

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III GENİNİN
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

DERYA OKUYAN ALTAN

BALIKESİR, OCAK - 2018

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III GENİNİN
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

DERYA OKUYAN ALTAN

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Prof. Dr. Berrin TUNCA

Prof. Dr. Olga SAK

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

BALIKESİR, OCAK - 2018

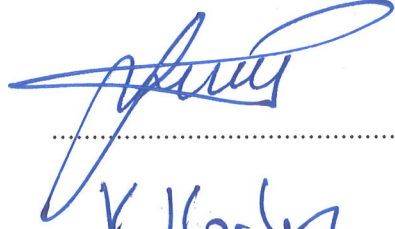
KABUL VE ONAY SAYFASI

DERYA OKUYAN ALTAN tarafından hazırlanan “**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17.01.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

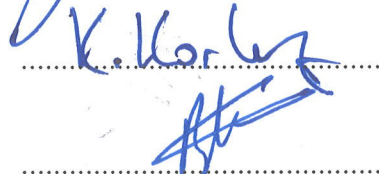
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye
Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ



Üye
Prof. Dr. Berrin TUNCA



Üye
Prof. Dr. Olga SAK



Üye
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma tarafından
2016/104 ve 2017/204 nolu projeler ile desteklenmiştir.**

ÖZET

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU
DOKTORA TEZİ
DERYA OKUYAN ALTAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.FERAY KÖÇKAR)**

BALIKESİR, OCAK - 2018

Karbonik anhidraz ailesinin üyesi olan, İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) geni, ailenin diğer üyelerinden farklı olarak düşük hidratize yapma, sülfanamid inhibitörlerine direnç gösterme ve esteraz aktivitesine sahiptir. Literatürde hakkında çok az bilgi bulunan CAIII geni başta iskelet kasında olmak üzere rahim, mesane, prostat, akciğer, karaciğer, kalp kası, mide ve bağırsakta ifade olan bir genidir.

Bu tez kapsamında CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmıştır. Biyoinformatik analizler kapsamında insan, fare ve sıçanın promotor bölgeleri kıyaslanmıştır. İnsan CAIII promotoruna ait dizi klonlanarak gen bankasına MF374499 erişim koduyla kayıt ettirilmiştir. CAIII promotoruna ait 4 farklı kısaltılarak yapılan delesyon promotor konstrağı (P1 -941/+86, P2 -699/+86, P3 -236/+86 ve P4 -108/+86) oluşturulmuştur. Geçici transfeksiyon deneylerinde, insan osteosarkom hücre modelinde (Saos-2) hücrelerinde tüm promotor parçalarının aktif olduğu ve en yüksek aktiviteyi P4 -108/+86 promotor parçasının gösterdiği belirlenmiştir. Biyoinformatik analizler CAIII promotorunda olası SP1, C/EBP ve USF bağlanma bölgelerini taşıdığını göstermiştir. Promotor parçaları SP1, C/EBP α ve USF1 transkripsiyon faktörleri ile ektopik ekspresyonu CAIII transkripsiyonel seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, SP1, C/EBP ve USF transkripsiyon faktörlerinin ektopik ifadesi, CAIII mRNA ve protein düzeyinde arttığı da qRT-PCR ve western blot ile gösterilmiştir. EMSA deneyleri ve yarışma deneyleri ile SP1, C/EBP α ve USF1, promotorda farklı bölgelere bağlandığı belirlenmiştir.

Prostat kanser modelinde kimyasal indüklenmiş hipoksik modelde, CAIII'ün ekspresyon seviyesini mRNA ve protein seviyenin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca -941/ +86 ve -699/ +86 promotorlarında transkripsiyonel aktivitede artış tespit edilmiştir. Bu artışın ise CAIII -268/-252 Bölgesinde bulunan HIF-1'in bağlandığı HRE bölgesinin sorumlu olabileceği belirlenmiştir.

Son olarak ektopik CAIII cDNA ekspresyonunun prostat kanser hücrelerindeki etkisi belirlenmiştir. PC3 hücrelerinde ektopik olarak verilen CAIII cDNA'sının hücrelerin apoptotik, metastatik ve proliferatif karakterine etkileri belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz, CA, CAIII, SP1, C/EBP α , USF1.

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE III GENE

PH.D THESIS

DERYA OKUYAN ALTAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JANUARY 2018

The Human Carbonic Anhydrase III gene that is a member of the carbonic anhydrase family has low hydratase activity, esterase activity and, resistance to sulphanamide inhibitors, unlike other members of the family. CAIII that has very little information in the literature is widely expressed in the uterus, bladder, prostate, lung, liver, heart, stomach and intestine, mainly in the skeleton.

In this thesis, the transcriptional regulation of CAIII has been elucidated. Within the context of bioinformatics analysis, the promoter regions of human, mouse and rat were compared. The sequence of the human CAIII promoter was cloned and registered with the accession code MF374499 to the gene bank. Four different truncated deletion promoter constructs (P1 -941 / + 86, P2 -699 / +86, P3 -236/ +86 and P4 -108 / +86) of the CAIII were generated. In transient transfection experiments, it was determined that all promoter fragments in the human osteosarcoma cell model (Saos-2) cells were active and that the highest activity was exhibited by the P4 -108 /+86 promoter fragment. Bioinformatics assays have shown that they carry possible numerous SP1, C/EBP and USF binding sites in the CAIII promoter. Ectopic expression with SP1, C/EBP α and USF1 transcription factors led to increase the transcriptional level of CAIII. Similarly, ectopic expression of SP1, C/EBP and USF transcription factors increased in CAIII mRNA and protein levels shown by qRT-PCR and western blot. EMSA and Competition experiments revealed that SP1, C/EBP α and USF1 bind different regions of the promoter.

In the chemically induced hypoxic model in the prostate cancer model, mRNA and protein level of CAIII was increased. The transcriptional activity of promoter -941 / +86 and -699 / +86 regions were also increased in the case of hypoxia. The increase of transcriptional activity of CAIII promoter was resulted from HRE region that is a target of HIF-1 transcription factors CAIII -268 / -252 promoter.

Finally, the effect of ectopic CAIII cDNA expression in prostate cancer cells was determined. The effects of CAIII cDNA, ectopically given in PC3 cells, on the apoptotic and proliferative characteristics of the cells have been determined.

KEYWORDS: Carbonic Anhydrase, CA, CAIII, SP1, C/EBP α , USF1.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	x
SEMBOL LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYON.....	1
1.1.1 Transkripsiyon Faktörleri ve Aktivasyon Mekanizması.....	4
1.1.1.1 Transkripsiyon Aktivasyon Mekanizması.....	6
1.1.1.2 Transkripsiyonun Baskılanma Mekanizması.....	7
1.1.2 Transkripsiyon Faktörlerinin Regülasyonu.....	8
1.2 Bazı Transkripsiyon Faktörleri.....	10
1.2.1 CCAAT/Enhanser Bağlayıcı Protein Ailesi (C/EBP).....	10
1.2.2 Spesifik Protein (SP) Ailesi.....	15
1.2.3 Upstream Stimüle Edici Faktör (USF) Ailesi.....	18
1.2.4 Hipoksiya İndüklenebilir Faktör (HIF).....	21
1.3 KARBONİK ANHİDRAZ (CA).....	25
1.3.1 Karbonik Anhidraz III (CAIII).....	29
1.3.1.1 İnsan CAIII Geninin Ekspresyonu.....	30
1.3.1.2 İnsan CAIII Geninin görevleri.....	30
1.3.1.3 Karbonik Anhidraz III (CAIII) ve Kanser.....	35
1.3.1.4 Karbonik Anhidraz III (CAIII) Geninin Transkripsiyonel regülasyonu.....	36
2. TEZİN AMACI	37
3. MATERYAL VE METOD	40
3.1 Materyal.....	40
3.1.1 Makine ve Teçhizat.....	40
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	41
3.2 Metod.....	46
3.2.1 Ortam sterilizasyonu ve malzeme temizliği.....	46
3.2.2 Bakteri Tabanlı Teknikler.....	47
3.2.2.1 Bakteriyel Hücre Soyları ve Kültür Ortamları.....	47
3.2.2.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler.....	47
3.2.2.3 Bakteriyel Besiyerinin Hazırlanması.....	51
3.2.2.4 Kompetant Hücre Hazırlanması.....	51
3.2.2.5 Ligasyon.....	52
3.2.2.6 Transformasyon.....	52
3.2.2.7 Küçük Ölçekli (Midi Prep) Plazmit İzolasyonu.....	52
3.2.2.8 Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit İzolasyonu.....	53
3.2.3 Hücre Kültür Teknikleri.....	54
3.2.3.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	54
3.2.3.2 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler.....	57
3.2.3.3 Sitotoksisite Deneyleri (MTT).....	59

3.2.4	RNA Düzeyin ki Çalışmalar	60
3.2.4.1	RNA İzolasyonu	61
3.2.4.2	Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	61
3.2.4.3	RNA Jel elektroforezi	62
3.2.4.4	Revers Transkriptaz (RT)-Reaksiyonu	63
3.2.5	DNA Tabanlı Teknikler	64
3.2.5.1	Primer Tasarımı	64
3.2.5.2	DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	65
3.2.5.3	Semi Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	65
3.2.5.4	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi (Real-Time)	65
3.2.5.5	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	67
3.2.5.6	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	67
3.2.5.7	İnsan CAIII Geninin Seçilen Vektör Sistemine Klonlanması.....	68
3.2.5.8	Restriksiyon kesim stratejisi	68
3.2.6	Protein Tabanlı Teknikler	69
3.2.6.1	Western Blot Tekniği ile Protein İfadesinin Belirlenmesi	69
3.2.6.2	İmmunflorasan Metodu ile İnsan CAIII Proteininin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi	74
3.2.7	DNA-Protein Etkileşimine Dayalı Teknikler	75
3.2.7.1	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Tekniği	75
3.2.8	İstatistiksel Değerlendirmeler ve Verilerin Yorumlanması	81
3.2.9	Biyoinformatik Analiz	81
3.2.10	Dizi Analizi ile Doğrulama	82
4.	BULGULAR	83
4.1	İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Promotor Bölgesinin Klonlanması ve Promotor Bölgesinin Analizi.....	83
4.1.1	İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Geninin Biyoinformatik Analizi	83
4.1.1.1	Karbonik Anhidraz III Promotorunun İnsan, Fare ve Sıçandaki Karşılaştırılması	83
4.1.1.2	İnsan CAIII Promotorunun CpG Adası Analizi.....	86
4.1.1.3	İnsan CAIII Promotorunun İkincil Yapı Analizi	87
4.1.2	İnsan CAIII Promotorunun Lusiferaz Haberci Vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu	90
4.1.2.1	Lusiferaz/SEAP Optimizasyonları	101
4.1.2.2	Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi	103
4.1.3	Bazı Transkripsiyon Faktörlerinin İnsan CAIII Geninin Transkripsiyonel Regülasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	105
4.1.3.1	SP1 Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi	106
4.1.3.2	C/EBP α Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi.....	112
4.1.3.3	USF Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi	119
4.1.4	DNA-Protein Etkileşiminin “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) Tekniği ile CAIII Dizisindeki olası Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi	126
4.1.5.1	İnsan CAIII Genine Ait Yönlendirilmiş Mutageniz Primer Dizaynı	135

4.1.5.2	DNA-Protein Etkileşiminin EMSA “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) Tekniği ile CAIII Dizisindeki olası SP1 Bağlanma Bölgesinin Gösterilmesi.....	136
4.2.1	İnsan CAIII Geninin Hipoksik ve Normoksik Koşullarda mRNA Düzeyindeki İfadesinin Belirlenmesi.....	138
4.2.2	İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin Belirlenmesi.....	140
4.2.2.1	İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin İmmünfloresan (IFC) Tekniği Kullanılarak Belirlenmesi.....	140
4.2.2.2	İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin Western Blot Tekniği Kullanılarak Belirlenmesi.....	143
4.3	İnsan CAIII Prostat Kanseri Modelinde Aşırı İfadesinin Hücresel ve Moleküler Analizi.....	149
4.3.1	Primer Dizaynı.....	149
4.3.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	149
4.3.3	İnsan CAIII cDNA’sının Klonlanması.....	152
4.3.4	İnsan CAIII cDNA’sının Seçilen Hücrelere Geçici Transfeksiyonu.....	153
4.3.1	İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) cDNA’sının aşırı ifadesinin Hücre Çoğalmasına Etkisi.....	154
4.3.2	İnsan CAIII cDNA’sının Apoptotik Sürece Etkisi.....	155
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	159
6.	KAYNAKLAR.....	171
7.	EKLER.....	195

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Tipik bir gen düzenleyici bölgenin şeması (Venter, 2001).	2
Şekil 1.2 : Ökaryotik transkripsiyonel mekanizması (Malik, ve Roeder, 2005).	3
Şekil 1.3 : (A) Maya GCN4 transkripsitranskripsiyon faktörünün yapısı, (B) Memeli Glukokortikoid Reseptörünün yapısı (Latchman, 1997).	4
Şekil 1.4 : Aktivatör, “Activator binding site” (ABS) bölgesine bağlanır ve RNA polimerazın bağlanabilmesi için bazal transkripsiyon kompleksinin oluşmasını uyarır. Şekil Latchman, 1997 Kaynaktan adapte edilmiştir (Latchman, 1997).	7
Şekil 1.5 : Transkripsiyon faktörlerinin gen ifadesini baskılayabileceği potansiyel mekanizmalar (Latchman, 1996b).	8
Şekil 1.6 : Transkripsiyon faktörlerinin sentezi ile dokuya spesifik gen regülasyonu (a), dokuya spesifik aktivasyon (b) Şekil Wood ve arkadaşlarının yaptığı makaleden adapte edilmiştir. (Wood vd., 1997).	10
Şekil 1.7 : C/EBP α ve C/EBP β 'daki port-translasyonel modifikasyon bölgeleri (Landschulz, Johnson, MacKnight., 1998; Nerlov, Ziff, 1995; Kowenz-Leutz, Leutz, 1999; Pedersen, Kowenz-Leutz, Leutz, Nerlov, 2001; Ross vd., 2004; Wang, Iakova, Wilde, Awad, Timchenko, 2004; Ross, Erickson, Hemati, MacDougald, 1999; Behre vd., 2002; Cesena, Cardinaux, Kwok, Schwartz, 2007).	11
Şekil 1.8 : C/EBP bağlanma bölgesi (Ramji, 2002).	12
Şekil 1.9 : C/EBP proteinleri yapısı. (Ramji, 2002).	13
Şekil 1.10 : SP Ailesinin domain yapıları. Şekilde AD: Aktivatör Domaini, ID: İnhibitör Domaini, Kırmızı alanlar Glutamince rezidülerini, Sarı alanlar Serin/threoinin rezidülerini, Siyah alanlar çinko parmak yapılarını göstermektedir. (Kingsley ve Winoto, 1992).	16
Şekil 1.11 : USF-1 ve USF-2'nin gen dizilimleri. Sarı bölgeler, Basik Domainleri, kırmızı bölgeler Heliks-Dönüş-Heliks motiflerini, siyah olan bölgelerLösın Femuar domainleri göstermektedir. (Liu, Whetstine, Payton, Ge, Flatley, ve Matherly, 2004).	18
Şekil 1.12 : USF Proteinin 3 boyutlu yapısı (Atchley ve Fitch, 1997).	19
Şekil 1.13 : HIF-1 α ve HIF-1 β genlerinin yapısı. (Pugh vd., 1997).	22
Şekil 1.14 : HIF-1'in başlıca rolleri; VEGF yoluyla anjiyojenezin, sodyum hidrojen pompaları vasıtasıyla pH'i ve glikolitik enzimler yoluyla glikoliz'i düzenler (Ziello vd., 2007).	23
Şekil 1.15 : Oksijen bağımlı ve bağımsız yolaklar (Kallio vd., 1997).	25
Şekil 1.16 : Karbonik Anhidrazların hücresel dağılımları (Supuran, C.T., Capasso, C., 2014).	26
Şekil 2.1 : Doktora tez amacını açıklayan diyagram.	39
Şekil 3.1 : pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.	48
Şekil 3.2 : Klonlamada ve tranfeksiyonda kullanılan pMetLuc Reporter vektörünün şematik gösterimi.	49

Şekil 3.3 : Transfeksiyonda kontrol amaçlı kullanılan pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi.	49
Şekil 3.4 : Transfeksiyonda kontrol normalizatör amaçlı kullanılan pSEAP2-kontrol vector sisteminin şematik gösterimi.	50
Şekil 3.5 : Klonlamada kullanılan pcDNA3.3 Topo Gateway vektörün şematik gösterimi.	50
Şekil 3.6 : Hemositometre.	56
Şekil 3.7 : MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.....	60
Şekil 4.1 : Karbonik Anhidraz III (CAIII)'ün 'Multiple Sequence Aligment' analizi ve korunmuş transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi	85
Şekil 4.2 : İnsan CA3 Promotorunun CpG Analiz Sonuçları.	87
Şekil 4.3 : İnsan CAIII Promotorunun Sekonder yapısı-I.	88
Şekil 4.4 : İnsan CAIII Promotorunun sekonder yapısı-II.....	89
Şekil 4.5 : -941/ +86 CAIII Promotor bölgesinin klonlanması	91
Şekil 4.6 : -941/ +86 CAIII Promotoru için rekombinant kloni kontrol planı.....	91
Şekil 4.7 : XhoI ve HindIII enzimleri ile kesilerek hazırlanan pGEM-T Easy/CAIII ve pMetLuc Vektörleri	92
Şekil 4.8 : pMetLuc vektörüne klonlanan -939/+86 CAIII promotorunun EcoRI enzimi ile yapılan kontrol kesim sonuçlarının jel görüntüsü	92
Şekil 4.9 : -699/ +86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı	93
Şekil 4.10 : -699/ +86 CAIII promotor klonlama kontrol kesim planı.....	94
Şekil 4.11 : CAIII -699/+86 konstrağı için -941/+86 CAIII+pGeMT-Easy'ın BamHI ve SacII ile, pMetLuc Vektörünün ise SacII ve BglII ile kesimi	94
Şekil 4.12 : İnsan CAIII -699/+86 konstrağı için rekombinant koloni kontrol kesim sonucu.....	95
Şekil 4.13 : -236/ +86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı	96
Şekil 4.14 : -236/ +86 CAIII Promotor bölgesinin kontrol kesim planı.....	96
Şekil 4.15 : CAIII -236/+86 ve pMetLuc vektörünün SacII ve PstI ile kesilmesi	97
Şekil 4.16 : CAIII -236/+86 konstrağın koloni taraması	97
Şekil 4.17 : -108/+86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı	98
Şekil 4.18 : -108/ +86 CAIII promotor bölgesi klonlama kontrol planı.....	98
Şekil 4.19 : -941/+86 CAIII + pGEMT-Easy ve vektörü SacII ve EcoRI enzimleri ile kesimi	99
Şekil 4.20 : CAIII -108/+86 + pMetLuc koloni taramasında kontrol kesimi (SacII ve EcoRI).....	99
Şekil 4.21 : Promotor Parçalarının temsili Şekli P1 (Promotor parçası 1): 1025 bç (-939/+86), P2 (Promotor parçası 2): 785 bç (-699/+86), P3 (Promotor parçası 3): 322 bç (-236/+86), P4 (Promotor parçası 4): 194 bç (-108/+86).	100
Şekil 4.22 : Saos-2 hücre hattında Lusiferaz/SEAP aktivitesi.....	102
Şekil 4.23 : Transfeksiyon deneyleri için -941/+86 İnsan CAIII Promotor Parçalarının Saos-2 hücre hattında miktar optimizasyonu.....	103
Şekil 4.24 : HT29 Hücrelerinde CAIII Promotor Parçalarının Transfeksiyonu Etkinliği.	104
Şekil 4.25 : Saos-2 Hücrelerinde CAIII Promotor Parçalarının transfeksiyonu Etkinliği.....	105

Şekil 4.26 :Saos2 Hücre hattında CAIII promotor parçaları ile SP1 Transkripsiyon faktörünün Ko-Transfeksiyon.....	107
Şekil 4.27 :SP1 ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve SP1 ekspresyon seviyesindeki değişim.....	109
Şekil 4.28 : SP1 ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve SP1ekspresyon seviyesindeki değişim.....	110
Şekil 4.29 :İnsan CAIII ve β -Aktin'in SP1 ile transfekte edilmiş Saos-2 Protein ekstraktlarındaki ifadesi.....	111
Şekil 4.30 :SP1 Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde İnsan CAIII Protein seviyesi.	112
Şekil 4.31 :Saos-2 Hücre hattında C/EBP α Transkripsiyon faktörünün İnsan CAIII promotor parçalarına etkisi.	114
Şekil 4.32 : C/EBP α ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve SP1 mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim.	116
Şekil 4.33 : C/EBP α ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve C/EBP ekspresyon seviyesindeki değişim.	117
Şekil 4.34 :C/EBP α ile transfekte edilmiş Saos2 Protein ekstraktlarındaki İnsan CAIII ve β -Actin proteinin ifadesi.	118
Şekil 4.35 :C/EBP α Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde CAIII protein seviyesi.	119
Şekil 4.36 :Saos-2 Hücre hattında USF1 Transkripsiyon faktörünün İnsan CAIII promotor parçalarına etkisi.	121
Şekil 4.37 :USF1 ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve USF1 mRNA seviyesindeki değişim.	123
Şekil 4.38 : USF1 ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve USF1 mRNA seviyesindeki değişim.	124
Şekil 4.39 :USF1 ile transfekte edilmiş Saos2 Protein ekstraktlarındaki İnsan CAIII ve B-Actin proteinin ifadesi.....	125
Şekil 4.40 :USF1 Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde CAIII protein seviyesi.	126
Şekil 4.41 : +28/+62 CAIII Promotor bölgesine ait EMSAsonucu.....	129
Şekil 4.42 : +28/ +62 CAIII Promotor bölgesine ait EMSAsonucu (2. Tekrar).....	130
Şekil 4.43 : Farklı Nükleer ekstraktlar kullanılarak yapılan -158/-134 CAIII Promotor bölgesine ait EMSAsonucu.....	131
Şekil 4.44 : -158/-134 CAIII Promotor Bölgesine ait EMSA sonucu.	132
Şekil 4.45 : Farklı Nükleer ekstraktlar kullanılarak yapılan -181/-153 CAIII Promotor bölgesine ait EMSA sonucu.	133
Şekil 4.46 : -181/-153 CAIII Promotor Bölgesine ait EMSA sonucu.	134
Şekil 4.47 : Mutagenez deneyleri için temel niteliğinde olan -181/-153 ve -158/-134'lik bölgelerin EMSA sonuçları.....	135
Şekil 4.48 : Hedef mutagenez bölgesine ait EMSA sonucu.....	137
Şekil 4.49 : CAIII'ün mRNA düzeyinde farklı hücre hatlarında hipoksik ve normoksik şartlardaki ekspresyonu	139
Şekil 4.50 : İnsan CAIII Proteinin Hipoksik ve normoksik şartlarda PC3 hücre hatlarındaki ifadesi.	142
Şekil 4.51 : İnsan CAIII Proteinin Hipoksik ve normoksik şartlarda DU145 hücre hatlarındaki ifadesi.	142
Şekil 4.52 : İnsan CAIII Proteinin Hipoksik ve normoksik şartlarda Saos-2 hücre hatlarındaki ifadesi.	143

Şekil 4.53 : CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin PC3 Hipoksia ve Normoksia protein ekstraktlarındaki sonucu.....	145
Şekil 4.54 : İnsan CAIII Proteininin PC3 Hücre hattında normoksik ve hipoksik şartlarda ifadesi.....	145
Şekil 4.55 : Saos-2 hücre hattında CAIII promotor konstraklarının Hipoksik ve Normoksik şartlardaki etkinliği.....	147
Şekil 4.56 : PC3 hücre hattında CAIII promotor konstraklarının Hipoksik ve Normoksik şartlardaki etkinliği.....	148
Şekil 4.57 : İnsan CAIII cDNA bölgesinin çoğaltılması için uygulanan PCR görüntü.....	151
Şekil 4.58 : pcDNA 3.3 TOPO/CAIII cDNA ait plazmitinin SacI ve PstI restriksiyon enzimleri ile yapılan kontrol kesimi	152
Şekil 4.59 : Hipoksik ve Normoksik şartlarda CAIII cDNA'sı ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerinde CAIII mRNA ifadesi.	154
Şekil 4.60 : Hipoksik ve Normoksik şartlarda CAIII cDNA ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerinde MTT etkinliği.	155
Şekil 4.61 : Bcl-XL ve Bcl-2 kat mRNA seviyeleri	156
Şekil 4.62 : Bax, Bad ve Bak kat mRNA seviyeleri	157
Şekil 4.63 : p27, Siklin D1 ve TS kat mRNA seviyeleri	158
Şekil A.7.1 : 1kb DNA Marker (Fermentas)	195
Şekil A.7.2 : Page Ruler Protein Marker 26620/Fermentas	195
Şekil A.7.3 : İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Poliklonal antikorunun görüntüsü (Pierce Antibody)	196

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : Transkripsiyon Faktörlerinin DNA bağlanma domainlerine göre sınıflandırılmaları (Carey, 2000; Latchman, 1997).....	5
Tablo 1.2 : İnsan CAIII geninin dokulardaki dağılımı (Shiels, A., vd., 1983).....	33
Tablo 3.1 : Kullanılan araç-gereçler ve Markaları.	40
Tablo 3.2 : Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar.	41
Tablo 3.3 : Klonlama ya da Transfeksiyon aşamasında kullanılan Vektörler ve Temin edildikleri firmaların adları.	43
Tablo 3.4 : Transformasyon aşamasında kullanılan Bakteri Soyları.	43
Tablo 3.5 : Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitler ve kimyasallar.	43
Tablo 3.6 : Kullanılan hücre hatları ve Temin edilen kaynakları.....	44
Tablo 3.7 : RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları.....	44
Tablo 3.8 : Protein çalışmalarında kullanılan Kimyasallar ve Temin Edildikleri Firmaların Adları.....	45
Tablo 3.9 : Kullanılan Antikorların İsimleri ve Temin Edildikleri Firmaların Adları.....	46
Tablo 3.10 : Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan kimyasal solüsyon içerikleri ve hazırlanışı.....	58
Tablo 3.11: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.	60
Tablo 3.12 : RNA jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.	63
Tablo 3.13 : Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde birinci Kullanılan Bileşenler ve Programı.	63
Tablo 3.14 : Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde ikinci basamakta kullanılan bileşenler.	64
Tablo 3.15 : Real-Time PCR Bileşenleri.	66
Tablo 3.16 : Real-Time PCR Koşulları.	66
Tablo 3.17 : Agaroz Jel Solüsyonları.	67
Tablo 3.18 : Kesim planı.	69
Tablo 3.19 : Protein seviyesi belirleme deneylerinde ki tamponların hazırlanışı.	70
Tablo 3.20: SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı.	72
Tablo 3.21 : Nükleer Ekstrakt eldesinde kullanılan çözeltiler.	76
Tablo 3.22 : Etiketleme işleminde kullanılacak enzim hazırlığı.	77
Tablo 3.23 : Etiketleme Reaksiyonu.	78
Tablo 3.24 : Bağlanma Reaksiyonu.	79
Tablo 3.25 : EMSA Jelinin Bileşenleri.	80
Tablo 3.26 : Dizileme aşamasında kullanılan primerler ve primerlere ait diziler.....	82
Tablo 4.1 : İnsan, fare ve sıçan promotorlarının benzerlik yüzdeleri (%).	84
Tablo 4.2 : İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Protmotoruna bağlanan olası SP1 Bölgeleri.	106
Tablo 4.3 : İnsan CAIII Protmotoruna bağlanan olası C/EBP α Bölgeleri.	113
Tablo 4.4 : İnsan CAIII Protmotoruna bağlanan olası USF1 Bölgeleri.	120
Tablo 4.5 : EMSA deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri.....	127

Tablo 4.6 : İnsan CAIII Genine Ait Yönlendirilmiş Mutagenez Primerleri.....	136
Tablo 4.7 : CAIII cDNA dizisine ait kullanılan forward ve reverse primerler.....	149
Tablo 4.8 : CAIII cDNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyonu	150
Tablo 4.9 : CAIII cDNA'sını çoğaltmak için kullanılan PCR döngüsü.....	151

SEMBOL LİSTESİ

CA	: Carbonic Anhydrase
CAIII	: Carbonic Anydrase III
SP1	: Specificity Protein 1
C/EBP	: CCAAT/Enhancer Binding Protein
USF-1	: Upstream Transcription Factor-I
USF-II	: Upstream Transcription Factor-II
HIF-1	: Hypoxia Inducible Factor-I
TFIIB	: Transcription Factor IIB
TFIID	: Transcription Factor IID
NfKβ	: Nuclear Factor Kappa B
HSP90	: Heat Shock Protein 90
STAT-3	: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
IL-6	: Interleukin 6
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
MYOD	: Myogenic Differentiation
DBS	: DNA Binding Site
TAD	: Trans-activating Domain
bZIP	: Basic Leucine Zipper Protein
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
Inr	: Initiator element
FAK	: Focal Adhesion Kinase
E.coli	: Escherichia coli
FCS	: Fetal Calf Serum
HEPES	: Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
CaCl₂	: Calcium chloride
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
PBS	: Phosphate-buffered saline
APS	: Ammonium Persulfate
EMSA	: Electromobility shift assay
SEAP	: Secreted embryonic alkaline phosphatase
bç	: Baz çifti
G	: Guanin
T	: Timin
C	: Sitozin
A	: Adenin
g	: Gram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca duruşuyla, kişiliğiyle, bilimsel zekâsıyla ve en çokta güzel yüreğiyle beni kendine hayran bırakan değerli danışman hocam Prof. Dr. Feray Köçkar'a,

Her tez izlememe büyük katkılarda bulunan, ufkumu açan, tezimde çözülmez noktalarda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz'a,

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen çok sevgili hocalarım Yrd. Doç Dr. Sümeyye Aydoğan Türkoğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım'a,

Doktora sürecim boyunca birçok özel an biriktirdiğim çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Arş. Gör. Nelin Hacıoğlu'na, Candan Akdır'a, Kübra Paspal'a, Ehed Aymaz'a ve Kamil Tok'a,

FK Lab'ın bana sunduğu belki de en büyük armağan olan, arkadaşlıktan öte çok can dostum, yol arkadaşım olan kıymetli kardeşlerim Dr. Tuğşen Aydemir'e, Uzm. Dr. Esra Tokay'a ve uzaklarda da olsa her daim ruhunu hissettiğim Gülinay Selçuk'a,

Her daim yoluma ışık olan babam Prof. Dr. Mustafa Cemal Okuyan'a, doğduğu ilk günden beri hayat enerjim olan kardeşim Batuhan Okuyan'a ve melek annem Rahime Okuyan'a ve kıymetli eşim Kaan Altan'a

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım...

Doktora tezimi ışığıyla yolumu her daim aydınlatan, hayatımın her anında en büyük destekçim olan biricik babam Prof. Dr. Mustafa Cemal Okuyan'a ithaf ediyorum...

Derya Okuyan Altan

1. GİRİŞ

1.1 TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYON

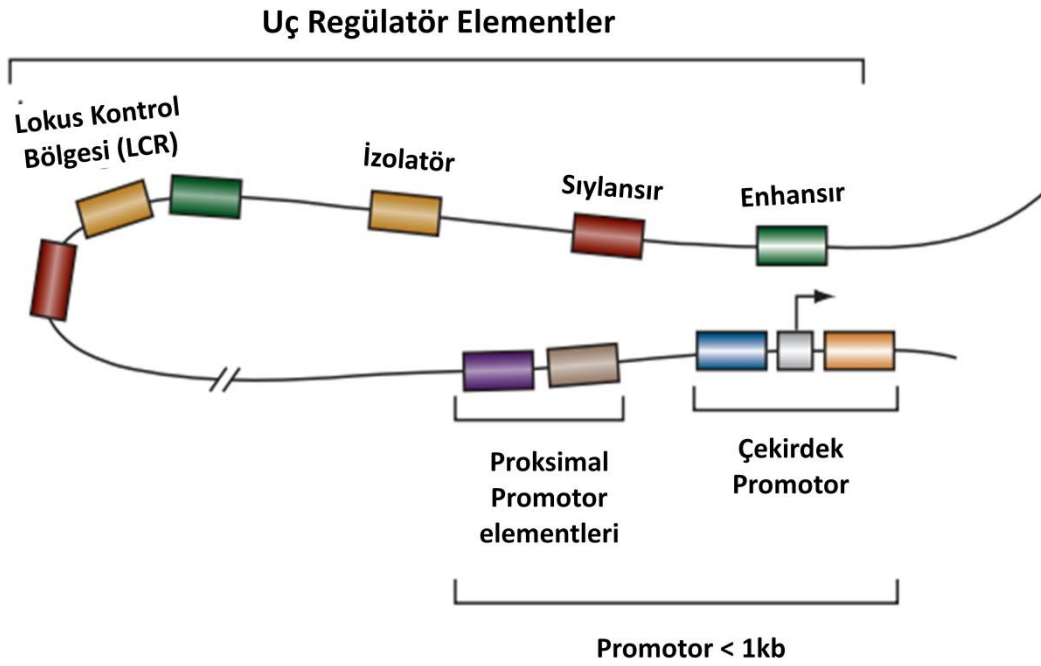
Gen transkripsiyonunun düzenlenmesi hem doku spesifik gen ekspresyonu hem de spesifik uyarılara yanıt olarak gen aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir noktadır. Bu nedenle transkripsiyon düzeyinde düzenleme, hangi genlerin birincil RNA transkriptine transkribe edileceğine karar vererek gerçekleşir. Transkripsiyondan sonra öncül RNA'dan intronların çıkartılması gibi, gen ekspresyonunun geri kalan evreleri otomatik olarak gerçekleşir ve istenen proteinin sentezlenmesi sağlanır (Adelman, ve Lis, 2012; Davidson vd.,1983; Latchman, 1995a; Taatjes, 2010).

Ökaryotik protein kodlayan genlerin ekspresyonu, transkripsiyon başlatma ve uzatma ve mRNA işleme, taşıma ve translasyon dâhil olmak üzere birçok aşamada düzenlenebilir. Yapılan çalışmalarla regülasyonun özellikle transkripsiyon başlatma seviyesinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Carey ve Smale, 2000; Conaway, Florens, Sato, Tomomori-Sato, ve Parmely, 2005).

Ökaryotlarda protein kodlayıcı genlerin transkripsiyonu RNA polimeraz II ile gerçekleştirilir. RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genler tipik olarak iki farklı cis-etkili transkripsiyon düzenleyici DNA elemanı ailesini ihtiva eder: (a) bir çekirdek promotör ve yakındaki (proksimal) düzenleyici elementlerden oluşan bir promotör ve (b) güçlendiriciler (enhansır), susturucular (sıylansır), izolatörler veya lokus kontrol bölgeleri (LCR) (Şekil 1.1). Bu cis-etkili transkripsiyonel düzenleyici elementler, transkripsiyonu arttırmak veya baskılamak için işlev gören trans-aktive DNA-bağlayıcı transkripsiyon faktörleri için tanıma bölgeleri içerir (Venter, Adams, Myers, Li ve Mural, 2001).

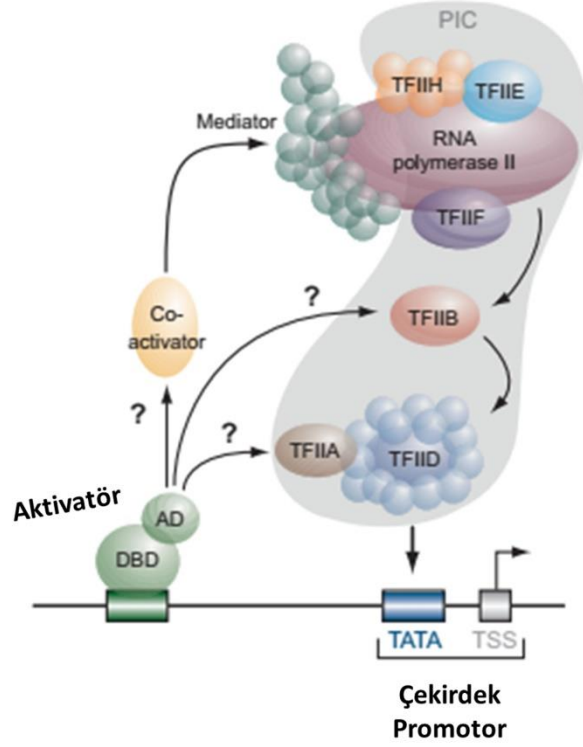
İnsan geni promoterlerinin yapısı oldukça karmaşık olabilir, tipik olarak çok sayıda transkripsiyon düzenleyici elementten oluşur. İnsan yaklaşık olarak 20.000-25.000 gen içerse de, muhtemelen 1850 DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörünü

kodlamaktadır. Promotorlardaki çoklu düzenleyici bölgelerin varlığı, regülasyonun kombinasyonlu kontrolünü sağlar ve ekspresyon çeşitliliği sağlar (Orphanides, Lagrange, ve Reinberg, 1996; Yeo, 2013). Belirtilen bu düzenleyici dizilere, “Transkripsiyon Faktörü” olarak bilinen spesifik proteinlere bağlanarak genin transkripsiyonel regülasyonunun olumlu veya olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Carey, 2000; Latchman, 1995b).



Şekil 1.1 : Tipik bir gen düzenleyici bölgenin şeması (Venter, 2001).

