₂HPO₄ (MA 141.96 g/mol), 17.6 mM KH₂PO₄ (MA 136.09 g/mol) 800 mL distile su ile hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 1 N HCl ile 7.4'e ayarlandı. Distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı ve 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda steril edildi. .

Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES

0.8 g NaCl (MA: 58.44 g/mol), 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O (MA: 177,99 g/mol) ve 1.2 g HEPES (MA: 238.3 g/mol) 90 mL distile su ile çözüldü ve pH, 0.5 N NaOH ile 7.05'e ayarlanarak 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon 0,25 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve falkonlara alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

2.5 M CaCl₂

36.75 g CaCl₂ (MA: 147.02 g/mol) 100 mL steril çift distile su içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon 0.25 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve falkonlara alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. pFRT/LacZeo, pFRTDEST/FLAG HA, pcDNA5/FRT, pOG44 ve pCDNA5/FRT-3x FLAG-RIPK4 Vektörlerinin Çoğaltılması

3.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlama

E. Coli suşlarını Inoue yöntemiyle (97) kompetan hale getirmek için istenilen bakteri stoğundan antibiyotiksiz LB katı besiyerine yayma yapıldı ve 37 °C’da bir gece boyunca inkübe edildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden bir kaç koloni alındı ve 40 mL LB agar besiyerine ekim yapılarak kültür 37 °C’da bir gece büyütüldü. Ertesi gün 125 mL SOC (20mM Glukoz içeren SOB) sıvı besiyerine OD₆₀₀ 0.2 olacak şekilde satüre kültürden alınarak ekim yapıldı ve 17 °C’da çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Sıcaklığın yükselmemesi için inkübatöre flask içerisinde buz da konuldu ve buzlar inkübasyon süresince tazelenildi. Kültür, OD₆₀₀ 0.4–0.6 olana kadar büyütüldü ve kompetan hücre hazırlamak üzere buza alınarak 10 dk bekletildi. Daha sonra 4 °C’de 2 500 g’de 10 dk santrifüj edilerek bakteriler çöktüldü. Hücre pelleti 40 mL soğutulmuş TB transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve tekrar 15-20 dk buz üzerinde bekletildi. Bakteriler 4 °C’da 2 500 g’de tekrar 10 dk santrifüj edildi. Bakteri pelleti 10 mL soğuk TB transformasyon tamponunda süspanse edildi. Ardından hücrelerin üzerine final hacimde %7 olacak şekilde 700 µL DMSO eklendi ve 10 dk buzda bekletildi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere eppendorflara dağıtılarak sıvı nitrojende donduruldu ve -80 °C’de saklandı.

3.2.1.2. *E. Coli* Transformasyonu

Transformasyon için önceden Inoue metoduyla süperkompetan hale getirilmiş *DH5α* bakteri suşu -80 °C’den çıkarılarak buza alındı. Transformasyon için 0.5 µg vektör karışımı ya da ligaz reaksiyon ürününün yarısı, 50 µL *E. Coli DH5α* kompetan bakteri içeren eppendorf tüpüne eklendi. Karışım 30 dakika buz içinde tutuldu ve her 10 dakikada bir parmakla hafifçe vurularak karıştırıldı. İnkübasyon sonunda bakteriler 30 saniye 42 °C’de ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından 2 dakika buzda bekletildi. Steril kabine alınarak üzerine 1 mL LB (pFRT/LacZeo için düşük tuzlu LB) veya S.O.C besiyeri eklendi. Eppendorflar yüzeye sabitlenerek 1 saat boyunca 37 °C’ye 220 rpm/dk hızda çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda hücre süspansiyonu 10 000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi ve hücre pelleti 1mL LB ile yıkandı. İkinci santrifüjden sonra hücre pelletine 50 µL besiyeri eklendi ve hücreler vektörde bulunan antibiyotik direncine göre ya 100 µg/mL Ampisilin ya da 50

$\mu\text{g/mL}$ içeren LB-Agar (pFRT/LacZeo için düşük tuzlu LB) petrilere ekildi. Petri tabaklar $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı inkübatörde 12-16 saat inkübe edildi.

3.2.1.3 Plazmit İzolasyonu

Transformasyon sonrası petride büyüyen kolonilerden seçilerek 5 mL uygun antibiyotik içeren ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ampicilin) LB'ye inoküle edilerek $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çalkalayıcı inkübatörde 220 rpm'de 12-16 saat kültüre edildi. Süre sonunda bakterilerin konsantrasyonları 600 nm 'de kontrol edildi. OD_{600} 2.0-3.0 arasında, bakteri kültüründen 4 mL alınarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Bakteri kaynaklı endotoksinler memeli hücreleri için toksik etki gösterdiğinden memeli hücrelerine transfekte edilecek ekspresyon vektörleri endotoksinleri uzaklaştırmaya uygun E.Z.N.A. Endo-free Plasmid DNA Mini Kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları ile izole edildi.

OD_{600} değerleri 2.0-3.0 arasında olan kültürlerden 4 mL alınarak $10\text{ }000\text{ g}$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine $250\text{ }\mu\text{L}$ Solüsyon I/RNase A ($10\text{ mg}/\mu\text{L}$) eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak tamamen homojen hale getirildi. Ardından Solüsyon II'den $250\text{ }\mu\text{L}$ eklenerek, berrak bir lizat oluşana kadar tüpler nazikçe alt-üst edildi. Bu aşamada DNA'nın kırılmasını önlemek için şiddetli çalkalamadan kaçınıldı ve maksimum 2 dakika inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sonunda lizatlara buz üzerinde soğutulmuş N3 Solüsyonundan $125\text{ }\mu\text{L}$ eklendi. Örnekler bekletilmeden 8-10 kez alt üst edilerek beyaz presipitatların oluşumu sağlandı. Sonrasında tüpler maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınarak hacim ölçüldü. Bu esnada, 2 mL'lik DNA kolonları $100\text{ }\mu\text{L}$ 3M NaOH solüsyonu eklenerek maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 1 dakika santrifüj edilerek dengelendi. Hacmi ölçülen süpernatant üzerine 1:1 oranında ETR Binding Solüsyonu eklendi ve tüp 10 kere alt-üst edildi. Elde edilen sıvı karışımdan maksimum $700\text{ }\mu\text{L}$ kitle gelen kolonlara transfer edildikten sonra ve maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem tüm karışım kolondan geçirilene kadar tekrarlandı. Kolona bağlanan plazmit üzerine $500\text{ }\mu\text{L}$ ETR Wash Solüsyonu eklenerek maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 1 dakika santrifüj edildi. Ardından $500\text{ }\mu\text{L}$ HBC Solüsyonu kolonlardan geçirilerek maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 1 dakika santrifüj edildi. Filtre edilen kısım atıldı ve $700\text{ }\mu\text{L}$ DNA Wash solüsyonu (%70 Etanol) kolonlara eklenerek maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi iki kere uygulandı. Kolonlar, alkol kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla maksimum hızda ($14\text{ }000\text{ g}$) 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlardaki alkol kalıntılarının tamamen uzaklaşması için ikinci bir işlem olarak kolonlar $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye

ayarlanmış ısı bloğunda 10 dakika inkübe edildi. Kolonlar temiz tüplere transfer edilerek endotoksin içermeyen elüsyon solusyonundan 60-100 µL eklendi ve 1 dakika inkübe edildi. Kolonlar maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmitlerden 2 µL alınarak %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü. Plazmitlerin konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçüldü ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Zeosin™ ve Higromisin™ Dozlarının Belirlenmesi

3.2.2.1. Genomuna FRT Kaseti Alan Hücrelerin Seçilimi için Uygun Zeosin™ Dozunun Belirlenmesi

FRT kaseti içeren pFRT/lacZeo vektörü aynı zamanda Zeosin™ direnç geni içermektedir. Bu nedenle transfeksiyon sonrası ortama Zeosin antibiyotiği verilerek, FRT kasetini genomuna almamış hücrelerin ölümü sağlanacaktır. Zeosin™'e karşı direnç genini eksprese eden hücrelerin seçilimi için hücrelerin %95'ini öldüren doz belirlendi.

12 kuyulu tabakta her kuyuya $1,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde HaCaT hücresi ekildi. Ertesi gün Zeosin™ (250 mg) 2 500 µL HEPES'de çözülerek 100 mg/mL Zeosin™ stokları hazırlandı. Sonrasında stok Zeosin™, DMEM ile 1:10 oranında seyreltilerek 10 mg/mL haline getirildi ve uygulanacak dozlar bu karışımdan seyreltilip hazırlandı. Kontrol hücrelerine normal besiyeri verilirken, diğer hücrelere 50, 100, 200, 400, 600 ve 1 000 µg/mL Zeosin™ verildi. Deney boyunca her üç günde bir Zeosin™ içeren besiyeri tazelenerek dokuzuncu günde deney sonlandırıldı.

3.2.2.2. RIPK4'ü Sürekli Eksprese Eden Flp-In-HaCaT Hücrelerinin Seçilimi için Uygun Higromisin™ B Dozunun Belirlenmesi

RIPK4'ün klonlandığı pFRTDEST/FLAG HA ve pcDNA5/FRT vektörleri aynı zamanda Higromisin direnç geni içermektedir. Bu nedenle transfeksiyon sonrası besiyerine Higromisin™ B antibiyotiği verilerek, RIPK4'ün klonlandığı ekspresyon vektörü genomuna yerleşmemiş Flp-In-HaCaT hücrelerinin ölümü sağlanacaktır. Higromisin™ B'ye karşı direnç genini eksprese eden hücrelerin seçilimi için hücrelerin %95'ini öldüren doz belirlendi.

Altı kuyulu tabakta her kuyucuğa 3×10^5 hücre olacak şekilde HaCaT hücresi ekildi. Ertesi gün toz halde gelen Higromisin™ B 100 µL ddH₂O ile 100 mg/mL konsantrasyon hazırlandı. Hücrelere 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL Higromisin™ verilerek ve her üç günde bir Higromisin™ içeren besiyeri tazelenerek 12.günde deney sonlandırıldı.

3.2.3. FRT Kaset İçeren pFRT/LacZeo Vektörünün Linearize Edilmesi

Flp-InTM sisteminin üretici firması kalıcı transfeksiyon verimi için vektörün linearize edilmesini önerdiği için vektörü ScaI enzimi ile kesildi. Kesim esnasında 1 µg vektör DNA için 10 U ScaI enzimi kullanıldı. Kesim için örnekler 37 °C 'de 4 saat inkübe edildi. Kesim reaksiyonu aşağıdaki koşullara göre gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Kesim Reaksiyonu Sonrası Örneklerin Saflaştırılması

Nucleospin Gel and PCR Clean-Up kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları ile ScaI ile kesilen pFRT/lacZeo vektörü temizlendi. Temizleme esnasında kesim reaksiyonu distile su ile 100 µL'ye tamamlandı ve 2 kat hacimde (200 µL) NTI buffer eklendi. Total hacmi 300 µL olan solüsyon kit içerisindeki silika membranlı kolonlara aktararak 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki atık uzaklaştırılarak kolonlara 700 µl NT3 buffer eklendi ve 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından reaksiyonları inhibe edebilen etanolün uzaklaştırılması için kolon 11000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR) ürünlerinin bulunduğu silika membranlı kolon temiz bir ependorf tüpe alındı. Kolondaki membranın üzerine 30 µl DNA elüsyon tamponu olan NE buffer eklendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kolonlar 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek PCR ürünlerinin saflaştırılması gerçekleştirildi.

3.2.4. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında, kontrol olarak insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK293 hücre genomuna FRT kaseti yerleştirilmiş olan Flp-InTM-293 hücreleri ve proje amacına uygun olarak yetişkin immortal insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücre hatları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı % 1 Penisilin ve Streptomisin antibiyotikleri içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyerinde 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi (98).

3.2.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankından alınan hücreler 37 °C sıcaklığa sahip su banyosunda, içinde bir parça buz halinde hücre kalacak şekilde çözülerek buz üzerine transfer edildi. Hücrelerin üzerine %20 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri eklendi ve 1 200 rpm'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre

pelleti aynı besiyeri ile pasteur pipeti yardımıyla nazikçe süspanse edildi ve flaska ekildi. Ertesi gün flaskta bulunan besiyeri %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Bölümümüze gelen her hücre mikoplazma PCR testi ile firmanın önerileri doğrultusunda analiz edildi. Mikoplazma kontaminasyonu olmadığı doğrulanan hücreler deneylerde kullanıldı.

3.2.4.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler, büyüme alanının %70-80’inini doldurduklarında 1/5 oranında seyreltilerek yeni flaska alındılar. Pasajlanma esnasında, hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile nazikçe yıkandı. Kullanılan flaskın büyüklüğüne göre (T25 flaska 0,7 mL ve T75 flaska 2 mL) Tripsin/EDTA (T/E) eklenerek 37 °C inkübatöre kaldırıldı. Hücreler yüzey ile olan bağlantıları kopana kadar (Flp-InTM-293 hücreleri 1-2 dakika, HaCaT hücreleri 8-10 dk) inkübatörde T/E’ye maruz bırakıldı. T/E uygulaması sonrası reaksiyonun inhibe edilmesi için hücrelere %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplanarak steril 15 mL’lik falkon tüplere aktarıldı ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti uygun hacimde besiyeri ile süspanse edildi ve uygun miktarda besiyeri ile uygun büyüklükteki flaska aktarıldı ve 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Protein stabilitesinin analiz edildiği çalışmalarda hücre medyumuna 5 µM olacak şekilde MG-132 proteaz inhibitörü eklendi ve hücreler ajanla 6 saat inkübe edildi.

3.2.4.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı ve T/E hücrelerin üzerine eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler yüzey ile olan bağlantıları koparılan kadar T/E’ye maruz bırakıldı ve sonrasında reaksiyonu inhibe etmek için %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplanarak steril 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Besiyeri uzaklaştırılarak pellet üzerine %10 FBS içeren besiyeri eklenerek hücreler nazikçe süspanse edildi ve tekrar 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletin üzerine daha önceden hazırlanmış ve soğutulmuş antibiyotik içermeyen %20 FBS içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) karışımından 900 µL eklendi. Ardından hücreler vidalı dondurma tüpüne (cryo-vial) transfer edildi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu

sürenin sonunda hücrelerin üzerine 100 µL DMSO (%10) eklendikten sonra alt-üst yapılarak karıştırıldı, tüpler buz üzerine alınarak 10 dakika daha bekletildi. Süre sonunda tüpler pamuklarla sarılarak -70 °C'ye kaldırıldı. Hücrelerin uzun dönem saklanabilmesi için -70 °C'de bir gün tutulan hücreler sıvı nitrojen tankına transfer edildi. Hücre setlerinin hem -70 °C'de hem de sıvı nitrojende tutulmasına özen gösterildi.

3.2.5. Memeli Hücrelerinin Geçici Transfekte Edilmesi

3.2.5.1. Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon

HEK293T ve Flp-InTM-293 hücrelerinin transfeksiyonunda, HEPES buffer varlığında, DNA'nın kalsiyum fosfat ile presipitat oluşturması ve endositoz ile hücre içine alınmasına dayalı "Kalsiyum Fosfat Transfeksiyon" yöntemi kullanıldı (91). Altı kuyulu tabaklar için 3×10^5 hücre yaklaşık %30-40 konfluent olacak şekilde, antibiyotik içermeyen %10 FBS içeren 1,8 mL DMEM besiyerine eklendi. Hücreler yüzeye yapışmaları için doku kültürü inkübatöründe gece boyu inkübe edildi.

2 ml besiyeri için (altı kuyulu tabak) maksimum 2 µg plazmit kullanıldı. Plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 20 µL'ye tamamlandı. 2.5 M CaCl₂'den 10 µL alınarak, 2 ml besiyerinde çalışma konsantrasyonu 12.5 mM CaCl₂ olacak şekilde, 70 µL steril distile suyun içinde seyreltilti. Son hacim 100 µL olacak şekilde 20 µL DNA-su karışımına 80 µL CaCl₂-su karışımı eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda DNA-CaCl₂ karışımı üzerine (100 µL) düşük hızda vorteks üzerinde damla damla 100 µL 2xHEPES eklenerek, toplam hacim 200 µL'ye tamamlandı. DNA- CaCl₂-HEPES karışımı 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra karışım hücrelerin üzerine damla damla eklendi ve altı kuyulu tabak hafifçe çalkalanarak etüve kaldırıldı. Ertesi gün kuyulardaki medyum, %10 FBS ve antibiyotik içeren DMEM (4.5g/L glukoz) besiyeri ile tazelendi. Transfeksiyondan yaklaşık 24saat sonra protein ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

3.2.5.2. HaCaT Hücrelerinin Lipozom Bazlı Kimyasal Ajanlarla Transfeksiyonu

HaCaT hücreleri altı kuyulu tabaklar için 3×10^5 , 60 mm tabaklar için 5×10^5 hücre ertesi gün yaklaşık %50-60 konfluent olacak şekilde, antibiyotik içermeyen %10 FBS içeren DMEM besiyerine eklendi. Hücreler yüzeye yapışmaları için doku kültürü inkübatöründe gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün Lipofektamin-2000 veya LipofectmaxTM ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda transfeksiyon gerçekleştirildi. 1 µg DNA için 2 µl

transfeksiyon ajanı kullanıldı. DNA ve ajan opti-MEM medyumunda seyreltildi. DNA ve transfeksiyon ajanı karıştırılıp 15 dk inkübe edilip damla damla hücrelere eklendi.

3.2.6. Flp-In-HaCaT Hücrelerinin Oluşturulması

3.2.6.1. HaCaT Hücrelerine pFRT/LacZeo Kalıcı Transfeksiyonu ve Zeosin™ ile Seçilimi

İlgili geni sürekli eksprese ettirmeye hazır keratinosit hücre hattı oluşturmak için konak hücrenin genomuna FRT kaseti yerleştirilmesinde pFRT/lacZeo vektörü kullanılır. Ürün kataloğunda FRT bölgesinin genomda tek bir yere girmesi için az miktarda DNA'nın kullanılması önerilmektedir. Bundan dolayı, firmanın önerisi dikkate alınarak, 10 cm² tabaklarda büyütülen 3x10⁶ hücre Lipofectamine 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak sırasıyla 0.25, 0.5 ve 1 µg olmak üzere ScaI ile linearize edilen pFRT/lacZeo vektörü ile transfeke edildi. Ancak koloni elde edilemedi. Bunun nedeninin HaCaT hücrelerinin düşük transfeksiyon veriminden kaynaklanmış olabileceğini düşünerek, verimin artırılması için deney 60 mm'lik tabaklarda 5x10⁵ hücre için DNA miktarı 3.5 µg'a çıkarılarak tekrarlandı. Ayrıca, Lipofectamine 2000'nin yanı sıra, daha evvel HaCaT hücrelerinde tarafımızca koşulları optimize edilen ve transfeksiyon verimi yüksek olan Lipofectmax™ ve PEI ajanları da deneye dahil edildi. 60 mm tabaklar için 3.5 µg DNA ve 7 µl lipozom ajanları, DNA/Ajan 1:2 oranında kullanılırken; PEI için 3.5 µg DNA ve 10,5 µL PEI ajanı DNA/Ajan oranı 1:3 olacak şekilde uygulandı. Vektörün genoma entegre olması için gereken zamanı sağlamak adına transfeksiyondan sonra 72 saat beklenerek, hücreler %20 yoğunluğu geçmeyecek şekilde pasajlandı. Hücrelerin yüzeye yapıştıkları gözlemlendikten sonra optimal doz olarak belirlediğimiz 100 µg/mL Zeosin™ konsantrasyonu hücrelere eklendi ve her üç günde bir besiyerini yenilenerek iki hafta boyunca hücreler Zeosin™'e maruz bırakıldı. Hücrelere 100 µg/mL Zeosin™ dozunun toksik gelmesi üzerine 50 µg/mL ve 25 µg/mL Zeosin™ dozları kullanılarak koloniler elde edildi. Koloniler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra sırasıyla 24, 12 ve altı kuyulu tabaklara oradan da T25 flasklara alınarak büyütüldü ve donduruldu.

3.2.6.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Hücrelerinde FRT Kasetinin Varlığının PCR ile Doğrulanması

Vektörün SV40 promotörü altında Zeosin direnç-β-galaktosidaz (Lac Z) füzyon geni bulunduğundan vektörü genomuna entegre eden hücrelerin varlığı Lac Z primerleri (1636 F-1637 R) (Tablo 2) kullanılarak PCR reaksiyonu ile doğrulanmak istendi. PCR analizi için 5x10⁴ hücre kullanıldı. Dondurulmuş hücre pelleti 90 µL Lizis tamponu (50 mM KCl, 10

mM Tris.Cl pH:8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL Jelatin, %0.45 NP40, %0.45 Tween 20) ile patlatıldı. 1 mL için 20 µL olacak şekilde 20 mg/mL Proteinaz K eklendi. 56 °C’de 3 saat inkübe edildi. Sonrasında 95 °C’ de 15 dakika ısıtılarak Proteinaz K inaktifleştirildi. DNA’dan 5 µL PCR için kullanıldı. Kontrol olarak aynı primerlerle pFRT/*LacZeo* vektöründen de amplifikasyon yapıldı. Reaksiyonda 42 ng/µL olan stok vektörden 1 µL kullanıldı. PCR aşağıda belirtilen reaksiyonla ve koşullarda PCR cihazı ile gerçekleştirildi.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X (µL)</u>
5X GC tamponu (Thermo)	5
dNTP karışımı (10 mM)	1
Pr F (10 pmol/µL)	1
Pr R (10 pmol/µL)	1
Taq pol	0.5
MgCl ₂ (25 mM),	1.5
dH ₂ O	10
Toplam	20

<u>PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	94	6 dk	
Denatürasyon	94	30 s	
Bağlanma	58	40 s	} 35 Döngü
Sentez	72	30 s	
Son sentez	72	6 dk	
Bekleme	10	∞	

PCR ile ilgili genlerin amplifikasyonu sonrası PCR ürünlerinin tamamı uygun konsantrasyondaki (%1-2) agaroz jele yüklenip 1X TAE tamponu kullanılarak 100 Voltta 1 saat yürütüldü.

Tablo 1. Kullanılan primerlerin listesi

Primer no	Primer dizisi (5'-3')	Primer adı
Pr.1055	Cttaccgcactcagagcag	PLAGL2_403_R
Pr.1149	CACTACCACGTCAAGATTTCTGA	RIPK4_F_RT_PCR
Pr.1150	ATCGCAAAGCTGTATACATCGTG	RIPK4_R_RT_PCR
Pr.1636	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	CMV- F
Pr.1637	TAGAAGGCACAGTCGAGG	BGH- R
Pr. 1654	TGCATTGCAAGCCTTTACCA	PLAGL2_Ex3_DNA_check_F
Pr. 1736	TGAAAGCTGGCTACAGGAAG	Lac Z F2
Pr.1737	GTCAAATTCAGACGGCAAAC	Lac Z R2
Pr.1778	ctagctagctagccaccATGGACTACAAAGACCATGACGG	pcDNA5/FRT-NheI-FLAG-F
Pr.1779	ccgctcgagcggTTACTAGGTCTTGCTTCGCCGC	pcDNA5/FRT-XhoI-RIPK4-R

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri ve intronik diziler küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi.

