

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL BİYOTEKNOLOJİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ 3 (*FGF3*) GENİNDE
TANIMLANAN L6P VE S156P MUTASYONLARININ ETKİLERİNİN *IN*
***VITRO* ANALİZİ**

Murat BAŞARAN

Danışman Öğretim Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

Ankara 2010

ONAY

Yrd. Doç. Dr. Arzu Atalay danışmanlığında, Murat BAŞARAN tarafından hazırlanan "FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ 3 (*FGF3*) GENİNDE TANIMLANAN L6P VE S156P MUTASYONLARININ ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZİ" adlı tez çalışması 23/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Enstitüsü Anabilim Dalı'nda Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: _____

Üye : _____

Üye : _____

Bu tez, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur, sunumu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

ÖZET

İşitme kaybı ve sağırılık dünya çapında en az 278 milyon insanı etkileyen küresel bir sorundur. Bu insanların yaklaşık olarak üçte ikisi gelişmiş ülkelerde yaşamaktadır. Bu ülkelerde uygulanan yeni doğan görüntüleme programları her 1000 çocuktan 1,33-1,86'sında konjenital işitme kaybının olduğunu göstermektedir. İşitme kayıpları doğuştan veya sonradan kazanılmış olabilir. Genetik nedenler, doğuştan işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluşturmaktadır. Genetik nedenli işitme kayıplarının yaklaşık %30'una başka klinik bulgular eşlik etmekte olup bu olgular sendromik işitme kaybı olarak adlandırılır.

İç kulakta işitme ve denge organlarının hiç gelişmediği (tüm labirentin aplazisi-Michel aplazisi), küçük aurikula (mikroşi) ve küçük dişler (mikrodonti)'in otozomal resesif olarak kalıtıldığı yeni bir sendrom 2007 yılında tanımlanmış (OMIM 610706, **L**AMM (**L**abirent **A**plazisine bağlı doğuştan işitme kaybı, **M**ikroşi ve **M**ikrodonti)) ve bu otozomal resesif sendroma neden olan homozigot mutasyonların Fibroblast Büyüme Faktörü 3 (*FGF3*) geninde olduğu gösterilmiştir (Tekin 2007). *FGF3* geni tarafından kodlanan FGF3 proteini hücre dışına salınan ve embriyonik dönemde ifade edilen bir proteindir. Bu tez çalışmasında *FGF3* geninde önceden tanımlanan p.L6P ve p.S156P mutasyonlarının proteinin hücre dışına atılmasını nasıl etkilediği araştırılmıştır. *FGF3* genindeki bu iki mutasyon bölgeye özgü mutagenез ile oluşturulup, mutant proteinler memeli hücre kültüründe ifade ettirildikten sonra normal ve mutant FGF3 proteinlerinin hücre içindeki lokalizasyonu ve miktarları analiz edilmiş ve mutant proteinlerin hem lokasyon hem de miktarlarının farklılaştığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: FGF3, mutasyon, sinyal peptid, bölgeye özgü mutagenез

ABSTRACT

Hearing loss and deafness are global issues that affect at least 278 million people worldwide. Two third of these people live in developed countries (Tucci vd 2010). Screening of newborns for hearing loss in these countries have shown that congenital hearing loss affects 1,33-1,86 of 1000 children. Hearing loss can occur congenitally or postnatally. Genetic causes account for approximately %50-60 of congenital hearing loss. Approximately 30% of the genetically caused hearing loss is accompanied by other clinical findings and these cases are referred to as syndromic hearing loss (Nance 2003).

A new autosomal recessive syndrome with type I microtia (shortening of auricles), microdontia, and profound congenital deafness associated with a complete labyrinth aplasia have been discovered in 2007 (OMIM 610706, **LAMM** (Deafness with Labyrinthine Aplasia, Microtia, and Microdontia, (Tekin vd 2007)) and it has also been shown that homozygous mutations causing this autosomal recessive syndrome are in the fibroblast growth factor 3 (*FGF3*) gene (Tekin vd 2008). FGF3 protein, which is encoded by *FGF3* gene, is a secreted protein that is expressed at the embryonic stage. In this study, the *in vitro* effects of two previously identified missense mutations, p.L6P and p.S156P, on secretion of this protein were investigated. After these two mutations were mimicked by site-directed mutagenesis, mutant proteins have subsequently been expressed in cell culture, normal and mutant FGF3 proteins are analyzed for determining the intracellular localization and the quantification. As a result, in contrast to the normal protein, it was found that there have been differences for localization and quantification in mutant FGF3 proteins.

Key Words: FGF3, mutation, signal peptide, site-directed mutagenesis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemedi her şekilde yanımda olan ve yol gösteren ve bundan sonraki hayatımda da aynı derecede yol göstericiliğine ihtiyaç duyacağım değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY'a,

Bu tez çalışmasına proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a,

Hep yanımda olan, kıymetli düşünceleri ve fikirleriyle, hiç bitmeyen enerjisi ve güleryüzlüğüyle, kişisel olarak ve tez çalışmamda tecrübesiyle bana yardımcı olan, çalışma arkadaşım, dostum, akıl hocam, hocam Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü MHB birimi üyeleri, arkadaşlarım, Mol. Bio. Nuri ERGEN ve Uzm. Bio. F. Funda DEMİRİSOY'a,

DNA dizi analizi çalışmalarında büyük bir özveriyle yardımcı olan Uzm. Bio. Nilgün TEKİN'e,

Konfokal Mikroskop görüntülerimi alırken sonsuz hoşgörüsü ve sabrıyla bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Can ÖZEN'e,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

Hayatım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için, değerli aileme, anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz, 2010

Murat BAŞARAN

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Kulağın Yapısı ve İşitme	5
2.2. Fibroblast Büyüme Faktörleri	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Genel Reaktifler.....	13
3.1.2. Nükleik Asitler ve Proteinler	13
3.1.3. Oligonükleotidler.....	13
3.1.4. Enzimler	13
3.1.5. Kullanılan antikorlar.....	13
3.1.6. Primerler ve Amplifikasyon Bölgeleri	14
3.1.7. Bakteri Kültürleri.....	18
3.1.8. Plazmidler.....	18
3.1.9. Hücre Hatları	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Transformasyon	21
3.2.2. Plazmid DNA İzolasyonu.....	21
3.2.3. Restriksiyon Endonükleaz Kesimi.....	21
3.2.4. Ligasyon	22
3.2.5. Agaroz Jel Elektrophorezi.....	22
3.2.6. Nükleik asit konsantrasyonunun ölçülmesi	23
3.2.7. Total RNA İzolasyonu.....	23
3.2.8. DNaz I muamelesi ile RNA örneklerinden DNA uzaklaştırılması.....	24
3.2.9. Fenol-Kloroform Yöntemi.....	24
3.2.10. RT-PCR ile cDNA sentezi.....	25

3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu	25
3.2.12. PCR ürünü Saflaştırılması	26
3.2.13. Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması	26
3.2.14. DNA Dizi Analizi.....	26
3.2.15. Bölgeye Özgü Mutageniz Yöntemi	27
3.2.16. Hücre Hatlarının İdamesi ve Pasajlanması.....	29
3.2.17. Hücre Hatlarının Transfeksiyonu	29
3.2.18. İmmün Floresan Boyama.....	30
3.2.19. Western Blot (İmmünblotlama).....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. pcDNA3.1.FGF3 DNA Dizi Analizi	34
4.2. <i>FGFR2</i> cDNA'sının pcDNA3.1 Memeli İfade Vektörüne Aktarılarak Klonlanması	39
4.2.1. <i>FGFR2</i> cDNA'sının Amplifikasyonu	39
4.2.2. <i>FGFR2</i> cDNA'sının pcDNA3.1 Vektörüne Aktarılması	39
4.2.3. pcDNA3.1.FGFR2 DNA Dizi Analizi	42
4.3. Bölgeye Özgü Mutageniz ile pcDNA3.1.FGF3 Plazmidinde L6P ve S156P Mutantlarının Oluşturulması	45
4.4. Memeli Hücre Hatlarının Normal ve Mutant FGF3 ile Transfeksiyonu, Ektopik FGF3'ün mRNA Tayini.....	54
4.5. Memeli Hücre Hatlarının Normal ve Mutant FGF3 ile Transfeksiyonu Sonucu, Ektopik FGF3'ün Protein Miktarı Tayini	58
4.6. FGF3 ve FGFR2'nin Lokalizasyon Analizi.....	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
6. KAYNAKLAR	77
EKLER	82
EK-1: pcDNA3.1.FGF3 Dizisi.....	82
EK-2: pcDNA3.1.FGFR2 Dizisi	84
EK-3: Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri	87
ÖZGEÇMİŞ.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.1: Kullanılan antikorlar ve kullanım dilüsyonları.	14
Çizelge 3.1.2: DNA dizi analizinde kullanılan T3, T7 ve BGH primerleri.....	15
Çizelge 3.1.3: <i>FGFR2</i> cDNA'sı için tasarlanan klonlama primerleri.	15
Çizelge 3.1.4: Bölgeye özgü mutagenез ile L6P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti.	16
Çizelge 3.1.5: Bölgeye özgü mutagenез ile S156P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti.	16
Çizelge 3.1.6: Ektopik FGF3 mRNA tayininde kullanılan primerler	18
Çizelge 3.2.1: DNA dizi analizi reaksiyonu	27
Çizelge 3.2.2: Klasik mutagenез aşamasında kullanılan PCR parametleri.	29
Çizelge 3.2.3: Protein örneklerinin Bradford testi ile konsantrasyon tayini	32
Çizelge 4.2.1: <i>FGFR2</i> klonlama primerleriyle gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun programı.	40
Çizelge 4.4.1: HPRT ve FGF3 primerleriyle gerçekleştirilen mRNA tayini sırasında kullanılan PCR parametreleri.	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1: Sendromdan etkilenen hastaların klinik fotoğrafları.....	2
Şekil 2.1.2: p.L6P mutasyonunun FGF3 proteininin sinyal peptid bölgesi üzerindeki etkisi.	3
Şekil 2.1.3: FGF3 proteini protein-protein BLAST sonucu. 156. kodondaki serin aminoasidi birçok organizmada korunmuştur.	4
Şekil 2.1.1: Kulağın anatomik yapısı.....	6
Şekil 2.1.2: Otik morfogenezin başlangıcında FGF3 fonksiyonunu gösteren model.....	8
Şekil 2.2.1: FGF reseptörleri ve FGF sinyal iletim yolağı.	10
Şekil 3.1.1: <i>FGFR2</i> cDNA dizisi ve tasarlanan klonlama primerlerinin dizideki bağlanma bölgeleri.	15
Şekil 3.1.2: L6P mutagenezi aşaması sırasında kullanılan, mutasyon bölgelerini ve kesim bölgelerini içeren primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisindeki konumu.....	17
Şekil 3.1.3: S156P mutagenezi aşaması sırasında kullanılan, mutasyon bölgelerini ve kesim bölgelerini içeren primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisindeki konumu.....	17
Şekil 3.1.4: pcDNA3.1 (+) memeli ifade vektörünün haritası	19
Şekil 3.1.5: pCMV.GFP plazmidinin haritası	20
Şekil 3.2.1: DNA molekül ağırlığı belirteçleri.	23
Şekil 3.2.2: Klasik mutagenez sisteminin temel adımları.	28
Şekil 4.1.1: pcDNA3.1+hFGF3 koloni 11'in T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.	35
Şekil 4.1.2: pcDNA3.1+hFGF3 koloni 11'in T7 primeri ile okunan dizinin referans diziyle karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.1.3: pcDNA3.1+hFGF3 koloni 11'in BGH primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.	37
Şekil 4.1.4: pcDNA3.1+hFGF3 koloni11'in BGH primeri ile dizi analizi, okunan dizinin referans diziyle karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.2.1: <i>FGFR2</i> cDNA'sını <i>HindIII</i> ve <i>XhoI</i> enzimleri ile kesildikten sonra alınan agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 4.2.2: Kesilen pcDNA3.1 plazmidinin ve <i>FGFR2</i> pcr ürünün agaroz jelden izolasyonu.....	40
Şekil 4.2.3: <i>FGFR2</i> cDNA'sının ligasyon sonrası, plazmidlerin <i>HindIII</i> ve <i>XhoI</i> enzimleriyle kesilerek kontrolü.	41

Şekil 4.2.4: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.	42
Şekil 4.2.5: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin T7 primeri ile okunan dizinin referans diziyile karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.2.6: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.	44
Şekil 4.2.7: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin BGHR primeri ile okunan dizinin referans diziyile karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.3.1: L6P mutagenesi için PCR1 ve PCR2 reaksiyonu ve jel kesimi.	45
Şekil 4.3.2: S156P mutagenesi için PCR1 ve PCR2 reaksiyonu ve jel kesimi.	46
Şekil 4.3.3: L6P ve S156P mutagenesi için PCR3 reaksiyonu ve jel kesimi.....	46
Şekil 4.3.4: Mutagenes PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.3.5: pcDNA3.1.FGF3'ün ve L6P PCR3 ürününün <i>SacI</i> ve <i>KpnI</i> enzimleri kullanılarak kesilmesi.....	47
Şekil 4.3.6: pcDNA3.1.FGF3'ün ve S156P PCR3 ürününün <i>KpnI</i> ve <i>XhoI</i> enzimleri kullanılarak kesilmesi.....	48
Şekil 4.3.7: pcDNA3.1.FGF3'ün ve PCR3 ürünlerinin restriksiyon kesim enzimleri kullanılarak kesilmesi.....	49
Şekil 4.3.8: İzole edilen L6P plazmidlerinin kesim enzimleri kullanılarak kontrolü.....	50
Şekil 4.3.9: İzole edilen S156P plazmidlerinin kesim enzimleri kullanılarak kontrolü.....	51
Şekil 4.3.10: pcDNA3.1.FGF3.L6P koloni 4 için T7 primeri ile yapılan DNA dizileme sonuçları.	52
Şekil 4.3.11: pcDNA3.1.FGF3.L6P koloni 4'ün T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi, c.17T>C, mutagenes yapılan bölge.....	52
Şekil 4.3.12: pcDNA3.1.FGF3.S156P koloni 1 için BGHR primeri ile yapılan DNA dizileme sonuçları.....	53
Şekil 4.3.13: pcDNA3.1.FGF3.S156P koloni 1'in BGHR primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi, c.466T>C, mutagenes yapılan bölge.....	54
Şekil 4.4.1: HEK293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu ve immünblot sonucu (48hr).....	56
Şekil 4.4.2: pCMV.GFP plazmidi ile yapılan transfeksiyon (24, 48 ve 72. saatler)	56
Şekil 4.4.3: HPRT ve FGF3 primerleriyle gerçekleştirilen mRNA miktar tayini.....	58

Şekil 4.5.1: HEK293 hücrelerinin pcDNA3.1-hFGF3 plazmidi ile transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72. saatlerde elde edilen total hücre lizatları ile gerçekleştirilen immüblotlama sonuçları.	59
Şekil 4.5.2: Normal ve mutant FGF3'ün transfeksiyon sonrası 48. saatte Western Blot ile analizi.	59
Şekil 4.5.3: FGF3 ve FGFR2 ile yapılan kotransfeksiyon.	61
Şekil 4.6.1: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları.	63
Şekil 4.6.2: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları.	64
Şekil 4.6.3: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları.	65
Şekil 4.6.4: FGF3 transfeksiyonu sonrası FGF3, kalneksin ve DNA boyamaları	66
Şekil 4.6.5: FGF3.S156P mutantı ve FGFR2 transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları	67
Şekil 4.6.6: FGF3.S156P mutantı ve FGFR2 transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları	68
Şekil 4.6.7: FGF3.S156P mutantı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları	69
Şekil 4.6.8: FGF3.S156P mutantı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları	70
Şekil 4.6.9: FGF3.L6P mutantı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları	71
Şekil 4.6.10: FGF3.L6P mutantı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları	72
Şekil 4.6.11: MCF-7 hücre hattının FGF3-FGFR2-L6P-S156P transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C : Santigrat derece
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
µM : Mikromolar
bç : Baz çifti
BSA : Bovine Serum Albumin
cDNA : Komplementer DNA
ddH₂O : Çift Distile Su
DEPC : Dietilpirokarbonat
dNTP : Deoksinükleozid Trifosfat
dk : Dakika
DMEM :Dulbecco's Mod"ified Eagles's Medium
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
g : Gram
g : Yer çekimi Kuvveti
GFP : Yeşil Floresan Proteini
He-Ne : Helyum-Neon
kb : Kilobaz
kDa : Kilo dalton
Leu : Lösin
M : Molar
ml : Mililitre
mM : Milimolar
mRNA: mesajcı RNA
NaOAc : Sodyum Asetat
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pro : Prolin
RNA : Ribonükleik asit
rpm : Dakikada dönüş sayısı
Ser : Serin
sn : Saniye

TBE: Tris Borik Asit EDTA

1. GİRİŞ

İşitme kaybı ve sağırılık dünya çapında en az 278 milyon insanı etkileyen küresel bir sorundur. Bu insanların yaklaşık olarak üçte ikisi gelişmiş ülkelerde yaşamaktadır (Tucci *et al.* 2010). Bu ülkelerde uygulanan yeni doğan görüntüleme programları her 1000 çocuktan 1,33-1,86 'sında kongenital işitme kaybının olduğunu göstermektedir. Etiyolojik olarak heterojen bir durum olan işitme kaybının bilinen birçok genetik ve çevresel etkenleri bulunmaktadır. Genetik etkenler, kongenital işitme kayıplarının en az yarısından sorumlu olmakla birlikte, kalıtımın çeşidine göre ve sendromik işitme kaybının spesifik bir biçiminin teşhisine izin veren karakteristik klinik özelliklerin varlığına göre sınıflandırılabilir. İşitme kaybıyla alakalı 120'den fazla bağımsız genin tanımlanması, işitme patofizyolojisine derin bir bakış açısı sağlamıştır (Nance 2003). Diğer yandan işitme kaybına neden olan bazı önemli çevresel faktörler, erken doğum, doğum öncesi ve doğum sonrası geçirilen enfeksiyonlar (kızamıkçık veya sitomegalovirus gibi), beyin travması, beyin zarının orta tabakasıyla en iç tabakasının arasında kalan subaraknoid bölgedeki kanama ve farmakolojik ototoksisite olarak görülebilmektedir (Morton and Nance 2006).

Sendromik olan ve sendromik olmayan şeklinde sınıflandırılan genetik kökenli işitme kayıplarının, yaklaşık olarak %50-60'ı çocukluk döneminde oluşmakta olup (Morton and Nance 2006), 400'den fazla sendromun birinde görülen vakaların %20'si ila %30'u arası iç kulakta çoklu yapısal bozuklukların görüldüğü farklılık gösteren işitme kayıplarıyla ilişkilendirilebilmektedir (Bamiou vd 2000; Mafong vd 2002).

İşitme kayıpları bireylerin çevreleriyle iletişim kopukluğuna dayalı psikolojik problemlere neden olabilmekte ve dolayısıyla sağlıklı kişisel gelişimlerine engel teşkil edebilmektedir. Hastaların yaşam kalitelerini büyük ölçüde düşüren işitme kayıplarının büyük bir bölümüne iç kulaktaki yapıların hiç gelişmemesi veya az gelişmesi neden olabilmektedir.

İç kulakta işitme ve denge organlarının hiç gelişmediği (tüm labirentin aplazisi-Michel aplazisi), küçük aurikula (mikroşi) ve küçük dişler (mikrodonti)'in otozomal resesif olarak kalıtıldığı yeni bir sendrom Mustafa Tekin ve çalışma ekibi tarafından tanımlanmıştır (OMIM 610706, **L**AMM (**L**abirent **A**plazisine bağlı doğuştan işitme kaybı, **M**ikroşi ve **M**ikrodonti, (Tekin *et al.* 2007)). Bu sendroma ait klinik bulguları taşıyan

hastalarda doğuştan duyuşal sağırlık, tip 1 mikroş (küçük ve içe doğru kıvrılan kulak kepçesi), mikrodonti (küçük ve geniş aralıklı dişler) gibi başlıca üç fenotipik etki görölmüşür (Şekil 2.1.1, (Tekin *et al.* 2007)). Bu fenotipik bulgulara sahip toplam 13 hasta birbiriyle akraba olmayan beş aileden gelmektedir. Bu otozomal resesif sendroma neden olan homozigot mutasyonların Fibroblast Büyüme Faktörü 3 (*FGF3*) geninde olduğı da tespitir edilmiştir (Tekin *et al.* 2008). Bu hastalarda *FGF3* geninde beş farklı mutasyon tanımlanmıştır. Hücre proliferasyonunun, hücre migrasyonunun ve embriyonik dönemde hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan *FGF3* geninde meydana gelen farklı mutasyonlar ilgili tüm ailelerde görölen LAMM sendromuna neden olmaktadır. Gelişim evresinde kritik görevleri üstlenen *FGF3* geni tarafından kodlanan FGF3 proteini, hücre dışına salınan ve embriyonik dönemde ifade edilen bir proteindir.

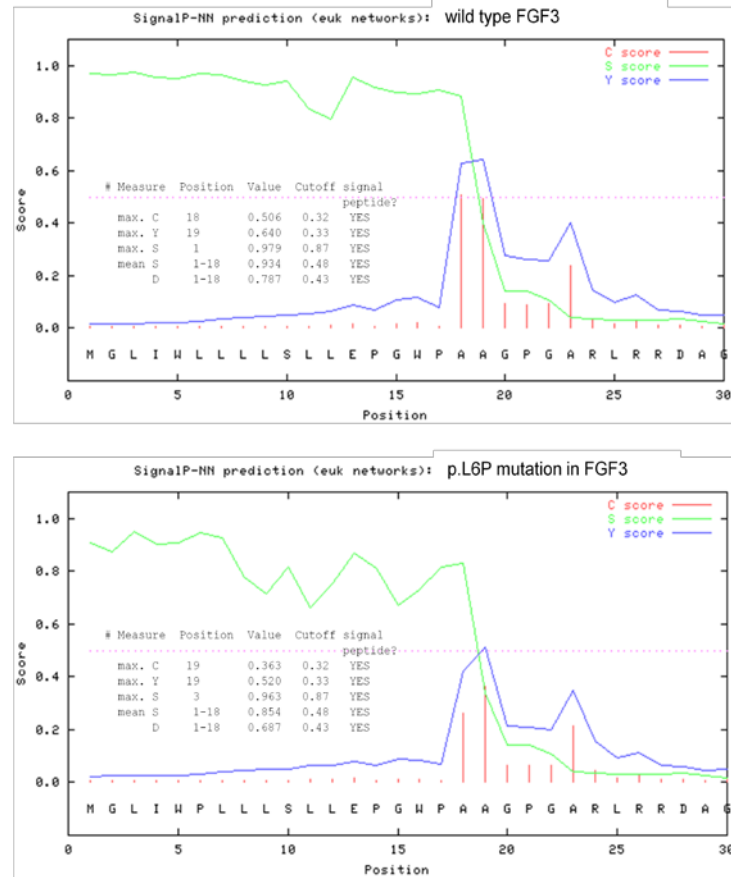


Şekil 2.1.1: Sendromdan etkilenen hastaların klinik fotoğrafları.

Hastalarda tip 1 mikroş ve mikrodonti ve yaşla birlikte belirginleşen uzun yüz fenotipi görölmektedir.

Bu çalışmada, *FGF3* geninde tanımlanan, LAMM sendromunda görölen fenotipe yol açan iki adet yanlış anlam mutasyonunun (p.L6P ve p.S156P), FGF3 proteininin hücre dışına salınımındaki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, p.Ser156Pro ve p.Leu6Pro mutasyonlarının proteinin işlevi üzerine olan *in vitro* etkileri analiz edilmiştir. p.L6P mutasyonu proteinin sinyal peptid dizisi içinde bulunmaktadır; sinyal peptidin işlevi proteinin endoplazmik retikuluma gitmesi ve burada olgun peptid oluşurken uygun

noktanın kesilmesinin sağlanmasıdır, bu da *in vitro* ortamda test edilebilir bir model teşkil etmektedir. p.L6P mutasyonunun sinyal peptid üzerindeki etkisi SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) programı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.1.2). Bu değerlendirmede mutant proteinde sinyal peptid özelliklerinin azalabileceği ve böylece olgun protein ayrılma noktasının değişebileceği öngörülmektedir (Tekin *et al.* 2008).



Şekil 2.1.2: p.L6P mutasyonunun FGF3 proteininin sinyal peptid bölgesi üzerindeki etkisi.

Yabancıl tip ve mutant proteinler FASTA formatında ‘neural networks’ ve ‘hidden Markow’ modellerinde SignalP 3.0 programında incelenmiştir. Bu şekilde yalnızca ‘neural networks’ modeli gösterilmektedir. S-score her amino asit için ayrı ayrı hesaplanmakta ve yüksek skorlar amino asitin sinyal peptid dizisine ait olduğunu göstermektedir. C-score olgun proteinin sinyal peptidinden ayrıldığı yeri göstermektedir. Y-max ise C-score ve S-score’un birlikte değerlendirildiği bir ayrılma noktası öngörü değeridir. S-mean S-score ortalamasıdır. D-score ise S-mean ve Y-max’ın ortalamasıdır (Tekin *et al.* 2008).

FGF3 proteinindeki p.S156P mutasyonu ise genin üçüncü ekzonunda (c.466T>C), proteinin karboksi terminaline yakın bölgesinde bulunmaktadır. Prolin aminoasidinin

proteinlerin ikincil yapısında dirsek oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, 156. kodondaki Serin aminoasidi evrimsel olarak yüksek bir oranda korunmaktadır (Şekil 2.1.3, (Tekin *et al.* 2007)). Dolayısıyla bu bölgedeki p.S156P mutasyonunun proteinin ikincil yapısında değişikliğe yol açması olasıdır.

156

Homo sapiens: Q P S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Pan troglodytes: Q P S A E K L W Y V S V N G K G R P R R G
Macaca mulatta: Q P S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Mus musculus: Q P G A Q R P W Y V S V N G K G R P R R G
Rattus norvegicus: Q P G A Q R P W Y V S V N G K G R P R R G
Canis familiaris: Q P S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Bos taurus: Q P S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Monodelphis domestica: K A S A E R L W Y V S I N G K G R P R R G
Gallus gallus: K A S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Xenopus tropicalis: K A S A E R L W Y V S I N G K G R P R R G
Xenopus laevis: K A S A E R L W Y V S V N G K G R P R R G
Danio rerio: R A S S K R Q W Y V S I N G K G R P R R G
Takifugu rubripes: R A S V K R Q W Y V S I N G K G R P R R G
Gasterosteus aculeatus: R A S A K R Q W Y V S I N G K G R P R R G
Oryzias latipes: R A S T E K L W Y V S I N G K G R P R R G

Şekil 2.1.3: FGF3 proteini protein-protein BLAST sonucu. 156. kodondaki serin aminoasidi birçok organizmada korunmuştur.

TÜBİTAK tarafından 108S067 proje numarası ile desteklenen bu tez çalışması kapsamında, *FGF3* genindeki yukarıda bahsedilen iki mutasyon bölgeye özgü mutagenез yapılarak oluşturulmuş, normal ve mutant proteinler memeli hücre kültüründe ektopik olarak ifade ettirilmiş, ardından normal ve mutant FGF3 proteinlerinin hücre içindeki lokalizasyonu/akıbeti ve yine ektopik olarak ifade ettirilen FGFR2 reseptörü ile interaksyonları incelenmiştir. LAMM sendromuna yol açan *FGF3* mutasyonlarının *in vitro* etkilerinin analizi sonucu, bu sendromun oluşum mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

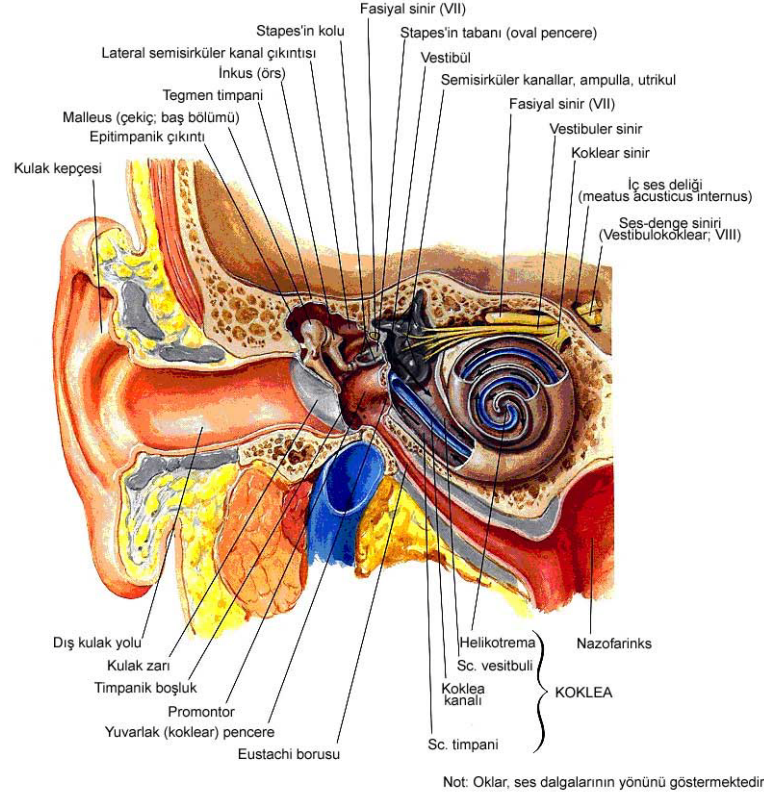
İşitme kayıpları çok çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulsalar da bunların içinde en önde gelen sınıflama işitme kaybının yerleştiği bölgeye göre yapılan sınıflamadır. İşitme kaybını yaratan hastalık dış ve orta kulakta yerleşmişse (kepçe anomalileri, dış kulak yolunun oluşmadığı durumlar, kulak zarı hastalıkları, orta kulak kemikçiklerinin çeşitli hastalıkları) buna sesin iç kulağa iletilmesinde sorun olduğu için "iletim tipi işitme kaybı" verilir. İç kulak ve/veya işitme sinirinin etkilendiği doğumsal veya sonradan meydana gelen hastalıklarda, kulağın sesi algılamasında bozukluk olduğu için alıcı (sensorinöral) tip işitme kaybı oluşur. Doğumsal işitme kayıplarının genellikle iç kulak kökenli olduğu, sonradan meydana gelen işitme kayıplarının ise hem iç kulak hem işitme siniri veya ayrı ayrı her birini tutabilmektedir. Doğumsal işitme kayıplarında iç kulak kökenli olma olasılığı çok yüksek olduğu için tam tedavi olasılığı düşüktür. Buna karşılık, yetişkinlerde sonradan edinilen hastalıklara bağlı olarak gelişen işitme kaybının tedavi edilebilme olasılığı daha yüksektir.

Genetik ve çevresel etkenlerin de neden olabildiği işitme kaybının kaynağı değişik şekillerde kendini gösterebilir. Bunlardan, doğuştan itibaren mevcut olan işitme kayıpları tüm işitme kayıplarının yaklaşık %50-60'ını oluştururken, genetik etkenlere dayalı işitme kayıplarının %70-80'i sendromik olmayan işitme kaybı olabilmektedir. Sendromik olmayan işitme kayıplarının %80'i ise otozomal resesif işitme kayıplarıdır (Nance 2003).

2.1. Kulağın Yapısı ve İşitme

İşitme ve denge işlevlerini gören kulak, dış kulak (auris externa), orta kulak (auris media), iç kulak (auris interna) olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1.1).

Dış kulak, kulak kepçesi ve dış kulak kanalından meydana gelir. Kulak kepçesi tarafından toplanan ses dalgaları, dış işitme kanalından geçirerek kulak zarına (timpanik zara) iletilir. Kulak zarı bu ses dalgalarını hava ile dolu olan orta kulağa iletir.



Şekil 2.1.1: Kulağın anatomik yapısı.

(<http://www.baskent.edu.tr/~scanan/sesweb/kulak.htm>)

Orta kulak, dış kulak yolundan kulak zarı ile ayrılır. İçi havayla dolu olan bir boşluk yapısına sahip orta kulak, geniz ile arasında bir irtibat sağlayan östaki borusunu içerir. Orta kulakta bulunan sırasıyla, çekiç (malleus), örs (inkus), özengi (stapes) adı verilen üç işitme kemikçığı, bir ses iletim zinciri oluşturmaktadır. Orta kulak, içerdiği bu yapıların da katkısıyla kulak zarına gelen sesleri toplayıp iç kulağın oval penceresine iletir. Kulak zarında oluşan ses titreşimleri, özengi kemiğine iletilir. Bu titreşimler nedeniyle iç ve dış doğru hareketler oluşturan oval pencere bu hareketleri iç kulağın sıvı ortamına taşır. Böylece ses dalgaları dış kulaktan itibaren orta kulağa ve daha sonra da iç kulak sıvılarına iletilmektedir. Gelen titreşimler işitme siniri yoluyla beyindeki işitme merkezine taşınır.

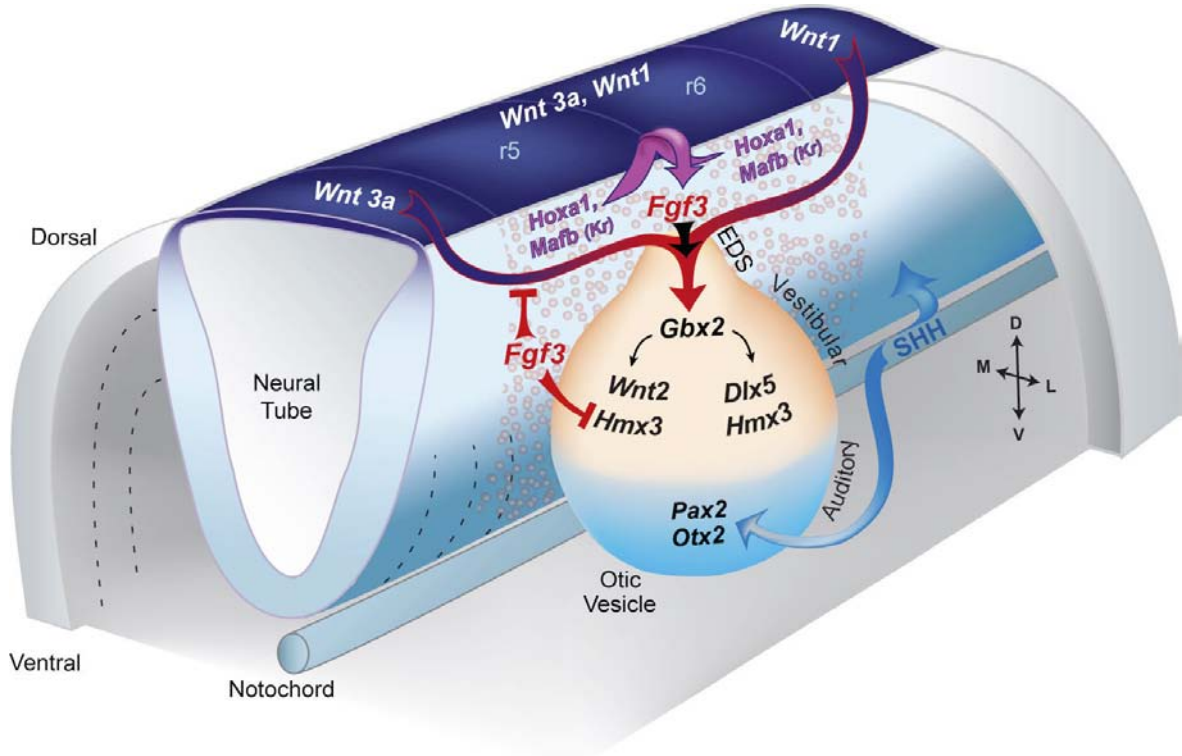
İç kulak, salyangoz şeklinde bir yapısı olan ve iç kulak sıvılarını ve tüy hücrelerini içeren koklea ve denge organı olan vestibülden oluşmaktadır. Yetişkin iç kulağı yapısal olarak son derece karmaşıktır, embriyonik olarak otik plaktan köken almaktadır. Nöral krest kökenli sekretuvar epitelyumun melanosit hücreleri ve ganglianın Schwann hücreleri

dışında, birincil eferent nöronlarda dahil olmak üzere iç kulağın bütün hücresel bileşenleri otik plak kaynaklıdır (D'Amico-Martel and Noden 1983; Rubel and Fritzsch 2002). Kraniyal plaklar ise, nöral katmanın dışında kalan özelleşmiş ektoderm bölgeler olup, bütün kraniyal duyusal organlara ve baş bölgesinin periferik sinir sistemine katkıda bulunurlar.

