

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

**C2C12 FARE MİYOBLAST HÜCRE HATTINDA KALICI TRANSFEKSİYONUN  
GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

**Mehmet Deniz AKYÜZ**

**Tıbbi Biyoloji Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Pervin DİNÇER**

**ANKARA**

**2009**

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Şükriye Ayter  
Hacettepe Üniversitesi



Danışman:

Prof. Dr. Pervin Dinçer  
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Engin Yılmaz  
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr. Y. Çetin Kocaefe  
Hacettepe Üniversitesi



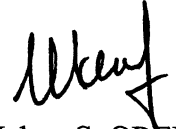
Üye:

Yrd. Doç. Dr. Beril Talim  
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. ORER  
Enstitü Müdürü Y.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, tüm bilimsel aktivitelerde bana yer vererek araştırma yapmam için beni teşvik eden, tez çalışmamda bilimsel birikimini ve değerli katkılarını esirgemeyen, danışmanım Sayın Prof. Dr. Pervin Dinçer'e,

Bilgilerini ve tecrübesini her zaman benimle paylaşan, çalışmalarım sırasında büyük sabır ve özveri gösteren, karşılaştığım en küçük sorunla bile ilgilenme inceliğinde bulunan Sayın Dr. Burcu Balcı'ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman desteğini hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarım, Sayın Prof. Dr. Meral Özgüç, Prof. Dr. Ahmet Kart, Prof. Dr. Şükriye Ayter, Prof. Dr. Hayat Erdem Yurter, Prof. Dr. Serap Emre, Prof. Dr. Engin Yılmaz, Doç. Dr. Çetin Kocaefe, Öğr. Gör. Dr. Didem Dayangaç Erden ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm arkadaşlarıma,

Ürettiği pcDNA6/TR plazmid vektörünü karşılıksız olarak bizimle paylaşma nezaketini gösteren, *National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration Jefferson Arkansas* biriminde görev yapan Sayın Dr. Vasily N. Dobrovolsky'ye,

Sahip olduğu pcDNA6/TR ve pcDNA4/TO/myc-His.B plazmid vektörlerini bizimle paylaşma inceliğinde bulunan, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda görev yapan Sayın Dr. Uygur Tazebay'a

Bilim yolunda ilerlemem için her fedakarlığı yapan, bana daima destek olan Sevgili Aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

## ÖZET

**Akyüz, M.D. C2C12 fare miyoblast hücre hattında kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009.** Kalıcı transfeksiyon, transfeksiyon yapılmış hücrelerde, ilgilenilen genlerin ifadesinin kontrolü, bir genin susturulması ya da belirli bir proteinin yüksek oranda ifadesinin hücre açısından fizyolojik sonuçlarının gözlenmesi gibi çeşitli amaçlar için kullanılan bir tekniktir. Kalıcı transfeksiyon ile, ilgilenilen genin genoma katılması ve mitotik bölünmeler sonucunda yavru hücrelere aktarılması sağlanır. Bu tez çalışmasının amacı, C2C12 fare miyoblast hücre hattında tetrasiklin ile uyarılabilen gen ifade sistemi oluşturarak kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirmektir. Bu nedenle *tet repressor* (tetR) genini ve blastisidin ilaç direnç genini içeren "pcDNA6/TR" plazmid vektörü C2C12 fare miyoblast hücre hattına transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

pcDNA6/TR plazmid vektörünün C2C12 fare miyoblast hücre hattına kalıcı olarak transfeksiyonunun sağlandığının kanıtlanması için, pcDNA4/TO-EGFP plazmid vektörünün C2C12 hücrelerine geçici olarak transfeksiyonu gerçekleştirilmiş, bunu takiben hücre kültür ortamına tetrasiklin ilave edilerek yeşil floresan protein (EGFP)'in ifadesi floresan mikroskop altında gözlenmiştir.

Kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği C2C12 fare miyoblast hücre hattının elde edilmesi sonucunda ilgilenilen herhangi bir genin ifade düzeyini kontrollü bir şekilde değiştirerek bu genin kaskadaki işlevini ortaya koymak amaçlı yapılacak bir çok çalışma için yararlı olacak bir sistem oluşturulmuştur. Ayrıca, tetrasiklin ile uyarılabilir gen ifade sisteminin oluşturulması sırasında edinilen tecrübeler, ilerleyen dönemlerde bu ve buna benzer kalıcı transfeksiyon gerektiren sistemlerin başka hücre hatlarında oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** C2C12, kalıcı transfeksiyon.

Bu tez çalışması, "TÜBİTAK 1001 Proje No: 107S228 (SBAG-3722) ile desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Akyüz, M.D. Establishment of stable transfection in C2C12 mouse myoblast cell line. Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2009.** Stable transfection is a technique used for versatile reasons such as gene silencing, inducing the expression of a gene of interest and observing the physiological effects of the overexpression of a target protein. Stable transfection occurs when the gene of interest is inserted in the nuclear genome of the cell and is transmitted to the daughter cells after mitosis. In this thesis study, in order to generate a stable cell line, we transfected the “pcDNA6/TR” plasmid vector, which contains tetracycline repressor gene and the blasticidin drug resistance gene to the C2C12 mouse myoblast cell line.

To prove that the pcDNA6/TR plasmid vector was transfected stably to the C2C12 mouse myoblast cell line, we transiently transfected the pcDNA4/TO-EGFP plasmid vector and observed the EGFP expression by fluorescence microscopy.

The establishment of the stable transfected C2C12 mouse myoblast cell line created a useful tool for the investigation of the effects of protein expression changes in a muscle like environment. The experience acquired while creating a tetracycline inducible expression system, will contribute to further research studies involving such inducible expression systems.

**Keywords:** C2C12, stable transfection.

This thesis is supported by, TÜBİTAK 1001 Project No: 107S228 (SBAG-3722)

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
<b>İÇ KAPAK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Hücre Tipi</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Transfeksiyon Yöntemi</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Transfeksiyon Sistemi</b>	<b>5</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar</b>	<b>12</b>
<b>3.1.A. Hücre Kültürü</b>	<b>12</b>
<b>3.1.B. <i>T-REx</i> Sistemi İçin pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması</b>	<b>12</b>
<b>3.1.C. Transfeksiyon</b>	<b>13</b>
<b>3.1.D. İmmünfloresan Boyama</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Yöntemler</b>	<b>14</b>
<b>3.2.A. C2C12 Hücre Hattı</b>	<b>14</b>
<b>3.2.B. <i>T-REx</i> Sisteminde Kalıcı Transfeksiyon İçin Gerekli pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün ve Sistemin İşlevinin Kanıtlanması İçin Gerekli pTO-EGFP Plazmid Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması</b>	<b>15</b>
<b>3.2.B.1 Plazmid Vektörlerin E.coli JM109 ve DH5<math>\alpha</math> Suşlarına Transformasyonu</b>	<b>16</b>
<b>3.2.B.2. Transforme Hücrelerin Çoğaltılması</b>	<b>17</b>
<b>3.2.B.3. <i>Mini-Prep</i> Plazmid Saflaştırması</b>	<b>17</b>

	Sayfa
<b>3.2.B.4. pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün Boyutunun Kontrolü</b>	18
<b>3.2.C. Blastisidin'in C2C12 Hücreleri İçin Minimal Toksik Dozunun Belirlenmesi</b>	19
<b>3.2.D. pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu</b>	20
<b>3.2.E. pcDNA6/TR Plazmid Vektörü İle Kalıcı Transfeksiyonun Gerçekleştirildiği C2C12 Hücrelerinin Blastisidin Varlığında Seçilimi</b>	21
<b>3.2.F. <i>T-REx</i> Sisteminin İşlevinin Kanıtlanması</b>	22
<b>3.2.F.1. pTO-EGFP Plazmid Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu</b>	22
<b>3.2.G. İmmünfloresan Boyama</b>	23
<b>4. BULGULAR</b>	25
<b>4.1. Blastisidin'in C2C12 Hücreleri İçin Minimal Toksik Dozlarının Belirlenmesi</b>	25
<b>4.2. C2C12 Hücrelerinde Kalıcı Transfeksiyonunun pcDNA6/TR Plazmid Vektörü İle Gerçekleştirilmesi</b>	26
<b>4.3. <i>T-REx</i> Sisteminin İşlevinin Kanıtlanması</b>	28
<b>4.4. Tet Represör Proteininin Varlığının İmmünfloresan Boyama İle Tespit Edilmesi</b>	29
<b>5. TARTIŞMA</b>	31
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	37
<b>KAYNAKLAR</b>	38

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Tet	<i>Tetracycline</i>
TetR	<i>Tetracycline repressor protein</i>
TetO <sub>2</sub>	<i>2 X Tetracycline operator sequence</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
LB	<i>Luria-Broth</i>
tTA	Tetrasiklin trans aktivatör
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
2.1. pcDNA6/TR plazmid vektörünün haritası	7
2.2. pcDNA4/TO/myc-His.B plazmid vektörünün haritası	8
2.3. <i>T-REx</i> sisteminin çalışma prensibi	9
3.1. pTO-EGFP plazmid vektörünün haritası	16
3.2. pcDNA6/TR plazmid vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü	19
4.1. Blastisidin'in C2C12 hücreleri için minimal toksik dozunun belirlenmesi	25
4.2. C2C12 hücrelerinin 6000ng pEGFP plazmid vektörü ile transfeksiyonu sonrasında transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi	26
4.3. C2C12 hücrelerinin pcDNA6/TR plazmid vektörüyle transfeksiyonu sonrasında ışık mikroskobu görüntüleri	27
4.4. Seçilim süreci sonunda klonal grupların gözlenmesi	27
4.5. C2C12 hücrelerinin 1000ng pEGFP plazmid vektörü ile transfeksiyonu sonrasında transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi	28
4.6. En düşük seviyede bazal ifadeye sahip ve en yüksek düzeyde uyarılan TR1 klonunun belirlenmesi	29
4.7. pcDNA6/TR plazmid vektörü ile kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği TR1 klonunda tet represör proteininin immünfloresan boyama ile tespit edilmesi	30

## 1.GİRİŞ

Kas hastalıkları, kas fibrillerindeki dejenerasyonla karakterizedir. Hastalığın ortaya çıkış yaşı, hastalığın seyri ve etkilenen kas tiplerine göre bir çok gruba ayrılırlar. Bu hastalıklarda, hastalık ortaya çıktıktan sonra kasların progresif bir biçimde dejenerasyonu gözlenir.

Kas hastalıklarının patogenezinin aydınlatılmasında C2C12 fare miyoblast hücre hattı sıkça kullanılmaktadır. C2C12 fare miyoblast hücre hattı hızla farklılaşarak miyotüpleri oluşturması ve karakteristik kas proteinlerini ifade etmesi nedeniyle kas dokusunu taklit eden bir model olarak kabul edilir.

İlgilendiğimiz bir proteinin kas dokusundaki rolü, hücrenin protein ifade düzeyini değiştirerek (genin yüksek derecede ifadesi ya da “RNA interference” ile genin ifade düzeyinin düşürülmesi veya genin tamamen susturulması vb.) bu değişimlerin hücre düzeyindeki etkisinin araştırılması ile gösterilebilir. Bu amaçla, C2C12 fare miyoblast hücre hattına bir plazmid ya da viral vektör aracılığıyla ilgilenilen gen aktarılır.

Plazmid vektörler aracılığıyla yapılan transfeksiyonlar kalıcı transfeksiyon ve geçici transfeksiyon olmak üzere iki gruba ayrılır. Geçici transfeksiyonda hücre içine alınan DNA nükleer genoma katılmadığından, transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücre bölünme sürecine girdikçe çekirdeğindeki plazmidleri kaybeder. Eğer aktarılan genin hücre genomuna katılmış olması ve yavru hücrelere de bu genin aktarılması isteniyorsa kalıcı transfeksiyon yöntemi uygulanmalıdır. Bunu sağlayabilmek için hedef hücreler genellikle ifade olması istenen genin yanısıra, hücreye belirli bir seçim özelliği kazandıracak başka bir gen ile birlikte aktarılır. Bu seçim sağlayacak özellik bir toksine dirençliliği sağlayan ilaç direnç geni olabilir.

Kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücre hatları elde etmek için, hücre hatlarının belirli bir antibiyotik direnç geni içeren plazmid vektörle transfeksiyonu ve antibiyotik seçilimine maruz bırakılması yeterlidir. Ancak, özellikle ilgilenilen genin hücre hattı için toksik bir etkisinin olduğu durumlarda, hücreler ilgilenilen genin

toksik etkisi yüzünden antibiyotik direncine sahip olmalarına rağmen ölürlür. Bu gibi durumları engellemek için uyarılabilir gen ifade sistemleri kullanılır. Bu sistemler sayesinde sadece kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre hatları elde edilmez ayrıca aktarılan genlerin ifade düzeyleri de kontrol edilebilir. Tetrasiklinle uyarılabilir gen ifade sistemleri bu amaçla yaygın olarak kullanılırlar.