3.2.6.3. Genomuna FRT Kaseti Giren Klonların Transkripsiyonel Olarak Aktif bir Bölgeye Girip Girmemesinin β -galaktosidaz Ekspresyon Analizi ile Belirlenmesi

FRT kasetinin genomda transkripsiyonel olarak aktif bir bölgeye entegrasyonu Flp-In-HaCaT klonlarından elde edilen lizattaki β -galaktosidaz ekspresyon seviyesine bakılarak analiz edildi (100). Deneyde 1×10^5 hücre 80 μ L TNTE lizis tamponunda patlatıldı. Santrifüj edilen hücre lizatından 5 μ L analiz için kullanıldı. Hücre lizatı β -Merkaptoetanol (BME) içeren 100 μ L Z tamponu (10 mL Z tamponuna 27 μ L BME eklendi) ve 20 μ L o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (4 mg/mL) solüsyonunda 30-50 dk sarı renge dönüşene kadar 37 °C'de inkübe edildi. Reaksiyon 50 μ L Na₂CO₃ (1 M) eklenerek sonlandırıldı. Sonuçlar OD₄₂₀ nm dalga boyunda okundu.

3.2.6.4. Oluşturulan HaCaT Flp-In Klonlarda Southern Blot ile Kopya Sayısının Belirlenmesi

Southern blot yöntemi elektroforez ile ayrılmış DNA fragmanlarının bir naylon membranına transferini ve ardından ilgilenilen DNA bölgesine yönelik işaretli bir probun hibridizasyonu aracılığıyla fragmanın tespitine dayanır (101). Kalıcı transfeksiyon sonrası genomuna yalnızca bir kopya FRT kaseti giren Flp-In-HaCaT hücrelerinin *LacZ* genine özgü prob ile hibridizasyon sonrasında tek bir fragmanın görülmesi beklenmektedir.

DNA İzolasyonu

Southern blot analizi için 5-10 µg genomik DNA kullanılması önerilmektedir (102). Oluşturulan Flp-In-HaCaT klonlarından 1×10^6 hücre pelleti alınarak MN DNA RapidLyse İzolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda izolasyon gerçekleştirildi. İlk olarak 11×10^6 hücreden elde edilen ve -80°C 'de saklanan hücre peleti üzerine 150 µl Buffer RLY eklenerek kitle birlikte gelen 2 mL'lik tüpe aktarıldı. Mekanik homojenizasyon için 0.2 mm şırıngadan geçirildi. Ardından 10 µl sıvı Proteinaz K eklenerek 56°C 'da 15 dakika inkübe edildi ve maksimum hızda ısı bloğunda çalkalandı. Örnekler 11 000 g'de 5 sn santrifüj edildi ve 2 mL'lik tüpte bulunan karışım üzerine 440 µL Buffer RLB eklenerek birkaç kez al-ver yapıldı. Tüm karışım (yaklaşık 640 µl) çekildi ve NucleoSpin® DNA RapidLyse Column tam ortasına eklendi. Ardından 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan solüsyonla birlikte 2 mL'lik tüp atılarak DNA'yı bağlamış olan kolon yeni 2 mL'lik tüpe konularak üzerine 500 µL Buffer RLW eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüjün ardından altta kalan solüsyon tekrar atılarak filtre üzerine 500 µL Buffer RLW eklendi ve 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama aşamalarından sonra kolon boş olarak 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından kolona ve elüsyon tamponu 15 dk etüvde 60°C 'de inkübe edildi. Son olarak filtre kolon 1.5 mL'lik ependorf tüpe alınarak filtrenin tam ortasına 100 µL ısıtılmış Buffer RLE eklendi. 4 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kolon 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA'lar nanodrop cihazıyla ölçüldü ve -20°C 'ye kaldırıldı.

DNA'nın Enzimle Kesilmesi ve Jelde Yürütülmesi

İzole edilen genomik DNA üretici firmanın önerisi doğrultusunda HindIII enzimi kullanılarak kesildi. Bunun için enzimle kesilecek DNA örnekleri 100 ng/µL olacak şekilde seyreltilti. Her bir kesim için 5-10 µg genomik DNA kullanıldı. 1 µg genomik DNA'yı kesmek için 10 U HindIII (20 U/µL) enzimi, toplam hacimin 1/10 (10X) kadar buffer ve 1/100 (100X) kadar BSA kullanıldı. Reaksiyon buz üzerinde kuruldu. Kesim öncesinde genomik DNA, enzim tamponu ve ddH₂O karışımı hazırlandı. Örnekler hafifçe karıştırıldıktan sonra enzim eklenmeden buz üzerinde 2 saat 4°C 'de inkübe edildi. Bu esnada DNA'ların homojen hale gelmesi için örnekler belli aralıklarla hafifçe karıştırıldı. 2 saat sonrasında karışım üzerine enzim eklendi ve 2-3 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra tüplerin ağzı parafilm ile sarılarak 37°C 'de gece boyu kesim reaksiyonuna bırakıldı.

HindIII ile kesilen genomik DNA'nın konsantre edilmesi için total 250 µL'lik kesim hacmi üzerine 25 µL 3M NaAc (NaAc'ın son konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde) eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra üzerine iki hacim 550 mL buzda bekletilmiş %100 Et-OH eklenerek tekrar karıştırıldı. Örnekler buz üzerinde 15-30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 16 000 g, 0 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ince uçlu bir pipet ile dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından örneklerin üzerine 500 µL %70'lik Et-OH eklendi ve örnekler birkaç kere alt üst edildi. 4 °C sıcaklıkta 16 000 g'de 5 dakika santrifüjün ardından süpernatant ince uçlu bir pipet ile uzaklaştırıldı. Tüpler ağzı açık bir şekilde 37 °C'deki etüvde 30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA örneklerinin üzerine 15 µL TE tamponu eklendi ve çözünmesine için hafifçe karıştırıldı. Örneklerden üzerine 3 µL (10X) yükleme tamponu eklenerek elektroforeze hazırlandı.

DNA'nın Pozitif Yüklü Membrana Transferi

Elde edilen DNA örneklerinin Southern blot yöntemi ile analizi için ilk etapta 0.5X TBE buffer ile %1.2'lik agaroz jel hazırlandı ve jel 1X TAE dolu tanka yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa 5 µL DIG işaretli markır yüklenirken diğer kuyulara enzimle kesilmiş genomik DNA'dan 18 µL kuyulara yüklendi. Örnekler 60 Voltta 12 saat yürütüldü. Blotlama sonrası agaroz jel Et-Br ile boyanarak fragmanların membrana aktarılıp aktarılmadığı gözlemlendi.

Jel dikkatlice steril dH₂O içine alındı. Sonrasında 250 mM HCL içinde bromfenol mavisinin mavisi sarıya dönene kadar oda ısısında 10 dk çalkalandı. Ardından jel tekrar steril ddH₂O ile yıkandı. Jel yaklaşık beş katı hacmindeki denatürasyon solüsyonuna alındı ve 15 dk çalkalanarak DNA oda sıcaklığında denatüre edildi. Denatürasyon işlemi taze denatürasyon solüsyonu ile bir kez daha tekrarlandı. Jel ddH₂O içinde kısa bir süre durulandı. Sonrasında jel beş katı hacmindeki nötralizasyon solüsyonuna alındı ve 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Nötralizasyon işlemi taze solüsyon ile ikinci kez tekrarlandı. Jel 20X SSC dengeleme solüsyonunda 10 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Jel transfere hazır hale getirildikten sonra, jelden DNA'nın membrana transferi için Turbo Blotter Sistemi kullanıldı. Turbo Blotter Sistemi altına sırasıyla 20 adet blot kağıt (GB004), dört adet kuru blot kağıt (GB002), bir adet 20X SSC'de ıslatılmış GB002 kağıt, 20X SSC'de bekletilen naylon membran, agaroz jel, 20X SSC'de ıslatılmış üç adet GB002 Whatman kağıdı ve son olarak tampon kapağı (buffer tray) yerleştirildi. Daha sonra 20X SSC'de ıslatılmış fitil (buffer wick) ve fitil kapağı (wick cover) kapatılarak transfer sistemi kuruldu. Sistemin haznesine 20X SSC dolduruldu ve ara ara 20X SSC seviyesi kontrol edilerek ve eksilen

tampon tamamlanarak bir gece transfere bırakıldı. Ertesi gün membran 2X SSC’de kısa süre yıkandı ve ardından 80 °C’de 2 saat fırında tutuldu ve ddH₂O içinde kısa süre yıkanarak kurutuldu.

Prop Öncesi Membranın Prehibridizasyonu

Prehibridizasyon için membranda her 100 cm² için 10 mL DIG Easy Hyb kullanıldı. DIG Easy Hyb Granules kullanım klavuzunda tarif edildiği şekilde 5,09 g DIG Easy Hyb 7 mL distile su ile sulandırıldı ve bir falkon tüpe aktararak 5 dakikada 37 °C’de köpürtmeden çalkalanarak çözüldü. Ardından su banyosu sıcaklığı 50 °C’ye ayarlandı. Membran hibridizasyon poşeti içerisinde DIG Easy Hyb ile 50 °C’de 30 dk çalkalanarak inkübe edildi.

Membranın Prop ile Hibridizasyonu

Hibridizasyon solüsyonu içinde konsantrasyonu 25 ng/mL olan probun üzerine 50 µL dH₂O eklendi. Prob kaynayan su içerisinde 5 dakika denatüre edildi. Süre sonunda hemen buz üzerine kaldırıldı. DIG Easy Hyb 50 mL’lik bir falkon tüpe alındı ve ön ısıtmaya tabi tutuldu. Buz üzerindeki denatüre edilmiş DIG işaretli LacZ probu, hazırlanmış DIG Easy Hyb üzerine eklendi ve falkon tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. Diğer yandan kapalı olan hibridizasyon poşetininin kapağı açılarak içindeki prehibridizasyon tamponu boşaltıldı. DIG işaretli LacZ probu içeren hibridizasyon solüsyonu poşete konuldu. Poşetin içindeki hava kabarcıkları çıkartılarak poşet, daha önceden sıcaklığı 65 °C’ye ayarlanmış olan su banyosuna köşelerine ağırlıklar bağlanarak yerleştirildi ve gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Ardından hibridizasyon sonrası yıkama adımları gerçekleştirildi. Poşet içerisindeki hibridizasyon solüsyonu temiz bir şişeye boşaltıldı ve daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı. Membran oda sıcaklığında plastik bir kaba alınarak düşük sertlikte tampon ile oda sıcaklığında 5 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında membranın üzerine daha önce sıcaklığı 65 °C’ye çıkartılmış olan yüksek sertlikte tampon eklenerek membran 65 °C’ ayarlanmış su banyosunda 15 dakika çalkalandı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

Kemilüminesans Görüntüleme

Prob-hedef hibridini görüntülemeye alkaline fosfatase konjuge anti-DIG antikoru ve alkaline fosfatase substratı kullanıldı. Membran içinde 100 mL yıkama tamponu olan plastik bir kaba alınarak çalkalayıcıda 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 100 mL bloklayıcı solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklayıcı

sonrasında Anti-DIG AP antikor 1:10 000 (75 mU/ml) olacak şekilde bloklama solüsyonuna eklenerek da sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi. Ardından membran iki kez 15'er dakika 100 mL'lik yıkama tamponu ile yıkandı. Membranın üzerine 20 mL sinyal despit (detection) tamponu eklenerek üç dakika bekletildi. Sonrasında DNA olan yüzey üste gelecek şekilde membran hibridizasyon poşetinin içine yerleştirildi. Alkalın fosfotaz substratı içeren CSPD solüsyonu tüm yüzeyi eşit olarak ıslatacak şekilde (membranın her 100 cm²'si için 1 mL) damla damla blotun üzerine eklendi. CSPD uygulandıktan hemen sonra arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde membranın üzeri streç naylonla kapatılarak membran beş dakika oda sıcaklığında ve 10 dakika 37 °C de inkübe edildi. Ardından Chemidoc görüntüleme cihazıyla görüntülendi.

3.2.6.5. Oluşturulan HaCaT Flp-In Klonlarda Real-Time PCR ile Kopya Sayısının Belirlenmesi

Flp-In-HaCaT hücrelerinin genomunda FRT kaseti kopya sayısının Southern blot yöntemi ile belirlenememesinden ötürü alternatif B planı olan kantitatif real-time PCR ile kopya sayısının belirlenmesine gidilmiştir. Bu yöntem J. Yun ve grubunun bir çalışması referans alınarak gerçekleştirilmiştir (103). Bu çalışmada özetle üçer kat seri dilüsyonlar (9, 3, 1, 0.3 ve 0.1 ng/rxn olacak şekilde) halinde hazırlanan genomik DNA (gDNA) standart kalıp olarak kullanılmıştır. Yayında insan gDNA miktarlarına denk gelen ve “www.genomesize.com” uygulaması kullanılarak belirlenen tek-gen kopya sayıları sırasıyla 2574, 858, 286,95 ve 31 kopya olarak belirtilmiştir. Standart eğrinin çiziminde ise tek-gen kopya sayılarının logaritmik değerlerine karşılık Ct değerleri kullanılmıştır. Örneklerdeki Ct değerlerine karşılık gelen genin kopya sayısı standart eğri kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar genomda tek kopya olarak bulunan internal bir genle normalize edilmiştir.

Bu kapsamda ilk olarak Flp-InTM-293 ve Flp-In-HaCaT hücreleri arasında en yüksek *LacZ* ekspresyonunu veren klonlardan DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izole edilerek (bkz başlık 3.2.6.4.) nanodrop cihazı ile miktarları belirlendi. Standart eğri hazırlamak için Flp-InTM-293 hücrelerine ait genomik DNA'dan 9, 3, 1, 0.3 ve 0.1 ng/rxn olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlandı. İnternal kontrol olarak genomda tek kopya olarak bulunan ve elimizde q-PCR için uygun primerleri olan *PLAGL2* geni kullanıldı. *LacZ* (1736F/1737R) ve *PLAGL2* (1654F/1055R) (Tablo 1) için ayrı ayrı standart eğriler oluşturuldu. Gerçek zamanlı (real time) PCR aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X (μL)</u>
Genomik DNA (10 ng)	1
Pr F (10 pmol/μL)	0.3
Pr R (10 pmol/μL)	0.3
2X SYBR	5
dH ₂ O	3.4
Toplam	10

<u>PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk	} 40 Döngü
Denatürasyon	95	30 s	
Bağlanma- Sentez	60	30 s	
Erime Eğrisi	95	4 s	
	65	1 dk	

Farklı dilüsyonların elde edilen Ct değerleri kullanılarak standart eğri LacZ ve PLAGL2 için oluşturuldu. Eğrinin formülü belirlenerek amplifikasyon verimi hesaplandı. Flp-InTM-293 ve Flp-In-HaCaT aday klonlarından elde edilen genomik DNA kullanılarak Ct değerlerine denk gelen LacZ kopya sayıları standart eğri denklemi kullanılarak belirlendi.

3.2.7. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi

Farklı dilüsyonların elde edilen Ct değerleri kullanılarak LacZ ve PLAGL2 için standart eğriler oluşturuldu. Eğrinin formülü belirlenerek amplifikasyon verimi hesaplandı. Sonrasında standart eğri formülü kullanılarak Flp-InTM-293 ve Flp-In-HaCaT aday klonlarından elde edilen Ct (X değeri) değeri denkleme yerleştirilerek genomlarındaki LacZ kopya sayısı belirlendi.

3.2.8. Hücrelerin Hücre Döngüsü Analizinin Belirlenmesi

HaCaT ve Flp-In-HaCaT hücrelerinin hücre döngülerinin analizi Cycle Test Plus DNA Reagent Kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. İlk olarak altı kuyulu tabaklara 5x10⁵ hücre ekildi. Ertesi gün hücreler T/E ile kaldırılıp PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 2.5 mL kitle gelen buffer solution eklenerek süspanse hale getirilen hücreler 400 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Ardından tekrar 750 μL Buffer Solution eklenerek süspanسیون haline getirilen hücreler ependorf tüplere alınarak santrifüj edildi. Hücre peletinin üzerine 125 μL Solüsyon A ilave edilerek yavaşça pipetaj yapıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda örneklerle 100 μL Solüsyon B ilave edilerek yavaşça pipetaj yapıldı ve tekrar 10 dakika oda

sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak 100 µl Solüsyon C (PI/RNase Staining Buffer) karanlıkta ilave edilerek buzda 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyanan hücrelerin hücre döngüsü flow sitometri BD Accuri C6 Plus kullanılarak ölçüldü ve ModFit LT™ yazılımıyla analiz edildi.

3.2.9. Gateway Klonlama Sistemi Kullanılarak RIPK4'ün pFRT/DEST/FLAG/HA Vektörüne Klonlanması

Hedef genin FRT kaseti içeren ekspresyon vektörüne klonlanmasında, faj lamdanın att sekansları üzerinden faja özgü enzimler ile gerçekleştirdiği homolog rekombinasyona dayalı Gateway klonlama sistemi kullanıldı (104).

LR rekombinasyon reaksiyonu buz üzerinde hazırlandı. İlk olarak giriş ve hedef (destination) vektör 25ng/µL konsantrasyona ayarlanıp 1'er µL PCR tüpünde karıştırıldıktan sonra üzerine nazikçe vortekslenen LR Clonase enziminden 0.5 µL eklendi. Karışım nazikçe vortekslenip santrifüj edildikten sonra 25 °C'de 4.5 saat inkübe edildi. Süre sonunda tüpe 0.35 µl Proteinaz K eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Reaksiyon sonrası, elde edilen LR reaksiyon ürününden 1.5 µl alınarak 50 µl *E.Coli DH5α* suşuna transforme edildi. Antibiyotik (Ampisilin, 100 µg/mL) içeren petrilere yayılan transforme bakteriler 37 °C inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Petride büyüyen kolonilerden seçilerek 5 mL antibiyotikli LB'ye inoküle edildi ve 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 220 rpm'de 12-16 saat büyütüldü. Büyütülen bakterilerin konsantrasyonları 600 nm'de ölçüldü. OD₆₀₀ 2.0-3.0 arasında, bakteri kültüründen 4-5 mL alınarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitler agaroz jelde görüntülendi. Beklenen boyuttaki plazmitlerin doğruluğu ve oryantasyonu Sanger dizileme ile kontrol edildi. Dizileri doğrulanan plazmitler etiketlendi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.9.1. Klonlamaların Dizilenerek Kontrolü

Çalışmada kullanılan hedef genlerin klonlandığı ekspresyon vektörleri %0,6'lık agaroz jelde, 200 ng/µL konsantrasyondaki pGEM vektörüyle (2 µL/kuyu) birlikte yürütüldü. Her bir dizileme reaksiyonunda kullanılacak kalıp DNA miktarı, referans vektöre göre 400-800 ng arasında olacak şekilde ayarlandı. Döngüsel dizileme reaksiyonu, Brilliant Dye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing kitinin önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Dizileme reaksiyonu, belirlenen dizileme primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 1). Döngüsel dizileme reaksiyonu, Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazında aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

<u>Dizileme PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
	(μL)
Brillant Dye	0.75
5X Buffer	1.625
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/ μ L)	0.5
Kalıp Vektör (400-800 ng/ μ L)	2
dH ₂ O	5.125
Toplam	10

<u>Döngüsel Dizileme Reaksiyonu Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	96	45 s	} 28 Döngü
Denatürasyon	96	10 s	
Bağlanma	50	5 s	
Sentez	60	2 dk	
Son sentez	10	5 dk	
Bekleme	10	∞	

Dizileme için PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex G-50 boncuklarından geçirilerek saflaştırıldı. PCR ürünleri 96 kuyulu tabağa transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları ‘Chromas 2.32’ ve ‘SeqScape® software v2.5’ programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler Human Genome Browser’ dan alınan referans gen dizileri ile karşılaştırıldı.

3.2.10. *RIPK4*’ün Restriksiyon Enzimleri ile Klonlamaya Dayalı pcDNA5/FRT Vektörüne Klonlanması

3.2.10.1. *RIPK4*’ün PCR ile Amplifikasyonu

RIPK4’ün pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüyle istenilen ekspresyonun sağlanmaması üzerine *RIPK4* bölümümüzde daha evvel kullanılan ve klonlanan genlerin yüksek seviyede ekspresyonuna olanak veren pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmıştır. pcDNA5/FRT vektöründe Kozak dizisi olmadığından bu dizi ileri primere yerleştirilmiştir. FLAG etiketi ise pDEST-3xFLAG *RIPK4* vektörü üzerinden yapılan PCR ile *RIPK4* gen ürününe eklenmiştir. Hedef genin FRT kaseti içeren ekspresyon vektörüne klonlanması için ilk olarak pcDNA5/FRT vektörünün çoklu klonlama bölgesi (Multiple Cloning Site, MCS) bölgesinde bulunan ve *RIPK4*’ü kesmeyen restriksiyon enzimleri Webcutter ile taranarak belirlendi (5’NheI-XhoI-3’). Restriksiyon enzime dayalı klonlama yapabilmek için ileri ve geri *RIPK4* primer uçlarına, Kozak sekansı-att sekansı ile birlikte vektöre uygun enzim kesim bölgeleri eklendi (1778-1779 primerleri) (Tablo 1). Ardından, pDEST-3X FLAG *RIPK4* (Plazmit

banka kodu: Exp190, ori exp56) vektörü kalıp olarak kullanılarak yüksek oranda hata düzeltme (proofreading) aktivitesi olan *Phusion Hot Start Taq* polimeraz ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıda yer alan PCR karışımı ve reaksiyon koşullarında PCR gerçekleştirildi. PCR ürünü agaroz jelde doğrulandıktan sonra saflaştırıldı.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X (μL)</u>
5X GC tamponu (Thermo)	5
dNTP karışımı (10 mM)	0.5
Pr F (10 pmol/μL)	1
Pr R (10 pmol/μL)	1
Phusion hot start taq pol (2U/μL)	0.3
Kalıp DNA (10ng/uL)	1
dH ₂ O	16.2
Toplam	25

<u>PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	98	1 dk	
Denatürasyon	98	10 s	} 38 Döngü
Bağlanma	62	20 s	
Sentez	72	72 s	
Son sentez	72	8 dk	
Bekleme	10	∞	

3.2.10.2. Vektör ve Hedef DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Hedef genin klonlanacağı pcDNA5/FRT ekspresyon vektörü ve RIPK4-PCR ürünü NheI-HF (20U/ul) ve XhoI (20U/μL) enzimleri ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda kesildi. 1 μg DNA için 10U NheI-HF ve XhoI enzimleri ve 10X Cutsmart tamponu kullanıldı.