İç kulak gelişiminin, plak indüksiyonunun ve vezikül oluşumunun erken evreleri süresince FGF3'ün fare, tavuk ve zebra balığı gibi farklı omurgalılarda yüksek oranda korunmuş bir rol oynadığı bilinmektedir (Brown vd 2003). Farede gelişen arka beyinde otik plak indüksiyonundan önce ve otik plak indüksiyonu sırasında FGF3 ifadesi, iç kulak oluşum uyarıcısı olarak rol oynadığını göstermiştir (Wilkinson vd 1988). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda, farede *Fgf3*^{-/-}/*Fgf10*^{-/-} mutantlarında otik vezikül oluşumun gerçekleşmediği veya sadece mikrovezikül olduğu gösterilmekle beraber, bu çift mutantların otik plaklarında, FGF3'ün FGF10 ile birlikte otik marker genlerinin yönlendirilmesi için varlığının gerektiği bilinmektedir (Alvarez vd 2003; Wright and Mansour 2003).

FGF3'ün otik morfogenezin başlamasındaki fonksiyonunu gösteren modelde de görüldüğü gibi (Şekil 2.1.2), otik vezikülün moleküler modeli ve morfogenezini WNT sinyalleriyle başlar. *Fgf3*, vezikül gelişiminin ilk morfolojik işareti olarak bilinen EDS indüksiyonunu başlatan *Gbx2* seviyesinin korunmasına sağlamaktadır. Buna ek olarak, *Fgf3*, otik *Hmx3*'ün medyal yayılmasını, arka beyin *Wnt3a*'nın ise ventral yayılmasını engellemektedir (Hatch vd 2007).

Özet olarak, fibroblast büyüme faktörleri embriyonik gelişim sırasında birçok hücre farklılaşmasında rol almakla beraber işitme mekanizmasının iletim yolundaki en önemli adımlarından biri olan iç kulağın oluşumunda çok önemli bir rol üstlenmektedir.



Şekil 2.1.2: Otik morfogenezin başlangıcında FGF3 fonksiyonunu gösteren model.

Gelişen arka beyinin ve otik vezikülün, otik morfogenezin başlangıcının şeması. Model şu anda var olan yayınlamış bulgularla, önceden yayınlanmış bulguların bütünleştirilmiş halidir. Otik vezikülün moleküler paterni ve morfogenezi, koyu maviyle gösterilen *Wnt3a* ve *Wnt1* ifadesiyle, WNT sinyalleri ile başlamaktadır. Bu sinyal *Wnt2* ve *Dlx5*'i minimum seviyede tutan ve EDS başlangıcının dışarıya dorsal gelişimini sağlayan otik *Gbx2*'yi indüklemektedir. r5-6 bölgesinde indüklenen *Fgf3* ve *Mafk*(Kr), *Gbx2*'nin ve bu genin etkilediği genlerin ifadelerinin idamesine hizmet etmektedir fakat ventral otik genlere (*Pax2* ve *Otx2*) doğrudan bir etkisi olmamaktadır. Ayrıca, *Fgf3* otik *Hmx3*'ün mediyal yayılmasını, arkabeyin *Wnt3a*'nın ventral yayılmasını engellemektedir. *Pax2* ve *Otx2*'nin indüklenmesi yoluyla SHH'nin ventral otik oluşumundaki rolü gösterilmiştir (Hatch et al. 2007).

2.2. Fibroblast Büyüme Faktörleri

Çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında çeşitli sinyal yolları yüksek bir kordinasyonla aktive olmaktadır. Fibroblast büyüme faktörleri (FGFs), kemik morfojenik proteinleri (BMPs), WNT ve Hedgehog gibi salınan sinyal molekülleri, yakın veya uzak bölgedeki hücreler arası olayları etkileyerek gelişimde büyük rol oynamaktadırlar (Logan and Nusse 2004; Mikels and Nusse 2006). Fibroblast büyüme faktörleri çoğunlukla biyolojik etkilerini hücre zarındaki tirozin kinaz FGF reseptörlerine

(FGFRlar) bağlanarak gösteren çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip polipeptid büyüme faktörleridir. FGF sinyal iletim sistemi, farklılaşma, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu da içine alan birçok gelişimsel süreçte gereklidir (Ornitz and Itoh 2001; Itoh and Ornitz 2004; Thisse and Thisse 2005).

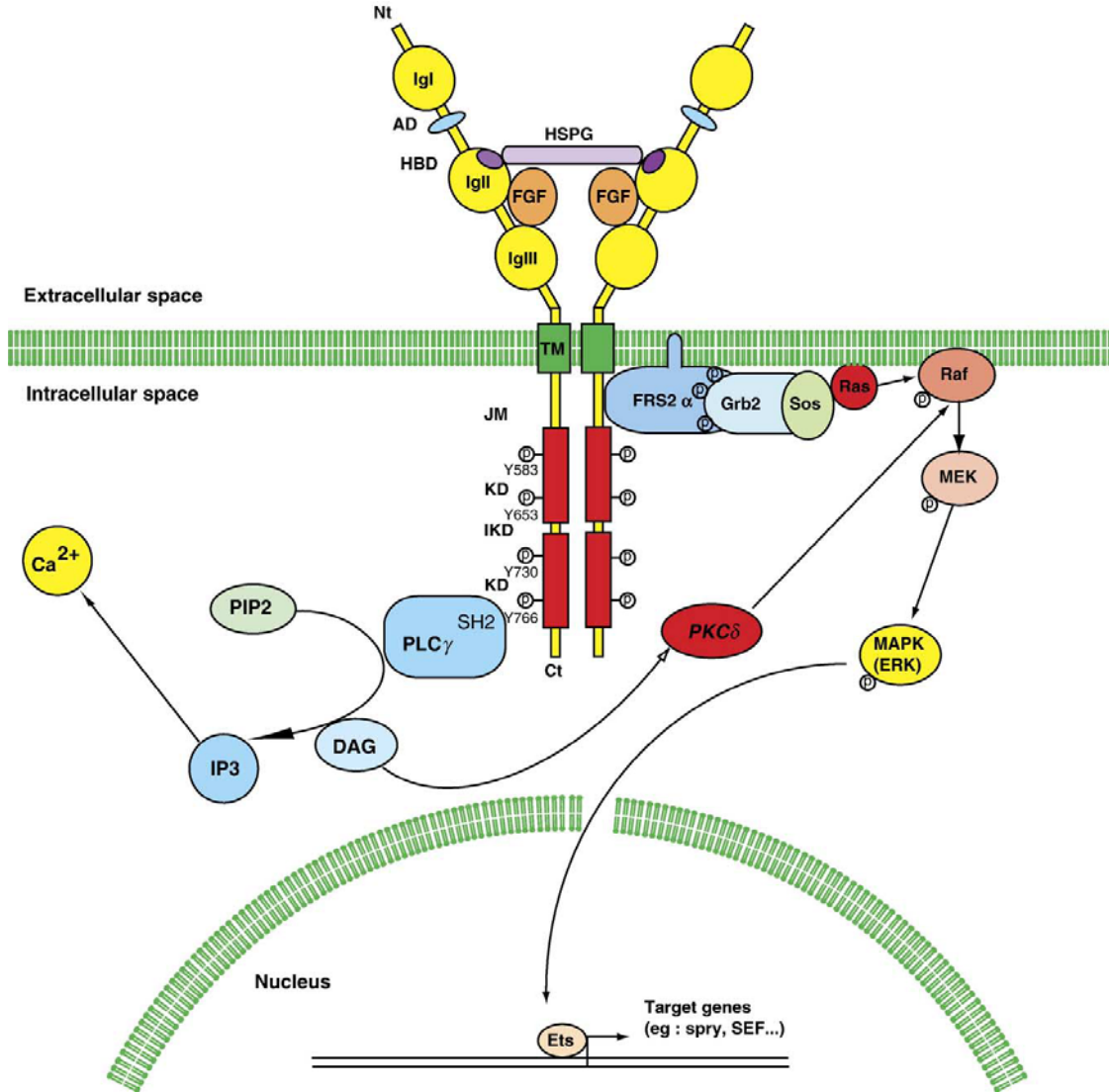
Bütün FGF'ler, yapısal benzerlik taşır ve heparine yüksek afinite gösterirler. FGF proteinleri, üç immünoglobulin benzeri bölgesi, bir heparin bağlanma dizisi olan tirozin kinaz reseptörlerine (FGFR) bağlanarak ve onları aktive ederek fonksiyon gösterirler.

İlk ayrıştırılan FGF1 ve FGF2'nin fibroblastların *in vitro* ortamda büyümesini sağladığı görüldüğü için bu isim verilmiştir. İnsanda şimdiye kadar 22 farklı FGF tanımlanmış (FGF 15 hariç) ve FGF1-23 arasında isimlendirilmiştir (Itoh 2007). FGF proteinlerinin boyu yaklaşık 150-250 aminoasit arasındadır ve bunun yaklaşık 120 aminoasitlik kısmı tüm FGF'lerde birbirine benzer.

FGF proteinleri, büyük çoğunluğu amino ucunda kesilebilen bir sinyal peptide sahip, salınan proteinlerdir. Bu dizi olgunlaşmak üzere proteinin endoplazmik retikuluma girmesini sağlamaktadır. Ancak, kesilmeyen iki parçalı sinyal dizisine sahip olan FGF9, FGF16 ve FGF20 proteinleri de salınan proteinlerdir (Miyakawa vd 1999; Revest vd 2000). Ayrıca, FGF1, FGF2, FGF11-FGF14 hidrofobik amino ucu dizisi olmayan ve tipik olarak salınan FGF'lerin dışında kalan proteinlerdir. FGF1 ve FGF2 hasar görmüş hücrelerden veya endoplazmik retikulum-Golgi yolağından bağımsız olan bir ekzositotik mekanizmadan salınıyor olabilir (Mignatti vd 1992). FGF11-FGF14 ise hücre içinde fonksiyonel olan fakat salınmayan proteinlerdir (Goldfarb 2005).

FGF proteinleri etkilerini hücre zarında bulunan dört adet (FGFR1-4) tirozin kinaz reseptör üzerinden gösterirler. Bu reseptörler, hücre dışında kalan kısımlarında, FGF'lere bağlanan bölgelerinde, üç adet immünoglobulin (I, II ve III) bölgesi, bir heparin bağlanma dizisi, bir transmembran bölgesi ve hücre içi bir tirozin kinaz bölgesi içerirler (Şekil 2.2.1). *FGFR1-FGFR3* genleri, mRNA'nın alternatif kırılması sonucu iki özgün ekzondan birini kullanarak, iki farklı immünoglobulin benzeri yapı (IIIb, IIIc) oluştururlar. İmmünoglobulin benzeri yapı III, ligand bağlanma özgülüğünü belirleyen önemli bir belirleyici faktördür. Bu yapıların alternatif kırılması sonucu farklı FGF'lere farklı eğilimle bağlanan ve farklı dokularda ekspresyonu olan sekiz adet izoform üretilir. Böylece

FGF ve FGFR'ler embriyonik gelişim sırasında çok farklı bölgelerde çok farklı işlevleri olan büyük bir grup olarak çalışırlar (Itoh 2007).



Şekil 2.2.1: FGF reseptörleri ve FGF sinyal iletim yolağı.

FGFR'ler 3 immüoglobulin bölgesi (IgI, IgII, IgIII) taşıyan modüler proteinlerdir. IgI ve IgII bir asidik bölge tarafından ayrılır (AD). IgII bir heparin bağlanma bölgesi taşır (HBD). IgIII bölgesini, özgün bir transmembran (TM), bir jukstamembran (JM) ve bir interkinaz tarafından ayrılmış bir kinaz bölgesi (KD) takip eder. Heparin sülfat proteoglikana bağlı FGF ligandları FGFR'nin IgII, IgIII'üne bağlanır. Bunun sonucunda dimerizasyona uğradıktan sonra spesifik tirozin rezidülerinin fosforilasyona uğrayarak transaktivasyonu gerçekleşir. İki ana sinyal iletim yolağı fosfolipaz C-γ (PLCγ) ve Ras/MAP kinazdır. PLCγ'nin SH2 bölgesi fosforilasyona uğramış olan reseptörün Y766 bölgesiyle iletişime girer. Aktivasyona uğramış PLCγ, fosfositil-inositol-4,5-difosfat (PIP2)'i inositol-1,4,5-trifosfat (IP3)'a ve diasilgliserol (DAG)'e hidrolize eder. IP3, Ca^{2+} açığa çıkarırken, DAG, protein kinaz C-δ (PKCδ)'yi aktive eder. Aktive olan PKCδ, Raf'ı S338 bölgesini fosforile ederek aktive eder ve aşağı doğru sinyal iletim yolağını Ras'tan bağımsız bir biçimde uyarır. Ana iletim yolağı, yavaşlama proteini olan (docking protein) FRS2α'nın 407-433 bölgesindeki

aminoasit rezidüleriyle iletişimini kapsar. Bu protein, birçok tirozin kinaz rezidülerinin fosforilasyonu ile aktive olur ve ardından Ras'ın aktivasyonunda nükleotit değişim faktörü olan Sos'a bağlı Grb2 ile iletişime girip aktive eder. Aktive olmuş Ras, MAP kinaz ERK'in fosforilasyonundan sorumlu olan MEK'i uyaran Raf'ı aktive eder. Bu son aktive olan bölüm, hücre çekirdeğine transloke olur ve FGF hedef genlerini aktive eden Ets ailesinin spesifik transkripsiyon faktörlerini fosforile eder (Thisse and Thisse 2005). P: fosforilasyon.

FGF3 geni ilk kez bir protoonkogen olarak klonlanmıştır (Dickson,1984). Fare embriyolarında *fgf3* mRNA'sı erken dönemde arka beyinde otik vezikülün hemen yakınlarında ve faringeal poşlarda gösterilmiştir (Wilkinson,1988). Daha büyük embriyolarda ve yenidoğanlarda *fgf3* ekspresyonu serebellum, retina, dişler ve iç kulakta gösterilmesine rağmen erişkin dokularında gösterilememiştir (Wilkinson,1988). *fgf3*'ün iç kulak gelişiminde önemli bir görevi olduğu zebra balığı, kurbağa, tavuk ve farelerde gösterilmiştir (Schimmang,2007). Ancak bugüne kadar yapılan iki fare 'knockout' modelinde otik vezikül indüksiyonunun olabildiği ve çok ağır iç kulak anomalilerinin gelişmediği de gösterilmiştir (Mansour,1993, Alvarez,2003).

İnsan *FGF3* geni 11q13 bölgesinde bulunur. Üç eksondan oluşan 1548 bazlık transkript 239 amino asit kodlar. İlk 17 aminoasit sinyal peptid bölgesini, geriye kalan aminoasitler ise olgun peptidi oluşturur. FGF3, etkisini FGFR2 reseptörünün b ve c izoformlarına bağlanarak gösterir (Mohammadi, 2005). Ancak, FGFR2b üzerinden etkisinin çok daha fazla olduğu bilinmektedir (Ornitz,1996).

Fare Fgf3 proteininin translasyon sonrası klasik yolak olan endoplazmik retikulum-golgi ve sekresyon ile parakrin olarak reseptör üzerinden etki etmesi dışında bir başka yolağa girebileceği de gösterilmiştir. Bu yolak proteinin yapısındaki nükleer sinyal özelliğindeki amino asitler aracılığıyla özellikle nükleusa gitmesidir. Bu yolağa giren Fgf3'ün hücre çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir (Antoine,1997,2005, Kiefer,1991,1993,1994,1995, Mathieu,1995). Fare Fgf3 proteininde sinyal dizisinin çıkarılması proteinin tamamıyla nükleusa lokalize olmasına neden olmuştur (Acland,1990).

FGF3 geninde insan hastalığına neden olan beş 'germline' mutasyon bildirilmiştir (Tekin,2007; Tekin,2008). İki yanlış anlam mutasyondan birisi, p.L6P, sekresyon sinyali bölgesindedir. p.S156P ise FGF'lerde korunmuş ve benzer olan 'core' bölgesinde

lokalizedir. Fare Fgf3 geninde nükleer lokalizasyon sinyali olduğu gösterilen bölgelerde mutasyon tanımlanmamıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Genel Reaktifler

Genel laboratuvar kimyasalları, Sigma Chemical Co. (St Louis, ABD) Sigma Chemical Co. (St.Louis, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya) ürünleri kullanılmıştır. Kitler Roche (Almanya) ve Invitrogen (ABD)'den temin edilmiştir.

3.1.2. Nükleik Asitler ve Proteinler

Bu çalışmada DNA moleküler ağırlık tespiti için 1kb DNA ladder ve 100 bp DNA ladder belirteçleri (New England Biolabs, USA) kullanılmıştır. Protein boyutu belirteçleri olarak Bio-Rad, Invitrogen ve Fermentas (SM1811)'tan sağlanmıştır.

3.1.3. Oligonükleotidler

PCR reaksiyonlarında kullanılan oligonükleotidler Metabion firmasından OPC veya HPLC pürifiye olarak temin edilmiştir.

3.1.4. Enzimler

Restriksiyon endonükleazlar MBI Fermentas ve Promega'dan; *Taq* polimerazlar, MBI Fermentas, Finnzymes, Invitrogen, Promega'dan; T4 DNA Ligaz New England Biolabs'tan temin edilmiştir. Reverse Transcriptaz, DNaz I, Roche'tan, DNA dizi analizinde kullanılan enzim karışımı olan Genome Lab DTCS Quick Start Mix Beckman Coulter firmasından sağlanmıştır.

3.1.5. Kullanılan antikorlar

Çalışma süresince kullanılan tüm Western Blot ve immün floresan aşamasında kullanılan antikorlar ve kullanım dilüsyonları çizelge 3.1.1'de özetlenmiştir:

Kullanılan Antikorlar	Katalog no	Western Blot	Immunfloresan	Abs/Ems (nm)
FGF3	Abcam ab10830	1:1000	1:500	
FGFR2	Abcam ab10648	1:1000	1:500	
Calnexin	Abcam ab22595		1:100	
B-actin-HRP	Abcam ab49900	1:5000		
Anti-GFP	Cell Signaling 2956S	1:1000		
Anti Mouse HRP	BioRad 170-5047	1:5000		
Anti Rabbit HRP	BioRad 170-5046	1:5000		
Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse)	Invitrogen A11001	-	1:1000	495/519
Alexa Fluor 568 (goat anti-rabbit)	Invitrogen A11011	-	1:1000	578/603
Alexa Fluor 594 (goat anti-rabbit)	Invitrogen A11012	-	1:1000	590/617
Toto-3-iodide	Invitrogen T3604	-	2 µM	642/660

Çizelge 3.1.1: Kullanılan antikorlar ve kullanım dilüsyonları.

3.1.6. Primerler ve Amplifikasyon Bölgeleri

Klonlamalarda, mutagenizde, ve PCR'da gen bölgelerine spesifik primerler Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) ve primer.exe programı kullanılarak tasarlanmıştır. Gen bölgelerine spesifik primer dizilerinin özgünlüğü blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak kontrol edilmiştir.

DNA dizi analizinde kullanılan T3, T7 ve BGH primer dizileri Çizelge 3.1.2'de verilmiştir. *FGFR2* cDNA'sı için tasarlanan klonlama primerleri Çizelge 3.1.3 'de, *FGFR2* cDNA dizisi ve tasarlanan klonlama primerlerinin bu dizideki komplementer olduğu bölgeler ise Şekil 3.1.1 'de gösterilmektedir.

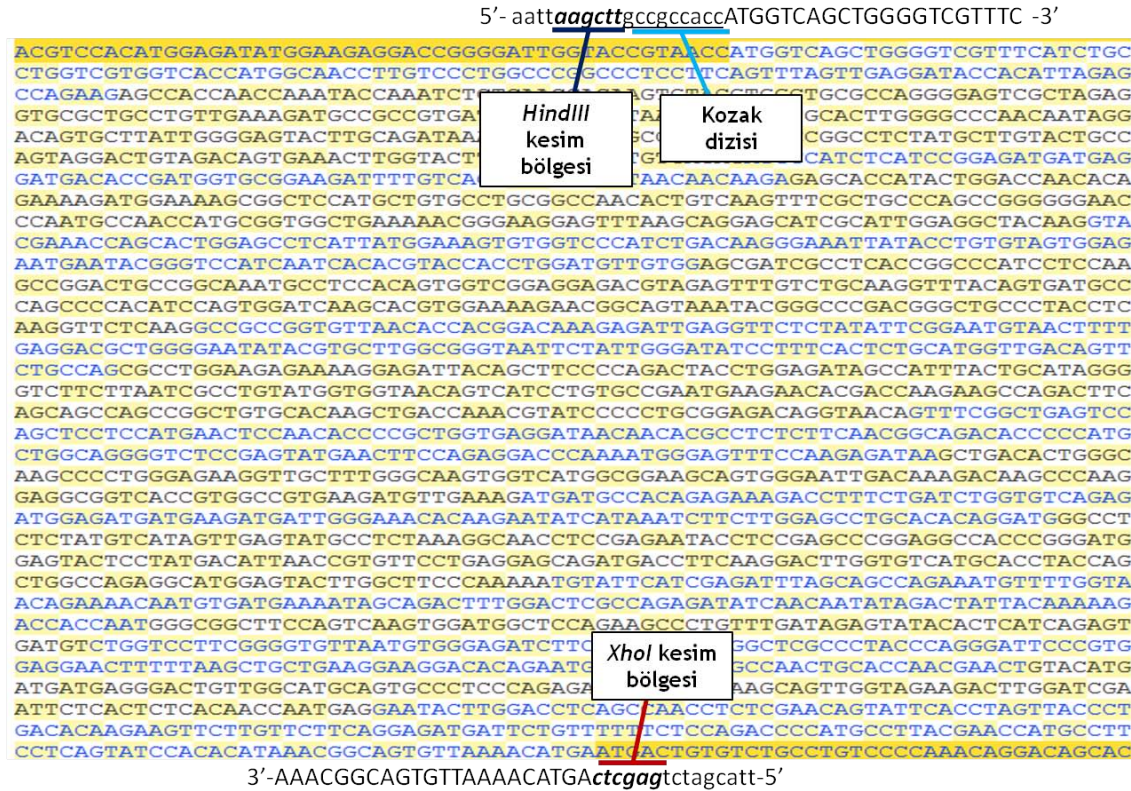
Bölgeye özgü mutagenез ile L6P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti Çizelge 3.1.4'de, S156P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti ise Çizelge 3.1.5'te gösterilmektedir. L6P mutagenезi aşaması sırasında kullanılan, mutasyon bölgelerini ve kesim bölgelerini içeren primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisindeki konumu Şekil 3.1.2'de S156P için bu bölgeler Şekil 3.1.3'te belirtilmektedir.

Primer (Metabion)	Primer Dizisi (5'-3')
T3	AATTAACCTCTACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH	ACTAGAAGGCACAGTCGAGG

Çizelge 3.1.2: DNA dizi analizinde kullanılan T3, T7 ve BGH primerleri.

Primer (Metabion)	Primer Dizisi (5'-3')
Fgfr2 <i>HindIII</i> F	aattaagcttgccgccaccATGGTCAGCTGGGGTCGTTTC
Fgfr2 <i>XhoI</i> R	aatgctagactcgagTCATGTTTTAACACGCCGTTT

Çizelge 3.1.3: *FGFR2* cDNA'sı için tasarlanan klonlama primerleri.



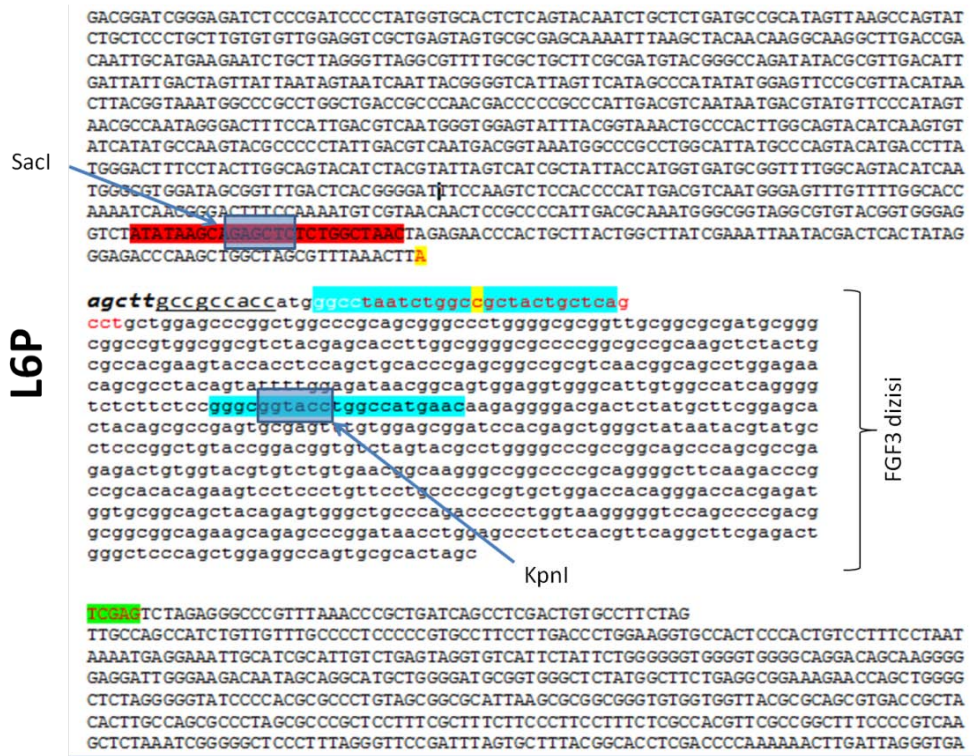
Şekil 3.1.1: *FGFR2* cDNA dizisi ve tasarlanan klonlama primerlerinin dizideki bağlanma bölgeleri.

pcDNA3.1.FGF3.L6P	
Primer1	5'-ATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAC-3' (endojen kesim bölgesi olan SacI 'ı içeriyor)
Primer2	5'-AGGCTGAGCAGTAGC <u>G</u> GCCAGATTA-3' (Komplementer dizi, mutasyon bölgesini içeriyor)
Primer3	5'-GGCCTAATCTGGC <u>C</u> GCTACTGCTCA-3' (mutasyon bölgesini içeriyor)
Primer4	5'-GTTCATGGCCAGGTACCGCCC-3' (Komplementer dizi, endojen kesim bölgesi olan KpnI 'ı içeriyor)

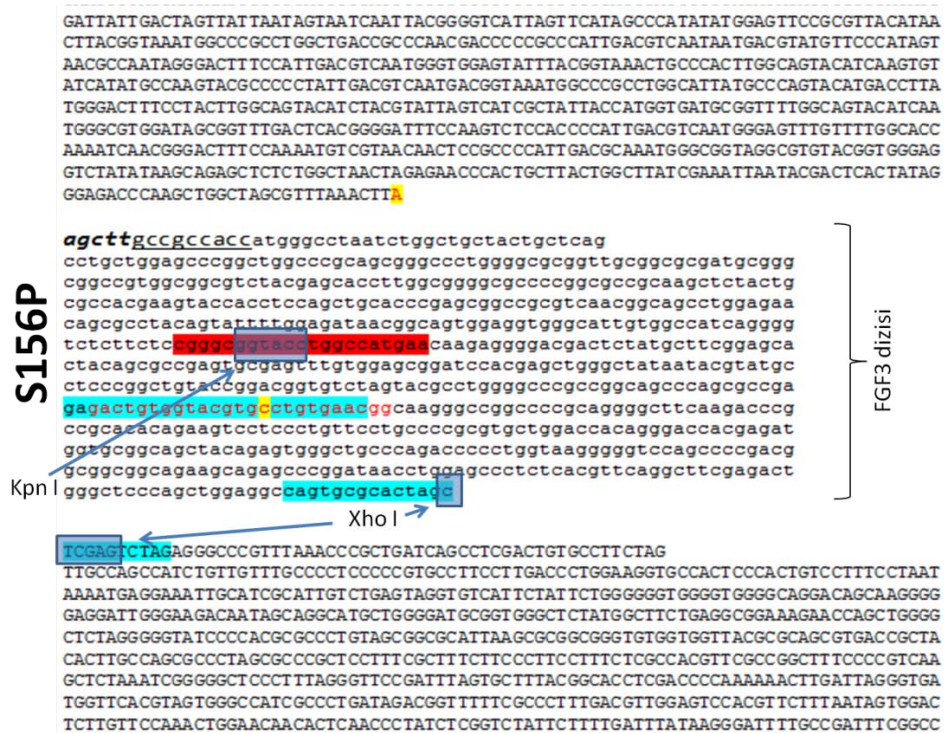
Çizelge 3.1.4: Bölgeye özgü mutagenез ile L6P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti.

pcDNA3.1.FGF3.S156P	
Primer1	5'-CGGGCGGTACCTGGCCATGAA-3' (endojen kesim bölgesi olan KpnI 'ı içeriyor)
Primer2	5'-CCGTTACACAG <u>G</u> CACGTACCACAGTC-3' (Komplementer dizi, mutasyon bölgesini içeriyor)
Primer3	5'-GAGACTGTGGTACGTG <u>C</u> CTGTGAAC-3' (mutasyon bölgesini içeriyor)
Primer4	5'-CTAGACTCGAGCTAGTGCGCACTG-3' (Komplementer dizi, stop kodon ardına eklenen XhoI kesim bölgesini içeriyor)

Çizelge 3.1.5: Bölgeye özgü mutagenез ile S156P mutasyonunu oluşturmak için tasarlanan primer seti.



Şekil 3.1.2: L6P mutagenesi aşaması sırasında kullanılan, mutasyon bölgelerini ve kesim bölgelerini içeren primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisindeki konumu.



Şekil 3.1.3: S156P mutagenesi aşaması sırasında kullanılan, mutasyon bölgelerini ve kesim bölgelerini içeren primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisindeki konumu.

HPRT F	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'
HPRT R	5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'
FGF3 F	5'-ATGGGCCTAATCTGGCTGCTAC-3'
FGF3 F (L6P)	5'-ATGGGCCTAATCTGGCCGCTAC -3'
FGF3 R (Kısa Primer)	5'- CCTGATGGCCACAATGCCCAC -3'
FGF3 R (Uzun Primer)	5'- CTAGTGCGCACTGGCCTCCAG -3'

Çizelge 3.1.6: Ektopik FGF3 mRNA tayininde kullanılan primerler

3.1.7. Bakteri Kültürleri

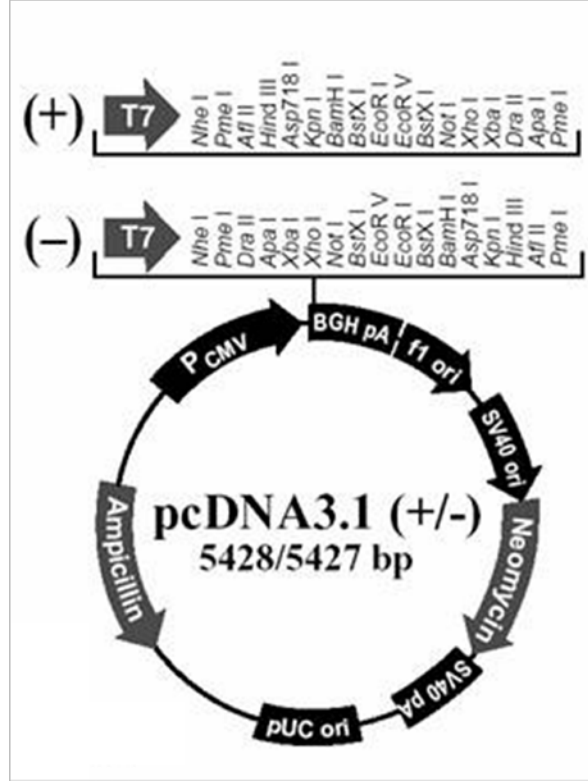
Bakteri suşları - 80 °C'de 30% gliserol içeren LB besiyerinde uzun süreli olarak saklanmıştır. Rekombinant plazmid içeren bakteri kültürleri aynı özellikleri içeren besiyerine ilaveten ilgili antibiyotikte eklenmiştir. Kısa süreli olarak bakteri suşları LB agar petrilerinde +4 °C de saklanmıştır.

3.1.8. Plazmidler

3.1.8.1. pcDNA3.1 Memeli İfade Vektörü

FGF3 ve FGFR2yi memeli hücre sisteminde ifade etmek amacıyla 5428 bp büyüklüğündeki Şekil 3.1.4'de plazmid haritası görülen pcDNA3.1 memeli ifade vektörü Invitrogen firmasından temin edilerek kullanılmıştır. pcDNA 3.1 plazmidi çoğu memeli hücre hattında yüksek düzeyde stabil ve replikatif olmayan geçici ekspresyon özelliğine sahip olmakla beraber konstitütif protein ifadesi için kuvvetli CMV promotoru içermektedir.

Bu vektörün içerdiği çoklu klonlama bölgesindeki restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgeleri kullanılarak klonlamalar ve mutagenез aşamaları, bakteri kültürleri kullanılarak bu plazmid üzerinde gerçekleştirilmiş ve daha sonra protein ifadesi için memeli hücre kültüründe Hek293 ve MCF-7 hücrelerine transfeke edilmiştir.