Laboratuvarımızda dejeneratif kas hastalıkları ile ilgili araştırmalar uzun süredir yapılmaktadır. Bu araştırmalarda C2C12 fare miyoblast hücre hattı kas dokusuna benzer bir model olduğu için sıkça kullanılmaktadır. Bugüne kadar laboratuvarımızda yapılan in vitro araştırmalarda geçici transfeksiyon yöntemiyle proteinlerin kastaki işlevi araştırılmıştır. Ancak, geçici transfeksiyon yöntemi kullanıldığında hücrelerin hepsinde transfeksiyon gerçekleşmediğinden heterojen hücre grupları oluşur. Bu heterojen hücre gruplarının oluşması, araştırmalardan çıkacak sonuçları etkilemektedir. Laboratuvarımızda her hücrenin belirli bir proteini ifade ettiğı kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 hücre hatları oluşturularak bir proteinin kastaki işlevini ortaya koymak, araştırma sonuçlarının güvenilirliğini arttıracaktır. Tetrasiklin ile uyarılabilir sistemler kalıcı transfeksiyon için en sık kullanılan sistemlerdir. Bu nedenle tez çalışmasında *T-REx* tetrasiklin ile uyarılabilir gen ifade sistemi kullanılarak kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 fare miyoblast hücre hattı oluşturulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre Tipi

Hücre kültür çalışmalarında iyi tanımlanmış hücre sistemleri ile çalışmak gereklidir. İskelet kası gibi farklılaşması çok karışık ve çok aşamalı süreç gerektiren hücrelerle yapılan çalışmalarda genellikle primer kültürler ve hücre hatları kullanılmaktadır.

C2C12 fare miyoblast hücre hattı normal embriyonel farenin (C3H) bacak kasından oluşturulmuş bir miyoblast hücre hattıdır. Kendi hücre kültür ortamında hızlıca farklılaşarak karakteristik kas proteinlerini ifade eden miyotüpleri oluşturmasıyla karakterizedir. *In vitro* miyogenez ve hücre farklılaşması çalışmalarında kas dokusuna benzer bir model olarak sıkça kullanılır (1).

### 2.2. Transfeksiyon Yöntemi

Hücre transfeksiyonu, klinik ya da araştırma amaçlı protein üretimi, hücrenin protein ifade düzeyini değiştirerek bu değişimlerin hücre düzeyindeki etkisinin araştırılması ve genetik belirleyicilerin hücrelere aktarılması gibi birçok amaç için kullanılan bir tekniktir.

Transfeksiyon genel anlamda ökaryotik bir hücreye yabancı bir genetik materyalin biyokimyasal, viral ya da fiziksel yöntemlerle aktarılması olarak tanımlanır.

Transfeksiyon için kullanılan en yaygın fiziksel gen aktarım yöntemi elektroporasyondur. Kalsiyum fosfat yöntemi, DEAE-Dekstran yöntemi ve lipozom benzeri transfeksiyon ajanlarının kullanılması ile gen aktarımı ise kimyasal gen aktarım yöntemlerine örnektir. Viral vektörler kullanıldığında ise, çıplak DNA transferi yapılmaz, bunun yerine ilgilenilen gen bir virüs ile birlikte hücrelere transfer edilir. Transfeksiyon için hangi yöntemin en doğru ve en etkili olduğu, kullanılan hücre tipine ve amaçlanan deney sistemine bağlıdır (2,3).

Transfeksiyon genel olarak geçici ve kalıcı transfeksiyon olmak üzere iki alt başlığa ayrılır. Geçici transfeksiyonda hücre içine alınan DNA nükleer genom katılmadığından, transfeksiyonun gerçekleştiği hücre bölünme sürecine girdikçe çekirdeklerindeki plazmidleri kaybeder. Aktarılan genin hücre genomuna katılması ve yavru hücrelere de bu genin aktarılması için kalıcı transfeksiyon yöntemi kullanılmalıdır. Bunu sağlayabilmek için hedef hücrelerin genellikle ifade olması istenen genin yanısıra, hücreye belirli bir seçim özelliği kazandıracak başka bir gen ile birlikte transfeksiyonu sağlanır. Bu seçim bir toksine dirençliliği sağlayan ilaç direnç geni ile gerçekleştirilebilir. Transfeksiyon sonrasında bu toksin, hücrelerin içinde bulunduğu besiyerine uygun dozda ilave edilirse; transfeksiyon sonrası ilk günlerde bu direnç genini kendi genomuna katmış ve epizomal olarak içeren hücreler yaşamlarını devam ettirirler. Seçim süreci uzatıldıkça bölünen hücrelerin genom katılmamış plazmidi dışarı atmaları sonucu sadece bu direnç genini kendi genomuna katmış olan hücreler yaşayıp çoğalabilecek, diğerleri ise eleneceklerdir. Seçim baskısı bu şekilde devam ettirildiğinde ilaç direnç genlerini genomlarına katmış “kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre hatları” elde edilir (4).

### 2.3. Transfeksiyon Sistemi

Kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre hatlarını elde etmek için sıkça kullanılan sistemlerden biri uyarılabilir gen ifade sistemleridir. Bu sistemler sayesinde sadece kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücre hatları elde edilmez, ayrıca transfeksiyon sonrasında genlerin ifade düzeyleri de kontrol edilebilir. Tetrasiklinle uyarılabilir gen ifade sistemleri en yaygın olarak kullanılan transfeksiyon sistemlerindedir (5).

Tetrasiklinle uyarılan gen ifade sistemleri, sistemin çalışabilmesi için iki ayrı vektöre ihtiyaç duyar. Bu vektörlerden ilki kalıcı transfeksiyon sonrasında hücrelerin seçilebilmesi için gerekli olan antibiyotik direnç genini ve tet operatör dizisine özgü represör proteinini kodlayan geni içerir. İkinci vektör ise ilk kalıcı transfeksiyon sonrasında elde edilen hücrelere kalıcı ya da geçici olarak transfeksiyonunun gerçekleştirileceği hedef geni, bu gen ile transfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerin

seçilebilmesi için gerekli olan ikinci bir antibiyotik direnç genini ve tet represör (tetR) proteininin bağlandığı tetrasiklin operatörünü içerir (6).

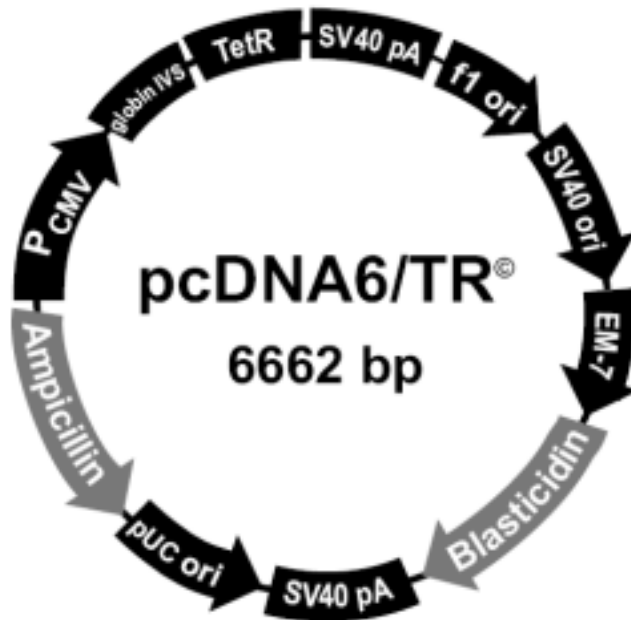
Tetrasiklin ile uyarılabilir sistemler (diğer bir adıyla *tet-on* ya da *tet-off* sistemleri) gen ifadesini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Bakteriye ait tetrasiklin direnç operonunun ökaryotik gen ifadesini kontrol edebildiğinin anlaşılmasının ardından, bu sistem değiştirilerek memeli hücreleri için kullanılabilir hale getirilmiştir. *Escherichia coli* tetrasiklin represör proteininin (tetR) DNA'ya bağlanma bölgesi ile herpesvirüs VP16 proteininin aktivasyon bölgesi birleştirilerek tetrasiklin trans aktivatör (tTA) yapısı oluşturulmuştur. Böylece tet operonunun *downstream* bölgesine hedef gen klonlandığında, gen ifadesi besiyerine tetrasiklin ilavesi ya da tetrasiklini besiyerinden çekerek kontrol edilebilir (7,8).

*Tet-on* sisteminde tetrasiklin'in hücre kültür ortamına eklenmesi tetrasiklin reseptörünün aktivasyonu için yeterlidir. *Tet-off* sisteminde ise aktivasyonu sağlamak için ortamdan bütün tetrasiklin'in uzaklaştırılması gereklidir. Hücre kültür ortamında az miktarda tetrasiklin kalması durumunda bile gen ifadesi baskılanabileceğinden *Tet-on* sistemi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (9).

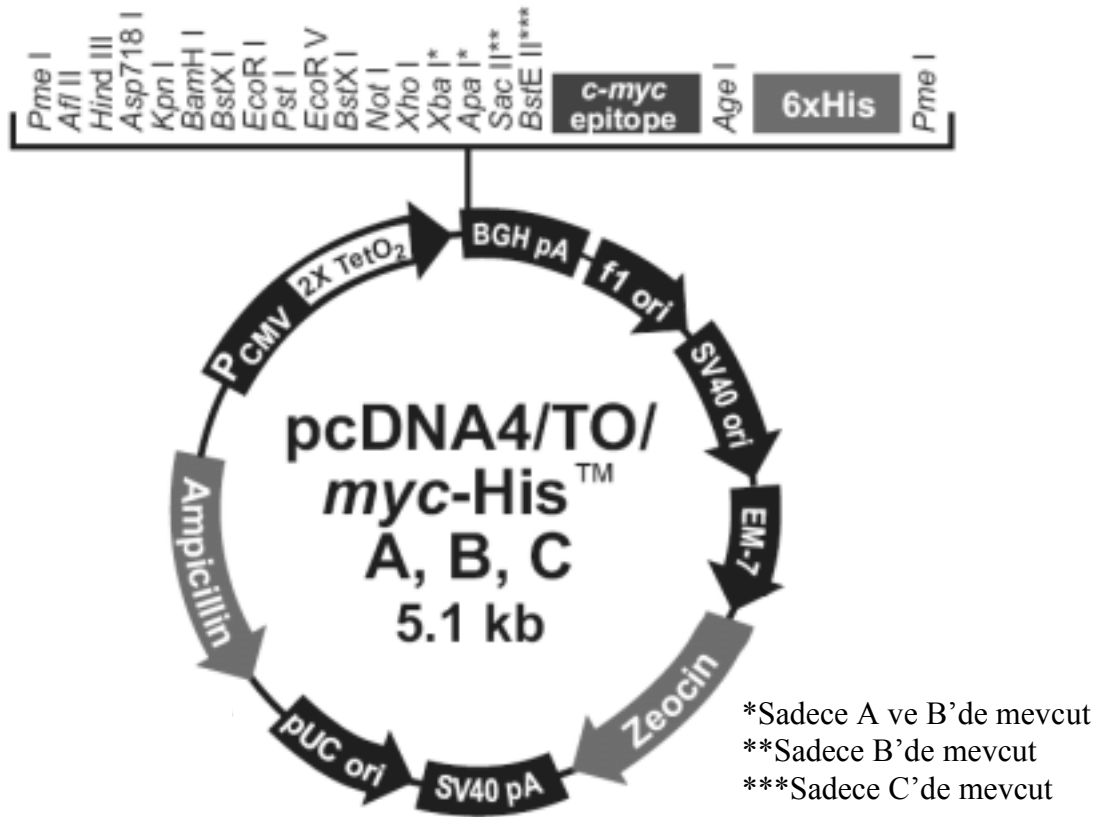
*Tet-on* sistemiyle benzer çalışma prensibine sahip olan ve araştırmalarda sıkça kullanılan diğer bir sistem ise *T-REx* sistemidir. *T-REx* sisteminde ilgilenilen genin ifadesi ortamda tetrasiklin yokken baskılanır, ortama tetrasiklin eklendiğinde ise gen ifade olur. Diğer tetrasiklin ile uyarılan ve hibrit düzenleyici elemanlar içeren sistemlerin aksine, *T-REx* sistemi doğal tet operatör dizisini kullanır. Sistem bakteriyel tet operonuna benzer bir şekilde çalışır ve viral transaktivatör bölgeler içermediğinden, memeli hücre hatlarında kullanıldığında olası bir toksik etki görülmez (10).