RNA polimeraz II tarafından kodlanan ökaryotik protein kodlayan genlerin transkripsiyonunda yer alan faktörler genel (veya bazik) transkripsiyon faktörleri (GTF'ler), promotöre özgü aktive edici proteinler (aktivatörler) ve koaktivatörler olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Şekil 1.2). Bu faktörler arasında RNA polimeraz II'nin kendisi ve TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH dâhil olmak üzere çeşitli yardımcı bileşenleri bulunmaktadır (Cantor, 2005; Malik, ve Roeder, 2005).

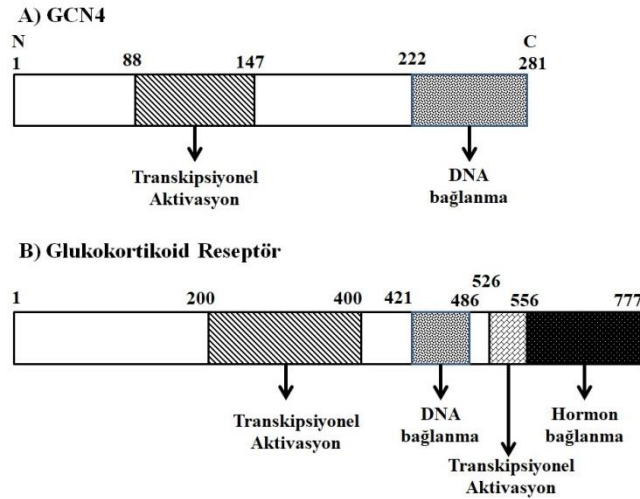


Şekil 1.2 : Ökaryotik transkripsiyonel mekanizması (Malik, ve Roeder, 2005).

GTFler, RNA polimeraz II'yi transkripsiyon başlangıç sitesine (TSS) yönelten bir transkripsiyon “Ön-başlangıç kompleksi (PIC)” oluşturmak için çekirdekte promotora yakın bir bölümde kompleks oluştururlar. PIC oluşumundaki ilk basamak, TATA-kutu bağlama proteini (TBP) ve sıkı bağlanmış TBP ilişkili faktörlerden (TAF'ler) oluşan birçoklu altbirim kompleksinin ve TFIID'nin bağlamasıdır. Sonrasında ise RNA polimeraz II uzatma kompleksi oluşur. PIC oluşumu yalnızca bir kez uyarılır ve RNA polimerleri II, promotörden ayırdıktan sonra, TFIID, TFIIE, TFIIH ve Mediatör'den oluşan bir kompleks çekirdek promotör üzerinde kalır; daha sonra transkripsiyonun yeniden başlatılması durumunda sadece RNA polimeraz II, TFIIF ve TFIIB'nin bu bölgeye bağlanması yeterlidir (Carey, 2000).

1.1.1 Transkripsiyon Faktörleri ve Aktivasyon Mekanizması

Transkripsiyon faktörleri, DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu olumlu ya da olumsuz etkileme yeteneğine sahiptirler. Transkripsiyon faktörlerinin görevlerini gerçekleştirmesi için, protein düzeyinde farklı domainler taşıması gerekir. Bu domainler *DNA bağlanma domaini*, *Aktivasyon domaini* ve *Baskılayıcı domain* olarak sıralanabilir. Ayrıca, transkripsiyon faktörünün özelliğine göre, dimerizasyon domaini ve nükleer hormon bağlanma domaini gibi ekstra domainler taşıyabilir. DNA Bağlanma mekanizması farklı transkripsiyon faktörleri ile yapılan birçok çalışmada Transkripsiyon Faktörlerinin DNA bağlanma domaini taşıdıkları ve bu sayede DNA üzerinde spesifik bağlanma gösterdikleri gösterilmiştir. Ayrıca transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon üzerinde uyarıcı ya da inhibe edici etki gösteren aktivasyon ya da represyon yapan bölgeler içerdiği de belirtilmektedir. (Şekil 1.3) (Cantor, 2005; Travers, 1993). Farklı transkripsiyon faktörlerine ait DNA bağlanma bölgeleri üzerinde yapılan çalışmalar gösteriyor ki; DNA'ya bağlanmayı etkileyen birkaç bölge olabilir (Harrison, 1993; Roeder 2005).



Şekil 1.3 : (A) Maya GCN4 transkripsiyon faktörünün yapısı, (B) Memeli Glukokortikoid Reseptörünün yapısı (Latchman, 1997).

Transkripsiyon faktörleri DNA bağlanma domainlerinin yapılarına göre sınıflandırılırlar. DNA bağlanma domainlerine göre sınıflandırma Tablo 1.1’de gösterilmektedir. Homeobox transkripsiyon faktörlerinde Helix-Dönüş-Helix motifi (Cameron, Chow, Berney, Chiu ve Yuan, 2005; Cantor, 2005; Kornberg, 1993), SP1 transkripsiyon faktör ailesi gibi gruplarda iki sistein- iki histidin çinko parmak motifi (Boyer, Lee, Cole, Johnstone ve Levine, 2005; Rhodes ve Klug, 1993), Steroid-tiroid hormon reseptör ailesi gibi gruplarda çoklu sistein çinko parmak motifi, Ets Domaini ve DNA bağlanma domaini bulunmaktadır.

Tablo 1.1 : Transkripsiyon Faktörlerinin DNA bağlanma domainlerine göre sınıflandırılmaları (Carey, 2000; Latchman, 1997).

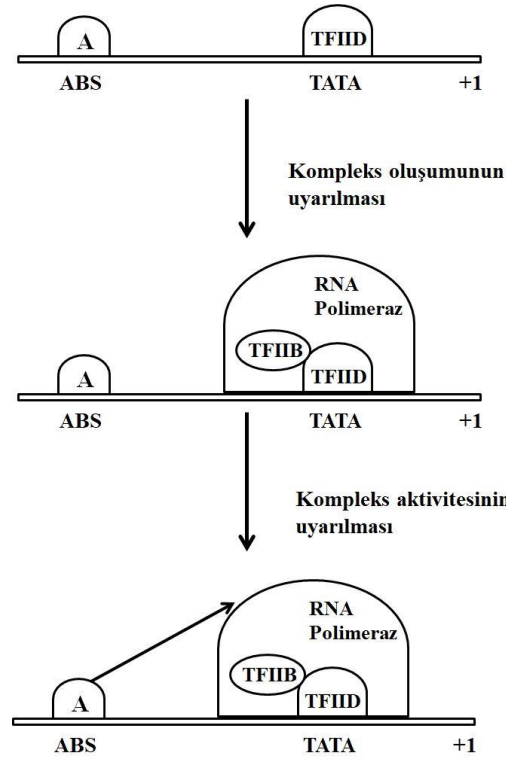
Domain	Domaini içeren Faktörler	Özellik
Homeobox	Birçok <i>Drosophila</i> homeotik genleri, diğer organizmalardaki ilgili genler	DNA bağlanma bölgesi Helix modelidir
POU	Oct-1, Oct-2, Pit-1, Unc-86	POU Domaini ve POU homeobox'dan oluşur
Paired box	Çeşitli <i>Drosophila</i> segmentasyon genleri, PAX faktörleri	PAX faktörlerinde genellikle bir homeobox ile birlikte bulunur.
Sistein- Histidin Çinko parmak	TFIIIA, Kruppel, SPI, vd.	Çok tekrarlı parmak motifi
Sistein- Sistein Çinko parmak	Steroid-tiroid hormone reseptör ailesi	Tek parmak motifleri
Basik Lösin Fermuar element	C/EBP, c-fos, c-jun, GCN4	Genellikle lösin fermuarı veya heliks-loop-helix dimerizasyon motifleri ile birlikte bulunur
Ets domain	Ets-1, Elk-1, SAP	Helix-turn-helix motifleri içerir

Bazik DNA domaini içeren transkripsiyon faktörleri, dimer oluşturduktan sonra DNA'ya bağlanabilirler. Dolayısıyla, Bazik bağlanma domaini içeren faktörler, içerdikleri dimerizasyon motifine göre daha alt gruplara ayrılırlar. Kageyama ve diğerleri tarafından yazılan makalede araştırılan transkripsiyon faktörleri gibi faktörlerden bazıları, dimerizasyona aracılık eden helezon-döngü-helezon motifi içerirler (Kageyama, 1997). Buna karşılık, Sassone-Corsi tarafından tartışılan CREB faktörü gibi diğer basit DNA bağlanma domaini içeren faktörler, lösin rezidüsü içeren lösin fermuar motifi ile dimerize edilir (Littlewood ve Evan, 1995; Yeo, 2013).

1.1.1.1 Transkripsiyon Aktivasyon Mekanizması

Şekil 1.1'de gösterildiği gibi, birçok transkripsiyon faktörü DNA bağlama domainine ek olarak, transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli spesifik bölgeleri içerir. Bu bölgeler, transkripsiyon faktörünün uzak yerleşimli bir DNA bağlama alanına bağlandığında bile, transkripsiyonu uyarabildikleri gösterilmiştir. Bu bölgelerde asidik amino asitlerce, glutamin rezidülerince veya prolin rezidülerince zengin olan farklı aktivasyon alanı tanımlanmıştır (Green, 2005; Mitchell ve Tjian, 1989).

Aktivasyon domeinleri, bazal transkripsiyonel kompleks bileşenleri ile etkileşerek işlev görmektedir. RNA polimeraz II ve Transkripsiyon Faktör II B (TFIIB) ve Transkripsiyon Faktör II D (TFIID) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu bu kompleks gene ait promotörde toplanır ve transkripsiyonun başlamasını sağlar (Şekil 1.4) Aktivasyon domaini, direkt olarak kompleksin spesifik bileşenleri ile ya da indirekt olarak ko-aktivatör moleküllerle interaksiyon gösterir (Roeder, 1996; Nikolev ve Burley, 1997).



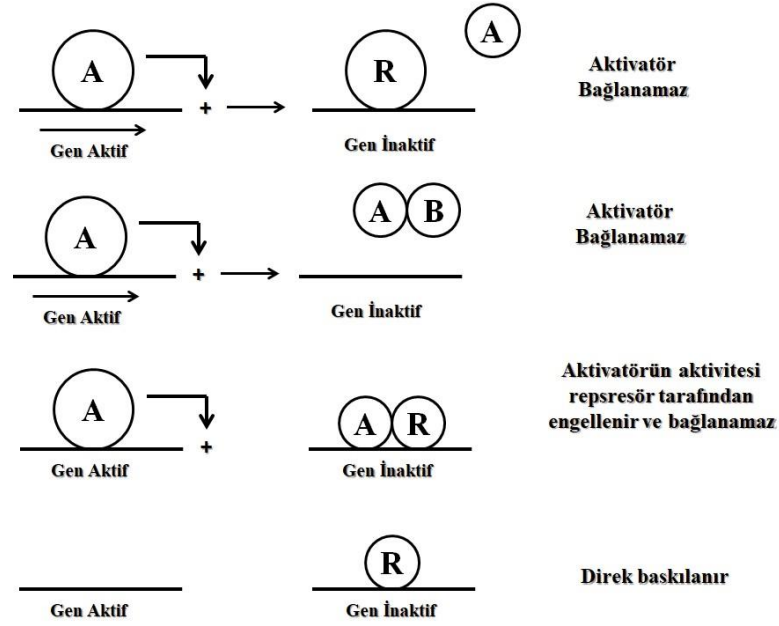
Şekil 1.4 : Aktivatör, “Activator binding site” (ABS) bölgesine bağlanır ve RNA polimerazın bağlanabilmesi için bazal transkripsiyon kompleksinin oluşmasını uyarır. Şekil Latchman, 1997 Kaynaktan adapte edilmiştir (Latchman, 1997).

1.1.1.2 Transkripsiyonun Baskılanma Mekanizması

Çoğu ökaryotik transkripsiyon faktörünün, transkripsiyonu uyarmakla görevli olduğu düşünülse de, bazıları spesifik genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek görev yaptığı belirlenmiştir. Bu inhibitör transkripsiyon faktörlerinin en az uyarıcı faktörler kadar önemli olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Boyer, 2005; Herschbach and Johnson, 1993; Hanna-Rose ve Hansen, 1996; Latchman, 1996b).

İnhibitör transkripsiyon faktörlerinin etki mekanizmaları genel olarak pozitif regüle edici faktörü inhibe ederek, transkripsiyonu durdurması şeklinde olmaktadır (Şekil 1.5). Bu mekanizmaları detaylandırırsak, DNA bağlama bölgesine negatif regülatörün bağlanması ve bu bölgeye pozitif regülatörün bağlanamamasına neden olur (Şekil 1.5-a). Bazı durumlarda pozitif regülatör ile negatif regülatörün protein-

proteini kompleksi oluşturur ve aktivatorün DNA'ya bağlanması engellenir (Şekil 1.5-b). Negatif regülatör, aktivatorün aktivasyon domaininin bloke eder (Şekil 1.5-c). En son olarak da Baskılayıcı transkripsiyon faktörlerinin bir sınıfı, bölgeye direk bağlanarak transkripsiyonu bloke etmektedir (Şekil 1.5-d) (Latchman, 1996b; Wilson, ve Roberts, 2011).



Şekil 1.5 : Transkripsiyon faktörlerinin gen ifadesini baskılayabileceği potansiyel mekanizmalar (Latchman, 1996b).

1.1.2 Transkripsiyon Faktörlerinin Regülasyonu

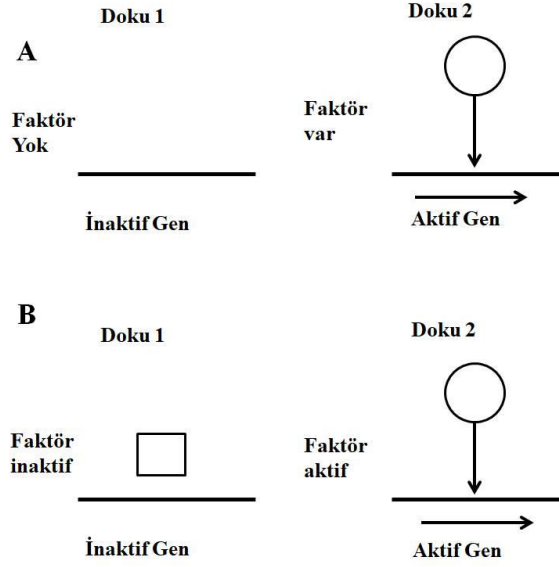
Transkripsiyon faktörleri iki aşamada regüle olurlar; Transkripsiyon faktörlerinin sentez regülasyonu ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin regülasyonu (Şekil 1.6). Birçok farklı durumda, bir transkripsiyon faktörü bir doku veya hücre tipinde sentezlenerek regüle olur, diğer dokularda regüle edilmez. En dramatik örneği sadece iskelet kas hücrelerinde sentezlenen MyoD transkripsiyon faktörüdür. Dolayısıyla MyoD faktörünün farklılaşmamış fibroblast hücrelerindeki aşırı ekspresyonu, kasa spesifik gen ekspresyonunu indükler ve bu faktör için kritik

role neden olan iskelet kası hücrelerinin oluşumunu sağlar (Carey, 2000; Edmondson ve Olson, 1993).

Sentezin regülasyonu hem hücre türünü veya doku spesifik gen ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri için hemde, spesifik genlerin indüksiyonunda önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörleri için de geçerlidir. Örneğin IL-6 sitokinin olduğu durumlarda spesifik bir transkripsiyon faktörü olan NFIL-6 β 'nın sentezi indüklenir (Ramji vd., 1993).

Transkripsiyon faktör sentez regülasyonu önemli bir kontrol noktası olmasına rağmen, transkripsiyon faktör aktivitesini kontrol eden tek düzenleyici mekanizma değildir. Bu nedenle, önceden var olan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu tarafından “de novo” gen transkripsiyonuna sağlayan ek bir mekanizmaya ihtiyaç vardır (Şekil 1.6-b). Örneğin IL-6 tarafından indüklenen NFIL-6 β transkripsiyon faktörünün sentezi, uyarılmamış hücrelerde önceden aktif halde bulunmayan NFIL-6 ve STAT-3 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile tamamlanır (Green, 2005; Ltutticken vd., 1994; Nakajima vd 1993; Yeo, 2013).

Önceden varolan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ligand bağlanması, protein-protein etkileşimindeki değişiklikler ve transkripsiyon faktörü fosforilasyonu gibi bir dizi farklı mekanizmayla olabilir. Örneğin Tenbaum ve Baniahmad tarafından araştırılan steroid reseptörleri, inaktifken bir Hsp90 inhibitör protein olan Hsp90 ile ilişkilidir. Steroid hormon ligantı bağlandığında, Hsp90 yapıdan ayrılır ve reseptör nükleusa doğru hareket eder, burada uygun yanıt elementine bağlanır ve transkripsiyonu başlatır (Tenbaum ve Baniahmad, 1995). Benzer durumlar aktif bir transkripsiyon faktörü olan “Hypoxia inducible factor” (HIF-1) ve NFK β 'da da gözlemlenir (Wood vd., 1997).



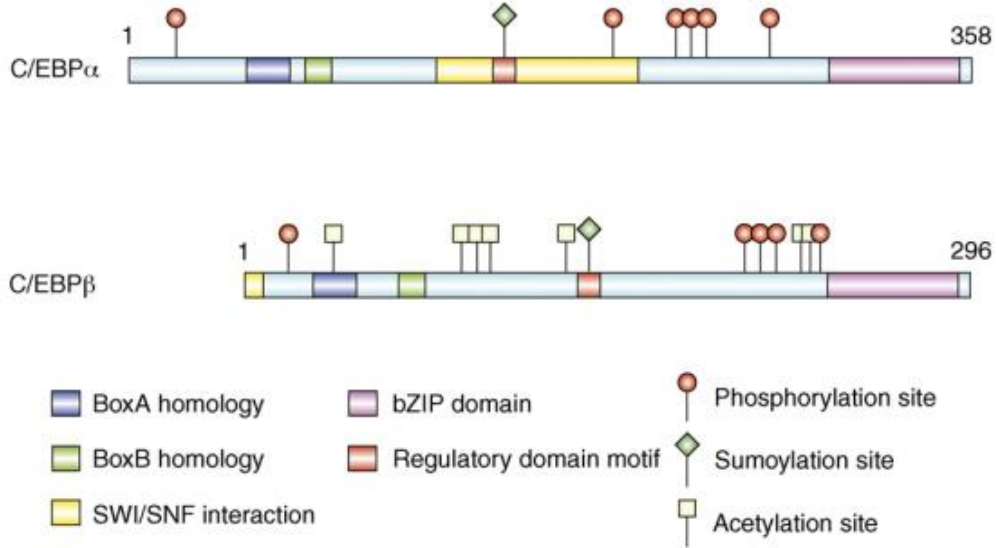
Şekil 1.6 : Transkripsiyon faktörlerinin sentezi ile dokuya spesifik gen regülasyonu (a), dokuya spesifik aktivasyon (b) Şekil Wood ve arkadaşlarının yaptığı makaleden adapte edilmiştir. (Wood vd., 1997).

1.2 Bazı Transkripsiyon Faktörleri

1.2.1 CCAAT/Enhanser Bağlayıcı Protein Ailesi (C/EBP)

Çoğu transkripsiyon faktörü fonksiyonel ve yapısal domainler içerir. Direk DNA ile etkileşime giren, korunmuş dizilerden oluşan “DNA Bağlanma Domain”leri (DBS) bulunmaktadır. Bazıları doğrudan veya dolaylı olarak transkripsiyonun başlatılmasına yol açan protein-protein etkileşimleri için önemli olan “Transkripsiyon Aktivasyon Domain” i (TAD) taşır. Multimerizasyon domainleri ise homomer ve heteromerlerin oluşmasını sağlar. Heteromerik kompleksler, spesifik DNA bağlanmasının yanı sıra inhibitör kompleksler için de potansiyel bağlanmayı sağlar. Her ne kadar heteromerik (heterotipik olarak da adlandırılır) kompleksler farklı tip faktörleri içerse de, bazı durumlarda bu tür komplekslerle ilişkili izoformlarda bulunabilir. Bu homotipik kompleksler, deneysel olarak kolaylıkla tespit edilemeyecek düzeyde hem kuvvetli hem de ince etki gizli etkilere neden

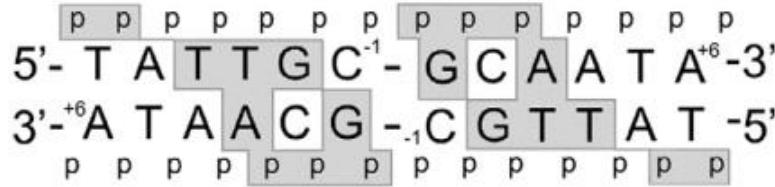
olabilirler. Tüm C/EBP'ler, C-terminalinde korunmuş ve aileye spesifik DNA bağlama ve dimerizasyon domaini içeren bazik lösin fermuar (bZIP) içerir. bZIP faktörleri için DNA Bağlanma Domainleri (DBD) birincil nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) sağlar ve DBD/NLS kompleksi oluşturulur. bZIP modülü, bZIP süperailisinde yüksek korunmuşluk içerir ve bu durum C/EBP subailesi izoformlarında gözlemlenir. C/EBP'lerde, bZIP rezidüsü karboksi terminal ucunda bulunmaktadır (Liu vd., 2009). N-terminal domeinleri oldukça çeşitlidir. Ancak korunmuş kısa motifler içerir. Bu motifler ise trans-aktivasyon veya represör etkili olabilir. SWI/SNF nükleosom remodeling kompleksleri ile etkileşen domainler post-translasyonel modifikasyonlar gösterirler. Bu durum özellikle C/EBP α ve C/EBP β 'larda karakterize edilmiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 : C/EBP α ve C/EBP β 'daki post-translasyonel modifikasyon bölgeleri (Landschulz, Johnson, MacKnight., 1998; Nerlov, Ziff, 1995; Kowenz-Leutz, Leutz, 1999; Pedersen, Kowenz-Leutz, Leutz, Nerlov, 2001; Ross vd., 2004; Wang, Iakova, Wilde, Awad, Timchenko, 2004; Ross, Erickson, Hemati, MacDougald, 1999; Behre vd., 2002; Cesena, Cardinaux, Kwok, Schwartz, 2007).

CCAAT/Enhanser Bağlayıcı Protein (C/EBP) ailesi ilk olarak sıçan karaciğerinde Steve Mcknight ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. İlk bulunduğu ısıya karşı kararlı bir faktör olarak tanımlanmıştır. Promotordaki CCAAT motifi ve bazı viral ‘enhancer’ larda bulunan ‘core homology’ bölgesini tanıdığı için C/EBP ismi almıştır (Johnson, McKnight, 1989).

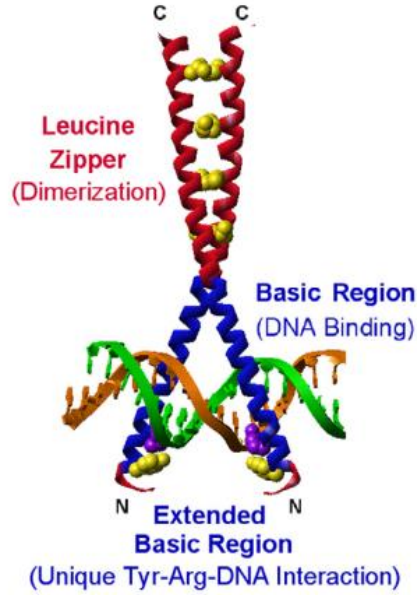
C/EBP geni ilk olarak 1988 yılında klonlanmıştır (Landschulz, Johnson, Adashi, Graves, McKnight, 1988). C/EBP ailesi altı üyeden oluşmakta ve günümüze kadar birçok labarotuvarda çalışılmaktadır. Bugüne kadar gelinen süreçte birçok çalışan tarafından klonlanmış ve farklı isimlendirme yapılmıştır. Bu karışıklığı önlemek için Cao ve arkadaşları tarafından keşif sıralarına göre Yunan alfabesinin harfleriyle oluşturulmuş sistematik bir isimlendirme önerilmiştir (C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , ζ). C/EBP α , β , γ ve δ genleri intronsuz iken ϵ ve ζ iki ve dört adet ekson içermektedir (Cao, Umek, ve McKnight, 1991). C/EBP bağlanma bölgesi “RTTGCGYAAAY” dizisi şeklindedir ancak bu dizide R yerine A ya da G ve Y yerine ise C ya da T gelmektedir (Şekil 1.8) (Ramji, ve Foka, 2002).



Şekil 1.8 : C/EBP bağlanma bölgesi (Ramji, 2002).

Bütün C/EBP izoformlarını C-terminallerinde 55-65 aminoasitlik bZIP domaini mevcuttur. bZIP yapısındaki lösün fermuarı bir alfa helikal yapısı oluşturarak dört ya da beş lösün heptad tekrarından oluşmaktadır. Tekrarlı yapılar paralel bir şekilde etkileşerek ‘coiled-coil’ yapısını oluşturmakta ve dimerizasyonun yapılmasını sağlamaktadır (Zahnow, 2002). Temel yapı lösün fermuar yapısıyla sürekli bir bağlantı halindedir ve bu yapıdaki aminoasitler DNA bağlanmasını sağlamaktadır. bZIP proteinleri, ters bir Y yapısı oluşturmaktadır ve oluşan her bir Y

yapısı DNA'nın palindromik tanıma bölgesinin yarısına makas gibi bağlanmaktadır (Şekil 1.9) (Ramji, 2002).



Şekil 1.9 : C/EBP proteinleri yapısı. (Ramji, 2002).

Yüksek korunmuşluk gösteren bZIP C/EBP ζ dışındaki tüm C/EBP aile üyeleri ile homo ya da heterodimer oluşturabilmektedirler (Lekstrom-Himes, ve Xanthopoulos, 1998). Bu heterodimerler nedeniyle farklı ağırlıklarda polipeptitler oluşabilmektedir. C-Terminusun aksine C/EBP proteinlerinin N-Terminus ucu birçok üyede korunmuş üç kısa alt bölge dışında oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu üç alt bölge temel transkripsiyon bileşenleri ile etkileşen ve transkripsiyonu uyarıcı aktivasyon bölgelerini oluşturmaktadır (Jain, Police, Phelps, ve Pekala, 1999).

C/EBP transkripsiyon ailesi altı üyeden oluşmasına rağmen bazı dokularda/hücre tiplerinde bulunan C/EBP proteinlerinin sayısı doku ve hücre tipine göre çeşitlilik göstermektedir. Normalde bu ailenin 6 üyesi bulunmaktadır. mRNA molekülünde bulunan farklı translasyon başlangıç kodonlarından başlayarak farklı proteinler üretilmesi, C/EBP proteinlerinin aile içinde heterodimer oluşturması, bZIP ya da bZIP olmayan bir aile dışı transkripsiyon faktörü ile protein-protein etkileşmesi yapması bu sayıyı arttırmaktadır (Calkhoven, Bouwman, Snippe, ve Ab, 1994).

C/EBP α alternatif sprints mekahniması ile N-terminallerindeki aminoasit sekanslarında farklılıklar iki major protein sentezlenebilir; C/EBP-42 kD ve C/EBP-30 kD. C/EBP α -30 kD translyasyonu sırasında ilk iki AUG kodonunu atlanır ve üçüncü AUG kodonundan başlanarak translyasyon yapılır. Bu nedenle C/EBP α -30, C/EBP α -42'de olan transkripsiyon aktivasyon bölgesini içermemekte ve bu da etkisinin C/EBP α - 42'den daha az olmasına neden olmaktadır (Ossipow, Descombes, Schibler, 1993; Nerlov, Ziff, 1995; MacDougald, Cornelius, Liu, Lane, 1995). C/EBP α -42'nin hücre proliferasyonunu inhibe ederken, C/EBP α -30 anti-mitotik değildir. Dolayısıyla C/EBP α 'nın 12 kD'luk N-terminalindeki sekansı anti-mitotik aktivite C/EBP α 'ya anti-mitotik etki kazandırmaktadır. Hücresel C/EBP α -42 / C/EBP α -30 oranı adiposit farklılaşmasında ve hepatosit gelişiminde değişmektedir ve değişen bu oranın hücresel düzeyde regülatör olduğu düşünülmektedir (Rangwala, Lazar, 2000; Jain, vd. 1999; MacDougald, vd., 1995; Lin, MacDougald, Diehl, Lane, 1993).

Farklı C/EBP izoformlarının doku/hücre ekspresyon profilleri hem mRNA hem de protein düzeyinde araştırılmıştır. C/EBP α adipoz doku, karaciğer, barsak, akciğer, adrenal bez, periferel kan mononükleer hücreleri ve plasentada yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. C/EBP β 'nin ise ekspresyonu özellikle karaciğer, bağırsak, akciğer, adipoz doku, dalak, böbrek ve miyelomonositik hücrelerde (Ramji, 2002).

C/EBP'lerin fonksiyonları ve doku/hücre ekspresyon profilleri birçok araştırmanın konusu olmuştur. Özellikle hepatosit, adiposit ve hematopoyetik hücrelerde hücre çoğalması, farklılaşması, metabolizma, inflamasyon ve diğer birçok cevapta yaşamsal rolleri olduğu gösterilmiştir. C/EBP'lerin ekspresyonları fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda, hormonlar, mitojenler, sitokinler, yiyecekler ve bazı toksinler gibi faktörler yoluyla farklı düzeylerde kontrol edilmektedir. Bu düzenlemelerden bir tanesi fosforilasyon mekanizmasıdır. C/EBP transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri fosforilasyon ile kontrol edilebilir. Ekstraselüler uyaranlar fosforilasyonu değiştirmekte, promotör aktivitelerini artırabilmekte ve proteinlerle etkileşmelerini sağlamaktadır (Luedde, Duderstadt, Streetz, Tacke, Kubicka, Manns, 2004; Timchenko, Harris, Wilde, Bilyeu, BurgessBeusse, Finegold, 1997;

Yamanaka, Kim, Radomska, Lekstrom-Himes, Smith, Antonson, 1997; Cortes-Canteli, Pignatelli, Santos, Perez-Castillo, 2002).

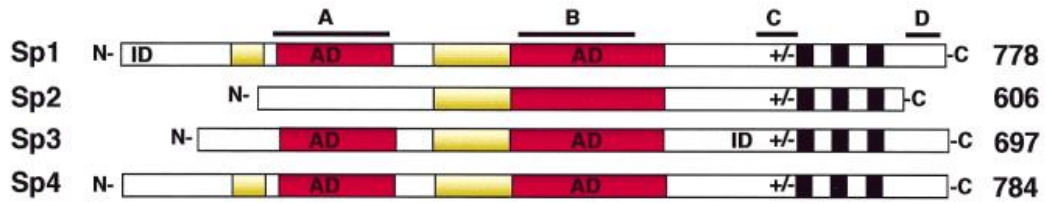
1.2.2 Spesifik Protein (SP) Ailesi

Bilindiği üzere, Transkripsiyonel regülasyon promotor ve enhansır elementlerine bağlanan proteinlerin kombinasyonel etkisi ile gerçekleşmektedir. Genellikle sınırlı sayıda bulunan cis-etkili DNA elementleri sadece tek bir transkripsiyon faktörü tarafından değil yapısal olarak farklı ilişkili proteinler tarafından da tanınmaktadır. Önemli ve yaygın dağılım gösteren GC kutusu (GGGGCGGGG) ve GT/CACCC kutusu (GGTGTGGGG) gibi promotor elementleri GC-zengin dizilerdir (Latchman, 1995b). Bu elementler bir çok ubikütün, doku spesifik ve viral genlerin ekspresyonları için gereklidir. Buna ek olarak, hücre döngüsünün düzenlemesi, hormonal aktivasyon ve gelişimsel patern gibi spesifik kontrol noktaları olan genlerin regülatör bölgelerinde de bulunmaktadır (Suske, 1999).

Yapılan çalışmalarda genel bir transkripsiyon faktörü olan “Spesifik Protein 1 (SP1)”in GC-kutularına bağlanıp, regülasyonu etkilediği ve bu proteinin birçok genin regülasyonunu düzenlendiği gösterilmiştir. Sp1, 'Sp1 bağlanma siteleri'ne bağlanarak etki eden tek protein değildir, küçük bir protein ailesinin ilk tanımlanan ve klonlanmış proteinini temsil eder. Bu aile dört protein üyesinden oluşmuştur; SP1, SP2, SP3 ve SP4 (Suske, 1999).

SP1, simian virüsü 40 (SV40) ve timidin kinaz (TK) promotörüne GC-kutularından bağlanıp transkripsiyonu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Dyanan ve Tjian, 1983; Gidoni, 1984). 1987’de HeLA hücrelerinden insan SP1 cDNA’sı klonlanarak moleküler tanımlaması yapılmıştır. İnsan SP1 proteininin tamamı 778 aminoasitten oluşur (Kadonaga, Carner, Masiarz, Tjian, 1987).

Bütün SP Ailesi üyeleri benzer domain yapıları gösterirler (Şekil 1.10). C-terminusuna yakın üç çinko parmak içerirler. N-terminus ucunda ise glutamin-zengin domani ve serin/theronin yapıları bulunmaktadır. 81 amino asitlik C₂H₂-tip çinko parmak bölgesi, bu protein ailesinde en çok korunmuşluk gösteren DNA bağlanma domainidir (Pavletich ve Pabo, 1991; Fairall, Schwabe, Chapman, Finch, Rhodes, 1993). Çinko parmak motiflerinin DNA bağlanması ile ilgili yapılan çalışmalar gösteriyor ki, bağlanma belli kritik proteinlerle regüle olmaktadır. Bu kritik amino asitler SP1, SP3 ve SP4'de korunmuşken, SP2'de böyle bir korunma söz konusu değildir. SP1, SP3 ve SP4 proteinleri, SP1 bağlanma bölgesine afinite göstererek bağlanırlar. SP2'de ise, ilk çinko parmakta yerleşim gösteren en önemli histidin rezidüsü lösün rezidüsü ile yer değiştirmiştir. Bu sebeple yapısal bir farklılık oluşur ve SP2, GC-Kutusuna bağlanmaz (Hagen vd., 1992, 1994).



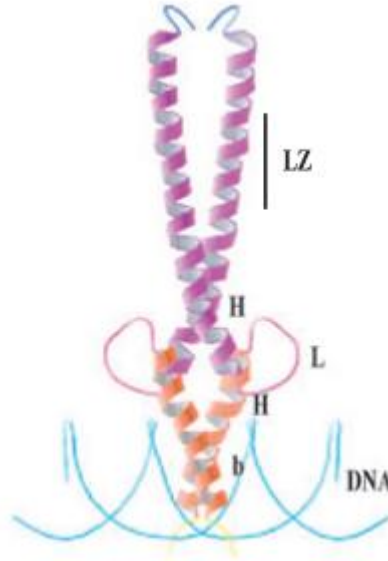
Şekil 1.10 : SP Ailesinin domain yapıları. Şekilde AD: Aktivatör Domaini, ID: İnhibitör Domaini, Kırmızı alanlar Glutamince rezidülerini, Sarı alanlar Serin/threonin rezidülerini, Siyah alanlar çinko parmak yapılarını göstermektedir. (Kingsley ve Winoto, 1992).

SP1'in moleküler klonlanması ve sonraki incelemelerle proteinin fonksiyonel domainleri belirlenmiştir. Her glutamin-zengin bölge güçlü aktivasyon domaini olarak etki göstermektedir (Courey, Holtzman, Jackson, Tjian, 1989). Aktivasyon domainlerinin haritalanması, hidrofobik aminoasitlerin transkripsiyonal aktivasyon için esansiyel olduğunu ve aslında glutamin rezidülerinin ise gerekli olmadığını ortaya koymuştur (Gill, Pascal, Tseng, Tjian, 1994). Ayrıca N-Terminusunda inhibitör domainin olduğu belirlenmiştir (Murata, Rogers, Udvardia, Horowitz, 1994). SP1 ile promotorların sinerjik aktivasyonu GC-Kutuları üzerinden olmaktadır (Pascal

ve Tjian, 1991). Sp1, fosforile olduğu ve glikosile olduğu ve multimerik komplekslere yol açan homotipik etkileşimler yaptığı bilinmektedir. Buna ek olarak, nüklear proteinlerin farklı sınıfları ile olan heterotipik interaksiyonlar rapor edilmiştir. TATA-kutusu bağlama proteini TBP ve TBP-ilişkili faktörler olan *Drosophila* TATA bağlanma protein ilişkili faktör II110/ İnsan TATA bağlanma protein ilişkili faktör II130.(dTAFII110/hTAFII130) (Hoey, Weinzierl, Gill, Chen, Dynlacht, Tjian, 1993; Tanese, Saluja, Vassallo, Chen, Admon, 1996) ve İnsan TATA bağlanma proteini ilişkili faktör II55 (hTAFII55) (Chiang, ve Roeder, 1995) gibi genel transkripsiyon mekanizmalarını kapsayan interaksiyonlardır. SP1 ile interaksiyona giren diğer proteinler retinoblastoma proteini olan p107 (Datta, Raychaudhuri, Bagchi, 1995), bir transkripsiyon faktörü olan Yin Yang -1 (YY1) (Lee, Galvin, Shi, 1993) ve E2 Faktör (E2F) gibi hücre siklus regülatörleridir (Karlseder, Rotheneder, Wintersberger, 1996). SP1 nükleosomlardaki hedef sekanslara bağlanır ve büyük bir koaktivatör kompleksi olan Sp1 için Gerekli Kofaktör (CRSP) ile etkileşime girer. CRPS, Sp1 aktivasyonu için gerekli olan kofaktördür (Ryu, Zhou, Ladurner, Tjian, 1999).