3.2.10.3. Ligasyon Reaksiyonu

Hedef *RIPK4* fragmanını vektöre yerleştirilmesi için T4 DNA Ligaz enzimi kullanıldı. Ligasyon öncesinde kesim reaksiyonundan sonra saflaştırılan vektör ve RIPK4'e ait PCR ürününün DNA miktarı agaroz jelde tayin edildi. "NEBio Calculator" programı ile uygun vektör/insert oranı 1/3 seçilerek ligasyonda kullanılacak DNA miktarları belirlendi. Ligasyon reaksiyonunda 1,5 μL plazmit DNA (35 ng /μL), 4.5 μL RIPK4 PCR ürünü (12 ng/μL), 1,5 μL T4 DNA Ligaz enzimi (10X), 1,5 μL ATP (10X) ve 5 μL ddH₂O eppendorf tüp içerisinde karıştırıldı. Kurulan reaksiyon 16 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün 7,5 μl ürün 75 μl DH5α'ya transforme edildi (*Bkz. Başlık 3.2.1.1*) Ardından petride büyüyen her bir koloni 10 μL deiyonize steril su ile süspanse edilerek PCR için kalıp DNA

olarak kullanıldı. Koloni PCR için *RIPK4*' e özgü 1149-1150 (Tablo 1) primerleri kullanıldı. Reaksiyon aşağıda belirtilen koşullardagerçekleştirildi.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X (μL)</u>
Hücre süspansiyonu	10
5X GC tamponu (Thermo)	5
dNTP karışımı (10 mM)	0.6
Pr F (10 pmol/μL)	0.6
Pr R (10 pmol/μL)	0.6
Taq pol (Thermo)	0.15
MgCl ₂ (25 mM),	1.5
dH ₂ O	6.55
Toplam	25

<u>PCR Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	94	6 dk	
Denatürasyon	94	30 s	} 35 Döngü
Bağlanma	58	40 s	
Sentez	72	30 s	
Son sentez	72	6 dk	
Bekleme	10	∞	

PCR sonuçları agaroz jelde analiz edildi. Klonlamanın doğruluğu ve oryantasyonu Sanger DNA dizi analizi ile kontrol edildi (*Bkz. Başlık 3.2.9.1.*). Dizileri doğrulanan plazmitler etiketlendi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.11. RIPK4'ü Sürekli Eksprese Eden Flp-In-HaCaT RIPK4 Hücre Hattının Oluşturulması

RIPK4'ün keratinositlerde kalıcı olarak sürekli eksprese ettirilmesi, 3x FLAG ile füzyon olacak şekilde RIPK4'ün klonlandığı pCDNA5/FRT vektörü ve FLP rekombinazı sürekli eksprese eden pOG44 vektörlerinin oluşturulan Flp-In-HaCaT hücrelerine ko-transfekte edilmesi ile sağlandı. İlk olarak tek FRT kasetinin girdiğini gösterdiğimiz klonlardan transkripsiyonel olarak aktif ilk iki klon olan 3.7 ve 5.7 Flp-In-HaCaT hücreleri 60 mm'lik tabaklara 5×10^5 hücre olacak şekilde antibiyotik içermeyen besiyerine ekildi. Ertesi gün hücreler yüzeye yapıştıktan sonra total DNA miktarı 3.5 μg olacak şekilde pCDNA5/FRT-RIPK4: pOG44 1:4 ve DNA: PEI 1:3 oranında transfeksiyon gerçekleştirildi. İki tüp hazırlandı. Tüp 1'e 3.5 μg DNA eklenerek hacim 250 μL'ye Opti-MEM ile tamamlandı. Tüp 2'ye 10 μL PEI eklenerek hacim 250 μL'ye Opti-MEM ile tamamlandı.

Tüp 1 ve 2 karışımları birleştirilerek 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra karışım damla damla 4.5 mL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde büyütülen hücrelerin üzerine eklendi. Ertesi gün medyum antibiyotik ve fungiozon içeren besiyeri ile değiştirildi. Transfeksiyondan 70 saat sonra hücreler pasajlandı. Hem 3.7 hem de 5.7 klonlar T/E ile kaldırılıp 3 mL besiyeri ile süspanse edildi. 10 cm²'ye hücre süspanسیونun 2/3'ü, 60 mm petriye 1/3'ü ekildi. Hücreler yapıştıktan sonra (yaklaşık 5-6 saat) 50 µg/mL HigromisinTM eklendi ve her 3 günde bir HigromisinTM içeren besiyeri tazelendi. Bu süreçte 100 µg/mL hatta 75 µg/mL dozun hücrelerimiz için toksik olduğu gözlemlendiğinden 50-25 µg/mL doz aralığında hücreler seçilebildi. Elde edilen koloniler 24 kuyulu tabaklara oradan da altı kuyulu tabaklara transfer edildi. Yüksek RIPK4 ekspresyonu gözlenen klonlar T25 flasklara alınarak çoğaltıldı ve donduruldu.

3.2.12. Sürekli Eksprese Ettirilen Proteinlerin İmmünoblot ile Analizi

3.2.12.1. Protein İzolasyonu

RIPK4'ü sürekli eksprese eden keratinosit hücrelerinden her bir koloni için 5x10⁵ hücre pelleti alınarak -80 °C'de saklandı. Protein analizi öncesinde örnekler buza alınarak, her birine 150 µL TNTE patlatma tamponu (liziz buffer) eklendi ve buz içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Genomik DNA'nın parçalanması ve proteinin daha iyi çıkartılması için %50 genlikte (amplitude) beş döngü sonikasyon (5 saniye pulse, 20 saniye bekleme) gerçekleştirildi. Sonikasyonun ardından örnekler 4 °C'de 15 000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz ependorf tüplere aktarıldı. Hücre lizatları protein analizleri için SDS-PAGE jeline yüklenerek immünoblot analizi gerçekleştirildi.

3.2.12.2. SDS-PAGE Hazırlanması ve Örneklerin Yürütülmesi

Poliakrilamid jelin hazırlanması için tasarlanmış uzun ve kısa camlar distile su ile yıkandıktan sonra %70'lik etanol ile yıkanarak partikül kalmayacak şekilde temizlendi. Temizlenen camlar jel standı üzerinde uygun pozisyonda yerleştirildi. Hedef proteinin molekül ağırlığına göre %7,5 konsantrasyonda SDS-PAGE ayırma jeli hazırlandı (Tablo 2) ve jel kısa camın üst seviyesinin 1.5-2 cm altına kadar döküldü. Ayırma jelinin hava ile temasını önlemek ve jelin düz şekilde polimerize olmasını sağlamak için ayırma jelinin üzerine izopropanol eklendi ve ayırma jelinin polimerleşmesi için 45-60 dakika beklendi. Bu sürenin sonunda jelin üzerindeki izopropanol dökülerek jelin üst kısmı birkaç defa distile su ile yıkandı. Ardından %5 konsantrasyonda yükleme jeli solüsyonu hazırlandı (Tablo 3)

ve ayırma jelinin üzerine döküldü. İhtiyaca göre 10 veya 15 kuyulu taraklar camlar arasına yerleştirildi ve yükleme jelinin polimerizasyonu için 45-60 dakika beklendi.

Tablo 2. %7,5'luk ayırma jeli içeriği

İçerik	%7,5 (1 mm)
ddH ₂ O	2.73 mL
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.94 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 mL
%10 SDS	0.05 mL
%10 APS	0.05 mL
TEMED	5 µL
Toplam	5 mL

Tablo 3. %5'lik yükleme jeli içeriği

İçerik	1 x (1 mm)
ddH ₂ O	1.57 mL
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.25 mL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.625 mL
10% SDS	0.025 mL
10% APS	0.025 mL
TEMED	1.5 µL
Toplam	2.5 mL

SDS-PAGE analizi için son konsantrasyon 1X olacak şekilde yükleme boyası hücre lizatlarına eklenerek 99 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığında 30 sn maksimum hızda santrifüj edildi. Bu esnada daha önce hazırlanmış olan poliakrilamid jelin tarakları çıkarılarak distile su ile temizlendi ve yükleme standına yerleştirildi. Ardından yükleme standı dikey jel elektroforez tankına yerleştirildi ve SDS-PAGE yürütme solüsyonu tanka eklendi İlk kuyuda 1 µL protein markır (Dual Color Standards) ve diğer kuyulara protein lizatından 15 kuyu için 20 µL 10 kuyu içinse 40 µL'yi geçmeyecek şekilde SDS-poliakrilamid jeline yüklendi. Jel 75 V 15 dakika, ardından 100 V 90-100 dakika yürütüldü.

3.2.12.3. SDS-Poliakrilamid Jelin Nitrosellüloz Membrana Transferi ve Protein Görüntülemesi

SDS-PAGE jeli yürütme sonrası tanktan çıkarıldı ve camlar distile su ile birkaç kez yıkanarak yürütme solüsyonu uzaklaştırıldı. Blotlama için dört adet ince Whatman kâğıdı ve iki adet sünger yatak önceden hazırlanan ve 4 °C’de soğutulan 1X transfer tampon içinde dengelendi. Blotlama kasetinin siyah tarafına (katot) sünger yatak yerleştirildikten sonra üzerine ıslatılan Whatmann kağıtlardan bir tanesi yerleştirildi. Spatula ile camlar dikkatlice birbirinden ayrıldı. Jel kısa cam üzerinde bırakılarak, yükleme jeli spatula ile kesilerek atıldı. Jele uygun büyüklükte 0.45 µm nitroselüloz membran kesildi ve transfer tamponuna alınarak dengelendi. Islatılan ikinci Whatman kâğıdı jeli kaplayacak şekilde jelin üzerine yerleştirildikten sonra dikkatli bir şekilde kaldırılarak camdan ayrıldı ve katot tarafında bulunan sünger ve Whatman’ın üstüne yerleştirildi. Ardından, transfer tamponunda dengelenen nitroselüloz membranı jelin üzerine yerleştirildikten sonra membranın üzerine transfer tamponunda dengelenmiş iki Whatman kâğıdı yerleştirildi. Son olarak sünger yatak yerleştirilerek blotlama kaseti kapatıldı. Blot kaseti cihazının siyahla belirtilen katot kısımları örtüşecek şekilde yerleştirildi. Transfer 100 V’da 1 saat 15 dk gerçekleştirildi.

Transfer sonrası membranın jele bakan kısmı işaretlenerek %0.05’lik Tween 20 içeren TBS (TBST) solüsyonu içerisine alınarak birkaç kez yıkandı. Ardından, bloklama solüsyonu eklendi. Bir saat oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Ardından primer ve sekonder antikor üreten firmaların önerdiği koşullar doğrultusunda membran sırasıyla primer ve HRP-konjuge-sekonder antikorlarla inkübe edildi. Sonrasında TBST yıkama solüsyonu ile membran 5 kez 5’er dakika beklenerek çalkalamalı karıştırıcıda yıkandı. **(Tablo 4)**. Protein görüntülemesi için membran HRP substratı içeren Clarity™ Western ECL kit ile muamele edilerek ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi ile görüntülendi.

Tablo 4. Western blotlama koşulları

Jel konsantrasyonu	%7,5
Membran tipi	Nitroselüloz 0.45 µm
Bloklama	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBST ile oda sıcaklığında 1 saat
Primer (1°) antikorlar	Mouse Monoclonal Anti-FLAG (Sigma F3165) 1:5000 Mouse β- Actin (Abcam, ab184220) 1:5000 Rabbit Polyclonal Anti-α-Tubülin (Abcam, ab15246) 1:5000
1°Antikor inkübasyonu	1x TBST içinde 4 °C’de 12-16 saat
Yıkama	1x TBST ile 5x5 dakika
Sekonder antikorlar (2°)	Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Goat Anti-Mouse IgG-HRP
2°Antikor inkübasyonu	1x TBST içinde 1:5000 oranında oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1x TBST ile 5x5 dakika
Görüntüleme	1 mL Clarity™ Western ECL Substrate (1:1 oranda Luminol Enhancer+Peroksit)

3.2.13. Proteinlerin Hücresel Lokalizasyonlarının İncelenmesi

3.2.13.1. İmmünofloresan Deneylerinde Kullanılacak Lamellerin Hazırlanması

İmmünofloresan deneyleri için, lazer taramalı konfokal mikroskopunda kullanımına uygun lameller kullanıldı. Deney öncesinde lameller tozlardan arındırılmak için asit ile yıkandı. Asit yıkama esnasında lameller önce 90 dakika 0,1 N HCl içerisinde çalkalayıcıda yıkandı. Süre sonunda lameller beş kez distile sudan geçirildi. Son yıkamadan sonra lameller 90 dakika distile su içerisinde çalkalayıcıda yıkanmaya bırakıldı. Son olarak otoklavlanmış distile sudan geçirilen lameller %70’lik alkolden geçirilirdi ve Class II Steril kabin altında kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra lamellerin sağ alt köşeleri numaralandı ve iki saat boyunca UV’ye maruz bırakılarak sterilizasyonları sağlandı.

3.2.13.2. İmmünofloresan Yöntemi

Asitle yıkanmış lameller altı kuyulu tabaklara yerleştirilerek üzerlerine analiz edilecek hücre süspansiyonu eklendi. Ortada toplanmamasına özen gösterilerek inkübatöre kaldırıldı. Flp-In-HaCaT hücrelerinde sürekli olarak eksprese olan RIPK4’ün görüntülenmesi için 24 saat sonra immünofloresan deneyine başlandı. İlk olarak besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı. Hücreleri fikse etmek için kuyulara 1 mL %4 PFA eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında kuyular beş kez üçer dakika bekletilerek PPS ile yıkandı. Hücrelerin membranında delik açmak için, kuyulara %0.2 Triton X-100’den 1 mL konularak beş dakika oda sıcaklığında

inkübe edildi. Permeabilizasyon sonrası, kuyular beş kez üçer dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında lameller 1 mL bloklama solüsyonu (PBS ile hazırlanan %10 Goat Serum) ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer ve sekonder antikörler Tablo 5’te önerilen dilüsyonda bloklama solüsyonu içerisinde hazırlandı. Antikörlerle muamele için parafilm üzerine 100 µL seyreltilmiş primer antikör solüsyonu eklenerek lamellerin hücre bulunan yüzeyleri antikora maruz kalacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde lameller hücre bulunan yüzeyleri yukarıda olacak şekilde tekrar altı kuyulu petrilere alındı ve kuyular beş kez üçer dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası florokrom konjuge sekonder antikörler primer antikörlere benzer şekilde lamellere uygulandı. Sekonder antikörlerin ışığa duyarlı olmalarından ötürü, primer antikordan farklı olarak, süreç esnasında örnekler alüminyum folya ile kaplandı. Sonrasında, partiküllerden %70 alkol kullanılarak arındırılmış lam üzerine bir damla DABCO-DAPI kapatma solüsyonu damlatıldı ve hücrelerin bulunduğu lamelin yüzeyi DABCO solüsyonunun üzerine kapatıldı ve oda sıcaklığında, karanlıkta gece boyu kurumaya bırakıldı. İnkübasyon sonunda preparat şeffaf oje ile sabitlendi ve lazer taramalı konfokal mikroskobunda analiz edildi.

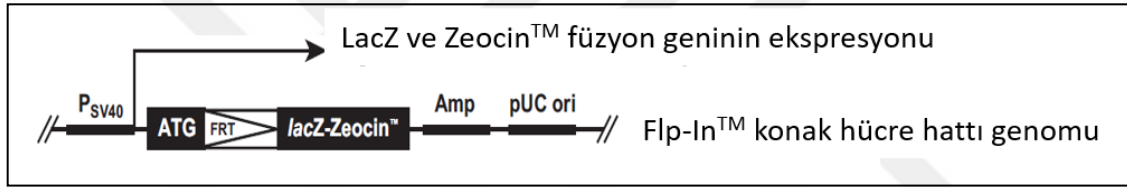
Tablo 5 . İmmüno Floresan koşulları.

Fiksasyon	%4 Paraformaldehit oda sıcaklığında 10 dakika
Permeabilizasyon	%0,2 Triton-X-100 (PBS içinde) oda sıcaklığında 5 dakika
Bloklama	%10 Goat Serum (PBS içinde)
Primer antikörler	Mouse Monoclonal Anti-FLAG (Sigma F3165) 1:500 Bloklama solüsyonunda hazırlanır. Oda sıcaklığında etiketli proteinler için 1 saat / 4 °C’de endojen proteinler için 16 saat
Yıkama	PBS ile 5 kez
Sekonder antikörler	Goat-Anti-Mouse IgG H&L (Cy3) (ab97035) 1:500 Oda sıcaklığında Bloklama solüsyonunda 1 saat
Yıkama	PBS ile 5 kez
Kapatma Medyumu	Prolong GOLD Antifade Mounting Media with DAPI (Thermo, 36935).

4. BULGULAR

4.1. HaCaT Hücrelerinin Genomuna FRT Kaseti Yerleştirilmesi

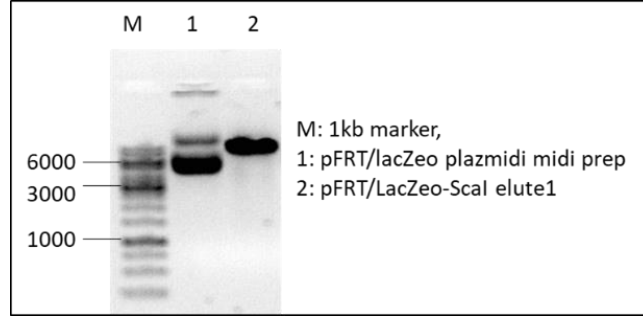
Bu çalışmada RIPK4'ü kalıcı olarak sürekli eksprese eden keratinosit hücre hattı oluşturmak amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Flp-InTM (Invitrogen/ Thermofisher Scientific) sistemi kullanılmıştır. İlk aşamada FRT kasetini içeren vektör (pFRT/LacZeo) linearize edilerek HaCaT hücre hattına transfecte edildi. FRT kasetini genomuna entegre eden klonlar ZeosinTM antibiyotiği ile seçildi. FRT kasetinin gen ekspresyon açısından aktif bir bölgeye tek kopya olarak yerleştiği klon belirlendi. Böylece, genomunda gen ekspresyon açısından aktif bölgesinde tek kopya FRT kaseti bulunduran ve bu kaset aracılığıyla istenilen hedef geni sürekli eksprese etmeye hazır Flp-In-HaCaT hücresi oluşturulmuş oldu. FRT kasetinin konak hücrenin genomundaki yerleşimi Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. FRT kasetinin konak hücre genomundaki yerleşimi (Flp-InTM Invitrogen'den 81)

4.1.1. FRT Kaset İçeren pFRT/LacZeo Vektörünün Linearize Edilmesi

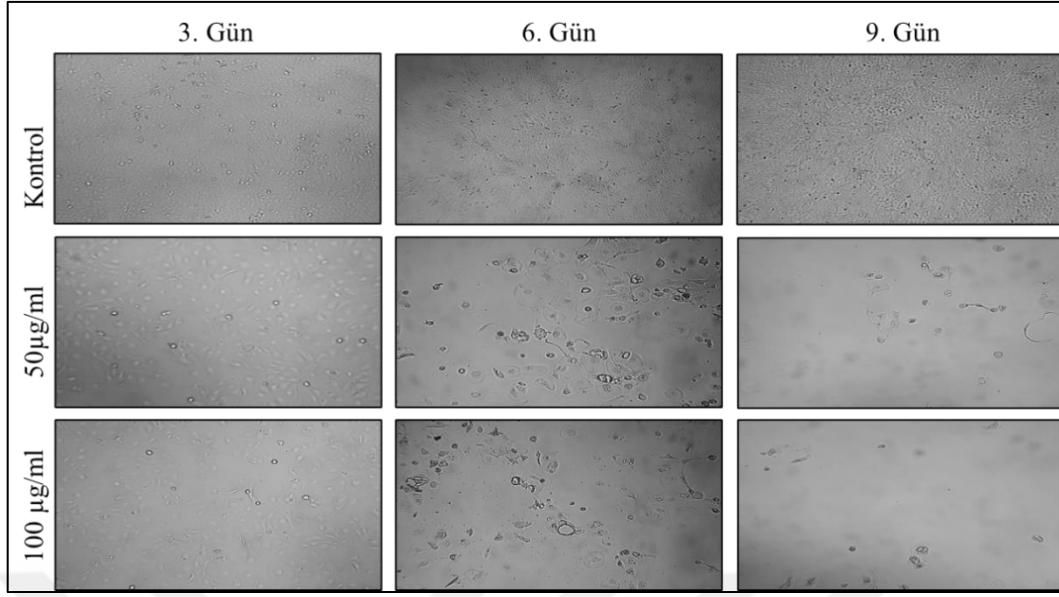
İlk olarak pFRT/LacZeo vektörü bakteride çoğaltıldı ve endotoksin içermeyen Midi Prep kiti ile izole edildi. Üretici firması kalıcı transfeksiyon verimi için vektörün linearize edilmesini önerdiğinden transfeksiyon öncesi pFRT/LacZeo vektörü (8106 bç) ScaI enzimi ile kesildi. Kesim sonrası linearize plazmit, PCR temizleme kiti kullanılarak temizlendi ve agaroz jelde görüntülendi (Resim 2).



Resim 2. pFRT/*LacZeo*'nun vektörünün enzimle kesilmemiş (Kuyu 1) ve *Scal* enzimiyle kesildikten sonra saflaştırılmış hali (Kuyu 2).

4.1.2. Zeosin Direnç Geni Taşıyan pFRT/LacZeo Vektörünün HaCaT Hücrelerine Entegrasyonun Seçilimi için ZeosinTM Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Transfeksiyon sonrası genomuna FRT kaseti yerleşen hücrelerin seçilimi, pFRT/*LacZeo* vektöründe ZeosinTM direnç geni bulunduğundan, ZeosinTM antibiyotiği ile sağlanır. İlk olarak entegrasyon seçilimi için normal HaCaT hücrelerinde uygun ZeosinTM doz belirlenmeye çalışıldı. 50 ve 100 µg/mL ZeosinTM verilen HaCaT hücreleri, antibiyotik uygulanmayan kontrol hücrelerine göre morfolojik farklılıklar gösterdi. Literatürle uyumlu şekilde ZeosinTM verilen hücrelerde sitomegalovirüs etkilerine benzer şekilde hücre boyutlarında büyük artış, anormal hücre şekli, sitoplazmada endoplazmik retikulum ve golgi aygıtının veya yapı iskele proteinlerinin parçalanmasının göstergesi olan büyük boş veziküllerin varlığı gözlemlendi (105). FRT kaseti yerleşen hücreler dışındaki hücreler tamamen parçalandı ve sadece hücre kalıntıları kaldı (Resim 3). 100-600 µg/mL ZeosinTM dozu hücrelere toksik geldiği için deney sonlanmadan tüm hücreler öldü. Dokuz gün süren deney sonunda hücrelerin %95'ini öldüren optimal doz 100 µg/mL olarak belirlendi.