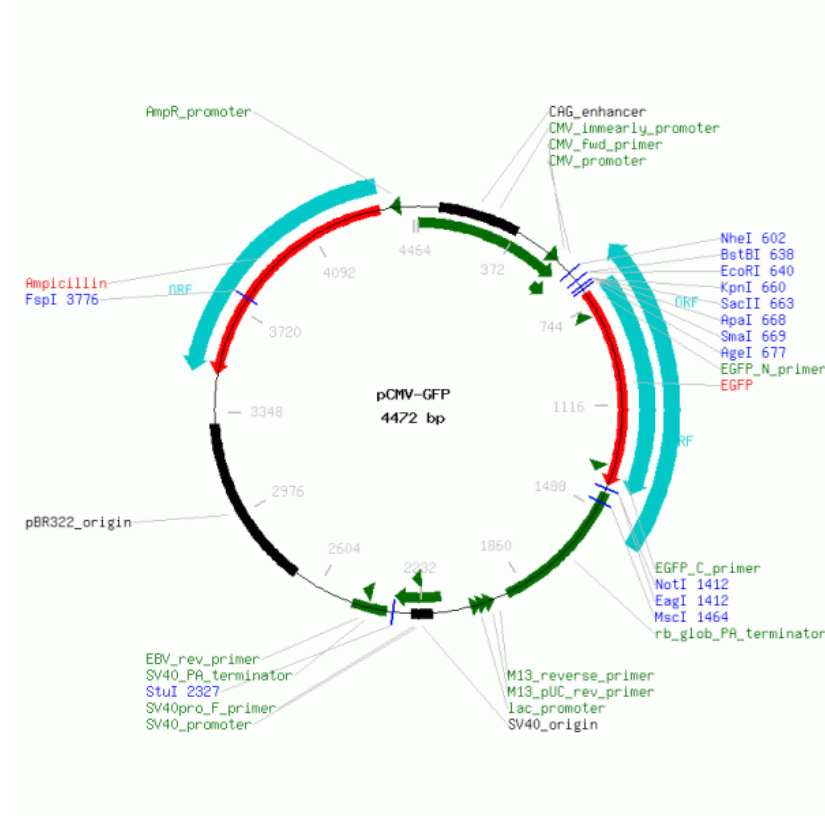
Şekil 3.1.4: pcDNA3.1 (+) memeli ifade vektörünün haritası

3.1.8.2. pCMV.GFP Plazmidi

Transfeksiyon aşamasında, transfeksiyon verimini analiz etmek için GFP proteinini sentezleyen hücrelerin miktarı ve GFP protein seviyesi hem floresan inverted mikroskopta göz ile hem de GFP antikor kullanılarak western blot ile tayin edilmiştir. Şekil 3.1.5’de Addgene’den temin edilen pCMV.GFP plazmidinin haritası görülmektedir.

3.1.8.3. pcDNA3.1.EGFP Plazmidi

pcDNA3.1.GFP plazmidi de Addgene’den temin edilmiş, ancak tranfeksiyon verimi gözlenmesi için pCMV.GFP plazmidi kullanılmıştır.



Şekil 3.1.5: pCMV.GFP plazmidinin haritası

3.1.9. Hücre Hatları

DSMZ 'den temin edilen insan embriyonik böbrek hücreleri (Hek293, kat: ACC305) ve insan meme kanseri hücreleri (MCF-7, kat: ACC 115) %10 fetal bovine serum (İnvitrogen) içeren ve 100 U/mL penisilin, 100µg/mL streptomisin eklenmiş Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Hyclone SH30081.01) besiyerinde, gaz yoğunluğu 5% CO₂, sıcaklığı 37 °C olan inkübatörde idame ettirilmiştir. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri EK-3'te yer almaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Transformasyon

Transformasyon için *E.coli* DH5 α suşu kullanılmıştır (Invitrogen). -80° C' den alınan superkompetan bakteri kültürü buz üzerinde çözülmüştür. Çözöldükten hemen sonra bakteri kültürlerine 2 μ l plazmid DNA'sı eklenerek hafifçe karıştırılıp 30 dk buz üstünde inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteriler 42°C'de 90 sn ısı şokuna tabi tutulmuş ve ardından 2 dk buz üstünde inkübe edilmiştir. Ardından 950 μ l antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklenmiş ve 37°C'de 1 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 220 rpm'de inkübe edilmiştir. 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek, bakteriler 200 μ l LB içinde tekrar çözölüp plazmidin özelliklerine göre gerekli antibiyotiği içeren LB agar petrilere ekilerek 37°C'de 16 saat süresince inkübe edilmiştir.

3.2.2. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA'sı Roche High Pure Plasmid Isolation Kit ile yapılmıştır. Plazmid DNA'sı kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda izole edilmiştir. Plazmid DNA'sını içeren bakteri kültürü santrifüjlenerek çöktüröldükten sonra pelet RNaz içeren süspansiyon tamponunda çözülmüş ve elde edilen supernatan kitin sağladığı kolondan geçirilerek yıkanmıştır. Daha sonra 50 μ l son hacim içinde kolondan saflaştırılmıştır. Bu yöntemle başlangıçta kullanılan 3ml bakteri kültüründen yaklaşık olarak 150-200 ng/ μ l plazmid DNA'sı elde edilmektedir.

Daha büyük miktarda plazmid DNA'sı saflaştırılması için Qiagen Plasmid Maxi kit kullanılarak, kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda izole edilmiştir. Çöktürölen bakteri kültürü, alkalın lizatından santrifüjlenerek temizlenmiş ve plazmid DNA'sı kolonda kalması sağlanarak karışım yıkanarak ardından saflaştırılmıştır. Bu yöntemle 200 ml bakteri kültüründen yaklaşık olarak 1- 1,5 μ g/ μ l plazmid DNA'sı elde edilmektedir.

3.2.3. Restriksiyon Endonökleaz Kesimi

Restriksiyon endonökleaz kesim reaksiyonlarında kullanılan enzimler Fermentas'tan ve Promega'dan temin edilmiş ve kit sağlayıcısının talimatları

doğrultusunda kullanılmıştır. Kullanılan enzimlerden *HindIII* ve *XhoI* 2 saat boyunca 37 °C'de kesilen hızlı yıkım (Fastdigest) özelliği taşıyan enzimler iken *Sac* ve *KpnI* bu özelliği taşımamakta ve 37 °C'de geceboyu kesilmiştir. Kesilecek plazmid DNAsı, hızlı yıkım özelliğine sahip enzimle ve sahip olmayan enzim birlikte kesildiği durumlarda, önce hızlı yıkım özelliğine sahip olmayan enzim ile 37 °C 'de gece boyu, ardından High Pure PCR Purification kit (Roche) ile DNA saflaştırma işlemi uygulandıktan sonra hızlı yıkım özelliğine sahip enzimle kesilmiştir.

Kesim reaksiyonları kurulurken sonraki aşamalarda 250ng-1µg aralığında değişen miktarda ihtiyaç duyulan DNA kadar kesim reaksiyonuna DNA koyulmuş ve 20 µl'lik reaksiyon başına 1 µg DNA'nın üzerine çıkılmamıştır. Kesim reaksiyonu sonrası istenilen kesim bölgelerinden kesilmiş DNA ligasyon aşamasında kullanılacaksa High Pure PCR Purification kit (Roche) ile DNA saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Ligasyon

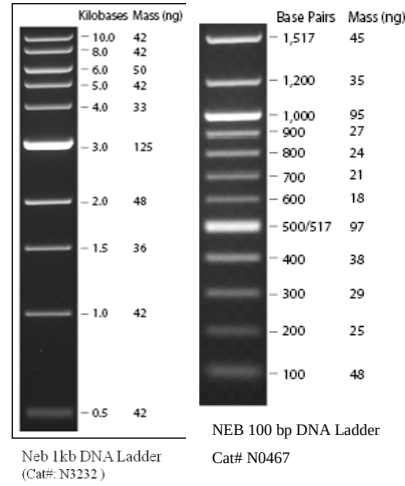
Ligasyon reaksiyonu New England Biolabs T4 DNA Ligaz (M0202S) ile gerçekleştirilmiştir. Yapışkan uçlara sahip ilgili enzimlerle kesilmiş plazmid DNA'sı ve aktarılacak DNA sırasıyla 1:3 oranında DNA sonu molaritesi hesabını takiben reaksiyona konulmuştur. DNA sonlarının molaritesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda hesaplanan miktarlarda DNA miktarları kullanılıp kit reaktifleriyle birlikte hazırlanan reaksiyon oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon reaksiyonundan 3µl alınarak hiç bir işleme tabi tutulmadan, transforme edilmiştir.

$$\text{DNA uçlarının Molaritesi} = [(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \div (\text{baz çifti} \times 650 \text{ dalton})] \times 2 \text{ uç}$$

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA fragmentleri, 0,8 - 2% arası yoğunluğunda değişen agaroz jel ile yatay jel elektroforeziyle 1xTBE içinde ayrıştırılmıştır. Hazırlanacak agaroz jelin yoğunluğuna göre gerekli miktarda agaroz alınıp tamamen 1xTBE içinde tamamen çözölmüştür. Daha sonra konsantrasyonu 10 mg/ml olan ethidyum bromür'den 30 ml agaroz jel için 1 µl, 150 ml agaroz jel için 3µl eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 2 µl 6x DNA Loading Dye, 10 µl

DNA örneklerine eklenmiş ve her kuyuya bu şekilde yüklenerek 80 V'ta 1 saat süresince yürütülmüştür. 1000 baza kadar olan DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığını belirlemek için New England Biolabs(ABD) 1kb DNA Ladder moleküler ağırlık belirteci kullanılmıştır (Şekil 3.2.1). Nükleik asitler Gene Genius Bio Imaging System ile ultraviyole ışığı altında görüntülenmiştir.



Şekil 3.2.1: DNA molekül ağırlığı belirteçleri.

1000-1500 baza kadar olan DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığını belirlemek için kullanılan NEB 100bp DNA Ladder ve NEB 1kb DNA Ladder moleküler ağırlık belirteçleri.

3.2.6. Nükleik asit konsantrasyonunun ölçülmesi

İzole edilen DNA örnekleri NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile ölçülmüştür (Nanaodrop Technologies, Monthcanin, DE, ABD). DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmakta olup, 260/280 oranının ~1.8, A260/A230 oranının ise 1.8 – 2.2 olması DNA'nın saf olduğunun göstergesidir.

3.2.7. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründe, plazmid ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden total RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche) ile kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Soğuk dPBS ile hücreler kazındıktan sonra, sıvı azotta dondurulan hücre pelletleri tekrar 200 µl soğuk PBS içinde çözülmüş ve Lizis ve bağlama tampon eklenerek 15 sn vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler kitle gelen kolondan

geçirilerek, santrifüjlenmiştir. Ardından DNase I eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kitin sağladığı yıkama tamponuyla yıkanarak 50 µl son hacim içinde elue edilmiştir. RNA konsantrasyonu nanodrop ile tayin edilmiştir.

Total RNA izolasyonu sonrasında kit ile gelen DNaz'ın kullanılmasına rağmen izole edilen RNA örneklerinin içinde plazmid DNA kontaminasyonu önlemek için total RNA örnekleri tekrar DNaz I (Roche) ile ek olarak muamele edilmiştir.

3.2.8. DNaz I muamelesi ile RNA örneklerinden DNA uzaklaştırılması

RNA örneklerindeki genomik DNA, RNA saflaştırılması sırasında kolaylıkla uzaklaştırılırken, plazmid DNAsının bu miktarda DNaz'a dayanıklı olduğu ve RNA örneğini kontamine ettiği gözlenmiştir. Bu sebeple plazmid DNA ile kontamine olan RNA örnekleri, RNaz'sız rekombinant DNaz I (Roche) ile kitteki talimatlar doğrultusunda muamele edilmiştir. 10-50 µg arası değişen total RNA 1 µl DNaz I ve 10X inkübasyon tamponu kullanılarak 50 µl içinde 37 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir. 15 dk inkübasyon sonrasında reaksiyonu durdurmak için son konsantrasyon 8 mM olacak şekilde reaksiyona EDTA eklenmiş ve 75 °C'de 10 dakika tekrar inkübe edilmiştir. Ayrıca yıkılan DNA'yı ve DNaz I'ı uzaklaştırmak için fenol-kloroform metodu uygulanmıştır.

3.2.9. Fenol-Kloroform Yöntemi

50 µl hacimde olan DNaz I ile muamele edilmiş reaksiyonlara 40 µl sırasıyla 3:1 oranında fenol/kloroform eklenmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Daha sonra 10 dk buz üstünde bekletilen örnekler +4 °C'de 5 dk son hızda (21.000 g) santrifüjlenmiş ve üst faz temiz bir tüpe aktarılmıştır. Sonraki aşama olan etanol presipitasyonunda 5 µl 3M NaOAc ve 200 µl %100 etanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından gece boyu -80 °C'de bekletilen örnekler 10 dk +4 °C'de RNA'yı çöktürmek için santrifüjlenmiştir. Supernatan RNA pelletini oynatmadan dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellet 0,5 ml %70 etanol (DEPC ile muamele edilmiş su içinde) ile yıkanmıştır. Ardından tekrar 5 dk son hızda santrifüjlenmiş, etanol uzaklaştırılmış ve DEPC ile muamele edilmiş 10-20 µl suda çözülerek RNA konsantrasyonu tayin edilmiştir.

3.2.10. RT-PCR ile cDNA sentezi

Yapılan RNA izolasyonu ve DNA kontaminasyonunun uzaklaştırılmasından sonra cDNA sentezi Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) ile kit talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. 1µg total RNA, 1 µl (50 pmol/µl) oligo(dT) primer ile 13 µl'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır. Daha sonra 65 °C 'de 10 dk inkübe edilerek RNA ikincil yapılarının denatürasyonu sağlanmıştır. Transkriptaz reaksiyon tamponundan 4 µl, RNase inhibitöründen 0,5 µl, 10mM dNTP'den 2 µl ve reverse transcriptaz enziminden de 0,5 µl eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır ve 55 °C'de 30 dk, ardından 85 °C'de inaktivasyon için 5 dk inkübe edilmiştir. 20 µl hacimde sentezlenen cDNA PCR sırasında kolay pipetaj yapılabilmesi için 100 µl'ye su ile seyreltilerek -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

Amplifiye edilecek kalıp DNA'lar materyal kısmında belirtilen enzimlerle sağlayıcıların talimatları doğrultusunda PCR reaksiyonda kullanılmıştır. Mutageniz aşamasında ve cDNA kalıbından yapılan PCR aşamasında Phusion (Finnzymes) polimeraz enzimiyle gerçekleştirilen reaksiyonlarda, son konsantrasyonları, Phusion Tamponu 1X, dNTP her biri 200 µM, her bir primer 0,5 µM, Phusion DNA polimeraz 0,03 unite/µl olacak şekilde ve kalıp DNA olarak da plazmid DNA'sı 10 ng, seyreltilmiş cDNA ise 4 µl kullanılmıştır. Diğer aşamalarda kullanılan PCR enzimlerinde, GoTaq (Promega) için yine aynı konsantrasyonlarda, Taq Polimeraz (Fermentas) enzimi içinse 25 µl son hacim içinde; 10X enzim tamponundan 2,5 µl, MgCl₂ 'den 1 µl, dNTP'den 1 µl, Taq polimeraz'dan 1 µl, 50 µM olan her bir primerden 0,5 µl eklenerek reaksiyon kurulmuştur. PCR programlarında, başlangıç denatürasyonu 95-98 °C 2-5 dk, denatürasyon 95-98 °C 10-30 sn, bağlanma 55-62 °C 30 sn, uzama 72 °C 30-120 sn, son uzama 72-73 °C 5 dk aralıklarında değişen parametreler, deneylerdeki istenilen koşullara göre kullanılmış ve reaksiyonlar genelde 35 siklusa gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları Peltier Thermal Cycler (DNA Engine) ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri analizi yapılan DNA bandının büyüklüğüne göre 0,8-2% arasında değişen agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2.12. PCR ürünü Saflaştırılması

DNA Pürifikasyonu High Pure PCR Product Purification kiti (Roche) ile yapılmış ve kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda uygulanmıştır. 100 µl'ye tamamlanan PCR ürününe kitin DNA bağlayıcı tamponu eklenerek kitle gelen kolonlardan geçirilerek DNA'nın kite bağlanması sağlanmış ve daha sonra yıkama tamponlarıyla yıkanan DNA son olarak santrifürlenerek 50 µl hacim içinde temiz bir tüp içinde toplanmıştır.

3.2.13. Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması

Agaroz jelden DNA purifiye ederken High Pure PCR Product Purification kiti (Roche) kullanılmış ve kit sağlayıcısının talimatları uygulanmıştır. PCR reaksiyonu 0,8-2% yoğunluğunda agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra etanol ile temizlenmiş bir bistüri kullanılarak ilgili DNA bandı jelden kesilerek önceden darası alınmış temiz bir tüpe aktarılmıştır. Bu aşamada UV ışığı altında kesilen jel miktarı minimumda tutulmuştur. Tekrar ağırlığı ölçülen jelin ağırlığına bağlı olarak kitle gelen DNA bağlayıcı tampon eklenmiş ve 15-30 sn boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra süspansiyon 10 dakika boyunca 56 °C'de inkübe edilmiştir (her 2-3 dakikada tüp kısaca vortekslenmiştir). Agaroz jel tamamen çözöldükten sonra her 100 mg jel için 150 µl isopropanol eklenmiş ve iyice vortekslenmiştir. Kolona aktarılan solüsyon 30-60 sn boyunca 13.000 rpm'de santrifürlenmiştir. Daha sonra yıkama tamponları eklenerek tekrar kolondan geçirildikten sonra 50 µl son hacim içinde DNA elde edilmiştir.

3.2.14. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi yapılacak tüm DNA fragmentleri için optimize edilen koşullarda hedef bölgeler amplifiye edilmiş ve High Pure PCR Purification (Roche) kiti kullanılarak kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Daha sonra Çizelge 3.2.1'deki reaksiyon koşullarında ve aşağıda belirtilen PCR koşullarında örnekler DNA dizi analizi için çoğaltılmıştır. Plazmid DNA'sının DNA dizi analizi yapılırken reaktifler eklenmeden önce plazmid DNA'sına 96 °C'de 3 dk ön denatürasyon yapılmış ve hemen buz üstüne alınmıştır.

Reaktif	Miktar
Genome Lab DTCS Quick Start Mix (S707019)	4 µl
Primer (1,6 pmol/ µl)	1 µl
Betain (5M)	2 µl
DNA	3 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 3.2.1: DNA dizi analizi reaksiyonu

PCR Koşulları:

96°C'de 20 sn	} 30 döngü
67°C'de 20 sn	
60°C'de 4 dk	

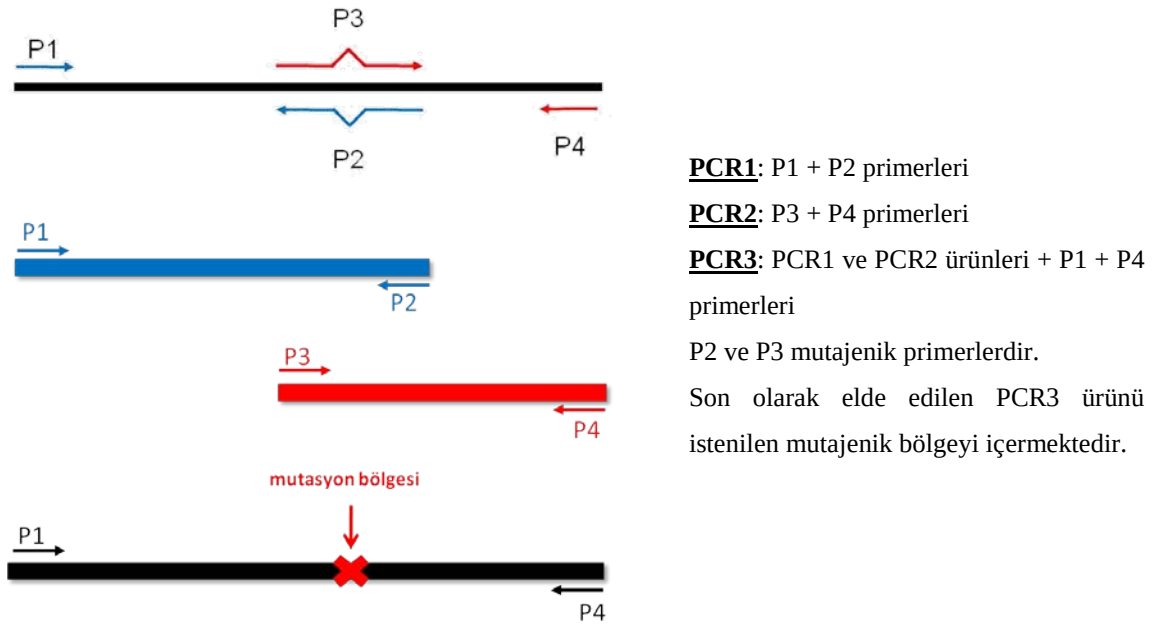
Elde edilen PCR ürünleri kısa süre santrifüjlenerek 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır. 1 µl 125 mM pH:8 EDTA'dan konulmuştur. PCR ürünleri EDTA konulan tüplere eklenmiştir. 3 M pH: 5,2 olan Naasetat'tan 1µl eklenmiş ve tüpler hafifçe vortekslenmiştir. -20 °C'de saklanan 100% etanol'den tüplere 35µl eklenmiş ve tekrar vortekslenmiştir. Tüpler 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüpler +4 °C'de 14.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve supernatan atılmıştır. 130 µl %70 soğuk etanol tüplere eklenerek tüpler bir kere ters yüz edilmiştir. +4 °C'de 10 dk boyunca 14.000 rpm'de tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında alkol uzaklaştırılmıştır. Yıkama tekrarlandıktan sonra vakumlu santrifüjde 10 dk boyunca alkol iyice uzaklaştırılmıştır. Örneklerin üzerine 20µl formamid (Amersham Biosciences 324838) eklenerek iyice çözülmesi sağlanmış ve örnekler Beckman Sample Plate'e konulmuştur. Her bir örneğin üzerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter S505019) damlatılarak plate sekans cihazına (Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) yüklenmiştir.

3.2.15. Bölgeye Özgü Mutagenез Yöntemi

Çalışmada bölgeye özgü mutagenез oluşturmak için klasik mutagenез sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, Şekil 3.2.2'de de gösterildiği gibi dört adet primerle yapılan üç

adet PCR reaksiyonundan oluşmaktadır. Birinci ve ikinci primerler ile oluşturulan PCR1 ürünü ve üçüncü dördüncü primerler ile oluşturulan PCR2 ürünü birleştirilerek birinci ve dördüncü primerler ile son ürün olan PCR3 reaksiyonu oluşturulmuştur. PCR3 reaksiyonu sonucu elde edilen DNA fragmenti istenilen bölgede elde edilmek istenen mutasyonu içermektedir.

İstenilen mutasyon oluşturulduktan sonra bu DNA fragmenti endojen kesim bölgeleri ve sonradan eklenmiş bazı kesim bölgelerinden pcDNA3.1.FGF3 vektörüne tekrar aktarılmıştır. Çizelge 3.1.4 ve Çizelge 3.1.5'te sırasıyla L6P ve S156P mutasyonlarını oluşturmak için pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisinde endojen olarak bulunan ve sonradan eklenmek üzere tasarlanmış restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içeren primerler gösterilmektedir. Şekil 3.1.2 ve Şekil 3.1.3'te bu primerlerin pcDNA3.1.FGF3 plazmid dizisi üzerindeki bağlanma bölgeleri görülmektedir.



Şekil 3.2.2: Klasik mutagenез sisteminin temel adımları.

Her bir mutasyon için tasarlanan dörder primer ile Pfu DNA Polimeraz (Finnzymes, Phusion DNA polymerase) kullanılarak PCR1, PCR2 ve PCR3 ürünleri oluşturulmuştur. Mutagenез sırasında kullanılan tüm PCR parametreleri Çizelge 3.2.2'te verilmiştir.

	PCR1 P1+P2 (L6P)	PCR2 P3+P4 (L6P)	Süre	PCR1 P1+P2 (S156P)	PCR2 P3+P4 (S156P)	Süre	PCR3 P1+P4 (L6P)	PCR3 P1+P4 (S156P)	Süre
İlk Denatürasyon	98 °C	98 °C	2'	98 °C	98 °C	2'	98 °C	98 °C	2'
Denatürasyon	98 °C	98 °C	10''	98 °C	98 °C	10''	98 °C	98 °C	10''
Bağlanma sıcaklığı	55 °C	55°C	30''	55 °C	55°C	30''	55 °C	55°C	30''
Uzama	72 °C	72 °C	30''	72 °C	72 °C	30''	72 °C	72 °C	45''
Son Uzama	72 °C	72 °C	5'	72 °C	72 °C	5'	72 °C	72 °C	5'

35 Döngü

Çizelge 3.2.2: Klasik mutagenез aşamasında kullanılan PCR parametreleri.

3.2.16. Hücre Hatlarının İdamesi ve Pasajlanması

37°C, 5% CO₂ inkübatöründe inkübe edilen hücreler ışık mikroskobu ile hergün kontrol edilerek pasajlama için gerekli yoğunluğa ulaşp ulaşmadığı teyit edilmiştir. Hücreler gerekli yoğunluğa ulaştığında, tripsinlenerek sayıldıktan sonra pasajlanmıştır.

3.2.17. Hücre Hatlarının Transfeksiyonu

Hücre hatları Fugene HD Transfection Reagent (Roche) ile kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda transfekte edilmiştir. 9,6 cm² alana sahip 6 kuyulu petriler için 3ml DMEM kullanılmıştır. Her bir ml başına 1 µg plazmid DNA'sı 80 µl ddH₂O içinde slue edilmiş, 6 kuyulu petriler için de 3 µg plazmid DNA'sı 240 µl ddH₂O içinde sulandırılmıştır ve 5-6 kere pipetlenerek iyice karıştırılmıştır. Ardından 1:4 oranında sırasıyla plazmid DNA'sı (µg) ve Fugene reaktifi (µl) (3 µg plazmid DNA'sı: 12 µl Fugene) karıştırılmışve 15 kere yavaşça pipetlenmiştir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek katyonik lipid komplekslerinin plazmid DNA'sına bağlanması sağlanmıştır. Bu aşamada pasajlanan hücrelerden 1,2 - 1,35 x10⁶ sayıda Hek293 hücresi her bir kuyuya eklenmiş ve üstlerine plazmid DNA'sı-Fugene karışımı eklenmiştir ve plazmid DNA'sının homojen olarak yayılması için son bir kez besiyeriyle birlikte hücreler pipetlenerek karıştırılmıştır. Daha sonra inkübatöre alınan hücreler 24-72 saat arası inkübe edilmiştir.

3.2.18. İmmün Floresan Boyama

3.2.18.1. Kullanılan solüsyonlar

4% Paraformaldehit: İmmünfloresan deneyinde fiksasyon aşamasında kullanılan paraformaldehit taze bir şekilde laminar kabin içinde bir gece önceden hazırlanmıştır. 4% paraformaldehit, PBS içinde geceboyu berrak hale gelene kadar 60°C 'de karıştırılmıştır.

Permeabilizasyon Tamponu: 10 ml PBS'in içine, 50ml içinde hazırlanan 1.47 gr sodyum sitrat'tan 340 µl ve 10µl TritonX-100 deterjanı eklenmiştir.

3.2.18.2. İmmün Floresan Protokolü

Hücrelerin transfeksiyon için inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra üç kere dPBS ile yıkanıp, ardından gece boyu hazırlanan 4% PFA hücrelerin üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelere permeabilization buffer eklenerek 5 dakika +4°C'de bekletilmiştir.

Blocking aşaması, PBS-T (0.1% Tween 20 içeren) içinde 5% BSA (Bovine Serum Albumin) ile 20 dakika süresince oda sıcaklığında yapılmıştır. Daha sonra PBS-T içerisinde hazırlanan 1% BSA ile primer antikorlar hazırlanıp her bir lamel üzerine eklenerek +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. FGF3 (abcam, cat: ab10830, 1.2 mg/ml) ve FGFR2 (abcam, cat: ab10648, 1.0 mg/ml) antikorları 1:500 dilüsyonunda, kalneksin (abcam, cat: ab22595) antikoruyse 1:100 dilüsyonunda kullanılmıştır.

Birincil antikorların inkübasyonu sonrasında hücreler bir kere PBS-T ile yıkandıktan sonra tekrar 3 kere 5 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı olarak yıkanmıştır. Yıkama aşaması bittiğinde yine 1% BSA içeren PBS-T ile ikincil antikorlar hazırlanmıştır. Alexa Fluor 488, 594 ve 568 boya (invitrogen) 1:1000 dilüsyonunda, çekirdek boyası olan TOTO-3 (invitrogen) ise 1-5 µM konsantrasyonunda kullanılmıştır. Tüm lameller üzerine ikincil antikorlar eklenmiş ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası hücreler yine bir kere PBS-T ile yıkandıktan sonra, 3 defa 5 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı olarak yıkanmıştır. Sonrasında lameller, TOTO-3 boyası kullanılmayanlar ProLongGold Antifade with DAPI mounting media (Invitrogen), TOTO-3 çekirdek boyası kullanılanlar içinse DAPI boyası içermeyen ProLongGold Antifade (Invitrogen) ile lam üzerine kapatılıp köşeleri tırnak cilası ile sabitlenmiştir. 24 saat oda sıcaklığında kuru ve karanlık bir ortamda bekletildikten sonra lamellerin bütün kenarları tırnak cilası ile kapatılıp +4°C’de karanlık ortamda saklanmıştır.

Görüntüler Zeiss LSM510 konfokal mikroskop sistemi ile Argon 488, He-Ne 543 ve He-Ne 633 lazerleri kullanılarak elde edilmiş ve LSM Image Browser yazılımı ile de işlenmiştir. Alexa Fluor 488 boyası Argon 488 lazer ile, Alexa Fluor 568 ve 594 boyları He-Ne 543 lazeri ile ve Toto-3- iodide’da He-Ne 633 lazeriyle görüntülenmiştir. Alınan her görüntüdeki sinyalin, otofloresan kaynaklı olmayıp sadece antikor boyaması kaynaklı olduğunu doğrulamak için, öncelikle hiçbir antikorla muamele edilmemiş hücrelerde, tüm lazerler için otofloresan sinyali alınmayan seviyede lazer güçleri ve detektör değerleri ayarlanmıştır. Ardından, bu değerler ile -transfekte edilmiş ve edilmemiş- hücrelerde birincil antikor kullanılmadan sadece ikincil antikor kullanılarak tüm lazerlerde sinyal alınmadığı doğrulanmıştır. Eğer az da olsa sinyal gözlenmiş ise, lazer güçleri ve detektör değerleri sinyal alınmayan seviyeye çekilerek bu değerler de kaydedilmiştir. Ve son olarak, en az iki sinyal alınacak görüntülerde, bu sinyallerin diğer lazerler tarafından uyarılmadığından emin olmak için, tüm antikorlar tüm lazerlerle analiz edilerek sadece kendi dalgaboyu aralığında ışıma yaptığı noktalarda lazer güçleri ve detektör seviyeleri kaydedilmiştir.

Bu kontroller yapıldıktan sonra, kaydedilen lazer güçleri ve detektör değerleriyle, her sinyalin kendinden kaynaklı olduğu bilinerek gerekli tüm örneklerin görüntüleri alınmıştır 40x büyütmede alınmıştır.

3.2.19. Western Blot (İmmünblotlama)

3.2.19.1. Protein Miktarı Tayini (Bradford Assay)

Roche Lysis M kullanılarak hücre lizatları hazırlandıktan sonra, protein konsantrasyonu Bradford testi ile tayin edilmiştir. BSA (Sigma) mikrosantrifüj tüpünün içinde tartılarak 1 mg/ml BSA stok solüsyonu bir tüpte hazırlanmıştır. Ardından gerekli

temiz tüpler aşağıdaki örnekte olduğu gibi hazırlanmış ve aşağıdaki miktarlarda BSA ve ölçülecek proteinler eklenmiştir (Çizelge 3.2.3).

BSA konsantrasyonu (stok: 1,0 µg/ml)	Eklenen BSA miktarı	Su miktarı
0,5 µg/ml	0,5 µl	99,5 µl
1 µg/ml	1 µl	99 µl
2,5 µg/ml	2,5 µl	97,5 µl
5 µg/ml	5 µl	95 µl
10 µg/ml	10 µl	90 µl
20 µg/ml	20 µl	80 µl

Çizelge 3.2.3: Protein örneklerinin Bradford testi ile konsantrasyon tayini

Gerekli miktarlarda otoklavlanmış ddH₂O ve +4 °C’de saklanan Bradford dye 1X (Bio-Rad)’ten 15’lik konik tüplere alınmıştır. Proteinleri içeren hücre lizatlarının supernatanlarından 5 µl ilgili mikrosantrifüj tüplerine konulur ve üzerine 95 µl ddH₂O eklenmiştir. Tüm mikrosantrifüj tüplerine 900 µl Bradford Dye 1X eklenir ve kısaca vortekslenmiştir. Örnekler ve referanslar 5’ oda sıcaklığında bekletilmiş ve spektrofotometre’de konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Örneklerdeki protein miktarları OD₅₉₅ nm’de kör protein miktarları kullanılarak Bio-Rad Smart Spec 3000 cihazında ölçülmüştür.

3.2.19.2. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Western Blot için hazır jeller -12% poliakrilamid Pierce Protein Gels (Pierce) ve Novex 4-12% Bis-Tris Gel (NuPAGE, invitrogen)- kullanılmıştır.

Novex Tris-Glycine Sample Loading Buffer (2x, Invitrogen) örnek yükleme tamponuna taze olarak %5 beta-merkaptoetanol eklenmiş örneklerin üzerine 1x olacak şekilde eklenmiştir. 5 dk 95 °C’de denatüre edilen örnekler, buz üstüne alınmıştır. Örnekler

jele yüklendikten sonra güç kaynağı 80-120V'a ayarlanarak proteinlerin ayrıştırılması sağlanmıştır.

3.2.19.3. Protein Transferi

Protein transferi kuru transfer sistemi olan iBlot Dry Blotting System (Invitrogen) cihazı kullanılarak sağlayıcının talimatları doğrultusunda yapılmıştır. iBlot cihazı açılıp anot bölüm alta gelecek şekilde plastik kapla birlikte cihazın haznesine yerleştirildi ve hava kabarcığı kalmaması sağlanmıştır. Daha sonra yürütülen jel kısaca distile sudan geçirilip, anot bölümün üstüne yerleştirilmiş ve üzerine distile suda ıslatılmış iBlot filtre kağıdı konulmuştur. Bunun üstüne katot bölüm yerleştirilerek tekrar cihazla gelen silindir kullanılarak oluşabilen hava kabarcıkları engellenmiştir. Ardından cihaz kapağının iç kısmına ilgili sünger takılarak cihaz program 1'de 7 dakika çalıştırılmıştır.