SP1 transkripsiyon faktörünün dokuya spesifik ve hücre siklusunu düzenleyen çok sayıda genin aktivasyonunda rol aldığı ayrıca CpG adalarının metilasyonunu önlediği düşünüldüğü için SP1'den yoksun hücrelerin hayatta kalamayacağı belirlenmiştir (Brandeis vd., 1994; Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A. P., 1994). Şaşırtıcı bir şekilde, durum böyle değildir. S. Philipsen ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada, fare SP1 genini dizilimini bozdular ve SP1-eksik embriyonik kök hücrelerin (ES hücreleri) canlı olduğunu, normal büyüme özelliklerine sahip olduğunu ve yabani tip ES hücreleri kadar verimli bir şekilde embriyoid organlarının ve farklılaşmanın olduğunu belirlediler. Bununla birlikte, SP1'in normal fare embriyogenezi için önemli olduğuda belirlenmiştir. SP1-knockout embriyoların gelişimi yavaşlamış ve gebeliğin 11. gününde bütün embriyolar ölmüştür (Marin, Karis, Visser, Grosveld, Philipsen, 1997).

Shieh ve arkadaşları USF-1 geninin 1. kromozomun q22-q23 koluna lokalize olduğunu ve farelerde de USF-1'in kromozom 1 ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Henrion vd., 1995). USF-1, yüksek korunmuşluk gösteren Bazik-Heliks-Loop-Heliks-Lösün (bHLH-LZ) fermuar protein ailesi üyesidir (Şekil 1.12) (Atchley ve Fitch, 1997).



Şekil 1.12 : USF Proteinin 3 boyutlu yapısı (Atchley ve Fitch, 1997).

Spesifik E-Box motiflerine bağlanan USF-1, hücre tipine göre değişkenlik gösterebilir. E-box motifinin (CACpGTG) merkezinde bulunan CpG dizisindeki metilasyon kompleks oluşumunu inhibe ederek, gen ifadesini negatif regüle eder (Prendergast, ve Ziff, 1991; Watt, ve Molloy, 1988). E-Box motifindeki tek nükleotit polimorfizimleri (SNPs), gen regülasyonunu etkilemektedir. Örneğin, Thymidylate sentez geninin USF E-box konsensüsünde tek bir G/C baz değişimi folat metabolizmasında rol oynar ve USF komplekslerinin aynı noktaya bağlanmasını engeller (Mandola vd., 2003) .

DNA bağlanması ve dimerizasyon için USF'nin transkripsiyonal aktivitesi bHLH-LZ domaininin bütünlüğüne bağlıdır. İlk olarak, USF proteinlerinin E-box motiflerine bağlanarak gen transkripsiyonunu modüle ettiği bulunmuştur (Ferre-

D'Amare, Pognonec, Roeder, ve Burley, 1994). İkincisi, USF-1 ile genel ve hücreye spesifik transkripsiyon faktörleri SP1, Pea3 ve MTF1 arasındaki etkileşim gösterir. USF-1/Pea3 kompleks oluşumu LZ motifinin varlığına bağlıdır, bu da Bax geninin transkripsiyonuna aktifleştirir (Andrews vd., 2001; Ge, Jensen, Matherly, ve Taub, 2003; Liu, Whetstine, Payton, Ge, Flatley, ve Matherly, 2004; Firlej, Bocquet, Desbiens, De Launoit, ve ChotteauLelievre, 2005). Üçüncü olarak ise, USF-1'nin doğrudan TATA-plus ve TATA-sız promotörlerin transkripsiyonel mekanizmalarıyla etkileşime girmesidir. TATA-yönelimli gen transkripsiyonunun ön başlatma kompleksinde yer alan TFIID ve TBP ile ilişkili faktörler, USF-1 ile etkileşime girer. TATA'sız promotorlarda ise SF-1'in başlangıç bölgesine yakın konumda bulunan pirimidin açısından zengin başlatıcı (Inr) elementlerine bağlandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer şekilde, TATA-sız ve Başlatıcı Element (Inr) içeren promoterler transkripsiyonu uyaran Inr sekansına potansiyel olarak bağlanan TFII-I faktörü, E-kutusunda bağlanabilmektedir (Bungert, Kober, Doring, ve Seifart, 1992; Chiang ve Roeder, 1995; Meisterernst, Horikoshi, ve Roeder, 1990; Sawadogo ve Roeder, 1985; Sawadogo vd., 1988) .

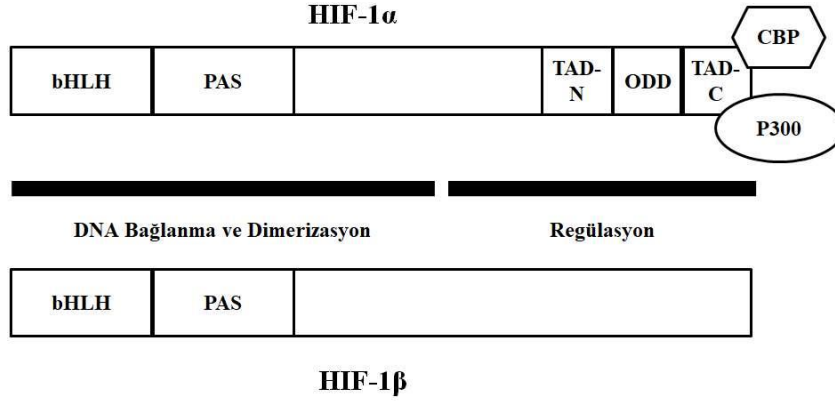
Hücre döngüsünün regülasyonu, hücre bölünmesinde kritik öneme sahiptir. Hücre döngüsünün progresyonu ve kardeş hücrelere genetik bilginin eşit dağılması genetik bütünlüğe bağlıdır. Siklin bağımlı kinazlar (Cdks) ve siklinler gibi diğer aktivatör elementler hücre döngüsünün sürdürülmesini sağlarlar. Hücre döngüsü sırasında, gen transkripsiyonuna bağlı olarak kinazların seviyesi değişir ve siklik-cdk komplekslerinin farklı alt grupları ile S ve M fazlarının regülasyonlarına neden olan ubiquitin-proteazom sistemi tarafından proteolizis başlar. G2/M progresyonuna geçiş Cdk1 (cdc2) ile Siklin A ve B'nin kombinasyonuna bağımlıdır (Hunter, 1991), G1/S progresyonunun regülasyonu Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 ile Siklik D ve E'nin kombinasyonuna bağlıdır. USF transkripsiyon faktörleri Cdk ve siklin genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek G1/S ve G2/M transisyonunda görev alır (Peter ve Herskowitz, 1994).

USF-1 transkripsiyon faktörü CDK-1 gen ekspresyonunda ve Siklin B-1'nin pozitif regülasyonunda görev alır. Aktif siklin-CDK kompleksleri (SiklinA2-CDKL ve SiklinB1-CDKL) ile fosforile olan rekombinant USF-1'nin DNA-bağlanma aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir; bu da G2/M geçişine pozitif etki etmektedir

(Cogswell, Godlevski, Bonham, Bisi, ve Babiss, 1995; North vd., 1999; Pawar, Szentirmay, Hermeking, ve Sawadogo, 2004; Philipp vd., 1994) .

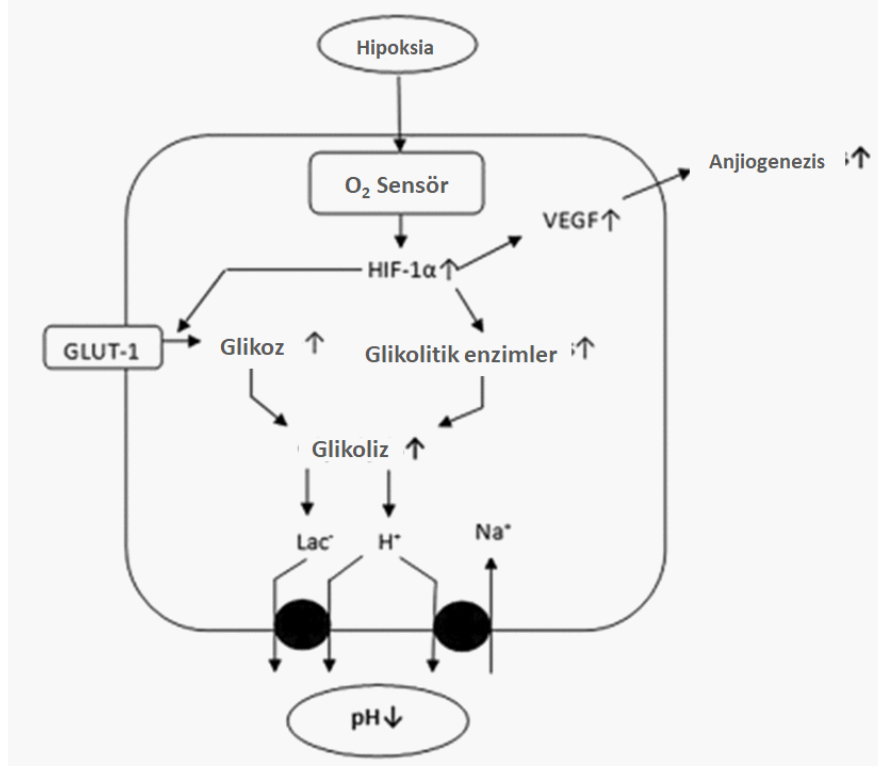
1.2.4 Hipoksiya İndüklenebilir Faktör (HIF)

HIF, HIF- α ve HIF- β olmak üzere 2 subüniteden oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 α 'nın HIF-2 α ve HIF-3 α olmak üzere 2 ayrı benzer proteini daha vardır (Ema, Taya, Yokotani, Sogawa, Matsuda, Fujii-Kuriyama, 1997; Gu, Moran, Hogenesch, Wartman, Bradfeld, 1998). Hem HIF-1 α hem de HIF-2 α , HIF- β ile heterodimer oluşturabilir, çünkü HIF-1 α ve HIF-2 α 'nin bHLH domainlerinin yaklaşık % 85'i benzerlik göstermektedir (Tian, McKnight, Russell, 1997). HIF- α alt ünitelerinin ekspresyonu oksijene bağlı iken, HIF- β temel olarak oksijene bağımsız olarak ekspres edilmektedir. HIF- β altbirimi aril hidrokarbon reseptör nükleer translokatorü (ARNT) olarak da bilinir ve aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanır (Wang, Jiang, Rue, Semenza, 1995). Hem HIF- α hem de HIF- β alt üniteleri, *Drosophila*'da bulunan bHLH-PAS (Basik Heliks- döngü- heliks/Per ARNT Sim) protein ailesine aittir (Jiang, Rue, Wang, Roe, Semenza, 1996). Bütün HIF- α 'lar oksijen bağımlı degradasyon domaini (ODD) ve N-Terminal Transaktivasyon domainine (N-TAD) sahiptirler (Pugh, O'Rourke, Nagao, Gleadle, Ratcliffe, 1997). Buna ek olarak, HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın, C-Terminallerinde C-Terminal Transaktivasyon domaini bulunmaktadır (C-TAD), ancak HIF-1 β tüm regülatör bölgelere sahip değildir (Şekil 1.13). ODD domaini, normoksik koşullar altında hidroksilasyon için prolin ve asparagin içerdiği için HIF- α alt birimlerinin aktivitesi ve stabilitesi için çok önemlidir (Ivan, Kondo, Yang, Kim, Valiando, Ohh, 2001). C-TAD'a bağlanan protein (CBP) ve P300 gibi bazı ko-aktivatörler lizin asetiltransferaz (KAT) aktivitesi ve transkripsiyonel mekanizmalarla etkileşim gösterip kromatinin yapısındaki değiştirir ve HIF ekspresyonunu regüle ederler (Bedford, Kasper, Fukuyama, Brindle, 2010) .



Şekil 1.13 : HIF-1 α ve HIF-1 β genlerinin yapısı. (Pugh vd., 1997).

İnsan dokuları, aerobik metabolik yollarla sabit enerji seviyesini korumak için bol miktarda oksijene ihtiyaç duyar. Kanser, kronik akciğer rahatsızlıkları, iskemi veya kalp hastalıkları gibi bazı bozukluklarda oksijen seviyesi bozulur ve böylece hipoksik durum ortaya çıkar. Bu koşullar, HIF ekspresyonunu artırırken ve degradasyonunu baskılar (Semenza, 2000). HIF, angiogenezi, metabolik yolları ve pH'ı düzeni gibi için üç önemli rolün yanı sıra çeşitli hücre sinyal yollarında da önemli rol oynamaktadır (Şekil 1.14). Hipoksi genellikle hücrelerin hızla çoğalmasıyla kan damarlarının sıkışmasına neden olan katı tümörlerde sık görülür. Bu sorunu düzeltmek için HIF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinin ekspresyon seviyesini artırıcı etki yapar. HIF, düşük oksijen seviyesine sahip dokulara doğru endotel hücre göçünü artırır ve bu hücreler, oksijen ihtiyacını gidermek için yeni kan damarları oluşturmaya yardımcı olurlar (Ziello, Jovin, Huang, 2007).



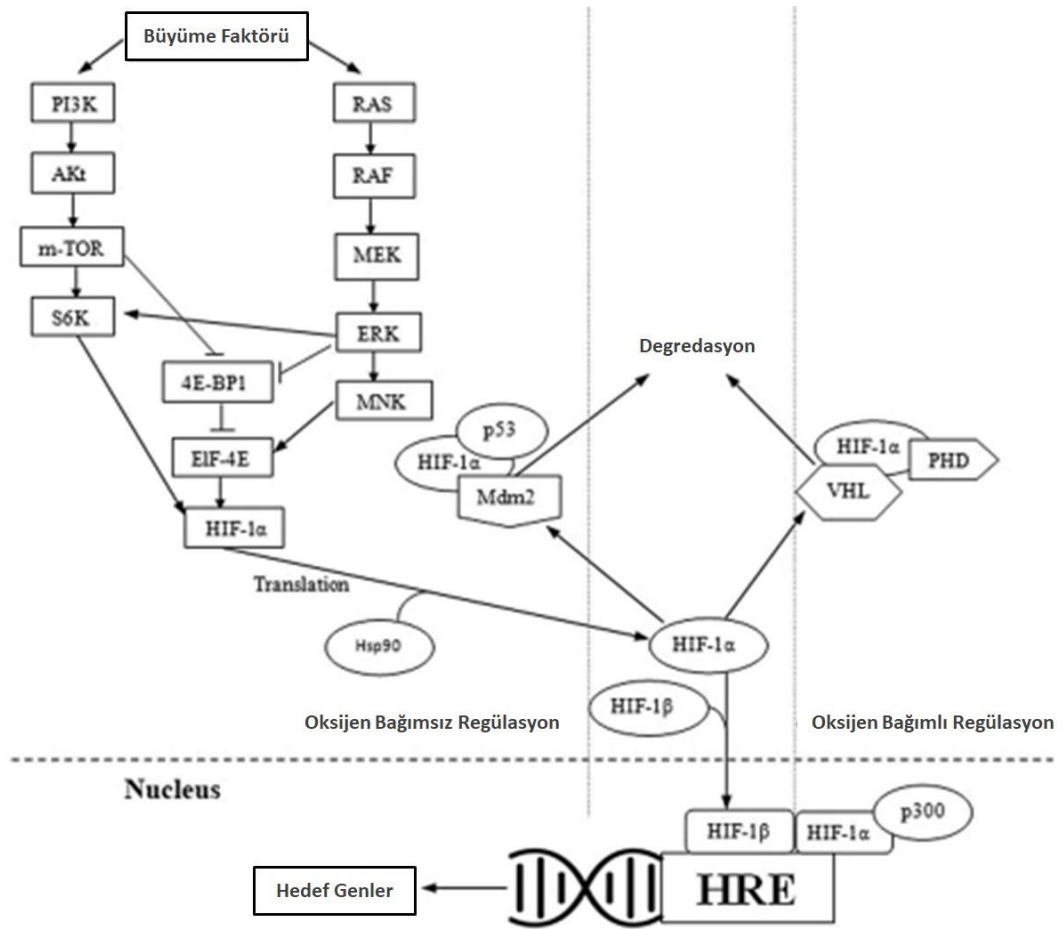
Şekil 1.14 : HIF-1'in başlıca rolleri; VEGF yoluyla anjiyojenezin, sodyum hidrojen pompaları vasıtasıyla pH'i ve glikolitik enzimler yoluyla glikoliz'i düzenler (Ziello vd., 2007).

Oksijen yokluğunda metabolik yollar ATP üretimin devam ettirebilmek için oksidatif fosforilasyondan, anaerobik metabolizmaya yönelmektedir. Bu değişim, heksokinaz, aldolaz, piruvat kinazın aşırı ekspresyonu ve piruvatın sitrik asit döngüsüne girmek için asetil CoA'ya dönüşümünü teşvik eden piruvat dehidrojenazının azaltılmış ekspresyonuyla yapılır (Semenza, Roth, Fang, Wang, 1994).

Tümör hücreleri (pH: 6.2-6.8), normal hücrelere (pH: 7.2-7.4) göre daha asidik hücre dışı pH'a sahiptir (Harguindey, Orive, Pedraz, Paradiso, Reshkin, 2005; Gerweck, Vijayappa, Kozin, 2006). Bu durumun başlıca sebepleri, laktik asit ve karbonik asit üretimidir. Monokarboksilat taşıyıcılar (MCT4), hipoksik durumlarda tümör hücrelerinden daha fazla laktik asit salgılar (Ullah, Davies, Halestrap, 2006). Ayrıca, HIF ile indüklenebilen ektoenzim CA (karbonik anhidraz) IX veya XII, ekstrasellüler pH'ı azaltmak için karbondioksidi karbonik asit haline dönüştürürler.

Histokimyasal çalışmalar CAIX ve CAXII izoformlarının tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese olduğunu göstermiştir ki bu da kanser de markör genler olduğunu göstergesidir (Švastová, Hulíková, Rafajová, Zat'ovičová, Gibadulinová, Casini, 2004).

HIF-1 α , düşük oksijen koşullarından bağımsız olarak birçok hücre içi sinyal yolağını etkiler. Burada post-translasyonel modifikasyonlardan ubiquitination, asetilasyon, sumoilasyon, hidroksilasyon ve fosforilasyon gibi reaksiyonlarla gerçekleştirilir. HIF-1 α ifadesini regüle eden oksijen bağımlı ve oksijen bağımsız iki farklı yolak vardır (Şekil 1.15). HIF-1 α ve HIF-2 α meme, mesane, beyin, glial, hepatosellüler, kolon, ovaryum, pankreas, prostat ve renal tümörlerde aşırı ifade olmaktadır (Kallio, Pongratz, Gradin, McGuire, Poellinger, 1997).

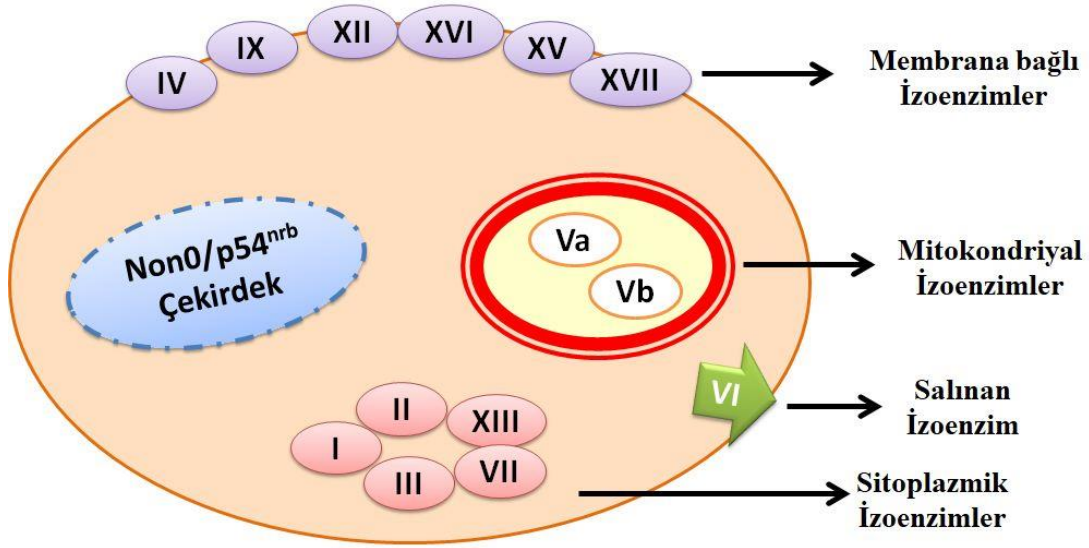


Şekil 1.15 : Oksijen bağımlı ve bağımsız yollar (Kallio vd., 1997).

1.3 KARBONİK ANHİDRAZ (CA)

Karbonik anhidraz (Karbonat Hidroliyz E.C.4.2.2.1.) karbondioksit (CO₂) ve bikarbonat (HCO₃⁻)'ın geri dönüşümlü reaksiyonu katalizleyen, aktif bölgesinde çinko (Zn⁺²) iyonu bulunan, metaloenzim ailesidir (Imtaiyaz, Shajee, Waheed, Ahmad, ve Sly, 2013; Supuran, 2008). Tüm organizmalarda bulunan bir enzim olan karbonik anhidraz (CA) ilk olarak Meldrum ve Roughton tarafından 1933 yılında eritrositlerde keşfedilmiştir (Supuran, 2010). Aktivitesi sonradan renal korteks, gastrik mukoza, pankreas, göz merkezi, sinir sistemini de içine alan birçok yerde saptanmıştır. Bitki kloroplastlarında, balıkların solungaç ve salgı organlarında, alglerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve bazı bakterilerde bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır. CA sözü geçen canlı hücrelerinde çoğu kez sitoplazmada çözünmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır (Lindskog, 1997; Supran, De Simone, 2015).

Bir metalloenzim ailesi olan Karbonik Anhidrazlar tek bir enzim formu değildir, kendi içinde 6 genetik gruba ayrılır: α -, β -, γ -, δ -, ζ -, and η -CA. Bu gruplardan α CA, omurgalılarda ve alglerde; β CA, bitkilerde ve prokaryotlarda; γ CA, arkealarda; δ CA ve ζ CA marin diatomlarda; η CA, protozoalarda ifade olmaktadır. Bu gruplardan α , memelilerde bulunur ve evrimsel analizlerle belirlenen 17 farklı α -CA üyesi bulunmaktadır. Bu isoformlar hücresel yerleşimlerine ve katalitik aktivitelere göre sınıflandırılmıştır; Sitozolik (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), membrana bağlı (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV, CAXV ve CAXVII), mitokondriyal (CAVa, Vb) ve ekstrasellüler (CAVI). Geriye kalan üyeler (CAVIII, CAX ve CAXI) katabolik olarak pasif oldukları için CARP'ler (Karbonik Anhidraz Bağlı Proteinler) olarak adlandırılır. α -CA grubuna dâhil Karbonik Anhidrazların hücresel dağılımları Şekil 1.16'de gösterilmektedir (Supuran, 2008; Alterio, Di Fiore, D'Ambrosio, 2012; Dathan, Alterio, Troiano, 2014; Supuran, Capasso, 2014).



Şekil 1.16 : Karbonik Anhidrazların hücresel dağılımları (Supuran, C.T., Capasso, C., 2014).

β sınıfındaki CA'lar bütün damarlı bitkilerde ve bazı ökaryotik bakterilerde, alg ve arkelerde mevcuttur. Aynı zamanda hem α hem β genlerinin birlikte bulunduğu bazı bitkiler, düşük yapıllı ökaryotlar ve omurgasızlarda mevcuttur (Chegwidden, ve Carter, 2000).

γ CA'lar ilk olarak arkeonlarda keşfedilmiş olmasına rağmen bazı bitki ve ökaryotik bakterilerde mevcuttur (Chegwidden, 2000). Bu izoenzimin aktif bölgesinde kobalt kullanıldığında daha yüksek hidrataz aktivitesi gösterdiği fakat esteraz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir (Hewett-Emmett, 2000).

Karbonik anhidraz izoformlarının ifadesi dokuya özeldir. Örneğin; CAI, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde CAII izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimler, doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO_2 'i, HCO^{3-} iyonuna, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO^{3-} 'in CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. CAI izoenziminin turnover sayısı 2.5×10^5 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu CAII kadar açık değildir. hCAI eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2008). Turnover

sayısı 25°C de 10^6 olan CAII, ailenin en çok çalışılan formudur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan CAII miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, CAII ve CAIV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan CAII izoenziminin önemi, glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan CAII izoenzimi ile Na^+ ve H_2O 'nun geri emilimi sağlanmaktadır. CAII izoenzimi ile ilgili olarak CAII eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da CAII izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Carter, Jeffrey, Shiels, Edward, Tiplen, Hopkins, 1979; Venta, Montgomery, Tashian, 1987; Lindskog, 1997).

İskelet kasında CA enzimi olarak CAIII izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kırmızı kas dokusuna CAIII enzimi zayıf bağlı olup, doku kapilerine CO_2 'nin difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır (Cabisco, Levine, 1996). Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı 8×10^3 'dir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. CAI ve CAII izoenzimleri gibi CAIII de p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan CAIII izoenziminin fosfotaz aktivitesi de vardır (Lindskog, 1997).

CAIV ve CAVI ise, iki sinyal sekans izoenzimleri olup, sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. CAIV izoenzimi membrana bağlı bir enzimdir ve böbreklerin membranına bağlı olarak bulunduğu gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağlı olarak ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan CAIV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO^{-3} iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır (Lindskog, 1997).

CAV izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoil fosfat sentetaz I ve piruvat karboksilaz enzimlerinin, üre devri ve glukoneojenezde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipojenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir (Kannan, Notstrand, Fridborg, Lövgren, Ohlsson, Petef, 1975).

Tükrük bezinde CA enzimi olarak CAVI ve CAVII izoenzimi vardır. CAVI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. CAVII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Kannan, vd., 1975; Carter, 1979).

CAVIII enzimi de sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının amino asit dizilişleri de tespit edilmiştir (Kannan, vd., 1975; Carter, 1979).

CAIX ilk olarak tümöre bağlı yeni bir antijen olarak tanımlanmış, insan serviks kanser hücrelerinde ekspresyonu yapılmıştır. Katalitik izoenzim CAX'ın beyin, böbrek, serebral korteks, hippokampus, talamus, yumurtalık ve hipofiz bezinde eksprese olduğu belirlenmiştir (Kannan, vd., 1975; Carter, 1979)

CAXI ilk olarak 36 kDa molekül ağırlıklı koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklamıştır. Proteinin güçlü bir sinyal sekansa, çeşitli potansiyel fosforilasyon bölgeleri ve bağlama motiflerine sahip olduğu ve sinyal uyumunda rol oynadığı önerilmektedir. Beyinde kuvvetli bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. İnsan pankreası, böbrek, karaciğer, tükrük bezi ve spinal kort'da tespit edilmiştir. Normal pankreasa göre pankreatik kanser hücresinde daha güçlü sinyal görülmüştür (Carter,1979 ; Lindskog, 1997).

CAXIII, tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi de içeren çeşitli dokularda eksprese olmuş bir enzimdir. CAXIII proteinini modelleme çalışmaları globüler bir molekül olduğunu ve CAI, II ve III sitozolik enzimleriyle yüksek derecede (% 60) özdeşlik gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan gen ekspresyon çalışmalarında insan dokularında; timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste, farede; dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testislerde pozitif sinyal elde edilmiştir (Lindskog, 1997; Imtaiyaz, 2013).

CAXIV ilk olarak fare böbreğinde; en çok eksprese olduğu proksimal çapraşık tübüllerde tanımlanmıştır. Fare dokularındaki Northern Blot analizleri CAXIV mRNA ekspresyonunun en bol böbrek ve kalpte, daha sonra iskelet kası, beyin ve karaciğerde olduğunu göstermiştir (Lindskog, 1997; Imtaiyaz, 2013).

CAXV'in yapısının CAIV ile çok benzer olduğu filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir ve katalitik aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. CA'nın değişik izoenzimleri farklı şekilde dokulara dağılmıştır. Bazı izoenzimler aynı dokularda birlikte bulunduğu gibi (eritrosit CAI ve CAII), bazı dokularda tek bir izoenzim olarak da bulunmaktadır (membrana bağlı CAIV gibi) (Lindskog, 1997; Imtaiyaz, 2013).

1.3.1 Karbonik Anhidraz III (CAIII)

İnsan CAIII geni (NM_005181) 8. Kromozomun q22 kolunda lokalize olmuş, 7 ekzona ve 6 introna sahip, 10.3 kb uzunluğunda bir gendir. 3' ucunun alt kısımlarında 270 bç büyüklüğünde pol(A) kuyruğu mevcuttur. 30 kDa molekül ağırlığına sahip, 259-260 amino asit rezidüsünden ibaret ve sitozolik yerleşimli monomerik bir proteindir (Carter, 1979). Ailenin diğer sitozolik üyelerinden olan CAI ve CAII gen yapısıyla oldukça benzerlik gösteren CAIII bütün enzimler içinde düşük aktiviteye sahip bir izoenzimdir. Ayrıca, birçok sülfonamid inhibitörüne karşı dirençlidir (Tashian, Hewett-Emmett ve Goodman, 1980; Koester, Pullan, ve Noltman, 1981; Sanyal, Swenson, Pessah, ve Maren, 1982). CAIII proteinin aktif bölgesinin kendine has bir yapısı vardır. Aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonuna bağlı amino asit rezidüleri lizin 64 ve arginin 164, arginin 67 ve arginin 197'dir. Ayrıca aktif bölgedeki hidrofobik kısımda fenilalanin 198 ve izolösin 207 vardır. Bu yapı farklılığından dolayı CAIII'ün aktif bölgesi diğer izoenzimlere göre daha dar bir kavite oluşturmaya meyildir. Aktif bölgenin bu özellikleri CAIII'ün CO_2 hidratasyon aktivitesini ve CA inhibitörlerine ilgisini sınırlamaktadır. Ayrıca klasik CO_2

hidratasyon aktivitesinin haricinde CAIII fosfotaz aktivitesine de sahiptir (Chai, Jung, Lii, 1991; Cabisco, 1996; Mallis, Poland, Chatterjee, 2000). Fosfatirozin residüsünü defosforilize eder.

1.3.1.1 İnsan CAIII Geninin Ekspresyonu

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda CAIII'ün özellikle Tip I iskelet kasında, adipositlerde ve karaciğerde lokalize olduğu bulunmuştur. Enzimin özellikle Tip II iskelet kasında, kalpte, prostatta, böbrek, beyin ve eritrositlerde çok düşük seviyelerde bulunmaktadır. CAIII, epitelde, salgı kanallarının belli bölgelerinde, erkek üreme sisteminde bulunmaktadır (Shima, 1984; Vaananen, Paloniemi, ve Vuori, 1985; Frémont, Charest, Côté, ve Rogers, 1988; Zheng, Rahkila, Vuori, Rasi, Takala, ve Väänänen, 1992; Sly ve Hu, 1995).

1.3.1.2 İnsan CAIII Geninin görevleri

CAIII'ün farklı fizyolojik görevleri vardır. CAIII pre-adipoz dokuda önemsiz derecede ifade olurken, farklılaşma sonrasında çok fazla miktarda ifade olmaktadır. Beyaz adipoz dokunun toplam sitozolik proteinlerinin % 24'ü CAIII'dür (Lynch, Brennan, Vary, Carter, Dodgson, 1993). Bu durumda CAIII'ün yağ asit metabolizmasında görevli olduğunu belirtmektedir. CAIII, glikolitik ara ürünlerinden oksaloasetatın ve sitratın hızlı dönüşümünü kolaylaştırıp ve bunların yağ asit metabolizmasına katılmasını sağlar. Ancak obez farelerdeki CAIII miktarı, zayıf farelere oranla daha düşüktür (Kim, Lee, Wetzel, Geers, Robinson, Myers, 2004; Feng, Jin, 2016). Sıçanlarda adipoz dokusunda yapılan çalışmada Leptin ve insülinin CAIII ekspresyonunu etkilediği; leptinin azalttığı, insülin ise arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar gösteriyor ki obezitede CAIII ekspresyonunun azaldığı ve hiperleptenimia ile regüle olmaktadır (Alver, Ucar, Keha, Kalay, Ovali, 2004). CAIII Asetil-CoA'yı malonil-Coa'ya dönüştürmek için Bikarbonat iyonunu oluşturur bu mekanizmada lipogenezis için gereklidir. Yağ asit sentezinde leptinler inhibe edildiğinde CAIII ekspresyonu üzerindeki leptin etkisi ortadan kalkar (Gibson,

Titchener, Wakil, 1958; Stanton, Ponte, Coleman, Snyder, 1991; Lynch, 1993). Ayrıca CAIII'ün ifadesi anahtar metabolik hormon olan insülin ile değişmektedir (Lynch, 1993). Adipoz dokuda insülin nedeniyle CAIII mRNA seviyesi artmaktadır. Sıçanlarda streptozotosin enjeksiyonu yoluyla insülin azaldığında, karaciğerindeki Car3 proteininin de azaldığı görülmektedir (Dodgson, Quistorff, Ridderstrale, 1993; Bauer, Hamm, Bonaus, Jacob, Jaekel, Schorle, 2004; Zhang, Xu, Zhou, He, Zhai, 2011).

CAIII reaktif oksijen radikallerinin yok edilmesinde ve iskelet kası ve karaciğerde oksidatif stresin neden olduğu hasardan hücreleri korumada rol alır. Hidrojen iyonlarının artışı, reaktif oksijen türleri (ROS) ve ATP'nin azalması kas yorgunluğunun önemli nedenleri olarak kabul edilmiştir. İlginç olarak, CAIII hücre içi pH'yı düzenleyen ve organizmalarda uygun asit-baz dengesini sağlamada önemli rol oynayan hidrase aktivitesine sahiptir. Ayrıca, CAIII hücreleri oksidatif hasardan koruyabilen antioksidatif bir etkiye de sahiptir (Cabiscol, 1995; Raisanen, Lehenkari, Tasanen, Rahkila, Harkonen, ve Vaananen, 1999). CAIII proteininin yüzeyinde bulunan iki sistein rezidüsünde S-glutamilasyon etkisiyle hepatositleri oksidatif strese korur. Glutasyon etkisi ile hidrojen peroksit, peroksiradikal ve hypochlorous asit gibi oksidantlar sistein rezidülerinde geri dönüşümsüz olarak sistidin sulfonik asit ve sisteik asit dönüşür. GSH varlığında, proteinde herhangi bir hasar oluşmadan CAIII'ün sistein rezidülerinde S-glutasyon aktivitesi oluşur (Li, Chai, Zhao, Thomas, ve, Hendrich, 1994; Thomas, Poland, ve., Honzatko, 1995). Hücre oksidatif strese girdiğinde, CAIII hızlıca glutatyonla gider. CAIII'ün overekspres edildiği hücrelerde, hücreler H₂O₂'in indüklediği pro-apoptotik ve anti-proliferatif etkiden korunmuştur. Yaşlı sıçanlarda yapılan çalışmada glutatyon seviyesinin azaldığı yerlerde oksitlenmiş CAIII miktarının arttığı gözlenmiştir. CAIII oksidatif fosforilasyon ve enerji metabolizmasında da görevli olabilir. Örneğin, CAIII eksikliği mitokondiri tarafından gerçekleştirilen ATP sentezini azaltmaktadır (Davies, Quantanilla, Brooks, ve Parker, 1982; Jenkins, 1988; Cabiscol, ve Levine, 1995).

Erkeklerde, kasa spesifik protein havuzunun büyük bir kısmını iyon dengesini ve asit-baz homeostazisinden görevli CAIII oluşturmaktadır. CAIII'un omurgalı iskelet kaslarında (TipI liflerinde) yüksek miktarlarda ifade olmaktadır. Sitozolik bir

protein olan CAIII, kastaki proteinlerin % 10'unu oluşturur. Sarkoplazmanın ana bileşenlerinden biridir olan CAIII, kas dokusu 7 mg/g civarında bulunmaktadır. Erkekler iskelet kaslarında hem Tip II (beyaz), hem de Tip I (kırmızı) fiberlerin yapısında gözlemlenmektedir. Tip II (Beyaz) fiberler, glikolitik aktivite bakımından zengindir. Tip I (Kırmızı) fiberler ise myoglobin ve düşük ATPaz aktivitesi ile karakterizedir. Kaslar vücuttaki dağılım ve fiber yapılarına göre değişiklik gösterir. Bu bağlamda kaslardaki CAIII miktarı Tablo 1.2' de görüldüğü gibi belirlenmiştir. (Robert-Pachot, vd., 2007a; Robert-Pachot, vd., 2007b) İnsanlarda da, CAIII özellikle iskelet kasına spesifiklik göstermektedir. CAIII'ün Tip I fiberlerinde, Tip II'ye göre oldukça fazla konsantrasyonda bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca insanda CAIII, düz kasta, kalp ve akciğerde düşük seviyelerde de olsa gözlenmiştir (Jeffery, Edwards, ve Carter, 1980; Lloyd, McMillan, Hopkinson, ve Edwards, 1986). CAIII'ün fiziksel rolü araştırmak için, farelerde fonksiyonel Car3 geni delesyona uğratılmıştır. Car3'ü susturulmuş bu fareler incelenmiş ve anormal bir görüntü oluşmadığı, doğurgan oldukları ve normal yaşam döngülerini sürdürdükleri gözlenmiştir. Ana sorun ise şu olmuştur, kas hücrelerinde farklılaşma gözlenmemiş ve hasar durumunda iyileşme olmamıştır. Susturulmuş farelerde kas fonksiyonlarında kusurlar meydana gelmiştir. Bunuda kaslarda mitokondriyal ATP sentezinde hasar oluşturarak yapmaktadır (Robert-Pachot, vd., 2007a; Robert-Pachot, vd., 2007b)

CAIII ün Tip I fiberlerinde konsantrasyonunun oldukça yüksek olmasının rabdomiyolisiz ve nöromusküler hastalıklarla direk olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle nöromusküler hastalıklarda kandaki CAIII miktarı oldukça artmaktadır. Bu enzim kas hasarlarından sonra artış göstermektedir. Ayrıca serumdaki miyoglobin/CAIII miktarındaki oran kalp krizinin erken teşhis belirtecidir. İskelet kasında yüksek ekspresyon gösteren CAIII kalp kası, adipoz dokuda, sindirim sistem dokuları, tükürük bezleri, prostat, süt bezleri gibi dokularda da düşük miktarda mevcuttur. CAIII'ün dokulardaki dağılımı Tablo 1.2'de gösterilmektedir (Shiels, Jeffery, Phillips, Shephard, Wilson, Carter, 1983).