*T-REx* sisteminin birinci bileşeni pcDNA6/TR plazmid vektörü olup bu vektör kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücre hatlarının oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.1.). pcDNA6/TR plazmid vektörü CMV promotörü kontrolünde yüksek seviyede TetR proteini sentezler. Ortamda tetrasiklin yokken, sentezlenen TetR proteinleri homodimer yapısı oluşturarak yüksek ilginlik ile tet operatör dizilerine

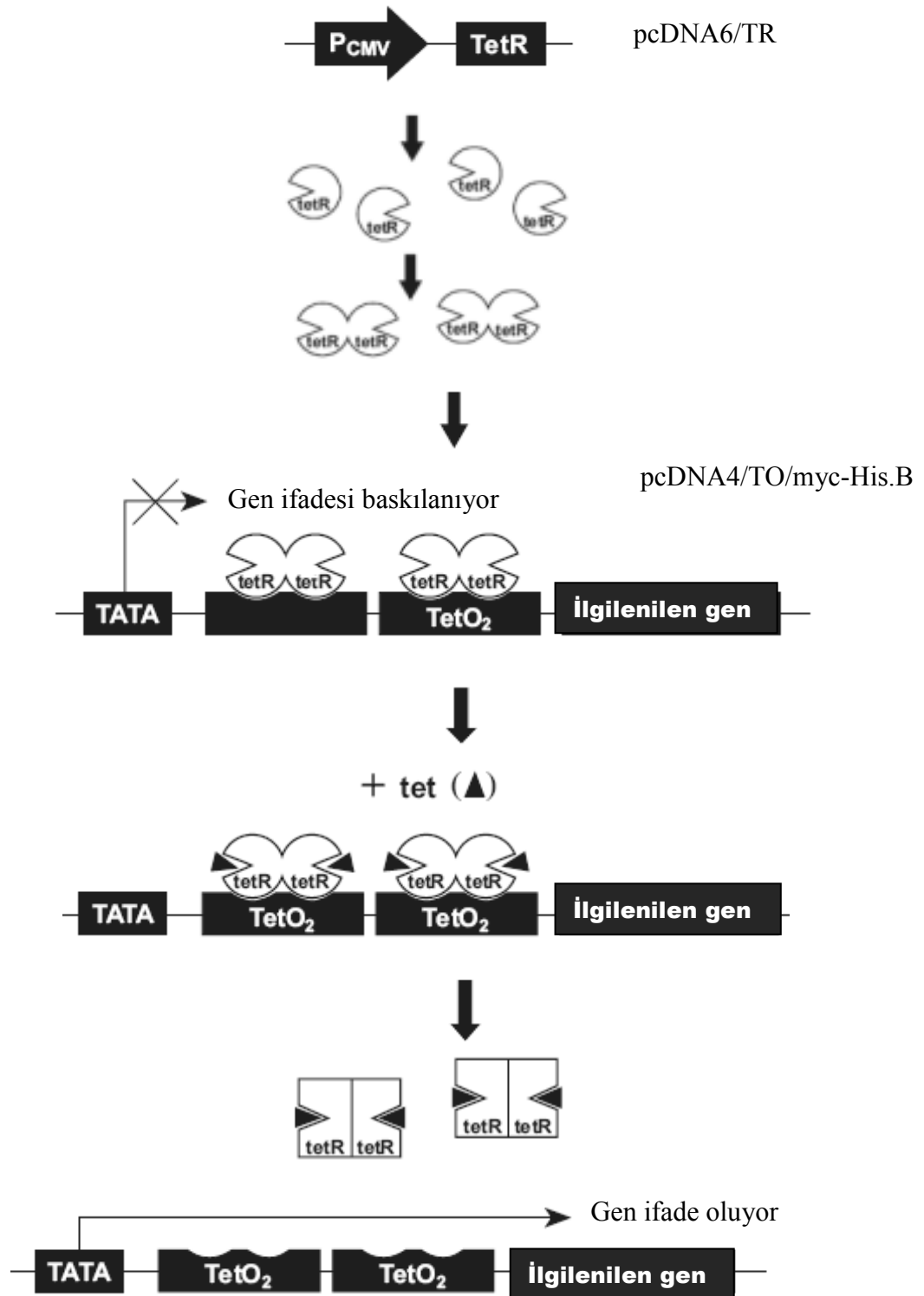
bağlanırlar. Ortama eklenen tetrasiklin tetR proteinine bağlanarak proteinde konformasyon değişimi oluşturur. Bu değişim sonrasında represör protein Tet operatör 2 (TetO<sub>2</sub>) dizilerinden ayrılır ve gen ifade olur. *T-REx* sisteminin ikinci bileşeni ise gen ifadesinin kontrolünü sağlayan pcDNA4/TO/myc-His.B ifade vektörüdür (Şekil 2.2.). İlgilenilen genin ifadesi, güçlü bir CMV promotörü ve bu promotöre yerleştirilmiş iki adet TetO<sub>2</sub> dizisi ile sıkıca kontrol edilir. Bu operatör dizilerden her biri TetR proteini için ikişer adet bağlanma bölgesi oluşturarak gen ifadesinin ortamda tetrasiklin yokken baskılanmasını sağlar (Şekil 2.3.) (10).



**Şekil 2.1.** pcDNA6/TR plazmid vektörünün haritası (Invitrogen, Cat. No: V1025-20)



Şekil 2.2. pcDNA4/TO/myc-His.B plazmid vektörünün haritası (Invitrogen, Cat.No: V1030-20)



**Şekil 2.3.** *T-REx* sisteminin çalışma prensibi.

pcDNA6/TR plazmid vektöründen ifade olan tetR proteini homodimer oluşturarak Tet operatör 2'ye (TetO<sub>2</sub>) bağlanır ve gen ifadesini baskılar. Ortama tetrasiklin eklendiğinde, tetrasiklin TetR homodimerlerine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda tetR proteininde yapısal bir değişim gözlenir ve represör protein Tet operatör dizisinden ayrılır. Bu ayrılma sonucunda ilgilenilen genin ifade olması sağlanır.

Kalıcı transfeksiyon yapılan hücreleri diğer hücrelerden ayırmak için değişik ilaç direnç genleri kullanılabilir. İlaç direnç genleri genellikle transfeksiyon için kullanılan plazmid vektörlerine klonlanmıştır. Ancak, eğer transfeksiyon için kullanılan plazmid vektöründe böyle bir direnç geni mevcut değilse transfeksiyon çalışması öncesinde vektöre uygun bir direnç geni klonlanmalı, transfeksiyon klonlanma doğrulandıktan sonra gerçekleştirilmelidir.

Transfeksiyon sonrasında ilaç direnç genini genomuna katmış olan hücrelerin seçilimi çalışmalarında sıkça kullanılan belirleyiciler mevcuttur. Örneğin bakteriyel bir gen olan neomisin fosfotransferaz içeren rekombinant vektör ile transfeksiyonun gerçekleştiği hücreler neomisin ya da bir neomisin analogu olan genetisin (G-418) ile ayırdedilebilir. Benzer bir şekilde, higromisin B fosfotransferaz genini içeren rekombinant vektörler ile transfeksiyonun sağlandığı hücreler, besiyerine higromisin B eklendiğinde, higromisin direncine sahip olduklarından, transfeksiyonun gerçekleşmediği diğer hücelere göre avantajlı konuma geçerler (11,12).

pcDNA6/TR plazmid vektörü memeli hücrelerinde antibiyotik seçilimi için blastisidin ilaç direnç genini içerir. Blastisidin S HCl *Streptomyces griseochromogenes*' den izole edilen bir antibiyotiktir ve hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde peptid bağı oluşumunu önleyerek protein sentezini inhibe edebilme özelliğine sahiptir. Blastisidin'e dirençlilik blastisidin S deaminaz genleri *bsd* ya da *bsr* ile sağlanır. Bu deaminazlar blastisidin'i toksik olmayan bir deaminohidroksi türevine çevirir (13).

pcDNA4/TO/myc-His.B ve pTO-EGFP plazmid vektörleri memeli hücrelerde antibiyotik seçilimi için zeosin ilaç direnç genini içerir. Zeosin, DNA zincirlerini kırar; bakteri, mantar, maya, bitki ve memeli hücreleri için toksiktir. Zeosin'e dirençlilik, *Sh ble* geni ile sağlanır. Bu genin protein ürünü zeosin'e bağlanarak onu inhibe eder ve DNA'ya bağlanmasını engeller (14).

Bu tez çalışmasında C2C12 hücrelerinde pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve tetrasiklin ile uyarılabilen gen ifade sistemi oluşturulmuştur. Bu amaçla ilk adım olarak, C2C12 fare miyoblast hücre için

blastisidin antibiyotiğinin minimal toksik doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. İkinci adım olarak, C2C12 fare miyoblast hücre hattına pcDNA6/TR plazmid vektörünün kalıcı olarak transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Üçüncü adım, sistemin oluşturulduğu klonlara pTO-EGFP plazmid vektörünün geçici olarak transfeksiyonu ile *EGFP* ifadesinin floresan mikroskop altında gözlenerek kanıtlanmasıdır. Tez çalışması sonunda trasiklin varlığında en iyi uyarılan ve ortamda tetrasiklin yokken en az bazal gen ifadesi gözlenen klonal hücre grupları belirlenmiş ve kas dokusunda proteinlerin işlevlerini araştırmak için yapılacak *in vitro* çalışmalarda bu klonal hücre hatlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

##### 3.1.A. Hücre Kültürü

C2C12 fare miyoblast hücre hattı (*American Type Culture Collection*)

*Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) (Biochrom)

Fötal Dana Serumumu (Biochrom)

Tripsin EDTA, (Biochrom)

L-Glutamin, 200 mM (Biochrom)

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applichem)

1X PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> ) (pH 7.4) :	NaCl (Carlo Erba)	140 mM.
	KCl (Carlo Erba)	3 mM.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	0.9 mM.
	NaHPO <sub>4</sub> (Merck)	6.4 mM.

Hücre bölünmesini sağlayan hücre kültür ortamı: %10 fötal dana serumu ve

2mM. L-Glutamin içeren DMEM

Hücre dondurma solüsyonu: %90 fötal dana serumu ve %10 DMSO

Tetrasiklin (Sigma, Cat. No: T7660)

##### 3.1.B. *T-REx* Sistemi İçin pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması

Plazmid vektör: pcDNA6/TR (Invitrogen, Cat. No: V1025-20)

Sıvı Bakteri Besiyeri pH 7.5 :10 g Tripton (Applichem)

5 g Maya özütü (Applichem)

5 g NaCl (Sigma)

12.5 ml (1 M) MgCl<sub>2</sub> (Sigma)

12.5 ml (1 M) MgSO<sub>4</sub> (Sigma)

10 ml (2 M) Glukoz (Sigma)

dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

Katı Bakteri Besiyeri :10 g Tripton (Applichem)  
 5 g Maya özütü (Applichem)  
 5 g NaCl (Sigma)  
 12.5 ml (1 M) MgCl<sub>2</sub> (Sigma)  
 12.5 ml (1 M) MgSO<sub>4</sub> (Sigma)  
 10 ml (2 M) Glukoz (Sigma)  
 15 g Agar (Sigma)  
 1 ml (50 µg/ml) Ampisilin  
 dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

Blastisidin (Invitrogen, Cat. No: R210-01)

Mini-prep plazmid saflaştırma kiti (Promega)

### 3.1.C. Transfeksiyon

*Fugene HD* transfeksiyon reaktifi (Roche, Cat. No: 4709705001)

*Minimum Essential Medium* (MEM) (Biochrom)

### 3.1.D. İmmünfloresan Boyama

*Triton X-100* (Sigma) : 0.2% /PBS (v/v)

Keçi serumu (Sigma) : 10% /PBS (v/v)

*Bovine serum albumin* (BSA) (Sigma) : 10% /PBS (w/v)

*Tween 20* (Sigma) : 0.1% /PBS (v/v)

*4',6-Diamidino-2-Phenylindole* (DAPI) (Sigma)

Solmayı geciktiren kapama ortamı (*ProLong Gold antifade reagent*, Molecular Probes, Cat. No: 36930)

1X PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> ) (pH 7.4) :	NaCl (Carlo Erba)	140 mM.
	KCl (Carlo Erba)	3 mM.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	0.9 mM.
	NaHPO <sub>4</sub> (Merck)	6.4 mM.

Birincil antikor: Tavşan anti-tetR poliklonal antikor (MoBiTec)

İkincil antikor: Keçi anti-tavşan AF 488 (Molecular Probe)

### 3.2. Yöntemler

Tez çalışması kapsamında C2C12 hücrelerinde pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve tetrasiklin ile uyarılabilen gen ifade sistemi oluşturulmuştur. Transfeksiyonun gerçekleştirildiği C2C12 hücreleri antibiyotik seçilimine maruz bırakılmış ve sadece transfeksiyonun sağlandığı hücreleri içeren saf klonal hücre grupları elde edilmiştir. Bu klonal hücre grupları, daha büyük kuyucuklara aktarılıp çoğaltılmış ve dondurulmuştur. Rekombinant pTO-EGFP plazmid vektörü temin edildikten sonra, bu vektörün klonal hücre gruplarına transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve tetrasiklin varlığında yeşil floresan proteininin ifadesi floresan mikroskop aracılığıyla gözlenmiştir.