3.2.19.4. Membrandaki Proteinlerin İmmünolojik Olarak Tespiti

Kullanılan Solüsyonlar:

PBS-T (500ml): 10x PBS + %0.5 Tween-20.

Bloklama Solüsyonu (Non-Fat Dry Milk): PBS-T + %5 yağsız süt tozu (BioRad)

Tris-HEPES SDS Yürüme Tamponu: 1X= 0,1M Tris, 0,1M HEPES, 3mM SDS, pH ~8 ± 0,25

Protein transfer edilen membranlar oda sıcaklığında +4 °C'de gece boyu bloklama solüsyonu içinde çalkalanarak inkübe edilmiştir. Geceboyu çizelge 3.1.1'de belirtilen dilüsyonlarda ilgili antikor ile soğuk odada çalkalanarak inkübe edilmiştir.

Primer antikorların inkübasyonu sonunda membranlar 4 kere 8 dk boyunca PBS-T ile yıkanmıştır. Sonrasında HRP konjuge ikincil antikorlarla inkübe edilen membran, tekrar yıkanmış ve Immunstar HRP Luminol/Enhancer ve Peroxide buffer (Bio-Rad) sistemi ile Kodak Image Station 4000 MM cihazında görüntülenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

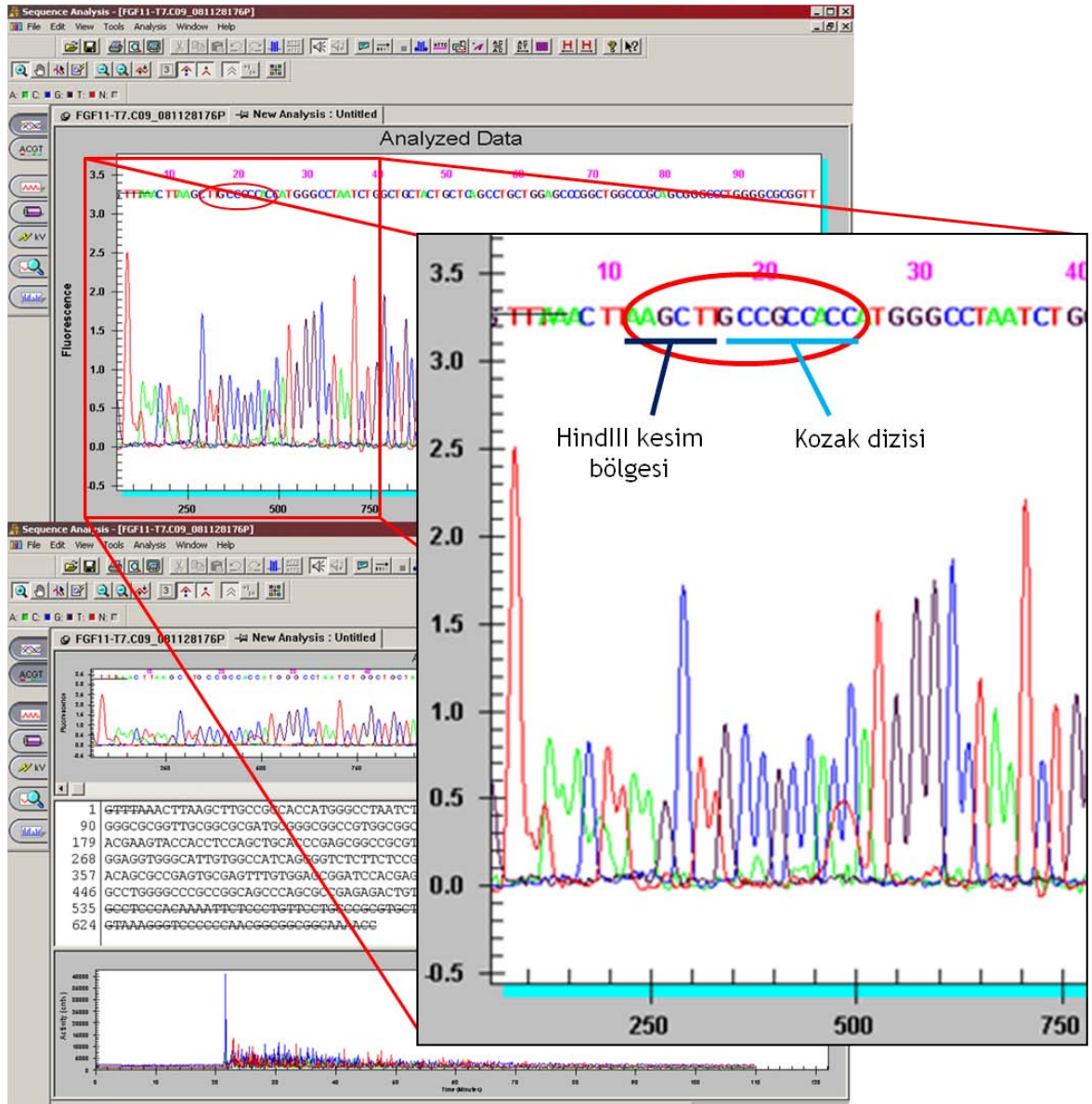
4.1. pcDNA3.1.FGF3 DNA Dizi Analizi

Çalışmada daha önceden klonlanan pcDNA3.1-hFGF3#11 plazmidi kullanılmıştır. Plazmide spesifik T7F ve BGHR primerleri ile (Çizelge 3.1.2) gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonuçları Şekil 4.1.1 ve Şekil 4.1.3'te gösterilmiştir.

Çıkan sonuçlar Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation) DNA dizi analizi yazılımında referans dizi ile karşılaştırılarak analiz edilmiş ve Genbank'taki *FGF3* cDNA dizisi ile (gi:111599420) yüzde yüz aynı olduğu ve ayrıca sırasıyla 5'uca *HindIII* enzim kesim bölgesinin ve başlangıç kodonunun önüne Kozak dizisinin, 3'uca da stop kodonu takiben *XhoI* kesim bölgesinin başarı ile eklendiği görülmüştür. Şekil 4.1.1'de T7 primeri ile gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonuçları gösterilmektedir, Şekil 4.1.2'de ise sonuçların Sequencher 4.7 programıyla yapılan okunan dizinin referans dizisiyle karşılaştırılması gösterilmektedir.

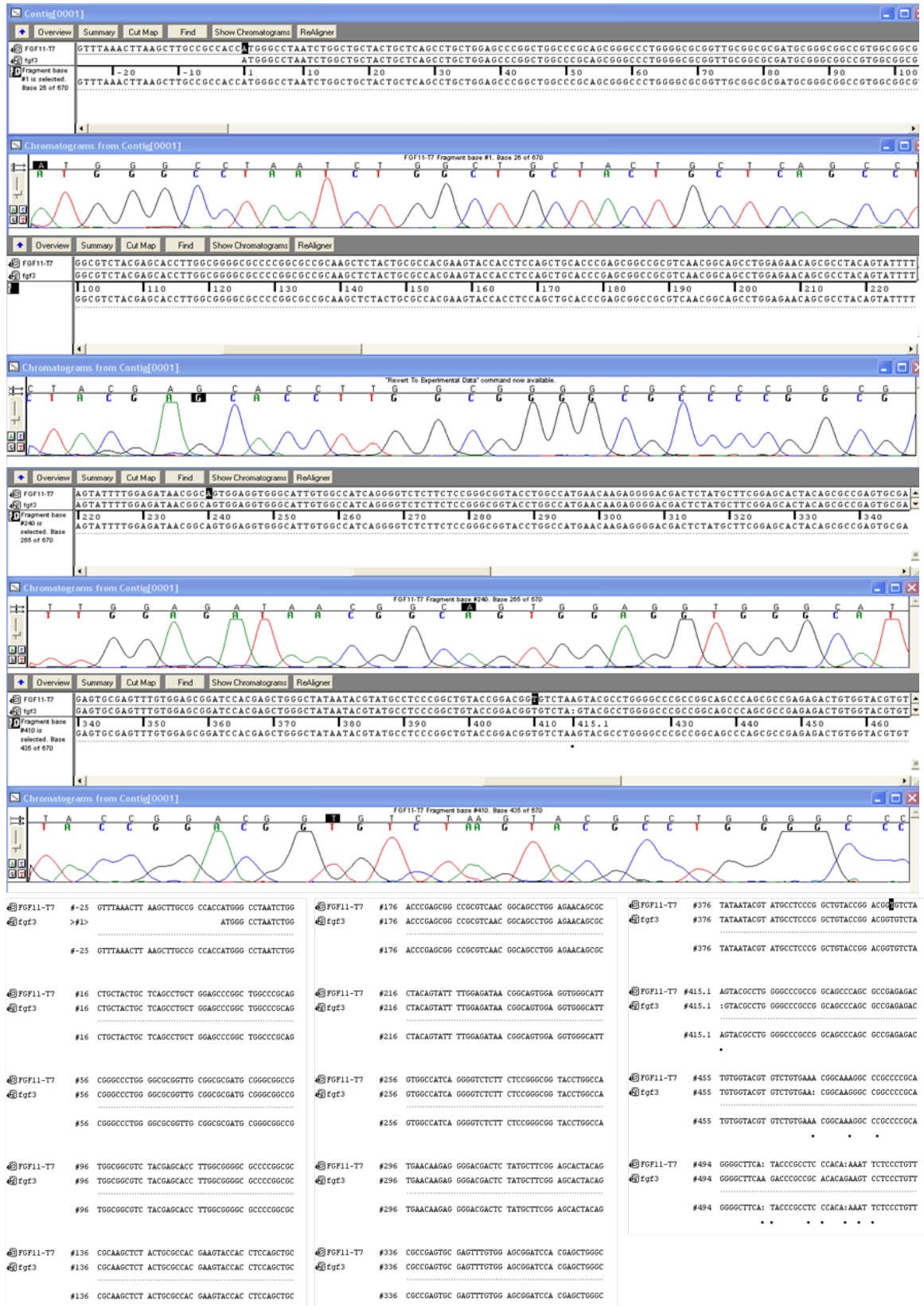
pcDNA3.1'da bağlanma bölgesi bulunan BGH R primeri ile de *FGF3* dizisinin 3' ucunun dizi analizi yapılmış ve stop kodonun ardına *XhoI* kesim bölgesinin eklendiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.3). Şekil 4.1.4'de okunan dizinin referans dizisiyle Sequencher 4.7 programıyla yapılan karşılaştırılması gösterilmektedir.

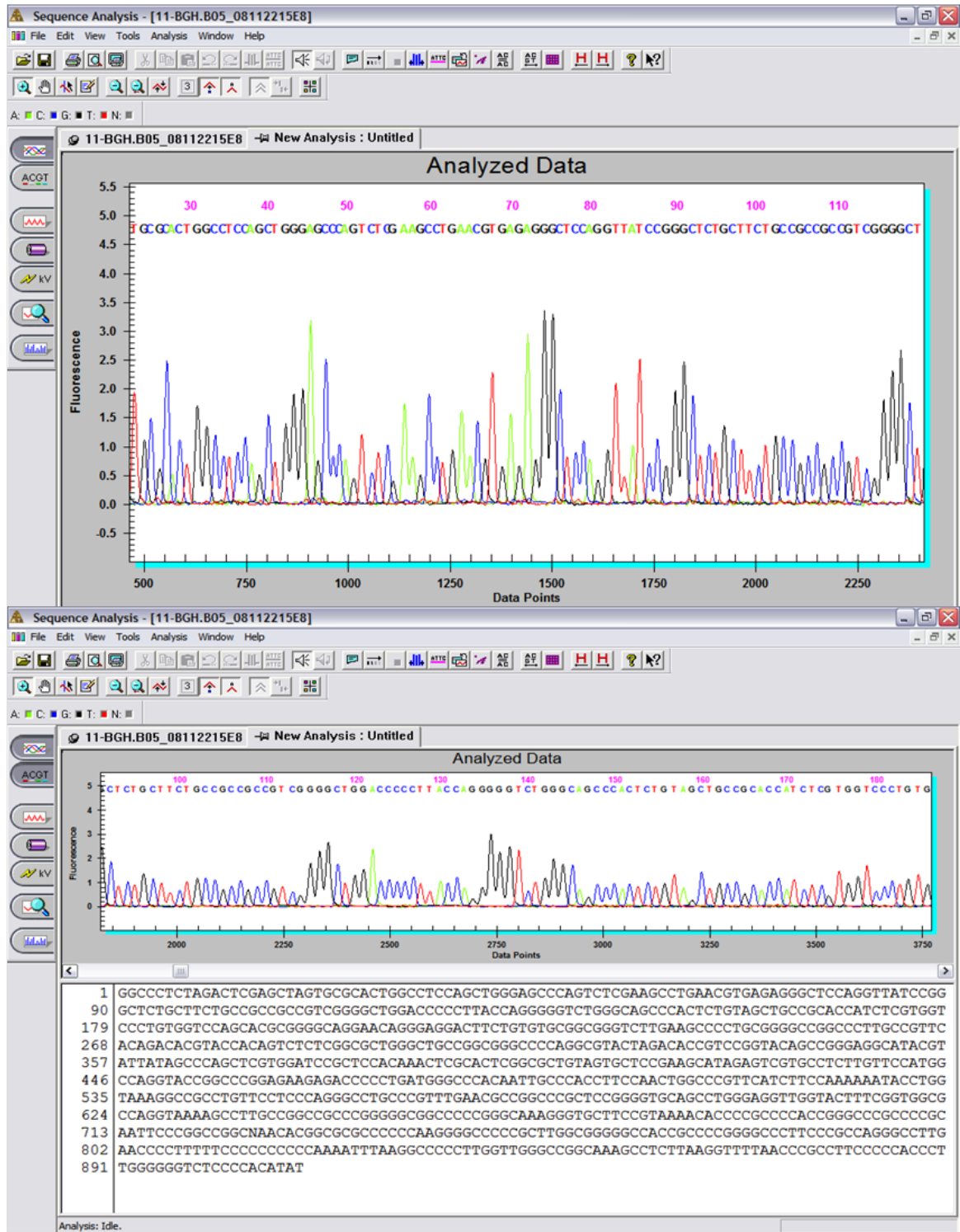
Özetle, DNA dizi analizi sonucu *FGF3* cDNA'sının başlangıç ve bitiş kodonlarının *HindIII* ve *XhoI* kesim bölgeleri bölgeleri arasına klonlanmış olduğu, başlangıç kodonu önüne kozak sekansının eklenmiş olduğu ve DNA dizi analizi veriminin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



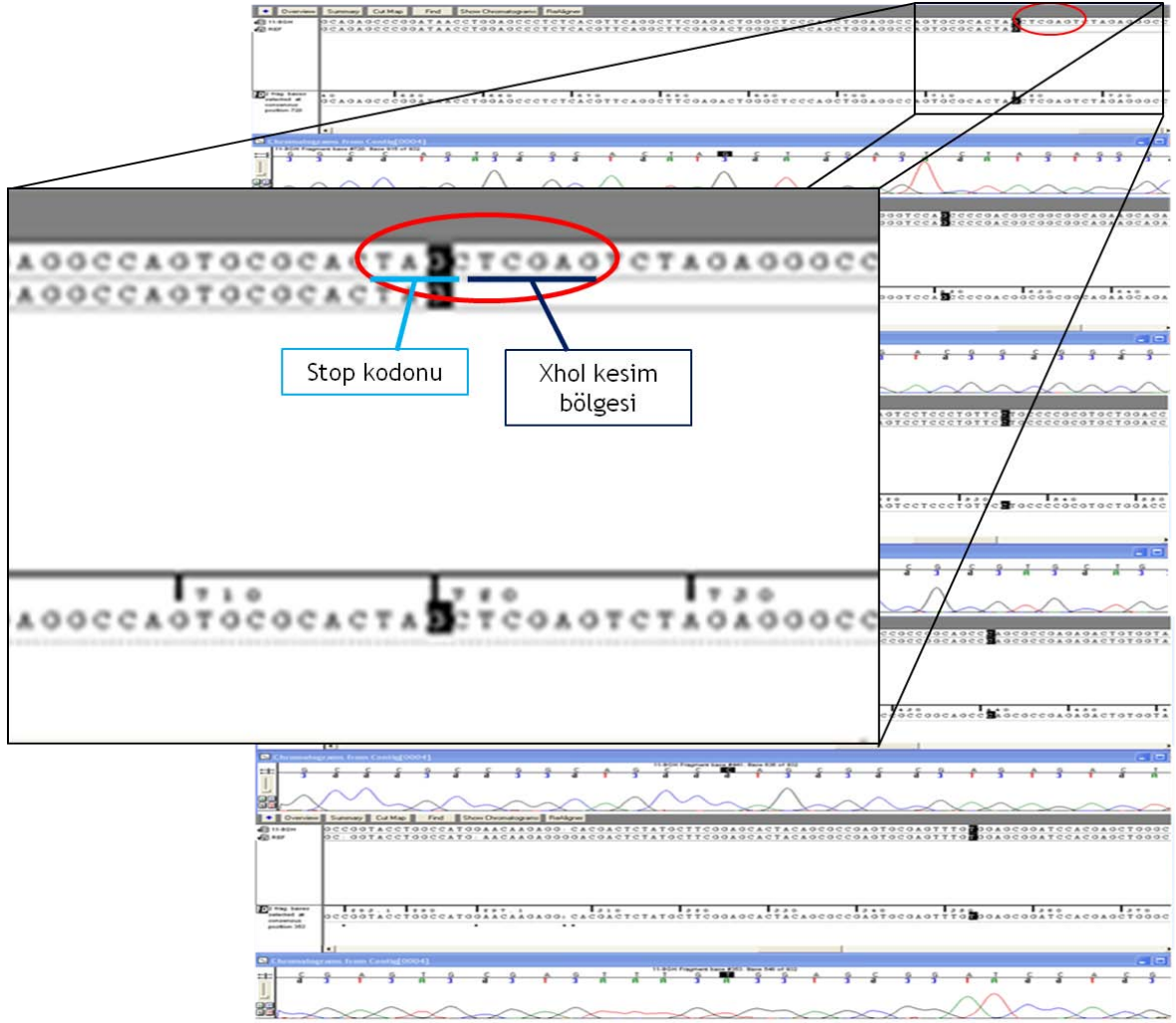
Şekil 4.1.1: pcDNA3.1+hFGF3 koloni 11'in T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.

Kırmızı ile işaretli dairede gösterildiği gibi, okunan dizide *HindIII* kesim bölgesi ve Kozak dizisi başarı ile *FGF3* başlangıç kodunu önüne eklenmiştir.





Şekil 4.1.3: pcDNA3.1+hFGF3 koloni 11'in BGH primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.



Şekil 4.1.4: pcDNA3.1+hFGF3 koloni11'in BGH primeri ile dizi analizi, okunan dizinin referans diziyle karşılaştırılması.

Stop kodonu ve ardına eklenen *XhoI* kesim bölgesi kırmızı daire içerisine alınmıştır

4.2. *FGFR2* cDNA'sının pcDNA3.1 Memeli İfade Vektörüne Aktarılarak Klonlanması

4.2.1. *FGFR2* cDNA'sının Amplifikasyonu

Ektopik FGF3 proteinin reseptörü olan FGFR2 proteini ile etkileşimini analiz etmek amacıyla FGFR2 cDNA'sı da pcDNA3.1 memeli ifade vektörüne klonlanmıştır. Çalışmada Open Biosystem'den temin edilen *FGFR2* cDNA'sı (catalog: MHS1010-7296146, source id: 5277896, accession: BI457785) kullanılmıştır. *FGFR2* cDNA'sını içeren pBlueScriptR.FGFR2 plazmidi bakteri gliserol stoğu içinde *E.coli* (DH10b) içinde gelmiş olup, bakteri gliserol stoğu LB + ampisilin sıvı besiyerinde büyütülmüş ve High Pure Plazmid DNA isolation kit ile izole edilmiştir.

FGFR2 pcDNA3.1 Multiple Cloning Site (MCS) içine yerleştirileceğinden FGFR2'yi de kesmeyen ve bu bölgede bulunan *HindIII* ve *XhoI* enzimleri seçilmiştir. pBlueScriptR.FGFR2 plazmidinden *FGFR2* cDNA'sı iki ucuna özel enzim kesim bölgeleri eklenmiş primerler ile Pfu Polimeraz (Promega) kullanılarak amplifiye edilmiştir. İleri primerin 5' ucunda sırasıyla *HindIII* enzim kesim bölgesi, Kozak dizisi ve *FGFR2*'ye spesifik başlangıç kodonu ve diğer kodonlar yer almaktadır. Ters primerdeyse *FGFR2* stop kodonunu takiben *XhoI* enzim kesim bölgesi eklenmiştir. Tasarlanan primer dizileri Çizelge 3.1.3 'de ve 2115 baz çifti (bç) büyüklüğündeki FGFR2 cDNA dizisi Şekil 3.1.1'de verilmiştir.

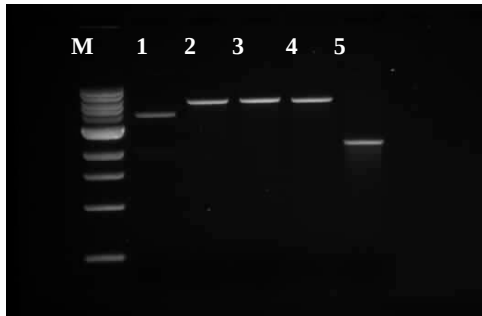
4.2.2. *FGFR2* cDNA'sının pcDNA3.1 Vektörüne Aktarılması

İki ucuna restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenerek *Pfu* polimeraz (Promega) ile amplifiye edilen *FGFR2* cDNA'sı ve pcDNA3.1 plazmidi, *HindIII* ve *XhoI* (MBI, Fermantas) enzimleri ile 2 saat 37°C'da kesilmiş (Çizelge 4.2.1), High Pure PCR purification kit (Roche) ile 50 µl son hacim içinde saflaştırılmış ve %0,8'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.2.1). 5. ve 6. kuyulardaki pcDNA3.1 plazmidi ve FGFR2 PCR ürünü, yine High Pure PCR purification kit (Roche) ile %0,8'lik agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 4.2.2).

Jel izolasyonu ile birlikte, pcDNA3.1 boş plazmid dizisindeki, *HindIII* ve *XhoI* kesim bölgeleri arasında yer alan 74 bp'lik fragmentin, elektroforez sırasında plazmidin geri kalan kısmından ayrılması sağlanmıştır. Bu sayede, bu fragmentin ligasyon reaksiyonuna girmesi önlenmiş ve ligasyon veriminde artış sağlanmıştır.

	FGFR2 PCR	Duration	Döngü
İlk Denatürasyon	95 °C	2 dk	-
Denatürasyon	95 °C	10 sn	35 döngü
Bağlanma sıcaklığı	60 °C	30 sn	
Uzama	73 °C	30 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	-

Çizelge 4.2.1: *FGFR2* klonlama primerleriyle gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun programı.



M) 6 µl 1kb Marker (NEB)

1) 150 ng pcDNA3.1,

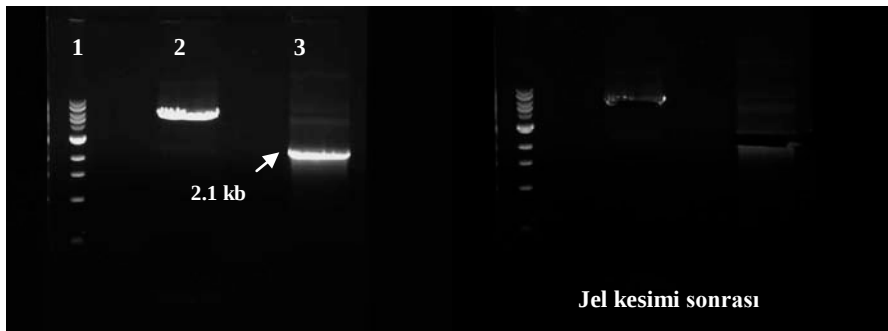
2) 150 ng pcDNA3.1+*HindIII*,

3) 150 ng pcDNA3.1+ *XhoI*,

4) 150 ng pcDNA3.1+*HindIII*+ *XhoI*,

5) 150 ng µl *FGFR2* pcr ürünü +*HindIII*+*XhoI*

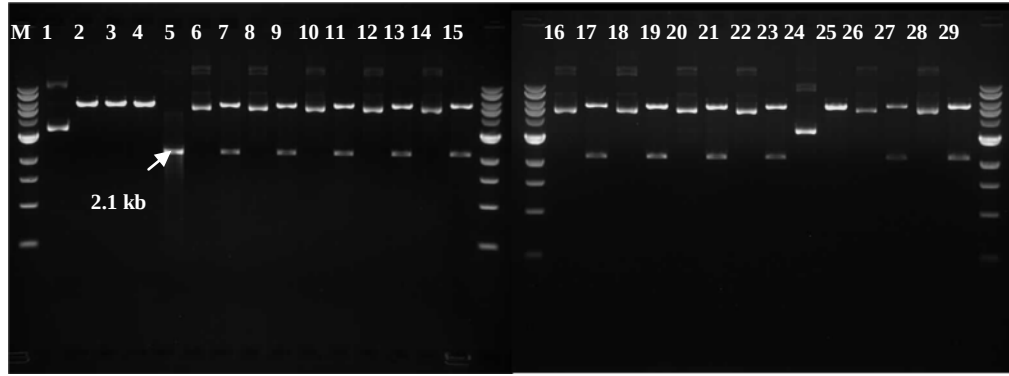
Şekil 4.2.1: *FGFR2* cDNA'sını *HindIII* ve *XhoI* enzimleri ile kesildikten sonra alınan agaroz jel görüntüsü.



Şekil 4.2.2: Kesilen pcDNA3.1 plazmidinin ve *FGFR2* pcr ürününün agaroz jelden izolasyonu.

1) 6 µl 1kb Marker (NEB), **2)** 1 µg pcDNA3.1+*HindIII*+ *XhoI*, **3)** 1 µg *FGFR2*+*HindIII*+ *XhoI*,

Ligasyon sırasında 3:1 insert:vektör oranı kullanılmıştır. DNA uç molarite hesabı sonrası agaroz jelden izole edilen *HindIII* ve *XhoI* ile kesilmiş pcDNA3.1 plazmidinden 50 ng ve FGFR2 PCR ürününden 58 ng alınmış ve T4 DNA Ligase ile oda sıcaklığında 2 saat ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyonun transformasyonunu takiben elde edilen kolonilerden plazmid DNAsı izole edilmiş ve agaroz jelde kontrol edildikten sonra 250 ng plazmid DNAsı *HindIII*+*XhoI* enzimleri ile kesilmiş ve yaklaşık 125 ng kesilmiş ürünler tekrar agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 4.2.3).



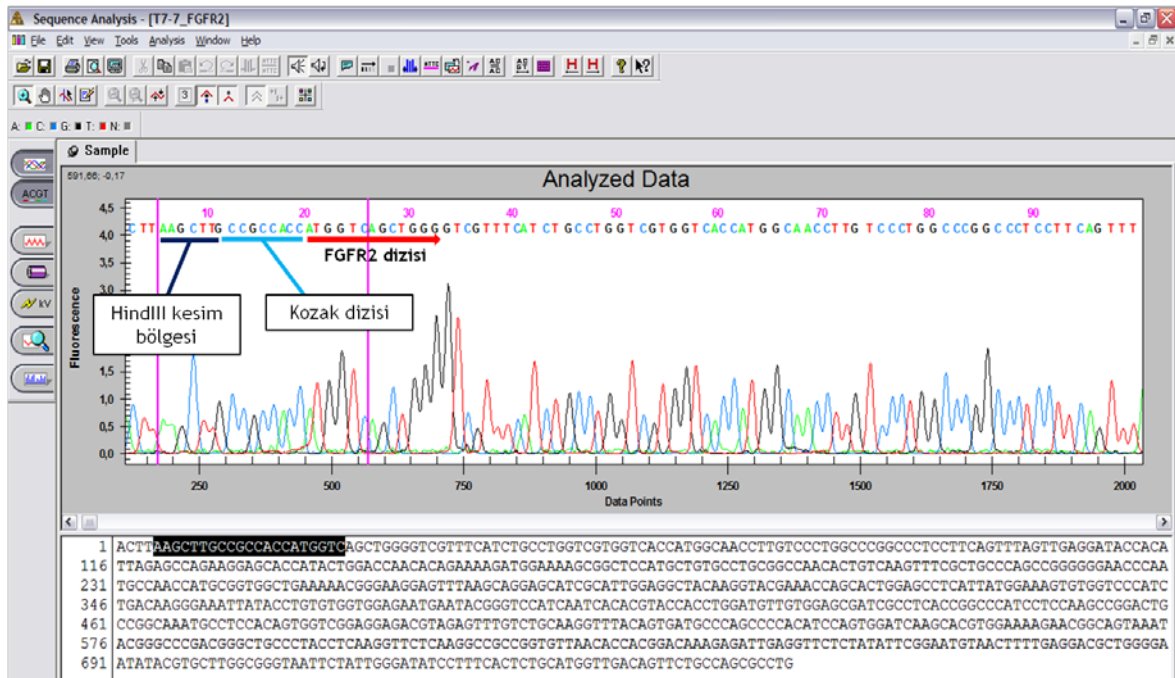
Şekil 4.2.3: FGFR2 cDNA'sının ligasyon sonrası, plazmidlerin *HindIII* ve *XhoI* enzimleriyle kesilerek kontrolü.

M) NEB 1kb marker	10) pcDNA3.1.FGFR2 #3 uncut	20) pcDNA3.1.FGFR2 #8 uncut
1) pcDNA3.1 uncut	11) pcDNA3.1.FGFR2 #3 H/X	21) pcDNA3.1.FGFR2 #8 H/X
2) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i>	12) pcDNA3.1.FGFR2 #4 uncut	22) pcDNA3.1.FGFR2 #9 uncut
3) pcDNA3.1 + <i>XhoI</i>	13) pcDNA3.1.FGFR2 #4 H/X	23) pcDNA3.1.FGFR2 #9 H/X
4) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	14) pcDNA3.1.FGFR2 #5 uncut	24) pcDNA3.1.FGFR2 #10 uncut
5) FGFR2 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	15) pcDNA3.1.FGFR2 #5 H/X	25) pcDNA3.1.FGFR2 #10 H/X
6) pcDNA3.1.FGFR2 #1 uncut	16) pcDNA3.1.FGFR2 #6 uncut	26) pcDNA3.1.FGFR2 #11 uncut
7) pcDNA3.1.FGFR2 #1 H/X	17) pcDNA3.1.FGFR2 #6 H/X	27) pcDNA3.1.FGFR2 #11 H/X
8) pcDNA3.1.FGFR2 #2 uncut	18) pcDNA3.1.FGFR2 #7 uncut	28) pcDNA3.1.FGFR2 #12 uncut
9) pcDNA3.1.FGFR2 #2 H/X	19) pcDNA3.1.FGFR2 #7 H/X	29) pcDNA3.1.FGFR2 #12 H/X

Kesilen kolonilerin çoğunda *HindIII*-*XhoI* ile kesildiğinde 5.4 kb'lık pcDNA3.1 ve 2.1 kb'lık *FGFR2* bantları gözlenmiş ve bu plazmid DNA'larından 4., 6. ve 7. koloni DNA dizi analizi için seçilmiştir.

4.2.3. pcDNA3.1.FGFR2 DNA Dizi Analizi

2.1 kb'lık *FGFR2* cDNA'sını alan koloniler pcDNA3.1 plazmidine spesifik T7F ve BGHR primerleriyle (Çizelge 3.1.2) iki uçtan sekanslanmıştır. Plazmid DNA'ları Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start kit (Beckman Coulter) kullanılarak sekansa hazırlanmış ve örnekler Beckman Coulter SEQ8000 cihazında yürütülmüştür. Çıkan sonuçlar Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation) DNA sekans yazılımında referans dizi ile karşılaştırılarak analiz edilmiş ve Genbank'taki *FGFR2* cDNA dizisiyle aynı olduğu ve ayrıca sırasıyla 5'uca *HindIII* enzim kesim bölgesinin ve başlangıç kodonunun önüne Kozak dizisinin, 3'uca da *XhoI* kesim bölgesinin başarı ile eklendiği görülmüştür. Şekil 4.2.4'te T7 primeri ile gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonuçları gösterilmektedir. Şekil 4.2.5'te ise okunan dizinin referans dizisiyle karşılaştırılması gösterilmiştir.

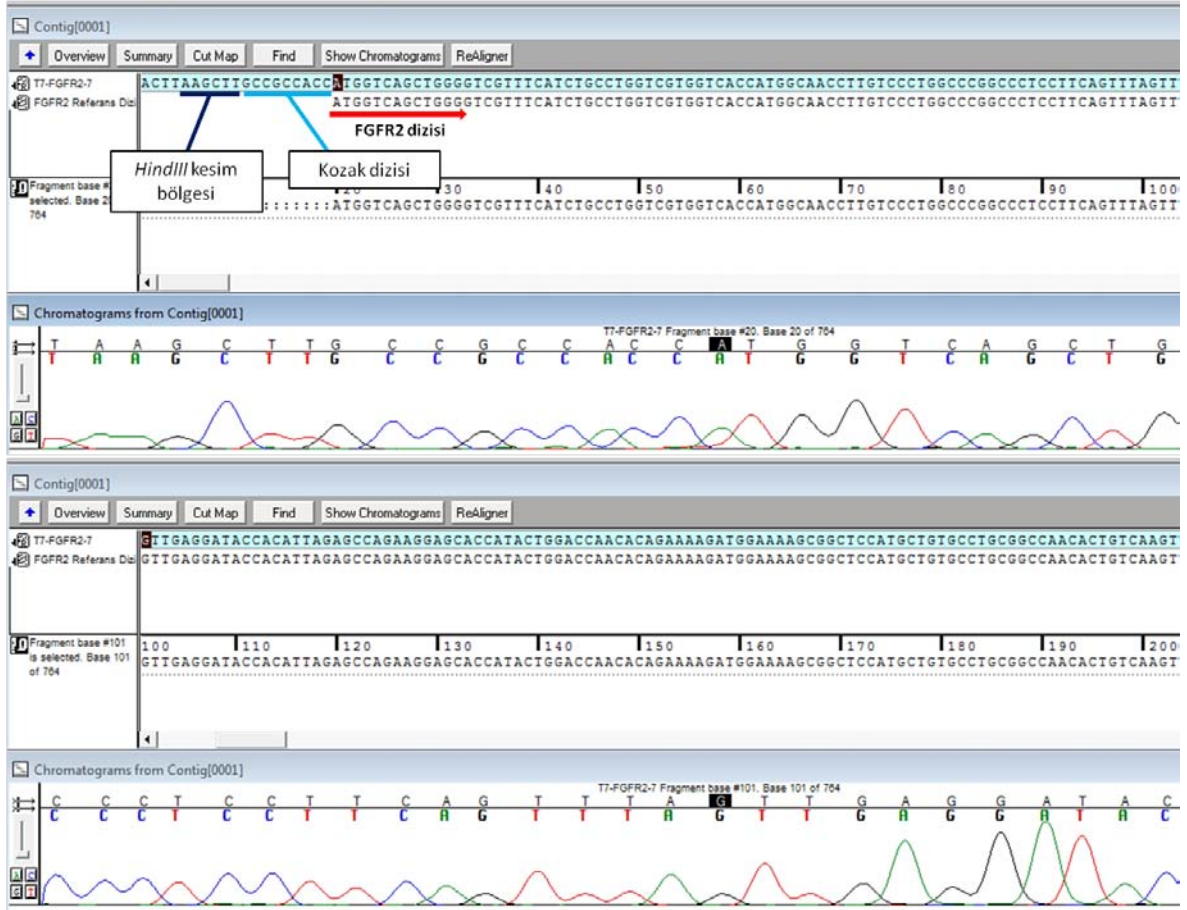


Şekil 4.2.4: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.