Doku hasarı esnasında, çizgili kaslardan CAIII ve miyoglobin salınır. Miyokardiyal infeksiyonlarda miyoglobin salınımı doku hasarında önemli bir belirteçtir fakat miyokardiyal infeksiyonlara spesifik değildir. Bu belirtecin özgünlüğünü artırmak için aynı zamanda CAIII seviyesi de ölçülmektedir.

Miyogloblin/CAIII oranı, miyokardiyal infeksiyon geçiren hastalarda önemlidir (Kim, Selengut, ve Levine, 2000).

Tablo 1.2 : İnsan CAIII geninin dokulardaki dağılımı (Shiels, A., vd., 1983).

DOKU	CAIII ($\mu\text{g/g}$ dokuda)
Beyin	0
Timus	0
Dalak	0
Karaciğer	Eser Miktarda (2 $\mu\text{g/g}$)
Rahim	20
Mesane	20
Akciğer	35
Kalp kası	70
İskelet kası	
Vastus lateralis	6550
Soleus	6284
Gastrocnemius	5957

Mesodermal kökenli hücrelerin kas hücrelerine farklılaşması olan “Miyogenez” de üç faz bulunmaktadır. İlk faz, mononükleus yapısındaki miyoblastın multinükleus yapısındaki miyotüblere dönüşümüdür. İkinci faz, kasılabilen yapının ortaya çıkması ve morfogenezis ile kas yapısının belirmesidir. Son faz ise, özgün kas fiberlerinin yetişkin kas fiberlerine farklılaşmasıdır. Bu farklılaşmanın sağlanması tamamen hormonal ve nöronal sinyaller aracılığıyla olur (Zenke, Grunstrom, Mattes, Wintzerith, Schatz, Wildeman, Chambon, 1986; Tweedie, Morrison, Charlton, Edwards, 1991).

Erkek sıçanlarda karaciğerdeki CAIII’ün konsantrasyonu dişilere oranla oldukça yüksek seviyelerde bulunduğu belirlenmiştir. CAIII’ün androjen bağımlı olup olmadığı radioimmunosorbet tekniği ile araştırılmıştır. Hadım edilmiş sıçanlardaki CAIII seviyesinin düşerek, dişilerle neredeyse aynı seviyede ifade olduğu, hadım edilmiş bu erkek sıçanlara dışarıdan testosteron uygulandığında ise

CAIII seviyesinin yeniden artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu ifadenin de hipotalamus-hipofiz-karaciğer yoluyla olduğu düşünülmüştür. İmmunohistokimyasal deneylerle CAIII'ün hepatositlerde regüle olduğu gösterilmiştir (Vaananen, Takala, ve Morris, 1986).

Fareleri total pankreas hücre ekstraktlarında yapılan çalışmada CAIII gözlenmemesine rağmen pankretik α -hücrelerinin langerhans adacıklarında CAIII rastlanılmıştır. CAIII'ün pankreastaki fonksiyonu oldukça merak edilen bir konudur. Daha önce yapılan çalışmalarda CAI'inde pankreasta bulunduğu ve fonksiyonunun endokrin hücre popülasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak CAIII'ün fonksiyonu ile ilgili bir çalışma yoktur (Tweedie, ve Edwards, 1989).

Fetal ve yeni doğmuş bebeklerdeki CAIII seviyeleri incelendiği zaman ise, 10 haftalık fetal kaslarda CAIII'ün ifade olmaya başladığı ancak 15 haftalık olana kadar önemli miktarda sentezlenmediği gözlenmiştir (Wistrand, Carter, ve Asmark, 1987). CAIII seviyesi 30 hafta süreyle takip edildiğinde, enzim seviyesinin hızla yükseldiği; bebek doğduğunda ise kaslardaki enzim seviyesinin yetişkinlerdeki oranın yarısına ulaştığı gözlenmiştir (Lloyd, Brownson, Tweedie, Charlton, ve Edwards, 1987). Kas gelişiminde CAIII ekspresyonunun ikinci fazı, miyotom farklılaşması sırasında başlar ve bütün iskelet kaslarının gelişim süresince devam eder. Hamileliğin geç dönemlerinde, CAIII boyun ve etrafındaki yağ hücrelerinde ekspre olmaktadır. Doğum sonrasında ise iskelet kasında, yetişkin beyaz yağ dokusunda ve intervertebral diskte CAIII proteini yüksek seviyelerde bulunmaktadır (Jeffery, Wilson, Mode, Gustafsson, ve Carter, 1986). Görüldüğü gibi CAIII ekspresyonu embriyogenesisin erken evreleri sırasında mezodermal kökenli dokularında dikkat çekici hale gelmektedir ve bu da, CAIII'ün sahip olduğu fosfotaz aktivitesinin farklılaşma sırasında spesifik rol oynadığını ve defosforilasyon ile protein fonksiyonlarına aracı olması gibi özelliklerini akla getirmektedir (Kim, Selengut, ve Levine, 2000).

CAIII diğer CA'larla bağlantılı haldedir, örneğin otoimmün yanıtta CAII ile ilişkilidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, romatoid artrit (RA) hastalarının serumlarındaki otoantikörlerin CAIII miktarını direk olarak etkilediği gözlenmiştir. RA hastalarının sinaviyal membranlarında CAIII'ün aşırı ifade olduğu ancak non-RA

hastalarda bu durumun gözlenmediği görülmüştür. Bu sonuçlarda bize CAIII'ün hücreleri oksidatif hasardan korumak için fizyolojik yanıt oluşturduğunu ve anti-CAIII antikoru uygulandığında CAIII'ün koruyucu etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir (Maclin, ve Bendich, 1987; Thomas, vd., 1995).

1.3.1.3 Karbonik Anhidraz III (CAIII) ve Kanser

Son yıllarda yapılan CAIII ün kanser ile olan ilişkisi üzerinde durulmaktadır. CAIII özellikle Karaciğer karsinomda (HCC) hücre içi veya hücre dışı asidifikasyon aracılığıyla, FAK sinyal yolu üzerinden hücrelerin invazyonunu arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir ve CAIII ekspresyonunun önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin metastas ve invazyon kabiliyetlerini arttırdığı gösterilmiştir (Dai, Hong, Liang, Yan, Lai, Cheng, ve Chuang, 2008). CAIII'ün insan hepatosellüler karsinomada (HCC) ki ekspresyon seviyesi incelendiğinde, CAI ve CAII gibi normal dokudaki ekspresyon seviyesine nazaran azaldığı ayrıca CAIII'ün overekspresyonu ile ekstrasellüler ve intrasellüler matrikte asidik pH'ın arttığı gözlemlenmiştir. Düşük pH seviyesi hücre canlılığı, migrasyonu ve yayılmasında önemli rol oynayan Fokal Adezyon Kinaz (FAK) yolağını aktive etmektedir (Owens, Xu, Craven, 1995; Bouchard, Demers, Thibodeau, 2007). Kuo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada öne sürdükleri hipotez, metastatik progresyondaki HCC'nin geç evrelerinde CAIII tekrar ifade edildiğinde karaciğer kanserinin metastatik gelişiminde önemli bir yanıt oluşabileceği üzerindedir (Kuo, Chiang, Yang, 2003). Yaptıkları çalışmada HCC hastalarındaki CAI, CAII ve CAIII seviyesinde sağlıklı bireylere oranla azaldığını göstermiştir; bu azalış özellikle CAII ve CAIII'de oldukça fazla olduğu gözlenmiştir (CAI % 10.9, CAII % 21.8, CAIII ise % 22.9 oranında azalış gösterir). CAIII'ün bu azalışı HCC ile ilişkilendirildiğinde ise karşımıza şöyle bir tablo çıkmaktadır; CAIII sahip olduğu 2 sülfidril grubu sayesinde hücreleri oksijen radikallerinden koruyarak, oksidatif stres de apoptozis ya da bir diğer adıyla programlanmış hücre ölümünü düzenleyerek kanser gelişimini engelleyici mekanizma gösterir (Dai, vd., 2008)

Aslında Karbonik Anhidrazların kanserle ilişkisi, sadece CAIII ile değil özellikle membran bağlı izoenzimler olan CAIX ve CAXII için de gösterilmiştir. CAIX ve CAXII nin kanserde özellikle hipoksik koşullarda ifadesinin arttığı ve ekspresyonunun kanserde kötü prognozla beraber eşlik ettiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle CAIX kanserde prognostik marker olarak kullanılabileceği ile ilgili pek çok çalışmada önerilmiştir (Nogradi, 1998; Whittington, Waheed, Ulmasov, 2001; Robertson, Potter, Harris, 2004). CAIII ün kanserle bağlantısı üzerine sınırlı çalışma olduğu göze çarpmaktadır.

1.3.1.4 Karbonik Anhidraz III (CAIII) Geninin Transkripsiyonel regülasyonu

CAIII ekspresyonu hakkında çok sınırlı bilgi bulunmasına rağmen gen transkripsiyonunun regülasyonu ile ilgili ana bilgiler bilinmektedir. CAIII 10 kb'lık genomik bölge tarafından kodlanmaktadır CAIII 1987 tarihinde klonlanmıştır. 631 bp'lık promoter yayınlanmıştır. Bu çalışmada CAIII promotorunun 631 bp'lık kısmı genomik dizileme ile aydınlatılmış ancak CAIII transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (Lloyd, 1986; 1987). CAIII'ün son eksonun 3' ucu ile CAII geninin 5' ucu birbirleri üzerine denk gelmektedir. Bu iki gen arasındaki fiziksel bağlantı, birbirlerinin regülasyon seviyelerini etkilemektedirler (Lloyd, 1986;1987).

İnsan CAIII geninin proksimal promotoru birçok özellik bakımından CAII geni ile ortak özellik göstermektedir. Her iki geninde Sp1 dizilerini içeren korunmuş üst dizi bölgeleri ve TATA kutuları % 90 oranında tanımlanmıştır. Ayrıca her iki promotorda "housekeeping" genlerle ilişkili olan CpG-zengin adalar bakımından da ortaktır. Ancak ekspresyon seviyelerine bakıldığında CAII geninin CAIII'e oranla daha fazla ekspre olduğu gözlemlenmektedir (Kadonga, Jones, ve Tjian, 1986).

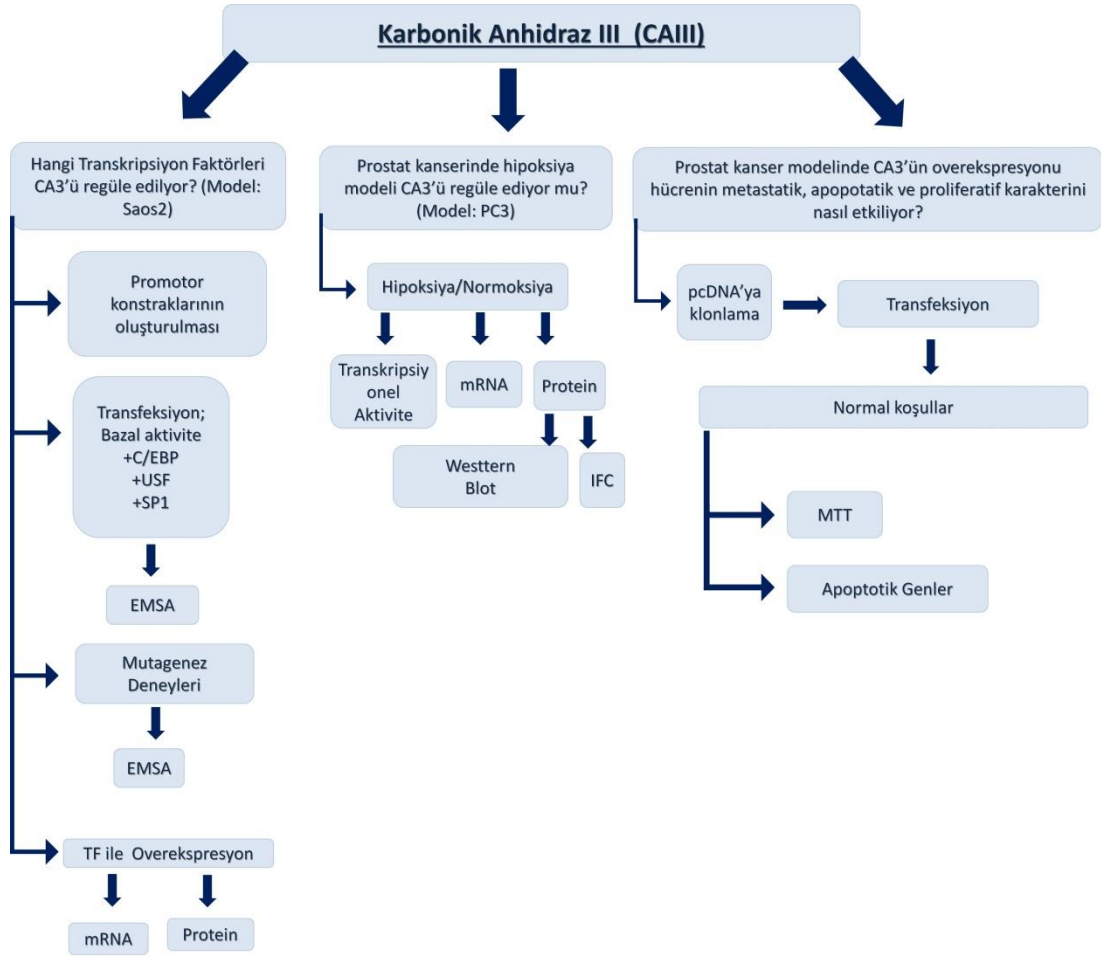
Sıçan CAIII promotor bölgesinin kas ekspresyonunu direk etkileyen cis-etkili dizileri içerdiği gösterilmiştir. -261 bp ile -7 bp arasındaki CAIII promotor parçası hücre transfeksiyon deneylerinde CAT haberci geninin ekspresyon seviyesini direk etkiler (Tweedie, vd., 1991)

2. TEZİN AMACI

Tez kapsamında literatürde çok sınırlı bilgi bulunan, özellikle transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili her hangi bir bilgiye rastlanılmayan İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) geninin transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatmayı amaçlanmıştır. Bu bağlamda tez kapsamında yapılanlar Şekil 2.1’de şematize edilmiştir. Sırasıyla;

- (i) İnsan Karbonik Anhidraz III genini hangi transkripsiyon faktörlerinin regüle ettiğini belirlemek amacıyla -941/+86, -699/+86, -236/+86 ve -108/+86 olmak üzere 4 farklı delesyon promotör konstrağı oluşturulmuştur.
- (ii) Klonlanan CAIII promotör bölgesine ait gen bankası dizisi oluşturuldu. CAIII Promotorunun CpG adalarının analizi, transkripsiyonun başlama noktası, DNA’ya bağlanan transkripsiyon faktörlerinin analizleri gerçekleştirildi.
- (iii) CAIII promotörüne ait bazal aktivitenin belirlenmesi amacıyla prostat kanser (PC3) ve osteosarkoma (Saos-2) hücre hatlarında -941/+86, -699/+86, -236/+86 ve -108/+86 promotör parçalarının transfeksiyonları gerçekleştirildi.
- (iv) Transkripsiyon faktörlerinin CAIII promotör aktivitesi üzerindeki etkilerin belirlenmesi amacıyla seçilmiş (SP1, USF ve C/EBP α) olan transkripsiyon faktörlerinin osteosarkoma, kolon kanser ve prostat kanser hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi.
- (v) Etki görülen promotör konstraklarında, hedef bölgeler seçilmiş ve bu bölgelere özgü EMSA primerleri dizayn edilerek hedef bölgelere bağlanan USF1, SP1 ve C/EBP α transkripsiyon faktörleri yarışmalı EMSA deneyleri ile belirlenmiştir.
- (vi) Osteosarkoma ve prostat kanser hücre hattına seçilen tekniklerle dışarıdan verilen USF1, C/EBP α ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin CAIII geninin mRNA ve protein seviyesindeki ifaedeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Real-Time PCR ve Western blot analizleri gerçekleştirildi.

- (vii) CAIII mRNA'sının Hipoksik ve Normoksik şartlardaki ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla osteosarkoma (Saos2), iki farklı prostat kanseri (DU145, PC3) ve hepatosellüler karsinoma (Hep3B) hücre hatlarında hipoksik ve normoksik modeller oluşturularak zamana bağlı mRNA seviyesi değişimleri Real-Time PCR ile belirlenmiştir.
- (viii) CAIII Proteinin Hipoksik ve Normoksik şartlardaki ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla osteosarkoma (Saos2) ve iki farklı prostat kanseri (DU145, PC3) hücre hatlarında hipoksik ve normoksik modeller oluşturularak protein seviyesi değişimleri IFC tekniği ile belirlenmiştir.
- (ix) CAIII Proteinin Hipoksik ve Normoksik şartlardaki ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla prostat kanseri (PC3) hücre hattında hipoksik ve normoksik modeller oluşturularak protein seviyesi değişimleri Western Blot tekniği ile belirlenmiştir.
- (x) CAIII'ün Hipoksik ve Normoksik şartlardaki ekspresyon farkının belirlenmesi amacıyla osteosarkoma (Saos2) ve prostat kanser (PC3) hücre hatlarında promotor konstraklarının bazal aktiviteleri belirlenmiştir.
- (xi) CAIII cDNA'sının ektopik ekspresyon çalışmaları için cDNA dizisi semi-kantitatif RT-PCR tekniği ile çoğaltılarak, pcDNA 3.3. TOPO vektörüne (Invitrogen) klonlanmıştır.
- (xii) CAIII cDNA'sının ektopik ekspresyonunun proliferatif etkisi prostat kanser hücre (PC3) hattında belirlenmiştir.
- (xiii) CAIII cDNA'sının ektopik ekspresyonu ile prostat kanser hücre (PC3) hattındaki apoptotik genlerin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.



Şekil 2.1: Doktora tez amacını açıklayan diyagram.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Makine ve Teçhizat

Doktora tezi kapsamında kullanılan makine teçhizat ve markaları Tablo 3.1’de belirtimiştir.

Tablo 3.1 : Kullanılan araç-gereçler ve Markaları.

Cihazın Adı	Markası
Elektroforez tankı	Apelex, İngiltere
Elektroforez için güç kaynağı	Consort/İngiltere
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica/ İspanya
pH metre	WTW/Almanya
Isıtıcı blok	FALC/İtalya
Thermo cycler	Techne progene, İngiltere
Mikro santrifüj	Sigma laborzentrifügen, Almanya
Sıcak Su banyosu	Elektromag/Türkiye
Vorteks	Elektromag/Türkiye
Buz makinesi	Fiocchetti, İtalya
Buzdolabı(-20) ve(+4)	Profilo/Türkiye
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL,Almanya
Santrifüj	Hettich Zentrifügen, Almanya
Luminometre	Thermo

Tablo 3.1 (devamı) : Kullanılan araç-gereçler ve Markaları.

Light cycler 485	Roche Diagnostic
Qubit florimetre	İnvitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1/(Comecta Sa)
Otoklav	Hirayama/Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging system
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
-80°C derin dondurucu	Thermo
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair
Horizantal çalkalayıcı	GFL, Almanya
Laminar air flow	TelstarBİOII/ İspanya
Mikroskop	Nikon eclipse

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Doktora tezi süresince kullanılan kimsayallar ve kitler Tablo 3.2’de belirtilmiştir. Kullanılan vektör sistemleri Tablo 3.3’de, kullanılan bakteri soyları ise Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 : Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar.

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
T4 DNA ligaz	NEB, Fermentas
Ligaz buffer	NEB, Fermentas
Restriksiyon endonükleazlar (XhoI, HindIII, BamHI, SacII, PstI, EcoRI)	NEB, Fermentas
Amfisilin antibiyotiği	Sigma
Kanamisin antibiyotiği	Sigma

Tablo 3.2 (devamı) : Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar.

LB broth	Pronadisa
Agar	Pronadisa
10mm petri plakaları	isolab
50 ve 15mL falkonlar	isolab
Mini prep küçük ölçekli plazmit izolasyon kiti	Fermentas
Maxi prep büyük ölçekli plazmit izolasyon kiti	Fermentas
Jelden geri purifikasyon kiti	Fermentas
Proteinaz K	Sigma
Sature Amonyum asetat (NaAc)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
EDTA	Sigma
Tris base	Sigma
Kuvartz 96-kuyulu plaka	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Agaroz	Fluka
Borik asit	Merck
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Fermentas
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas
Taq+KCl Tamponu	Fermentas
Taq polimeraz	Fermentas
Betain	Sigma
7-deaza GTP	İnvitrogen
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Gliserol	Merck
6X yükleme boyası	Fermentas

Tablo 3.3 : Klonlama ya da Transfeksiyon aşamasında kullanılan Vektörler ve Temin edildikleri firmaların adları.

Vektörün adı	Temin edilen Firmanın adı
pGEMT®easy	Promega
pMetLuc Reporter	Clontech Laboratories
pMetLuc Kontrol	Clontech Laboratories
Seap-2 kontrol	Clontech Laboratories
pcDNA™3.3-TOPO™	Life Technologies

Tablo 3.4 : Transformasyon aşamasında kullanılan Bakteri Soyları.

Bakteri suşları	Genotip
XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]
DH5-α	dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1

Tablo 3.5 : Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitler ve kimyasallar.

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Highclone/Gibco
FCS (Fetal Sığır Serum)	Highclone/Gibco
L-Glutamin	Highclone/Gibco
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Highclone/Gibco
Tripan mavisi	Highclone/Gibco
75 ve 25cm ² 'lik flasklar	Corning
10-25 mL Serolojik pipetler	Corning

Tablo 3.5 (devamı) : Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitler ve kimyasallar.

0,22 mikron filtre	Sartorius
0,45 mikron Büyük filtre	Sartorius
50-15 mL falkon	Corning
Bovin serum albumin	Sigma
Tripan mavisi	Sigma

Tablo 3.6 : Kullanılan hücre hatları ve Temin edilen kaynakları.

Hücre Adı	Temin edilen Kaynak
Hep3B (Human Hepatoma Cell line)	Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi, İNGİLTERE
Mg-63(Human Osteosarcoma Cell line)	Cardiff Üniversitesi (İngiltere) Dr. Kenneth Brown
Saos-2 (Human Osteosarcoma Cell line)	Cardiff Üniversitesi (İngiltere) Dr. Kenneth Brown
PC3 (Human prostate cancer cell line)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ
DU-145 (Human prostate cancer cell line)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Tablo 3.7 : RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları.

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
RNA izolasyon kiti	Fermentas
MOPS	Merc
DEPC	Sigma
Formaldehit	Sigma
Reaksiyon tamponu	Fermentas

Tablo 3.7 (devamı) : RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları.

oligodT	Fermentas
Ribolock inhibitörü	Fermentas
Geri Transkriptaz enzimi	Fermentas

Tablo 3.8 : Protein çalışmalarında kullanılan Kimyasallar ve Temin Edildikleri Firmaların Adları.

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
Trizma Base	Sigma Aldrich
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck
Glisin	Merck
Metanol	Merck
Akrilamit- Bisakrilamit	Fisher Scientific
Yağsız Süt tozu	Chem Cruz
Tween -20	Sigma Aldrich
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
Gliserol	Merck
2-Merkaptoetanol	Sigma
ECL	Pierce
PVDF membran	Milipore
Page ruler plus prestained Ladder	Fermentas
Amonyum persülfat	Merc

Tablo 3.9 : Kullanılan Antikorların İsimleri ve Temin Edildikleri Firmaların Adları.

Antikor adı	Antikor tipi	Temin edilen firma ve katalog no
CAIII Poliklonal Antikor	Primer	Pierce/ PA525977
İnsan anti- β aktin Tavşan poliklonal antikor	Primer	Abcam / ab8227
Keçi tavşan karşıtı sekonder antikor	Sekonder	Abcam / ab97069
Keçi fare karşıtı IgG/HRP	Sekonder	Santa cruz
Alexa flour 488 tavşan karşıtı t antikor	Sekonder	Life Technologies

3.2 Metod

3.2.1 Ortam sterilizasyonu ve malzeme temizliği

DNAz, RNAz, proteaz ve mikrobiyal bulaşmalardan arınmak amacıyla otoklava dayanıklı bütün plastik ve cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, PCR tüpleri, bakteri sıvı ve katı kültür ortamları 121°C' de 20 dk (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Otoklavdan alınan ve nemli kalması sterilizasyon bakımından sorun yaratabilecek bütün malzemeler (Tampon ve besiyerleri hariç) 80°C'ye ısıtılmış kurutma fırınında bekletildi ve 24 saat sonra deneyde kullanıldı.

Hücre kültürü laboratuvarının sterilizasyonu için yedi günde bir düzenli olarak sırasıyla Sodyum hipoklorid, Biacon-A ve etil alkol (%70) ile temizlendi. Haftanın belirli günlerinde Ultra Viyole (UV) ışığı açılarak, oda içindeki havanın ve çalışma alanının sterilizasyonu sağlandı. Ayrıca yine haftanın belirli günlerinde laminar flow içindeki UV lambası açılarak, kabin içi sterilizasyon sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat çalışma ortamının hazırlığı için laminar flow açıldı. Çalışma boyunca oda da bulunan hava sterilizasyon cihazı gün boyunca çalıştırılarak hücre kültür odasının havasının sürekli steril kalması sağlandı. Ayrıca

gün içinde klima ile oda ısısının düşük seviyelerde tutulması sağlanarak sıcaklığa bağlı mikrobiyal gelişimlerinin önüne geçildi.

3.2.2 Bakteri Tabanlı Teknikler

3.2.2.1 Bakteriyal Hücre Soyları ve Kültür Ortamları

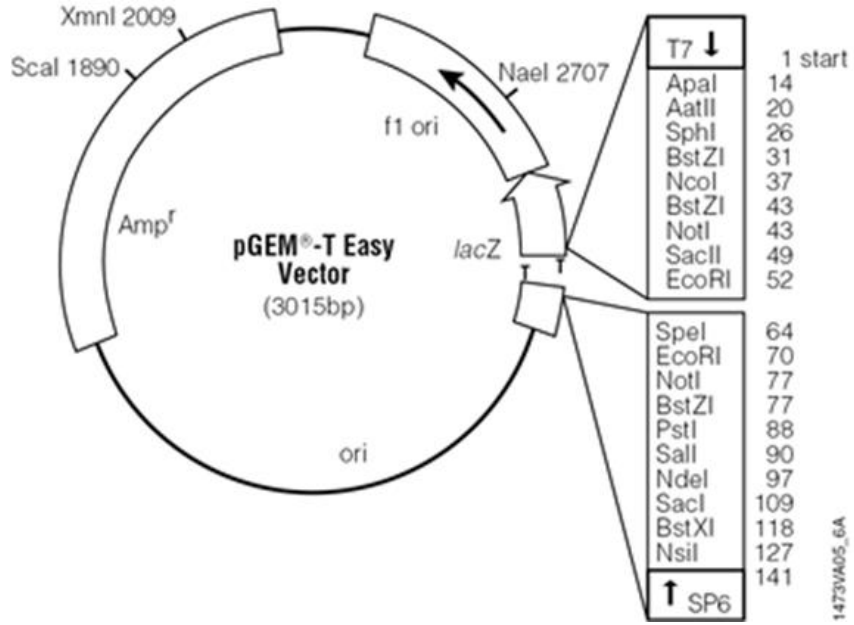
Promotor ve gen klonlamaları için *Escherichia coli* (E.coli) DH5 α ve XL-1 Blue süper kompetent soyları kullanıldı. *E.coli*'nin üreme ve büyümesini sağlayan besi ortamı olan Luria-Bertani (LB) ve Luria-Bertani (LB) Agar kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan toz formundaki bakteriyel medyalar dH₂O içinde önerilen şekilde çözüldü ve steril edilmek için otoklavlandı.

Kültürlerde kullanılan Ampisilin stokları 100 mg/mL olacak tarzda, Kanamycin stokları ise 50 mg/mL olacak tarzda steril dH₂O ile hazırlandı. Antibiyotik solüsyonları 0.22 mikronluk filtreler kullanılarak steril edildi.

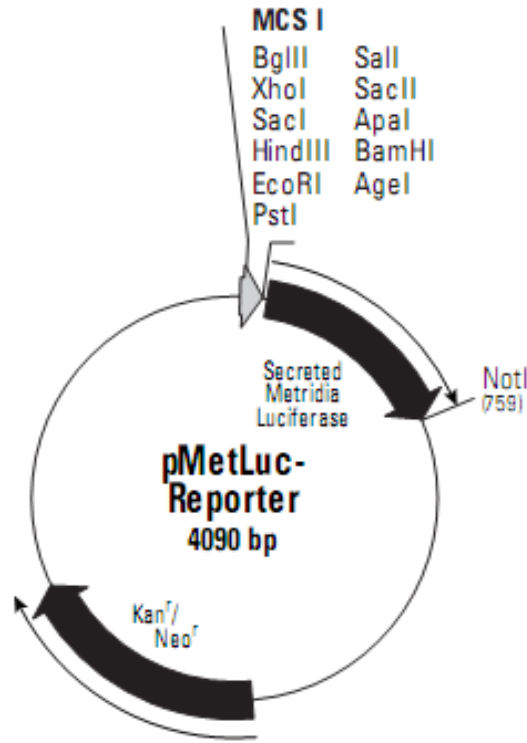
3.2.2.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler

İnsan CAIII promotoruna ait belli uzunluktaki DNA parçasının içeren Promega firmasından temin edilen pGEM-T Easy vektörü (Şekil 3.1), promotor konstraklarının aktivitelerini belirlemek için farklı uzunluklara ait delesyon alt klonlamayla promotor parçaları pMetLuc Reporter (haberci gen vektörü)'a klonlandı (Şekil 3.2). Ayrıca pMetLuc Kontrol vektörü pozitif kontrol olarak transfeksiyon etkinliğini belirlemek için kullanıldı (Şekil 3.3). Normalizatör vektör olarak ise hücrelere pSEAP/Kontrol transfekte edildi (Şekil 3.4) ve kuyucuklarda 0.5 μ g plazmit olacak şekilde transfekte edildi.

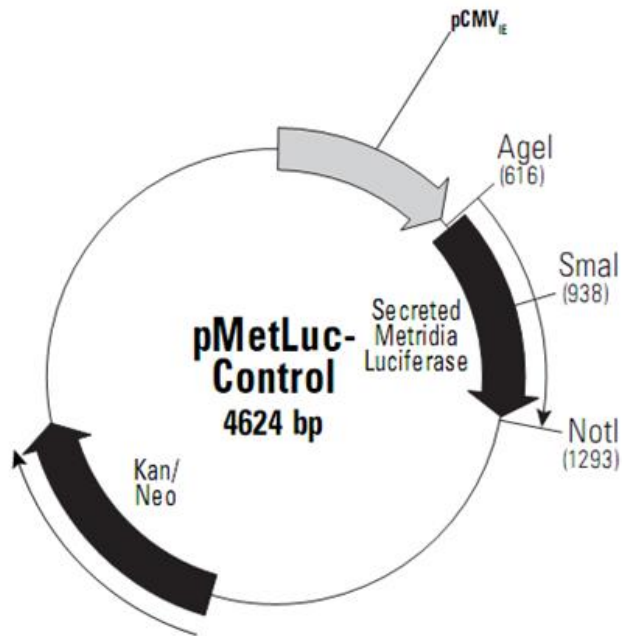
İnsan CAIII Genine ait DNA dizi ise pcDNA3.3-TOPO vektörüne klonlanmıştır. Restriksiyon Endonükleazlarla linner hale getirilen rekombinant vektör seçilen hücre hattına transfekte edilerek, CAIII geninin çekirdek DNA'sına entegre olması sağlanmıştır (Şekil 3.5).



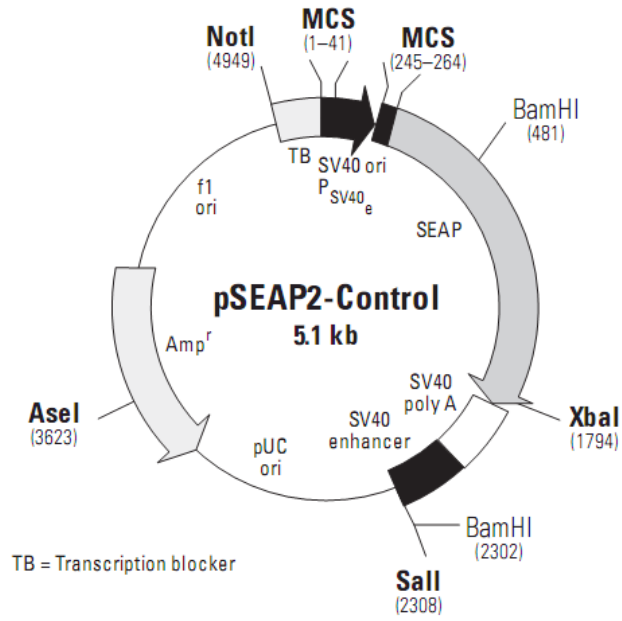
Şekil 3.1: pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.



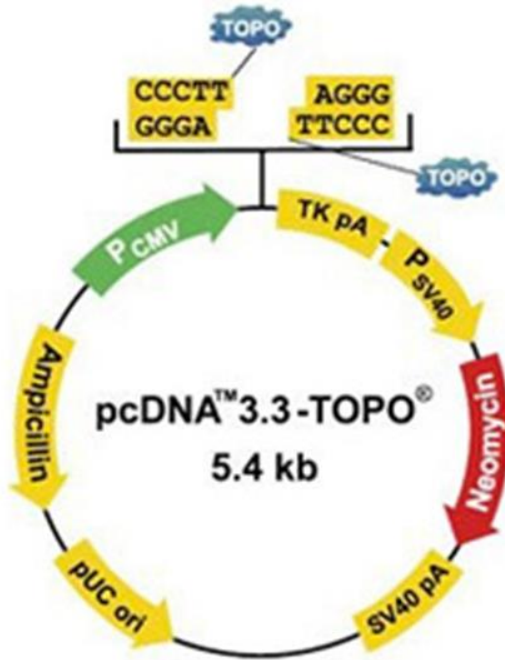
Şekil 3.2 : Klonlamada ve tranfeksiyonda kullanılan pMetLuc Reporter vektörünün şematik gösterimi.



Şekil 3.3 : Transfeksiyonda kontrol amaçlı kullanılan pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi.



Şekil 3.4 : Transfeksiyonda kontrol normalizatör amaçlı kullanılan pSEAP2-kontrol vector sisteminin şematik gösterimi.



Şekil 3.5 : Klonlamada kullanılan pcDNA3.3 Topo Gateway vektörün şematik gösterimi.

3.2.2.3 Bakteriyel Besiyerinin Hazırlanması

Bakteriyel çalışmalarda bakterilerin üremesini ve büyümesini sağlamak için LB kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilen sıvı besiyeri önerilen şekilde dH₂O'da çözüldü ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Soğuması beklenerek, gereken durumlarda da opsiyonel olarak antibiyotik eklenip kullanıldı.

LB-agar, bakteriyel çalışmalarda katı besiyeri olarak kullanıldı. LB-Agar firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O'da çözüldü. 121°C'de 20 dk otoklavlandı ve kendi kendine soğuması için oda ısısında bırakıldı. Seçici ortam yaratmak amacıyla Amfisilin (100 µg/mL) veya Kanamycin (30 µg/mL) olacak şekilde eklenerek karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında, alevin oluşturduğu zon içerisinde petri kaplarına dökülerek katılaşması beklendi. Katılaştıran besiyerlerini içeren petri ters çevrilerek ağızları hava almayacak şekilde parafilm ile sarıldı ve sonra +4°C'de buzdolabında alüminyum folyaya sarılarak ışıktan korundu.

3.2.2.4 Kompetant Hücre Hazırlanması

Transformasyon deneylerinde kullanılmak üzere DH5α veya XL-1Blue *Escherichia coli* hücreleri kompetant hale getirildi. Katı besi yerine tek koloni ekim yapıldı. 16-24 sa 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Petri içinden tek koloni seçilerek 20.000 µL sıvı besiyerine ekim yapıldı, 16-24 sa 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. 500 mL'lik hacimli erlene 250 mL taze besiyeri eklendi ve önkültürden 15 mL inoküle edildi. Etüvde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Belirli zaman aralıklarında kontrol edilerek, OD₆₀₀ 0.5 ile 0.6 arasına ulaşmaya kadar beklendi. Bakteri süspansiyonu 5000 rpm de 20 dk 4°C'de santrifüj yapıldı. Pellete dikkat edilerek üst sıvı kısım pipetle çekildi ve atıldı. Başlangıç hacminin yarısı kadar 0.1 M CaCl₂ eklenerek, pellet nazikçe çözüldü. Süspanse haldeki hücreler 25 dk buz üzerinde inkübe edildi. 25 dk'nın sonunda 5 dk 3000 rpm'de 4°C'de santrifüj yapıldı. Üst sıvı faz dikkatle uzaklaştırılarak başlangıç hacminin yaklaşık 1/10'u kadar 0.1 M CaCl₂ eklendi ve pellet çözüldü. Yaklaşık 4 sa arasında buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda soğutulmuş ependorflara önce 200 µL % 40'luk steril gliserol daha sonra kültürden 200 µL ilave edilerek alikot edildi. Her ependorf etiketlenerek -80°C dondurucuda stoklandı.