#### 3.2.A. C2C12 Hücre Hattı

Bölümümüzde uzun süredir dejeneratif kas hastalıkları ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasında, kas dejenerasyonunun mekanizmasının açıklanmasında ve kas yolaklarının araştırılmasında genellikle primer kültürler ve hücre hatları kullanılmaktadır. Primer hücre kültürlerinde bir süre sonra hücreler yaşlanma sürecine gireceğinden, ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kalıcı transfeksiyon çalışmalarında tercih edilirler. C2C12 fare miyoblast hücre hattı hızla farklılaşarak miyotüpleri oluşturması ve karakteristik kas proteinlerini ifade etmesi nedeniyle kas dokusunu taklit eden bir model olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, tetrasiklin ile uyarılan gen ifadesi sisteminin oluşturulması amacıyla C2C12 fare miyoblast hücre hatları kullanıldı.

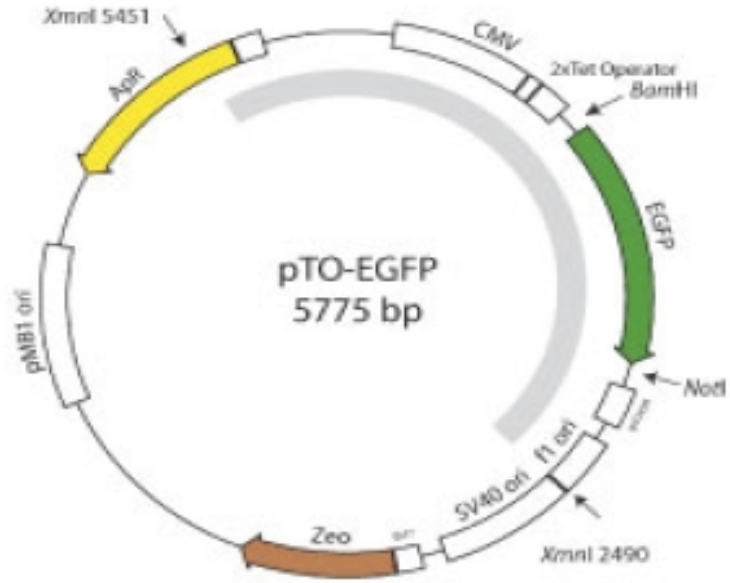
1. C2C12 fare miyoblast hücre hatları (*American Type Culture Collection*) temin edildi.
2. Hücreler %10 oranında fetal dana serumu ve 2 mM. L-glutamin içeren

*Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) hücre kültür ortamı içinde %80 yoğunluğa ulaşana kadar, %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren, 37°C'deki etüvde inkübe edildi.

3. Hücreler petri kabının tamamını kaplayınca tripsinize edildi ve 1x10<sup>6</sup> hücre/ml. dondurma solüsyonu (%90 fotal dana serumu, %10 DMSO) hazırlanarak donduruldu. 48 saat -80°C'de saklanan hücreler transfeksiyon aşamasına kadar sıvı azot (-196°C) tanklarına alınarak depolandı.

### **3.2.B. *T-REx* Sisteminde Kalıcı Transfeksiyon İçin Gerekli pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün ve Sistemin İşlevinin Kanıtlanması İçin Gerekli pTO-EGFP Plazmid Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması**

C2C12 hücre hattında kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirilmesi ve tetrasiklin ile uyarılabilen gen ifade sisteminin oluşturulması amacıyla kullanılan pcDNA6/TR plazmid vektörü Dr. Uygur Tazebay (Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) tarafından hediye edilmiştir. Ayrıca sistemin çalışmasının doğrulanması amacıyla kullanılan pTO-EGFP plazmid vektörü de Dr. Vasily Dobrovolsky (*National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration Jefferson, Arkansas*)'den temin edildi. pTO-EGFP plazmid vektörünün haritası Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** pTO-EGFP plazmid vektörünün haritası (Invitrogen)

pcDNA6/TR ve pTO-EGFP plazmid vektörleri *E.coli* JM109 suşlarına transforme edildi. Bu tür klonlama çalışmalarında, ana stoktaki bakterilerin tek koloni halinde çoğaltılması ve elde edilen klonların doğru plazmid vektörü içerip içermediğinin kontrol edilmesi gereklidir. Uygun plazmid vektörü içeren bakteri kolonisinin seçilerek daha sonraki çalışmalar için saklanması gerekmektedir.

Bu amaçla aşağıda belirtilen çalışmalar yapıldı.

### 3.2.B.1 Plazmid Vektörlerin *E.coli* JM109 ve DH5 $\alpha$ Suşlarına Transformasyonu

pcDNA6/TR ve pTO-EGFP plazmid vektörleri çoğaltmak amacıyla, vektörlerin ısı şoku ile hücre membran geçirgenliği artırılmış kompetan *E.coli* JM109 ve DH5 $\alpha$  suşlarına transformasyonu gerçekleştirildi.

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan kompetan *E.coli* suşları çıkartılarak, buz içerisinde inkübe edildi.

2. Plazmid vektörler konsantrasyonları 50 nanogram olacak şekilde 150 µl kompetan hücreye eklendi.
3. Karışım 30 dakika buzda inkübe edildi.
4. Karışım 42°C’de 1.5 dakika inkübe edildi.
5. Karışım 10 dakika buzda inkübe edildi.
6. Karışıma 150 µl antibiyotiksiz LB sıvı besiyeri eklendi ve 40 dakika 37°C’deki çalkalamalı etüvde 250 rpm’de inkübe edildi.
7. pcDNA6/TR ve pTO-EGFP plazmid vektörlerinin transforme edildiği E.coli hücreleri ile ampisilin içeren LB katı bakteri besiyerlerine ekim yapıldı ve 16-18 saat 37°C’deki etüvde inkübe edildi.

### **3.2.B.2. Transforme Hücrelerin Çoğaltılması**

İnkübasyon sonrası ampisilin antibiyotik direnç özelliğine sahip koloniler seçilerek plazmid saflaştırması için sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 16-18 saat 37°C’deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

### **3.2.B.3. Mini-Prep Plazmid Saflaştırması**

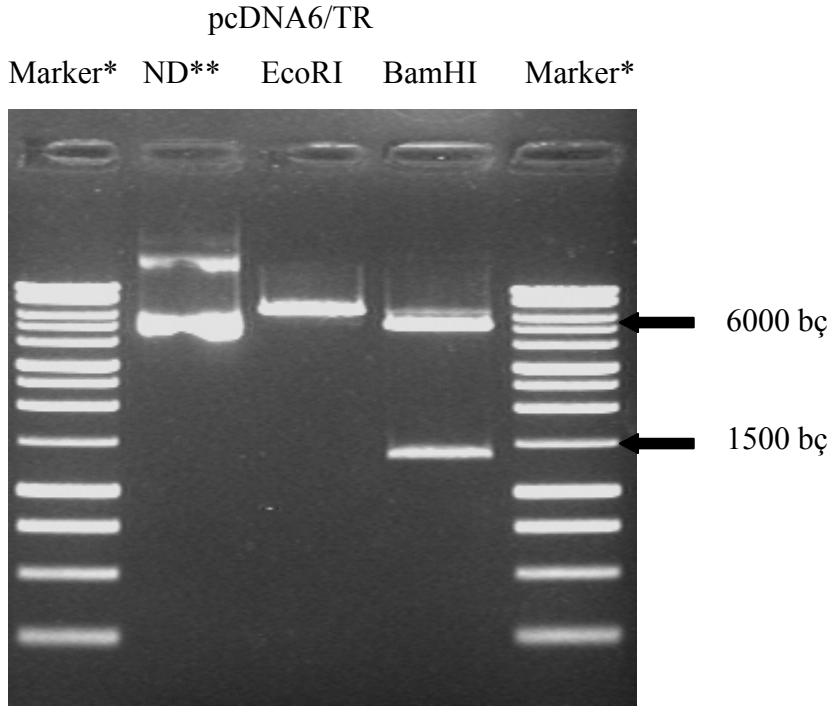
12 ml sıvı besiyerinde çoğaltılan transforme bakterilerden *mini-prep* plazmid saflaştırması yapıldı.

1. Çoğalan bakteriler 50 ml.’lik tüplere aktarıldı ve 2500 rpm.’de 10 dk. santrifüj yapıldı.
2. Hücre pelleti üzerine 250 µl. resüpsansiyon solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 250 µl. lizis solüsyonu eklenerek alt üst edildi.

3. Karışımın üzerine 10 µl. alkalın proteaz solüsyonu eklendi ve alt üst edilerek 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası 350µl. nötralizasyon solüsyonu ilave edilerek tüp alt üst edildi ve karıştırıcı yardımıyla tüp içeriğinin tamamen homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra oda sıcaklığında 14.000 rpm.'de 10 dk. santrifüj yapıldı.
5. Süpernatant rezin bağlı kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj yapıldı.
6. Kolona bağlanan plazmid DNA'sını izole etmek amacıyla, kolon yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 750 ve 250 µl. olacak şekilde iki kez etanol içeren yıkama solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µl. nükleaz içermeyen distile su ilave edildi. 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj sonrası kolondan tüpe geçmiş olan plazmid DNA'sının konsantrasyonu 260 nm. dalga boyunda ölçüldü (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*).
8. Saflaştırılan plazmid DNA'larının boyutlarının kontrolü için restriksiyon endonükleaz enzim kesimi yapıldı. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile morötesi ışık altında incelendi ve uzunlukları doğrulandı.

#### **3.2.B.4. pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün Boyutunun Kontrolü**

pcDNA6/TR plazmid vektörünün boyutunu kontrol etmek amacıyla ile restriksiyon enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimi ürünleri %1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile morötesi ışık altında görüntülendi (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** pcDNA6/TR plazmid vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

EcoRI restriksiyon enzimi pcDNA6/TR plazmid vektörünü 2324. nükleotidden kesiyor ve doğrusal duruma getiriyor. BamHI restriksiyon enzimi plazmid vektörünü 927. ve 2315. nükleotidlerden olmak üzere iki kez kesiyor. \**Promega 1Kb Ladder*. \*\*Kesilmemiş plazmid vektör.

### 3.2.C. Blastisidin'in C2C12 Hücreleri İçin Minimal Toksik Dozunun Belirlenmesi

C2C12 hücrelerinde blastisidin'in minimal toksik dozunun belirlenmesi amacıyla aşağıda belirtilen çalışmalar yapıldı.

1. 8 adet 10 cm<sup>2</sup>'lik kuyucuğa 100.000 hücre ve antibiyotiksiz DMEM (%10 Fötal dana serumu, 2mM L-glutamin) eklendi ve 24 saat 37°C %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
2. 24 saat sonunda hücre kültür ortamı 0 µg/ml, 1.5µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml, 5µg/ml, 6µg/ml, 8µg/ml, 10µg/ml blastisidin içeren kültür ortamı ile değiştirilerek hücreler etüv içerisinde 3 gün boyunca inkübe edildi.

3. Her 3 günde bir hücre kültür ortamı aynı konsantrasyonda blastisidin içeren kültür ortamıyla değiştirildi.
4. 15 günün sonunda hücrelerin tamamını öldüren en düşük blastisidin dozu belirlendi.

### 3.2.D. pcDNA6/TR Plazmid Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu

C2C12 fare miyoblast hücre hatları antibiyotiksiz hücre kültür ortamında çoğaltılarak transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon amacıyla; yüksek transfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksik yan etkisi olduğu bilinen, lipozom yapısındaki *Fugene HD* transfeksiyon reaktifi kullanıldı. 6000 ng pcDNA6/TR plazmid vektörü SapI restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrusal hale getirildi ve aşağıda belirlenen şartlarda transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon etkinliğinin saptanabilmesi için aşağıda belirlenen şartlarda pEGFP gen ifade vektörünün C2C12 fare miyoblast hücre hattına transfeksiyonu sağlandı. Bu şekilde hücreler transfeksiyon sonrası floresan mikroskop altında incelenerek, transfeksiyon yapılan hücrelerin transfeksiyonun gerçekleşmediği hücrelere oranı belirlendi.

1. 35 mm. çapındaki petri kaplarına  $1 \times 10^5$  hücre, 2ml hücre kültür ortamı içerisine konuldu. Hücreler 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren etüvde inkübe edildi.
2. 24 saat sonunda hücre kültür ortamı yenisi ile değiştirilerek hücreler etüv içerisinde 1 saat inkübe edildi.
3. Eş zamanlı olarak hazırlanan transfeksiyon karışımı 45dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Transfeksiyon karışımı: MEM hücre kültür ortamı (100  $\mu\text{l}$ .)  
Plazmid vektör (pcDNA6/TR)  
Fugene HD Transfeksiyon reaktifi  
Plazmid (x1000ng.)/ Transfeksiyon reaktifi ( $\mu\text{l}$ .) oranı: 6:14

5. Transfeksiyon karışımı hücreler üzerine pipet yardımıyla ilave edildi ve hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
6. 24 saatin sonunda hücre kültür ortamı 2µg/ml blastisidin içeren yenisiyle değiştirildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.

pcDNA6/TR plazmid vektörünün transfeksiyonunun yapılmadığı C2C12 hücreleri negatif kontrol amaçlı kullanıldı.