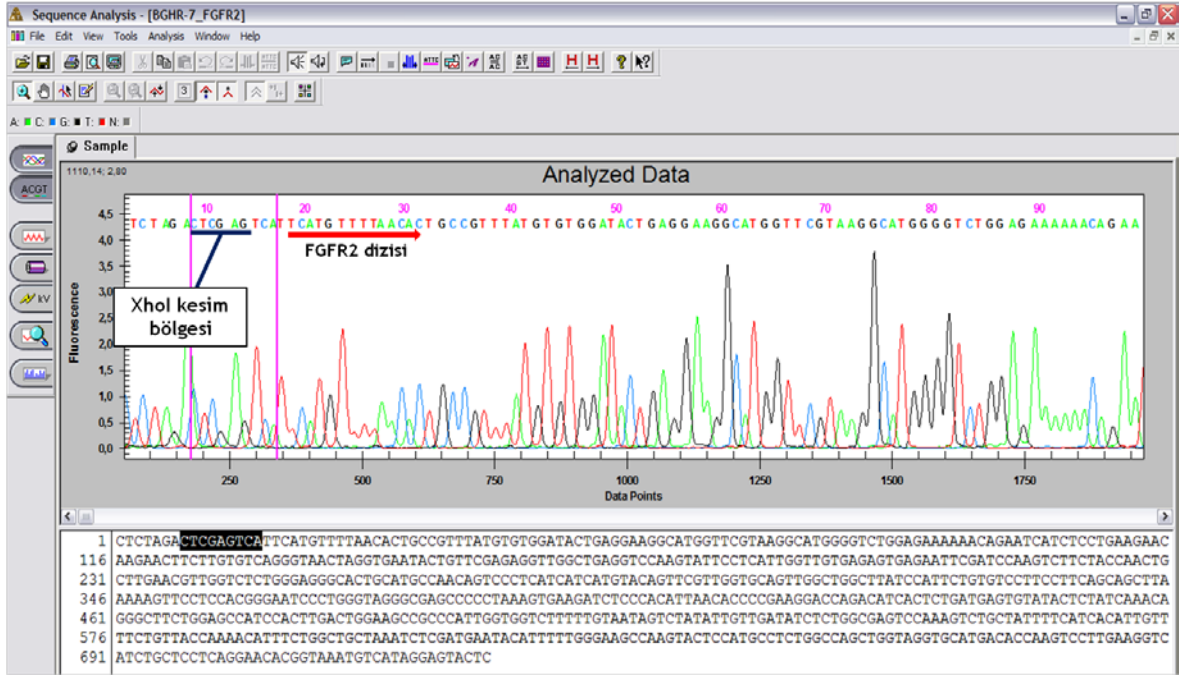
Aynı şekilde pcDNA3.1'da bağlanma bölgesi bulunan BGHR primeri ile de *FGF3* dizisinin 3' ucunun dizi analizi yapılmış ve stop kodonun ardına *XhoI* kesim bölgesinin

eklendiği gözlenmiştir (Şekil 4.2.6). Şekil 4.2.7’te okunan dizinin referans dizisiyle Sequencher 4.7 programıyla yapılan karşılaştırılması verilmektedir.

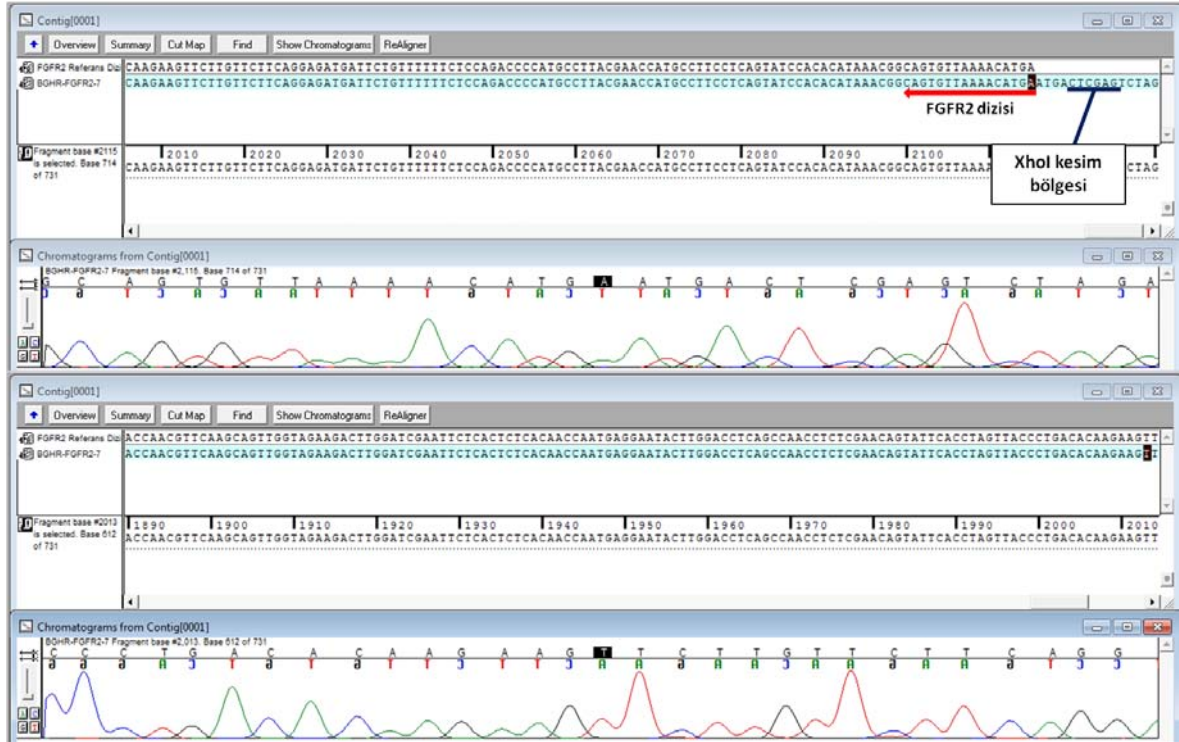
FGFR2 cDNA’sı, başarıyla pcDNA3.1 plazmidinin içine klonlanmıştır.



Şekil 4.2.5: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7’nin T7 primeri ile okunan dizinin referans dizisiyle karşılaştırılması.



Şekil 4.2.6: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin BGHR primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi.

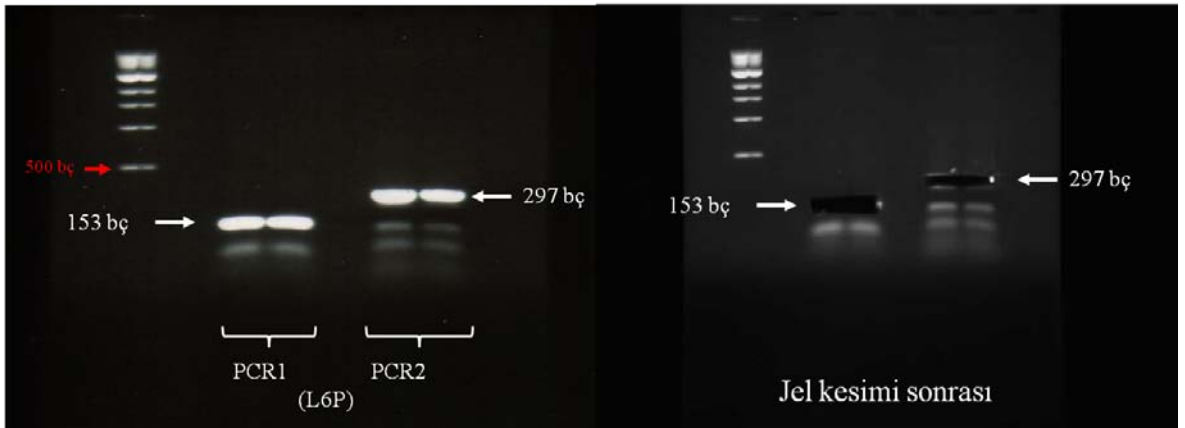


Şekil 4.2.7: pcDNA3.1.FGFR2 koloni 7'nin BGHR primeri ile okunan dizinin referans dizile karşılaştırılması.

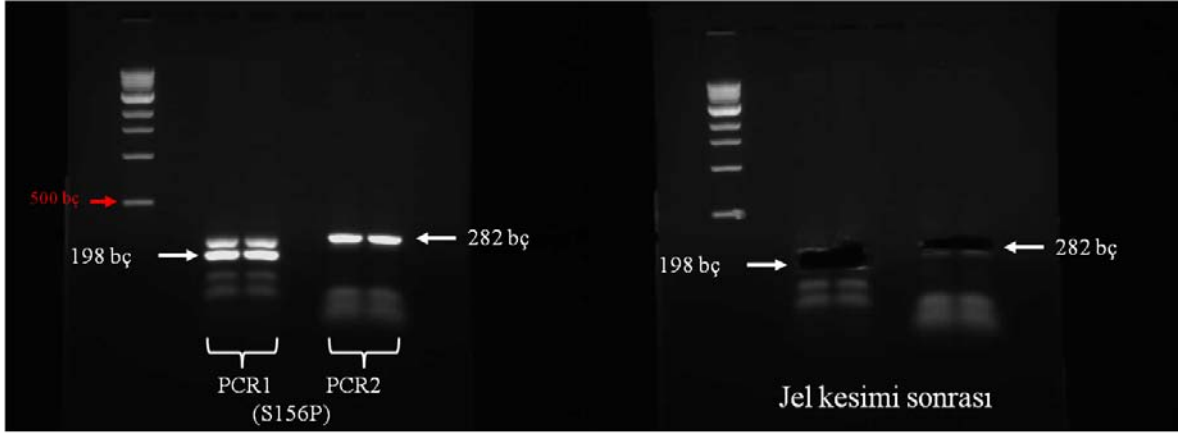
4.3. Bölgeye Özgü Mutagenез ile pcDNA3.1.FGF3 Plazmidinde L6P ve S156P Mutantlarının Oluşturulması

FGF3 geninde tanımlanan c.17T>C (p.Lue6Pro) ve c.466T>C (p.Ser156P) mutasyonları (Tekin *et al.* 2007; Tekin *et al.* 2008) yabancı tip FGF3'ü ifade eden pcDNA3.1-hFGF3 plazmidinde oluşturulmuştur. L6P mutasyonu salınan bir protein olan FGF3'ün sinyal peptidinde, S156P ise proteinin karboksi terminaline doğru yer almaktadır.

L6P mutagenезi için Çizelge 3.1.4'deki birinci ve ikinci primerler kullanılarak oluşturulan 153 bç büyüklüğündeki PCR1 ürünü ve yine aynı çizelgedeki üçüncü ve dördüncü primerler kullanılarak oluşturulan 297 bç büyüklüğündeki PCR2 ürünü Roche PCR purification kiti kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 4.3.1). S156P içinde aynı şekilde Çizelge 3.1.5'te görülen bu mutagenез için tasarlanan primerler kullanılarak 198 bç büyüklüğündeki PCR1 ve 282 bç büyüklüğündeki PCR2 ürünü elde edilmiştir ve yine aynı kit ile agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 4.3.2). Bu PCR reaksiyonlarda kullanılan parametreler Çizelge 3.2.2 'de görülmektedir.

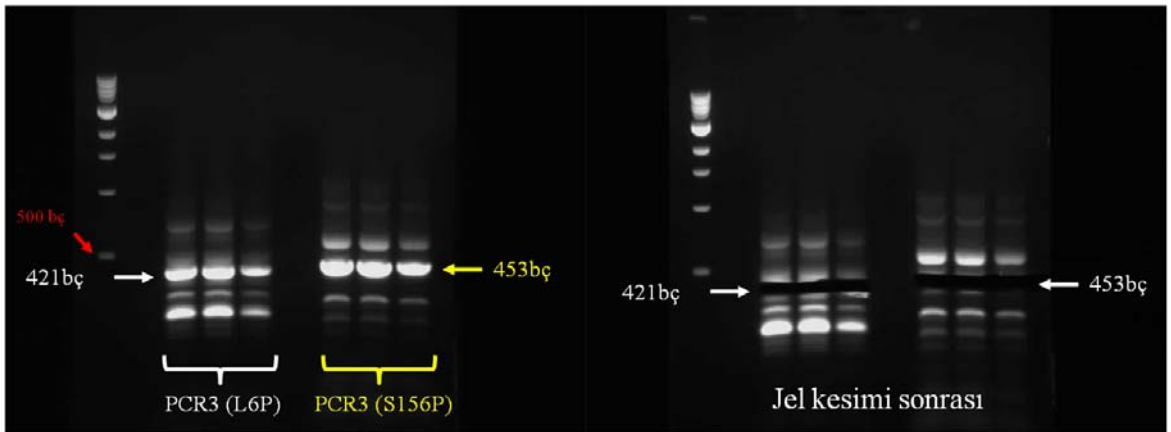


Şekil 4.3.1: L6P mutagenезi için PCR1 ve PCR2 reaksiyonu ve jel kesimi.

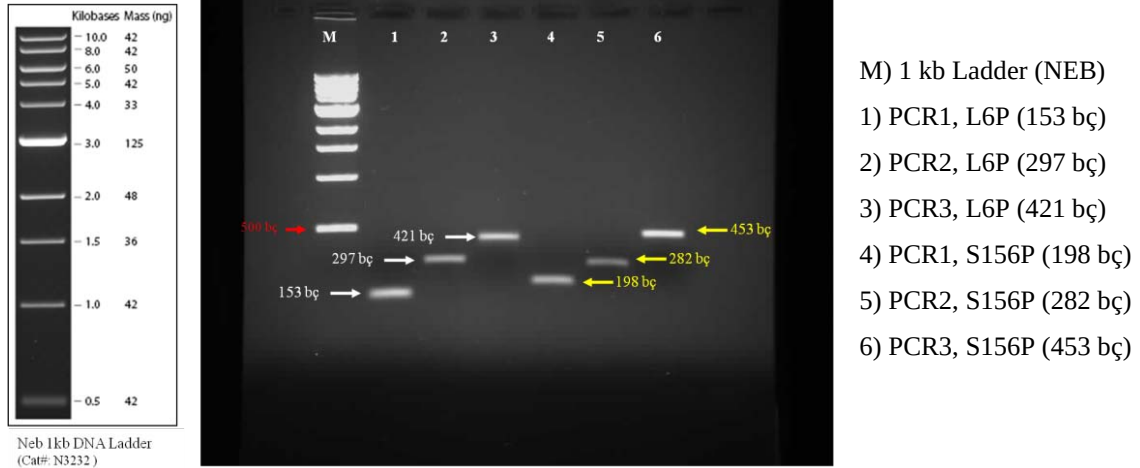


Şekil 4.3.2: S156P mutagenezi için PCR1 ve PCR2 reaksiyonu ve jel kesimi.

L6P mutagenezi için, izolasyon sonucu elde edilen PCR1 ve PCR2 ürünleri kalıp DNA olarak kullanılarak Çizelge 3.1.4'deki birinci ve dördüncü primerler ile 421 bç uzunluğundaki PCR3 ürünü elde edilmiştir. S156P içinde aynı şekilde Çizelge 3.1.5'deki bu mutageniz için tasarlanan primerler kullanılarak 453 bç büyüklüğündeki PCR3 ürünü elde edilmiştir (Mutageniz aşamasında kullanılan tüm PCR parametreleri Çizelge 3.2.2'de gösterilmiştir). PCR3 reaksiyonu yine Roche PCR purification kiti kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 4.3.3). Ardından her iki mutageniz için elde edilen tüm PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi yapılmıştır (Şekil 4.3.4) ve tüm bantların istenilen boyutta olduğu gözlenmiştir.

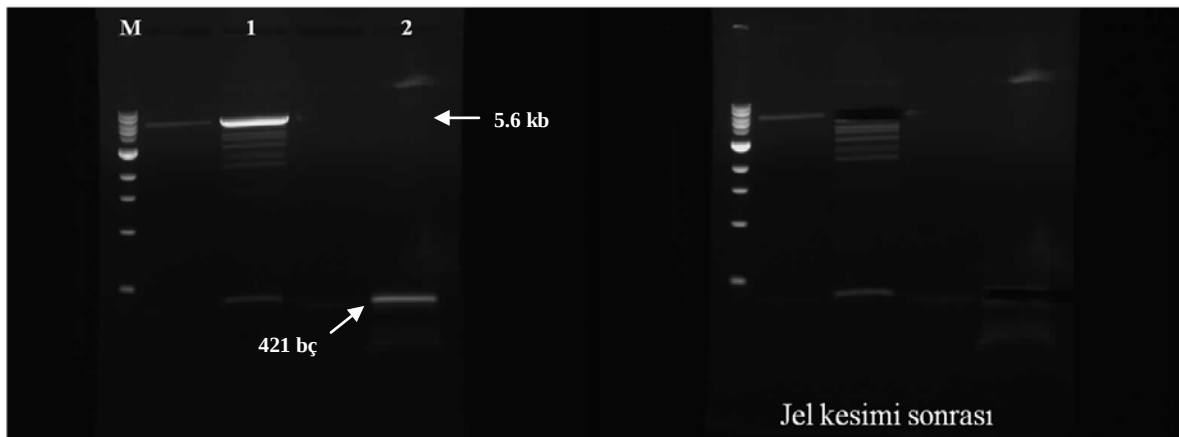


Şekil 4.3.3: L6P ve S156P mutagenezi için PCR3 reaksiyonu ve jel kesimi.



Şekil 4.3.4: Mutagenез PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

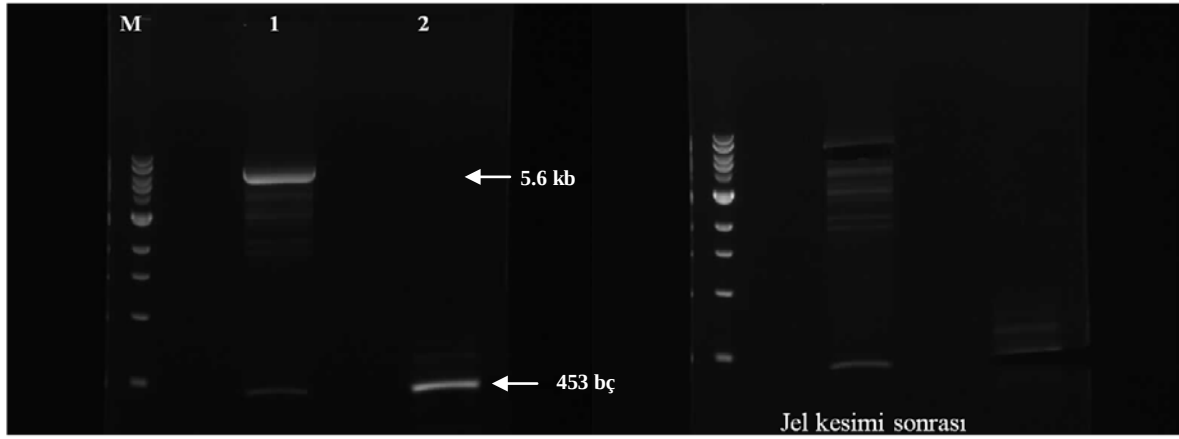
L6P mutasyonu oluşturulan PCR3 DNA fragmenti agaroz jelden izole edildikten sonra, iki ucunda *SacI* ve *KpnI* bölgelerini içeren 1µg PCR3-L6P ve FGF3 dizisinde bu bölgelerin endojen olarak bulunduğu 1µg pcDNA3.1.FGF3 plazmidi *SacI* ve *KpnI* enzimleri ile 37°C’de gece boyu kesilmiştir (Şekil 4.3.5).



Şekil 4.3.5: pcDNA3.1.FGF3’ün ve L6P PCR3 ürününün *SacI* ve *KpnI* enzimleri kullanılarak kesilmesi.

M: NEB 1kb marker, 1) pcDNA3.1.FGF3 + *SacI*, *KpnI*(1µg), 2) L6P, PCR3 + *SacI*, *KpnI*(1µg)

S156P mutagenezi içinse yine aynı şekilde iki ucunda *KpnI* ve *XhoI* bulunan 1µg PCR3-S156P ve FGF3 dizisinde *KpnI* bölgesini endojen olarak, *XhoI* bölgesini de klonlamayla birlikte içeren 1µg pcDNA3.1.FGF3 plazmidi önce *KpnI* enzimiyle 37°C’de gece boyu kesilmiştir, daha sonra Roche High Pure Purification kit ile saflaştırılıp ardından *XhoI* enzimi ile 37°C’de 2 saat süresince kesilmiştir (Şekil 4.3.6). *KpnI* enzimi Fastdigest enzim olmadığından dolayı *XhoI* ile birlikte 2 saatte kesilememiştir.



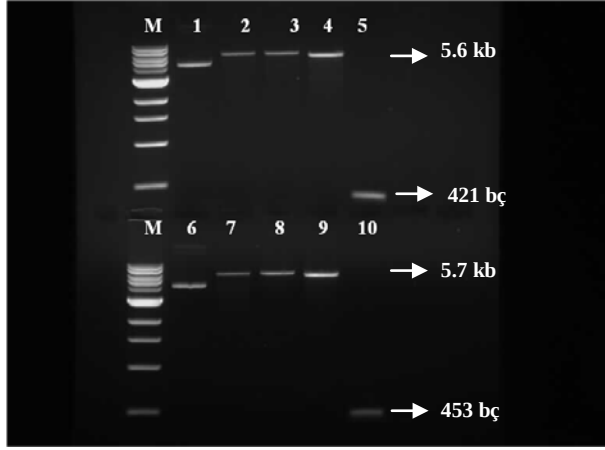
Şekil 4.3.6: pcDNA3.1.FGF3’ün ve S156P PCR3 ürününün *KpnI* ve *XhoI* enzimleri kullanılarak kesilmesi.

M: NEB 1kb marker, 1) pcDNA3.1.FGF3 + *KpnI* *XhoI* (1µg), 2) S156P, PCR3 + *KpnI*, *XhoI*(1µg)

Jelden izole edilen, pcDNA3.1.FGF3 + *SacI*+*KpnI*, L6P- PCR3 + *SacI*+*KpnI* ve pcDNA3.1.FGF3 + *KpnI* +*XhoI*, S156P, PCR3 + *KpnI*+ *XhoI* ve diğer tüm kesim reaksiyonları birlikte jel elektroforeziyle analiz edilmiştir (Şekil 4.3.7).

Ligasyon aşamasında, DNA uçlarının molaritesi yine aşağıdaki formüle göre hesaplanmış olup 3:1 insert:vektör oranı kullanılmıştır.

$$\text{DNA uçlarının Molaritesi} = [(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \div (\text{baz çifti} \times 650 \text{ dalton})] \times 2 \text{ uç}$$



M) NEB 1kb marker
 1) pcDNA3.1.FGF3 uncut
 2) pcDNA3.1.FGF3 + *SacI*
 3) pcDNA3.1.FGF3 + *KpnI*
 4) pcDNA3.1.FGF3 + *SacI*, *KpnI*
 5) PCR3, L6P + *SacI*, *KpnI*
 *Tüm örnekler 50ng

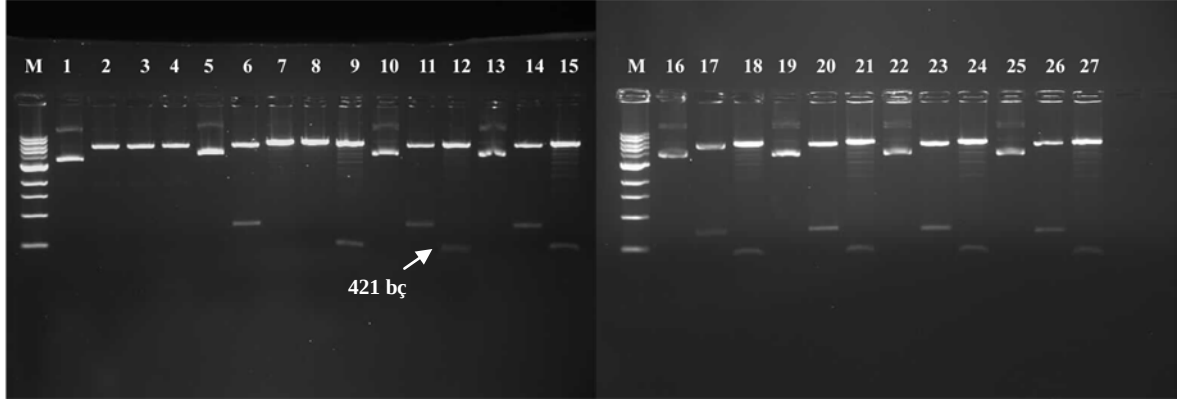
M) NEB 1kb marker
 6) pcDNA3.1.FGF3 uncut
 7) pcDNA3.1.FGF3, S156P + *KpnI*
 8) pcDNA3.1.FGF3, S156P + *XhoI*
 9) pcDNA3.1.FGF3, S156P + *KpnI*, *XhoI*
 10) PCR3, S156P + *KpnI*, *XhoI*
 *Tüm örnekler 50ng

Şekil 4.3.7: pcDNA3.1.FGF3'ün ve PCR3 ürünlerinin restriksiyon kesim enzimleri kullanılarak kesilmesi.

Bu hesaplama göre, pcDNA3.1.FGF3.L6P mutasyonunu içeren plazmidi oluşturmak için, agaroz jelden izole edilen *SacI* ve *KpnI* ile kesilmiş pcDNA3.1.FGF3 plazmidinden 50 ng, yine aynı enzimlerle kesilmiş olan L6P-PCR3 ürününden 15 ng alınmış ve T4 DNA Ligase (New England Biolabs) ile oda sıcaklığında 2 saat ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

pcDNA3.1.FGF3.S156P mutasyonunu içeren plazmidi oluşturmak içinse, yine agaroz jelden izole edilen *KpnI* ve *XhoI* ile kesilmiş pcDNA3.1.FGF3 plazmidinden 50 ng, ve aynı enzimlerle kesilmiş olan L6P-PCR3 ürününden 15 ng alınmış ve T4 DNA Ligase (New England Biolabs) ile oda sıcaklığında 2 saat ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra, ligasyon karışımlarından 3 µl alınmış ve *E.coli* DH5α-T1 suşuna transforme edilerek LB+amp besiyerinde geceboyu büyümeye bırakılmışlardır. Ertesi gün, ligasyon petrilerinden L6P ve S156P mutagenезlerinin herbiri için altışar olmak üzere toplam 12 koloni alınmış ve 3 ml LB+amp besiyerinde gece boyu büyütülerek Plasmid Isolation kit (Roche) ile plazmid DNA'ları elde edilmiştir. Agaroz jelde kontrol edildikten sonra 250 ng plazmid DNA'ları L6P için, *SacI* ve *KpnI*, S156 için *KpnI* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiş ve yaklaşık 125 ng kesilmiş ürünler tüm kontrol kesimleri yapılarak tekrar agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 4.3.8 ve Şekil 4.3.9).

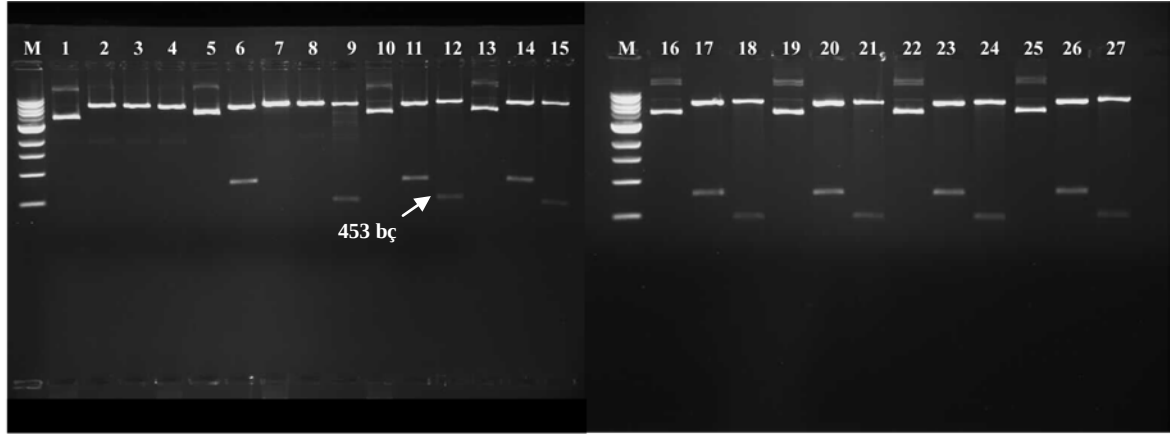


Şekil 4.3.8: İzole edilen L6P plazmidlerinin kesim enzimleri kullanılarak kontrolü.

M) NEB 1kb marker	10) pcDNA3.1.FGF3.L6P #1 uncut	20) pcDNA3.1.FGF3.L6P #4 H/X
1) pcDNA3.1 uncut	11) pcDNA3.1.FGF3.L6P #1 H/X	21) pcDNA3.1.FGF3.L6P #4 S/K
2) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i>	12) pcDNA3.1.FGF3.L6P #1 S/K	22) pcDNA3.1.FGF3.L6P #5 uncut
3) pcDNA3.1 + <i>XhoI</i>	13) pcDNA3.1.FGF3.L6P #2 uncut	23) pcDNA3.1.FGF3.L6P #5 H/X
4) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	14) pcDNA3.1.FGF3.L6P #2 H/X	24) pcDNA3.1.FGF3.L6P #5 S/K
5) pcDNA3.1.FGF3 uncut	15) pcDNA3.1.FGF3.L6P #2 S/K	25) pcDNA3.1.FGF3.L6P #6 uncut
6) pcDNA3.1.FGF3 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	16) pcDNA3.1.FGF3.L6P #3 uncut	26) pcDNA3.1.FGF3.L6P #6 H/X
7) pcDNA3.1.FGF3 + <i>SacI</i>	17) pcDNA3.1.FGF3.L6P #3 H/X	27) pcDNA3.1.FGF3.L6P #6 S/K
8) pcDNA3.1.FGF3 + <i>KpnI</i>	18) pcDNA3.1.FGF3.L6P #3 S/K	*Tüm kontroller ve örnekler 125 ng
9) pcDNA3.1.FGF3 + <i>SacI</i> , <i>KpnI</i>	19) pcDNA3.1.FGF3.L6P #4 uncut	

Şekil 4.3.8’ deki kesimlerde, L6P mutagenezi aşamasında kullanılan *SacI* ve *KpnI* enzim kesim bölgelerinin bulunması mutant PCR parçasının başarıyla plazmide eklendiğini, ve *HindIII* ve *XhoI* ile yapılan kontroller ise pcDNA3.1.FGF3.L6P plazmidindeki FGF3 dizisinin varlığını mutagenez sonrasında sürdürdüğünü göstermektedir. Analizi yapılan 6 koloni de Okla belirtilen 421 bp’lik L6P-PCR3 bandı ve 5.6 kb’lik pcDNA3.1.FGF3 bandı bulunmaktadır. Bu sonuç, mutajenik fragment olan L6P-PCR3’ün pcDNA3.1.FGF3 plazmidine başarılı bir şekilde aktarıldığının göstergesidir. Bu kolonilerden 1, 3 ve 4 numaralı koloni DNA dizi analizinde mutasyonu göstermek üzere için seçilmiştir.

Şekil 4.3.9’te pcDNA3.1.FGF3.S156P plazmidinin mutagenezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği benzer şekilde gösterilmektedir. *KpnI* ve *XhoI* fragmenti mutagenez PCR ürününün plazmid içine girdiğini göstermektedir. Analizi yapılan 6 koloni de okla belirtilen 453 bp’lik S156P-PCR3 bandı ve 5.7 kb’lik pcDNA3.1.FGF3 bulunmaktadır. Bu sonuç da mutajenik fragment olan S156P-PCR3’ün pcDNA3.1.FGF3 plazmidine yine başarılı bir şekilde aktarıldığını göstermektedir.

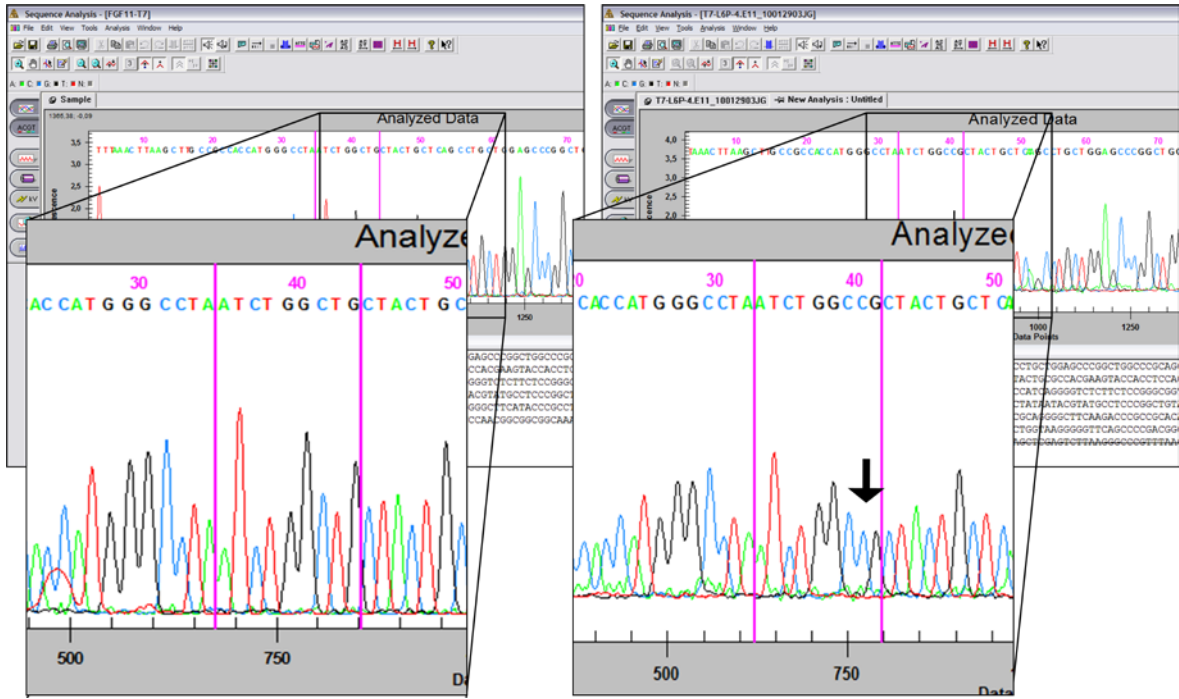


Şekil 4.3.9: İzole edilen S156P plazmidlerinin kesim enzimleri kullanılarak kontrolü.