Resim 3: ZeosinTM muamelesi sonrasında farklı günlerde HaCaT hücrelerinin morfolojileri

4.1.3. FRT Kaset İçeren Linearize pFRT/LacZeo Vektörünün Konak HaCaT Hücrelerine Transfeksiyonu

HaCaT hücrelerinin düşük transfeksiyon veriminden dolayı deney esnasında Lipofectamine 2000, LipofectmaxTM ve Polyethylenimine (PEI) gibi farklı DNA transfeksiyon ajanları deneye dahil edildi. PEI transfeksiyon ajanının diğer iki ajana göre daha verimli olduğu gözlemlendi. Ancak diğer iki ajan da sorunsuz çalıştı.

100 µg/mL ile başlanan ZeosinTM doz uygulamasında koloni elde edilemeyince sonraki denemede doz 50 µg/mL'ye düşürüldü. İki haftanın sonunda koloniler görülmeye başlandı (Resim 4). Zeosine direnç gösteren toplam 37 klon yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra sırasıyla 12 ve altı kuyulu tabaklara sonrasında da T25 flasklara alınarak çoğaltıldı ve sonraki analizler için donduruldu.

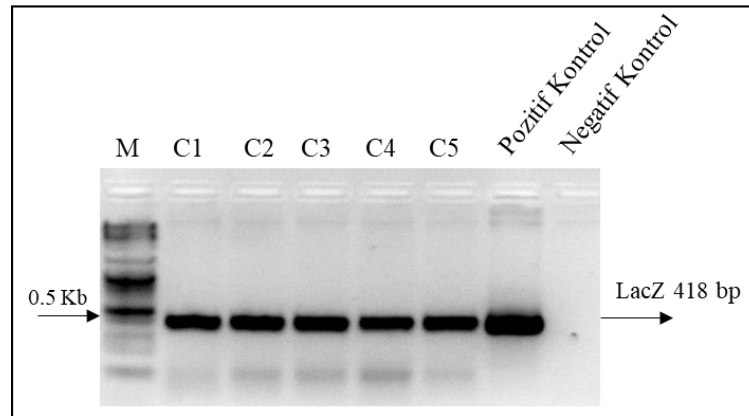


Resim 4: Transfeksiyondan sonra 2 hafta boyunca Zeosin™ verilen hücrelerde oluşan Zeosin-dirençli koloni.

4.1.4. Genomuna FRT Kaset Yerleşen Klonlarda FRT Kasetinin PCR ile Doğrulanması

Seçilen ve çoğaltılan Zeosin-dirençli 37 aday klonda FRT kasetinin yerleşimi kasetin içinde bulunan *LacZ* genine özgü tasarlanmış primerler (1662 ileri - 1663 geri) (Tablo 1) kullanılarak PCR ile de doğrulandı.

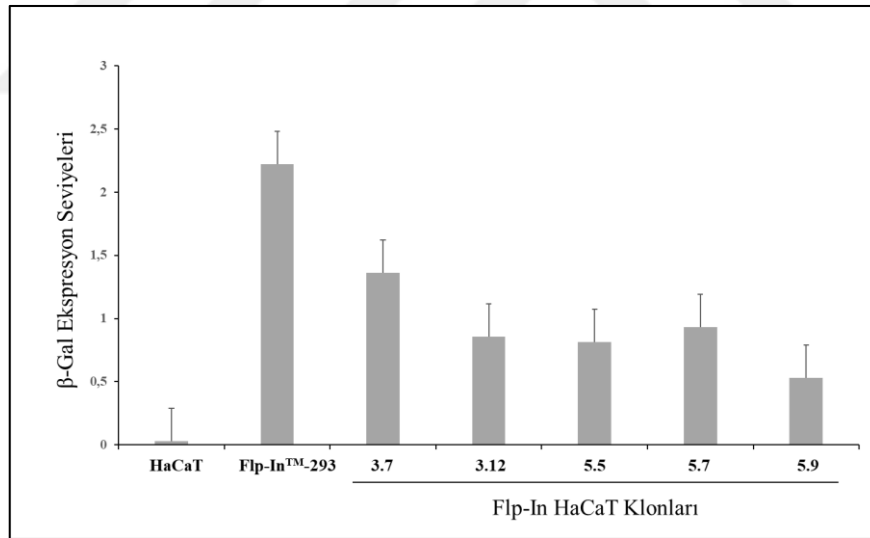
LacZ genine ait 418 baz çiftlik PCR ürünü test edilen beş klonda ve pFRT/*LacZeo*'nun kullanıldığı pozitif kontrolde görüldü. Bu da FRT kasetinin HaCaT hücre genomuna girmiş olduğunu gösterdi (Resim 5). Elde edilen tüm klonlarda FRT kasetinin varlığı PCR ile doğrulandı.



Resim 5. FRT kaseti yerleştirilen klonlarda *LacZ* geninin PCR ile test edilmesi. M: 100 bp markır. C1-C5: rastgele seçilen beş klon. Pozitif kontrol: pFRT/*LacZeo* vektörü. Negatif kontrol: kalıp DNA yok.

4.1.5. Genomuna FRT Kaseti Giren Klonların Transkripsiyonel Olarak Aktif Bölgeye Yerleşiminin Analizi

FRT kaseti konak hücrenin genomuna rastgele bir şekilde girdiğinden, ileriki aşamada FRT kasetine yerleştirilecek genin verimli bir şekilde eksprese olması için bu bölgenin transkripsiyonel olarak aktif olması gerekmektedir (88). FRT kasetinin transkripsiyonel olarak aktif bir bölgeye yerleşiminin analizi için Flp-In-HaCaT klonlarından elde edilen lizatta *Lac Z* gen ürünü olan β -Galaktosidaz ekspresyonu analiz edildi. Deneyde β -galaktosidaz ekspresyonunun kantitatif ölçümüne olanak sağlayan β -galaktosidaz substratı ONPG kullanıldı. β -galaktosidaz'ın ONPG'yi parçalamasına bağlı oluşan renk değişimi OD₄₂₀ nm dalga boyunda ölçüldü. Pozitif kontrol olarak genomunda tek bir FRT kaseti, dolayısıyla *LacZ* geni olan Flp-InTM-293 hücreleri kullanıldı. Zeosin dirençli 37 klonun analizi sonrasında β -galaktosidaz ekspresyonu en yüksek olan beş klon belirlendi (Resim 6). En yüksek ekspresyonlar sırasıyla; 3.7, 5.7, 3.12, 5.5 ve 5.9 olarak isimlendirilen Flp-In-HaCaT klonlarında görüldü.



Resim 6. FRT kaseti yerleştirilen klonlarda *LacZ* gen ekspresyonunun β -galaktosidaz substratı olan ONPG kullanılarak kantite edilmesi. Pozitif kontrol olarak Flp-InTM-293 hücreleri kullanıldı. Negatif kontrol olarak genomuna FRT kaseti yerleştirilmemiş HaCaT hücre hattı kullanıldı.

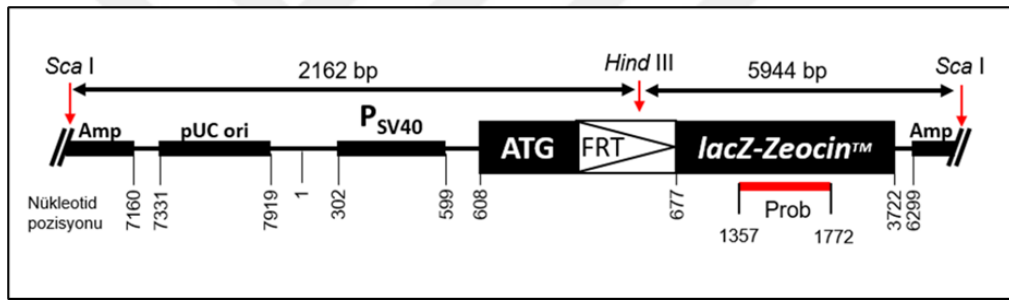
4.1.6. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarda FRT Kaseti Kopya Sayısının Belirlenmesi

pFRT/*LacZeo* vektörünün genom içine entegrasyonu rastgele olmaktadır. Genomda FRT kasetinin birden fazla yere entegre olması FRT kasetleri arasında olası bir

rekombinasyonu tetikleyebileceğinden üretici firma tarafından FRT kasetinin genomda tek bir yere yerleştiği klonun seçilerek kullanılması önerilmektedir. FRT kaseti kopya sayısının belirlenmesi için ilk olarak Southern blot yöntemi denenmiştir. Southern blot yönteminin beklenen sonucu vermemesi üzerine tez önerisinde B planı olarak sunulan real time PCR ile kopya sayısının belirlenmesi yaklaşımlarına başvurulmuştur.

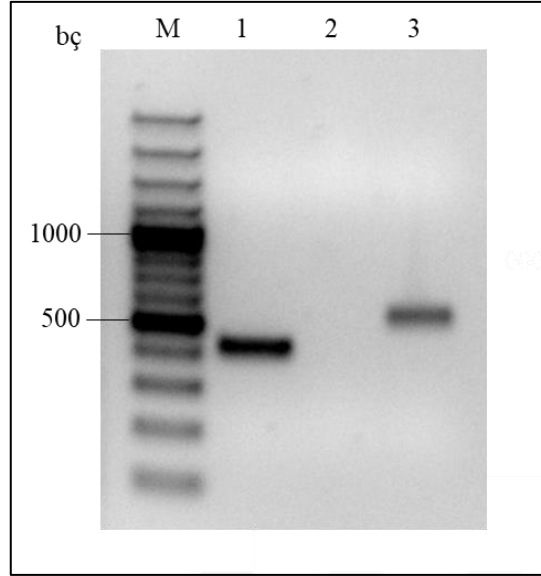
4.1.6.1. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarında FRT Kaseti Kopya Sayısının Southern Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Klonlardaki FRT kaset sayısının belirlenmesi için DIG işaretli LacZ probunun kullanıldığı Southern blot yöntemine başvuruldu. Southern blot ile tek kasete sahip klonların seçilimi için *LacZ* genine özgü prob tasarlandı. Tasarlanan probun kaset üzerindeki yerleşimi Şeki 13’de gösterilmiştir.



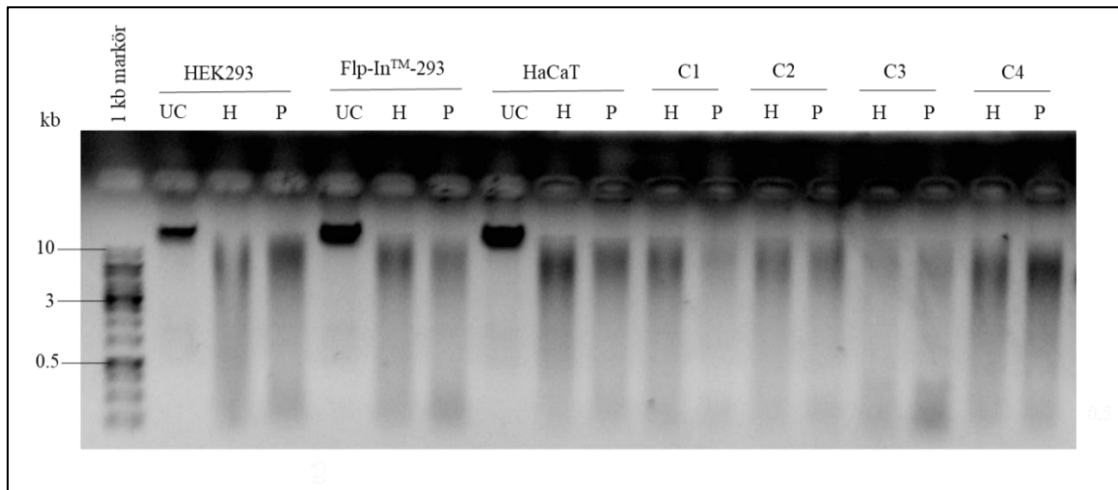
Şekil 13. DIG işaretli LacZ probunun pFRT/LacZeo vektörü üzerindeki yerleşimi

Probu Digoksijenin ile işaretlemek için PCR DIG Probe Synthesis Kiti kullanıldı. Kısaca, bu deneyde DIG işaretlenmiş dUTP’nin olduğu dNTP karışımı kullanılarak pFRT/LacZeo vektöründen 1662-63 *LacZ* ileri ve geri primerleriyle (Tablo 1) PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Deneye işaretli olmayan dNTP’lerin olduğu kondisyon da kontrol olarak dahil edildi. PCR reaksiyon hacminin onda biri %2’lik agaroz jele yüklenerek amplifikasyon analiz edildi (Resim 7). DIG ile işaretlenmiş *Lac Z* probu (kuyu 3) DIG’ile işaretlenmesinden ötürü ağırlaştığından dolayı jelde işaretlenmemiş proba (kuyu 1) kıyasla daha geriden yürüdü.



Resim 7. *LacZ* probunun DIG ile işaretlenmesi. 1: İşaretlenmemiş kontrol prob, 2: Vektör olmayan negatif kontrol, 3: DIG ile işaretlenmiş prob.

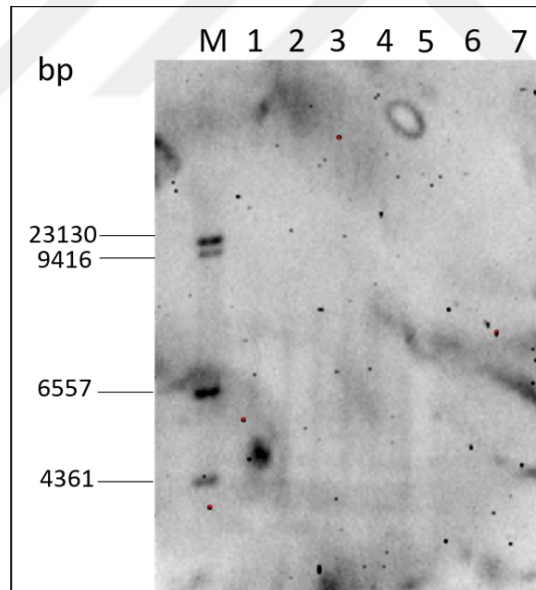
Sonrasında Flp-In-HaCaT klonlarından izole edilen genomik DNA'lar, HindIII ile kesildi ve etanol presipitasyon ile konsantre edildi. Deneye dört Flp-In-HaCaT klonunun yanı sıra negatif ve pozitif kontrol olarak FRT kaseti olmayan HaCaT, HEK293 hücre hatları ve FRT kasetinin genomunda tek bir yere girdiği bilinen ticari Flp-InTM-293 hücre hattı da dahil edildi. Enzim kesim reaksiyonu %0.8'lik agaroz jele yüklendi (Resim 8).



Resim 8. Genomik DNA'nın HindIII ile kesiminin kontrolü. M: 1kb markır, UC: Uncut (kesilmemiş DNA), H: HindIII kesimi, P: Kesim sonrası saflaştırma.

FRT kaseti üzerinde HindIII kesim bölgesi Resim 7’de gösterildiği üzere *LacZ*-Zeosin füzyon geninin önündedir. pFRT/*LacZeo* vektörü ScaI enzimi ile linearize edildikten sonra genoma entegre olduğundan, HindIII kesimi sonrasında *LacZ* probunun bağlanacağı fragmanların 5944 baz çiftinin üzerinde olması beklenir. Bundan dolayı Southern blot için kullanılacak EtBr içermeyen agaroz jelin yanında fragmanların jelde ilerlemesini takip edebilmek için aynı boyutta ve konsantrasyonda hazırlanan EtBr içeren agaroz jelde 1 kb DNA markırı yürütüldü. Bu sayede 5944 baz çifti ve üzeri fragmanların jelin ortasının biraz altında kalmasına özen gösterilerek yürütülme süresi belirlendi. DNA’lar yürütülürken DIG işaretli markır referans olarak kullanıldı.

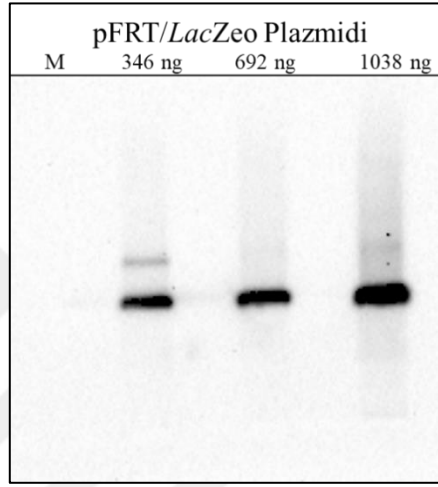
Probun genoma bağlanmasını görüntülemek için DIG işaretli probu tanıyan anti-DIG alkalin fosfataz antikorunun ve alkalin fosfatazın kemilüminesans substratının bulunduğu DIG Luminescent Detection Kit kullanıldı. Protokol üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi ve membran kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi (Resim 9).



Resim 9. Southern blot membran görüntülemesi. M: DIG işaretli markır, 1: HaCaT, 2: HEK293, 3: Flp-InTM 293, 4,5,6,7: Flp-In-HaCaT klonları.

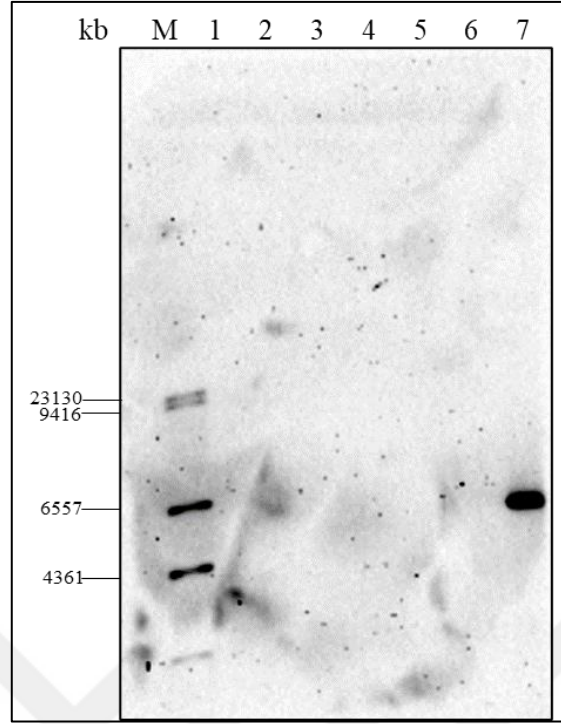
Deney sonucunda, kullanılan DIG işaretli markırı görebilmemiz transferin olduğunu, DIG’e özgü antikorun ve antikora konjuge alkalin fosfatazın ve substratın çalıştığını gösterdi. Bununla birlikte çalıştığımız örneklerde beklenen 5944 baz çiftinin üzerinde bir bant görülmedi.

Bir sonraki denemede LacZ probu için uyguladığımız Southern blot deney koşullarını doğrulamak amacıyla HindIII ile linearize edilen pFRT/LacZeo vektöründen farklı konsantrasyonlarda (346, 692 ve 1038 ng) kullanılarak Southern blot deneyi tekrarlandı. Deney sonucunda LacZ probunun vektörde bulunan FRT kasetine bağlanabildiği gösterildi (Resim 10). Bu kontrol ile LacZ probu için uygulanan koşulların uygunluğu doğrulandı. Deneyde jele yüklenen vektör miktarından ötürü sinyalin çok yüksek olması markırın görüntülenmesini engelledi.



Resim 10. Farklı miktarlarda pFRT/LacZeo kullanılarak LacZ prob bağlanma ve görüntülenme koşullarının test edilmesi.

Bir sonraki aşamada tüm koşullar bir önceki deneyle aynı tutularak farklı genomik DNA miktarları kullanıldı. Deneyde HindIII ile linearize edilmiş 4, 5, 8, 11 ve 20 µg genomik DNA miktarları denendi. Ancak yine herhangi bir fragmana rastlanmadı (Resim 11). Southern blot yöntemi ile ticari Flp-In™ 293 hücre hattında bile sonuç alınamaması, öngörülen sürede iş paketinin gerçekleştirilememesi ve kullanılan malzeme ve kitlerin azalmasından dolayı alternatif B planına geçildi.



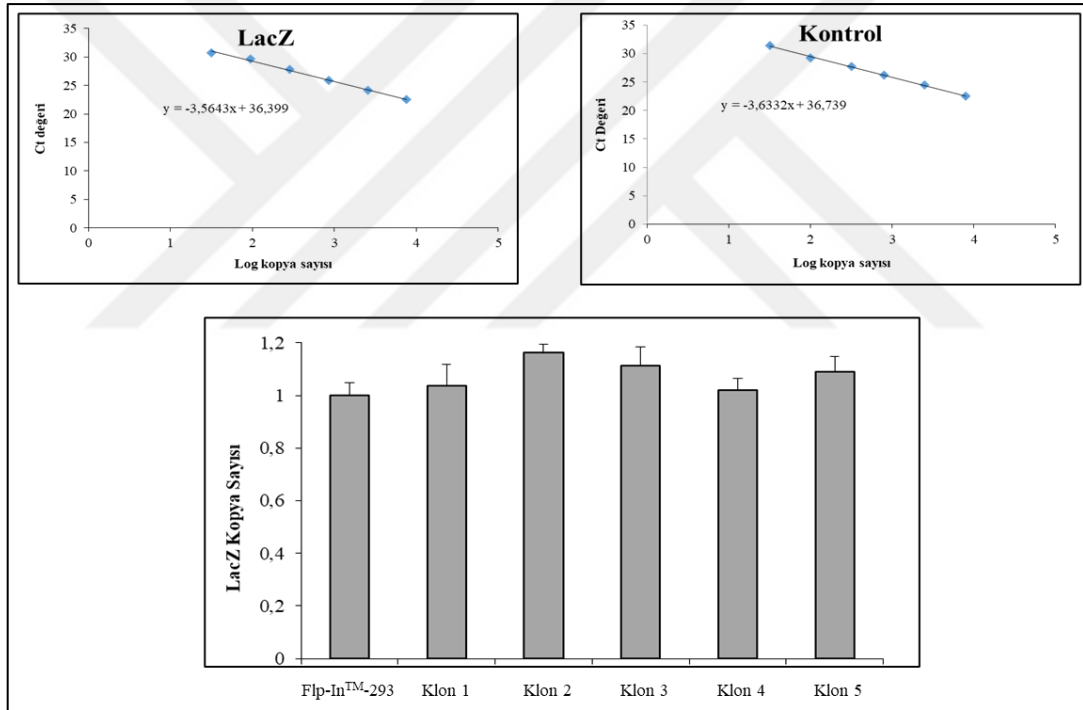
Resim 11. Southern blot membran görüntülenmesi. M: DIG işaretli markır, 1: HaCaT, 2: Flp-InTM 293, 3, 4, 5, 6: Flp-In-HaCaT klonları (sırasıyla 4.5 µg, 8 µg, 11 µg, 20 µg). 7: pozitif kontrol (pFRT/LacZeo).