### **3.2.E. pcDNA6/TR Plazmid Vektörü İle Kalıcı Transfeksiyonun Gerçekleştirildiği C2C12 Hücrelerinin Blastisidin Varlığında Seçilimi**

pcDNA6/TR plazmid vektörüyle transfeksiyonu sağlanan C2C12 hücreleri, kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücreleri belirlemek amacıyla blastisidin varlığında antibiyotik seçilimine maruz bırakıldı. Bu amaçla aşağıda belirtilen çalışmalar yapıldı.

1. Transfeksiyondan 48 saat sonra C2C12 hücreleri tripsinize edilip 100 mm. çapındaki petri kaplarına aktarıldı. Bu sayede hücreler %25 oranında petri kabını kaplayacak hale getirildi. Hücre kültür ortamı 2µg/ml blastisidin içerecek şekilde yenilendi.
2. Her 3 günün sonunda hücre kültür ortamı vakum ile ortamdan çekildi, 1XPBS ile yıkandı ve ortama 2µg/ml blastisidin içeren yeni besiyeri eklendi.
3. Seçilim sürecine, hücreler klonlar oluşturuncaya kadar devam edildi.
4. Gözlenen klonlar tek tek seçilerek tripsinize edildi ve 60 mm. çapındaki petri kaplarına aktarıldı.
5. Klonlar 2µg/ml blastisidin içeren kültür ortamında %100 yoğunluğa ulaşıncaya kadar seçilime devam edildi.

6. %100 yoğunluğa ulaşan klonlar tripsinize edilerek %10 DMSO %90 fetal dana serumu içeren hücre dondurma solüsyonu içerisine alınarak -80°C'de donduruldu.

48 saatlik bekleme süresinin ardından dondurulan hücreler -196°C'deki sıvı azot tankına aktarıldı.

### 3.2.F. *T-REx* Sisteminin İşlevinin Kanıtlanması

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin çalıştığının gösterilmesi, tetrasiklin varlığında ilgilenilen genin ifadesindeki artışın gözlenmesi ile mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada pTO-EGFP plazmid vektörünün daha önce seçilen klonlara geçici olarak transfeksiyonu sağlandı ve tetrasiklin varlığında, seçilen klonlarda *EGFP* gen ifadesi olup olmadığı araştırıldı.

Bu amaçla aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

#### 3.2.F.1. pTO-EGFP Plazmid Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu

pcDNA6/TR plazmid vektörü ile kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği C2C12 hücreleri 2µg/ml blastisidin içeren hücre kültür ortamında çoğaltılarak 1000 ng pTO-EGFP plazmid vektörüyle transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon amacıyla *Fugene HD* transfeksiyon reaktifi kullanıldı. C2C12 hücreleri için transfeksiyon etkinliğinin saptanabilmesi için pEGFP gen ifade vektörünün transfeksiyonu aynı transfeksiyon koşullarında C2C12 hücrelerine yapıldı. Bu şekilde hücreler transfeksiyon sonrası floresan mikroskop altında incelenerek, transfeksiyonun sağlandığı hücrelerin transfeksiyonun gerçekleşmediği hücrelere oranı belirlendi.

1. 35 mm. çapındaki petri kaplarına  $1 \times 10^5$  hücre, 2ml hücre kültür ortamı içerisine konuldu. Hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
2. 24 saat sonunda hücre kültür ortamı yenisi ile değiştirilerek hücreler etüv içerisinde 1 saat inkübe edildi.

3. Eş zamanlı olarak hazırlanan transfeksiyon karışımı 45dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

Transfeksiyon karışımı: MEM hücre kültür ortamı (100 µl.)

Plazmid vektör (pTO-EGFP)

Fugene HD Transfeksiyon reaktifi

Plazmid (x1000ng.)/ Transfeksiyon reaktifi (µl.) oranı: 1:10

4. Transfeksiyon karışımı hücreler üzerine pipet yardımıyla ilave edildi ve hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
5. 24 saatin sonunda hücre kültür ortamına 10µg/ml tetrasiklin eklendi ve hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.

Tetrasiklin eklendikten 24 saat sonra floresan mikroskop altında *EGFP* ifade eden hücreler gözlemlendi.

pTO-EGFP plazmid vektörü ile transfeksiyonun yapılmadığı 2C12 hücreleri negatif kontrol amaçlı kullanıldı.

### 3.2.H. İmmünfloresan Boyama

Hücre ve dokulardaki proteinlerin florofor adı verilen renk verici antikorlarla işaretlenerek görünür hale getirildiği immün boyama tekniğine immünfloresan boyama adı verilir.

1. 6000 ng pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyonun sağlandığı TR1 klonundan 100.000 hücre alınarak 35mm. çapındaki petri kaplarının içine önceden konulan lamellere yerleştirildi. Hücreler 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında lameller alındı ve lamel üzerindeki hücreler fiksasyon amacıyla %4'lük paraformaldehit solüsyonunda 15 dakika inkübe edildi.

3. Hücreler 1XPBS solüsyonunda yıkama sonrasında, %0.2 Triton X-100/1XPBS solüsyonu ile 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek, hücre zarının geçirgenliği artırıldı.
4. Lamel üzerindeki hücreler 1XPBS solüsyonunda yıkandı ve birincil antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla 1 saat %10 keçi serumu ve %10 *bovine serum albumin* (BSA) içeren %0.1 Tween20/1XPBS solüsyonu ile inkübe edildi.
5. Hücreler sırasıyla birincil antikor ile 24 saat 4°C'de ve yıkama sonrasında ikincil antikor ile 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi (Antikorları sulandırmak amacıyla kullanılan solüsyon: %10 keçi serumu içeren %0.1 Tween20/1XPBS). Birincil antikor olarak 3:500 seyreltme ile tavşan anti-tetR poliklonal antikor (MoBiTec) kullanıldı. İkincil antikor olarak 1:500 dilüsyon ile anti-tavşan AF 488 ve anti-fare AF 568 (Molecular Probes) kullanıldı. Birincil ve ikincil antikorla boyama sonrasında distile su ile 1:1000 oranında seyreltilen DAPI ile çekirdek boyaması yapıldı.
6. Lameller kapama ortamı kullanılarak lam üzerine yapıştırıldı ve kuruması için karanlıkta 10-12 saat bekletildi.

pcDNA6/TR plazmid vektörü ile transfeksiyonun yapılmadığı 2C12 hücreleri negatif kontrol amaçlı kullanıldı.

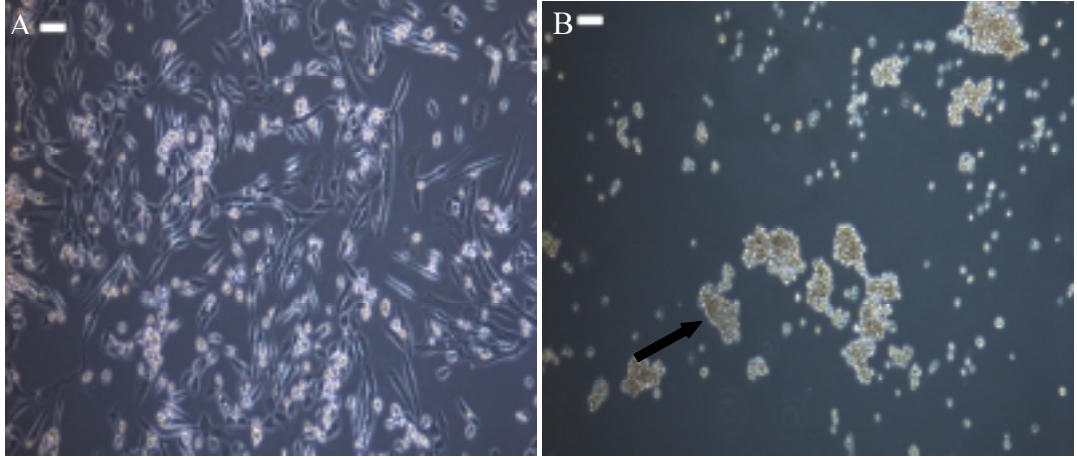
Boyama sonrası lamlar, floresan ataçmanlı *inverted* mikroskop (Trinoküler Floresan Ataçmanlı Inverted Mikroskop, Leica DMIL) kullanılarak incelendi.

## 4. BULGULAR

T-REx tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin oluşturulması amacıyla gerekli olan pcDNA6/TR plazmid vektörü ve sistemin işlevinin kanıtlanması için kullanılan pTO-EGFP plazmid vektörü Yöntemler 3.2.B1/2/3/4 ve 5’de ifade edilen deney aşamalarından sonra Yöntemler 3.2.A’da tanımlanan protokole göre hazırlanan C2C12 hücrelerine kalıcı transfeksiyon çalışmaları için kullanılmak üzere -20°C’de saklandı. Bu aşamadan sonra blastisidin’in C2C12 hücreleri için minimal toksik dozunun belirlenmesi çalışmalarına başlandı.

### 4.1. Blastisidin’in C2C12 Hücreleri İçin Minimal Toksik Dozlarının Belirlenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda 15 günlük sürecin sonunda C2C12 hücrelerinin tamamını öldüren minimal toksik dozdaki blastisidin miktarı 2µg/ml olarak belirlendi (Şekil 4.1.).

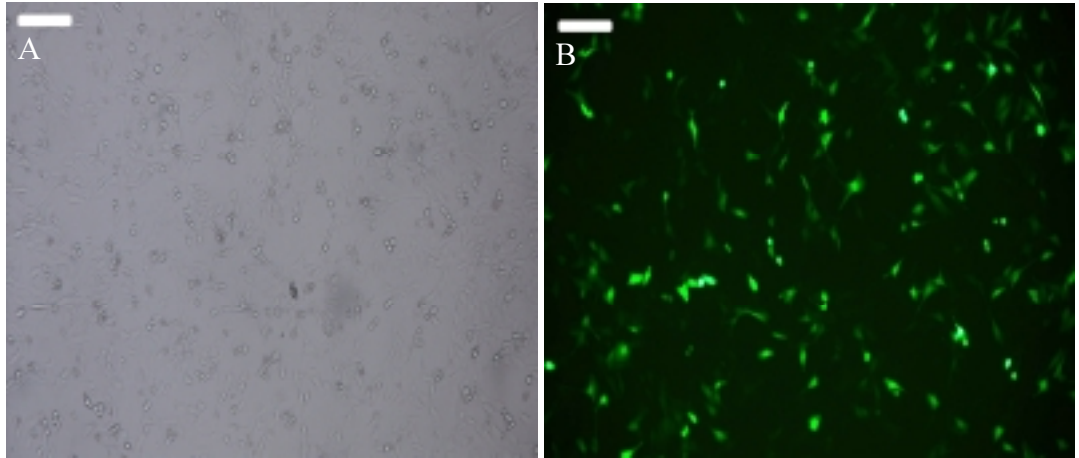


**Şekil 4.1.** Blastisidin’in C2C12 hücreleri için minimal toksik dozunun belirlenmesi.

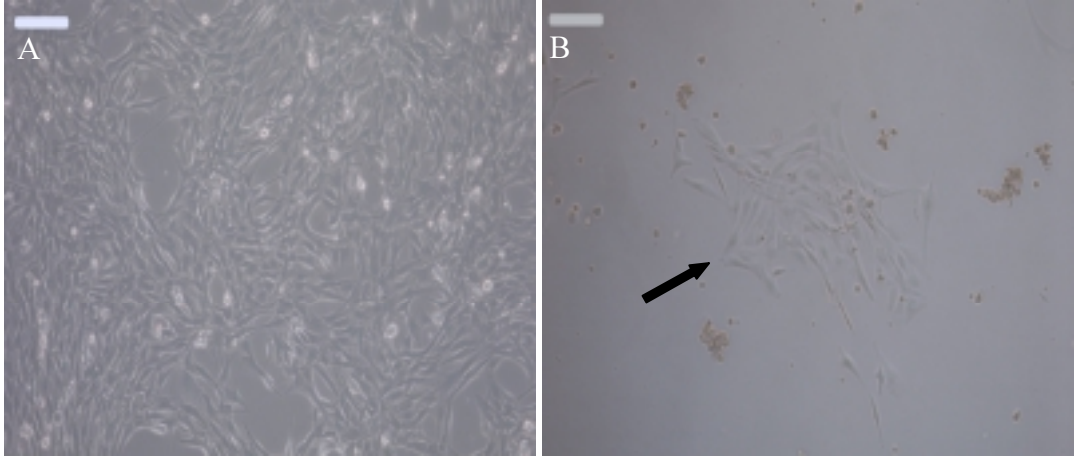
**A)** 4. gün, ışık mikroskobu görüntüsü, **B)** 10. gün, ışık mikroskobu görüntüsü (ok:küme halindeki ölü hücreler). Çubuk: 100 µm.