M) NEB 1kb marker	10) pcDNA3.1.FGF3.S156P #1 uncut	20) pcDNA3.1.FGF3.S156P #4 H/X
1) pcDNA3.1 uncut	11) pcDNA3.1.FGF3.S156P #1 H/X	21) pcDNA3.1.FGF3.S156P #4 K/X
2) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i>	12) pcDNA3.1.FGF3.S156P #1 K/X	22) pcDNA3.1.FGF3.S156P #5 uncut
3) pcDNA3.1 + <i>XhoI</i>	13) pcDNA3.1.FGF3.S156P #2 uncut	23) pcDNA3.1.FGF3.S156P #5 H/X
4) pcDNA3.1 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	14) pcDNA3.1.FGF3.S156P #2 H/X	24) pcDNA3.1.FGF3.S156P #5 K/X
5) pcDNA3.1.FGF3 uncut	15) pcDNA3.1.FGF3.S156P #2 K/X	25) pcDNA3.1.FGF3.S156P #6 uncut
6) pcDNA3.1.FGF3 + <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i>	16) pcDNA3.1.FGF3.S156P #3 uncut	26) pcDNA3.1.FGF3.S156P #6 H/X
7) pcDNA3.1.FGF3 + <i>KpnI</i>	17) pcDNA3.1.FGF3.S156P #3 H/X	27) pcDNA3.1.FGF3.S156P #6 K/X
8) pcDNA3.1.FGF3 + <i>XhoI</i>	18) pcDNA3.1.FGF3.S156P #3 K/X	*Tüm kontroller ve örnekler 125 ng.
9) pcDNA3.1.FGF3 + <i>KpnI</i> , <i>XhoI</i>	19) pcDNA3.1.FGF3.S156P #4 uncut	

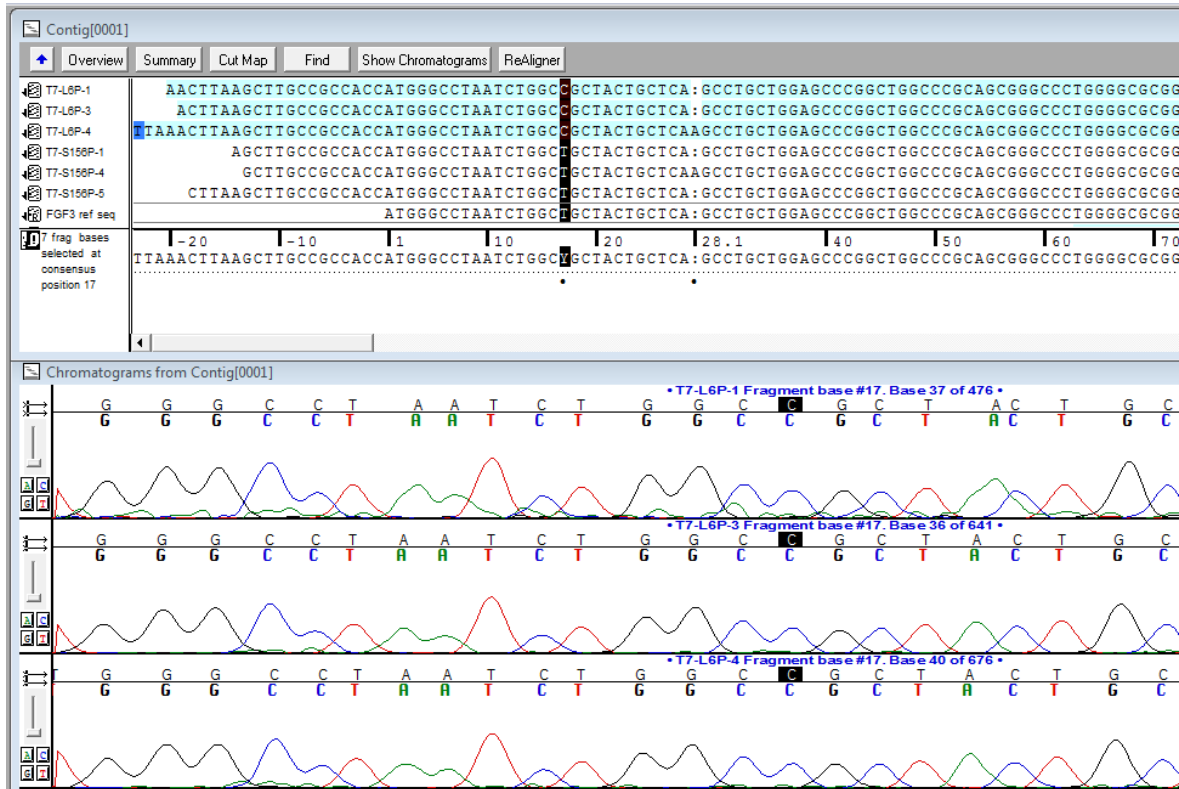
L6P kolonilerinden 1, 3 ve 4 numaralı koloniler, S156P kolonilerinden 1, 4 ve 5 numaralı koloniler DNA dizi analizinde gerçekleştirilen mutasyonları doğrulamak üzere seçilmiştir.

421 bp'lık L6P-PCR3 fragmenti ve 453 bp'lık fragmenti alan koloniler pcDNA3.1 plazmidinde bağlanma bölgesi bulunan T7F ve BGHR primerleriyle (Çizelge 3.1.2) iki uçtan sekanslanmıştır. Çıkan sonuçlar Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation) DNA sekans yazılımında referans diziyile karşılaştırılarak analiz edilmiş ve *FGF3* geninde tanımlanan c.17T>C (p.Leu6Pro) ve c.466T>C (p.Ser156Pro) mutasyonlarının başarıyla pcDNA3.1.FGF3 plazmidinde başarıyla oluşturulduğu görülmüştür. Şekil 4.3.10'te L6P için T7 primeri ile *FGF3* dizisinin 5' ucundan gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonuçları okunan dizinin referans pcDNA3.1 dizisiyle Sequencher 4.7 programıyla yapılan karşılaştırılması verilmektedir.



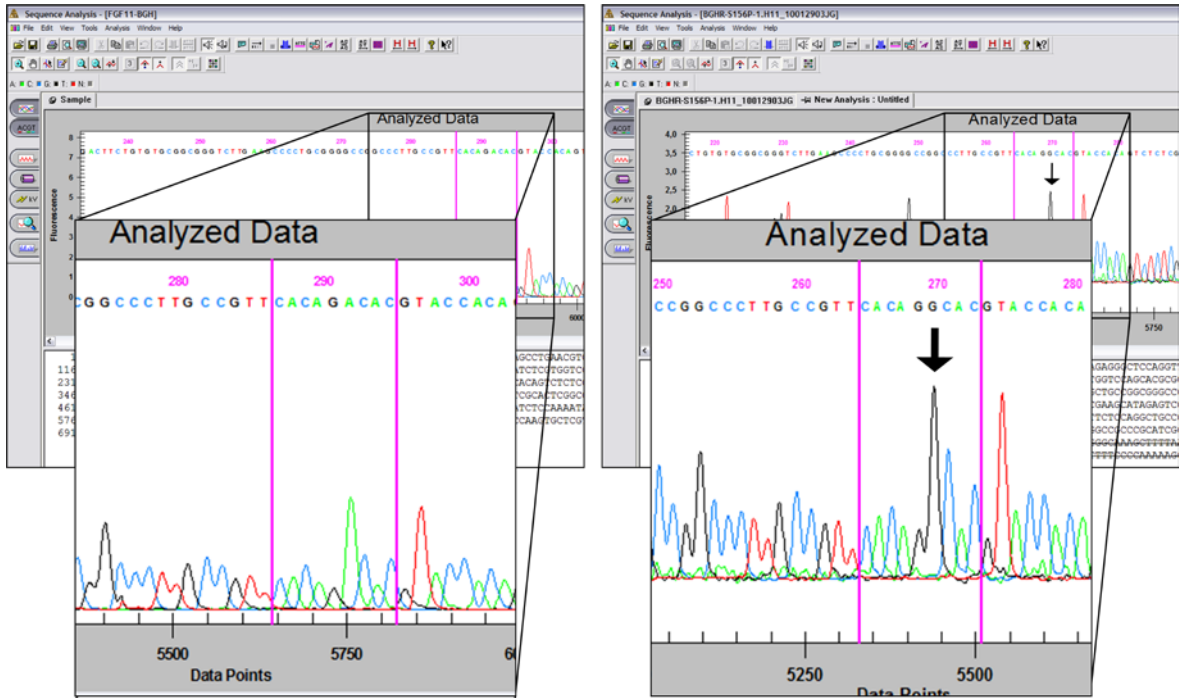
Şekil 4.3.10: pcDNA3.1.FGF3.L6P koloni 4 için T7 primeri ile yapılan DNA dizileme sonuçları.

Mutagenез bölgesini içeren kodon ve önceki iki kodon sınırlarla gösterilmektedir. Solda Mutagenез öncesi sağda mutagenез sonrası sekans sonuçları gösterilmektedir. Mutagenез bölgesi, c.17T>C, okla belirtilmiştir.



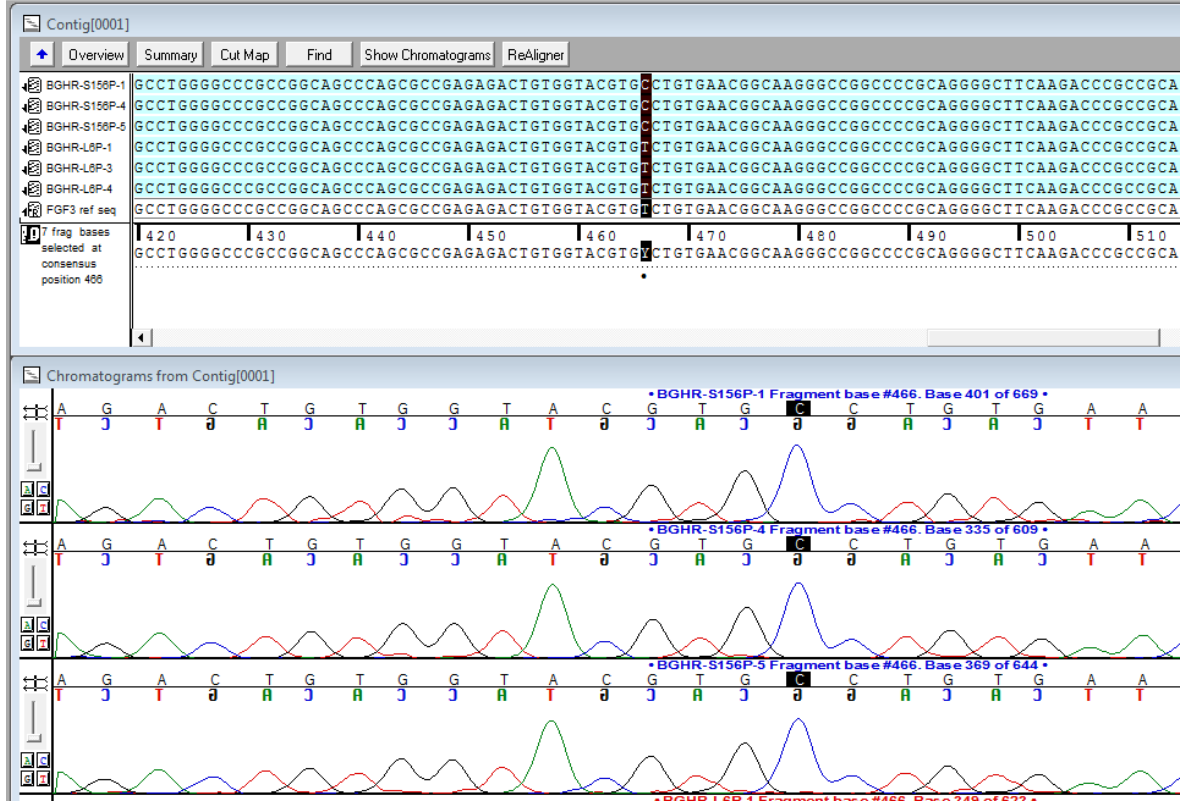
Şekil 4.3.11: pcDNA3.1.FGF3.L6P koloni 4'ün T7 primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi, c.17T>C, mutagenез yapılan bölge.

pcDNA3.1’da bağlanma bölgesi bulunan BGHR primeriyle de *FGF3* dizisinin 3’ ucunun dizi analizi sonuçlarına göre S156P mutasyonunun da aynı şekilde başarılı bir şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil 4.3.12). Şekil 4.3.13’te S156P için okunan dizinin referans pcDNA3.1 dizisiyle Sequencher 4.7 programıyla yapılan karşılaştırılması verilmektedir.



Şekil 4.3.12: pcDNA3.1.FGF3.S156P koloni 1 için BGHR primeri ile yapılan DNA dizileme sonuçları.

Mutagenез bölgesini içeren kodon ve önceki iki kodon sınırlarla gösterilmektedir. Solda Mutagenез öncesi sağda mutagenез sonrası sekans sonuçları gösterilmektedir. Mutagenез bölgesi, c.466T>C, okla belirtilmiştir.



Şekil 4.3.13: pcDNA3.1.FGF3.S156P koloni 1'in BGHR primeri ile dizi analizi, kromatogram ve okunan dizi, c.466T>C, mutagenez yapılan bölge.

4.4. Memeli Hücre Hatlarının Normal ve Mutant FGF3 ile Transfeksiyonu, Ektopik FGF3'ün mRNA Tayini

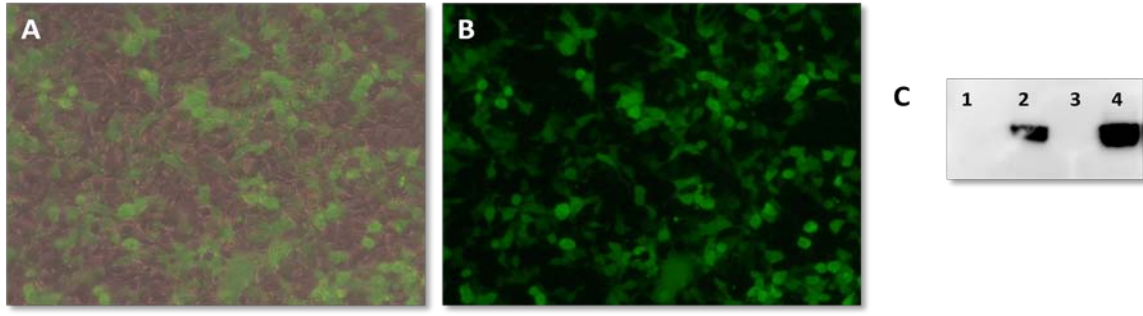
Bu çalışmada normal ve mutant FGF3 proteinlerinin hücre içindeki lokalizasyonunu tayin etmek amacıyla HEK293T (Human Embryonal Kidney) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hattının seçilme nedenlerinin arasında, benzer çalışmalarda sıklıkla kullanıldığından dolayı detaylı olarak tanımlanmış oluşu, yüksek yüzde ile transfecte edilebilmesi ve embriyonik doku kökenli olması yer almaktadır. Hücreler lipid bazlı transfectiyon reaktifi (Fugene HD, Roche) kullanılarak transfecte edilip ve optimal protein ifadesi için 24, 48 ve 72. saatlerde analiz edilmiştir. Her deney düzenğinde aşağıdaki transfectiyonlar yapılmıştır:

- 1) Boş transfeksiyon (mock - plazmid içermeyen transfeksiyon)
- 2) pCMV.GFP transfeksiyonu (transfeksiyon veriminin yüzdesini tayin etmek için kullanılmıştır. Canlı hücrelere uygun dalga boyundaki ışıpta bakıldığında, bu plazmidin ürünü olan yeşil floresan protein, transfeksiyon verimi ve deney koşullarının optimumluğu hakkında fikir vermiştir)
- 3) pcDNA3.1 transfeksiyonu (plazmid transfeksiyonu)
- 4) pcDNA3.1-hFGF3 transfeksiyonu (ektopik yabancı tip *FGF3* geninin ifade seviyesini ve lokalizasyonunu kontrol etmek için kullanılmıştır)
- 5) pcDNA3.1-hFGF3L6P transfeksiyonu (L6P mutant *FGF3* geninin ifade seviyesini ve lokalizasyonunu kontrol etmek için kullanılmıştır)
- 6) pcDNA3.1-hFGF3S156P transfeksiyonu (S156P mutant *FGF3* geninin ifade seviyesini ve lokalizasyonunu kontrol etmek için kullanılmıştır)

Transfeksiyon ve müteakip analizlerin optimizasyonu için GFP proteini ifade eden plazmid ile transfeksiyon yapılmış, metod bu hücre hattı için optimize edilmiş ve ardından Western Blot analizi yapılarak sonuçlar teyid edilmiştir.

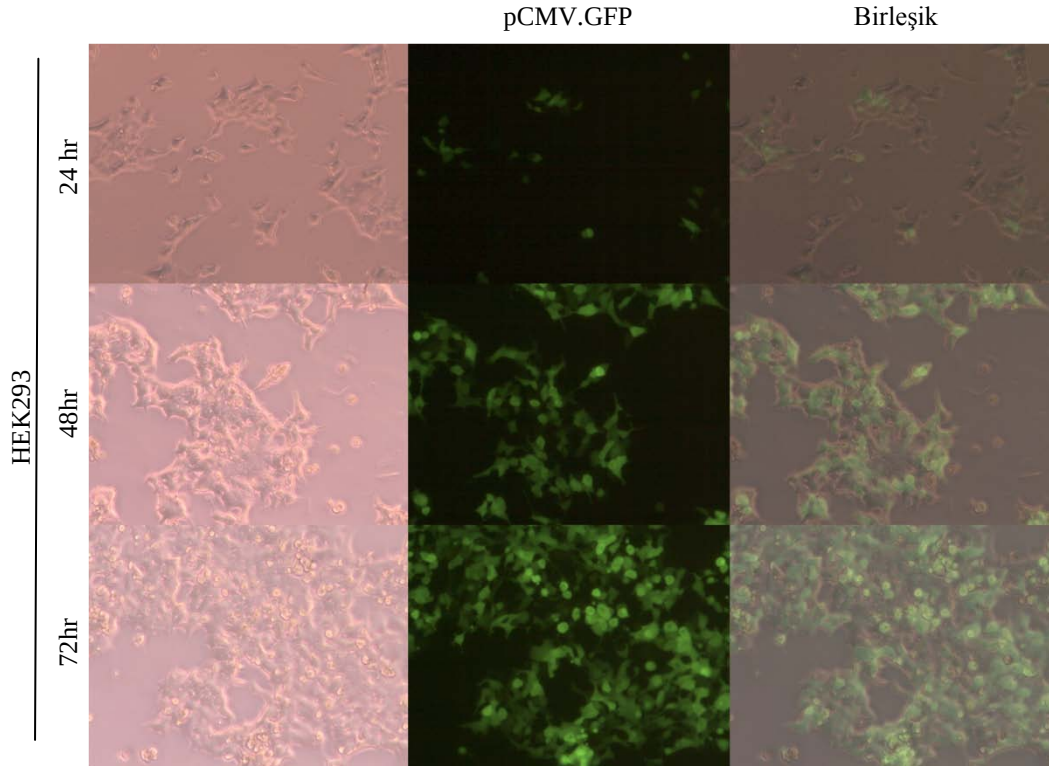
HEK-293 hücreleri Fugene HD (Roche) kullanılarak pCMV.GFP plazmidi ile transfekte edilmiştir. Şekil 4.4.1’de A ve B panellerinde HEK293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonunu takiben 48. saatte çekilen fotoğraflarda da görüldüğü gibi transfeksiyonun %90 verimle gerçekleştiği gözlenmiştir. Aynı koşullarda MCF-7 meme kanser hücre hattı ise daha düşük verimle transfekte edilebilmiştir. C panelinde ise 48 saat sonunda transfekte edilen hücrelerdeki GFP protein ifadesi immünblotlama ile gösterilmektedir. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler toplanmış, total hücre lizatları hazırlanmış ve her bir kuyuya 10 µg hücre lizatı yüklenerek SDS-PAGE gerçekleştirilmiştir. Anti-GFP (Cell Signaling) antikoru ile MCF-7 ve HEK293 hücrelerindeki ektopik GFP protein (27 kDa) miktarları gösterilmektedir.

HEK293 hücrelerinde 24. saatte GFP ekspresyonu yüksek değilken, 48. saatte sinyal yoğunluğu en yüksek seviyeye ulaşmaktadır, 72. saatte ise GFP proteini hücrelere toksik geldiği için ölü hücre sayısında artış olmaktadır (Şekil 4.4.2). Bu sonuç HEK293 hücrelerinin daha yüksek verimle transfekte edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.4.1: HEK293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu ve immünblot sonucu (48hr).

(A) Işık mikroskopu ve GFP protein görüntüsü, (B) Floresan filtre görüntüsü, (C) Transfekte edilen hücre lizatlarının Anti-GFP antikoruna ile Western Blot sonucu 1) MCF-7(mock), 2) MCF-7+pCMVGFP, 3) HEK293T (mock), 4) HEK293T+pCMVGFP.



Şekil 4.4.2: pCMV.GFP plazmidi ile yapılan transfeksiyon (24, 48 ve 72. saatler)

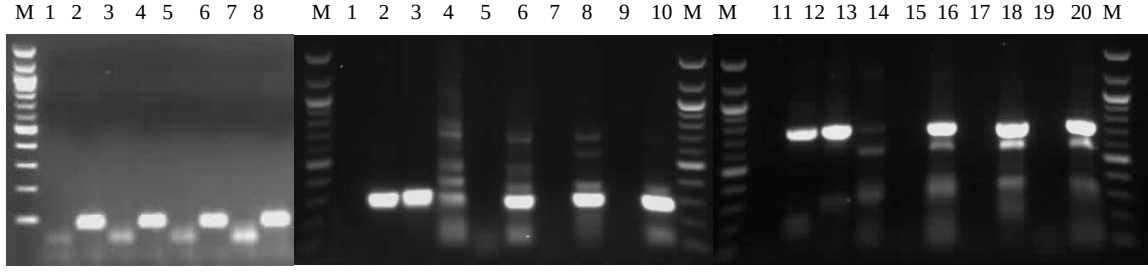
Transfekte edilen hücrelerdeki normal ve mutant FGF3 mRNA'sını tespit etmek amacıyla pcDNA3.1.FGF3, pcDNA3.1.FGF3L6P ve pcDNA3.1.FGF3S156P plazmidleri ile transfekte edilen hücreler 48. saatte toplanmış ve RNA isolation kit (Roche) ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunu takiben 1st strand cDNA sentezi ve PCR

yapılmıştır (Şekil 4.4.3). mRNA tayini sırasında tüm PCR'larda kullanılan parametreler Çizelge 4.4.1' de görülmektedir.

	Sıcaklık	Duration	Döngü
İlk Denatürasyon	98 °C	2 dk	-
Denatürasyon	98 °C	10 sn	35 döngü
Bağlanma sıcaklığı	58 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	-

Çizelge 4.4.1: HPRT ve FGF3 primerleriyle gerçekleştirilen mRNA tayini sırasında kullanılan PCR parametreleri.

Bu PCR aşamasında kullanılan primerler Çizelge 3.1.6'de gösterilmekte olup, FGF3 dizisinin başını ve sonunu kapsamaktadır, ayrıca FGF3 dizisinin başından başlayan ve 267 bç'lik kısa bir bölgeyi amplifiye eden primerlerde tasarlanmıştır (Düz primerin bağlanma bölgesinde yer alan L6P mutasyonu için gerekli baz değiştirilerek bu mutasyona özel bir primer de tasarlanmıştır). Şekil 4.4.3'te görüldüğü gibi reverse transkriptaz eklenmeyen örneklerde herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiş, HPRT, FGF3 kısa ve FGF3 uzun primer çiftleri ile yapılan amplifikasyonlarda hem kontrol plazmid DNAsından hem de cDNAlardan beklenen büyüklükteki fragmentler çoğaltılmıştır. Bu sonuç normal ve mutant FGF3 mRNAlarının pcDNA3.1 plazmidinden ektopik olarak transkribe olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4.3: HPRT ve FGF3 primerleriyle gerçekleştirilen mRNA miktar tayini.

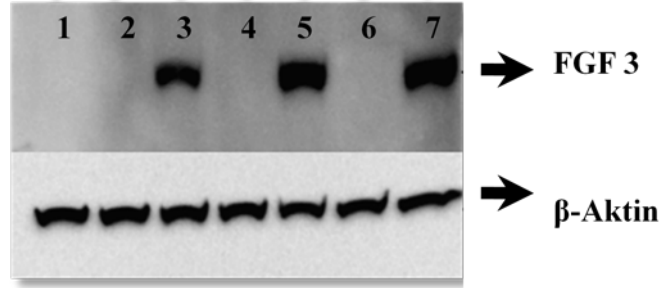
M) 100 bp DNA belirteci (NEB)	1) Kısa primer PCR (-)	11) Uzun primer PCR (-)
1) HPRT PCR (-)	2) pcDNA3.1.FGF3 plazmid	12) pcDNA3.1.FGF3 plazmid
2) mock +RT	3) pcDNA3.1.FGF3L6P plazmid	13) pcDNA3.1.FGF3L6P plazmid
3) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu -RT	4) mock +RT	14) mock +RT
4) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu +RT	5) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu -RT	15) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu -RT
5) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu -RT	6) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu +RT	16) pcDNA3.1.FGF3 transfeksiyonu +RT
6) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu +RT	7) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu -RT	17) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu -RT
7) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu -RT	8) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu +RT	18) pcDNA3.1.FGF3L6P transfeksiyonu +RT
8) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu +RT	9) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu -RT	19) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu -RT
	10) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu +RT	20) pcDNA3.1.FGF3S156P transfeksiyonu +RT

Sol panelde HPRT primerleriyle yapılan mRNA'dan cDNA'ya sentezin kontrolü olarak yapılan PCR görülmektedir. Mock plazmid transfeksiyonu yapılmayan, -RT cDNA sentezi sırasında (plazmid DNA kontaminasyonunu kontrol etmek için) Reverse transkriptaz eklenmemiş, +RT eklenmiş anlamına gelmektedir. 2,3,12,13 numaralı kuyularda cDNA yerine normal ve primer bölgesinde bulunan mutant plazmidten primer bölgeleri çoğaltılıp cDNA'dan amplifikasyon ile karşılaştırılmıştır.

4.5. Memeli Hücre Hatlarının Normal ve Mutant FGF3 ile Transfeksiyonu Sonucu, Ektopik FGF3'ün Protein Miktarı Tayini

Şekil 4.5.1'de, pcDNA3.1-hFGF3 #11 ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden 24, 48 ve 72. saatlerde elde edilen total hücre lizatları hazırlandıktan ve Bradford assay yapıldıktan sonra FGF-3 için gerçekleştirilen immüno blotlama sonucu görülmektedir. Kuyu başına yüklenen 10 µg hücre lizatı SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra anti-FGF3 (Abcam) antikoruna ile immüno blotlama gerçekleştirilmiştir. Boş (mock) transfeksiyon ve sadece pcDNA3.1 plazmid ile transfekte edilen örneklerde FGF-3 bandı gözlenmezken, pcDNA3.1-hFGF3 #11 ile transfekte edilen örneklerde 24, 48 ve 72. saatlerde gittikçe artan ektopik FGF-3 protein ifadesi (29 kDa) gözlenmektedir. FGF-3 sadece embriyonik dönemde ifade edildiği için erişkin hücrelerde veya hücre hatlarında ifade edilmesi beklenmemektedir. Buna ek olarak örneklerin eşit yüklendiğini doğrulamak için tüm

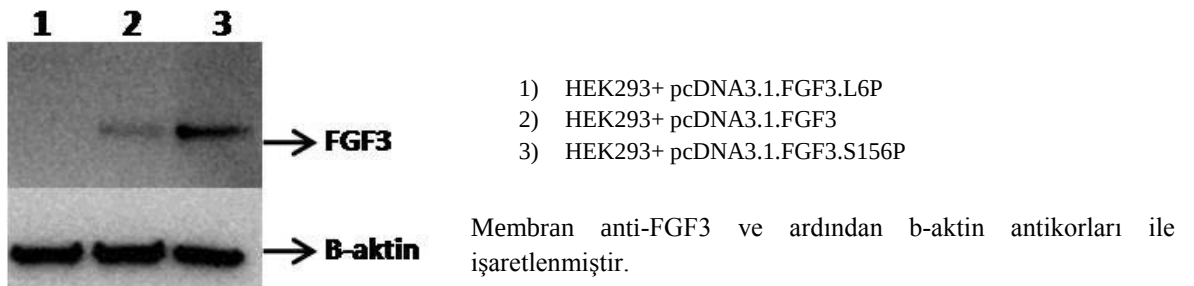
örnekler beta-aktin (Abcam-HRP konjuge) antikoruna ile de immünblotlanmış ve 42 kDa'lık bantın eşit yoğunluğa sahip olduğu gözlenmiştir (alt panel).



Şekil 4.5.1: HEK293 hücrelerinin pcDNA3.1-hFGF3 plazmidi ile transfeksiyonu sonrası 24, 48 ve 72. saatlerde elde edilen total hücre lizatları ile gerçekleştirilen immünblotlama sonuçları.

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1) HEK293 mock transfeksiyonu 24. saat, | 2) HEK293 +pcDNA3.1 24. saat, |
| 3) HEK293+ pcDNA3.1-hFGF3 24. saat, | 4) HEK293 +pcDNA3.1 48. saat, |
| 5) HEK293+ pcDNA3.1-hFGF3 48. saat, | 6) HEK293 +pcDNA3.1 72. saat, |
| 7) HEK293+ pcDNA3.1-hFGF3 72. saat. | |

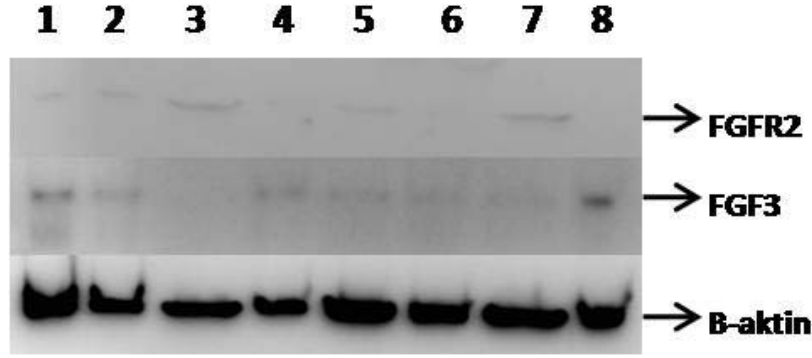
Bölgeye özgü mutagenезle oluşturulmuş pcDNA3.1.FGF3L6P ve pcDNA3.1.FGF3L6P plazmidleriyle yapılan transfeksiyonlar western blot analizi ile incelendiğinde her defasında L6P 'de 48. saat sonunda elde edilen hücre lizatlarında bant görülmezken S156P 'de yabancı tip FGF3'ten fazla protein biriktiği gözlenmiştir (Şekil 4.5.2). Bu sonuçlar büyük oranda immün floresan boyama sonuçlarıyla da tutarlıdır.



Şekil 4.5.2: Normal ve mutant FGF3'ün transfeksiyon sonrası 48. saatte Western Blot ile analizi.

FGFR2 proteini hücrelerde ifade ettirmek istenildiğinde ise transfeksiyon inkübasyon süresinin 48 saat tutulması hücrelere toksik gelmiş ve transfeksiyon sonrası analizlere 30-36. saat arasında başlanmıştır. Membran proteini olan FGFR2 Lysis M içinde çözünür olmayabilir veya FGF3'te oluşturulan mutasyonlar da proteinin çözünürlüğünü etkilemiş olabileceği düşünülerek farklı deterjan kombinasyonları içeren tamponlar kullanılmıştır ve hücre pelletleri sonike edilerek FGF3 ve FGFR2 proteinlerinin ifadesi western blot ile incelenmiştir (Şekil 4.5.3).

Transfeksiyon sonrası 30. saatte toplanan hücrelerden ilk seti Laemni yükleme tamponu içinde çözülmüş, kaynatılmış ve jele yüklenmiştir. İkinci set, Chaps tamponu ve proteaz inhibitörleri, üçüncü set, LysisM ve proteaz inhibitörleri ve dördüncü set de, proteaz inhibitörü içeren RIPA tamponu içinde çözülmüştür. Lysis M hariç tüm örnekler sonike edilmiş ve süpernatantlar yüklendikten sonra pellet tekrar çözülüp jele yüklenmiştir. Şekil 4.5.3'e göre ektopik ifade edilen FGFR2 (110 kDa) ve FGF3 (29 kDa) beklenen molekül ağırlığında bantlar vermiştir, ancak her tamponda çözülmedikleri de gözlenmiştir. Laemni tamponunda her iki proteini de görürken, Chaps tamponunda FGFR2 süpernatanda iken, FGF3 pellette gözlenmektedir. Benzer şekilde Lysis M ve RIPA içerisinde süpernatanda hem FGFR2 hem de FGF3 gözlenirken pellette sadece FGF3 görülmektedir. Bu jeldeki FGF3 ve FGFR2 proteinleri antikorlar ikinci kez kullanıldığından silik gözlenmektedir ve ayrıca 30 saat sonunda lizatlar hazırlandığı için protein ifade seviyesi henüz maksimum seviyesine ulaşamamıştır.



Şekil 4.5.3: FGF3 ve FGFR2 ile yapılan kotransfeksiyon.