4.1.6.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarda FRT Kaseti Kopya Sayısının RT-PCR ile Belirlenmesi

Flp-In-HaCaT hücrelerinde FRT kasetinin genomda tek bir yere girdiğinin doğrulanması için alternatif B-planı olarak Yun J.J ve grubunun çalışmasında genomik DNA'da kopya sayısını bulmak için kullanılan kantitatif Real-Time PCR sistemi uygulanmıştır (103).

Flp-InTM-293 ve en yüksek LacZ ekspresyonunu veren Flp-In-HaCaT klonlarından (3.7, 5.7, 3.12, 5.5, 5.9) (Resim 6) DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izole edildi. Standart eğri hazırlamak için Flp-InTM-293 hücrelerine ait genomik DNA'dan seri dilüsyonlar (9, 3, 1, 0.3 ve 0.1 ng/rxn olacak şekilde) yapıldı. İnternal kontrol olarak genomda tek kopya olarak bulunan ve elimizde RT-PCR için uygun primerleri bulunan PLAGL2 geni kullanıldı. LacZ (1736 ileri ve 1737geri) ve PLAGL2 (1654 ileri ve 1055 geri) (Tablo 1) için SYBR Green kiti kullanılarak ayrı ayrı standart eğriler oluşturuldu. Standart eğrilerinden eğim değerleri LacZ ve PLAGL2 için sırasıyla -3,56 ve -3,63 olarak belirlendi (Resim 13). Standart eğri eğimlerinin kabul edilebilirlik aralığı (-2,92) -(-3,92) olarak

belirtilmiştir. Bu aralık $100 \pm 20\%$ PCR verim aralığına denk gelmektedir (Yun J.J ve grubu). Deneyde elde edilen eğimlere denk gelen amplifikasyon verimi kabul edilebilirlik aralığında olduğundan, sırasıyla %91 ve %89 olarak hesaplandı, analizlere devam edildi. Flp-InTM-293 ve Flp-In-HaCaT aday klonlarından elde edilen genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen real-time PCR'dan elde edilen Ct değerlerine denk gelen LacZ kopya sayıları standart eğri denklemi kullanılarak bulundu. Genomunda tek kopya FRT kaseti dolayısıyla *LacZ* geni olan Flp-InTM 293 hücreleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Standart eğri denklemi kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda yüksek *LacZ* ekspresyonu gösteren Flp-In-HaCaT klonlarında da Flp-InTM 293'in hücrelerinde olduğu gibi FRT kasetinin genomda tek bir yere girdiği gösterilmiş oldu (Resim 12).



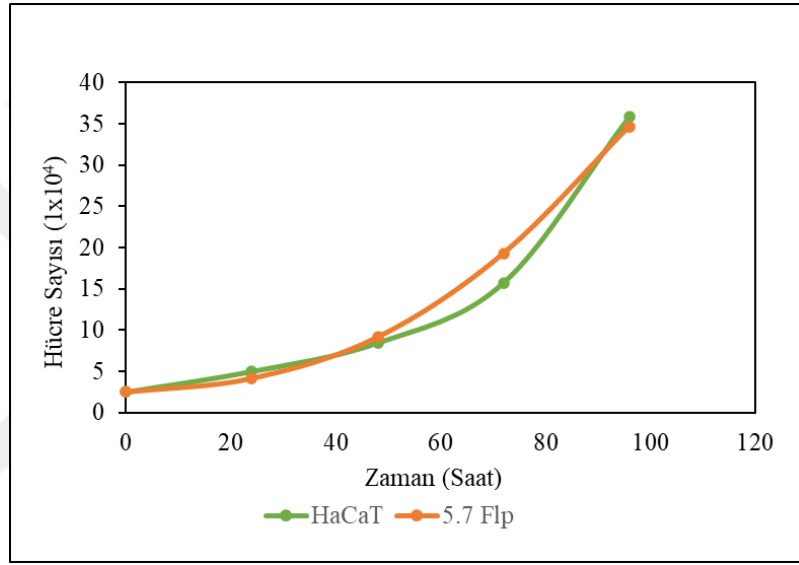
Resim 12. Flp-In-HaCaT klonlarında FRT kaseti kopya sayısının kantitatif real time PCR ile belirlenmesi.

4.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının Karakterizasyonu

Genomuna FRT kaseti yerleştirilmiş HaCaT hücre hatı, normal hücre hattıyla karşılaştırılarak FRT kasetinin hücrenin temel fonksiyonlarını etkileyip etkilemediği araştırıldı. Bu bağlamda hücrelerin büyüme eğrileri ve hücre döngüleri sırasıyla ikilenme zaman analizi ve akım sitometrisi kullanılarak incelendi.

4.2.1. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının İkilenme Zamanlarının Analizi

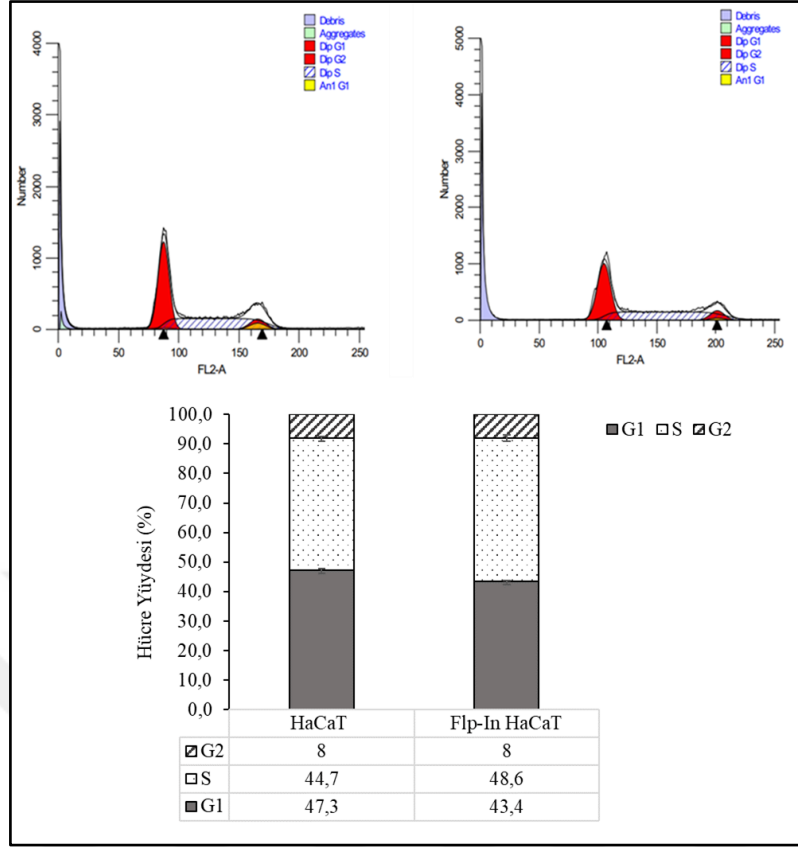
Çalışmaya, hücrelerin büyüme karakteristiklerini belirlemek için hücrelerin bölünerek sayılarını iki katına çıkardıkları ikilenme zamanı tespiti ile başlandı. Hücrelerin ikilenme zamanının tespiti için 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde akım sitometrisi kullanılarak hücre sayımı yapıldı ve büyüme eğrileri çizildi. Hücre ikiye katlanma zamanının hesaplanması için 'cell doubling time calculator'(<https://doubling-time.com/compute.php>) programı kullanıldı. İkilenme zamanı HaCaT hücre hattında 24.48 saat, Flp-In-HaCaT hücre hattında ise 24.72 saat olarak belirlendi (Resim 13).



Resim 13. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri. Yeşil: HaCaT kontrol Turuncu: Flp-In-HaCaT.

4.2.2. Oluşturulan Flp-In-HaCaT Klonlarının Hücre Döngüsü Analizi

Keratinosit hücrelerinin genomuna FRT kasetinin yerleştirilmesinin hücre döngüsünün ilerlemesi üzerine etkisinin belirlenmesi için Flp-In-HaCaT hücre hattı kontrol HaCaT ile karşılaştırılarak hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. PI/RNase Staining Buffer ile boyanan hücreler akış sitometrisi kullanılarak BD Accuri C6 Plus ve ModFit LT™ yazılımlarıyla analiz edildi. Kontrol HaCaT ve Flp-In-HaCaT hücre hattı Student T Testi ile analiz edildi ve aralarında anlamlı bir fark görülmedi (Resim14).

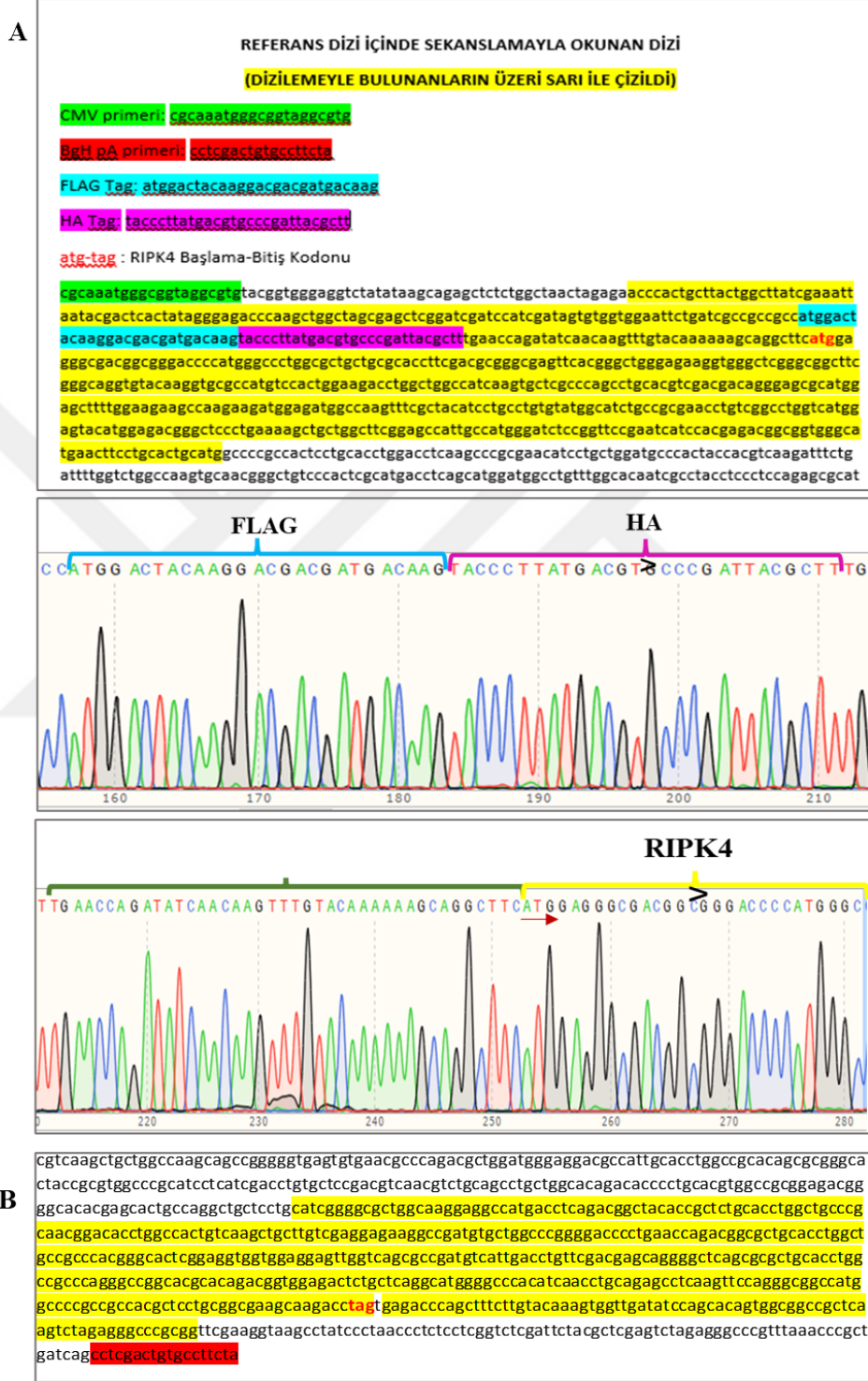


Resim 14. HaCaT ve Flp-In-HaCaT klonlarının hücre döngüsü analizi

4.3. RIPK4'ün pFRT/DEST/FLAG/HA Vektörüne Klonlanması

Tez danışmanım Tıbbi Biyoloji Ana bilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tuba DİNÇER'in yürütücüsü olduğu, benim de bursiyer olarak yer aldığım "PLAGL2'nin Epidermal Farklılaşmadaki Rolü" adlı 118Z124 no'lu TÜBİTAK projesi'nin ikinci iş paketi epidermal farklılaşmada kilit bir rolü olduğu bilinen RIPK4'ün HaCaT hücre hattında sürekli olarak eksprese ettirilmesini içermektedir. Bu kapsamda, Flp-In-HaCaT hücreleri oluşturulduktan sonraki aşamada RIPK4'ün sürekli ekspresyonu için FRT kasetine *RIPK4* geninin yerleştirilmesi çalışmalarına başlandı. Bu hedefe yönelik olarak ilk etapta RIPK4 proteinini kodlayan açık okuma çerçevesi pFRT/DEST/FLAG/HA Gateway klonlama vektörüne rekombinasyona dayalı Gateway klonlama sistemi kullanılarak yerleştirildi. Gateway klonlama sisteminde ilk olarak istenilen gen giriş vektörüne BP reaksiyonu ile aktarılır. Sonrasında da bu vektörden ekspresyon vektörüne LR reaksiyonu ile transfer edilir. RIPK4 giriş klonu (Entry 13) önceki çalışmalar kapsamında hazırlanmıştı. Bu giriş klonu kullanılarak LR reaksiyonu ile *RIPK4* açık okuma çerçevesi, pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonlandı. Bakteriye transformasyon sonrasında elde edilen klonlarda RIPK4

kodlayan gen dizisinin varlığı, Sanger dizileme ile 1636 CMV ileri ve 1637 BGH geri primerleri (Tablo 1) kullanılarak doğrulandı (Resim 15).

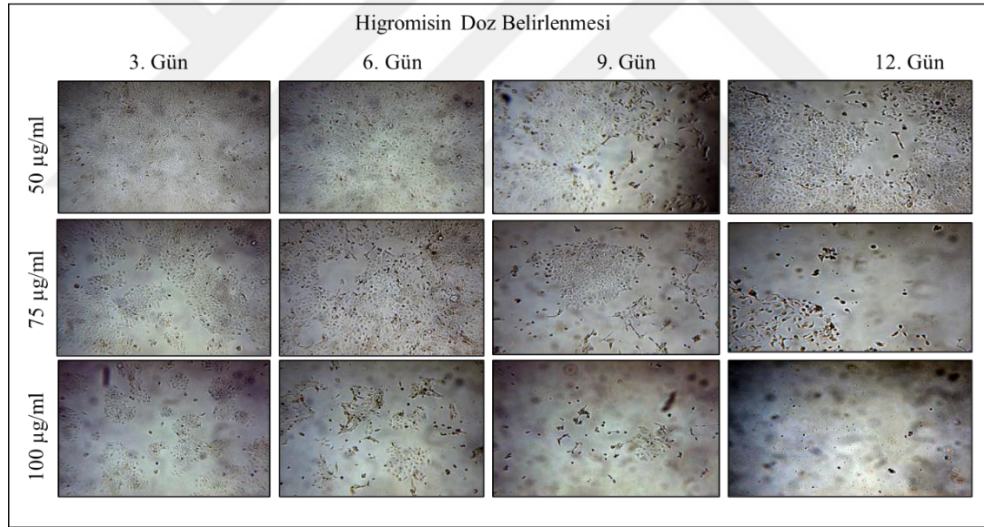


Resim 15. pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonlanan RIPK4 açık okuma çerçevesinin dizileme reaksiyonu ile doğrulanması. A: 1636 CMV ileri primeriyle dizileme reaksiyonu sonucu, B: 1637 BGH geri primeriyle dizileme reaksiyonu sonucu.

4.4. Flp-In-RIPK4 Hücrelerinin Oluşturulması

4.4.1. Higromisin Direnç Geni Taşıyan Vektörün Flp-In-HaCaT Hücrelerine Entegrasyonunun Seçiliminde Kullanılacak HigromisinTM Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Transfeksiyon sonrası genomuna RIPK4'ü klonladığımız FRT içeren ekspresyon vektörünü genomuna entegre eden Flp-In-HaCaT hücrelerin seçilimi, vektörde Higromisin direnç geni bulunduğundan Higromisin antibiyotiği ile sağlanır. RIPK4'ü FRT kasetine yerleştiği hücrelerin belirlenmesi için ilk olarak Flp-In-HaCaT hücrelerinin seçiliminde kullanılacak optimal doz analiz edildi. Resim 16'da 50, 75 ve 100 µg/mL HigromisinTM verilen HaCaT hücrelerinin, 12 gün içerisindeki morfolojik farklılıkları görülmektedir. Sonuçlara göre hücrelerin yaklaşık %95'ini öldüren 100 µg/mL dozun vektörün seçiliminde kullanılmasına karar verilmiştir.



Resim 16. HigromisinTM muamelesi sonrasında farklı günlerde HaCaT hücrelerinin morfolojileri.

4.4.2. Flp-In-HaCaT Hücrelerine pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4 Kalıcı Transfeksiyonu

RIPK4'ü keratinositlerde kalıcı olarak sürekli eksprese ettirmek için FRT kaseti içeren pFRT/DEST/FLAG/HA ekspresyon vektörüne klonlanan RIPK4 (pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4) ve FLP rekombinazı sürekli eksprese eden pOG44 vektörleri daha evvel FRT kaseti yerleştirilen Flp-In-HaCaT hücrelerine ko-transfekte edildi.

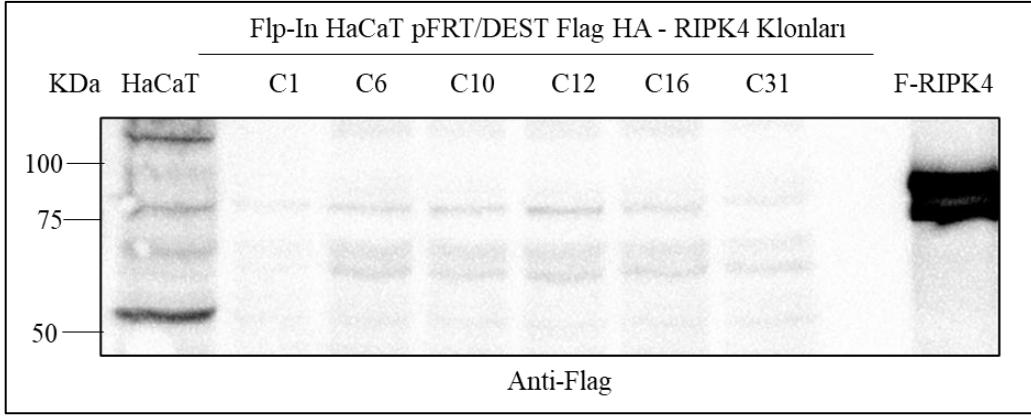
Bu aşamada içerisine tek bir FRT kaseti giren klonlar arasında en yüksek *LacZ* ekspresyonu gösteren 3.7 No'lu klon seçilerek deneyde kullanıldı (Resim 6).

İlk olarak Flp-InTM kataloğunun önerdiği pFRT/DEST/FLAG/HA: pOG44 oranı 1:9 olacak şekilde denendi. İlk denemede hiç klon elde edilemedi. Sonrasında 1:4 oranı kullanılarak gerçekleştirilen ko-transfeksiyon deneylerinde klonlar elde edilmeye başlandı.

Transfeksiyondan sonra 72. saatte hücreler %20 yoğunluğu geçmeyecek şekilde pasajlandı ve hücreler yüzeye yapıştıktan sonra yarısına 100 µg/mL diğer yarısına 50 µg/mL HigromisinTM eklendi. 100 µg/mL HigromisinTM verilen hücreler 9 gün boyunca, 50 µg/mL HigromisinTM verilen hücreler ise 12 gün boyunca 3 günde bir besiyerleri değiştirilerek pasajlandı. Her iki koşul için de koloniler elde edildi ve C1-C31 şeklinde isimlendirildi. Elde edilen klonlar sırasıyla 24, 12, ve altı kuyulu tabaklar ve T25 flasklara aktararak çoğaltıldı ve donduruldu.

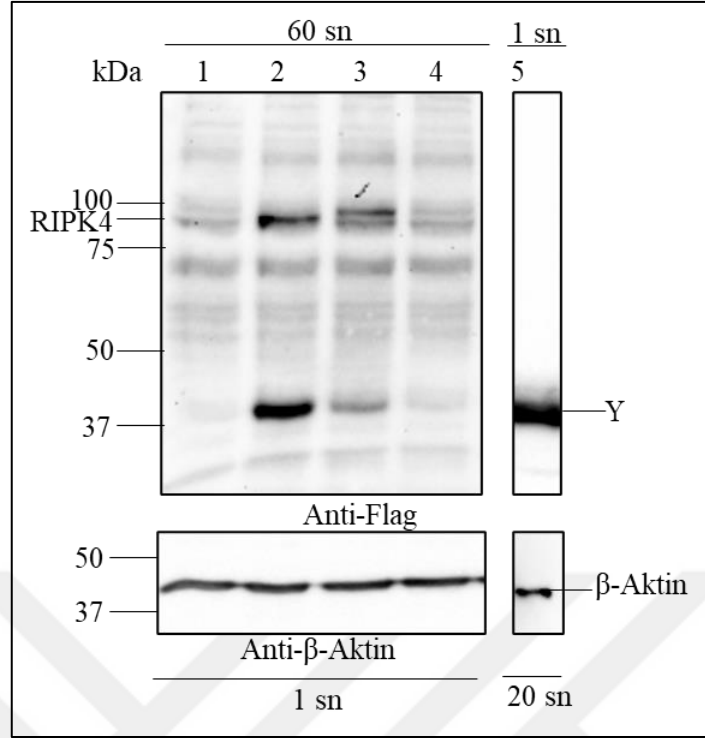
4.4.3. Flp-In-HaCaT Hücrelerinde RIPK4'ün Sürekli Ekspresyonunun İmmünoblot ile Gösterilmesi

Flp-In-HaCaT hücrelerine RIPK4'ün kalıcı transfeksiyonu sonrası HigromisinTM ile seçilen klonlarda RIPK4'ün sürekli ekspresyonunu doğrulamak için klonlardan elde edilen hücre lizatı immünoblot ile analiz edildi. Vektöre klonladığımız genin FLAG ve HA etiketleriyle füzyon oluşturmamasından dolayı ekspresyonu doğrulamak için immünoblot deneyinde primer antikor olarak fare anti-FLAG antikoru kullanıldı. Negatif kontrol olarak HaCaT hücre lizatı, pozitif kontrol olarak da daha evvel HEK293 hücrelerine CaCl₂ yöntemiyle geçici olarak FLAG-RIPK4'ü (pDEST-3X FLAG RIPK4 (Exp190) (ori exp56)) eksprese eden vektörle transfekte ettiğimiz HEK293T hücre lizatı kullanıldı. RIPK4'ün geçici olarak sürekli eksprese edildiği HEK293T lizatında RIPK4 çok fazla eksprese olduğundan Flp-In-HaCaT hücrelerdeki görüntülemeyi baskılayacağı düşünüldü ve Flp-In-HaCaT hücrelerden elde edilen lizata kıyasla daha az miktarda kullanıldı. Flp-In-HaCaT-RIPK4 klonlarında RIPK4'ün ekspresyonu görülmedi (Resim 17).