#### 4.2. C2C12 Hücrelerinde Kalıcı Transfeksiyonunun pcDNA6/TR Plazmid Vektörü İle Gerçekleştirilmesi

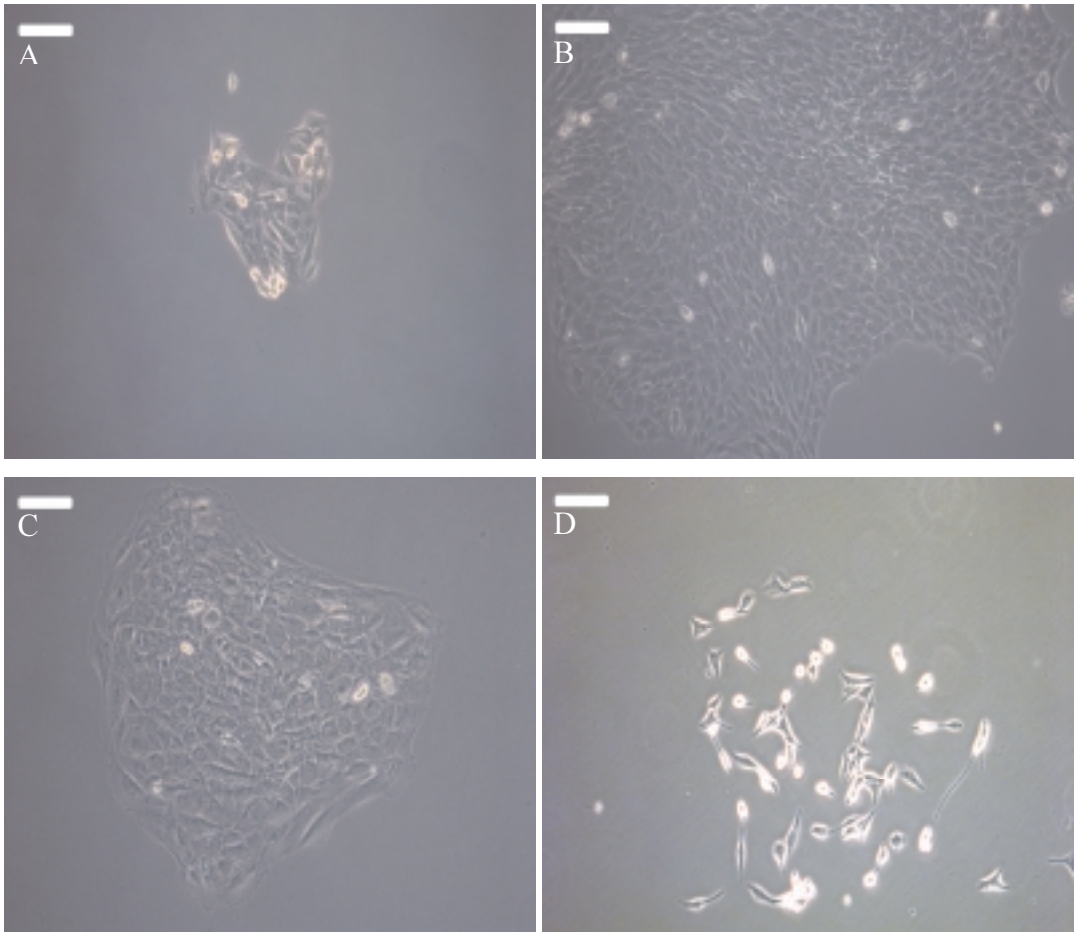
Toksik doz belirleme çalışmalarının tamamlanması ile birlikte 6000ng pcDNA6/TR plazmid vektörünün transfeksiyonu C2C12 hücrelerine *Fugene HD* transfeksiyon reaktifi ile yapıldı. Hücrelerde transfeksiyon etkinliği %70 olarak saptandı (Şekil 4.2.). Öldürücü doz olan ve minimal toksik etki gösteren blastisidin antibiyotiği (2µg/ml) plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin besi ortamına eklendi. Antibiyotikli besi ortamı her 3 günde bir yenilendi ve hücreler 18. günün sonunda klonal gruplar oluşturmaya başladılar (Şekil 4.3.). Hücreler 45 gün antibiyotik seçilimine maruz bırakıldı ve değişik büyüklükteki klonal hücre gruplarının oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.4.). Oluşan klonlar tripsinize edildi ve her klonal grubun ayrı petri kaplarında çoğalmaları sağlandı. Klonal hücre grupları petri kabını tamamen kapladıklarında tripsinize edilip hücre dondurma solüsyonuna alınarak donduruldular.



**Şekil 4.2.** C2C12 hücrelerinin 6000ng pEGFP plazmid vektörü ile transfeksiyonu sonrasında transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi. **A)** Işık mikroskobu görüntüsü, **B)** Aynı alanın floresan mikroskop görüntüsü. Çubuk: 100 µm.



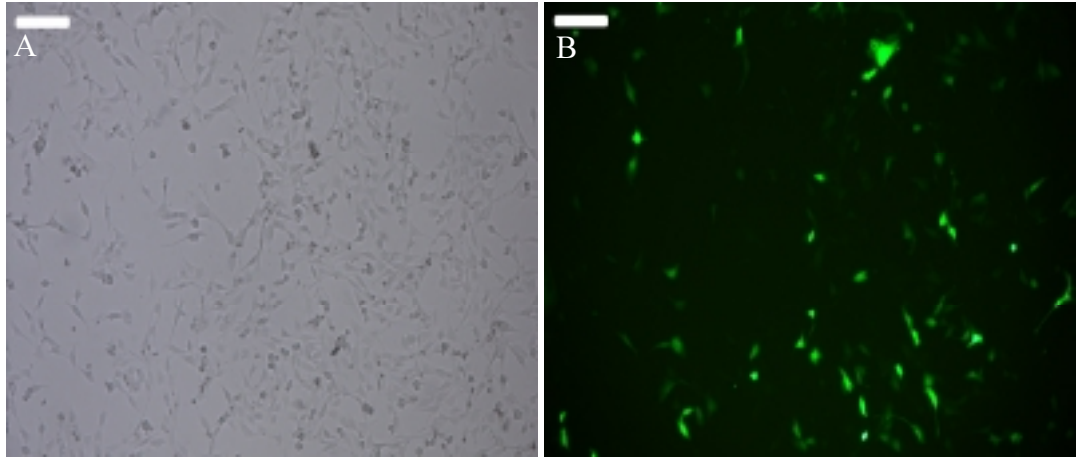
**Şekil 4.3.** C2C12 hücrelerinin pcDNA6/TR plazmid vektörüyle transfeksiyonu sonrasında ışık mikroskobu görüntüleri. **A)**Transfeksiyon sonrası 4. Gün, **B)** Transfeksiyon sonrası 18. günde klonal grupların oluşumu (ok: kalıcı transfeksiyonun gerçekleşmediği ölü hücreler). Çubuk: 100  $\mu$ m.



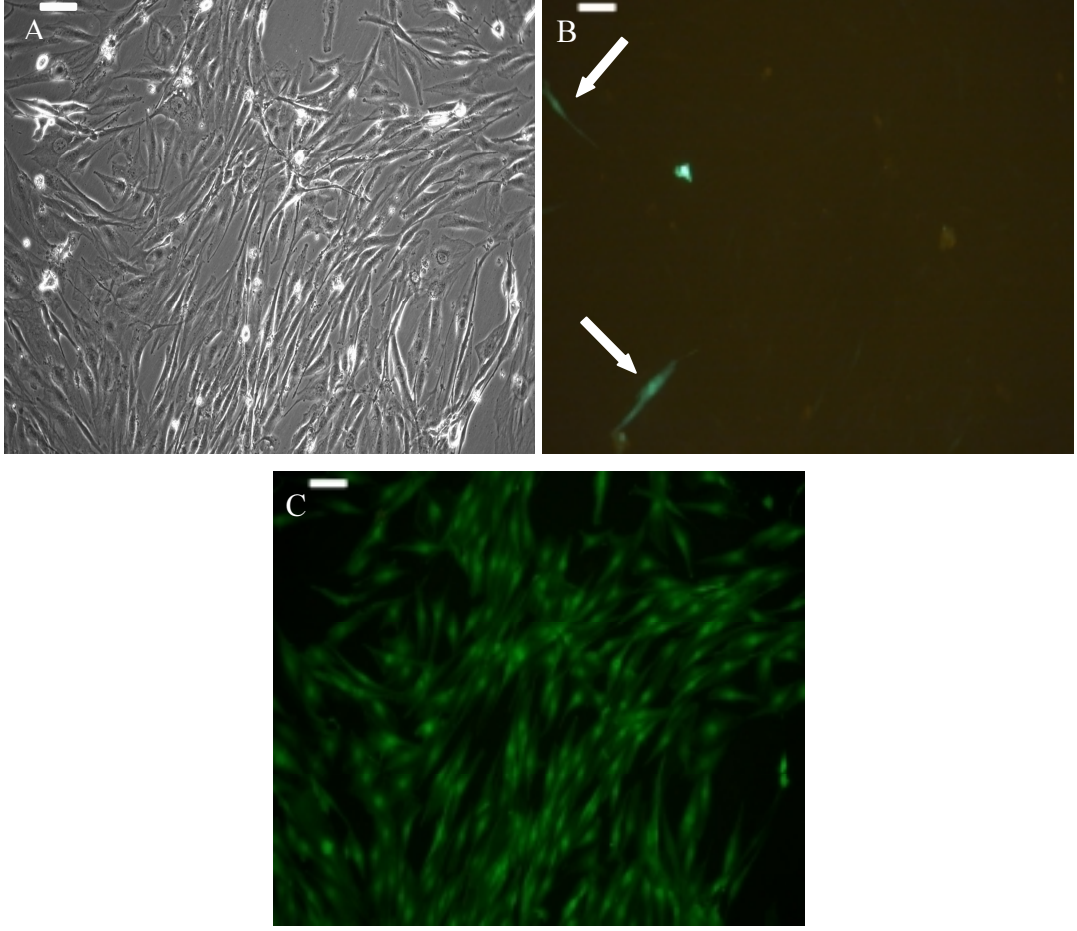
**Şekil 4.4.** Seçilim süreci sonunda klonal grupların gözlenmesi. **A, B, C** ve **D** değişik morfoloji ve büyüklükteki klonal hücre grupları. Çubuk: 100  $\mu$ m.

### 4.3. *T-REx* Sisteminin İşlevinin Kanıtlanması

C2C12 hücrelerinde kalıcı transfeksiyonun gerçekleştiğinin ve *T-REx* sisteminin işlevinin kanıtlanması amacıyla *EGFP* genetik belirleyicisini içeren pTO-EGFP plazmid vektörü temin edildi. Temin edilen plazmid vektör *mini-prep* plazmid saflaştırılması yöntemiyle çoğaltılıp 1000ng pTO-EGFP plazmid vektörünün transfeksiyonu, 6000ng pcDNA6/TR plazmid vektörü ile kalıcı transfeksiyonun sağlandığı 22 adet C2C12 hücre klonuna yapıldı. Transfeksiyon etkinliği %40 olarak saptandı (Şekil 4.5.). Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre kültür ortamına 10µg/ml tetrasiklin eklendi ve 24 saat sonra *EGFP* ifadesi floresan mikroskop altında gözlenerek sistemin çalıştığı kanıtlandı (Şekil 4.6.). Tetrasiklin varlığında en iyi uyarılan ve ortamda tetrasiklin yokken en az bazal *EGFP* ifadesi gözlenen klonal C2C12 hücre grubu belirlenmiş ve TR1 olarak adlandırılmıştır. Kas dokusunda proteinlerin işlevlerini araştırmak için yapılacak *in vitro* çalışmalarda TR1 klonunun kullanılmasına karar verilmiştir.