- 1) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, supernatan, Laemni)
- 2) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, pellet, Laemni)
- 3) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, supernatan, Chaps)
- 4) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, pellet, Chaps)
- 5) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, supernatan, Lysis-M)
- 6) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, pellet, Lysis-M)
- 7) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, supernatan, RIPA)
- 8) pcDNA3.1.FGF3 + pcDNA3.1.FGFR2 (20 µg, pellet, RIPA)

4.6. FGF3 ve FGFR2'nin Lokalizasyon Analizi

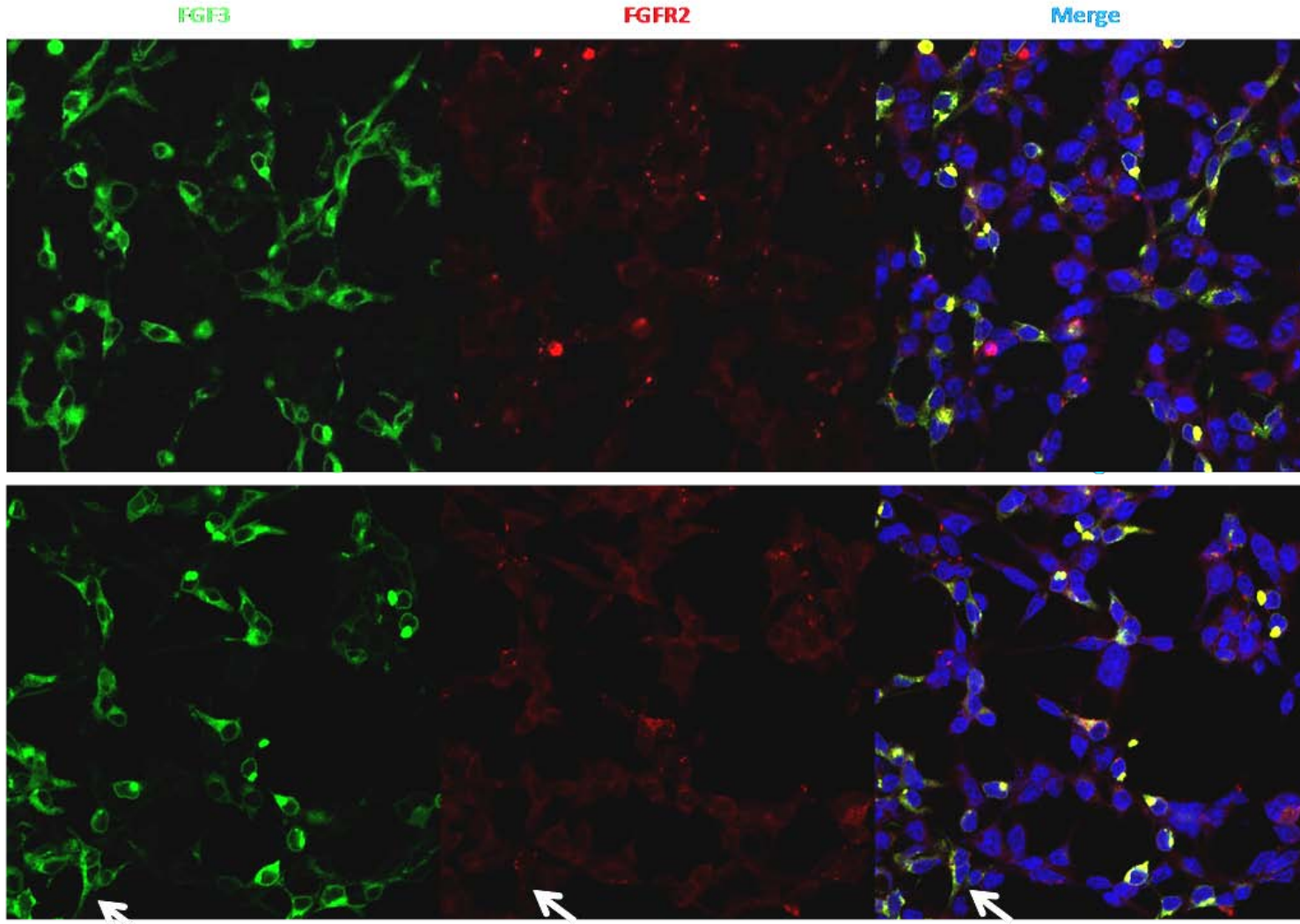
İmmünfloresan antikor boyamaları FGFR2 proteini bir süre sonra hücrelere toksik geldiği için transfeksiyondan 30 saat sonra gerçekleştirilmiştir. FGF3, FGFR2 ve endoplazmik retikulum proteini olan kalneksin birincil antikorları kullanılmıştır. DNA boyası olarak kullanılan Toto-3-iodide ise sekonder antikor olarak eklenmiştir. Alexa Fluor 488, 568 ve 594 ise kullanılan diğer sekonder antikorlardır. Bu antikorların özellikleri Çizelge 3.1.1'de verilmiştir. Görüntüler, Zeiss LSM510 konfokal mikroskobunda, Argon 488, He-Ne 543 ve He-Ne 633 lazerleri kullanılarak alınmıştır. Alınan her görüntüdeki sinyalin, otofloresan kaynaklı olmayıp sadece antikor boyaması kaynaklı olduğu yöntem kısmında tanımlandığı gibi kontrol edilmiştir.

Endojen olarak FGF3 ve FGFR2 proteinlerini ifade etmeyen HEK293 hücrelerinde bu iki protein ektopik olarak ifade ettirildiğinde FGF3 proteini sitoplazmik, FGFR2 proteini ise membranda agregatlar halinde gözlenmektedir (Şekil 4.6.1). FGF3 bazı hücrelerde membranda da gözlenmektedir. Şekil 4.6.2 'de okla işaretli hücrede FGF3'ün bir kısmı ve FGFR2 membranda beraber lokalize gözlenmektedirler. Şekil 4.6.3'de üst paneldeki yakınlaştırılmış görüntüde de benzer bir durum gözlenmektedir. Altpaneldeki

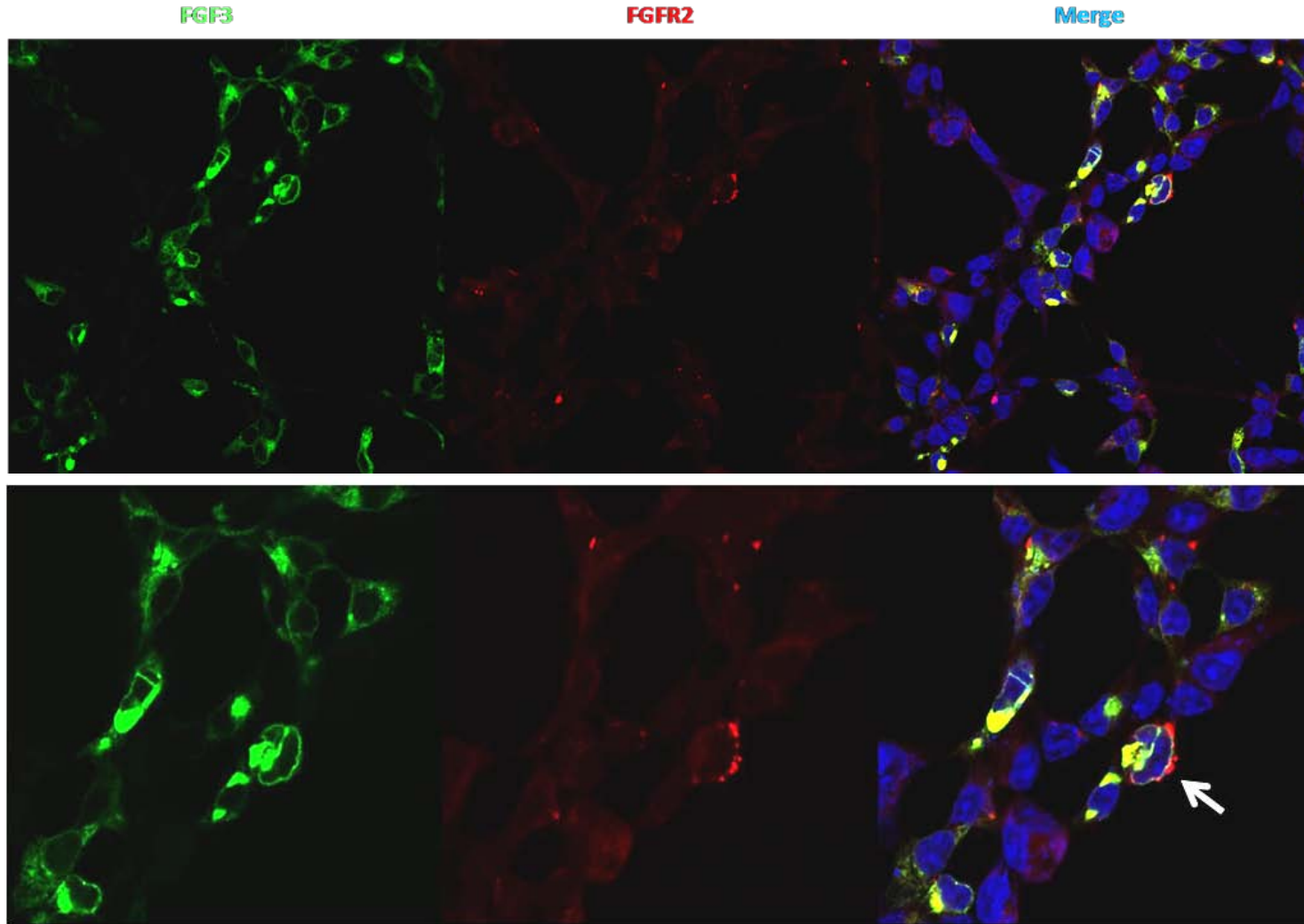
100x objektifle alınan görüntüde noktacıkların bazılarının kolokelize, bazılarının olmadığı görülmektedir. Kalneksin Endoplazmik retikuluma spesifik bir proteindir ve boyamalarda sitoplazmik olarak görünmektedir. Ektopik ifade edilen FGF3'nin büyük kısmı sitoplazmik ve hatta hücrelerin uzantılarında gözlenmektedir (Şekil 4.6.4). HEK293 hücreleri pcDNA3.1.hFGF3.S156P ve pcDNA3.1.hFGFR2 ile transfekte edildiklerinde mutant FGF3.S156P'nin en az normal FGF3 kadar kuvvetli sinyal verdiği gözlenmiştir. Dikkatli incelendiğinde FGF3'ün tamamıyla sitoplazmik ve normale kıyasla daha az bölgede FGFR2 ile kolokelize olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.6.5, Şekil 4.6.6). Şekil 4.6.7 ve Şekil 4.6.8 'te S156Pnin kuvvetli sinyali ve calneksin ile sitoplazmik lokalizasyonda bulunduğu gözlenmektedir. L6P ile yapılan transfeksiyonlarda her seferinde çok az sayıda hücrede ve daha az seviyede FGF3.L6P gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.9, Şekil 4.6.10). FGF3.L6P ile transfekte edilebilen az sayıda hücrede L6Pnin de sitoplazmik olduğu gözlenmekte ve sinyal peptit kopmadığı için bu mutant proteinin yıkıldığını düşündürmektedir.

MCF-7 hücrelerinde L6P ve normal FGF3 miktarları aşağı yukarı aynı ve daha net noktacıklar halinde gözlenirken S156P biraz daha difuz gözlenmektedir (Şekil 4.6.11).

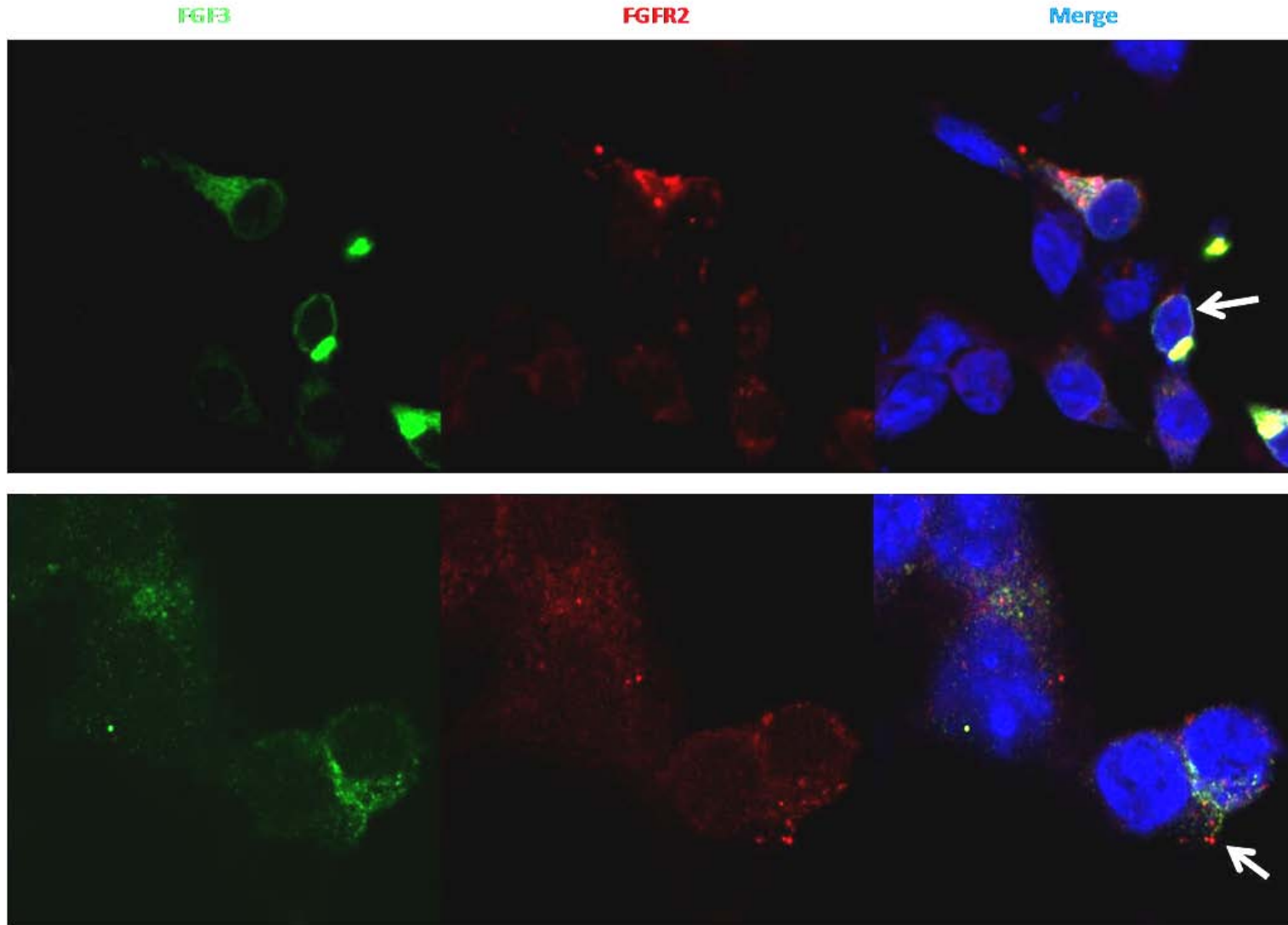
.



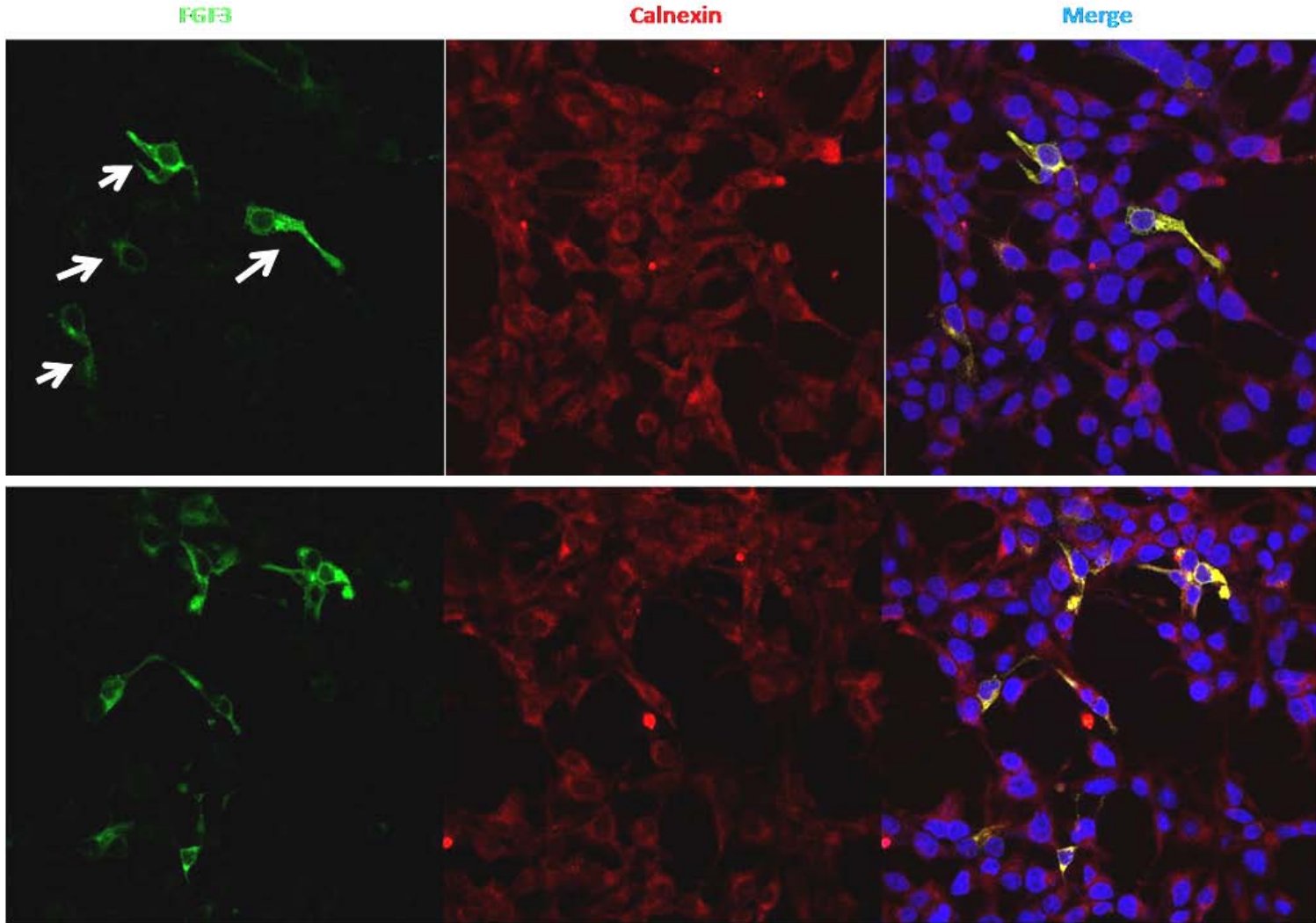
Şekil 4.6.1: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları



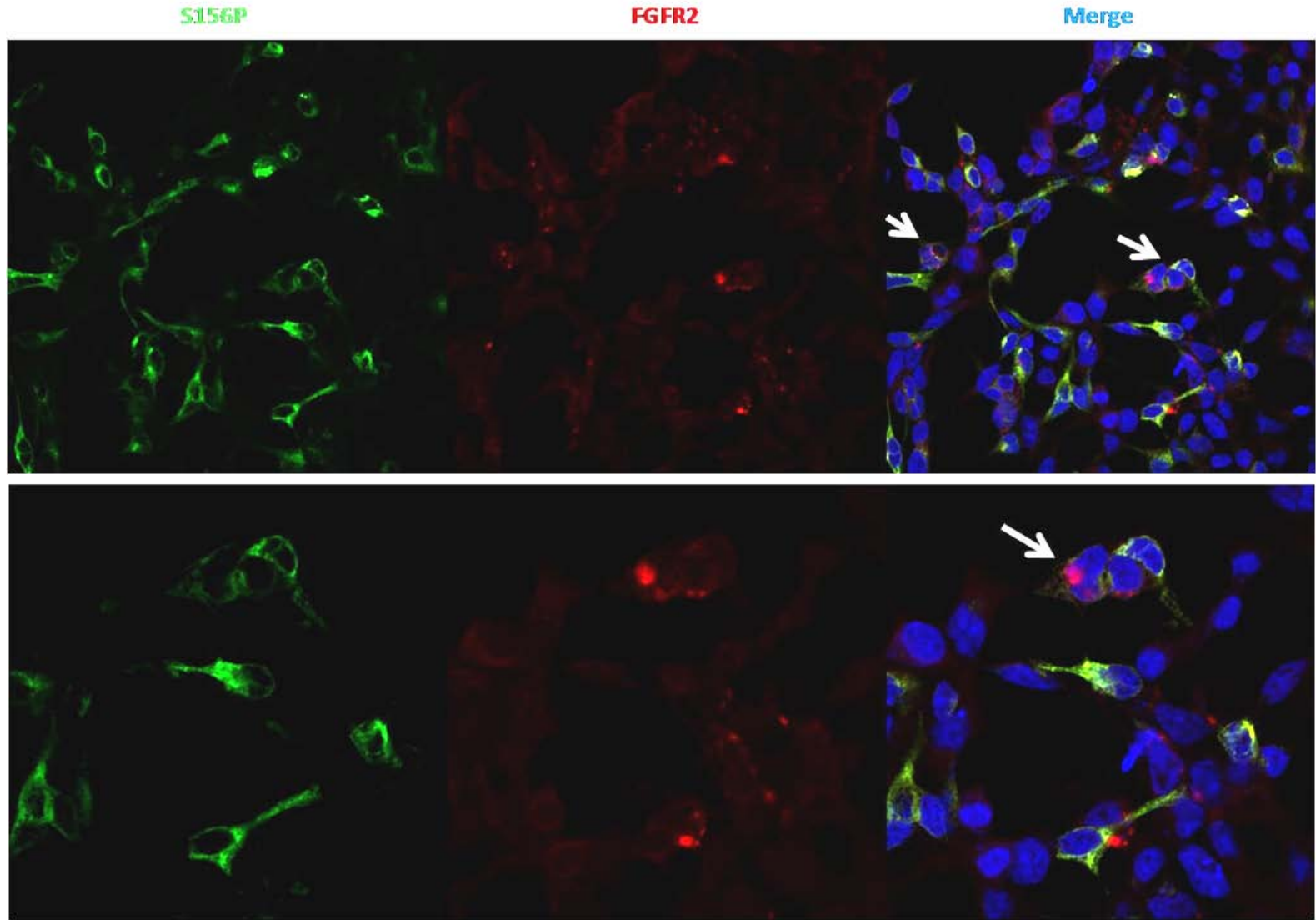
Şekil 4.6.2: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları



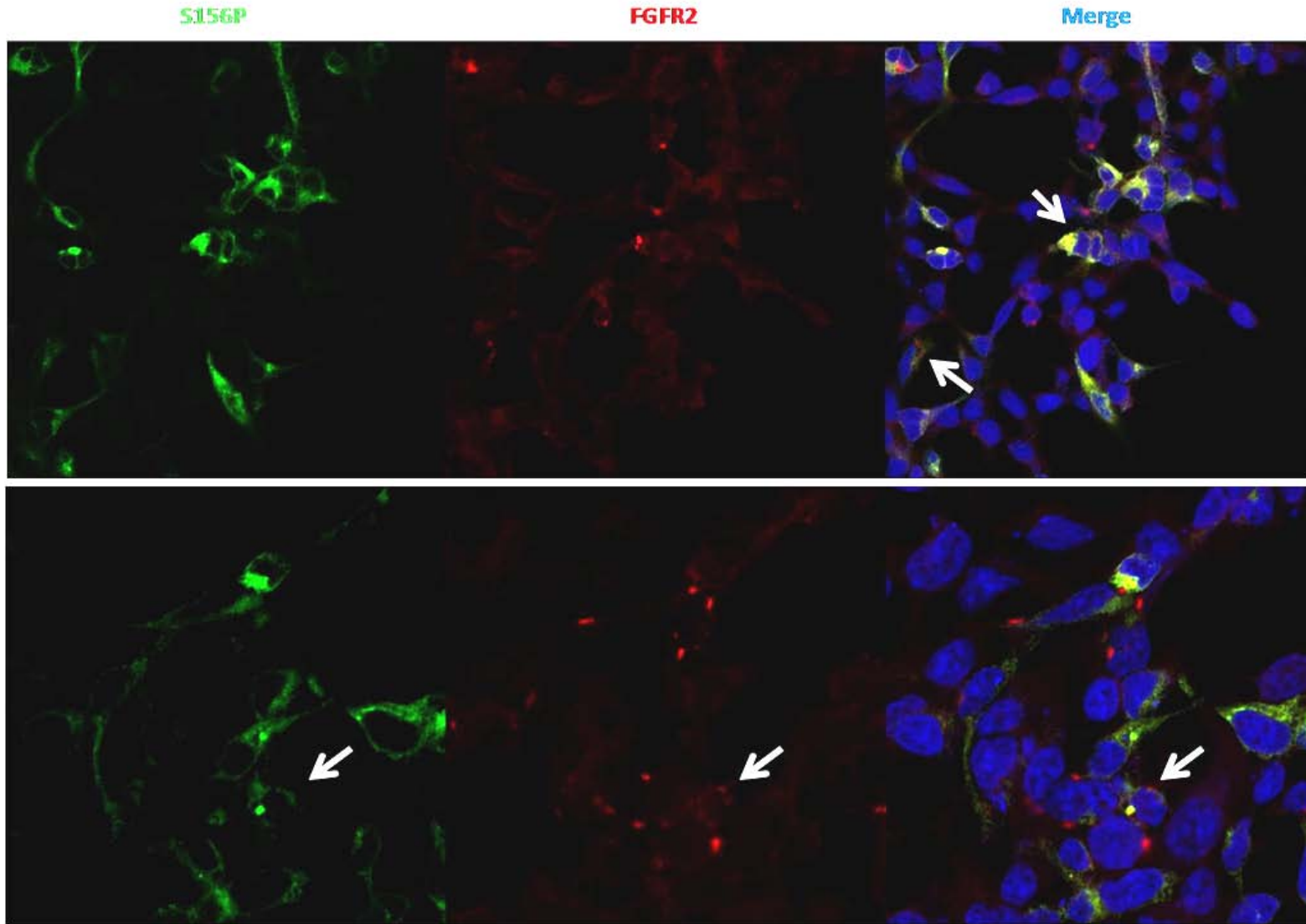
Şekil 4.6.3: FGF3+FGFR2 kotransfeksiyonu sonucu FGF3,FGFR2 ve DNA boyamaları



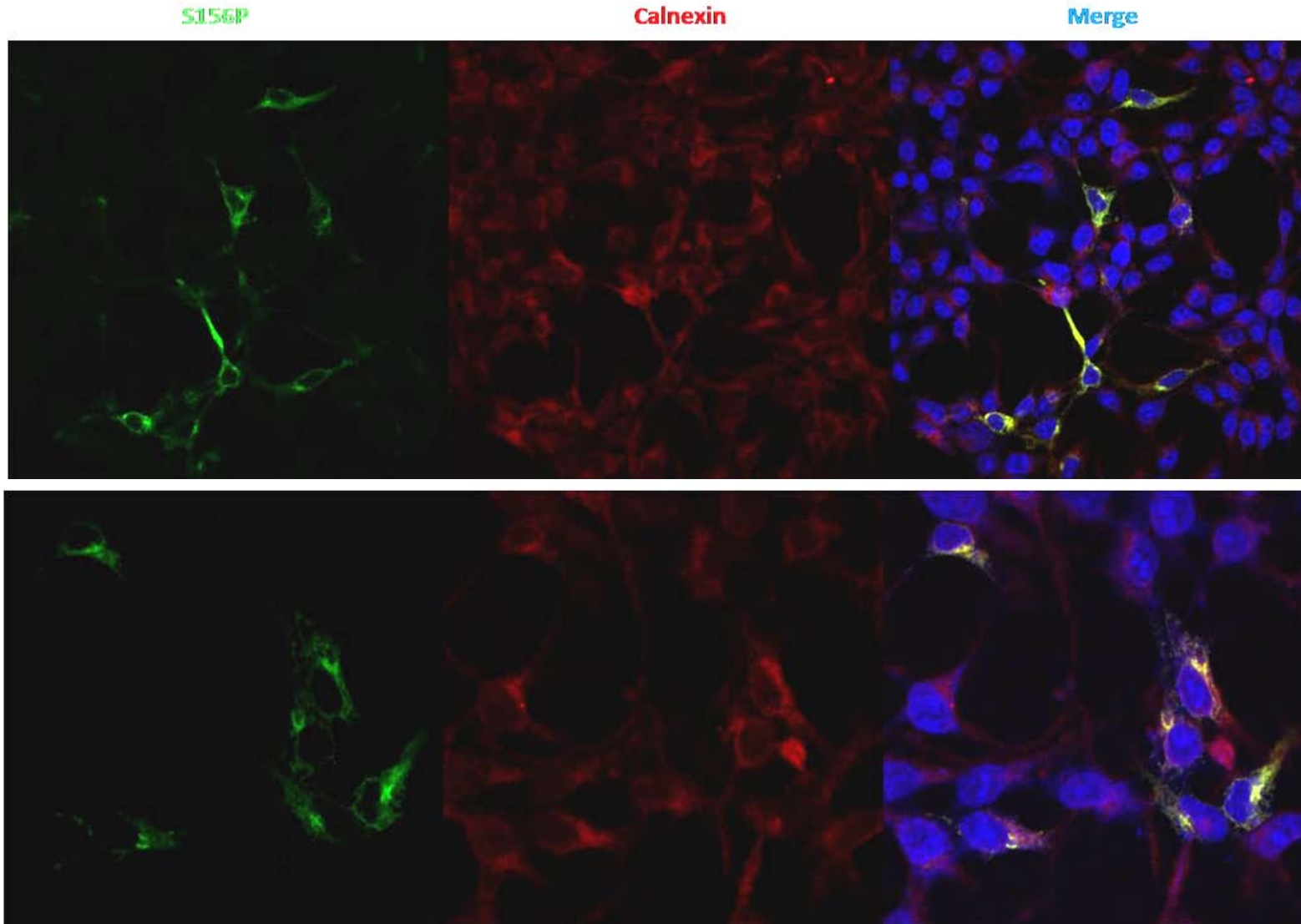
Şekil 4.6.4: FGF3 transfeksiyonu sonrası FGF3, kalneksin ve DNA boyamaları



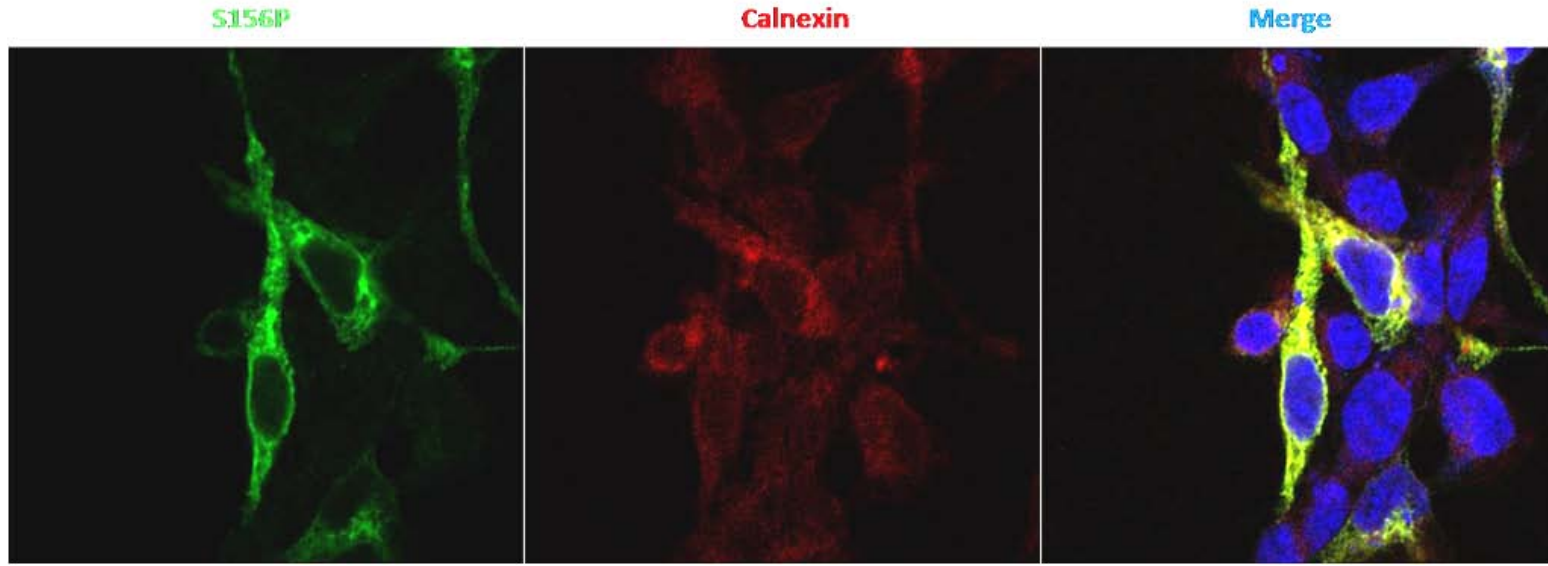
Şekil 4.6.5: FGF3.S156P mutan  ve FGFR2 transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları



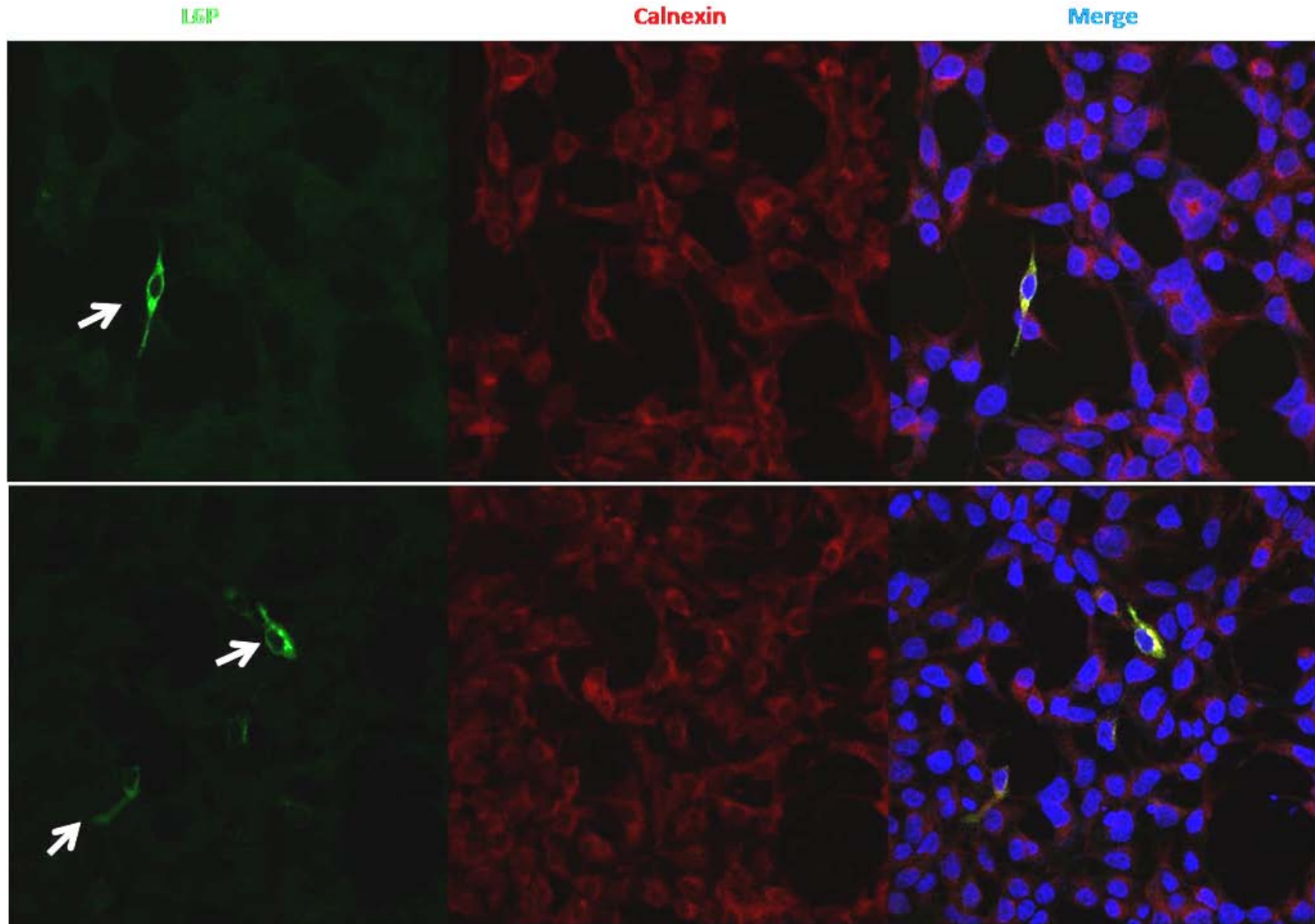
Şekil 4.6.6: FGF3.S156P mutanđı ve FGFR2 transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları



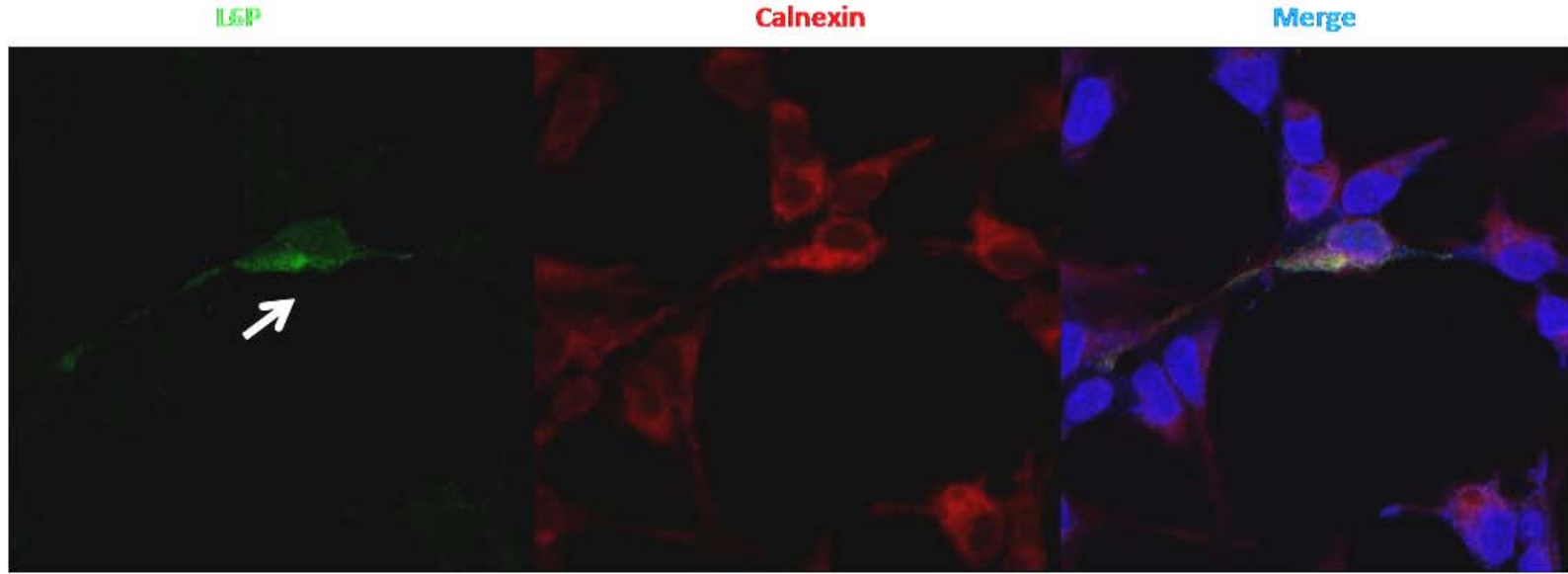
Şekil 4.6.7: FGF3.S156P mutan ı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları



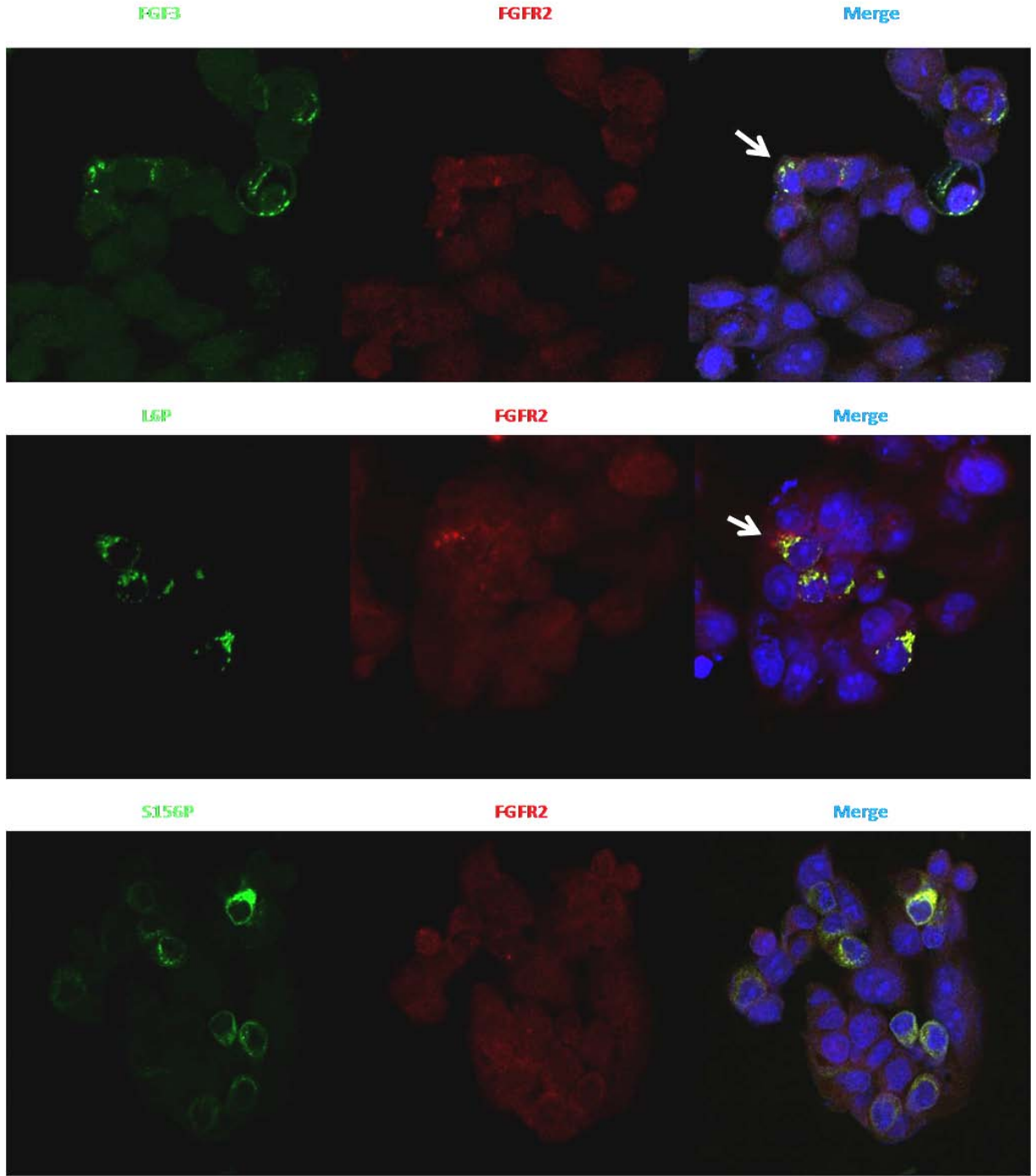
Şekil 4.6.8: FGF3.S156P mutanđı transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları



Şekil 4.6.9: FGF3.L6P mutan  transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları



Şekil 4.6.10: FGF3.L6P mutan  transfeksiyonu sonrası FGF3-kalneksin ve DNA boyamaları



Şekil 4.6.11: MCF-7 hücre hattının FGF3-FGFR2-L6P-S156P transfeksiyonu sonrası FGF3-FGFR2 ve DNA boyamaları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya çapında birçok insanı etkileyen ve yaşam kalitesini düşüren işitme kayıpları doğuştan veya sonradan kazanılmış olabildiği gibi doğuştan olanlar iç kulak nedenli olabilmektedir. İç kulakta işitme ve denge organlarının hiç gelişmediği (tüm labirentin aplazisi- Michel aplazisi), küçük aurikula (mikroşi) ve küçük dişler (mikrodonti)'in otozomal resesif olarak kalıtıldığı Mustafa Tekin ve çalışma ekibi tarafından tanımlanan sendromda görülen fenotipe yol açan mutasyonlardan iki adet yanlış anlam mutasyonunun, hücre farklılaşmasında ve hücre göçünde büyük rol oynayan *FGF3* geninde olduğu gösterilmiştir (OMIM 610706, **L**AMM (**L**abirent **A**plazisine bağlı doğuştan işitme kaybı, **M**ikroşi ve **M**ikrodonti, (Tekin *et al.* 2007)). Bu çalışmada *FGF3* geninde tanımlanan L6P ve S156P mutasyonlarının LAMM sendromu oluşum mekanizmasına olan etkileri aydınlatılmaya çalışılmış ve her iki mutasyon oluşturulduğunda da *FGF3* protein ifade seviyesinin değiştiği gözlenmiştir.

Bu amaçla öncelikle pcDNA3.1.hFGF3 plazmidinde klasik mutagenез yöntemi ile L6P ve S156P mutasyonları oluşturulmuş ve restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri ve DNA dizi analiziyle de plazmid dizisinde herhangi bir dizi değişikliğine neden olmadan mutasyonların başarılı bir şekilde sadece istenilen aminoasitlerde gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

Embriyonik gelişim sırasında iç kulak oluşumuyla beraber birçok hücre farklılaşmasında rol alan *FGF3*, fonksiyonel etki gösterebilmek için hücre dışına salınmakta ve hücre membranındaki FGFR2 reseptörüne bağlanmaktadır. Bundan dolayı bir sonraki adım olarak, *FGF3* proteinin hedefi olan FGFR2 reseptörü ile etkileşimini incelemek amacıyla, FGFR2 cDNA'sı pcDNA3.1 içine klonlanmış ve yine dizinin bütünlüğü enzim kesim reaksiyonlarıyla, doğruluğu da DNA dizi analizi yöntemiyle kontrol edilmiştir.

Sonraki aşamada, oluşturulan tüm plazmidler ile transfeksiyon deneyleri yapılmış normal *FGF3*, mutant *FGF3* proteinleri ve FGFR2 protein ifadesi istenilen hücre hatlarında ektopik olarak sağlanmıştır. Ağırlıklı olarak deneyler *FGF3* ve FGFR2 ifade etmeyen ve yüksek verimle transfekte edilebilen HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Bu transfeksiyon sonuçlarından elde edilen hücre lizatları kullanılarak,

hem ilgili proteinlerin ifadesini sağlayan genlerin mRNA seviyeleri ve hem de immünblotlama yöntemiyle protein seviyeleri kontrol edilmiştir. Genomik veya plazmid DNA kontaminasyonu olmadığından emin olunarak ektopik olarak ifade ettirilen normal ve mutant FGF3 mRNA'ları beklenen şekilde gözlenmiştir. İmmünblotlama yöntemi sonucu, normal FGF3 seviyesi net olarak gözlenirken, her iki mutasyon oluşturulduğunda da FGF3 protein seviyesinin değiştiği gözlenmiştir; L6P yok denecek kadar azalmış, S156P artmıştır.

Son adımda, immünfloresan yöntemiyle, normal ve mutant FGF3 proteinlerinin ve FGFR2 proteinlerinin lokalizasyonu anti-FGF3 ve anti-FGFR2 antikorları ve endoplazmik retikuluma spesifik olan anti-Kalneksin antikoru kullanılarak tespit edilmiştir. Zeiss LSM 510 konfokal mikroskobu kullanılarak alınan görüntülerin değerlendirilmesi sonucunda, öncelikle normal FGF3'ün büyük yüzdesinin sitoplazmik, bir kısmının da membranda FGFR2 ile beraber lokalize olduğu gözlenmiştir.

S156P mutasyonunun FGF3 proteininin doğru katlanması ve reseptörü olan FGFR2'ye bağlanması için kritik olabileceği öngörülmektedir. Ancak hem immünblot hem de antikor boyaması sonuçlarına göre FGF3.S156P proteininin seviyesi normal FGF3'e göre biraz daha yüksektir, bu da FGF3.S156P'nin salınamadığı ve hücre içinde birikiyor olabileceği ihtimalini göz önüne getirmektedir.

Bunun dışında, L6P ifadesi ve ifade eden hücre sayısı normal FGF3'e göre oldukça azdır, ayrıca fazla apoptotik hücre gözlenmese de, sinyal peptidinin kesilmeme ihtimalinden dolayı doğru katlanamayan FGF3.L6P'nin net olarak açıklayamadığımız bir yolla HEK293 hücre hattında hemen yıkıldığı akıllara gelmektedir. Çünkü her ne kadar immunoblotta protein tespit edilemese de L6P mRNAsı beklenen büyüklükte tespit edilmiştir, yani protein sentezi sırasında veya sonrasında bir sorun vardır; sinyal peptit L6P mutasyonundan dolayı kesilemediği için katlanamayan protein yıkılıyor olabilir. Ancak hem L6P hem de S156P mutantları normal FGF3'ün aksine ağırlıklı olarak sitoplazmada gözlenmektedirler.

Ektopik olarak ifade edilen FGFR2 ise membranda büyük agregatlar şeklinde gözlenmiş olup, ayrıca 48 saat sonunda transfekte edilen hücrelerin büyük kısmına toksik geldiği için FGFR2 kotransfeksiyonları 30-36. saatlerde sonlandırılarak analiz edilmiştir.

MCF-7 hücreleri daha az verimle transfekte edilebilmektedirler. L6P mutasyonunda yine sitoplazmada birikim gözlenmiştir, ancak bu deney immünblotlama ile de tekrarlanmalıdır. Pek çok soruyu aydınlatacak ve bu çalışmaya eklenmesi gereken başka bir deney ise normal ve mutant FGF3 ve FGFR2'nin immün çöktürme yolu ile interaksyonu olup olmadıklarının doğrulanmasıdır. Ayrıca hücre kültürü supernatanlarından normal ve mutant FGF3 bulunup bulunmadığı yine immün çöktürme ile kontrol edilmeli ve FGF3ün salınıp salınmadığı anlaşılmalıdır.

Bir diğer yol ise FGFR2 yolağı tarafından indüklenen genlerin hem mRNA'larının PCR ile kontrol edilmesi hem de FGFR2 tarafından etkilenen MAPK'lerin fosforilasyonlarının analiz edilmesi olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Alvarez, Y., M. T. Alonso, V. Vendrell, L. C. Zelarayan, P. Chamero, T. Theil, M. R. Bosl, S. Kato, M. Maconochie, D. Riethmacher and T. Schimmang 2003. Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development* 130(25); 6329-6338.
- Antoine, M., K. Reimers, W. Wirz, A. M. Gressner, R. Muller and P. Kiefer 2005. Fibroblast growth factor 3, a protein with a dual subcellular fate, is interacting with human ribosomal protein S2. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2); 1248-1255.
- Arnos, K. S., J. Israel and M. Cunningham 1991. Genetic counseling of the deaf. Medical and cultural considerations. *Ann N Y Acad Sci* 630; 212-222.
- Bamiou, D. E., P. Phelps and T. Sirimanna 2000. Temporal bone computed tomography findings in bilateral sensorineural hearing loss. *Arch Dis Child* 82(3); 257-260.
- Bitner-Glindzicz, M. 2002. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 63; 73-94.
- Brabyn, J. A., M. E. Schneck, G. Haegerstrom-Portnoy and L. A. Lott 2007. Dual sensory loss: overview of problems, visual assessment, and rehabilitation. *Trends Amplif* 11(4); 219-226.
- Brown, S. T., K. Martin and A. K. Groves 2003. Molecular basis of inner ear induction. *Curr Top Dev Biol* 57; 115-149.
- Chen, Z. Y. and D. P. Corey 2002. Understanding inner ear development with gene expression profiling. *J Neurobiol* 53(2); 276-285.
- D'Amico-Martel, A. and D. M. Noden 1983. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat* 166(4); 445-468.

- Espinos, C., H. Perez-Garrigues, M. Beneyto, C. Vilela, O. Rodrigo and C. Najera 1999. [Syndromic hereditary deafness. Usher's syndrome. Oto-neurologic and genetic factors]. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 26(1); 83-95.
- Fitoz, S., L. Sennaroglu, A. Incesulu, F. B. Cengiz, Y. Koc and M. Tekin 2007. SLC26A4 mutations are associated with a specific inner ear malformation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71(3); 479-486.
- Goldfarb, M. 2005. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2); 215-220.
- Gregory-Evans, C. Y., M. Moosajee, M. D. Hodges, D. S. Mackay, L. Game, N. Vargesson, A. Bloch-Zupan, F. Ruschendorf, L. Santos-Pinto, G. Wackens and K. Gregory-Evans 2007. SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma. *Hum Mol Genet* 16(20); 2482-2493.
- Hatch, E. P., C. A. Noyes, X. Wang, T. J. Wright and S. L. Mansour 2007. Fgf3 is required for dorsal patterning and morphogenesis of the inner ear epithelium. *Development* 134(20); 3615-3625.
- Itoh, N. 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol Pharm Bull* 30(10); 1819-1825.
- Itoh, N. and D. M. Ornitz 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20(11); 563-569.
- Itoh, N. and D. M. Ornitz 2008. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn* 237(1); 18-27.
- Kalatzis, V. and C. Petit 1998. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 7(10); 1589-1597.

- Kiefer, P., P. Acland, D. Pappin, G. Peters and C. Dickson 1994. Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *EMBO J* 13(17); 4126-4136.
- Kiefer, P. and C. Dickson 1995. Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Mol Cell Biol* 15(8); 4364-4374.
- Kiefer, P., G. Peters and C. Dickson 1991. The Int-2/Fgf-3 oncogene product is secreted and associates with extracellular matrix: implications for cell transformation. *Mol Cell Biol* 11(12); 5929-5936.
- Kiefer, P., G. Peters and C. Dickson 1993. Retention of fibroblast growth factor 3 in the Golgi complex may regulate its export from cells. *Mol Cell Biol* 13(9); 5781-5793.
- Krejci, P., J. Prochazkova, V. Bryja, A. Kozubik and W. R. Wilcox 2009. Molecular pathology of the fibroblast growth factor family. *Hum Mutat* 30(9); 1245-1255.
- Logan, C. Y. and R. Nusse 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20; 781-810.
- Mafong, D. D., E. J. Shin and A. K. Lalwani 2002. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 112(1); 1-7.
- Mignatti, P., T. Morimoto and D. B. Rifkin 1992. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 151(1); 81-93.
- Mikels, A. J. and R. Nusse 2006. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25(57); 7461-7468.

- Miyakawa, K., K. Hatsuzawa, T. Kurokawa, M. Asada, T. Kuroiwa and T. Imamura 1999. A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem* 274(41); 29352-29357.
- Morton, C. C. and W. E. Nance 2006. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 354(20); 2151-2164.
- Nance, W. E. 2003. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 9(2); 109-119.
- Nechiporuk, A. and D. W. Raible 2008. FGF-dependent mechanosensory organ patterning in zebrafish. *Science* 320(5884); 1774-1777.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3); REVIEWS3005.
- Petit, C., J. Levilliers and J. P. Hardelin 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35; 589-646.
- Ramsebner, R., M. Ludwig, T. Parzefall, T. Lucas, W. D. Baumgartner, O. Bodamer, F. B. Cengiz, C. Schoefer, M. Tekin and K. Frei 2010. A FGF3 mutation associated with differential inner ear malformation, microtia, and microdontia. *Laryngoscope* 120(2); 359-364.
- Revest, J. M., L. DeMoerlooze and C. Dickson 2000. Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem* 275(11); 8083-8090.
- Rozen, S. and H. Skaletsky 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132; 365-386.
- Rubel, E. W. and B. Fritsch 2002. Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25; 51-101.

- Smith, R. J. H. and G. Van Camp 1993. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview.
- Steel, K. P. and T. J. Bussoli 1999. Deafness genes: expressions of surprise. *Trends Genet* 15(6); 207-211.
- Tekin, M., B. O. Hismi, S. Fitoz, H. Ozdag, F. B. Cengiz, A. Sirmaci, I. Aslan, B. Inceoglu, E. B. Yuksel-Konuk, S. T. Yilmaz, O. Yasun and N. Akar 2007. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am J Hum Genet* 80(2); 338-344.
- Tekin, M., H. Ozturkmen Akay, S. Fitoz, S. Birnbaum, F. B. Cengiz, L. Sennaroglu, A. Incesulu, E. B. Yuksel Konuk, A. Hasanefendioglu Bayrak, S. Senturk, I. Cebeci, G. E. Utine, E. Tuncbilek, W. E. Nance and D. Duman 2008. Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Clin Genet* 73(6); 554-565.
- Thisse, B. and C. Thisse 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287(2); 390-402.
- Tucci, D., M. H. Merson and B. S. Wilson 2010. A summary of the literature on global hearing impairment: current status and priorities for action. *Otol Neurotol* 31(1); 31-41.
- Wilkinson, D. G., G. Peters, C. Dickson and A. P. McMahon 1988. Expression of the FGF-related proto-oncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J* 7(3); 691-695.
- Wright, T. J. and S. L. Mansour 2003. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development* 130(15); 3379-3390.
- Zheng, Q. Y., C. R. Rozanas, I. Thalmann, M. R. Chance and K. N. Alagramam 2006. Inner ear proteomics of mouse models for deafness, a discovery strategy. *Brain Res* 1091(1); 113-121.

EKLER

EK-1: pcDNA3.1.FGF3 Dizisi

>pcDNA3.1.FGF3, 6089 bç

T7 primer bölgesi sarıyla, BGH R primer bölgesi kırmızıyla belirtilmiştir.

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTAT
CTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGA
CAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAA
CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA
TGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA
TGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAG
GTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG

HindIII kesim bölgesi

GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTgcccgcaccATGGGCCTAATCTGGCTGCTACTGCTCAGCCTGCT
GGAGCCCGCTGGCCCGCAGCGGGCCCTGGGGCGCGGTTGCGGCGCGATGCGGGCGGCCGTGGCGGCGTCTACGAGCACCT
TGGCGGGGCGCCCCGGCGCCGCAAGCTCTACTGCGCCACGAAGTACCACCTCCAGCTGCACCCGAGCGGCCGCGTCAACGG
CAGCCTGGAGAACAGCGCTACAGTATTTGGAGATAACGGCAGTGGAGGTGGGCATTGTGGCCATCAGGGGTCTCTTCTC
CGGGCGGTACCTGGCCATGAACAAGAGGGGACGACTCTATGCTTCGGAGCACTACAGCGCCGAGTGCAGTGTGTTGGAGCG
GATCCACGAGCTGGGCTATAATACGTATGCCTCCCGGCTGTACCGGACGGTGTCTAGTACGCTGGGGCCCGCCGCGAGCC
CAGCGCCGAGAGACTGTGGTACGTGTCTGTGAACGGCAAGGGCCGGCCCCGCAGGGGCTTCAAGACCCGCCGCACACAGAA
GTCCTCCCTGTTCTGCCCCGCGTGCTGGACCACAGGGACCACGAGATGGTGCGGCAGCTACAGAGTGGGCTGCCAGACC
CCCTGGTAAGGGGGTCCAGCCCCGACGGCGGCGGAGAAGCAGAGCCCGGATAACCTGGAGCCCTCTCACGTTACGGCTTC
GAGACTGGGCTCCCAGCTGGAGGCCAGTGCGCACTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA

XhoI kesim bölgesi

CTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG
TCCTTTCCATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAA
CCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCG
TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATT
AGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
GTGGACTCTTGTTCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCGGATTT
CGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAAGTTAGGGTG
TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTC
CCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCC
CATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCGGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGA

GGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGG
AGCTTGATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
AGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
GTTCCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGA
GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGA
CTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC
TGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGC
ACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTT
CGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGT
GGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC
CCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCA
GCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTGCAAATGACCGACCAAGCGACGCC
AACCTGCCATCAGGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGC
TGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCCCACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC
AAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC
AATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC
TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGG
CTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC
GAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
CTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
GTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
TACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
CCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTC
GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCT
CCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAG
TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATG
GTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
ACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCTG
ATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGG
CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGC
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACA
TTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

EK-2: pcDNA3.1.FGFR2 Dizisi

>pcDNA3.1.FGFR2, 7484 bp

T7 primer bölgesi sarıyla, BGH R primer bölgesi kırmızıyla belirtilmiştir.

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTAT
CTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGA
CAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAA
CTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA
TGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA
TGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAG
GTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAG

HindIII kesim bölgesi

GGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTTAACTTAAGCTTgcccaccatGGTCAGCTGGGGTCGTTTCATCTGCCTGGTCGT
GGTCACCATGGCAACCTTGTCCTGGCCCGGCCCTCCTTCAGTTTAGTTGAGGATACCACATTAGAGCCAGAAGGAGCACC
ATACTGGACCAACACAGAAAAGATGGAAAAGCGGCTCCATGCTGTGCCTGCGGCCAACACTGTCAAGTTTCGCTGCCCAGC
CGGGGGGAACCAATGCCAACCATGCGGTGGCTGAAAAACGGGAAGGAGTTTAAGCAGGAGCATCGCATTGGAGGCTACAA
GGTACGAAACCAGCACTGGAGCCTCATTATGAAAAGTGTGGTCCCATCTGACAAGGGAATTATACCTGTGTAGTGGAGAA
TGAATACGGGTCCATCAATCACACGTACCACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCCTCACCGGCCCATCTCCAAGCCGGACT
GCCGGCAATGCCTCCACAGTGGTCGGAGGAGACGTAGAGTTTGTCTGCAAGGTTTACAGTGATGCCCAGCCCCACATCCA
GTGGATCAAGCACGTGAAAAAGAACGGCAGTAAATACGGGCCGACGGGCTGCCCTACCTCAAGGTTTCAAGGCCGCCGG
TGTTAACACCACGGACAAAGAGATTGAGGTTCTCTATATTCGGAATGTAACTTTTGAGGACGCTGGGGAATATACGTGCTT
GGCGGGTAATTCTATTGGGATATCCTTTCACTCTGCATGGTTGACAGTTCTGCCAGCGCCTGGAAGAGAAAAGGAGATTAC
AGCTTCCCCAGACTACCTGGAGATAGCCATTTACTGCATAGGGGTCTTCTTAATCGCCTGTATGGTGGAACAGTCATCCT
GTGCCGAATGAAGAACACGACCAAGAAGCCAGACTTCAGCAGCCAGCGGCTGTGCACAAGTGACCAACGTATCCCCCT
GCGGAGACAGGTTTCGGCTGAGTCCAGCTCCTCCATGAACTCCAACACCCCGCTGGTGAGGATAACAACACGCCTCTCTTC
AACGGCAGACACCCCATGCTGGCAGGGGTCTCCGAGTATGAACTTCAGAGGACCCAAAATGGGAGTTTCCAAGAGATAA
GCTGACACTGGGCAAGCCCTGGGAGAAGGTTGCTTTGGGCAAGTGGTCATGGCGGAAGCAGTGGGAATTGACAAAGACAA
GCCCAAGGAGGCGGTACCGTGCCGTGAAGATGTTGAAAGATGATGCCACAGAGAAAGACCTTTCTGATCTGGTGTCAGA
GATGGAGATGATGAAGATGATTGGGAAACACAAGAATATCATAAATCTTCTTGAGCCTGCACACAGGATGGGCCTCTCT
ATGTCATAGTTGAGTATGCCTCTAAAGGCAACCTCCGAGAATACCTCCGAGCCCGGAGGCCACCCGGGATGGAGTACTCCT
ATGACATTAACCGTGTTCCTGAGGAGCAGATGACCTTCAAGGACTTGGTGTCATGCACCTACCAGCTGGCCAGAGGCATGG
AGTACTTGGCTTCCAAAAATGTATTCATCGAGATTTAGCAGCCAGAAATGTTTTGGTAACAGAAAACAATGTGATGAAAA
TAGCAGACTTTGGACTCGCCAGAGATATCAACAATATAGACTATTACAAAAAGACCACCAATGGGCGGCTTCCAGTCAAGT
GGATGGCTCCAGAAGCCCTGTTTGATAGAGTATACACTCATCAGAGTGATGTCTGGTCCTTCGGGGTGTTAATGTGGGAGA
TCTTCACTTTAGGGGGCTCGCCCTACCCAGGGATTCCCGTGGAGGAACTTTTAAGCTGCTGAAGGAAGGACACAGAATGG
ATAAGCCAGCCAACTGCACCAACGAAGTGTACATGATGATGAGGGACTGTTGGCATGCAGTGCCCTCCAGAGACCAACGT
TCAAGCAGTTGGTAGAAGACTTGGATCGAATTCTCACTCTCACAAACCAATGAGGAATACTTGGACCTCAGCCAACCTCTCG

AACAGTATTACCTAGTTACCCTGACACAAGAAGTTCTTGTTCTTCAGGAGATGATTCTGTTTTTCTCCAGACCCCATGC
CTTACGAACCATGCCTTCCCTCAGTATCCACACATAAACGGCAGTGTTAAACATGA**CTCGAG**TCTAGAGGGCCCGTTTAA

XhoI kesim bölgesi

ACCCGCTGATCAG**CTCGACTGTGCCTTCTAGT**TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTG
GAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG
GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG
GCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGT
GTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTC
GCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTC
GACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTG
GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAAGTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTA
TAAGGGATTTTGCGGATTTGCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGA
ATGTGTGTGAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAG
CAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAG
TCCGCGCCCTAACTCCGCCCCTCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT
TTATTTATGCAAGAGCGGAGGCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGAGGCGCTAGGCT
TTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTG
AACAAGATGGATTGCACGCAAGTCTCCGCGCCTTGGGTGGAGAGGCTATTGCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCG
GCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCC
TGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGTATCGTGCTGGCCACGACGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTG
TCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCTCACCTTGCTCCTGCCG
AGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGA
AACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGC
TCGCGCCAGCCGAAGTCTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCT
GCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC
AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCGGCGCAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTTACGGTA
TCGCGCTCCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTTCAAAT
GACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAT
CGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTG
TGTTTTGTCAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTG
GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATA
CCAGGCGTTTTCCCGTGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCT
CCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGAGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCGCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA
GTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGG
AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA

TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCAT
AGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACGCG
AGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAAC
TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGCGCAACGT
TGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAA
TACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACC
GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCT
TTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

EK-3: Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri

HEK293 (DSMZ)

Cell line: 293
Cell type: human embryonal kidney
DSMZ no.: ACC 305
Origin: established from a human primary embryonal kidney transformed by adenovirus type 5 (Ad 5); classified as risk category 1 according to the German Central Commission for Biological Safety (ZKBS); cell line also known as HEK-293 (human embryonic kidney-293)
References: Graham et al., J Gen Virol 36: 59-72 (1977), PubMed ID [886304](#)
Depositor: Dr. W. Dirks, DSMZ, Braunschweig, Germany

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: adherent fibroblastoid cells growing as monolayer
Medium: 85% Dulbecco's MEM + 15% FBS
Subculture: split confluent culture 1:5 to 1:6 every 2-3 days (without using trypsin/EDTA, cells can be detached by tapping the flask); seed out at about $2-3 \times 10^6$ cells/25 cm²
Incubation: at 37 °C with 5-10% CO₂
Doubling time: about 24-30 hours
Harvest: cell harvest of about 40×10^6 cells/175 cm²
Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 2×10^6 cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology: cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 (+), desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, neurofilament +, vimentin +

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, LDH

Cytogenetics: human near-triploid karyotype with 6% polyploidy - 69(64-69)XX?X, +1, +6, -10, -13, -16, -18, -20, +21, +22, +mar, add(?X)(p22), inv(1)(p35q43), del(1)(p35), i(5p), del(6)(q11), add(8)(q24), add(13)(p13), add(17)(qter), der(?)t(5;?)(q13;?)

Molec.

Genetics:

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

MCF-7

Cell line: MCF-7
Cell type: human breast adenocarcinoma
DSMZ no.: ACC 115
Origin: established from the pleural effusion of a 69-year-old Caucasian woman with metastatic mammary carcinoma (after radio- and hormone therapy) in 1970; cells were described of being positive for cytoplasmic estrogen receptors and having the capability to form domes
References: Soule et al., J Natl Cancer Inst 51: 1409-1413 (1973), PubMed ID [4357757](#)
Depositor: obtained from ATCC (HTB 22), Rockville, Maryland, USA

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: epithelial-like cells growing as monolayers
Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS + MEM non-essential amino acids + 1 mM sodium pyruvate + 10 µg/ml human insulin
Subculture: split confluent culture 1:2 to 1:4 every 2-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. $0.1\text{-}0.2 \times 10^5$ cells/cm²
Incubation: at 37 °C with 5% CO₂
Doubling time: ca. 50 hours (range 30-72 hours)
Harvest: about $50\text{-}60 \times 10^6$ cells/175 cm²
Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 2×10^6 cells/ampoule

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology: cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament -, vimentin -
Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, MDH

Cytogenetics: human hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy - 86(80-87)<4n>XX, -X, -X, -1, -1, +6, +7, -9, -10, -10, -12, -13, -13, +14, -17, -17, -18, -18, -20, -20, -20, -22, +6-8mar, add(X)(q27), add(2)(q35-37)x1-2, add(5)(p15), del(6)(q25)x1-2, add(7)(p11), add(7)(p14;hsr), add(10)(q23), del(11)(q21q23), add(15)(p11), i(15q), add(16)(q24), add(19)(q13), add(19)(p13)x1-2 - corresponds to published karyotype

Molec.

Genetics:

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat BAŞARAN

Doğum Yeri : ARTVİN

Doğum Tarihi : 22 / 05 / 1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı dili : İngilizce, Almanca (Başlangıç Seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Gazi Anadolu Lisesi, 2003

Lisans : Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü, 2007