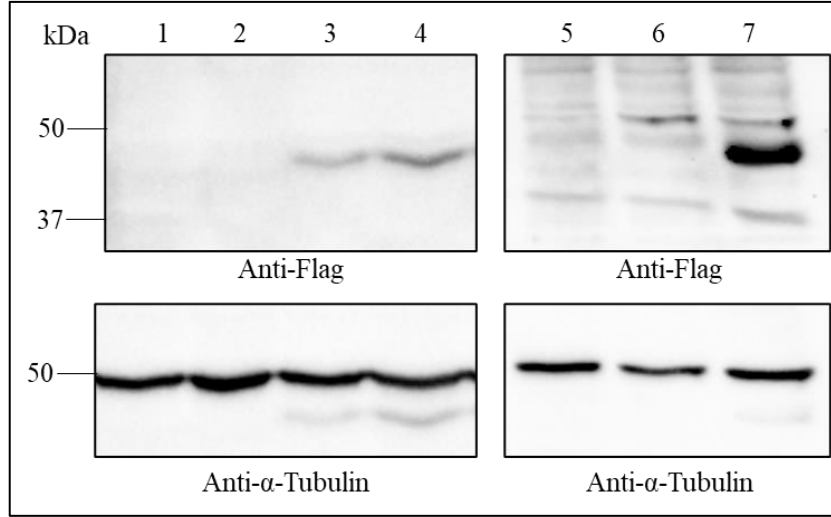
Resim 17. 3.7 Flp-In-HaCaT hücrelerinde RIPK4'ün sürekli ekspresyonunun gösterilmesi

Yaşanan sorunun vektör kaynaklı olup olmadığını anlamak için pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4 klonunun HaCaT hücrelerine geçici transfeksiyon yapılarak ekspresyonu analiz edildi. Bu deneyde pozitif kontrol olarak daha evvel bölümümüzde Flp-InTM-293 hücrelerinde kalıcı ekspresyonları sağlanmış olan pFRT/DEST FLAG HA vektörüne klonlanmış olan FLAG etiketli X geni ve aynı vektörün restriksiyon enzimleri ile klonlamaya uygun formu olan pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmış olan FLAG etiketli Y geninin ekspresyonları da analiz edildi. Ayrıca, RIPK4 proteinin ekspresyon sonrasında proteozomal parçalanmaya yönlendirilme olasılığını dışlamak için pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4 ile transfekte edilen hücreler patlatılmadan önce bir proteozom inhibitörü olan MG132 ile muamele edildi. Resim 18'de de görüldüğü üzere pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonlanan X geni tarafından kodlanan protein (105 kDa) (Resim 18, kuyu 2), ve RIPK4 (95 kDa) (Resim 18, kuyu 3) hücrelerde eksprese olmadı. RIPK4 civarında gözlemlenen koyu bantlar kontrolde de (kuyu 1) görüldüğü için özgün oldukları düşünülmeli. Bunların aksine, pcDNA5/FRT vektörüne klonlanan Y geni ile transfekte edilen hücre lizatından diğer örneklerle göre 4 kat daha az kullanılmasına rağmen ilk saniyede görüntüleme alındı. Proteozom inhibitörünün lizis öncesi besiyerine eklenmesi, pFRT/DEST/FLAG/HA-RIPK4 transfekte hücrelerde RIPK4 ekspresyonunu sağlamadı (Resim 18, kuyu 4). Bu sonuç, pFRT/DEST/FLAG/HA vektörünün HaCaT hücrelerinde ekspreson için uygun olmadığını gösterdi. Bunun üzerine RIPK4 cDNA'sının ekspresyon verimi çok daha iyi olan pcDNA5/FRT vektörüne (Şekil 18, kuyu 5) klonlanarak Flp-In-HaCaT hücrelerine transfeksiyonda kullanılması yaklaşımına gidildi.



Resim 18. HaCaT hücrelerinde gerçekleştirilen geçici transfeksiyonların anti-mouse-FLAG antikoru kullanılarak immünoblot ile analizi. 1: Boş vektör, 2: pFRTDEST FLAG-HA X mutant, 3: pFRTDEST FLAG-HA RIPK4, 4: pFRTDEST FLAG-HA RIPK4 MG-132, 5: pCDNA 5-FRT-Y. 1-4 kuyularda 20 μ L 5. kuyuda 5 μ L lizat kullanıldı. Yükleme kontrolü olarak Beta-Aktin kullanıldı. Protein görüntülenmesi esnasında membranlardan alınan sinyalin süresi şekilde belirtilmiştir.

RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlamadan önce, oluşturulan Flp-In-HaCaT hücrelerinde pcDNA5/FRT-Y vektörü kullanılarak Y proteinin sürekli ekspresyonu test edildi. Bu çalışmada FRT kasetinin transkripsiyonel olarak en aktif bölgeye girdiği gösterilen dört klon (3.7, 3.12, 5.7 ve 5.5) kullanıldı. Klonlar arasında 3.7 ve 5.7'de kalıcı olarak Y'nin sürekli ekspresyonu doğrulanırken 5.5 ve 3.12'de beklenen ekspresyon görülmedi (Resim 19). Bu nedenle pcDNA5/FRT vektörü kullanılarak RIPK4'ü sürekli eksprese ettirmek için transfeksiyonda Flp-In-HaCaT klonları 3.7 ve 5.7'nin kullanılmasına karar verildi.

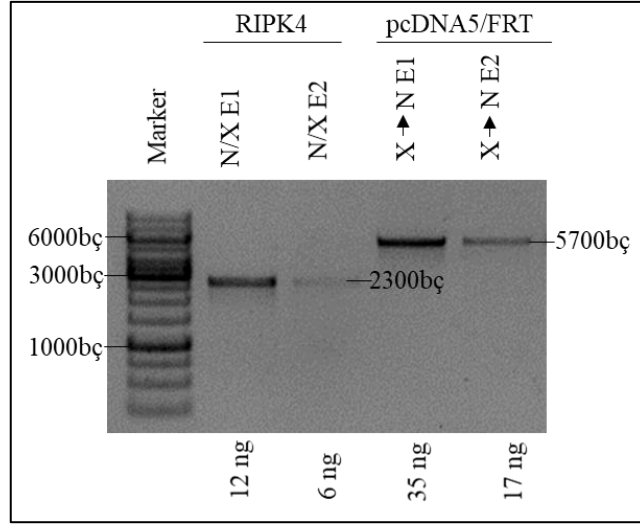


Resim 19. Flp-In-HaCaT klonlarında Y geninin ekspresyonu. Kuyu 1,2 ve 5: Flp-In-HaCaT 5.5-Y, Kuyu 3,4: Flp-In-HaCaT 5.7-Y, Kuyu 6: Flp-In-HaCaT 3.12-Y, Kuyu 7: Flp-In-HaCaT 3.7-Y. Eşit yükleme kontrolü olarak α -Tübülin kullanılmıştır.

4.5. RIPK4'ün pcDNA5/FRT Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

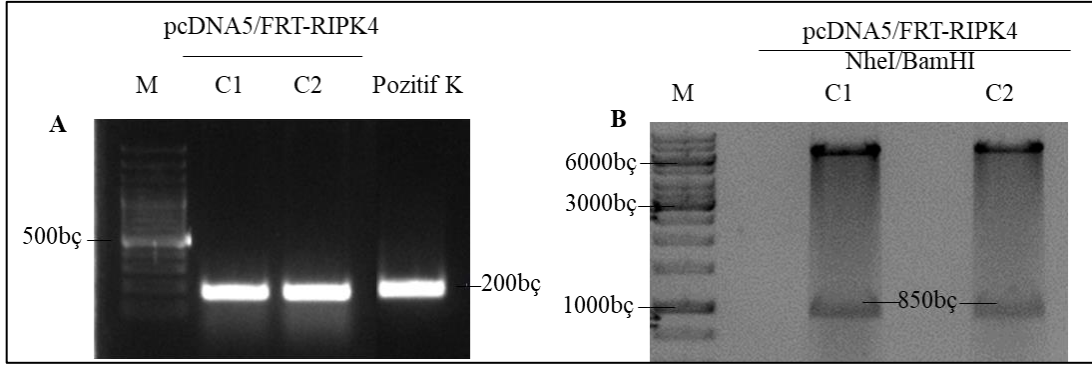
RIPK4 cDNA'sının pcDNA5/FRT vektörüne klonlanması esnasında daha evvel Y geni için kullanılan klonlama yaklaşımı bire bir uygulandı. İlk olarak pcDNA5/FRT vektörüne RIPK4'ü klonlamak için vektörün çoklu klonlama bölgesinde olup RIPK4' ü kesmeyen restriksiyon enzimleri webcutter ile tarandı. Bu listeye göre RIPK4 cDNA'yı kesmeyen ve vektörde kesim bölgeleri olan NheI ve XhoI seçilerek, bahsekonu restriksiyon enzim sekanslarına ve *RIPK4*'ün 5' ve 3' dizilerine komplementer olan primerler tasarlandı. 5'primer aracılığıyla *RIPK4*'ün 5' ucuna NheI enzim dizisinin yanısıra korunmuş KOZAK sekansı (CCACC) ve 3xFLAG epitopu da eklendi.

Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase kiti kullanılarak 1778- ileri ve 1779- geri primerleriyle (Tablo 1) pDEST-3X FLAG RIPK4 (Exp190) vektöründen RIPK4 PCR ile amplifiye edildi. Elde edilen ampikon pJET vektörüne üretici firmanın talimatları doğrultusunda klonlandı Elde edilen klonlar endotoksin içermeyen kit ile izole edildi. RIPK4 inserti NheI-HF (20 U/ μ L) ve XhoI (20 U/ μ L) restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkartıldı. RIPK4'ün klonlanacağı pcDNA5/FRT vektörü ilk olarak XhoI ile ardından NheI enzimi ile kademeli olarak kesildi ve saflaştırıldı. Fragmanlar %0.8'lik agaroz jelde görüntülenerek ligasyon için kantite edildi (Resim 20).



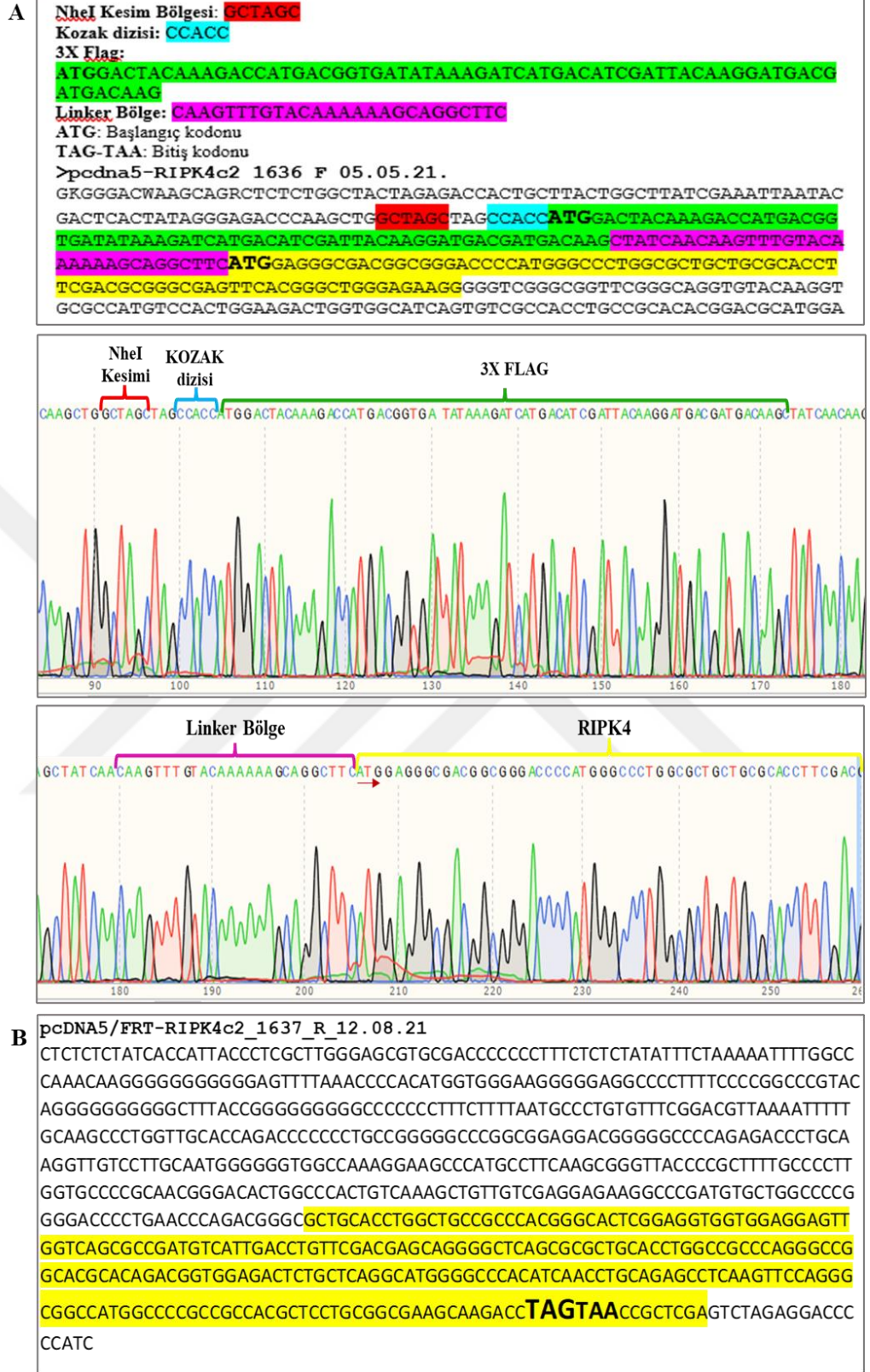
Resim 20. RIPK4 ve pcDNA5/FRT'nin kesim sonrası görüntülenmesi ve ligasyon için kantite edilmesi. (N/X: NheI ve XhoI ile aynı anda kesim, X → N: Önce XhoI ardından NheI ile kademeli kesim)

Ligasyon T4 DNA ligaz ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Ertesi gün ligasyon ürünü *DH5α* suşuna transforme edildi. Elde edilen kolonilerde insertin varlığını doğrulamak için 1149- ileri ve 1150- geri RIPK4 primerleriyle (Tablo 1) koloni PCR yapıldı ve klonlarda beklenen 200 bp'lik fragman görüntülendi (Resim 21A). Ardından C1 (665 ng/μL) ve C2 (480 μg/μL) klonları endotoksin içermeyen miniprep plazmit izolasyon kiti ile izole edildi. Bu klonlarda insertin yerleşimini doğrulamak için vektörü kesen ama RIPK4'ü kesmeyen BamHI-HF (20U/μL) ve NheI-HF (20U/μL) ile DNA kesildi. Kesim sonrası beklenen 850 bp bant görüldü (Resim 21B).



Resim 21. RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının doğrulanması. (A) RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının koloni PCR ile doğrulanması, (B) RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının restriksiyon enzimleri ile doğrulanması.

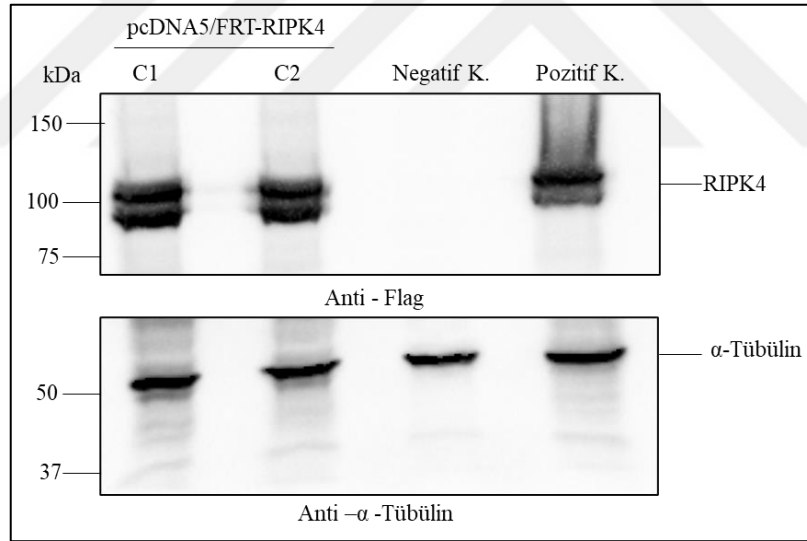
Sonrasında RIPK4 açık okuma çerçevesinin pcDNA5/FRT vektörüne hatasız yerleştiğini göstermek için bu klonlar dizilendi. pcDNA5-RIPK4 C2 klonu 1636 CMV ileri (Resim 22A) ve 1637 BGH geri (Resim 22B) primerleriyle dizilenerek RIPK4'ün vektöre yerleşimi doğrulandı.



Resim 22: RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasının dizileme reaksiyonu ile doğrulanması. A: 1636 CMV ileri primeriyle dizileme reaksiyonu sonucu, B: 1637 BGH geri primeriyle dizileme reaksiyonu sonucu.

4.5.1. pcDNA5/FRT- RIPK4 Klonlarının Geçici Transfeksiyon ile Ekspresyon Analizi

pcDNA5/FRT vektörüne klonlanan ve doğrulanan RIPK4 klonları kalıcı transfeksiyon yapılmadan önce HEK293T hücrelerine CaCl_2 ile geçici transfekte edildi. Daha önce RIPK4'ü pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonladığımızı dizileme reaksiyonu ile doğrulamamıza rağmen kalıcı transfeksiyondan sonra klonlarımızda ekspresyon görülmemişti. Bu nedenle uzun bir süreç olan kalıcı transfeksiyondan önce klonlarımızın ekspresyonu kolay transfekte olan HEK293T hücrelerinde analiz edildi. pcDNA5/FRT-RIPK4 C1 ve C2 klonları altı kuyulu tabakta HEK293T hücrelerine CaCl_2 ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler lizis tamponu ile patlatılıp sonike edildi ve %7.5 SDS PAGE jelde immüno blot yapıldı. Negatif kontrol olarak transfekte edilmemiş klon kullanılırken, pozitif kontrol olarak daha önceki çalışmalarımızda dizileme ve immüno blot ile doğruladığımız pLentiIII-HA RIPK4 1.1 klonu transfekte edildi. pcDNA5/FRT RIPK4 C1 ve C2 her iki klonda da ekspresyon görüldü (Resim 23).



Resim23. pcDNA5/FRT- RIPK4 klonlarının CaCl_2 ile HEK293T hücrelerine transfeksiyon sonrası immüno blot ile ekspresyon analizi.

4.6. Flp-In-HaCaT Hücrelerine pcDNA5/FRT- RIPK4'ün Kalıcı Transfeksiyonu

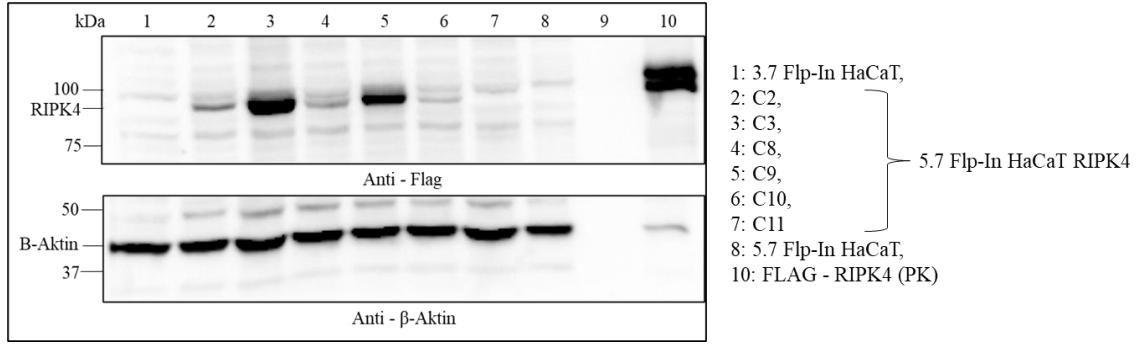
pcDNA5/FRT-RIPK4 vektöründeki RIPK4'ün HEK293T hücrelerinde geçici ekspresyonunu doğruladıktan sonra Flp-In-HaCaT hücrelerinde sürekli ekspresyon çalışmalarına başlanıldı. RIPK4'ün keratinositlerde sürekli eksprese ettirilmesi için 3XFLAG ile füzyon olacak şekilde RIPK4'ün klonlandığı pCDNA5/FRT vektörü ve FLP

rekombinazı sürekli eksprese eden pOG44 vektörleri, oluşturulan Flp-In-HaCaT hücrelerine birlikte transfecte edildi. pcDNA5/FRT-RIPK4: pOG44 oranı 1:4 olarak kullanıldı. Transfeksiyon esnasında lipozom bazlı kimyasal ajanlardan daha verimli olduğunu gözlemlediğimiz PEI ajanı kullanıldı.

Transfeksiyonda daha evvel pcDNA5/FRT-Y geninin sürekli olarak eksprese olduğunu gösterdiğimiz Flp-In-HaCaT 3.7 ve 5.7 klonları kullanıldı. Transfeksiyondan sonraki 70. saatte hücreler pasajlandı ve hücreler yüzeye yapıştıktan sonra 50 µg/mL HigromisinTM eklendi. 100 µg/mL hatta 75 µg/mL HigromisinTM dozda hiç koloni elde edilemediğinden, doz 50-25 µg/mL arasında değiştirildi. 12. günde 5.7 Flp-In-HaCaT'da oldukça çok sayıda koloni gözlemlendi. Daha evvel pcDNA5/FRT -Y genini sürekli eksprese ettirmek için kalıcı transfeksiyonu doğrulanmış (Resim 20) 3.7 Flp-In-HaCaT'da ise yalnızca iki küçük koloni görüldü ancak bu koloniler de çoğalmadı. 5.7 Flp-In-HaCaT kalıcı transfeksiyonundan elde edilen koloniler sırasıyla 24 ve altı kuyulu tabaklara transfer edildi. Hücrelerde immüno blot ile ekspresyon analizi yapıldıktan sonra iyi ekspresyon gösteren klonlar T25 flasklara alınarak çoğaltıldı ve saklamak için donduruldu.