3.2.2.5 Ligasyon

pMetLuc haberci gen vektörüne alt klonlanması amaçlanan promotor fragmentleri 20 µL'lik son hacimde reaksiyon ortamına; DNA parçası (Klonlanmak istenen) ve pMetLuc vektörü (minimum 3/1 oranında olacak şekilde), 1 X T4 DNA Ligaz tamponu, 0.3 U/µL T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +4°C'ye ayarlanmış PCR cihazı içinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gece sonunda elde edilen ligasyon ürünü, kompetan hale getirilmiş DH5α ve XL-1 Blue (*E. Coli*) hücrelerine transforme edildi. Rekombinantların seçimi amacıyla seçici antibiyotiği içeren petrilere yayıldı.

3.2.2.6 Transformasyon

Kompetant hücreler -80°C'den dikkatle çıkarılarak buza konuldu. Yaklaşık 20 dak beklenerek hücreler buz üzerinde çözünmesi sağlandıktan sonra 150 µL kompetant hücre buz üzerinde soğutulan ependorfa alındı. Üzerine 6 µL transforme edilmek istenen plazmit eklendi. Buzda 50 dk inkübe edilen hücreler daha sonra 42°C su banyosunda 90 sn, 2 dk buzda bekletilerek ısı şoku uygulandı. Buz üzerinde bekletilen ısı şokunu tamamlamış hücrelere, 37 °C'ye ısıtılmış LB medyumdan 450 µL eklendi ve çalkalamalı inkübatörde 2 sa bekletildi. süre sonunda çoğalan kültür 5 dk 5000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 100 µL LB medyumda çözüldü ve petriye yayıldı. 15 dk süreyle inkübatörde düz olarak bekletilen petrilere süre sonunda hücrelerin büyümesi için 16-24 sa ters çevrilerek 37°C'deki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Antibiyotikle seçilimi sağlanan petri içinde oluşan kolonilerinden izole edilen plazmitler restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek, kesim sonrasında plazmitlerin rekombinant olup olmadığı belirlendi.

3.2.2.7 Küçük Ölçekli (Midi Prep) Plazmit İzolasyonu

Çalışmanın öncesindeki gece bakteri kültürü 37°C'de çalkalayıcı etüvde inkübe edilmiş. İstenen bakteri yoğunluğuna ulaşan önkültürden öncelikle gliserol stokların taze kalması amacıyla 500 µL % 40'luk gliserol ve 500 µL önkültür karıştırılarak gliserol stok hazırlandı ve -80°C'ye kaldırıldı. Kalan önkültür 2 mL'lik

ependorflara paylaştırılarak 5000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüjlendi. Toplamda 10 mL önkültürün santrifüjlenerek çöktürülmesinden elde edilen pellet GeneJet Plazmit minprep™ kitinin önerdiği şekilde 250 µL resüspanسیون tamponunda çözüldü. Ardından 250 µL lizis tamponu eklenerek, oda ısısında 4-5 defa ependorflar alt-üst edilerek vizkoz ve sümüksü yapının oluşması sağlandı. Sümüksü yapının oluşumu gözlemlendikten sonra 350 µL nötralizasyon tamponu eklenerek 4-5 defa alt-üst edilmiş ve beklemeden 13.500 rpm'de 5 dk süresinde santrifüjlendi. Hücre atıklarının oluşturduğu beyazımsı çöküntüye dokunmadan süpernatant dikkatlice Genejet kolona yüklendi ve 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı. Bu işlem süpernatant bitinceye kadar tekrar edildi. Yüklü kolonu 500 µL yıkama tampon eklenip, 1 dk santrifüj yapılarak 2 defa tekrar edilerek yıkandı. Yıkama işlemini takiben kolondaki etanol kalıntılarında kurtulmak amacıyla kolon bir kez daha boş olarak 2 dk süreyle santrifüjlendi. Son olarak kolon yeni bir ependorf tüpüne alındı ve 55°C civarlarına ısıtılmış 40 µL dH₂O ile elüsyon alındı. Elüsyon etiketlenerek -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.2.8 Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit İzolasyonu

Endotoksinlerden arındırılmış, temiz ve yüksek konsantrasyonda plazmit DNA'sının saflaştırılmasında büyük ölçekli plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific) kullanılmış ve izolasyon kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Önkültür için uygun antibiyotik LB besiyerine eklenerek, besiyeri içine tek koloni ekimi yapıldı. Önkültür 37°C'de bir gece boyunca 250 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Ertesi gün seçici antibiyotik içeren 250 mL LB medyuma önkültür aşılansarak kültür 37°C'de bir gece boyunca 250 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılarak istenen bakteri yoğunluğuna gelinmesi beklendi. Kültürün bakteri yoğunluğu istenen aralığa geldiğinde, kültür +4°C'de 6000 rpm'de 20 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen pellet kit protokünün önerdiği şekilde tamamlandı ve sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi. Elde edilen DNA elüsyonunun saflık ve miktar tayini Florimetrik ya da spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi. Elüsyonlar -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.3 Hücre Kültür Teknikleri

3.2.3.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

3.2.3.1.1 FCS Hazırlanması

Donmuş ve aktif halde ki FCS (Fetal Calf Serum, Highclone/Gibco) – 20°C’de saklanır. Stok haldeki FCS ilk kullanımdan önce 56°C’de 1 sa ısı ile inaktive edilir ve 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edilir. 500 mL’lik inaktive stok FCS, 50 mL’lik steril falkonlara bölünerek kullanıma hazır halde -20°C’de saklanır.

3.2.3.1.2 PBS Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması

Firmadan tablet formunda temin edilen PBS (Phosphate Buffered Saline, Highclone/Gibco) önerildiği şekilde 100 mL ddH₂O içinde 1 tablet çözünerek hazırlanır ve otoklavlanır. Otoklavdan çıkan steril PBS 2-8°C’da saklanır.

3.2.3.1.3 Tripsin-EDTA (TE) Tamponunun Hazırlanması

Hücreleri pasajlarken kullanılan Tripsin-EDTA hazırlaman için 0.5 mM EDTA ve % 0.05 Tripsin 1 X PBS içerisinde çözüldü. Sterilizasyon amacıyla 121°C’de 20 dk otoklavlandı ve +4°C’de muhafaza edildi.

3.2.3.1.4 Hücre kültürü medyumunun Hazırlanması

İçinde L-Glutamin bulunmayan Dulbecco’s Modified Eagles Medium (DMEM) ’in içine 0.2 mM son konsantrasyonu olacak şekilde L-Glutamin eklenir. +4°C’de kullanıma hazır halde bekletilir. Kullanmadan önce, kullanılacak DMEM

miktarı içine son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde FCS eklenir. FCS eklenmiş DMEM +4°C'de 1 gün süre ile bekletilebilir.

3.2.3.1.5 Hücre Soyunun Başlatılması

Hücre soyu başlatılmadan önce laboratuvarında ön hazırlıklar yapıldı. Eğer mümkün ise çalışmadan önceki gece laboratuvar ve kabin içinde UV açılarak sterilizasyon yapıldı. Çalışmadan en az yarım saat önce laminar flow çalıştırıldı. Kabin içi Etil alkol (%70) ve Biacon ile temizlendi. 37°C'deki su banyosu içinde istenen sıcaklığa getirilen FCS ve DMEM'in etil alkol (%70) ile temizlenerek, laminar flow içine alındı. Dondurularak -80°C'de stok yapılan seçilen hücre hatlarının büyütülmesi için donmuş hücre soyu 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve ısının etkisiyle hızlıca çözüldü. % 10 FCS içeren DMEM ile çözünen hücreler süsoanse hale getirildi. Bu süspansiyon santifüj cihazında 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan pellet 75 cm²'lik flasklar da büyütülmek üzere, % 10 FCS içeren DMEM ile çözüldü ve son hacmi 15 mL olacak flasklara ekim yapıldı. Flaskların üst yüzeyine hücre soynun adı, pasaj numarası, tarih ve kullanıcının adı yazılarak ve 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

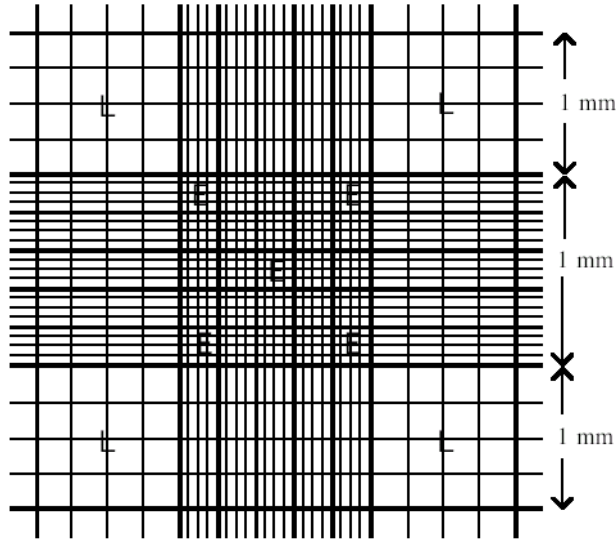
3.2.3.1.6 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları flask yüzeyini %80-90 oranında kaplayınca pasajlamaya hazır hale geldiği belirlenir ve flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler steril PBS tampon ile 2 kez yıkandı ve 1.5 mL Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlandı. Hücreler yüzeyden ayrılınca Tripsin-EDTA'nın inaktive olması için FCS içeren DMEM eklendi. Süspanse hale gelen hücreler santrifüj cihazında 5 dk, 1000 rpm 'de çöktürüldü ve süpernatant döküldü. Elde edilen hücre yığını taze DMEM ile süspanse edildi ve flasklara ekim yapıldı. Flaskların üst yüzeyine hücre soynun adı, pasaj numarası, tarih ve kullanıcının adı yazılarak ve 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

3.2.3.1.7 Büyütülene Hücrelerin Sayımı ve Toplam Canlılıklarının Belirlenmesi

Total canlı hücre sayını belirlemek için üzeri 1mm^2 alan, 0.1 mm derinliği olan, 25 küçük kareye ayrılmış ve hacim içindeki toplam canlı hücre sayımının hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 3.6) lamı kullanılır. Toplam canlı hücrelerin popülasyonunu belirlemek için $10\ \mu\text{L}$ hücre süspansiyonu ve $10\ \mu\text{L}$ Tripanmavisi (1:1 dilüsyon oranında) karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3-5 dk inkübe edilir. Ölü hücreler tripan mavisi sayesinde mavi boyanırken canlı olanlar boyanmazlar ve mikroskop altında sayım yapılır. Hücre süspansiyonun bir mililitresindeki toplam sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

$$\text{Total hücre sayısı (canlı)/ml} = \text{Hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$



Şekil 3.6 : Hemositometre.

3.2.3.1.8 Hücrelerin -80°C’de Saklanması

Hücreler buldukları flask yüzeyini % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler steril PBS ile 2 kez yıkanır ve 75 cm² flasklar için yaklaşık 2 mL Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılır. Hücreler yüzeyden ayrılınca %10 FCS içeren DMEM eklenir ve hücre süspansiyonu 1000 rpm 'de 5 dk santrifüj ile hücreler çöktürülür. Süpernatant uzaklaştırılır, pellet % 10 DMSO içeren 1mL FCS ile dikkatlice çözülür (100 µL DMSO ve 900 µL FCS). Süspansiyon cryovial tüplerine konular, tüp üzerine hücre soyu, pasaj numarası, tarih ve çalışan kişinin adı yazılarak etiketlenir. Dondurulmak üzere hazır hale getirilen hücreler -80°C’de saklanır.

3.2.3.1.9 Hipoksik Hücre Modelinin Oluşturulması

Yaklaşık 2.000.000 hücre, 25 cm² flasklara deneyden 24 sa önce ekilir. Ertesi gün 150 µM son konsantrasyonda CoCl₂ eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarılır. 1 gün, 2 gün ve 3 gün sonra hücreler TE (Tripsin-EDTA) ile kaldırılır ve pellet olarak, RNA izolasyonları için -80°C dondurucuda saklanır.

3.2.3.2 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler

3.2.3.2.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Transfeksiyon deneyinden bir gün önce 12 kuyucuklu plakalara her bir kuyu için 250.000 hücre olacak şekilde hücre ekilerek %10 FCs içeren DMEM ile son hacmi 500 µL’ye tamamlandı. Son hacmi 45 µL olacak şekilde; 2 mM CaCl₂ solüsyonu, transfekte edilcek DNA parçası ve dH₂O karıştırılarak üzerine 2xHEPES (45 µL) pastör pipetiyle bir yandan kabarcı çıkartılarak, bir yandan da pipet yardımıyla damla damla ortama eklendi. Yaklaşık 2.5 sa boyunca beklenerek presipitasyonun oluşması gözlemlendi. Ependorf içerisinde presipitasyondan dolayı

beyaz bulutsu yapı oluştuktan sonra plakalardaki her bir kuyuya 90 µL dikkatlice ilave edildi. Homojen dağılması için plakalar dikkatlice sallandı. transfekte hücrelerin bulunduğu 12 kuyulu plakalar 37°C’de, CO₂’li inkübatör içinde 6 sa inkübe edildi. 6 sa sonunda medyum uzaklaştırıldı. Kuyular iki kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonunda % 10 FCS içeren taze DMEM eklendi. 2 gün ve 3 gün inkübasyon sonunda medyumlar toplanarak transfeksiyon aktivitesi luminometre ile ölçüldü.

Küçük hacimli (25cm²) flasklarda transfeksiyon deneyi kurmak için, transfeksiyondan bir gün önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde flaska ekim yapıldı. Üzerine son hazim 5 mL olacak şekilde %10 FCS’li DMEM eklendi. Son hacmi 225 µL olacak şekilde; 2 mM CaCl₂ solüsyonu, transfekte edilcek DNA parçası ve dH₂O karıştırılarak üzerine 225 µL 2 X HEPES pastör pipeti yardımıyla damla damla eklendi (Tablo 3.10). Deney tüpleri yaklaşık 2.5 sa çökelti oluşması için oda sıcaklığında inküne edildi. Çökelti oluşumu gözlemlenmesinin akabinde 450 µL karışım dikkatlice küçük hacimlerle flaska eklendi. Homojenije olması için hafifçe sallanan flask, inkübasyona bırakıldı. 6 sa süre sonunda transfeksiyon medyumunu dökülerek, flask içi 2 defa PBS ile yıkandı ve % 10 FCS içeren taze DMEM eklendi. 2 gün ve 3 gün sonra hücreler (TE) Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve santrifüjlenerek hücreler pellet haline getirildi. Eğer hemen yapılacaksa RNA izolasyonları ya da daha sonra protein ve RNA çalışılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

Tablo 3.10 : Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan kimyasal solüsyon içerikleri ve hazırlanışları

2 mM Kalsiyum Klorür (CaCl₂)	29.4 g CaCl ₂ 100 mL’ye dH ₂ O ile çözüldü. Otoklavlanıp, filtrelenip +4°C’ de saklandı.
2xHydroxyethyl piperazineethanesulfonik asit (HEPES)	0.02 g Na ₂ HPO ₄ , 0.8 g NaCl, 0.65 g HEPES 50 ml son hacme dH ₂ O ile tamamlandı (pH: 7.05–7.12). Otoklavlandı, filtre edildi ve -20°C’de saklandı.

3.2.3.2 Salınan Sistem ile Lusiferaz ve Seap Etkinliğinin Belirlenmesi

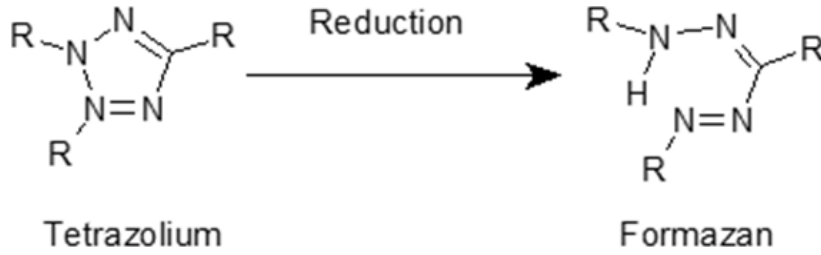
İnsan CAIII promotorunun 5' ucu kısaltılarak oluşturulmuş promotor parçalarının bazal aktivitesini belirlemek amacıyla Dual-core lusiferaz reporter assay kiti™ (Clontech) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan 10 X substrat tamponu, Reaksiyon tamponu ile 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalara istenen zaman aralığında toplanan transfeksiyon medyumundan 50 µL konuldu ve üzerine 5 µL 1X Substrat/Reaction tamponundan eklendi ve sonuçlar bekletilmeden luminometrede okundu. Seap aktivitesi için ise öncelikle 96 kuyucuklu plaklara 25 µL istenen zaman aralığında toplanan transfeksiyon medyumunu eklendi. 5X dilüsyon tampon 1X'e ddH₂O ile dilüe edildi. Sulandırılan 1X tamponundan her kuyuya 75 µL eklendi ve plaka alimünyum folya ile sarılarak 65⁰C'de 30 dk bekletildi. Tamamlanan süre sonunda buzda 2-3 dk bekletildikten plaka sonra oda sıcaklığına getirildi ve oda sıcaklığına getirilmiş olan SEAP substrat solusyonundan her kuyuya 100 µL eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 60 dk süresince bekletildi. İşlem sonunda plaka luminometrede okutuldu. Elde edilen değerler Microsoft excel programı kullanılarak değerlendirildi. Çalışma 384'lük plakalarda okuma gerçekleştirmek için 10 kat seyreltilerek okuma gerçekleştirilecek şekilde optimize edildi.

3.2.3.3 Sitotoksisite Deneyleri (MTT)

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla ile oluşturduğu reaksiyonda, MTT solüsyonunda bulunan tetrazolium halkasının hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. MTT yöntemi, sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Kullanılan çözeltiler Tablo 3.11'de gösterilmektedir.

Tablo 3.11: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
MTT solüsyonu	5 mg/mL olacak şekilde steril PBS içerisinde çözülerek hazırlanır. +4°C’de muhafaza edilir.
0,004 M HCl içeren izopropanol	500 mL 2- Propanol içerisine 210 µL HCl eklenir. Oda sıcaklığında saklanır.



Şekil 3.7 : MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.

Deney öncesi gün hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler 24 kuyucuklu plakalara her kuyuda 250.000 hücre olacak paylaştırıldı. Bir gece inkübatörde inkübasyona bırakılıp, ertesi gün son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarılır. Uygulamadan 24, 48 ve 72 sa sonrasında son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde her kuyuya stok MTT solüsyonu eklendi ve 4 sa 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı ve 0.004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözüldü ve spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans alındı. Sonuçlar Microsoft excel programı kullanılarak grafiklendirildi.

3.2.4 RNA Düzeyin ki Çalışmalar

Deneyisel olarak kullanılan çözeltilerin tamamı RNA parçalayan enzim içermeyen su ile hazırlandı. Çalışılacak ortamın ve malzemelerin RNAaz’dan

arındırılması için 999 mL dH₂O içinde 1 mL Dietilpirokarbonat (DEPC), çözülüp 37°C’de 1 gece süreyle bekletildi ve 121°C’de 20 dk otoklav yapıldı. Çalışmalardan önce ortam ve pipetler DEPC’li su ile temizlenerek kullanıldı.

3.2.4.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonları ticari bir kit olan Fermentas RNA Purification Kit’i kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla hücre kültüründe büyütülen hücreler gereken hücre yoğunluğuna geldikten sonra ortamdaki tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak pellet haline getirilir. Her pellete 600 µL β-Mercaptoethanol içeren Liziz Buffer eklenir ve pipetaj yapılarak iyice çözülüp, yaklaşık 10 sn vorteks yapılır. Liziz olduğundan emin olunan her tüpe 360 µL etanol (%96-100) eklenerek pipetaj yapılır. Bu sırada kolonlar hazırlanır ve lizattan maksimum 700 µL eklenerek 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj edilir. Lizat bitene kadar aynı işlem tekrar edilir. İşlem bittikten sonra kolon yeni 2 mL ependorfa yerleştirilir ve üzerine 700 µL Wash Buffer-I eklenir. Kolon 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj edilir, alta geçen sıvı atılır. 600 µL Wash Buffer-II eklenir ve 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj edilir, alta geçen sıvı kısım atılır. Son olarak 250 µL Wash Buffer-II eklenir ve 13.500 rpm’de 2 dk santrifüj edilir. Kolon 1,5 mL’lik ependorfa aktarılır. Kolona 35-40 µL steril dH₂O eklenir ve kolonun dH₂O’yu iyice emmesi için oda ısısında yaklaşık 2-5 dk bekletilir. Beklem işleminden sonra 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj edilir. İzolasyonu tamamlanan RNA’lar -80°C dolapta muhafaza edilir.

3.2.4.2 Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Safkaştırılan RNA’ların miktar ve saflıkları spektrofotometre ile ölçülerek absorbanları belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçüm için kvartz ölçüm kaplarına kör değer için 200 µL dH₂O, RNA ölçümleri için ise 195 µL dH₂O ve 5 µL ölçülmek istenen RNA konuldu. Spektrofotometrik ölçümde belirlenen absorban ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times 50 \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.4.3 RNA Jel elektroforezi

RNaz enzimlerine karşı oldukça hassas olan RNA'ların degrades olmamaları için kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. Cam malzemeler % 0.1 DEPC içeren suda 12 sa bekletildikten sonra otoklavlandı. Elektroforez tankı % 0.5'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi ile yıkandı. DEPC'li su ile durulandı. Saf etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

RNA jelinin yapımı için 0,5 gr agaroz tartılıp 10xFA jel tamponunda çözüldü. RNaz içermeyen steril dH₂O ile kaset hacmine tamamlandı. Jel kaynatıldıktan sonra 50°C'ye kadar soğuması beklendi. % 37'lik (12.3 M) formaldehitten 0,9 mL eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. 10 mg/mL Et-Br stok solüsyonundan 1 µL eklendi. Jel elektroforezinin kasetine uygun büyüklükteki taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel kasete döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi. RNA örnekleri önce ısı ile denatüre edildi (70°C'de 10 dk) daha sonra buz üzerinde yaklaşık 10 dk bekletildi. Yürütülmek istenen RNA'lar jele yüklenerek 1xFA Jel tamponu içerisinde 90 V'ta 45 dk yürütüldü.

Tablo 3.12 : RNA jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

Tamponun Adı	Hazırlanışı
FA jel tamponu	0.2 M MOPS pH:7,0 0.05 M EDTA pH:8,0 0.01 M NaAc pH: 7,0 DEPC'li su ile 1 L'ye tamamlanır.
FA tank tamponu	10 X FA jel tamponu 100 mL (1X) % 37'lik 12.3M Formaldehit 900 µL koyularak DEPC'li su ile 1L'ye tamamlanır.

3.2.4.4 Revers Transkriptaz (RT)-Reaksiyonu

İzole edilen RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezlemek için Reverse Transkripsiyon kiti (Fermentas) kullanıldı. RNA örnekleri buz içerisinde çözüldü ve her RNA kalıbından 1 µg olacak şekilde hesaplanarak reaksiyon tüpüne eklenir. Her reaksiyon tüpüne 1 µL Oligo(dT) Primer eklenir. Son hacim 12µL olacak şekilde, kalan hacim dH₂O ile tamamlanır. cDNA eldesinin ilk basamağı olan bu basamakta kullanılan ürünler ve PCR programı Tablo 3.13 gösterilmiştir.

Tablo 3.13 : Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde birinci Kullanılan Bileşenler ve Programı.

Bileşenler	Kullanılacak Miktar
Kalıp RNA (1 µg)	-----
Oligo(dT) Primer	1 µL
DEPC'li dH ₂ O	12 µL'ye tamamlayacak şekilde eklenir
70°C'de 5 dk inkübe edilir.	

Birinci basamağın ardından ikinci basamağa geçilir. Her reaksiyon tüpüne 5X Tamponu, Ribonükleaz inhibitörü, 10 mM dNTP karışımı, Reverse Transkriptaz enzimi eklenir ve uygun program seçilerek PCR cihazına yerleştirilir. İkinci basamakta kullanılan ürün, ürün miktarları ve reaksiyon programı Tablo 3.14’de gösterilmektedir.

Tablo 3.14 : Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde ikinci basamakta kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Kullanılacak Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	4 µL
Ribonükleaz İnhibitörü (20 u/µL)	1 µL
10mM dNTP karışımı	2 µL
RT Enzimi	1 µL
Son Hacim	20 µL
42°C 60 dk	
72°C’de 10 dk	

3.2.5 DNA Tabanlı Teknikler

3.2.5.1 Primer Tasarımı

İnsan CAIII Genine ait primer tasarımı için www.ncbi.nlm.nih.gov, www.idtdna.com ve www.restrictionmapper.org sitelerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blast

yapılarak İnsan CAIII geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir. Primerler yurtdışı kaynaklı olan MacroGen firmasından sipariş edilmiştir.

3.2.5.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen plazmit DNA'larının miktar ve saflıkları 260 nm ve 280 nm'deki absorpsiyonlarının ölçümü ile hesaplanmıştır. Spektrofotometrik ölçüm için kvartz ölçüm kabına kör değer için 200 µL dH₂O, DNA ölçümleri için 195 µL dH₂O ve 5 µL ölçülmek istenen plazmit DNA'sından konuldu. Spektrofotometrik ölçümde belirlenen absorpsiyon ve saflıklarının değerlendirilmesi amacıyla verilen formül kullanılmış ve değerler belirlenmiştir.

$$\text{DNA miktarı} = A_{260} \times 50 \times 40 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.5.3 Semi Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Hedeflenen diziyi çoğaltmak için gerçekleştirilen polimeraz zincir (PCR) reaksiyonları son hacim 50 µL olacak şekilde kurulmuştur. Kalıp DNA yaklaşık olarak 200 ng, Düz (Forward) ve Ters (Reverse) primerlerden son konsantrasyonları 2 µM, Taq DNA Polimeraz 1X Tampon (Fermentas)(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve her bir reaksiyon için 2,5 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu için optimizasyon çalışması yapıldı. Sırasıyla 1 mM, 2 mM ve 4 mM'lık konsantrasyonlar çalışıldı. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülenerek oluşan bantlar sonraki işlemler için jelden geri kazanıldı.

3.2.5.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi (Real-Time)

Real-Time PCR için Roche-The LightCycler® 480 Real-Time PCR Sistemi kullanılmıştır. Kit olarak yine firmaya ait LightCycler 480 SYBR Green Master

(Roche) kullanılmıştır. Deney düzeneğinde analiz edilecek olan her DNA örneği 3 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu plakaya eklenmiştir. Reaksiyon, kitin önerdiği hacimin 1/5'i olacak şekilde Tablo 3.15'da gösterildiği gibi kurulmuş ve Tablo 3.16'daki programa göre çalıştırılmıştır. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human- β -mikroglobülin 2 geninin Ct değerleri ile bulunan Ct değerinin formülü aşağıdaki gibidir;

$$Ct_{H-\beta-2} - Ct_{CAIII} = \Delta Ct$$

$$\text{Hedef ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

Tablo 3.15 : Real-Time PCR Bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
cDNA	1 μ L
MasterKarışım	5 μ L
dH₂O	3 μ L
F-Primer (5ng)	0,5 μ L
R-Primer (5ng)	0,5 μ L
Son Hacim	10 μ L

Tablo 3.16 : Real-Time PCR Koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
94°C	3 dk	1
94°C	30 sn	35
55°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	10 dk	1

3.2.5.5 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA jel elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve örnekler 45 dk süreyle 95 volt elektrik akımında yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 0.5 x TBE tercih edildi. 0.5xTBE tamponu 5xTBE tampanunda dilüe edilerek hazırlandı. Tampon içerikleri Tablo 3.17’da gösterilmektedir. Çalışmalarda plazmit DNA’lar için % 0,8 ve ekspresyon profillerini karşılaştırmak için % 2’lik konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Agaroz jeli hazırlarken agar, 0.5xTBE tamponu içinde çözülerek mikrodalgada kaynatılarak hazırlandı. Ilıyan jele son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi ve uygun jel kasetine dökülerek donmaya bırakıldı. DNA’ları jele yüklemeye önce örnekler DNA izleme boyası olan bromfenol mavisi ile boyandı. Böylelikle hem örnekler izlenebilir oldu hemde DNA çökerek jelde bulunan kuyuların içine çökmesi sağlandı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 1 kb DNA ladder (Fermentas) kullanıldı (Şekil 3.8). Elektroforez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Densometrik analizleri yapıldı.

Tablo 3.17 : Agaroz Jel Solüsyonları.

Solüsyon	İçeriği
5X TBE (pH:8.00)	27.5 g Borik Asit, 54 g Tris Base, tartılır. 20 mL 0.5 M EDTA pH:8.00 ve dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.
0,5X TBE	5X TBE stok tampondan 100 mL alınarak üzeri dH ₂ O ile 1litreye tamamlanır

3.2.5.6 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

Deneye sonucunda istenilen doğru DNA bantları UV transilluminator üzerinde koruyucu maske, önlük ve eldiven giyilerek agaroz jelden kesilerek alındı. Ependorlara alınan DNA’yı içeren jeller DNA jel ekstraksiyon kiti olan GeneJET

Gel Extraction Kit (Fermentas) kullanılarak saflaştırıldı. Jelden kazanılan DNA'nın 2-3 µL'lik küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve DNA saflığının belirlenmesi için spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alınarak değerlendirildi.

3.2.5.7 İnsan CAIII Geninin Seçilen Vektör Sistemine Klonlanması

Klonlama yapılmak istenen insört ve vektör sistemi 20 µL toplam hacim olacak şekilde, 2 µL vektör, 6 µL hedef DNA, 10 µL T4 ligaz tamponu ve 2 µL T4 DNA ligaz +4°C'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon örneklerinin, kompetent hücre olarak seçilen XL1blue ve/veya DH5α *E.coli* soylarına transformasyonları yapıldı.

Rekombinant kolonilerin seçimi için Mavi/Beyaz Koloni tekniği veya antibiyotik seçilimine göre yapıldı. Mavi Beyaz koloni seçilimi için bakteri katı besiyerine ilk olarak 100 mM stoktan 100 µL IPTG yayıldı, kuruması beklendikten sonra 50 mg/mL stok X-Gal'den 20 µL yayıldı.

Antibiyotik seçilimi için ise vektörün içinde mevcut olan dirençli antibiyotiğe göre LB agar besiyeri dökülürken uygun antibiyotik eklenerek dökülmesi sağlandı.

pcDNA 3.3 vektörüne klonlama ise ptozokolün önerdiği şekilde yapıldı. Taq polimerazla çoğaltılan PCR ürünleri kullanıldı. Ligasyon total hacmi 6 µL olacak şekilde 4 µL PCR ürün, 1 µL Salt Solüsyon ve 1 µL Vektör konularak oda sıcaklığında 30 dk bekletilip *E.coli* One Shot®TOP10 kompetent hücrelerine transforme edildi. Hücreler ampisillin içeren LB agar besiyerlerine ekilerek 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.5.8 Restriksiyon kesim stratejisi

Restriksiyon kesimlerinde; 1U enzim, 1 µg DNA'nın kesimi için ve toplam hacmin %10'u olacak şekilde önerilen tampon kullanıldı. Son hacim 50 µL olacak şekilde kesim reaksiyonu kurularak, 37 °C'de 12-18 sa inkübasyona bırakıldı (Tablo 3.18).

Tablo 3.18 : Kesim planı.

Bileşen	Hacim
DNA	1 µg
Tampon	5 µL
Enzim	1 Ünite
Distile su	---- µL
Toplam Hacim	50 µL

3.2.6 Protein Tabanlı Teknikler

3.2.6.1 Western Blot Tekniği ile Protein İfadesinin Belirlenmesi

3.2.6.1.1 Protein Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Protein analiz yöntemi olan Western blot çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanışları Tablo 3.19’da verildiği gibidir.

Proteinlerin spesifik büyüklüklerini belirlemek için Page Ruler Protein Marker (Fermentas /26620) kullanıldı.

Markerin bant büyüklükleri EK-A’da belirtilmiştir.

Tablo 3.19 : Protein seviyesi belirleme deneylerinde ki tamponların hazırlanışı.

Kullanılan Çözelti	Çözeltinin Hazırlanışı
RIPA Çözeltisi	10 mM Tris-HCl (pH:8), % 1(v/v) Triton X100, % 0,1 (v/v) SDS, % 0.1 (v/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 140 mM NaCl, proteaz inhibitörü.
Brom/fenol Çözeltisi	% 0.05 (w/v) bromfenol
Loading Dye	8 g SDS, 2.8 g Tris, 8 mg bromfenol mavisi, 40 g Sükröz, 200 mL'ye tamamlandı (pH: 6.8).
Ayrırma Jeli	% 10 (w/v) SDS, 1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)
Yığıma Jeli	% 10 (w/v) SDS, 1 M Tris-HCl (pH:6.8)
SDS PAGE Yürütme Tamponu	250 mM Glisin, 25 mM Tris, % 0.1 (w/v) SDS
Jel Boyama Solüsyonu	0.5 g Coomassie Brilliant Blue 250, 200 mL % 95'lik Etanol, % 10 Asetik Asit
Açma Solüsyonu	Hacimce % 7.5 Asetik Asit, % 5 Metanol ve % 87.5 distile su
Transfer Tamponu	192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol, 25 mM Tris,
10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Soyma Tamponu	1 M Glisin, % 1 SDS, pH: 2.5
Developer Tamponu	Kitin önerdiği şekilde hazırlandı
Fikser Tamponu	Kitin önerdiği şekilde hazırlandı
Ponceau	10 mL saf su içerisine 300 µL glasiyel asetik asit, 0.033 g Ponceau boyası koyuldu. Saf su ile 30 mL'ye tamamlandı.

3.2.6.1.2 Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

Hücre kültüründe hücrelerle kurulan deneyinlerin 72 sa inkübasyon süresi tamamlandığında izolasyonları yapılacak hücrelerin medyumunu uzaklaştırılarak, PBS (soğuk, 2 kez) ile yıkanmıştır. Buz (+4°C) üzerine konulan plakaların her kuyusuna RIPA buffer eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Soğuk 1,5 ml'lik tüplere alınan hücreler 45 dk buzda bekletildi. bekleme süresince bir kaç defa pipetaj yapılarak örneklerin iyice liziz olması sağlandı. 45 dakikda bekletilen hücre lizatları +4°C 15000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Altta kalan pellete dokunmadan üst kısımdaki proteinli süpernatant ayrı bir ependorfa alındı ve konsantrasyonu belirlenerek etiketlendi. Stok Proteinler -80°C'de saklandı.

3.2.6.1.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Deney gruplarına ait RIPA ile izole edilen protein konsantrasyonlarını belirlemek için Qubit (Invitrogen)TM cihazı kullanıldı. Cihazın kit çeşitlerinden protein deteksiyon kiti ile florimetrik olarak protein miktarları tayin edildi. Basamaklar kitin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Her örnek ve standart verileri için protein tamponu (199 µL) ve protein reagent (1 µL) birleştirilerek reaksiyon tamponu oluşturuldu. İlk olarak cihaza protein standartları okutuldu ve standart eğri oluşturulması sağlandı. Daha sonra reaksiyon tamponu (198 µL) ile protein örneğimiz (2 µL) 100 kat sulandırılarak son hacim 200 µL olacak şekilde hazırlandı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. ardından vorteks ile dibe çöken proteinlerin karışması sağlanarak cihazda sırasıyla okutuldu. Cihazda verilen sonuçlar sulandırla kat sayısı ile çarpılarak toplam protein miktarı belirlenmiş oldu. Örneklerin son konsantrasyon 30-50 µg olacak şekilde jele yüklendi.

3.2.6.1.4 SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı ve Örneklerin Yürütülmesi

SDS-PAGE tekniğinde 2 ayrı jel üst üste dökülür. Bu bağlamda %10'luk ayırma jeli Tablo 3.20'de belirtildiği hazırlandı. % 10 ayırma jeli üstten 1.5 mL boş kalacak şekilde döküldü. Üzerine isopropanol eklenerek jelin dümdüz bir şekilde donması sağlandı. Donması için 10-15 dk bekletildi. Ayırma jeli donduktan son

hazırlanan, üst yığıma jeli ayırma jelinin üzerine dökülerek taraklar yerleştirildi ve donmaya bırakıldı. Jeller dökülürken baloncuk olmamasına özen gösterildi. Son hacim 30 µL olacak şekilde 5 µL yükleme boyası ve 30-50 µg protein lizatı koyularak örnek 100°C'de 5 dk kaynatıldı. Jel kuyucuklarına son hacim 30 µL olacak şekilde yüklendi. Proteinlerin ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla ilk kuyuya Protein marker (Page Ruler-26620, Fermentas) yüklendi. İlk 15 dk 90 Volt akımda daha sonra yaklaşık 1,5 sa 120 V akımda yürütüldü.

Tablo 3.20: SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı.