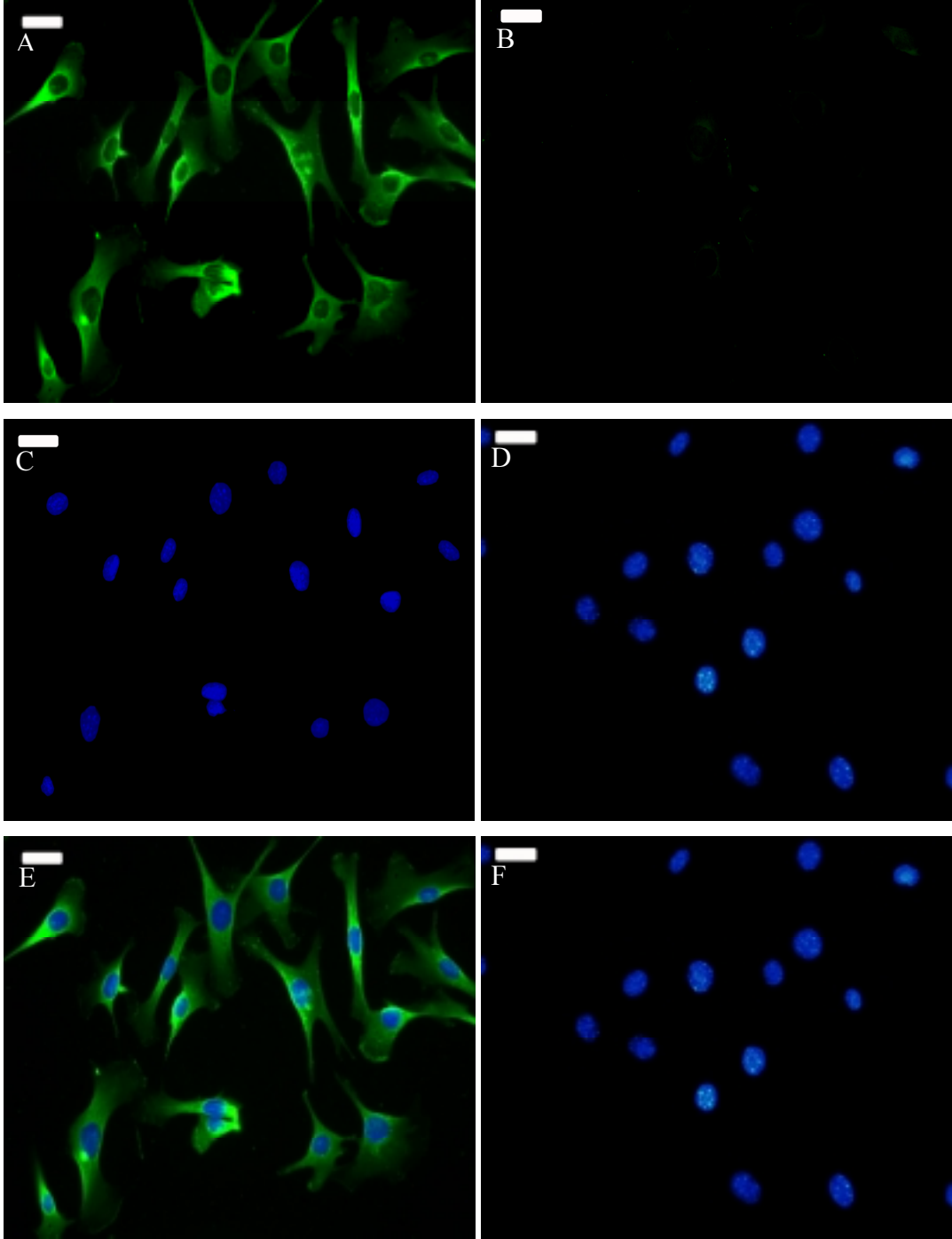
**Şekil 4.5.** C2C12 hücrelerinin 1000ng pEGFP plazmid vektörü ile transfeksiyonu sonrasında transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi. **A)** Işık mikroskobu görüntüsü. **B)** Aynı alanın floresan mikroskop görüntüsü. Çubuk: 100 µm.



**Şekil 4.6.** En düşük seviyede bazal ifadeye sahip ve en yüksek düzeyde uyarılan TR1 klonunun belirlenmesi. **A)** Işık mikroskobu görüntüsü. **B)** Aynı alanın floresan mikroskop görüntüsü (ok: bazal *EGFP* ifadesi gözlenen hücreler). **C)** Tetrasiklin ile uyarılan *EGFP* ifadesinin floresan mikroskop görüntüsü. Çubuk: 100 µm.

#### 4.4. TR1 klonunda Tet Represör Proteininin Varlığının İmmüno Floresan Boyama İle Tespit Edilmesi

pcDNA6/TR plazmid vektörü ile kalıcı transfeksiyonun sağlandığı TR1 klonunda tet represör proteininin varlığı tavşan anti-tetR poliklonal antikorunu (MoBiTec) kullanılarak immüno floresan boyama ile tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** pcDNA6/TR plazmid vektörü ile kalıcı transfeksiyonun sağlandığı TR1 klonunda tet represör proteininin immünfloresan boyama ile tespit edilmesi. **A)** Yeşil-FITC: tet represör proteini, **B)** Yeşil-FITC: pcDNA6/TR plazmid vektörüyle transfeksiyonun gerçekleştirilmediği C2C12 hücreleri, **C)** Mavi-DAPI: A ile aynı alan hücre çekirdekleri, **D)** Mavi-DAPI: B ile aynı alan hücre çekirdekleri, **E)** A ile C'nin çakıştırılmış filtre görüntüleri, **F)** B ile D'nin çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 µm.

## 5. TARTIŞMA

İlgilendiğimiz bir genin kas dokusundaki rolü, *in vitro* sistemde bu genin C2C12 fare miyoblast hücre hattına bir plazmid vektör aracılığıyla transfeksiyonu ile araştırılabilir.

Transfeksiyon sonrası heterojen hücre populasyonları, geçici gen ifadesi ve klonların kendi içlerinde genetik varyasyon göstermesi nedeniyle araştırmalardan çıkacak sonuçların doğruluğunu etkileyebilir. Kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre hatlarında, transfeksiyon ile aktarılan gen hücre genomuna katılır ve mitotik bölünmeler sonucunda yavru hücrelere aktarılır. Bu sayede aynı klonal gruptan köken alan, her hücrenin belirli bir proteini ifade ettiği homojen hücreler elde edilir ve araştırmalarda heterojen hücre gruplarının varlığından kaynaklanabilecek hataların önüne geçilir.

Kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücre hatlarını elde etmek için kullanılan yöntemlerden birisi uyarılabilen gen ifade sistemlerinin kullanılmasıdır. İndüklenebilir gen ifade sistemleriyle kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre hatları elde edilmesinin yanında transfeksiyon ile aktarılan genlerin ifadeleri bir uyarıcı aracılığıyla kontrol edilebilir. Özellikle ilgilenilen gen ürününün toksik, apoptotik ya da anti mitotik olduğu durumlarda uyarılabilir sistemlerin kullanılması avantajlıdır. İlgilenilen genin toksik ya da apoptotik özellikte olduğu durumlarda hücreler transfeksiyon gerçekleşse bile genin kendi özelliğinden dolayı öleceklerdir. İlgilenilen genin antimitotik olduğu durumlarda ise, hücre bölünme süreci etkilenir. Hücreler transfeksiyondan sonra bölünmeyeceğinden klonal hücre grupları oluşmaz, heterojen hücre grupları ortamda yaşamlarını devam ettirirler. Bu gibi durumlarda gen ifadesinin istenildiği zaman başlatılıp istenildiği zaman sonlandırılabilirdiği uyarılabilir gen ifade sistemleri avantaj sağlar.

İdeal bir uyarılabilir gen ifade sisteminin özgüllük, verim ve doza bağımlı uyarılabilirlik gibi belirli özelliklere sahip olması gerekir. Sistem, hücrede varolan endojen ürünlerle aktive olmamalı ve hücrenin düzenleyici yollarına etki etmemelidir. Bunun dışında uyarıcı molekül ortamda yokken düşük düzeyde bir

bazal ifadeye sahip olmalı, uyarıcı molekül eklendiğinde hızlıca yüksek düzeyde ve her hücrede eşit düzeyde gen ifadesi gerçekleşmelidir.

Yapılan karşılaştırmalı yayınlar incelendiğinde ekdizon ve rapamisin ile uyarılan sistemlere göre tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin sağladığı düşük bazal gen ifadesi ve yüksek düzeyde uyarılabilirlik özelliği bu tez çalışmasında bu sistemin seçilmesinde etken olmuştur. Ayrıca bu sistem memelilerde mevcut olmayan kontrol elemanlarını içermemektedir. Bu sayede kontrol elemanları hücrel faktörlerle etkileşime girmezler ve memeli sinyal yollarını etkilemezler (15-17).

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılabilen gen ifade sistemi belirli bir proteinin yüksek düzeyde ifadesinin sağlanmasının yanında, gen ifadesinin baskılanması amacıyla da kullanılabilir. C2C12 fare miyoblast hücre hattında bu yönde yapılan çalışmalar incelendiğinde, ilgilenilen gen ifadesinin kontrol hücrelere göre %10 seviyesine kadar indirilebildiği gözlenmiştir. Bu sistemin gen ifadesinin baskılanması amacıyla kullanılması sayesinde kas fizyolojisinde görevli önemli proteinlerin işlevleri hakkında daha net bilgi sahibi olmak mümkün olabilmektedir (15,18).

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sistemi *in vivo* çalışmalarda da kullanılmaktadır. Özellikle transgenik hayvan modellerinin oluşturulmasında ve belirli dokulardaki gen ifadesinin etkilerinin gözlemlendiği çalışmalarda yaygın olarak kullanılır (21).

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sistemi iki plazmid vektörden oluşmaktadır. pcDNA4/TO/myc-His.B plazmid vektörü güçlü bir CMV promotörünün yanı sıra memeli hücrelerinde tetrasiklin ile regülasyonu sağlayan iki adet tet operatör dizisini de içermektedir. Ayrıca bu vektörde yer alan *c-myc* epitopu bu sistem ile ifade edilen rekombinant proteinin tespiti ve miktarının ölçülmesi çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır Üretilen proteinler *anti-myc* ya da *anti-myc-HRP* antikorlarıyla kolayca boyanabilmektedir. Yine vektör üzerinde yer alan *C-terminal polyhistidine (6xHis)* işareti üretilen rekombinant proteinin purifikasyonunu mümkün kılmaktadır. pcDNA6/TR plazmid vektörü ise tetrasiklin

ortamda bulunmadığında sistemin çalışmasını tet operatör dizisine bağlanarak önleyen tetR proteinini üretmektedir (22,23).

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin oluşturulmasındaki en önemli aşama TetR proteinini yüksek düzeyde ifade eden klonların seçilmesidir. Bu amaçla pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı olarak transfeksiyonu sağlanmış hücre hattından mümkün olduğu kadar çok hücre klonu izole edilip çoğaltılmalı ve bu klonlar arasından en iyi gen ifadesini sağlayan klonlar pozitif kontrol vektörünün geçici olarak transfeksiyonu ile seçilmelidir. Sistemin çalıştığına kanıtlanması için kullanılan birçok pozitif kontrol geni mevcuttur. Bunlardan sıkça kullanılanları *EGFP*, *H-Ras* ve *lacZ* genleridir. *EGFP* geninin ifadesi floresan mikroskop ile kolayca tespit edilebildiğinden *EGFP* genini içeren pTO-EGFP plazmid vektörü daha çok tercih edilmektedir (8).

Bölümümüzde uzun süredir dejeneratif kas hastalıkları ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bugüne kadar laboratuvarımızda yapılan araştırmalarda bir proteinin kastaki işlevini belirlemek amacıyla geçici transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Geçici transfeksiyon sonrasında transfeksiyonun gerçekleşmediği hücreler de hücre kültür ortamında bulunur, transfeksiyonun sağlandığı hücreler ise farklı kopya sayılarında plazmid içerdiklerinden eşit düzeyde gen ifadesi gözlenemez. Bu durum araştırmalardan çıkacak sonuçların güvenilirliği etkilenebilir. Eğer araştırmalarda her hücrenin belirli bir proteini ifade etmesi isteniyorsa, transfeksiyonun olmadığı hücrelerin antibiyotik seçilimiyle ortadan kalkacağı ve tüm hücrelerin eşit düzeyde gen ifadesi göstereceği kalıcı transfeksiyon yöntemi kullanılmalıdır. Bu tez çalışmasında pcDNA6/TR plazmid vektörünün C2C12 hücrelerine kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve kalıcı transfeksiyonun gerçekleştiği C2C12 fare miyoblast klonal hücre gruplarına pTO-EGFP plazmid vektörünün geçici olarak transfeksiyonu ile yeşil floresan protein ifadesi floresan mikroskop altında gözlenmiştir. Bu çalışma sonunda kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 fare miyoblast hücre hattının elde edilmesi ile, bölümümüzde kasta ifade edilen herhangi bir proteinin ifade düzeyini değiştirerek bu proteinin kastaki işlevini ortaya koymak amaçlı yapılacak bir çok çalışma için yararlı olacak bir araç oluşturulmuştur. Ayrıca, tetrasiklin ile uyarılabilir gen ifade sistemi ile kalıcı transfeksiyonun sağlandığı hücre

hattı oluşturulması sırasında edinilen tecrübeler, ilerleyen dönemlerde bu ve buna benzer kalıcı transfeksiyon gerektiren sistemlerin başka hücre hatlarında oluşturulmasına da katkı sağlayacaktır.