4.6.1. HaCaT Hücrelerinde RIPK4'ün Kalıcı Olarak Sürekli Ekspresyonunun İmmüno blot ile Gösterilmesi

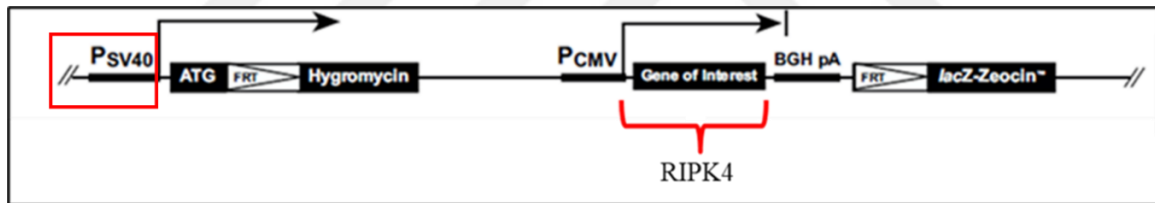
Flp-In-HaCaT hücrelerine RIPK4 kalıcı transfeksiyonu sonrası HigromisinTM ile seçilen klonlarda RIPK4'ün sürekli ekspresyonunu doğrulamak için anti-FLAG antikoru kullanılarak immüno blot yapıldı. Deneyde negatif kontrol olarak transfeksiyonda kullandığımız Flp-In-HaCaT 3.7. ve 5.7. klonları kullanılırken pozitif kontrol olarak daha evvel HEK293T hücrelerine geçici olarak FLAG-RIPK4'ü transfecte ettiğimiz HEK293T hücrelerinden elde edilen hücre lizatı kullanıldı. Pozitif kontrol fazla eksprese olup fazla ışığa verdiği için diğer örneklerle kıyasla daha az miktarda jelle yüklendi (Resim 25, kuyu 10). Flp-In-RIPK4 C3 ve C9 klonlarında (Resim 25, 3 ve 5. kuyu) ekspresyon diğer klonlara göre daha fazlaydı. C2 ve C8 klonlarında az da olsa ekspresyon görülürken C10 ve C11 klonlarında RIPK4 ekspresyonu görülmedi. Eşit yükleme kontrolü olarak Anti-β- Aktin kullanıldı (Resim 24).



Resim 24. HaCaT hücrelerinde RIPK4'ün kalıcı ekspresyonunun gösterilmesi

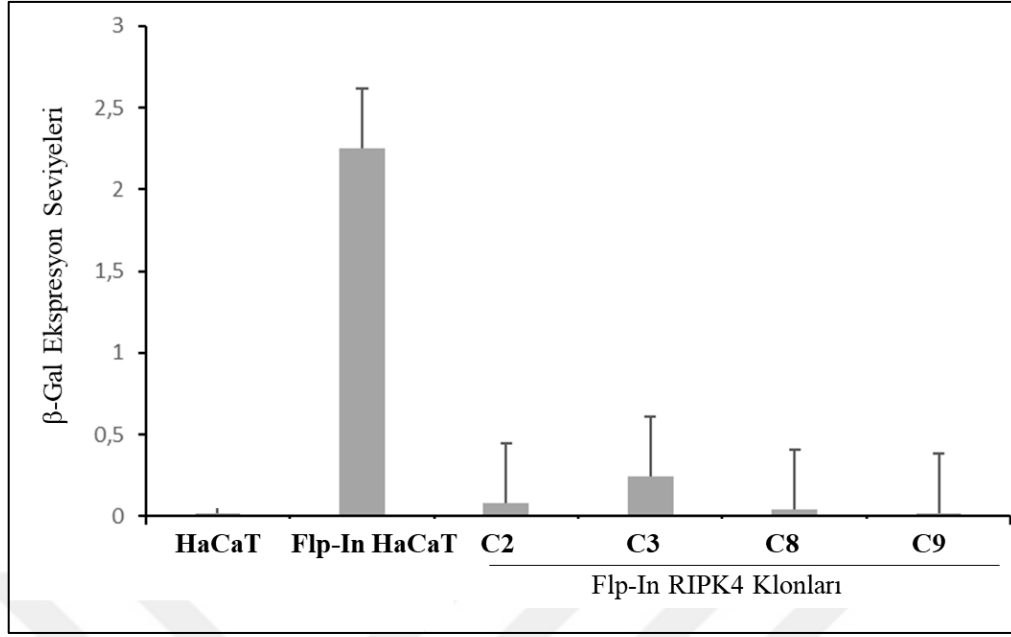
4.6.2. Flp-In-HaCaT Klonlarında RIPK4'ün Sürekli Ekspresyonunun Baskılanan β -Galaktosidaz Ekspresyonu ile Doğrulanması

RIPK4'ün FRT kasetine entegrasyonu sonrasında pcDNA5/FRT vektöründe bulunan Higromisin direnç geninin ve hedef genlerin eksprese olması beklenirken LacZ- Zeosin SV40 promotöründen uzaklaştıkları için ekspresyonları sonlanacaktır (Şekil 14).



Şekil 14. Ekspresyon kasetinin HaCaT hücrelerindeki FRT kasetine girmesi sonrasında FRT kasetinde beklenen yerleşim. Flp-InTM (Invitrogen) kataloğundaki şekil değiştirilerek kullanılmıştır.

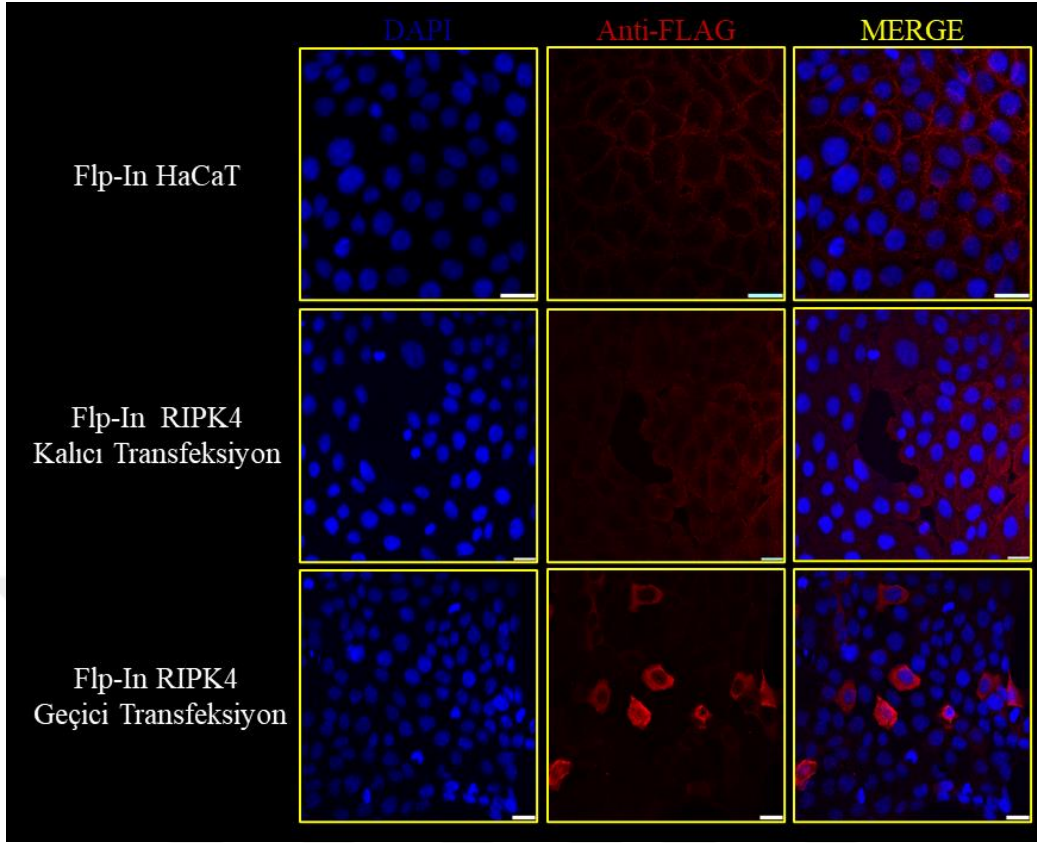
Bundan dolayı kalıcı transfeksiyon sonrası FRT kasetine RIPK4 cDNA'sı giren klonlar HigromisineTM dirençli, ZeosineTM hassas hale gelirken β -Galaktosidaz aktivitelerini de kaybederler. Bu bilgiden yola çıkarak immünoiblot ile ekspresyonlarını gösterdiğimiz klonların β -Gal aktivitesi ONPG substratı kullanılarak analiz edildi. Beklenildiği şekilde Flp-In-HaCaT klonunda β -Gal seviyesi fazlayken, RIPK4'ün sürekli ekspresyonun olduğu Flp-In-RIPK4 klonlarında β -Gal seviyesi belirgin şekilde azaldı (Resim 25).



Resim 25. Flp-In-HaCaT hücrelerine RIPK4'ün kalıcı transfeksiyonu sonrası oluşan 5.7. Flp-In-RIPK4 klonlarda β-Gal ekspresyon seviyeleri.

4.6.3. Flp-In-RIPK4 Hücrelerinde RIPK4 Ekspresyonunun İmmünofloresan ile Analizi

Kalıcı transfeksiyon sonrası oluşturulan Flp-In-RIPK4 klonlarda RIPK4'ün sürekli ekspresyonu immüno blot ve β-Gal ekspresyonu ile doğrulanmıştı. Daha sonra oluşturulan Flp-In-RIPK4 klonlarının hücre içi yerleşimlerini belirlemek için immünofloresan yöntemine başvuruldu. Negatif kontrol olarak boş Flp-In-HaCaT hücreleri, pozitif kontrol olarak da pcDNA5/FRT-RIPK4 vektörünün geçici transfekte edildiği Flp-In-HaCaT hücreleri kullanıldı. Pozitif kontrolde RIPK4 ekspresyonu belirgin bir şekilde hücre sitoplazmasında noktalar halinde görülürken, RIPK4'ün sürekli eksprese edildiği Flp-In-HaCaT hücrelerinde boş Flp-In-HaCaT hücrelerine kıyasla bir fark görülmedi (Resim 26). Deney çeşitli antikorlar ve farklı konsantrasyonları ile birkaç kez tekrarlandı da istenilen sonuca ulaşılamadı.



Resim 26. Flp-In-HaCaT, kalıcı transfekte Flp-In-RIPK4 ve geçici transfekte Flp-In-RIPK4 klonlarının hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesi (Bar uzunluğu: 25µm).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Derinin dış katmanını oluşturan epidermis patojenlere, fiziksel ve kimyasal hasarlara maruz kaldığından kendini yenileme ihtiyacı duyar. Epidermal farklılaşma olarak adlandırılan bu süreç bazal tabakadaki kök hücrelerin çoğalması, sonrasında bu hücrelerin üst katmanlara göç ederek ölü keratinositlere dönüşüp dökülmesiyle gerçekleşir. Epidermal farklılaşmanın herhangi bir aşamasında ortaya çıkan sorunlar ciddi konjenital malformasyonlara neden olmaktadır (47). Bu mekanizmanın aydınlatılması yönündeki hücre bazlı çalışmalarda insan keratinosit hücre hattı HaCaT'ın kullanımı oldukça yaygındır. Bunun nedeni, HaCaT hücrelerinin ölümsüz olmaları, kolay pasajlanmaları, normal keratinositlerde yapılabilen tüm hücresel analizlerin -farklılaşma çalışmalarının ve organoid oluşturma gibi- bu hücrelerde de yapılabilmesidir.

Keratinositlere yönelik en önemli hücresel süreçlerden biri bazal laminada bulunan keratinosit öncüllerinden farklılaşarak derinin katmanlarının oluşturulmasıdır. Bir çok deri hastalığı bu farklılaşmadaki bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. İki ila üç hafta kadar süren keratinosit farklılaşma sürecini birkaç gün ekspresyon sağlayan geçici transfeksiyon ile incelemek mümkün değildir. HaCaT hücrelerinde transfeksiyon veriminin düşük olması ve geçici transfeksiyonun yalnızca birkaç günlük analizlere olanak sağlamasından ötürü ilgilenilen genin sürekli ekspresyonunun tüm hücrelerde sağlandığı kalıcı transfeksiyon yöntemine HaCaT hücrelerinin kullanıldığı analizlerde sıklıkla başvurulmuştur (106-109). Bu yöntemde, hücreye aktarılan gen hücre genomuna entegre olup mitotik bölünmeler yoluyla yavru hücrelere aktarıldığından ilgilenilen proteini eksprese eden homojen hücreler elde edilerek, çalışmalarda heterojen hücre gruplarından kaynaklanabilecek sorunların da önüne geçilmiş olur.

Anabilim dalımızda uzun süredir epidermal farklılaşma ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Epidermal farklılaşmada kilit rolü olduğu bilinen ve patolojik varyasyonlarının çeşitli ektodermal anomalilerle karakterize sendromlara neden olduğu literatür ve bölümümüzdeki çalışmalar ile gösterilen RIPK4'ün HaCaT hücrelerinde ekspresyonuna dayanan çalışmaların çoğunda geçici transfeksiyon yöntemlerine başvurulmuştur (29, 36, 110, 111). Bu tez çalışmasında ise RIPK4'ün HaCaT hücrelerinde kalıcı transfeksiyon yöntemiyle sürekli olarak eksprese olması amaçlanmıştır. İlk etapta oluşturulan bu kalıcı hücreler epidermal farklılaşmanın moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılacaktır. İlerleyen süreçte ise bu hücrelerin yine

uzun süreli deney kurgusuna dayalı deri organoidlerinin oluşturulması ve yara iyileşmesinin moleküler temeli gibi çalışmalarda kullanılması planlanmaktadır.

Kalıcı transfeksiyon için farklı yöntemler uygulanmakla beraber, çalışmamızda daha evvel ticari olarak elde ettiğimiz Flp-In-293TM hücrelerinin oluşturulmasında kullanılan Flp-InTM kalıcı hücre oluşturma sistemine başvurduk.

İlgilenilen hedef geni sürekli eksprese ettirmeye hazır Flp-In-HaCaT konak hücresi oluşturmak için ilk olarak FRT kaseti içeren pFRT/LacZeo vektörünün memeli hücre genomuna kolay entegre olması için vektörü üretici firmanın önerisi doğrultusunda linear hale getirdik (Resim 2). FRT kasetini genomuna entegre eden HaCaT hücrelerinin seçimini, FRT kasetinde bulunan Zeosin direnç geni varlığından ötürü ZeosinTM ile yaptık. ZeosinTM seçilimi için uygun dozu 100 µg/mL olarak belirlemiştik (Resim 3). Ancak, transfeksiyon sonrasında optimize ettiğimiz 100 µg/mL dozun hücreler için toksik geldiğini ve genomuna FRT kaseti yerleşen kolonilerin oluşmadığını gördük. Bunun nedenini, transfeksiyon işleminin ve 9 kb boyutunda bir vektörün hücre genomuna entegrasyonunun yarattığı stresin hücrenin ZeocinTM'e olan hassasiyetini artırması ile ilişkilendirdik. Bundan dolayı kademeli olarak dozu indirdik. En son doz 25 µg/mL'ye indirildiğinde FRT kasetini genomuna entegre etmiş hücreler çoğalarak kolonileri oluşturmaya başladı (Resim 4). Bunun yanı sıra, diğer bir optimizasyonu transfeksiyon sonrası bekleme süresinde yaptık. Üretici firmanın önerdiği şekilde transfeksiyondan 48 saat sonra hücreleri pasajlayıp ZeosinTM muamelesi uyguladığımızda da koloni elde edemedik. Bu süreyi 72 saate çıkardıktan sonra kolonileri elde ettik. Bu sonuçlar bize kalıcı hücre oluşturma sürecinin hücreden hücreye ve koşuldan koşula çok farklılık gösterdiğini, her aşamanın optimizasyona tabii olduğunu gösterdi.

ZeosinTM ile seçilen tüm klonlarda FRT kasetinin varlığını ayrıca *Lac Z* genine özgü tasarlanmış primerler kullanarak gerçekleştirdiğimiz PCR reaksiyonu ve β-Galaktoz ekspresyon analiziyle doğruladık (Resim 5, 6).

FRT kasetinin genoma yerleşimi rastgele olduğu için oluşan her bir klonda FRT genomda farklı bir bölgeye girmiş olabileceğinden seçilen klonlar birbirinden farklı olacaktır. Oluşturulan Flp-In-HaCaT konak hücresinin ilgili hedef genimizi eksprese edebilmesi için FRT kasetinin transkripsiyonel olarak aktif bölgeye girmesi gerekmektedir. Bundan ötürü çok sayıda klonun taranması en iyi ekspresyonu veren klonun seçiminde avantaj sağlayacağı için olabildiğince çok sayıda klonu toplamaya çalıştık ve toplamda

ZeocinTM'e direç gösteren 37 klonu analiz ettik. Bu klonlarda FRT içeren vektörde bulunan rapörtör gen *Lac Z* ürünü B-Gal'in substratı (ONPG) kullanarak ekspresyon analizi yaptık ve en fazla β -Gal ekspresyonu görülen beş klonu belirledik (Resim 6).

Hücrenin genomuna birden fazla FRT kaseti entegrasyonunun, kromozomal yeniden düzenlenmeler, FRT kasetleri arasında intramoleküler rekombinasyon ve genomik dizilerin silinmesi riskini artırdığından dolayı genomuna tek FRT kaseti entegre olan klonlar seçilmesi önemliydi (88). Bundan dolayı genomunda transkripsiyonel olarak aktif bir bölgeye FRT kaseti giren klonlarda FRT kasetinin kopya sayısını analiz ettik. Bu amaçla ilk etapta Southern blot yöntemine başvurduk. Bu yöntemde kullanılmak üzere *Lac Z*'ye özgü problemler tasarladık ve bu problemleri DNA fragmanlarının görüntülenmesine olanak veren radyoaktiviteye alternatif digoksijenin ile işaretledik. Flp-In-HaCaT hücrelerinden izole edilen genomik DNA'nın HindIII ile kesimi sonrasında *LacZ* probunun bağlanacağı fragmanın büyüklüğünü tam olarak bilemeyeceğimizden, genoma yerleşen pFRT/*LacZeo* vektörünü baz alarak yaptığımız hesaplamada beklenen fragmanın ya da fragmanların 5944 bp üzerinde olacağını belirledik (Şekil 13). Ancak, ne kontrol olarak kullandığımız genomunda tek kopya barındıran Flp-InTM 293 hücrelerinde ne de oluşturduğumuz Flp-In-HaCaT hücrelerinde beklenen fragmanları göremedik (Resim 9). Sonucun deneysel bir hatadan kaynaklanmadığından emin olmak amacıyla, *LacZ* probu için uyguladığımız hibridizasyon ve görüntüleme koşullarını farklı konsantrasyonlarda HindIII ile kesilmiş pFRT/*LacZeo* vektörünün kullanıldığı Southern blot deneyinde test ettik ve *LacZ* probunun vektörde bulunan FRT kasetine bağlandığını göstererek deneysel hatayı dışlamış olduk (Resim 10). Bölümümüzde daha evvel Southern blot tekniği başarıyla uygulanmıştı. Önceki çalışmalar büyüklüğü net olarak bilinen genomik fragmanları hedef alıyordu. Çalışmamızda FRT kasetinin klonlarda farklı yerlere yerleşmesi ve beklenen fragman büyüklüğünün net olarak bilinmemesi istenen sonuçların elde edilmesini zorlaştırdı. Bu iş paketine ayrılan sürenin daralmasından ötürü oldukça uzun, pahalı ve zorlu Southern blot tekniğini zorlamak yerine genomda kopya sayısının belirlenmesine yönelik alternatif bir yöntem araştırmasına gittik ve Southern blot yaklaşımı için B-planı olarak belirlediğimiz real-time PCR yöntemine geçtik. Yapılan literatür araştırması sonrası, Yun JJ ve grubunun bir çalışmasında hızlı sonuç verebilecek, kopya sayısı bilinen miktarlarda kalıp DNA kullanılarak çizilen standart eğri aracılığıyla araştırılan genin kopya sayısının kantite edilmesine dayanan real-time PCR metodu kullanıldı (103). Bu yöntem ile en yüksek β -gal ekspresyonu görülen beş Flp-In-HaCaT klonunda kontrol Flp-InTM 293'in hücrelerine benzer şekilde FRT kasetinin genomda

tek bir yere girdiğini göstermiş olduk (Resim 12). Böylece istenilen geni kalıcı olarak eksprese etmeye hazır konak Flp-In-HaCaT hücre hattını başarıyla oluşturmuş olduk.

Çalışmamızın devamında ise oluşturduğumuz Flp-In-HaCaT hücrelerinde FRT kasetinin genoma entegrasyonunun hücrenin yaşamsal olaylarına etki edip etmediğini incelemek için, ikilenme zamanı ve hücre döngüsü analizleri yaptık. Flp-In-HaCaT hücrelerini normal HaCaT hücreleri ile kıyasladık ve bu hücresel süreçlerde normal HaCaT ile oluşturduğumuz transgenik HaCaT arasında anlamlı bir fark göremedik (Resim 13-14). Bu sonuç bize FRT kasetinin genomuna yerleşmesinin Flp-In HaCaT hücrelerinin yaşamsal fonksiyonlarını etkilemediğini gösterdi.

Flp-In-HaCaT hücrelerini oluşturduktan sonra RIPK4'ün sürekli ekspresyonu için bu hücrelerin genomunda bulunan FRT kasetine *RIPK4* geninin yerleştirilmesi çalışmalarına geçtik. Bu hedefe yönelik olarak ilk etapta RIPK4 proteinini kodlayan açık okuma çerçevesini pFRT/DEST/FLAG/HA Gateway klonlama vektörüne yerleştirdik ve Sanger dizileme reaksiyonu ile klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğruladık (Resim 15).

RIPK4'ü klonladığımız pFRT/DEST/FLAG/HA vektörü ve Flp-rekombinaz ekspresyon vektörünü, Flp-In-HaCaT (klon 3.7) hücrelerine birlikte transfekte ettik. Vektör HigromisinTM direnç geni içerdiğinden seçimleri HigromisinTM ile yaptık. Zeosin uygulamamıza dayalı seçimdeki tecrübemize dayanarak, HigromisinTM seçiminde belirlenen optimal doz olan 100 µg/mL'nin yanında 50 µg/mL dozunu da kullandık ve yüksek dozda yalnızca bir kaç klon elde ederken düşük dozda çok sayıda klon elde ettik. (Resim 16).

HigromisinTM ile seçilip çoğaltılan HaCaT hücrelerinden elde edilen lizatın anti-FLAG antikoru ile immüno blot analizini yaptığımızda RIPK4'ün ekspresyonunu göremedik (Resim 17). Bundan dolayı, pFRT/DEST/FLAG/HA vektörüne klonlanan RIPK4'ün HaCaT hücrelerinde ekspresyonundan emin olmak istedik. Pozitif kontrol olarak daha evvel Flp-InTM293 hücrelerinde kalıcı ekspresyonu sağlamış olan pFRT/DEST/FLAG/HA Gateway vektörü ve bu vektörün restriksiyon enzimleriyle klonlamaya dayalı formu olan pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmış olan iki farklı genin -X ve Y olarak tanımlanmış olduğu vektörleri ayrı ayrı HaCaT hücrelerine geçici olarak transfekte ettik. RIPK4'ün ve X geninin eksprese edildiği pFRT/DEST/FLAG/HA vektöründe ekspresyon göremedik. RIPK4'ün stabilitesini artırmak adına uyguladığımız proteozom inhibitörü MG-132 de

RIPK4 ekspresyonunu etkilemedi. Yalnızca pcDNA5/FRT vektörüne klonlanan Y geninin ekspresyonunu görebildik. (Resim 18).