Malzemeler	%10 Alt Jel	Üst yığıma jeli
Ayrırma Çözeltisi jeli	2,5 mL	-
Yığıma Çözeltisi	-	2,5 mL
Akrilamit Bisakrilamit (37:1)	2,5 mL	1,25 mL
ddH ₂ O	5 mL	6,14 mL
% 10 APS	100 µL	50 µL
Tetramethylethylenediamine	10 µL	5 µL

3.2.6.1.5 Proteinlerin Transfer ve Antikorlarla Muamele İşlemi

Yürütme işlemi ile ayrılan proteinler membrana transfer edildi. Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membran kullanıldı. Transfer işlemi için üst yığıma jeli kesilerek, sadece alt ayırma jeli bırakıldı ve jel, transfer tamponu içine bırakılarak 15 dk süreyle dengelenmesi sağlandı. Bu sırada Whatman kağıtları ve PVDF naylon membran jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Membranın aktive olması için, jel boyutlarında kesilen PVDF membran metanol içinde 1-2 dk boyunca bekletildi. Bu sırada PVDF membranın pürüzlü yüzeyi dikkate alınarak çalışmaların bu yüzeyde sürdürülmesi sağlandı. Transfer için sandviç methodu kullanıldı ve transfer kasetinin siyah plakalı (-) yüzeyi üstüne sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış transfer süngeri, 3 kat whatman kağıdı, jel, aktif PVDF

membran, 3 kat whatman kağıdı ve sünger üst üste dizildi. Hava kabarcığı kalmaması için özel silindir aparat ile sandiviç ezilerek olası hava kabarcıkları önleildi. En üste transfer kasetinin kırmızı (+) plakası yerleştirilerek, sandiviç kapatıldı. Kaset (-) ve (+) yönlerine dikkat edilerek transfer tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi. 15 volt, 400 mA akımda 1 gece boyunca +4°C'de transfer için bırakıldı.

Transferin ardından membran, % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponuna % 5 oranında yağsız süt tozu eklenerek hazırlanan bloklama tamponuna alındı. Membran bloklama tamponu için de 1 sa süreyle oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda çalkalanarak bloklandı. 1 sa sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak membran, % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponu ile 7 dklık sürelerle 3 defa arka arkaya yıkandı. Membran ilk olarak primer antikora alındı. Primer antikolar, % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponuna % 5 oranında yağsız süt tozu eklenerek hazırlanan tamponun içine İnsan CAIII Antikoru 1/1000, β -Aktin ise 1/5000 oranında eklendi. İnsan CAIII antikoruyla membran 3.5 sa süreyle çalkalayıcıda çalkalandı. B-Aktin antikoruyla ise 1 sa yeterli geldi. Süre sonunda antikolar temiz bir falkon içine alınıp, etiketlenerek +4°C'de saklandı. Membran, % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponu ile 7 dklık sürelerle 3 defa arka arkaya yıkandı. Sekonder antikolar ise, % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponuna % 5 oranında yağsız süt tozuna 1/5000 oranında eklenerek hazırlandı. Membran 1 sa süreyle sekonder antikolarla muamele edildi. Süre membran % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1xTBS tamponu ile 10 dklık sürelerle 3 defa arka arkaya yıkandı.

3.2.6.1.6 Membranların Oto Radyografi ile Görüntülenmesi

Membranlar ilk olarak ECL substratı ile 5 dk süresince muamele edildi, ECL substratının membranın her yerine değmesine özen gösterildi. Membran film kasetine yerleştirilerek karanlık odaya geçildi. Karanlık odada X-Ray filmi, membran üzerine 5 dk, 10 dk ve 15 dk süreyle basıldı. El ile yapıldığında banyo salüsyonunda 2 dk, fikse etme tamponunda 2 dk ve temiz su içerisinde 1 dk bekletilip, kurumaya bırakıldı.

3.2.6.1.7 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Western Blot sonuçlarının densitometrik olarak değerlendirilmesi için ImageJ programı kullanıldı. Normalizatör olarak şekçilen β -Aktin proteini, tüm deney ve kontrol gruplarında çalışılarak İnsan CAIII Proteini ile kıyaslandı.

3.2.6.2 Immunflorasan Metodu ile İnsan CAIII Proteininin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

İmmunflorasan tekniği için 24 kuyulu plakaların her kuyusuna özel yuvarlak lameller yerleştirildi. Her kuyuda 125.000 hücre olacak şekilde hücrelerin ekimleri yapıldı. Son hacmi 500 μ l olacak şekilde % 10 FCS'li DMEM ile tamamlandı. Hücreler bir gece inkübatör içinde inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün kuyulardaki % 10 FCS'li DMEM uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkandı. Her kuyudaki hücre popülasyonu 15 dk boyunca % 4'lük paraformaldehit çözeltisinde bekletilerek fiksasyon yapıldı. Fiksasyonun reaksiyonu pipetle çekilerek atıldı ve PBS ile hücreler üç defa yıkandı. Yıkama tamamlandığında hücre zarlarının porları açılın diye PBS içinde hazırlanmış % 0.3 (v/v) Triton X-100 hücreler eklendi ve 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda PBS ile 2 defa yıkama işlemi yapıldı. İstenmeyen bağlanmaları engellemek için hücrelere % 10 BSA içeren PBS'den 100 μ L eklendi ve yarım sa oda ısısında bekletildi. Bloklama basamağının sonunda hücreler 2 defa 5 dk boyunca PBS ile yıkanarak bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve her kuyuya 100 μ L, % 1 BSA içeren PBS ile hazırlanan 1/50 oranında dilüye edilmiş İnsan CAIII primer antikor eklendi. Bir gece boyunca +4°C'de ışık geçirmeyen kapaklı ve uygun şekilde nemlendirilmiş bir kapta primer antikor ile reaksiyona bırakıldı. Bir günün akabinde primer antikor pipetle çekilip temiz bir ependorf içine alınıp etiketlenerek daha sonrada kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı. Hücreler 3 defa, 5 dk süresince PBS yıkandı. Karanlık odaya geçilerek sekonder antikor uygulandı. Sekonder antikor, % 1 BSA içeren PBS ile 1/100 oranında dilüye edilerek hazırlandı ve her kuyuya 200 μ L eklendi. Işık almayan korunaklı bir kaba yerleştirilerek oda sıcaklığında bir sa bekletildi. Sekonder antikor uygulamasının sonunda hücreler PBS ile üç kez 5'er dk ara ile yıkandı. Hücrelere oda ısısında 5 dk'lık inkübasyonla, 1 μ g/mL DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası eklenerek hücrelerin çekirdek boyaması yapıldı. Süre

tamamlanınca fosfat tamponuyla (PBS) yıkama yapıldı. Lamların üzerine ticari olarak temin edilen antifade tampon (İnvitrogen) damlatıldı, böylelikle mikroskop incelemesine sırasında floresans sinyalin zamanla solmasını engellendi. Özel lameller çıkartılıp, lam üzerine kapatıldı. Oje ile sabitlendi.

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ait laboratuvarında bulunan “ED200” floresans ataçmanlı “Olympus BX51” marka mikroskopla floresans görüntülemelerinde kullanıldı. Elde edilen görüntülerin çekimleri “Olympus DP72” ile yapıldı.

3.2.6.2.1 IFC Analizi

Mikroskop ile elde edilen immunflorsans görüntüleri “Image J” programı kullanılarak densitometrik olarak analiz edildi. Image J’de belli sayıda hücrenin çevresi sınırlandırılarak belli değerler elde edildi. Floresans hücre ışınması verilen formül doğrultusunda hesaplandı;

$$\text{Total hücre floresans ışınması} = \text{Tüm yoğunluk} - (\text{Hücre alanı} \times \text{arka plan değeri})$$

3.2.7 DNA-Protein Etkileşimine Dayalı Teknikler

3.2.7.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Tekniği

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), DNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. DNA-protein etkileşimi ile bileşik oluşması durumunda, EMSA jelinde bu bileşik bağlı olmayan DNA molekülünden daha yavaş ilerlemektedir. Çalışılan proteinlerin DNA’ya bağlanması durumunda kompleksin jeldeki hareketi daha da ağırlaşarak arkalarda bant vermektedir. DNA’nın hareketindeki bu değişimler değerlendirilerek çalışılan bölgenin olası protein ya da proteinlerle etkileşime girip girmediği belirlenmektedir.

3.2.7.1.1 EMSA Deneyleri için Seçilen Hücrelerden Nükleer Ekstrakt Hazırlanması

Seçilem hücre hattına ait 75 cm²'lik flask yüzeyindeki belli yüzdelik çoğalma gösteren hücreler, iki kez soğuk PBS ile muamele edilip üzerlerine 3000 µL TEN çözeltisi ilave edildi ve soğukta yaklaşık 10-15 dk bekletildi. Hücre kazıyıcısının yardımı ile hücreler kazınarak 2 mL hacimli ependorf tüplerine alındı. 14.000 rpm'de 20 sn +4°C'de, santrifüj yapıldı. Soğuk PBS ile pellet yıkandı. 14.000 rpm'de 20 sn +4°C'de, santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 50 µL A tamponuyla pellet süspanse hale getirildi. Buzda 20 dk süspanse örnekler bekletildi. Süspansiyona ara ara pipetaj yapıldı. Süre sonunda süspansiyon ilk olarak normal enjektörden sonrada insülin enjektöründen birkaç kez geçirilerek lizis edildi. Lizat 14.000 rpm'de 20 sn +4°C'de santrifüj edildi. 60 µL C tamponunda elde edilen pellet süspanse hale getirildi. Buz üzerinde 45 dk beklendi, sonra 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Proteinli süpernatanttan protein konsantrasyonunu tayin ettikten sonra küçük hacimlerde ayrılarak -80°C dondurucuda stoklandı. Nükleer ekstrakt eldesinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.21'de gösterilmiştir.

Tablo 3.21 : Nükleer Ekstrakt eldesinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti Adı	Bileşen
TEN	40 mM Tris-Cl (pH: 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
Tampon A	10 mM Hepes (pH: 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM PMSF, 0.5mM DTT
Tampon C	20 mM Hepes (pH: 7.9), 420 mM NaCl, 11.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF

3.2.7.1.2 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi

EMSA kompleks oluşturma deneyi öncesinde primerler eğer biotinsiz ise biotinlendi ve biotinli primerler karşı zinciri ile bağlanma reaksiyonuna tabi tutularak prob oluşturuldu. Biotinleme ve bağlanma reaksiyonları Tablo 3.22 ve 3.23'de belirtilmiştir.

Biotinleme reaksiyonunda, Termina Transferaz Enzimi (TdT) sulandırılarak kullanılmaktadır. Sulandırma işlemi için önce Tablo 3.22'de gösterilen sulandırma işlemi, ardından biotinleme için Tablo 2.23'de gösterilen reaksiyonu kurulur. Reaksiyon içeriği ve etiketlenecek oligolar birlikte tüpe konur, 37°C'de 40 dk inkübe edilir. 40 dk'lık süre tamamlandığında 2.5 µL 0.2M EDTA (pH:8) reaksiyonu durdurmak için ortama eklenir. Yine TdT enzimini de uzaklaştırmak için ortama 50 µL kloroform: izoamil alkol (24:1) eklenir. Vortkes ve ardından 1-2 dk'lık 14.000 rpm'de santrifüj yapılarak 2 ayrı faz oluşması sağlanır. Enzimden arındırılmış ve de etiketlenmiş oligoların bulunduğu üst faz temiz bir ependorfa alınarak, EMSA'da kullanılmak üzere etiketlenerek -20°C'de saklanabilir.

Tablo 3.22 : Etiketleme işleminde kullanılacak enzim hazırlığı.

Reaksiyon	Miktar (µL)
5X TdT Reaksiyon Tamponu	2 µL
Distile su	7 µL
Enzim	1 µL
Toplam	10 µL

Tablo 3.23 : Etiketleme Reaksiyonu.

Reaksiyon	Miktar (μL)	Derişim
dH₂O	25 μL	---
5X TdT Reaksiyon tamponu	10 μL	1X
Kontrol oligo (1 μM)	5 μL	100 nM
Biotin (5 μM)	5 μL	0.5 μM
Seyreltilmiş Enzim (2 U/μL)	5 μL	0.2 U/ μL
Son hacim	50 μL	---

3.2.7.1.3 Oligonükleotitlerin Bağlanması

Etiketli ya da etiketsiz oligoların birbiri ile üst üste yapışması için için her bir oligodan 500 fmol/ μl olacak şekilde alınarak, son hacim 50 μL olacak şekilde distikle su içerisinde çözülür. Oligoların üstüste birbirlerine yapışmaları için 95°C’de 5 dk PCR cihazında bekletildi. Süre tamamlandığı gibi tüpler PCR cihazından alındı ve oda sıcaklığında zaman içinde soğumaları sağlandı.

3.2.7.1.4 Bağlanma Reaksiyonu ve Örneklerin EMSA Jelinde Yürütülmesi

Bağlanma reaksiyonu kurulmadan önceki gün EMSA için % 6’lık jel döküldü ve buzdolabında bekletildi. Jelin en iyi şekilde polimerleşmesini sağlamak için bu basamak atlanmamalıdır. EMSA jelinin bileşenleri Tablo 3.24’de gösterilmektedir.

Bağlanma reaksiyonu için Tablo 3.25’deki bileşenlerden oluşan reaksiyon kuruldu. 1.5 mL’lik ependorflarda reaksiyon kurulduktan sonra, oda ısısında 1.5 sa beklendi. Bu süre içinde bir gece öncesinden hazırlanan % 6’lık EMSA jeli yükleme

yapılmadan jeldeki iyon dengesinin sağlanması için 0.5 x TBE yürütme tamponunda 100V’da ön yürütmeye tabii tutuldu. Bağlanma reaksiyonu ve ön yürütme işleminin sonunda 20 µL’lik toplam örnek hacmine 5µL 6x Yükleme Boyasıda eklenerek, jelle yüklendi. Örnekler 100V akımda, yaklaşık 1.5 sa süreyle yürütüldü.

Yarışma deneyleri

Tablo 3.24 : Bağlanma Reaksiyonu.

Bileşenler	Final Konsantrasyon	Reaksiyon		
		#1	#2	#3
Ultra saf dH ₂ O	-----			
10 X Bağlanma Tamponu	1X	2 µL	2 µL	2 µL
1 µg/µL Poly (dI.dC)	50ng/µL	1 µL	1 µL	1 µL
Opsiyonel: % 50 Gliserol		-	-	-
Opsiyonel: % 1 NP-40		-	-	-
Opsiyonel: 1 M KCl		1 µL	1 µL	1 µL
Opsiyonel: 100 mM MgCl ₂		-	-	-
Opsiyonel: 200 mM EDTA		1 µL	1 µL	1 µL
Etiketsiz DNA	4 pmol	-----	-----	
Protein Ekstraktı	Sisteme bağlı	-----		
Biotin etiketli DNA	20 fmol			
TOPLAM	-----	20µL	20µL	20µL

Tablo 3.25 : EMSA Jelinin Bileşenleri.

	50 mL		
Stok Solüsyon	%3,5	%5	%6
% 40 Akrilamid	4.38 mL	6.25 mL	7.5 mL
% 2 Bis-akrilamid	2.91 mL	4.15 mL	5 mL
10X TBE Buffer	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
TEMED	50 µL	50 µL	50 µL
% 10 Ammonium persulfate	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL
dH₂O	39.6 mL	36.5 mL	34.4 mL

3.2.7.1.5 DNA-Protein Kompleksinin Transferi

Transferi için naylon membran kullanıldı. Kurutma kağıtları, membran ve transfer süngerleri soğuk 0.5 X TBE içinde alınarak en az 15 dk bekletildi. Kasetinin siyah plakalı (-) yüzeyi üstüne sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış transfer süngeri, 3 kat whatman kâğıdı, jel, aktif naylon membran, 3 kat whatman kâğıdı ve transfer süngeri üst üste dizildi. Hava kabarcığı kalmaması için özel silindir aparat ile transfer sandivici ezilerek olası hava kabarcıkları önleildi. En üste transfer kasetinin kırmızı (+) plakası yerleştirilerek, sandiviç kapatıldı. Kaset (-) ve (+) yönlerine dikkat edilerek soğuk 0.5xTBE ile dolu olan transfer tankına yerleştirildi. +4°C’de 90 mA akımda 1.5 sa boyunca transfer gerçekleştirildi. DNA’nın membrana sıkıca tutunmasını sağlayan “cross-link” reaksiyonu streç film içine konularak sarılan membran, 15 dk UV’ye maruz bırakıldı. Bu süre içinde +4°C’de muhafaza edilen EMSA “Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit” i tamponlarından “Nucleic Acid Detection” bloklama tamponu ve “4xWash Buffer” yıkama tamponu 37-50°C ısıtılmış su banyosunda bekletildi. +4°C’de bekletilen bu tamponlar kristalize olmakta ve deneyin çalışmasına engel olmaktadır. Cross-link sonrasında membran oda sıcaklığında 15 dk süresince 16 mL “Nucleic Acid Detection” tamponu ile muamele edildi. 15 dk sonunda kaba, 67 µL “Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate” eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Ticari olarak kit

içeriğinde bulunan 4xWash Buffer, 1x'e saf su ile dilüe edilerek membran dört kez, 5'er dk yıkandıktan sonra 30 mL substrat dengeleme tamponu eklenerek 5 dk, oda ısısında çalkalandı.

3.2.7.1.6 EMSA Membranının Görüntülenmesi

DNA-Protein kompleksini içeren membranlar ECL substratı ile 5 dk süresince muamele edildi, ECL substratının membranın her yerine değmesine özen gösterildi.

Görüntüleme için ya Fusion FX Vilber Lourmat cihazı ve kamerası kullanıldı ya da membran film X-Ray filmine basılıp, manuel film banyosu yapılarak sonuçlar görünür hale getirildi.

3.2.8 İstatistiksel Değerlendirmeler ve Verilerin Yorumlanması

3 tekrarlı ve 3 deney düzeneği halinde tekrarlı olarak çalışılmış veriler Minitab 14 programı kullanılarak değerlendirildi. Buna ilişkin "P" ve "Standart Sapma" değerleri belirlendi. Belirlenen değerler ile analiz grafikleri çizildi. Western metodu verileri, RT-PCR jel elektroforez bantları ve immunflorasan dataları fotoğrafları IMAGE J programı kullanılarak değerlendirildi ve grafikler oluşturuldu.

3.2.9 Biyoinformatik Analiz

İnsan CAIII genin mRNA özellikleri, başlama ve bitiş kodonları, ekzon ve intron bölgeleri ve muhtemel promotor bölgesi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi üzerinden analiz edildi.

İnsan CAIII Promotörüne ait en büyük konstrağın oluşturulması için manual olarak tasarlanan primerlerin promotora spesifik olup olmadığı <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresi üzerinden kontrol edildi.

“Restriction mapper version 3” programı ile diziye ait restriksiyon haritası belirlendi. Bu harita kasamında diziye kesen ve kesmeyen enzimler belirlenerek delesyon konstrakları oluşturuldu.

İnsan CAIII promotor bölgesinin % GC içeriği ise (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) adresi üzerinden belirlendi.

Sekonder bölge analizi için <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form> programı kullanıldı.

İnsan CAIII promotoruna bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi için ise Mathinspector programı (<https://www.genomatix.de/>) adres kullanıldı.

3.2.10 Dizi Analizi ile Doğrulama

İnsan CAIII promotor parçasının PGEM-T Easy ve pMetLuc vektörüne klonlanma işlemlerinden sonra elde edilen plazmitler restriksiyon enzimleri ile kesilerek rekombinant olup olmadığı belirlendi. Rekombinant olduğunu düşündüğümüz plazmitlerin doğru diziye içerip içermediği veya herhangi bir mutasyon olup olmadığının tespiti için REFGEN/ANKARA yada SENTEGEN dizileme merkezine vektöre ait dizileme primerleri gönderilerek kontrol edildi. Kullanılan dizileme primerleri Tablo 3.26’de verildiği gibidir. Elde edilen ham data BIOEDIT programı kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.26 : Dizileme aşamasında kullanılan primerler ve primerlere ait diziler.

Primerin Adı	T _m (°C)	Primer Dizisi (5’ - 3’)	Uzunluk (bç)
pMetLuc Dizileme Primeri	68°C	AGT TAT TAC TAG CGC TAC CGG AC	23 bç

4. BULGULAR

4.1 İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Promotor Bölgesinin Klonlanması ve Promotor Bölgesinin Analizi

4.1.1 İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Geninin Biyoinformatik Analizi

İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) geninin promotor dizisi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinden araştırıldı. Erişim numarası NC_000008.11 olan dizi çeşitli programlar kullanılarak analiz edildi.

4.1.1.1 Karbonik Anhidraz III Promotorunun İnsan, Fare ve Sıçandaki Karşılaştırılması

Karbonik Anhidraz III (CAIII) promotorunun korunmuşluğunu belirlemek amacıyla insan, fare ve sıçanın promotor bölgeleri gen bankasından bulundu. İnsan (NC_000008.11), fare (NC_000069.6) ve sıçan (NC_005101.3)'a ait CAIII promotor bölgeleri verilen erişim numaraları ile bulunmuştur. Bu dizilerin BioEdit programı kullanılarak 'Multiple Sequence Alignment' analizleri yapıldı.

Translasyonun başlangıcından itibaren yaklaşık 420 Bp'lik yukarı promotor bölgeleri karşılaştırıldı ve elde edilen veriler doğrultusunda insan, fare ve sıçanın promoter dizileri arasındaki benzerlik Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1 : İnsan, fare ve sıçan promotorlarının benzerlik yüzdeleri (%).

	Benzerlik
İnsan/ Fare	%76
İnsan/ Sıçan	%75
Fare/ Sıçan	%86

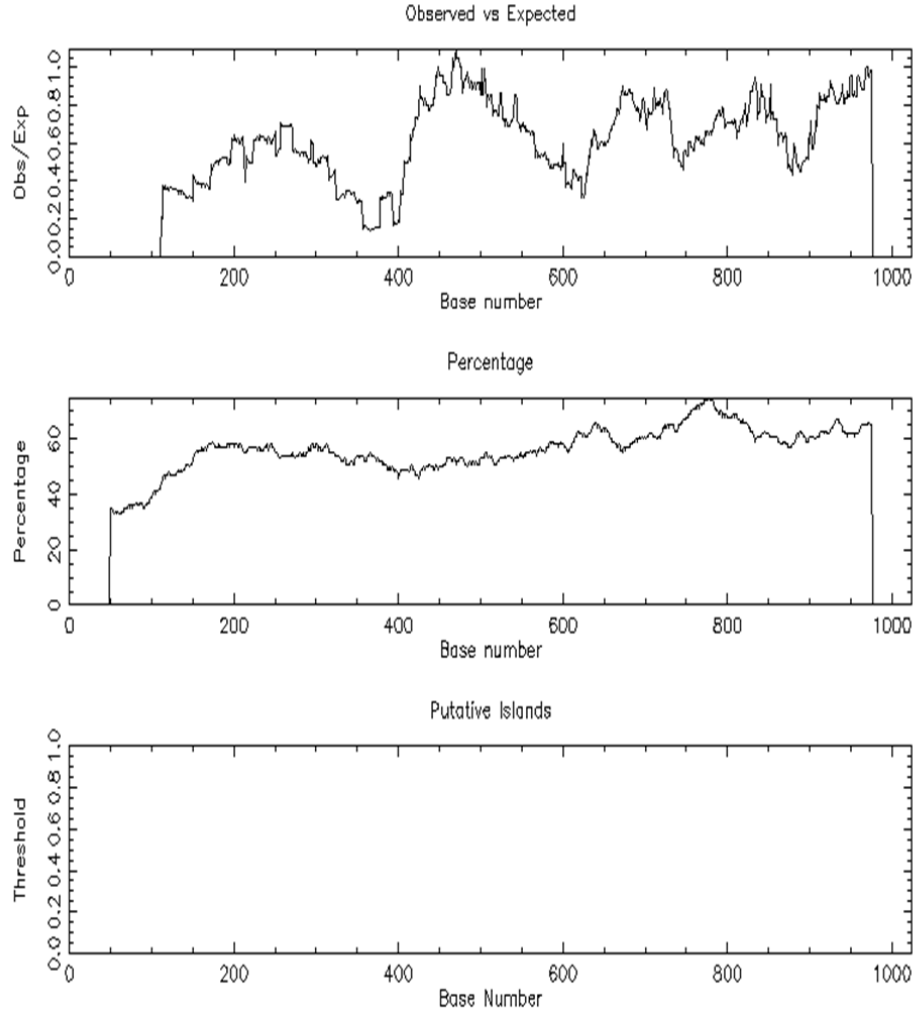
İnsan, fare ve sıçan promotorlarının dizilerindeki bu benzerlik aynı zamanda korunmuş bölgelerle ilgili bize bilgi vermektedir. Bilindiği üzere evrimsel süreçte genleri üzerinde gene ait belli korunmuş diziler mevcuttur. Bu diziler polimerazların bağlanabildiği yerler olduğu gibi, bazı transkripsiyon faktörlerinin de tanıyıp bağlanabildiği diziler olabilir.

BioEdit programı kullanılarak elde edilen bilgiler doğrultusunda, bazı transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin korunduğu belirlenmiştir. Özellikle SP1 bağlanma bölgelerinin korunduğu, aynı zamanda C/EBP α , MYOD ve E-Box dizilerinin korunmuşluğu belirlendi. Yapılan dizi karşılaştırma işleminde insan CAIII promotorunun fare ve sıçana göre daha fazla baz içerdiği görülmüştür. Ayrıca TATA kutusu içeriklerine göre incelendiğinde İnsan CAIII promotorunun TATA içermediği, fare ve sıçan CAIII promotorlarının ise TATA içerdiği görülmüştür. TATA kutu ökaryotik bir dizidir ve evrimsel süreçte çok iyi korunmuşluk göstermiştir. TBP'lerin ve Polimerazın tanıyıp bağlanabildiği bölgedir. TATA kutusu içermeyen promotorlarda bu amaçlar özelleşmiş primidinlerce zengin olan Inr Elementleri bulunmaktadır. İnsan, fare ve sıçan için transkripsiyonun başladığı bölgeler (TSS) “▲” ile işaretlenmiştir. Yapılan analize Şekil 4.1’de gösterilmektedir

4.1.1.2 İnsan CAIII Promotorunun CpG Adası Analizi

Sitozin ve Guanin adaları, transkripsiyonel regülasyonda oldukça önemlidir. Bu bölgelerin metilasyon ile promotor regülasyonu na katılabilme potansiyeli bulunabilir. Bu nedenle guanin sitozice zengin bölgelerin analiz edilmesi amacıyla <http://www.ebi.ac.uk/> sitesindeki Cpplot programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Analiz sonucunda G-C oranı % 50 civarlarında çıkmıştır. Bir promotorun GC adası olduğunu söyleyebilmek için analiz sonucunda çıkan değerin yaklaşık %70-80 oranlarında ya da daha fazla olması gerekiyor. Bu nedenle CAIII promotor dizisinde GC adaları bulunmamaktadır.



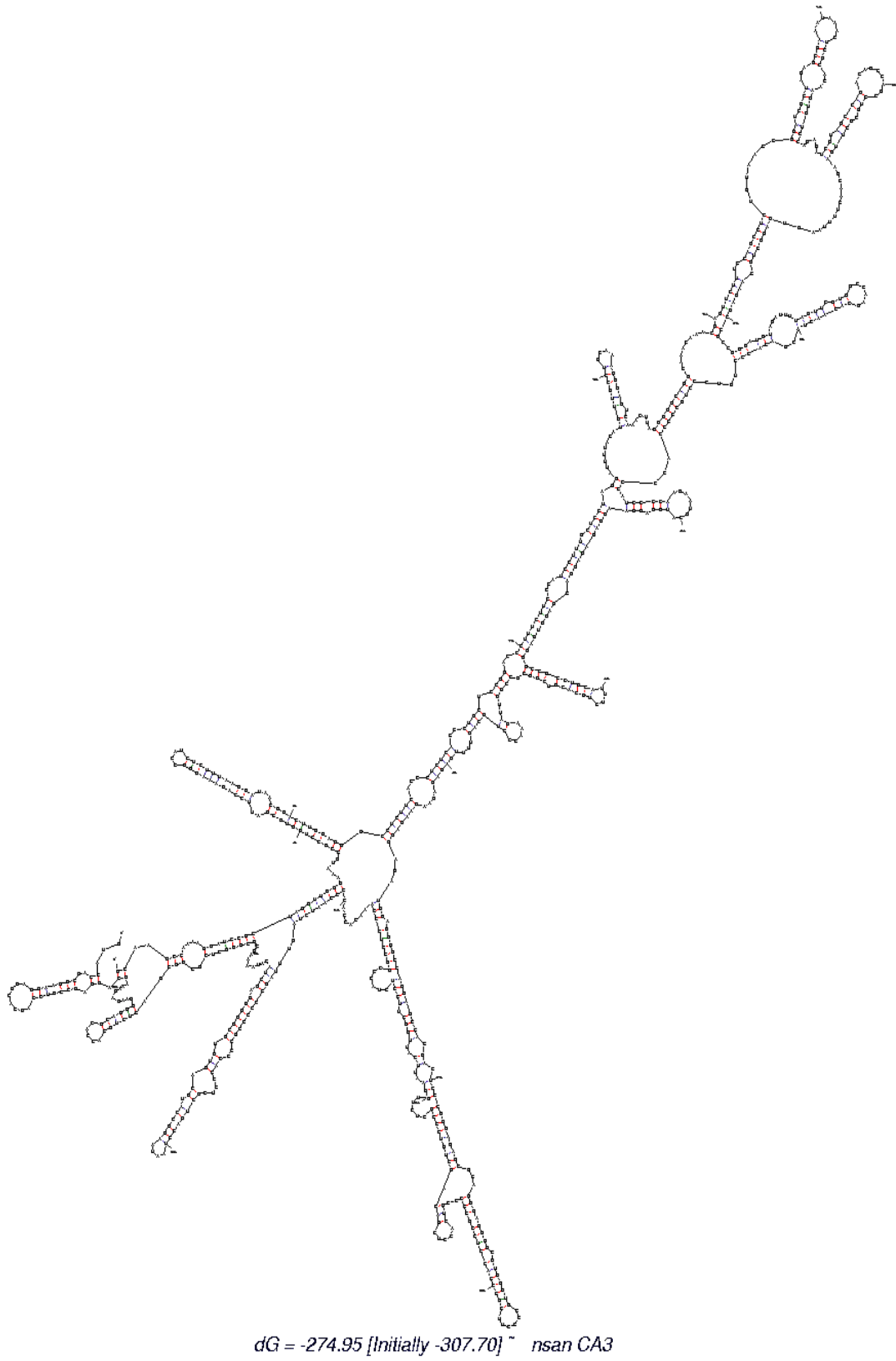
CPGPLOT islands of unusual CG composition
EMBOSS_001 from 1 to 1025

Observed/Expected ratio > 0.60
Percent C + Percent G > 50.00
Length > 200

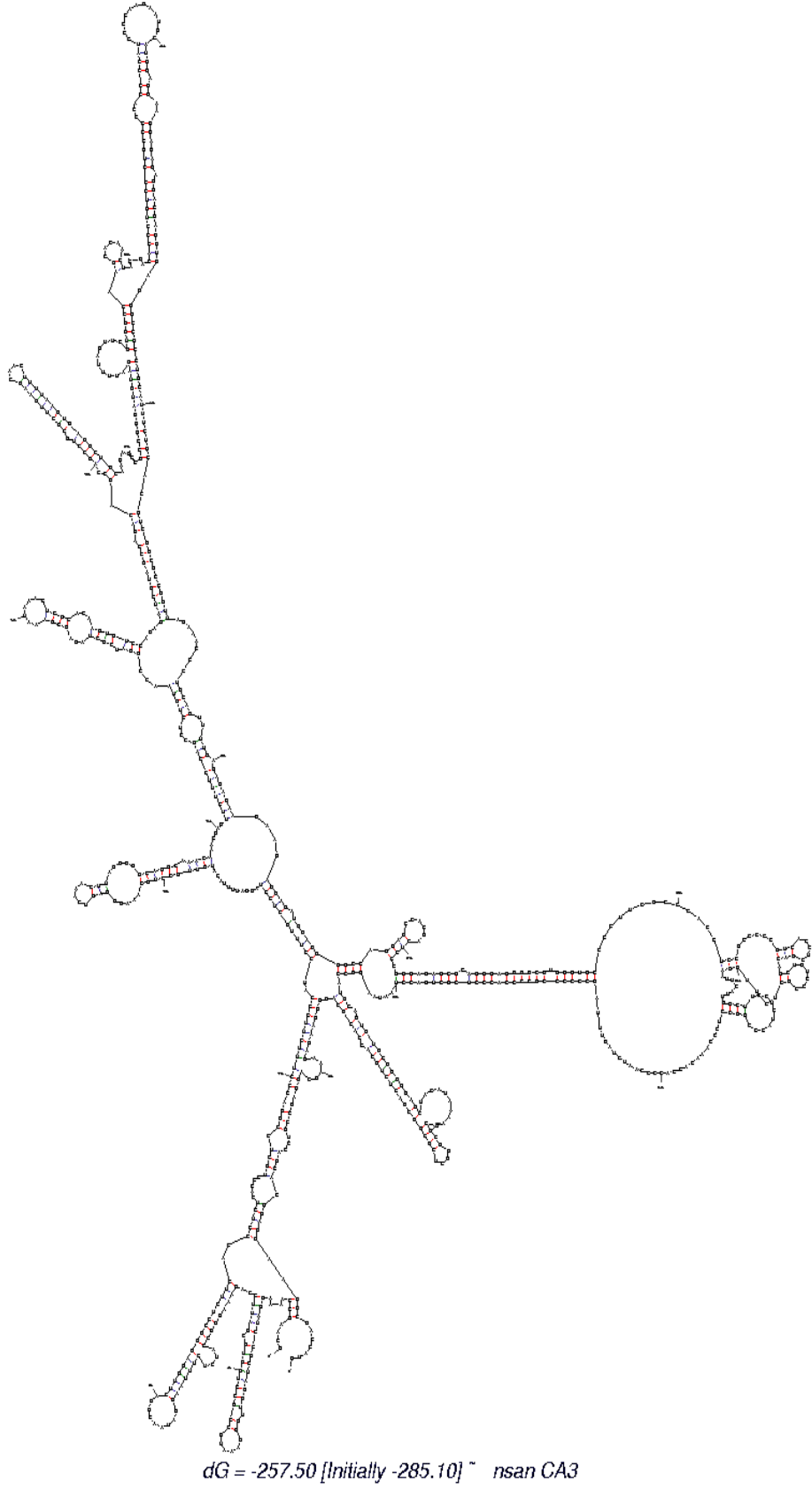
Şekil 4.2 : İnsan CA3 Promotorunun CpG Analiz Sonuçları.

4.1.1.3 İnsan CAIII Promotorunun İkincil Yapı Analizi

Promotor bölgesi çalışmalarında, promotor bölgesi çoğaltılırken ikincil yapılar amplifikasyon için oldukça önemlidir. İnsan CAIII geninin ikincil yapılarının analizi <http://mfold.rna.albany.edu/> internet adresinden analiz edilmiştir. 26 adet yapı karşımıza çıkmasına rağmen bunlardan “ ΔG ” değerleri maksimum ve minimum olanları verilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.3 ve 4.4’da verilmiştir.



Şekil 4.3 : İnsan CAIII Promotorunun Sekonder yapısı-I.



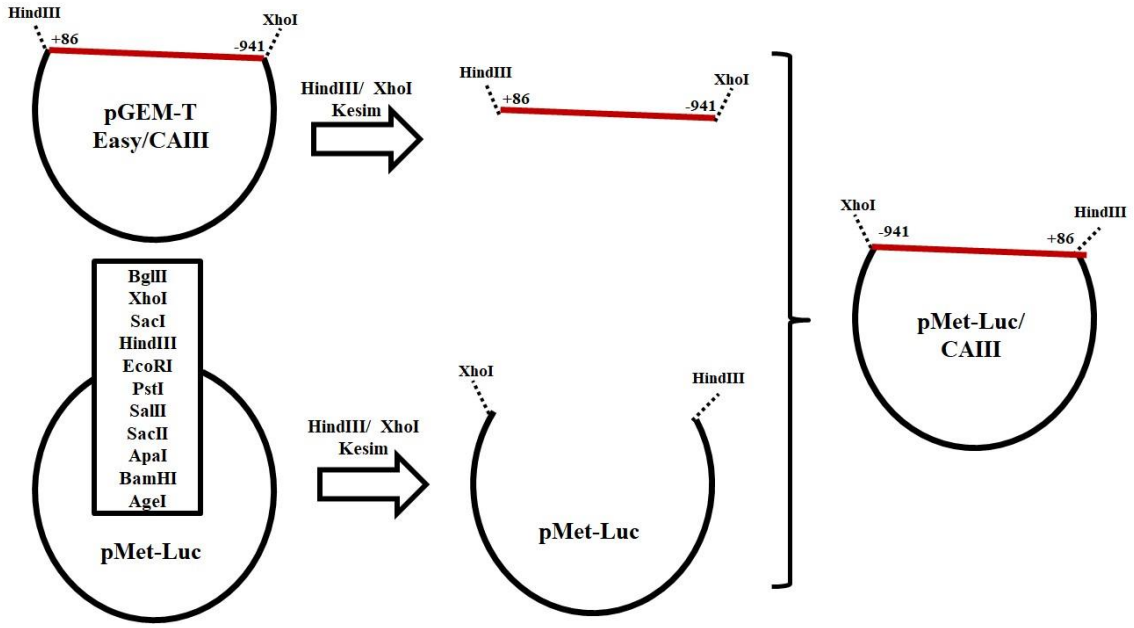
Şekil 4.4 : İnsan CAIII Promotorunun sekonder yapısı-II.