Yüksek düzeyde tetR proteini üreten kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 hücrelerinin elde edilmesi sürecinde transfeksiyon etkinliği önemli rol oynamaktadır. Tez çalışmasında 6000ng doğrusal pcDNA6/TR plazmid vektörünün C2C12 hücrelerine transfeksiyonu %70 etkinlik ile gerçekleştirilmiştir. Sistemin en verimli düzeyde çalışabilmesi için pcDNA6/TR plazmid vektörünün yüksek transfeksiyon etkinliği ile hücrelere transfeksiyonu gerekmektedir. Yüksek transfeksiyon etkinliği sonucunda pcDNA6/TR plazmid vektörünü fazla kopya sayısı ile bulunduran hücre miktarı artacağından, tetR proteinini yüksek düzeyde ifade eden klon sayısı da artacaktır. Ancak, tez çalışmasında *T-REx* gen ifade sisteminin etkin bir biçimde tetrasiklin ile uyarılabilmesi için 6000ng pcDNA6/TR vektörü ile kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği C2C12 hücrelerine 1/6 oranında pTO-EGFP plazmid vektörünün transfeksiyonu sağlanmıştır. Bu durumda yalnızca sistemin çalıştığını kontrol etmek amacıyla yapılan geçici transfeksiyon %40 etkinlik ile gerçekleşmiştir. C2C12 hücrelerine 1000ng plazmid vektör ile yapılan transfeksiyonlarda %40'lık bu transfeksiyon etkinliği elde edilebilecek maksimum etkinlik olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında pTO-EGFP plazmid vektörü pcDNA6/TR plazmid vektörü ile 22 farklı klonal hücre grubuna transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre besi ortamına 10µg/ml tetrasiklin eklenmiş, 24 saat sonra gen ifadesi en iyi uyarılan klon seçilmiştir.

Tez çalışmasında seçilen koloniler uyarılma yönünden incelendiğinde besiyerine tetrasiklin ilave edildikten 24 saat sonra uyarılma gerçekleştiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde besiyerinden tetrasiklin çekildikten 3 gün sonra tam anlamıyla gen ifadesinin baskılandığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında *T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin çalıştığı pTO-EGFP plazmid vektörünün, pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyonun olduğu hücrelere transfeksiyonu sonucunda tetrasiklin uyarılmanın gerçekleştirilmesi ile gösterilmiştir. Bu aşamadan sonra uyarılmanın gerçekleştiği koloni TR1 olarak adlandırılmıştır. TR1 kolonisi sonraki çalışmalar için çoğaltılmış ve dondurulmuştur.

*T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminde bazal gen ifadesi gözlenmesi sıkça rastlanan bir sorundur. Bu sorunun iki farklı sebebi olabilir. Birincisi, hücre besi ortamında kullanılan fotal dana serumunun eser miktarda tetrasiklin içermesi olabilir. Serumun elde edildiği hayvanların besininde tetrasiklin bulunduğu ve besi ortamına eklenen serum bunu eser miktarda içerdiğinden bazal gen ifadesi gözlenir. Diğer bir sebep ise pTO-EGFP plazmid vektörünün klonal hücre gruplarına transfeksiyonu kalıcı olmadığından, ilk günlerde plazmid vektörü epizomal olarak içeren hücrelerin sayısı çok olacağından, tetrasiklin ile uyarılma olmadığı halde gen ifadesi gözlenmesinin mümkün olabilmesidir. Ayrıca kaçak transkripsiyondan dolayı da düşük miktarda gen ifadesi gözlenebilir. Bu durumda hücrelerin geçici transfeksiyondan sonra zeosin ve blastisidin içeren besiyerinde tekrar antibiyotik seçilime maruz bırakılması gerekmektedir. Bu antibiyotik seçilimi sonucunda hem pcDNA6/TR plazmid vektörünü hem de pTO-EGFP plazmid vektörünü içeren hücreler ortamda yaşamaya devam edeceklerdir. Bu hücreler arasında pTO-EGFP plazmid vektörünü yüksek miktarda içeren hücrelerde, yine bazal gen ifadesi gözlenebilir. C2C12 fare miyoblast hücrelerinde T-REx tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin başarıyla oluşturulduğu yayınlar incelendiğinde bu sistemde hücre kültür ortamına tetrasiklin eklenmeden bazal gen ifadesinin gözlendiği ve %10'luk bir bazal gen ifadesinin normal olarak karşılandığı görülmektedir. (18-20). Tez çalışmamızda da klonlar bazal gen ifadesi yönünden incelendiğinde, pcDNA6/TR plazmid vektörünün kalıcı olarak transfeksiyonun sağlandığı klonal grupların bazılarında beklenen düzeyde bazal gen ifadesi gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiğine diğer bir kanıt ise tetR proteininin varlığının 6000ng pcDNA6 plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 hücrelerinde immünfloresan boyama yöntemiyle gösterilmesidir. İmmünfloresan boyamada tavşan anti-tetR poliklonal antikoru kullanılmıştır. İmmünfloresan boyama DAPI zıt boyaması ile desteklenmiştir. TR1 klonundaki tüm hücrelerde tetR proteininin varlığı gösterilmiştir.

İlerleyen dönemde pcDNA6/TR plazmid vektörüyle kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olan C2C12 hücreleri proteinlerin kasdaki işlevini ortaya koymak amaçlı yapılacak çalışmalarda kullanılacağında bazı noktalara dikkat etmek gerekmektedir. Öncelikle çalışmaya başlamadan önce ilgilenilen gen pcDNA4/TO/myc-His.B plasmid vektörüne klonlanmalı, ve klonlanma DNA dizi analizi yapılarak kanıtlanmalıdır. Bu işlemden sonra elde edilen rekombinant pcDNA4/TO/myc-His.B plasmid vektörünün, TR1 klonuna bu tez çalışmasında belirtilen şartlarda transfeksiyonu sağlanmalıdır. Transfeksiyon sonrasında hücreler zeosin ve blastisidin içeren hücre kültür ortamında tutulmalı ve antibiyotik seçilimine çalışma sona erinceye kadar devam edilmelidir. Antibiyotik baskısı olmadığında genomun, içerisindeki plazmidi atabileceği göz ardı edilmemelidir. Oluşan klonlar ayrı ayrı klonlama halkalarıyla tripsinize edilip daha büyük petrilere alınmalıdır. Yeterli sayıya ulaşan klonların bir kısmı dondurulmalı ve sıvı azot tankına alınmalıdır. Geriye kalan hücreler ayrı bir petriye alınmalı, hücreler 10µg/ml tetrasiklin ile uyarılmalı ve 24 saat sonra ilgilenilen gen ürüne göre uygun antikorlarla her klonun bazal gen ifade düzeyi ve uyarılma seviyesi belirlenmelidir. Çalışmada en düşük bazal gen ifadesine ve en yüksek düzeyde uyarılabilirliğe sahip klon seçilerek sonuçlar o klon üzerinden değerlendirilmelidir.

Bu tez çalışması sonucunda C2C12 fare miyoblast hücrelerinde kalıcı transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve *T-REx* tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin oluşturulduğu gösterilmiştir. Bu sistem sayesinde herhangi bir proteinin kas dokusundaki işlevinin belirlenmesi amacıyla yapılacak araştırmalar için yararlı bir araç oluşturulmuştur. Ayrıca, tetrasiklin ile uyarılabilir gen ifade sisteminin oluşturulması sırasında edinilen tecrübeler, ilerleyen dönemlerde bu ve buna benzer kalıcı transfeksiyon gerektiren sistemlerin başka hücre hatlarında oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Blastisidin'in C2C12 fare miyoblast hücre hattı için toksik dozu 2 µg/ml olarak belirlenmiştir.
- C2C12 fare miyoblast hücre hattına pcDNA6/TR plazmid vektörünün kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- C2C12 fare miyoblast hücre hattında tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sisteminin oluşturulduğunun kanıtlanması için klonlara pTO-EGFP plazmid vektörünün geçici olarak transfeksiyonu sağlandıktan sonra hücre kültür ortamına tetrasiklin eklenmiş ve *EGFP* ifadesi floresan mikroskop altında gözlenmiştir. Bu durumda kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 hücrelerinin oluşturulduğu kanıtlanmıştır.
- Kalıcı transfeksiyonun gerçekleştirildiği C2C12 TR1 klonundaki tüm hücrelerde tetR proteininin varlığı immünfloresan boyama yöntemiyle gösterilmiştir.
- Tetrasiklin varlığında en iyi uyarılan ve ortamda tetrasiklin yokken en az bazal gen ifadesi gözlenen klon TR1 olarak adlandırılmış ve bu klon ileriki çalışmalar için çoğaltılarak dondurulmuştur.
- Tez çalışması kapsamında oluşturulan tetrasiklin ile uyarılan gen ifade sistemi tez çalışmasını takip eden diğer araştırmalar için bir alt yapı hazırlamıştır. İlerleyen dönemde kas dejenerasyon mekanizmalarının açıklanmasına yönelik olarak yapılacak çalışmalar için tüm hücrelerin belirli bir proteini yüksek düzeyde ifade ettiği ya da belirli bir proteinin ifadesinin baskılandığı transfeksiyonun kalıcı olduğu hücre hatları çok sıklıkla kullanılacaktır.
- Tetrasiklin ile uyarılabilir gen ifade sisteminin kullanıldığı, kalıcı transfeksiyonun sağlandığı C2C12 hücre hattının oluşturulması sırasında

edinilen tecrübeler, ilerleyen dönemlerde bu ve buna benzer sistemlerin başka hücre hatlarında oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Yaffe, D., Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725-727
2. Schenborn, E.T. ve Goiffon, V. (2000). DEAE-Dextran Transfection of Mammalian Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology*, 130, 147-153
3. Schenborn, E.T. ve Oler, J. (2000). Liposome-mediated transfection of mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 130, 155-164
4. Power, C.A. ve Meyer, A. (2000). Generation of Stable Cell Lines Expressing Chemokine Receptors. *Methods in Molecular Biology*, 130, 99-104
5. Dohn, M., Nozell, S., Willis, A. ve Chen, X. (2003). Tumor Suppressor Gene-Inducible Cell Lines. *Methods in Molecular Biology*, 223, 221-235
6. Vickers, E.R., ve Sharrocks, A.D. (2002). The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors. *Methods*, 26, 270-280
7. Lai, J.F., Juang, S.H., Hung, Y.M., Cheng, H.Y., Cheng, T.L., Mostov, K.E., ve Jou, T.S. (2003). An ecdysone and tetracycline dual regulatory expression system for studies on Rac1 small GTPase-mediated signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, 711–719
8. Song, P., Wang, H.C.R. (2004). Efficient identification of tetR-expressing cell lines for tetracycline-regulated gene expression. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7, 2
9. Jiang, L., Rampalli, S., George, D., Press, C., Bremer, E.G., O’Gorman M.R.G., ve Bohn, M.C. (2004). Tight regulation from a single tet-off rAAV vector as demonstrated by flow cytometry and quantitative, real-time PCR. *Gene Therapy* 11, 1057–1067
10. Invitrogen. (2006). A Tetracycline Regulated Expression System for Mammalian Cells.
11. Blochlinger, K., Diggelmann, H. (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol Cell Biol.* 4(12), 2929–2931

12. Karreman, C. (1998). A new set of positive/negative selectable markers for mammalian cells. *Gene*, 218(1-2), 57-61
13. Izumi, M., Miyazawa, H., Kamakura, T., Yamaguchi, I., Endo, T., Hanaoka, F. (1991). Blasticidin S-resistance gene (bsr): a novel selectable marker for mammalian cells. *Exp Cell Res*, 204(2), 388
14. Baron, M., Reynes, J.P., Stassi, D., Tiraby, G. (1992). A selectable bifunctional  $\beta$ -galactosidase: phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene*, 114, 239-243
15. Tate, C.G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y., Williams, D.C. (2003). Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1610(1), 141-153
16. Rossi, F., Blau, H.M. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol*, 9, 451-456.
17. Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Mayumi, T., Hayakawa, T. (2003). Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene*, 309(2), 145-151
18. Shafey, D., Cote, P. D., and Kothary, R. (2005). Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Exp Cell Res*, 311(1), 49-61
19. Wilson, M.O., Scougall, K.T., Ratanamart, J., McIntyre, E.A., Shaw, J.A.M. (2005). Tetracycline-regulated secretion of human (pro)insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 391-403
20. Liu, J., Burkin, D.J., Kaufman, S.J. (2008). Increasing  $\alpha_7\beta_1$ -integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, 627-640
21. Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H. (2007). On the use of the T-REx tetracycline-inducible gene expression system in vivo. *Biotechnol Bioeng*, 98(3)
22. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 5(12), 3610–3616

23. Lindner, P. ve diğeri (1997). Specific detection of His-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *BioTechniques*, 22(1), 140-149