Bundan ötürü RIPK4'ün pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmasına karar verdik. Klonlamaya geçmeden evvel oluşturduğumuz Flp-In-HaCaT klonlarında pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmış Y geninin sürekli ekspresyonunu analiz etmek için β -Gal ekspresyonu en yüksek dört klona (3.7, 3.12, 5.7 ve 5.5 Flp-In-HaCaT) bu vektörü kalıcı transfekte ettik. pcDNA5/FRT-Y'nin sürekli ekspresyonu 3.7 ve 5.7 Flp-In-HaCaT hücrelerinde doğrulanırken 5.5 ve 3.12'de beklenen ekspresyonu göremedik (Resim 19). Flp-In-HaCaT 5.5 ve 3.12' de RIPK4 ün FRT kasetine entegrasyonu esnasında oluşan patolojik bir varyasyonun, RIPK4'ün gen ekspresyonunu engelleyebileceğini düşündük. pcDNA5/FRT vektörünün daha verimli ekspresyon vermesini ise primerler aracılığıyla vektöre sonradan eklenen kozak dizisinin pFRT/DEST/FLAG/HA vektöründeki kozak dizisine kıyasla translasyon veriminin daha yüksek olması ile açıkladık (Resim 18).

Ayrıca, Flp-In-HaCaT hücrelerine kalıcı transfeksiyon süreci öncesinde pcDNA5/FRT RIPK4 vektörünü HaCaT hücrelerine geçici transfekte edip ekspresyonlarını doğruladık (Resim 23). Sonrasında kalıcı transfeksiyon için pcDNA5/FRT RIPK4 vektörünü Flp rekombinaz vektörü ile birlikte Flp-In-HaCaT hücrelerine birlikt transfekte ettik ve HigromisinTM ile seçtik. Flp-In-HaCaT (klon 5.7) hücrelerinde çok sayıda koloni elde ettik. Bu klonlarda RIPK4'ü sürekli eksprese eden klonları immüno blot ile belirledik ve ileriki çalışmalar içinde en yüksek ekspresyonu veren klon 3'ü kullandık (Resim 24). Klonlar arası görülen ekspresyon seviyesi farkını FRT kasetine entegrasyon esnasında oluşabilecek mutasyonlardan kaynaklanabileceğini düşündük. Klon 5.7'nin aksine klon 3.7'den yalnızca iki klon elde ettik. Ancak bu klonların devamlılığını sağlayamadık. Oysa 3.7 Flp-In-HaCaT hücrelerinde yine pcDNA5/FRT vektörüne klonlanmış Y geninin eksprese olduğu klonlar yaşamıştı (Resim 19). RIPK4'ü eksprese eden klonların yaşamamasının nedeni olarak bir apoptoz modülatörü olarak görev yaptığı daha evvel gösterilmiş olan RIPK4'ün (29, 42), klonlar arasında FRT kasetinin transkripsiyonel olarak en aktif bölgeye entegre olduğu klon 3.7'deki yüksek ekspresyonuna bağlı olarak apoptozu indüklemiş olabileceğini düşündük.

RIPK4'ün klonlandığı ekspresyon vektörü Higromisin direnç geni içermesine rağmen bir ATG başlatma kodunu ve genin ekspresyonunu teşvik edecek bir promotör içermez. Bu vektörün FRT kasetine yerleşmesi ile Higromisin direnç geni SV40 promotörünün yanına yerleşerek eksprese olmaya başlar. FRT kasetindeki *LacZ*-Zeosin

füzyon geni ise SV4O promotöründen uzaklaşır. Bundan dolayı FRT kasetine RIPK4 yerleşmiş hücreler Higromisin'e dirençli ve Zeosin'e hassas hale gelirken β -Gal ekspresyonu da gerçekleştirmez (88). Bu bilgiden yola çıkarak hücrelerde RIPK4'ün FRT kasetine entegrasyonunu β -Gal seviyelerini analiz ederek ve oluşturulan klonlarda ekspresyonun olmadığını göstererek doğruladık (Resim 25).

Son aşamada Flp-In-HaCaT hücrelerinde RIPK4'ün ekspresyonunun immüno blot ile gösterilmesinin yanında hücre içi yerleşimini de immüno floresan ile analiz etmek istedik. Daha evvelki çalışmalarımızda RIPK4'ün hücre içi yerleşimini nadir olarak çekirdekte daha ziyade sitoplazmada noktasal yapılarda görüntülemiştik (112). Benzer hücresel yerleşim RIPK4'ün geçici olarak HaCaT hücrelerinde eksprese edildiği örneklerde de görüldü (Resim 26). Ancak, RIPK4'ü sürekli olarak eksprese eden Flp-In-HaCaT hücrelerinde, RIPK4 boyamasında kontrol boş Flp-In-HaCaT hücrelerine kıyasla bir fark görülmedi. Bu sonucu, kalıcı transfeksiyonla sağlanan ekspresyonun geçici transfeksiyonla sağlanan ekspresyona kıyasla oldukça az olduğunu (Resim 25) ve bu farkın immüno blot ile belirlenmesi mümkünken, sinyal yükseltme özelliği sınırlı olan immüno floresan yöntemiyle belirlenmesinin mümkün olamayabileceği şeklinde değerlendirdik (Şekil 26).

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla araştırılması istenilen genleri keratinosit hücrelerinde sürekli olarak eksprese ettirmeye hazır Flp-In-HaCaT hücre hattını oluşturmuş olduk. Epidermal farklılaşmanın moleküler mekanizasının anlaşılmasına yönelik çalışmaların uzun süredir gerçekleştirildiği bölümümüzde tüm hücrelerde sürekli olarak istenilen genin ekspresyonunun sağlanamaması, geçici transfeksiyonda kullanılan ajanların pahalı olması ve HaCaT hücrelerinde transfeksiyon veriminin düşük olması çalışmalarımıza kısıtlamalar getirmekteydi. Bu kapsamda oluşturduğumuz Flp-In-HaCaT hücreleri ile araştırılacak genin sürekli ekspresyonunun ihtiyaç duyulduğu epidermal farklılaşma, yara iyileşmesi, üç boyutlu deri organoidlerinin oluşturulması, çip üzerinde organ-hücre gibi çalışmaları gerçekleştirmemiz mümkün olacaktır.

Bunlara ilaveten tez kapsamında gerçekleşen çalışmalar sonucunda farklı hücre hatlarında farklı genler için kullanılabilecek daha verimli ve ucuz bir sistem bölümümüzde kurulmuş oldu. Böylelikle edinilmesi oldukça pahalı olan, hücre biyolojisi çalışmalarında sıklıkla başvuru olan teknolojiyi bölümümüze kazandırdık.

6. KAYNAKLAR

1. Kanitakis J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12(4): 390-399; 400-391.
2. Hsu YC, Li L, Fuchs E (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 20(8): 847-856.
3. Alonso L, Fuchs E (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11830-11835.
4. Fuchs E (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 180(2): 273-284.
5. Rice RH, Green H (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* 11(2): 417-422.
6. Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* 34(9): 453-463.
7. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD (2012). Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 212: v, vii, 1-115.
8. Brown TM, Krishnamurthy K (2022). *Histology, Dermis.* (Ed). StatPearls Treasure Island (FL).
9. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9(5): 667-684.
10. Schosserer M, Grillari J, Wolfrum C, Scheideler M (2018). Age-Induced Changes in White, Brite, and Brown Adipose Depots: A Mini-Review. *Gerontology* 64(3): 229-236.
11. Hall BK (2018). Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genesis* 56(6-7): e23103.
12. Taylor SC, Kelly AP, Lim H, Serrano AMA (2016). *Taylor and Kelly's Dermatology for Skin of Color 2/E* McGraw Hill Professional.
13. Matsui T, Amagai M (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* 27(6): 269-280.
14. Segre JA (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116(5): 1150-1158.
15. Fuchs E, Nowak JA (2008). Building epithelial tissues from skin stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 333-350.
16. Kierszenbaum A (2006). *Histology and Cell Biology.* St. Louis: Mosby. Elsevier; p.
17. Morita K, Miyachi Y (2003). Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci* 31(2): 81-89.
18. Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(3): 207-17
19. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3471-3480.
20. Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2009). RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 138(2): 229-232.
21. Meylan E, Tschopp J (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 30(3): 151-159.
22. Zhang D, Lin J, Han J (2010). Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol* 7(4): 243-249.

23. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 8(3): 297-303.
24. Muendlein HI, Sarhan J, Liu BC, Connolly WM, Schworer SA, Smirnova I, Tang AY, Ilyukha V, Pietruska J, Tahmasebi S, Sonenberg N, Degterev A, Poltorak A (2020). Constitutive Interferon Attenuates RIPK1/3-Mediated Cytokine Translation. *Cell Rep* 30(3): 699-713 e694.
25. Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2(8): 736-742.
26. Magalhaes JG, Lee J, Geddes K, Rubino S, Philpott DJ, Girardin SE (2011). Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur J Immunol* 41(5): 1445-1455.
27. Wegner KW, Saleh D, Degterev A (2017). Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis. *Trends Pharmacol Sci* 38(3): 202-225.
28. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137(6): 1112-1123.
29. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002). RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3(12): 1201-1208.
30. Holland P, Willis C, Kanaly S, Glaccum M, Warren A, Charrier K, Murison J, Derry J, Virca G, Bird T, Peschon J (2002). RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr Biol* 12(16): 1424-1428.
31. Kwa M, Huynh J, Aw J, Zhang L, Nguyen L, Reynolds E, Sweet M, Hamilton J, Scholz G (2014). Receptor-interacting protein kinase 4 and interferon regulatory factor 6 function as a signaling axis to regulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 289(45): 31077-87.
32. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002). RIPK4 (DIK/PKK) a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3(12): 1201-8.
33. Huang X, McGann J, Liu B, Hannoush R, Lill J, Pham V, Newton K, Kakunda M, Christine Y, Hymowitz S, Hongo J, Wynshaw A, Polakis P, Harland R, Dixit V (2013). Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. *Science* 339(6126): 1441-5.
34. Qi ZH, Xu HX, Zhang SR, Xu JZ, Li S, Gao HL, Jin W, Wang WQ, Wu CT, Ni QX, Yu XJ, Liu L (2018). RIPK4/PEBP1 axis promotes pancreatic cancer cell migration and invasion by activating RAF1/MEK/ERK signaling. *Int J Oncol* 52(4): 1105-1116.
35. Mugami S, Dobkin-Bekman M, Rahamim-Ben Navi L, Naor Z (2018). Differential roles of PKC isoforms (PKCs) in GnRH stimulation of MAPK phosphorylation in gonadotrope derived cells. *Mol Cell Endocrinol* 463: 97-105.
36. Dincer T, Boz Er AB, Er I, Toraman B, Yildiz G, Kalay E (2020). RIPK4 suppresses the TGF-beta1 signaling pathway in HaCaT cells. *Cell Biol Int* 44(3): 848-860.
37. Zha J, Zhou Q, Xu LG, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu HB (2004). RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 319(2): 298-303.
38. Langston RG, Rudenko IN, Cookson MR (2016). The function of orthologues of the human Parkinson's disease gene LRRK2 across species: implications for disease modelling in preclinical research. *Biochem J* 473(3): 221-232.

39. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K (2019). LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener* 14(1): 49.
40. Bahr C, Rohwer A, Stempka L, Rincke G, Marks F, Gschwendt M (2000). DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase Cdelta. Cloning, characterization, and gene analysis. *J Biol Chem* 275(46): 36350-36357.
41. Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S (2001). Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem* 276(24): 21737-21744.
42. Zou L, Liu J, Lu H (2018). Influence of protein kinase RIPK4 expression on the apoptosis and proliferation of chondrocytes in osteoarthritis. *Mol Med Rep* 17(2): 3078-3084.
43. Liu DQ, Li FF, Zhang JB, Zhou TJ, Xue WQ, Zheng XH, Chen YB, Liao XY, Zhang L, Zhang SD, Hu YZ, Jia WH (2015). Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* 5: 11955.
44. Liu J, Zhang Y, Zeng Q, Zeng H, Liu X, Wu P, Xie H, He L, Long Z, Lu X, Xiao M, Zhu Y, Bo H, Cao K (2019). Delivery of RIPK4 small interfering RNA for bladder cancer therapy using natural halloysite nanotubes. *Sci Adv* 5(9): eaaw6499.
45. Lee P, Jiang S, Li Y, Yue J, Gou X, Chen SY, Zhao Y, Schober M, Tan M, Wu X (2017). Phosphorylation of Pkp1 by RIPK4 regulates epidermal differentiation and skin tumorigenesis. *EMBO J* 36(13): 1963-1980.
46. Adams S, Munz B (2010). RIP4 is a target of multiple signal transduction pathways in keratinocytes: implications for epidermal differentiation and cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 316(1): 126-137.
47. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL, Khavari PA (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. *Trends Genet* 29(1): 31-40.
48. Rountree RB, Willis CR, Dinh H, Blumberg H, Bailey K, Dean C, Jr., Peschon JJ, Holland PM (2010). RIP4 regulates epidermal differentiation and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 130(1): 102-112.
49. De Groote P, Tran HT, Franssen M, Tanghe G, Urwyler C, De Craene B, Leurs K, Gilbert B, Van Imschoot G, De Rycke R, Guerin CJ, Holland P, Berx G, Vandenabeele P, Lippens S, Vleminckx K, Declercq W (2015). A novel RIPK4-IRF6 connection is required to prevent epithelial fusions characteristic for popliteal pterygium syndromes. *Cell Death Differ* 22(6): 1012-1024.
50. Richardson RJ, Hammond NL, Coulombe PA, Saloranta C, Nousiainen HO, Salonen R, Berry A, Hanley N, Headon D, Karikoski R, Dixon MJ (2014). Periderm prevents pathological epithelial adhesions during embryogenesis. *J Clin Invest* 124(9): 3891-3900.
51. Ji Y, Garland MA, Sun B, Zhang S, Reynolds K, McMahon M, Rajakumar R, Islam MS, Liu Y, Chen Y, Zhou CJ (2020). Cellular and developmental basis of orofacial clefts. *Birth Defects Res* 112(19): 1558-1587.
52. Adams S, Pankow S, Werner S, Munz B (2007). Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* 127(3): 538-544.
53. Dincer T, Gumus E, Toraman B, Er I, Yildiz G, Yuksel Z, Kalay E (2021). A novel homozygous RIPK4 variant in a family with severe Bartsocas-Papas syndrome. *Am J Med Genet A* 185(6): 1691-1699.

54. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, Kreiger E, Cansu A, Toraman B, Abdalla EM, Aslan Y, Pillai S, Akarsu NA (2012). Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 90(1): 76-85.
55. Leslie EJ, O'Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, Alsubaie L, Ch'ng GS, van der Laar IM, Hoogeboom AJ, Dunnwald M, Kapoor S, Jiramongkolchai P, Standley J, Manak JR, Murray JC, Dixon MJ (2015). Expanding the genetic and phenotypic spectrum of popliteal pterygium disorders. *Am J Med Genet A* 167A(3): 545-552.
56. Mitchell K, O'Sullivan J, Missero C, Blair E, Richardson R, Anderson B, Antonini D, Murray JC, Shanske AL, Schutte BC, Romano RA, Sinha S, Bhaskar SS, Black GC, Dixon J, Dixon MJ (2012). Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. *Am J Hum Genet* 90(1): 69-75.
57. Gripp KW, Ennis S, Napoli J (2013). Exome analysis in clinical practice: expanding the phenotype of Bartsocas-Papas syndrome. *Am J Med Genet A* 161A(5): 1058-1063.
58. Gollasch B, Basmanav FB, Nanda A, Fritz G, Mahmoudi H, Thiele H, Wehner M, Wolf S, Altmüller J, Nürnberg P, Frank J, Betz RC (2015). Identification of a novel mutation in RIPK4 in a kindred with phenotypic features of Bartsocas-Papas and CHAND syndromes. *Am J Med Genet A* 167A(11): 2555-2562.
59. Sutton VR, Plunkett K, Dang DX, Lewis RA, Bree AF, Bacino CA (2009). Craniofacial and anthropometric phenotype in ankyloblepharon-ectodermal defects-cleft lip/palate syndrome (Hay-Wells syndrome) in a cohort of 17 patients. *Am J Med Genet A* 149A(9): 1916-1921.
60. Hanel KH, Cornelissen C, Luscher B, Baron JM (2013). Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci* 14(4): 6720-6745.
61. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3): 761-771.
62. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM, et al. (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14(5): 833-839.
63. Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE (1997). Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* 19(4): 201-214.
64. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D, Calvieri S, Gismondi A, Taramelli D, Dell'Agli M (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017: 7435621.
65. Grabbe J, Welker P, Rosenbach T, Nürnberg W, Krüger-Krasagakes S, Artuc M, Fiebiger E, Henz BM (1996). Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J Invest Dermatol* 107(2): 219-224.
66. Lehmann B (1997). HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol* 108(1): 78-82.

67. Seo EY, Piao YJ, Kim JS, Suhr KB, Park JK, Lee JH (2002). Identification of calcium-induced genes in HaCaT keratinocytes by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization. *Arch Dermatol Res* 294(9): 411-418.
68. Chandrasekaran S, Giang UB, King MR, DeLouise LA (2011). Microenvironment induced spheroid to sheeting transition of immortalized human keratinocytes (HaCaT) cultured in microbubbles formed in polydimethylsiloxane. *Biomaterials* 32(29): 7159-7168.
69. Recillas-Targa F (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol* 34(3): 337-354.
70. Lufino MM, Edser PA, Wade-Martins R (2008). Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Mol Ther* 16(9): 1525-1538.
71. Kim TK, Eberwine JH (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397(8): 3173-3178.
72. Bussow K (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr Opin Struct Biol* 32: 81-90.
73. Schlake T, Bode J (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33(43): 12746-12751.
74. Jayaram M, Ma CH, Kachroo AH, Rowley PA, Guga P, Fan HF, Voziyanov Y (2015). An Overview of Tyrosine Site-specific Recombination: From an FLP Perspective. *Microbiol Spectr* 3(4).
75. Turan S, Bode J (2011). Site-specific recombinases: from tag-and-target- to tag-and-exchange-based genomic modifications. *FASEB J* 25(12): 4088-4107.
76. Stark WM (2014). The Serine Recombinases. *Microbiol Spectr* 2(6).
77. Olorunniji FJ, Rosser SJ, Stark WM (2016). Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. *Biochem J* 473(6): 673-684.
78. Fu TJ, Tse-Dinh YC, Seeman NC (1994). Holliday junction crossover topology. *J Mol Biol* 236(1): 91-105.
79. Nagy A (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2): 99-109.
80. Golic KG, Lindquist S (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59(3): 499-509.
81. Oumard A, Qiao J, Jostock T, Li J, Bode J (2006). Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based Cassette-exchange Systems in Animal Cell Biotechnology. *Cytotechnology* 50(1-3): 93-108.
82. 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. *J Mol Biol* 390(4): 579-594.
83. Thomas H, Senkel S, Erdmann S, Arndt T, Turan G, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res* 32(19): e150.
84. Reynolds AE, Murray AW, Szostak JW (1987). Roles of the 2 microns gene products in stable maintenance of the 2 microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7(10): 3566-3573.
85. Soidla TR, Nevzgliadova OV (1987). [A 2-um plasmid of *Saccharomyces*]. *Mol Biol (Mosk)* 21(6): 1467-1479.

86. O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251(4999): 1351-1355.
87. Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD (1985). The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40(4): 795-803.
88. invitrogen (2010). FLP-In™ System, For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by FLP Recombinase-Mediated Integration Version E ed1-40.
89. Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE (2007). Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat Environ Biophys* 46(4): 409-416.
90. Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G (1991). High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet* 20(4): 309-314.
91. Baron M, Reynes JP, Stassi D, Tiraby G (1992). A selectable bifunctional beta-galactosidase::phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene* 114(2): 239-243.
92. Bussow K (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr Opin Struct Biol* 32: 81-90.
93. Pittenger RC, Wolfe RN, Hoehn MM, Marks PN, Daily WA, Mc GJ (1953). Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)* 3(12): 1268-1278.
94. Cabanas MJ, Vazquez D, Modolell J (1978). Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 83(3): 991-997.
95. Blochlinger K, Diggelmann H (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol Cell Biol* 4(12): 2929-2931.
96. Broach JR, Hicks JB (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* 21(2): 501-508.
97. Sambrook J, Russell DW (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc* 2006(1).
98. Phelan MC (2006). Techniques for mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Hum Genet* Appendix 3: Appendix 3G.
99. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24(4): 596-601.
100. Young DC, Kingsley SD, Ryan KA, Dutko FJ (1993). Selective inactivation of eukaryotic beta-galactosidase in assays for inhibitors of HIV-1 TAT using bacterial beta-galactosidase as a reporter enzyme. *Anal Biochem* 215(1): 24-30.
101. Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3): 503-517.
102. Porchet N, Aubert JP (2000). Southern blot analysis of large DNA fragments. *Methods Mol Biol* 125: 313-321.
103. Yun JJ, Heisler LE, Hwang, II, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS, Der SD (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 34(12): e85.
104. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11): 1788-1795.

105. Povirk LF, Austin MJ (1991). Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 257(2): 127-143.
106. Huang YP, Kim Y, Li Z, Fomenkov T, Fomenkov A, Ratovitski EA (2005). AEC-associated p63 mutations lead to alternative splicing/protein stabilization of p63 and modulation of Notch signaling. *Cell Cycle* 4(10): 1440-1447.
107. Sawamura D, Goto M, Shibaki A, Akiyama M, McMillan JR, Abiko Y, Shimizu H (2005). Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Ther* 12(10): 857-861.
108. Yasukawa K, Sawamura D, Goto M, Nakamura H, Shimizu H (2007). Histone deacetylase inhibitors preferentially augment transient transgene expression in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 157(4): 662-669.
109. Sato J, Nishimura M, Yamazaki M, Yoshida K, Kurashige Y, Saitoh M, Abiko Y (2013). Expression profile of drosomycin-like defensin in oral epithelium and oral carcinoma cell lines. *Arch Oral Biol* 58(3): 279-285.
110. Sumer C, Boz Er AB, Dincer T (2019). Keratin 14 is a novel interaction partner of keratinocyte differentiation regulator: receptor-interacting protein kinase 4. *Turk J Biol* 43(4): 225-234.
111. Liu S, He L, Sheng C, Su R, Wu X, Sun Y, Xi X (2021). Overexpression of RIPK4 Predicts Poor Prognosis and Promotes Metastasis in Ovarian Cancer. *Biomed Res Int* 2021: 6622439.
112. Boz Er AB (2016). RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin Etkileşimlerinin Araştırılması. . Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji.