4.1.2 İnsan CAIII Promotorunun Lusiferaz Haberci Vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

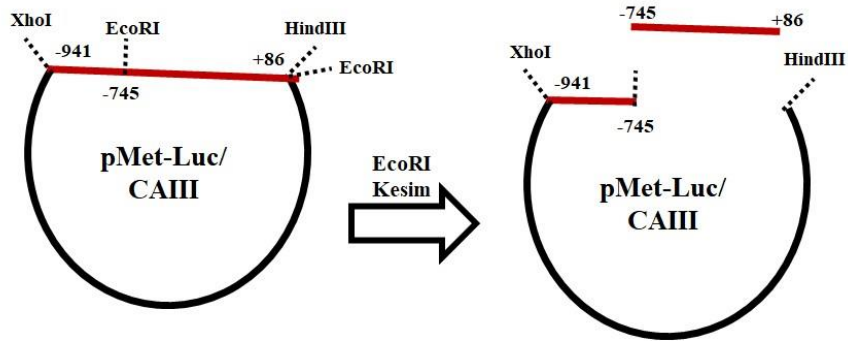
“İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Promotorunun Klonlanması ve Genin Ekspresyon Profil Analizi” isimli Yüksek Lisans tezim kapsamında CAIII promotoruna ait -941/+86’lık bölgenin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması, dizi analizi ile bu bölgenin doğrulanması sağlanmıştır.

Doktora tezim kapsamında, pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan CAIII promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMET-LuC lusiferaz reportör vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilen pMET-Luc vektörü ile insan CAIII promotoru bir gece +4°C’de ligasyona bırakıldı. Kesim sonuçları şekil 4.7’de gösterilmektedir. Ligasyon Bölüm 3.2.2.5 de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Ligasyon ürünü *E.coli* XL-1 blue hücrelerine transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 4 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. EcoRI enzimi ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi ekilen 4 kolonin hepsinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan CAIII promotor dizisini içermektedir.

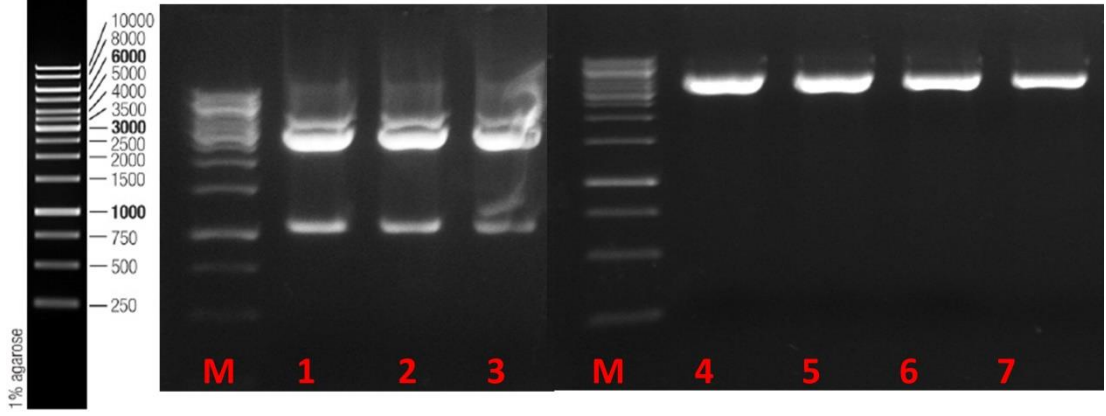
-941/+86 CAIII promotor bölgesinin klonlama stratejisi Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Rekombinant kloninin restriksiyon kesim strateji ile kontrol planı ise şekil 4.6’da gösterilmektedir.



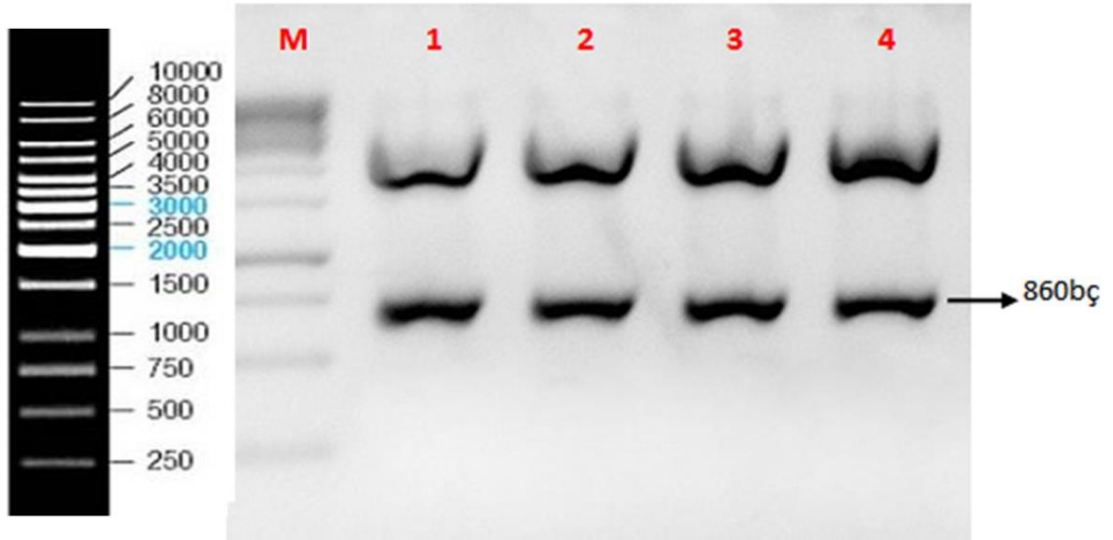
Şekil 4.5 : -941/ +86 CAIII Promotor bölgesinin klonlanması



Şekil 4.6 : -941/ +86 CAIII Promotoru için rekombinant kloni kontrol planı



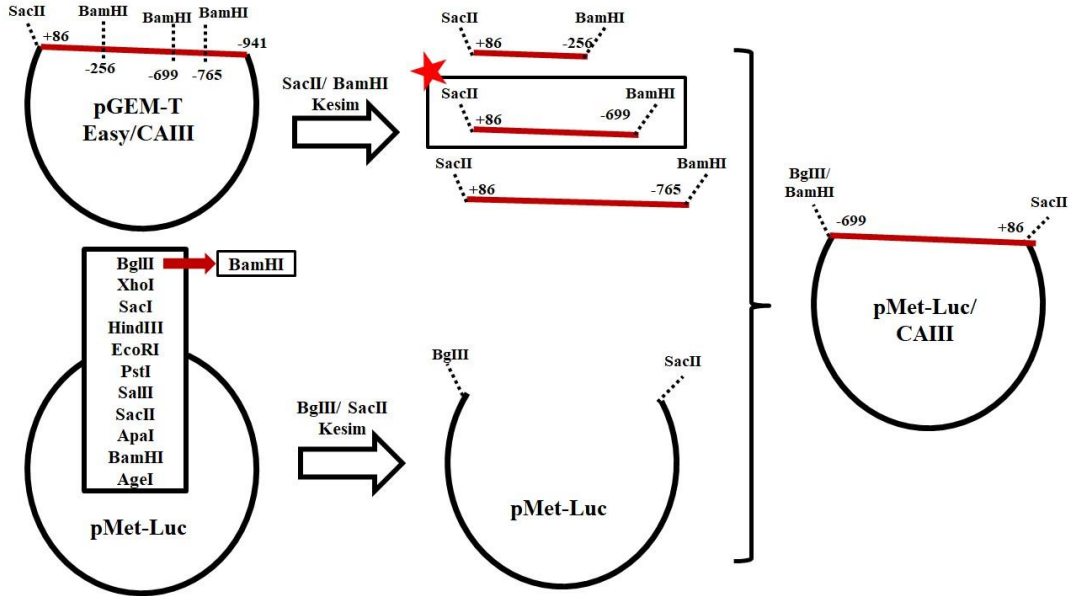
Şekil 4.7 : XhoI ve HindIII enzimleri ile kesilerek hazırlanan pGEM-T Easy/CAIII ve pMetLuc Vektörleri (M: 1kb Marker, 1: pGEM-T Easy/CAIII kesim, 2: pGEM-T Easy/CAIII kesim, 3: pGEM-T Easy/CAIII kesim, M: 1kb Markör, 4: pMetLuc kesim, 5: pMetLuc kesim, 6: pMetLuc kesim, 7: pMetLuc kesim)



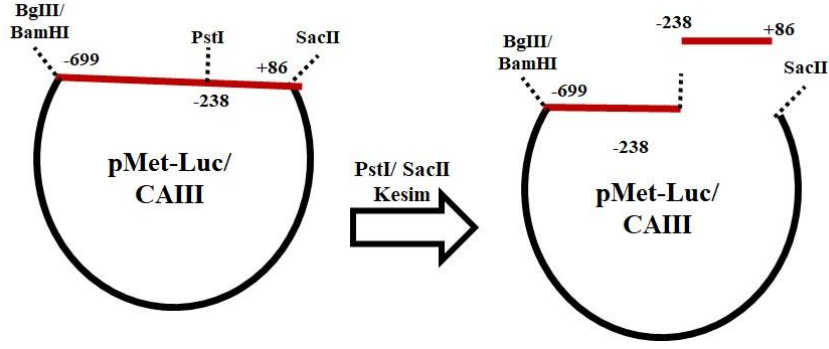
Şekil 4.8 : pMetLuc vektörüne klonlanan -939/+86 CAIII promotorunun EcoRI enzimi ile yapılan kontrol kesim sonuçlarının jel görüntüsü (M: Marker, 1: 1. Koloni kontrol kesini, 2: 2. Koloni kontrol kesimi, 3: 3. Koloni kontrol kesimi, 4: 4. Koloni kontrol kesimi).

Dizi analizi ile kontrol edilen insan CAIII promotoruna ait -941/ +86 dizisine ait bölge pGEMT-Easy içerisinde BamHI ve SacII enzimleri kullanılarak CAIII -699/ +86 promotor parçası oluşturmak üzere çıkartılmıştır. CAIII -699/ +86 promotor parçası haberci vector sistemi olan pMetLuc'a klonlayabilmek için benzer uç oluşturan BglII ve SacII ile kesilmiştir. Kesim sonuçları Şekil 4.11'da gösterilmiştir.

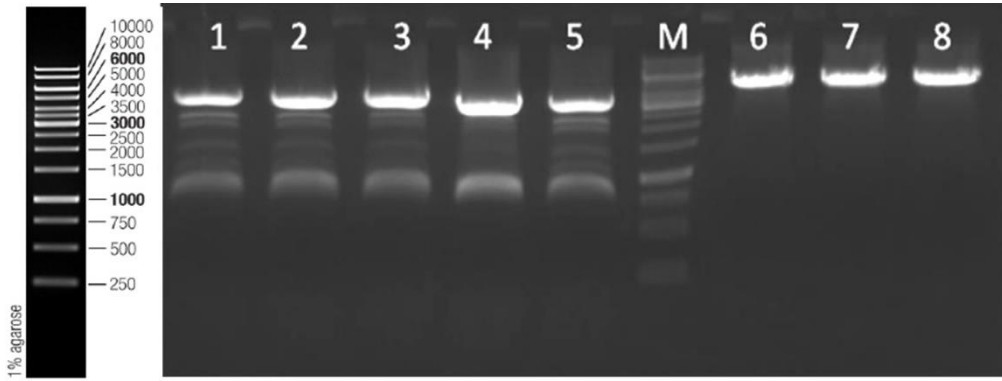
-699/+86 CAIII promotor bölgesinin klonlama stratejisi Şekil 4.9'de gösterilmektedir. Rekombinant klonunun restriksiyon kesim strateji ile kontrol planı ise şekil 4.10'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9 : -699/ +86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı

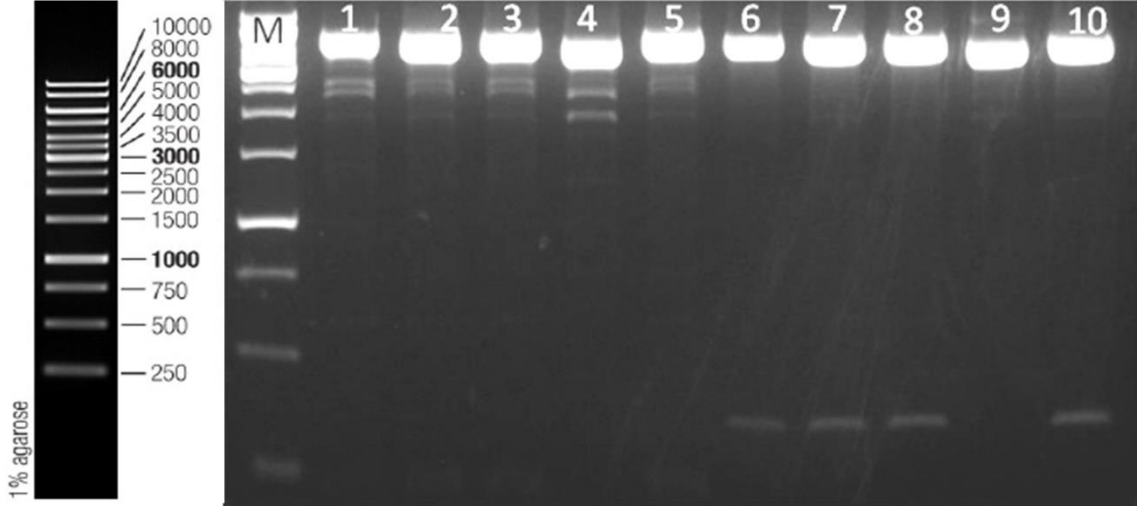


Şekil 4.10 : -699/ +86 CAIII promotor klonlama kontrol kesim planı



Şekil 4.11 : CAIII -699/+86 konstrağı için -941/+86 CAIII+pGeMT-Easy'ın BamHI ve SacII ile, pMetLuc Vektörünün ise SacII ve BglII ile kesimi (M: 1kb Marker, 1-5 -939/+86 CAIII+pGEMT Easy kesimi, 6-8: pMetLuc kesimi).

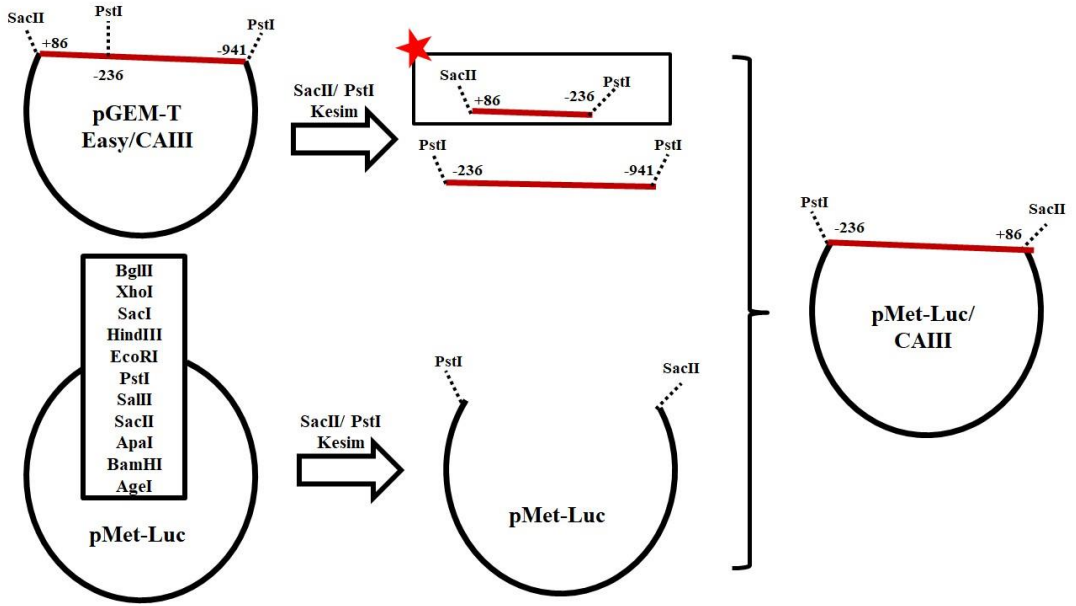
CAIII -699/+86 konstrağının oluşturulması için hazırlık kesimleri yapılan vektör ve CAIII promotor dizisinin ligasyon ürünlerine ait transformasyonu sonucu oluşan kolonilerinin rekombinant olup olmadığını belirlemek amacıyla PstI ve SacII enzimleri kullanılarak plazmit kontrol kesimi yapılmıştır. Seçilen bu enzimler konstrağı keserek 324 bp'lik bir parçanın çıkmasına sebep olmaktadır. Kesim sonucu Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Fotoğrafa bakıldığında 6, 7, 8 ve 10. Koloniler rekombinanttır.



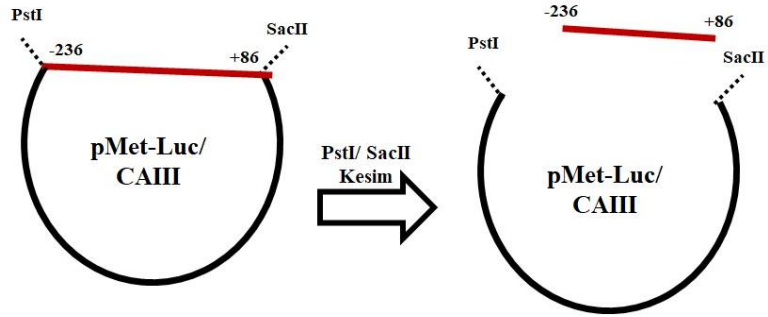
Şekil 4.12 : İnsan CAIII -699/+86 konstrağı için rekombinant koloni kontrol kesim sonucu. (M: Marker, 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni, 3: 3. Koloni, 4: 4. Koloni, 5: 5. Koloni, 6: 6. Koloni, 7: 7. Koloni, 8: 8. Koloni, 9: 9. Koloni, 10: 10. Koloni).

Diğer konstrakların yapımı gibi İnsan CAIII -236/+86 promoter parçası oluşturmak içinde restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. -941/+86 CAIII + pGEMT-Easy ve pMETuC vektörü SacII ve PstI enzimleri ile kesilmiş, ligasyon için hazır hale getirilmiştir. Ligasyon ve transformasyon sonrası rekombinant koloni taraması yine restriksiyon enzimleri ile yapılmıştır (Şekil 4.15 ve 4.16).

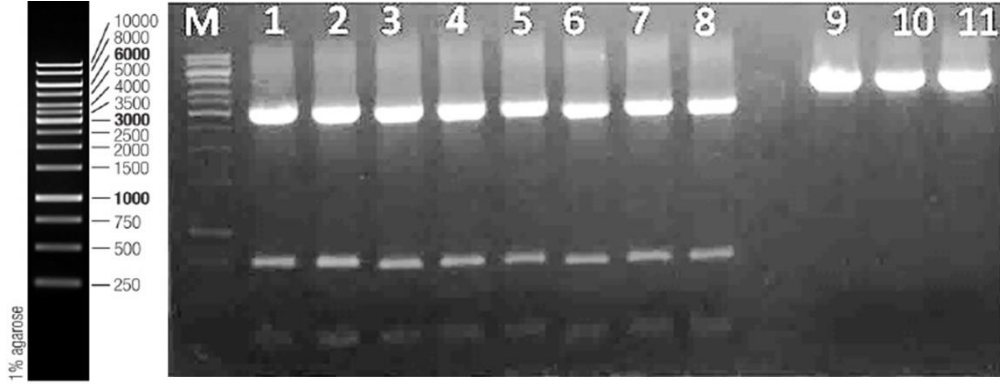
-236/+86 CAIII promotor bölgesinin klonlama stratejisi Şekil 4.13'de gösterilmektedir. Rekombinant kloninin restriksiyon kesim strateji ile kontrol planı ise şekil 4.14'da gösterilmektedir.



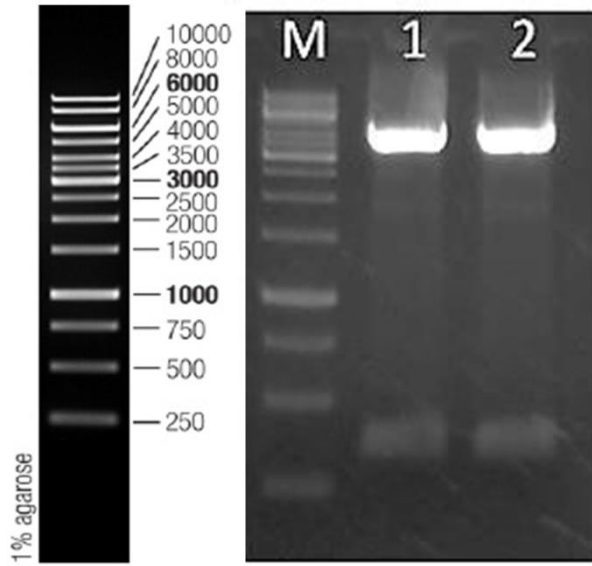
Şekil 4.13 : -236/ +86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı



Şekil 4.14 : -236/ +86 CAIII Promotor bölgesinin kontrol kesim planı



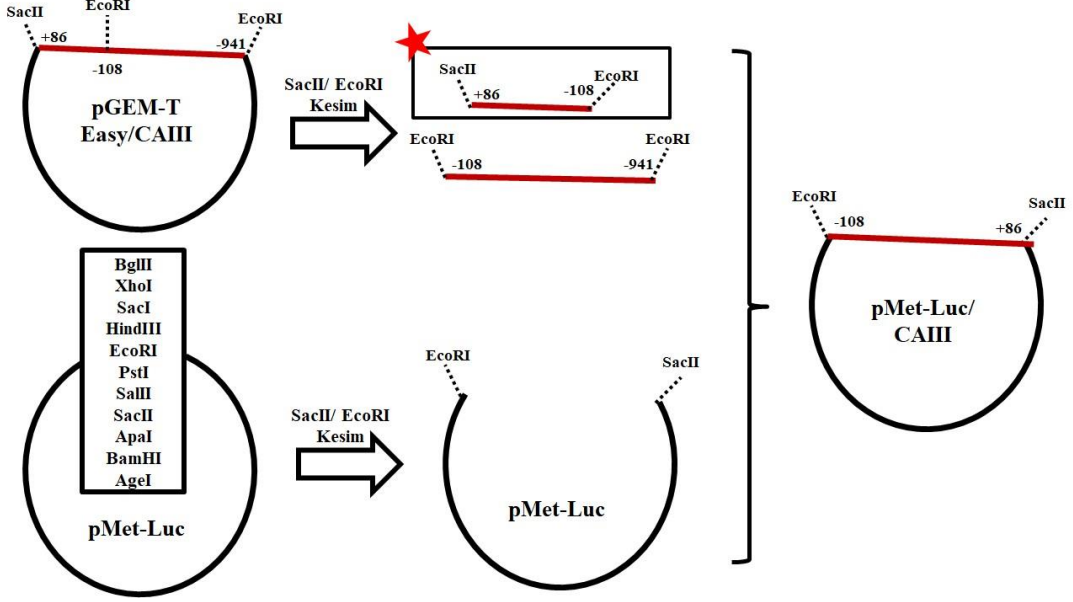
Şekil 4.15 : CAIII -236/+86 ve pMetLuc vektörünün SacII ve PstI ile kesilmesi (M: 1kb Marker, 1-8 (-236/+86)+pMetLuc, 9-11: pMetLuc kesimi).



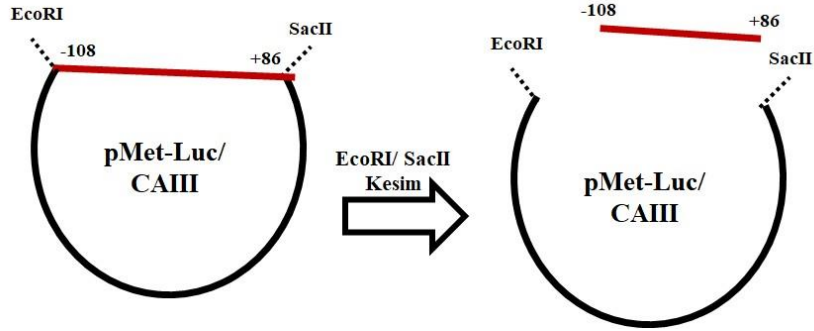
Şekil 4.16 : CAIII -236/+86 konstrağın koloni taraması (M: 1kb Marker, 1-2: CAIII -236/+86 ve pMetLuc kesimi).

CAIII -108/+86 promotor parçasının oluşturulmasında da restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. -941/+86 CAIII + pGEMT-Easy ve pMETLuc vektörü SacII ve EcoRI enzimleri ile kesilmiş, ligasyon için hazır hale getirilmiştir. Ligasyon ve transformasyon sonrası rekombinant koloni taraması yine restriksiyon enzimleri ile yapılmıştır (Şekil 4.19 ve 4.20)

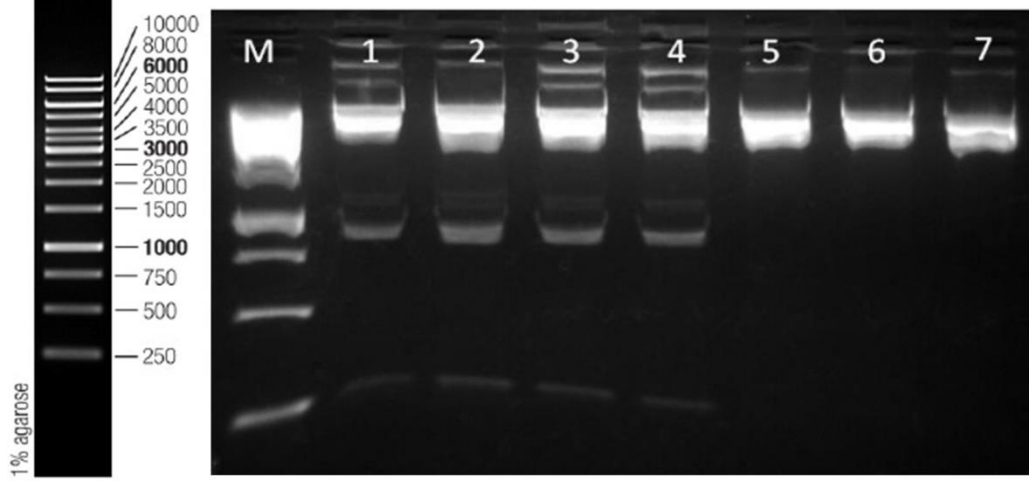
-108/+86 CAIII promotor bölgesinin klonlama stratejisi Şekil 4.17’de gösterilmektedir. Rekombinant klonunun restriksiyon kesim strateji ile kontrol planı ise şekil 4.18’da gösterilmektedir.



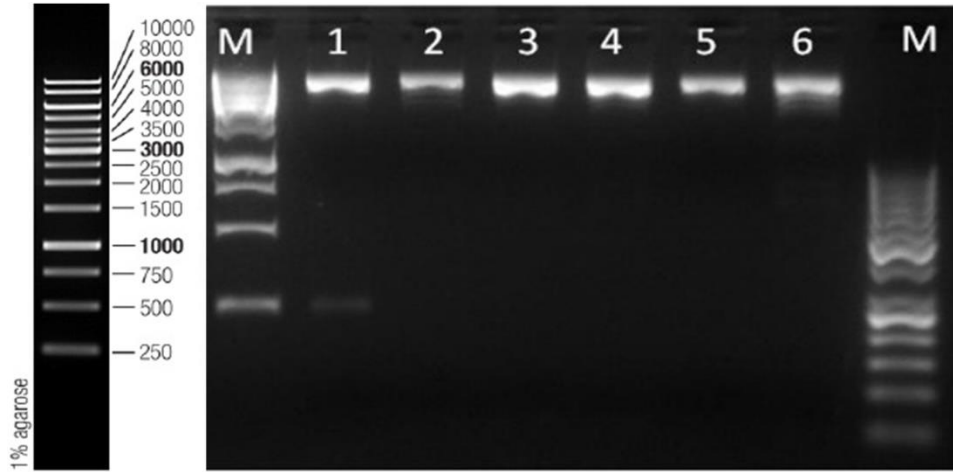
Şekil 4.17 : -108/+86 CAIII Promotor bölgesi klonlama planı



Şekil 4.18 : -108/ +86 CAIII promotor bölgesi klonlama kontrol planı



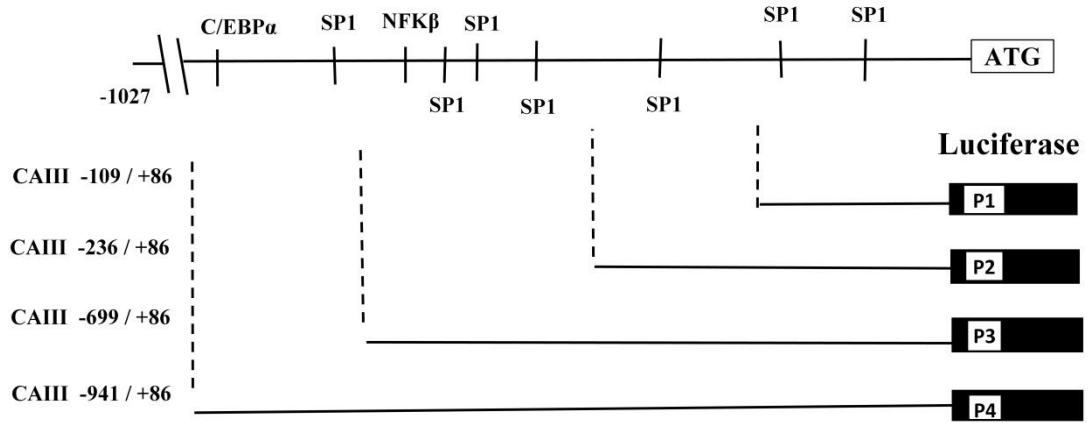
Şekil 4.19 : -941/+86 CAIII + pGEMT-Easy ve vektörü SacII ve EcoRI enzimleri ile kesimi (M: Marker, 1-4: -939/+86 CAIII + pGEMT-Easy kesim sonucu, 5-7: pMetLuc kesimi).



Şekil 4.20 : CAIII -108/+86 + pMetLuc koloni taramasında kontrol kesimi (SacII ve EcoRI) (M: Marker, 1: CAIII -108/+86 içeren recombinant pMetLuc, 2-6: CAIII -108/+86 içermeyen pMetLuc).

pMetLuc vektörüne klonlanan CAIII -941/+86 promotor parçası kullanılarak restriksiyon kesimi ile 4 farklı uzunlukta promotor parçası oluşturulmuştur. Promotor parçalarının şematize edilmiş şekli aşağıda Şekil 4.21’de görülmektedir.

Promotor parçalarının kapsadığı bölgeler ve uzunlukları şu şekildedir; P1 (Promotor parçası 1): 1025 bç (-941/+86), P2 (Promotor parçası 2): 785 bç (-699/+86), P3 (Promotor parçası 3): 322 bç (-236/+86), P4 (Promotor parçası 4): 194 bç (-108/+86).



Şekil 4.21 : Promotor Parçalarının temsili Şekli P1 (Promotor parçası 1): 1025 bç (-939/+86), P2 (Promotor parçası ü2): 785 bç (-699/+86), P3 (Promotor parçası 3): 322 bç (-236/+86), P4 (Promotor parçası 4): 194 bç (-108/+86).

İnsan CAIII promotor parçalarının fonksiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için kolon karsinomu (HT29) ve insan osteosarkom (Saos2) hücrelerine kalsiyum fosfat prespitasyon metodu kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Kalsiyum fosfat prespitasyon yöntemi, DNA'nın kalsiyum klorür ile karıştırılması ve bu karışımın fosfat içeren tampona kontrollü şekilde ilave edilerek oda sıcaklığında inkübasyonunu içerir. Böylece oluşan prespitasyonlar hücreler üzerine yayılarak fagositoz ya da endositoz yoluyla hücrelerin DNA moleküllerini almalarını sağlar. Yöntem özellikle kullanılan materyallerin ucuz olması ve kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Promotor aktivitesini belirlemek için haberci gen olarak *Metridia longa* (marin copepod) lusiferaz geni içeren pMetLuc vektör sistemi kullanılmıştır. Lusiferaz proteini medyuma salındığı

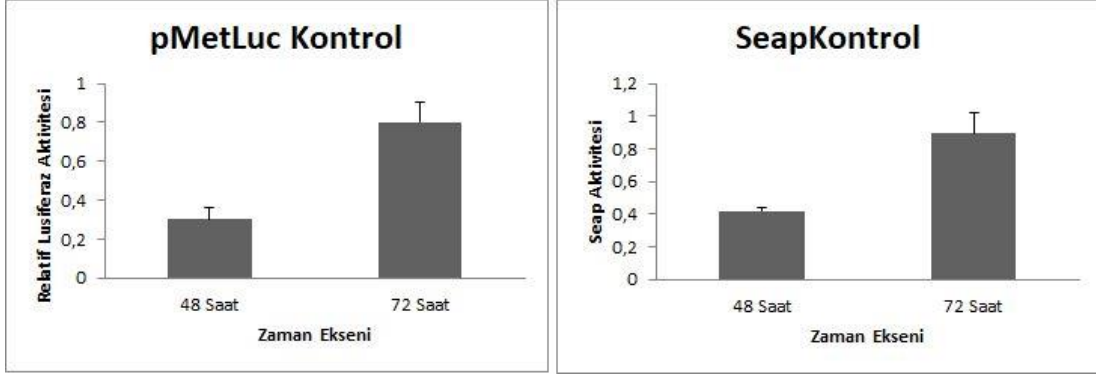
için lusiferaz aktivitesini belirlemek hassas, güvenilir ve hızlıdır ayrıca bu enzimin hücre içinde sabit kalmasından olmasından dolayı (uzun yarı ömürlü), lusiferaz raportör geni promotor aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. HT29 kalsiyum fosfat prespitasyon yöntemi ile kolaylıkla transfekte edilmektedir. Transfeksiyon çalışmalarından önce promotor parçalarının dizi analizi ile kontrolleri yapıldıktan sonra Bölüm 3.2.2.8 belirtildiği üzere büyük ölçekli plazmit izolasyon kiti (Maxi prep) ile saflaştırılarak transfeksiyonları yapıldı.

4.1.2.1 Lusiferaz/SEAP Optimizasyonları

Lusiferaz enzim aktivitesini belirlemek için ‘Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System’ kullanılmıştır. Ölçümler Luminoskan Ascent marka luminometre ile alınmıştır. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Hücrelere promotor parçasını içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 µg SEAP (Secreted Alkaline Fosfatase) vektörü de transfekte edildi.

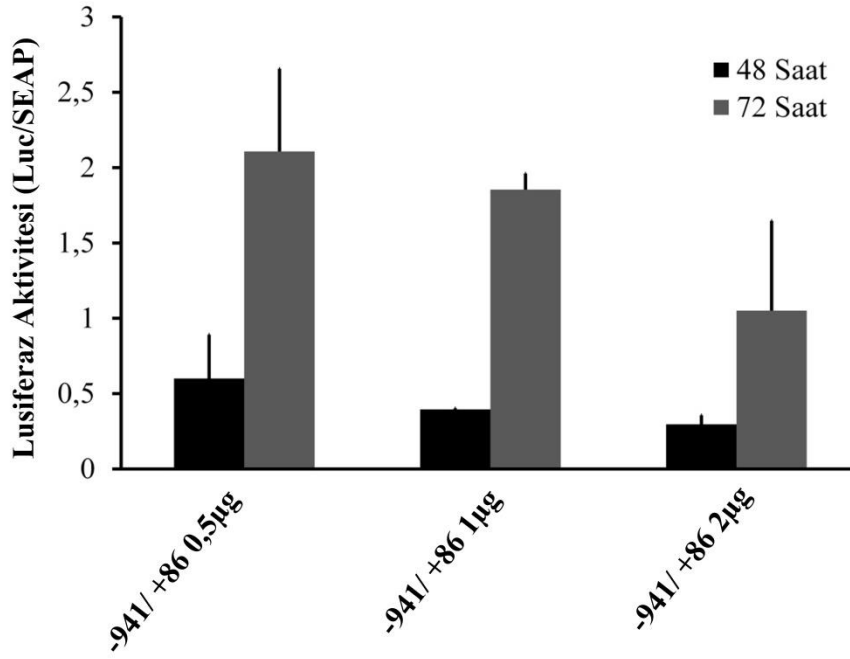
Transfeksiyon deneylerinde kontrol kullanmak son derece önemlidir. Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesinde önünde virus promotoru taşıyan pMeTLuc kontrol vektörü transfekte edilmiştir. Viral promotor oldukları için çok yüksek lusiferaz aktivitesi göstermektedir. Bu vektor haritası Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Normalizasyon amaçlı endojen kontrol olarak kullandığımız SEAP aktiviteleri içinde önünde viral promotor taşıyan seap kontrol vektörü kullanılmıştır. SEAP Kontrole ait vektör haritası Şekil 3.4’de görülmektedir.

Transfeksiyonun etkiliğini belirlemek üzere yapılan Şekil 4.22 de belirtilen deneyler pozitif kontrollerdir. Transfeksiyonun başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir.



Şekil 4.22 : Saos-2 hücre hattında Lusiferaz/SEAP aktivitesi.

Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 sa sonra medyundan örnek alınarak Bölüm 3.2.3.2.2' de belirtildiği şekilde lusiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçüldü. En büyük promotor parçası olan 1025 bç (-941/+86) ile konsantrasyon optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla 0.5 µg 1 µg ve 2 µg, 1025 bç (-941/+86) promotor parçası farklı bir doku modeli olarak seçilen HT29 hücrelerine kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi ile transfekte edildi ve DNA konsantrasyonu belirlendi. 0.5µg promotor parçası uygulamasının lusiferaz ölçümü değerlendirilmesinde yeterli olduğu görüldüğü için kotransfeksiyonlarda 0.5 µg promotor parçası uygulamasına karar verildi (Şekil 4.23).



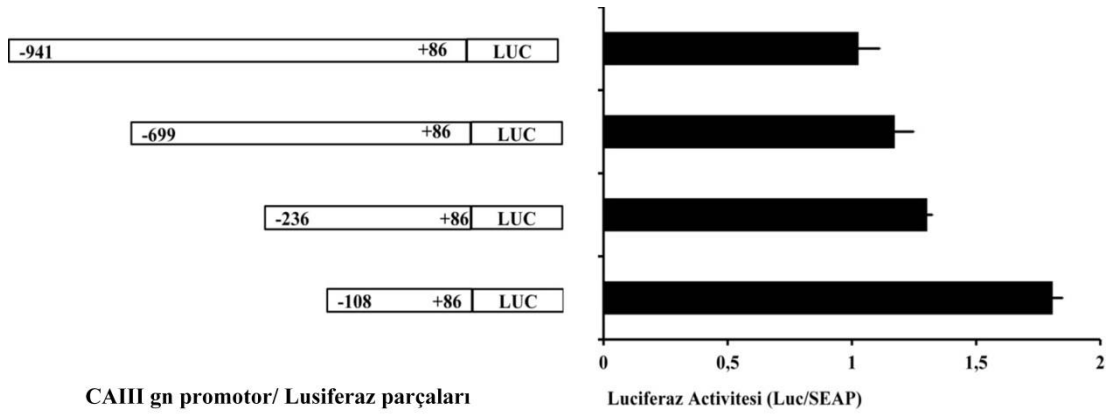
Şekil 4.23 : Transfeksiyon deneyleri için -941/+86 İnsan CAIII Promotor Parçalarının Saos-2 hücre hattında miktar optimizasyonu.

4.1.2.2 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

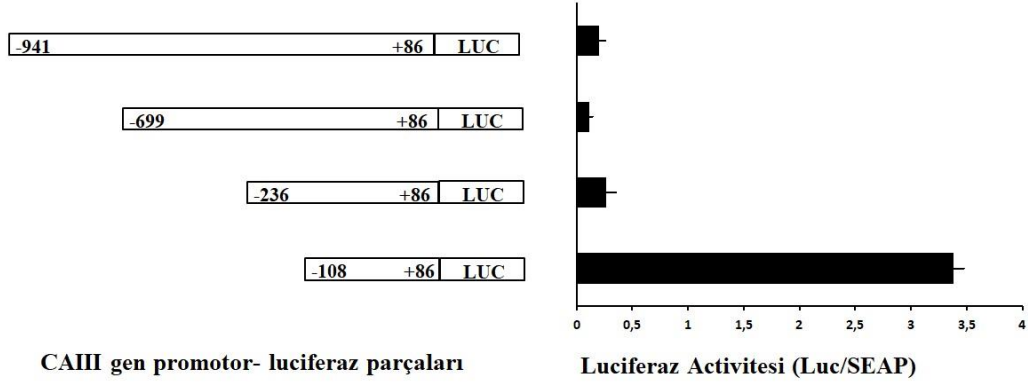
Öncelikle dört farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan CAIII promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlenmiştir. HT29 ve Saos-2 modeline aktarımda kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır ve lusiferaz vektör sistemiyle aktivite belirlenmiştir. Hücrelere 0.5 µg promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 µg SEAP vektörü de transfekte edilmiştir. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak promotor parçası içermeyen pMetLuc vektörü hücrelere transfekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak pMetLuc vektörü kullanılmasının nedeni, bu vektörün lusiferaz geninin önünde kontrol promotor taşıdığı için yüksek lusiferaz aktivitesi göstermesidir. Transfeksiyondan 48 ve 72 sa sonra transfekte edilmiş hücrelerden medyum toplanarak Bölüm

3.2.3.2.2’de belirtildiği şekilde lusiferaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edilmiştir. HT29 hücrelerinde promotor konstraklarının bazal aktiviteleri Şekil 4.24’de, Saos-2 hücrelerinde promotor konstraklarının bazal aktiviteleri ise Şekil 4.25’da verilmiştir.

Bazal aktiviteler, dokuya özelleşmiş farklılık göstermektedir. Her doku için transkripsiyonel regülasyonda ve promotor aktivitesinde farklılıklar görmek şaşırtıcı değildir. Gerek dokunun karakteri, gerek kanserleşme sürecindeki basamaklar bu ifadenlerdeki farklılıkların temelini oluşturan bazı etkenlerdendir. CAIII promotor konstraklarının Saos-2 ve HT29 hücre hatlarındaki aktiviteleri farklılık göstermektedir. Özellikle Saos-2 hücre hattında en küçük promotor konstraklığı olan -108/ +86’lık bölge oldukça aktiftir. Bu etki HT29 hücrelerinde de kısmi olarak gözükse de, Saos-2 hücrelerinde kıyasla aktivitesi daha düşüktür.



Şekil 4.24 : HT29 Hücrelerinde CAIII Promotor Parçalarının Transfeksiyonu Etkinliği.



Şekil 4.25 : Saos-2 Hücrelerinde CAIII Promotor Parçalarının transfeksiyonu Etkinliği

4.1.3 Bazı Transkripsiyon Faktörlerinin İnsan CAIII Geninin Transkripsiyonel Regülasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

İnsan CAIII Promtorouna bağlanan olası transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi için MATINSPECTOR programı kullanılmıştır. Programın önerdiği olası transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri analiz edilerek deney planı belirlenmiştir.

Bu bağlamda özellikle SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörlerinin bağlanmaları dikkat çekici bir tablo çizmektedir. MATINSPECTOR proqramına göre bağlanmalar EK-C'de verilmiştir.

4.1.3.1 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi

4.1.3.1.1 İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Genine Bağlanan Olası SP1 Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi

İnsan CAIII Promotoruna bağlanan olası “Specificity Protein 1 (SP1)” bölgeleri MATINSPECTOR programı sonucunda belirlenmiştir. Buna göre bağlanan bölgeler Tablo 4.2’de gösterilmektedir.

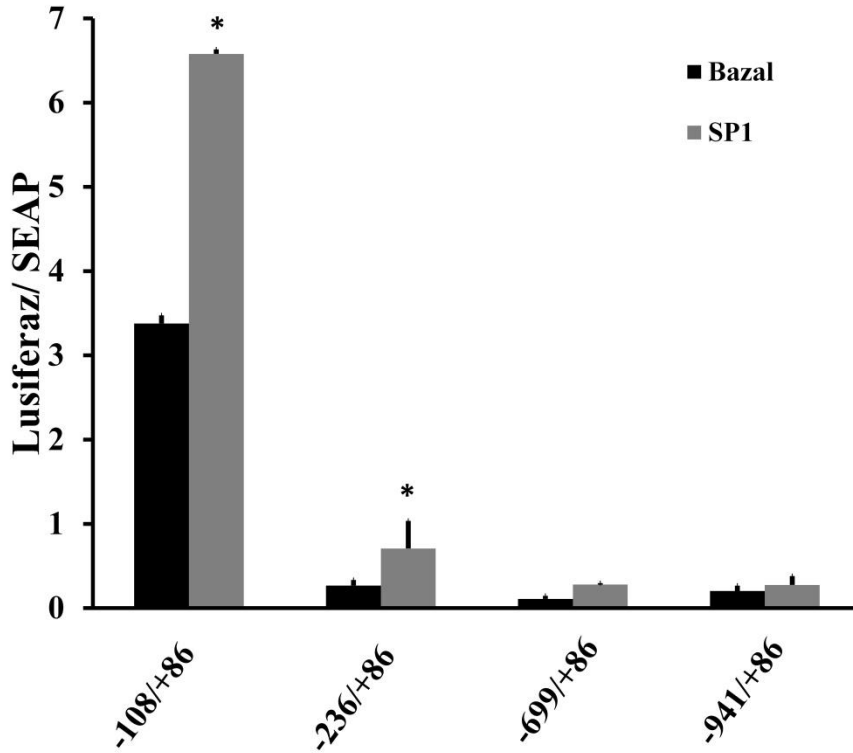
Tablo 4.2 :İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Promotoruna bağlanan olası SP1 Bölgeleri.

İnsan CAIII Promotoru Üstündeki Olası SP1 Bağlanma Bölgeleri	
-34/-50	-163/-179
-38/-54	-319/-335
-107/-123	-325/-341
-133/-149	-515/-531
-158/-174	

4.1.3.1.2 İnsan CAIII Promotorunun SP1 ile Ko-Transfeksiyonu

Dört farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan CAIII promotor parçaları SP1 transkripsiyon faktörü ile birlikte Saos-2 hücrelerine beraber transfeksiyonu yapılarak promotor parçalarının aktivitesi belirlenmiştir. Saos-2 modeline aktarımda Bölüm 3.2.3.2.1’de anlatılan kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır ve Bölüm 3.2.3.2.2’de anlatılan lusiferaz vektör sistemiyle aktivite belirlenmiştir.

SP1 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon vektörleri Dr.Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi U.K."den temin edilmiştir. Hürelere 0.5 µg promotör parçaları içeren rekombinant plazmitler, 2 µg SP1 transkripsiyon faktörü içeren plazmitler ve transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 µg SEAP vektörü de transfekte edilmiştir. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak promotör parçası içermeyen pMetLuc vektörü hürelere transfekte edilmiştir. CAIII Promotör konstarklarının bazal ve ko-transfeksiyon aktiviteleri Şekil 4.26'de gösterilmektedir.



Şekil 4.26 :Saos2 Hücre hattında CAIII promotör parçaları ile SP1 Transkripsiyon faktörünün Ko-Transfeksiyon.

Üç tekrarlı olarak yapılan deney sonucunda en yüksek aktivite en küçük promotör parçası olan CAIII -108/+86 parçasında gözlenmiş ve SP1 Transkripsiyon

faktörünün -108/+86 ve -236/+86 CAIII Promotor konstrakalarını belirgin bir şekilde transkripsiyonel aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir.

4.1.3.1.3 İnsan CAIII mRNA'sının SP1 ile Regülasyonunun Belirlenmesi

mRNA düzeyinde CAIII ifadesinin belirlenmesi amacıyla SP1 transkripsiyon faktörü ile Saos-2 hücreleri, bölüm 3.2.3.2.1'de anlatıldığı şekilde transfekte edilmiştir. 24, 48 ve 72. Saatlerde hücre pelletleri toplanarak bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi RNA miktarları belirlenmiştir. Bölüm 3.2.4.4 anlatıldığı şekilde elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır.

Sentezlenen cDNA'ların çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla Human- β -Mikroglobulin genleri kullanılarak bölüm 3.2.5.3'de anlatıldığı şekilde Semi Kantitatif PCR yapılmış ve sonuç % 2'lik agaroz jelde yürütülerek görünür hale getirilmiştir.

Çalıştığı belirlenen DNA'larda CAIII'ün ifadesinin belirlenmesi amacıyla Kantitatif Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) yapılmıştır. Real Time PCR bölüm 3.2.5.4'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

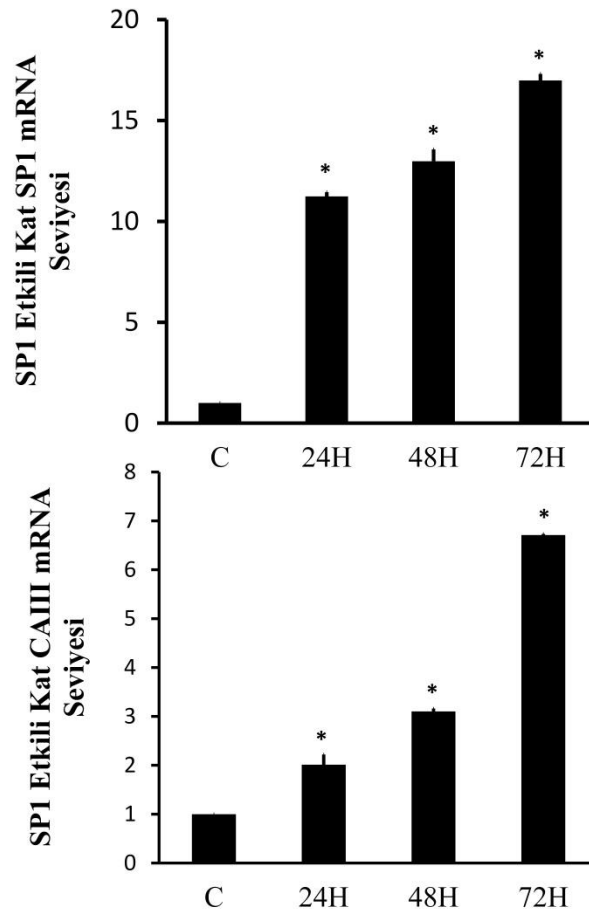
Sonuçlar Bölüm 3.2.5.4'da anlatılan Livak metoduna göre değerlendirildi. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır.

SP1, ektopik olarak seçilen hücre hattalarında transfekte edilip, aşırı ifade edilmiştir. Gerçekten de hücrede SP1 aşırı ifade edildiği Real time PCR kontrol edilmiştir. Buna göre SP1 mRNA'sının arttığı, SP1'in CAIII mRNA'sı üzerinde de arttırıcı etki yaptığı gösterilmiştir. Real Time PCR'ın grafiksel görünüm Şekil 4.27'de gösterilmektedir.

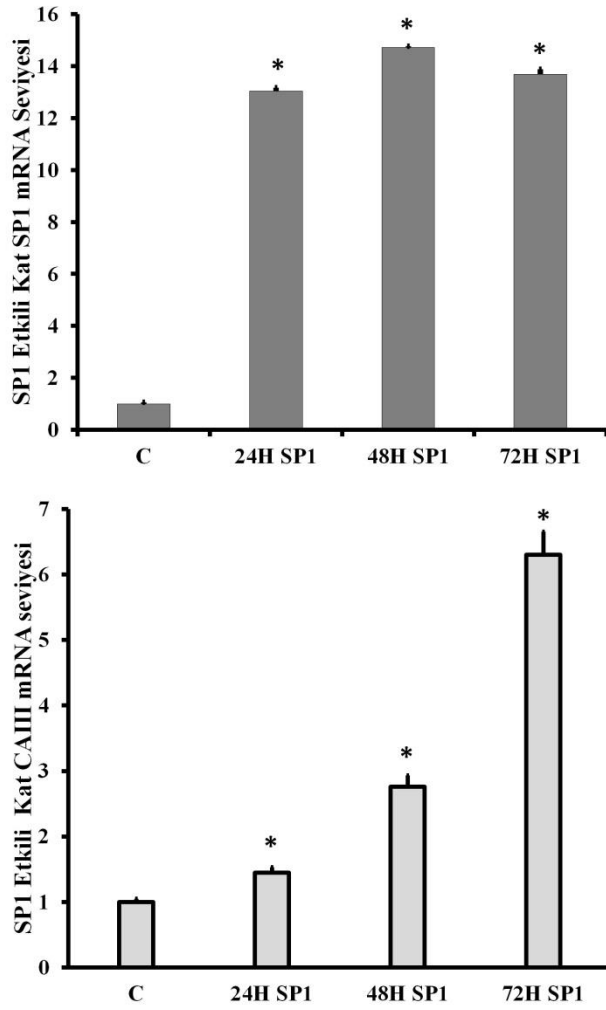
Elde edilen etkinin dokuya mı bağla olup olmadığını belirlemek üzere farklı bir hücre hattı olan insan prostat kanser modeli PC3 hücrelerine SP1 ektopik olarak

transfekte edilmiştir. Real-Time verilerine göre PC3 hücrelerinde de SP1 etkili CAIII mRNA seviyesi zamana bağlı artış göstermektedir (Şekil 4.28).

Yapılan analizler gösteriyor ki SP1 transkripsiyon faktörü CAIII mRNA'sını ekspresyon seviyesini hem Saos-2 hücrelerinde hem de PC3 hücrelerinde zamana bağlı olarak arttırmaktadır.



Şekil 4.27 :SP1 ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve SP1 ekspresyon seviyesindeki değişim.



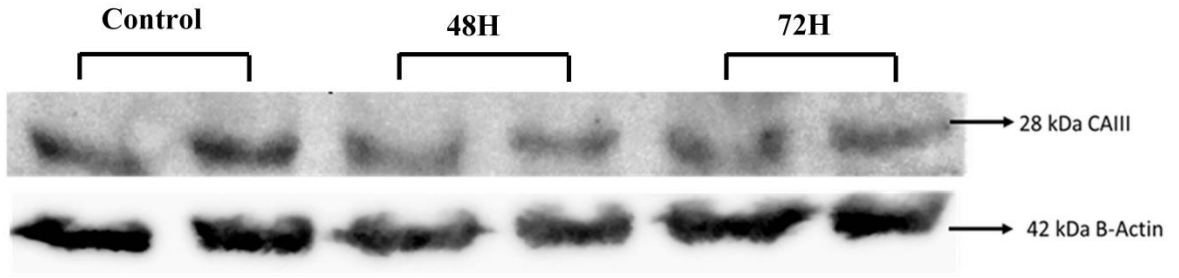
Şekil 4.28 : SP1 ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve SP1 ekspresyon seviyesindeki değişim

4.1.3.1.4 İnsan CAIII Proteininin SP1 ile Regülasyonunun Belirlenmesi

Seçilen Transkripsiyon faktörlerinin CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için çalışılacak hücre soyları Bölüm 3.2.3.1.5'da anlatıldığı gibi başlatılmış, Bölüm 3.2.3.1.6'de anlatıldığı gibi büyütülüp pasajlanmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna gelen hücre popülasyonu sayımı yapılarak 25 cm²'lik flask içinde 2.000.000 hücre olacak şekilde bölünüp, son hacmi 5 mL olacak şekilde % 10 FCS içeren DMEM eklenmiştir. Seçilen transkripsiyon faktörleri Saos-2 hücre hattında

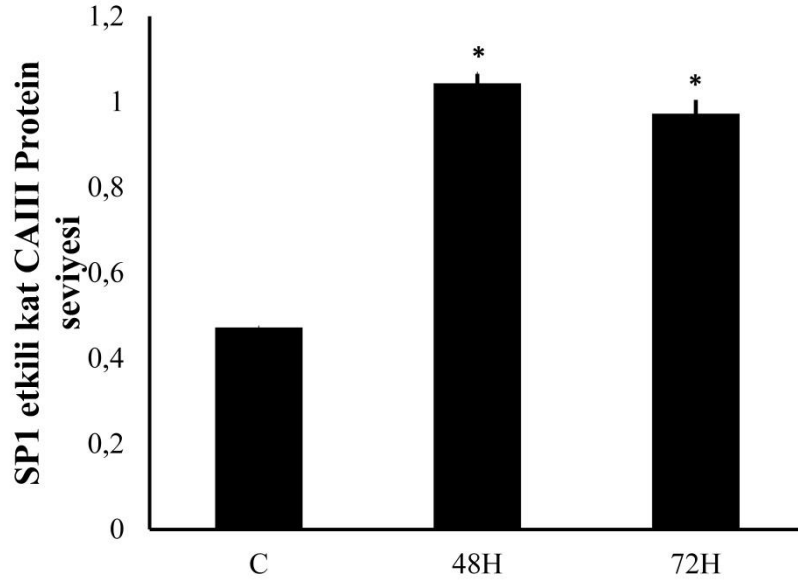
Bölüm 2.2.3.2.1’de anlatıldığı şekilde kalsiyum-fosfat presipitasyon metoduyla kullanılan materyaller ve son hacim 5 kat olacak şekilde transfekte edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 zaman aralıklarında toplanmıştır. Bölüm 3.2.6.1.2’de anlatıldığı şekilde RIPA tekniği kullanılarak protein izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.6.1.3’de anlatıldığı gibi protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

Elde edilen protein havuzları kullanılarak Western Blot yapılmıştır. Bu teknikler protein düzeyinde İnsan CAIII Geninin regülasyonu belirlenmiştir. Buna göre Saos Kontrol, Saos 24 sa SP1, Saos 48 Sa SP1, Saos 72 Sa SP1 örnekleri tek tekrarlı olarak çalışmış, İnsan CAIII Antikoru ve β -Aktin ile membranlar işaretlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.29 :İnsan CAIII ve β -Aktin’in SP1 ile transfekte edilmiş Saos-2 Protein ekstraktlarındaki ifadesi.

Western Blot çalışması ile elde edilen örneklere ait bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar excelde grafik haline getirilerek etkinin değeri gösterilmiştir (Şekil 4.30). SP1 ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerinden elde edilen proteinlerden yapılan Western Blot sonuçlarına göre CAIII’ün zaman bağılı olarak protein düzeyinde de arttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.30 :SP1 Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde İnsan CAIII Protein seviyesi.

4.1.3.2 C/EBP α Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi

4.1.3.2.1 İnsan CAIII Genine Bağlanan Olası C/EBP α Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi

İnsan CAIII Promotoruna bağlanan olası “CCAAT/enhancer-binding protein alfa (C/EBP α)” bölgeleri MATINSPECTOR programı sonucunda belirlenmiştir. Buna göre bağlanan bölgeler Tablo 4.3’de gösterilmektedir.

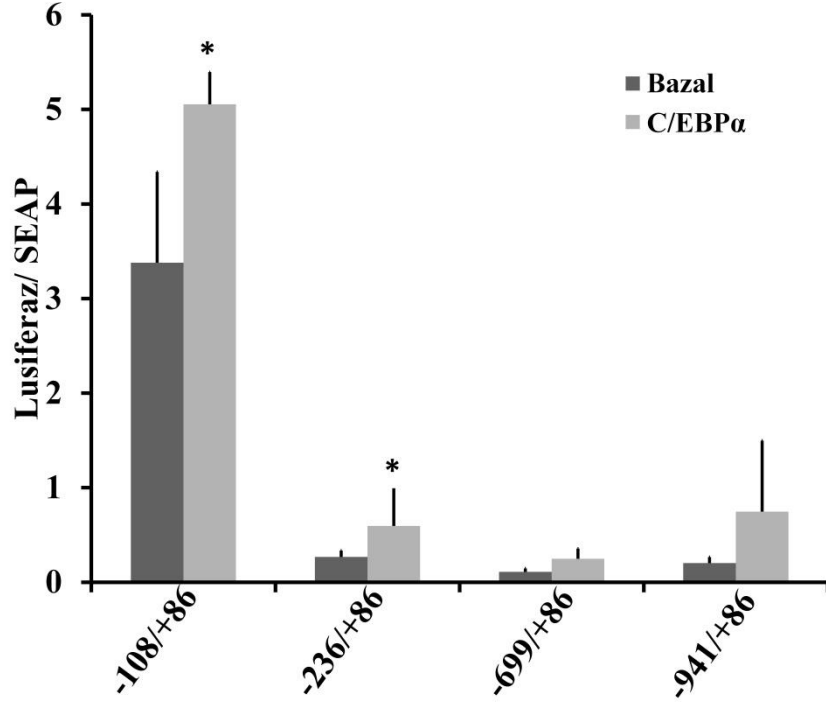
Tablo 4.3 : İnsan CAIII Promotoruna bağlanan olası C/EBP α Bölgeleri.

İnsan CAIII Promotoru Üstündeki Olası C/EBPα Bağlanma Bölgeleri	
-94/-108	-641/-929
-380/-368	-675/-689
-451/-439	

4.1.3.2.2 İnsan CAIII Promotorunun C/EBP α ile Ko-Transfeksiyonu

Dört farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan CAIII promotor parçaları C/EBP α transkripsiyon faktörü ile birlikte Saos-2 hücrelerine transfeksiyonu yapılarak promotor parçalarının aktivitesi belirlenmiştir. Saos-2 modeline aktarımda Bölüm 3.2.3.2.1’de anlatılan kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır ve Bölüm 3.2.3.2.2’de anlatılan lusiferaz vektör sitemiyle aktivite belirlenmiştir.

Ekspresyon plasmidi Dr.Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi U.K.’den temin edilmiştir. Hücrelere 0.5 μ g promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler, 2 μ g transkripsiyon faktörü içeren plazmitler ve transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 μ g SEAP vektörü de transfekte edilmiştir. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak promotor parçası içermeyen pMetLuc vektörü hücrelere transfekte edilmiştir. CAIII Promotor konstarklarının bazal ve ko-transfeksiyon aktiviteleri Şekil 4.31’ de verilmiştir.



Şekil 4.31 :Saos-2 Hücre hattında C/EBPα Transkripsiyon faktörünün İnsan CAIII promotor parçalarına etkisi.

3 tekrarlı olarak yapılan deney sonucunda en yüksek aktivite en küçük promotor parçası olan CAIII -108/+86 parçasında gözlenmiş ve C/EBPα Transkripsiyon faktörünün -108/+86 promotor bölgesini istatistiki olarak önemli olacak şekilde aktive ettiği belirlenmiştir.

4.1.3.2.3 İnsan CAIII mRNA'sının C/EBPα ile Regülasyonunun Belirlenmesi

mRNA düzeyinde CAIII ifadesinin belirlenmesi amacıyla C/EBPα transkripsiyon faktörü ile Saos-2 hücreleri bölüm 3.2.3.2.1'de anlatıldığı şekilde transfekte edilmiştir. 24, 48 ve 72. Salerde hücre pelletleri toplanarak bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi RNA miktarları belirlenmiştir. Bölüm 3.2.4.4 anlatıldığı şekilde elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi yapılmıştır.

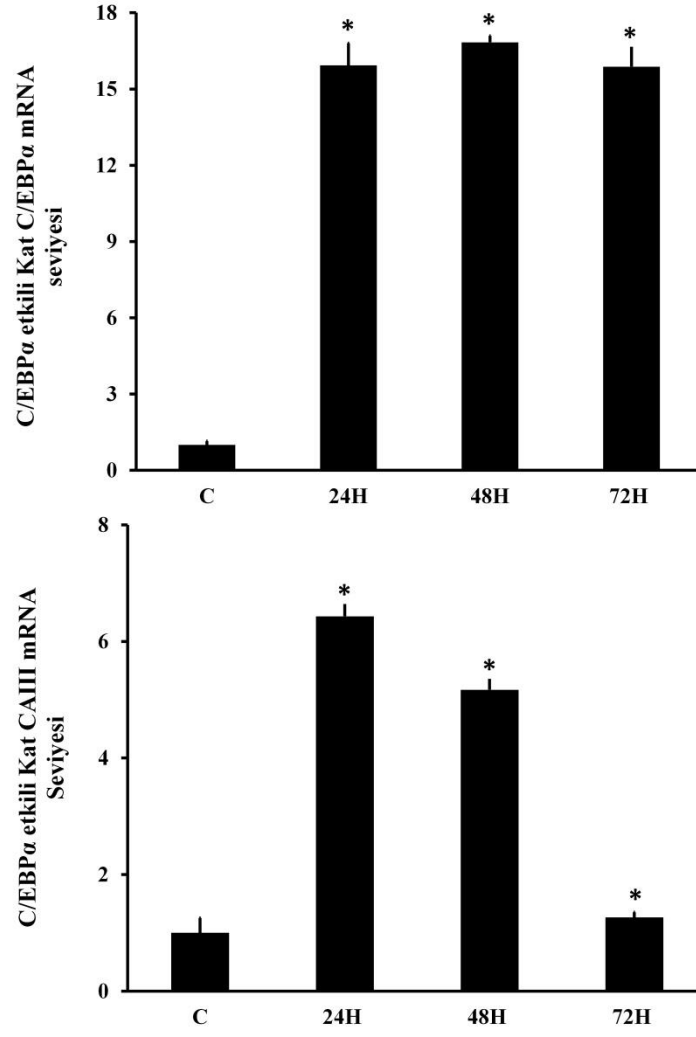
Sentezlenen cDNA'ların çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla Human- β -Mikroglobulin genleri kullanılarak bölüm 3.2.5.5'de anlatıldığı şekilde Semi Kantitatif PCR yapılmış ve sonuç %2'lik agaroz jelde yürütülerek görünür hale getirilmiştir.

Çalıştığı belirlenen DNA'larda CAIII'ün ifadesinin belirlenmesi amacıyla Kantitatif Gerçek zamanlı PCR (Real-Time) yapılmıştır. Real Time PCR bölüm 3.2.4.5'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

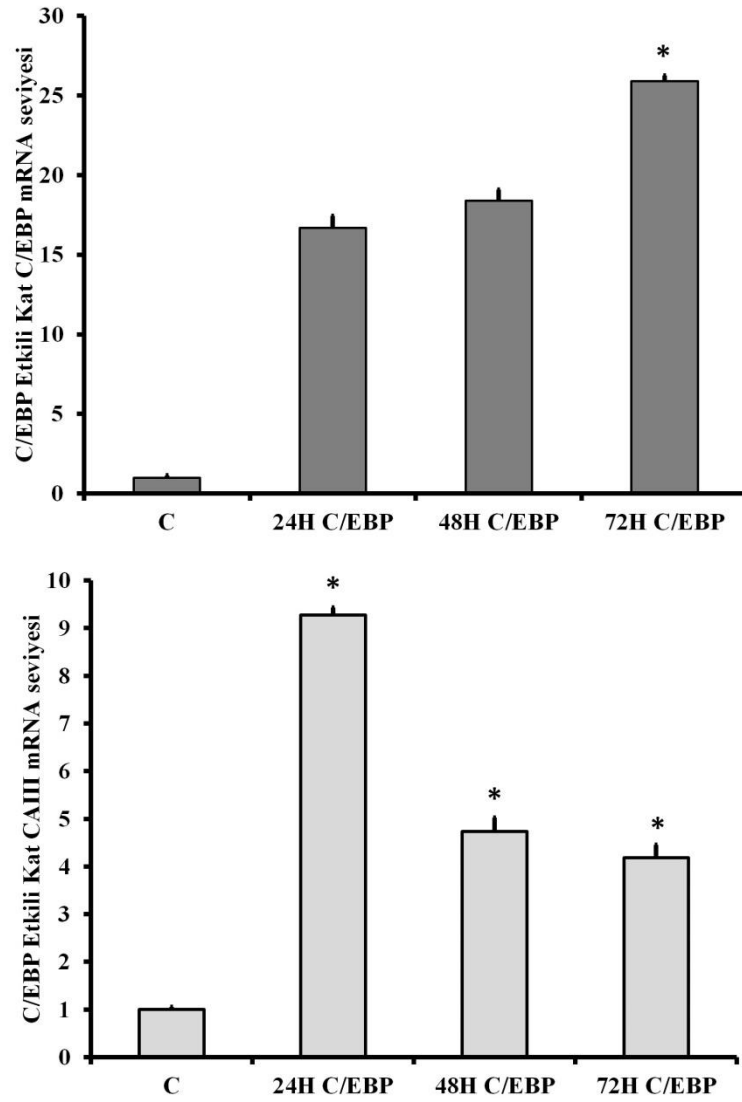
Sonuçlar Bölüm 3.2.5.4'de anlatılan Livak metoduna göre değerlendirildi. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır.

C/EBP α , ektopik olarak seçilen hücre hattalarında transfekte edilip, aşırı ifade edilmiştir. Gerçekten de hücrede C/EBP α 'nın aşırı ifade edildiği Real time PCR kontrol edilmiştir. Buna göre C/EBP α mRNA'sının arttığı, C/EBP α 'nın CAIII mRNA'sı üzerinde de arttırıcı etki yaptığı gösterilmiştir. Real Time PCR'ın grafiksel görünüm Şekil 4.32'de gösterilmektedir.

Elde edilen etkinin dokuya mı bağla olup olmadığını belirlemek üzere farklı bir hücre hattı olan insan prostat kanser modeli PC3 hücrelerine C/EBP α ektopik olarak transfekte edilmiştir. Real-Time verilerine göre PC3 hücrelerinde de C/EBP α etkili CAIII mRNA seviyesi zamana bağlı artış göstermektedir (Şekil 4.33).



Şekil 4.32 : C/EBP α ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve SP1 mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim.



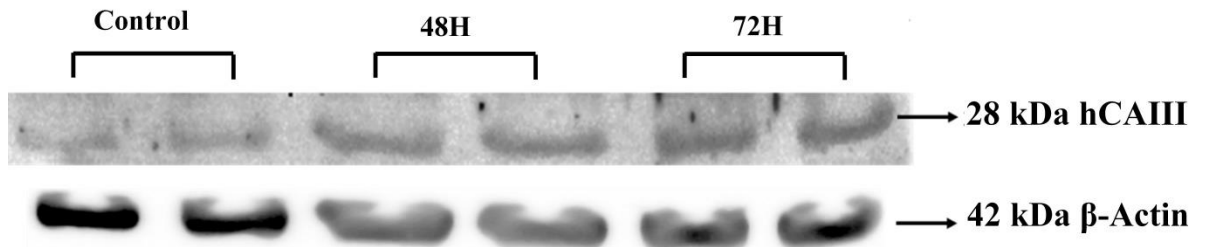
Şekil 4.33 : C/EBP α ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve C/EBP ekspresyon seviyesindeki değişim.

4.1.3.2.4 İnsan CAIII Proteininin C/EBP α ile Regülasyonunun Belirlenmesi

Seçilen Transkripsiyon faktörlerinin CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için çalışılacak hücre soyları Bölüm 3.2.3.1.5'da anlatıldığı gibi başlatılmış, Bölüm 3.2.3.1.6'de anlatıldığı gibi büyütülüp pasajlanmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna gelen hücre popülasyonu sayımı yapılarak 25 cm²'lik flask içinde 2.000.000 hücre olacak şekilde bölünüp, son hacmi 5 mL olacak şekilde % 10 FCS

içeren DMEM eklenmiştir. Seçilen transkripsiyon faktörleri Saos-2 hücre hattında Bölüm 2.2.3.2.1’de anlatıldığı şekilde kalsiyum-fosfat presipitasyon metoduyla kullanılan materyaller ve son hacim 5 kat olacak şekilde transfekte edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 sa zaman aralıklarında toplanmıştır. Bölüm 3.2.6.1.2’de anlatıldığı şekilde RIPA tekniği kullanılarak protein izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.6.1.3’de anlatıldığı gibi protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

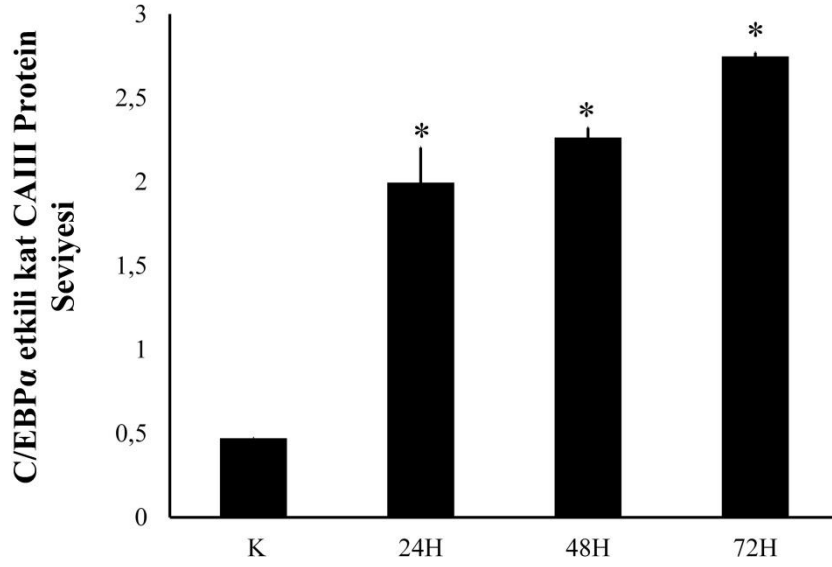
Elde edilen protein havuzları kullanılarak Western Blot yapılmıştır. Bu teknikler protein düzeyinde İnsan CAIII Geninin regülasyonu belirlenmiştir. Saos Kontrol, Saos 24 sa C/EBP α , Saos 48 sa C/EBP α ve Saos 72 sa C/EBP α örnekleri tek tekrarlı olacak şekilde kuyulara yüklenmiştir ve deney sonuçları Şekil 4.24’de gösterilmiştir.



Şekil 4.34 :C/EBP α ile transfekte edilmiş Saos2 Protein ekstraktlarındaki İnsan CAIII ve β -Actin proteininin ifadesi.

Western Blot çalışması ile elde edilen örneklere ait bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar excelde grafik haline getirilerek etkinin değeri gösterilmiştir (Şekil 4.35).

Yapılan analiz sonucunda C/EBP α ile transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen protein ekstraktlarında CAIII protein ifadesinin arttığı, zamana bağlı olarak da bu artışın lineer bir doğru gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.35: C/EBP α Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde CAIII protein seviyesi.

4.1.3.3 USF Transkripsiyon Faktörünün Ektopik Ekspresyonunun İnsan CAIII Gen ifadesine Etkisinin Belirlenmesi

4.1.3.3.1 İnsan CAIII Genine Bağlanan Olası USF1 Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi

İnsan CAIII Promotoruna bağlanan olası “Upstream stimulatory factor 1 (USF1)” bölgeleri MATINSPECTOR programı sonucunda belirlenmiştir. Buna göre bağlanan bölgeler Tablo 4.4’de gösterilmektedir.

Tablo 4.4 : İnsan CAIII Promotoruna bağlanan olası USF1 Bölgeleri.

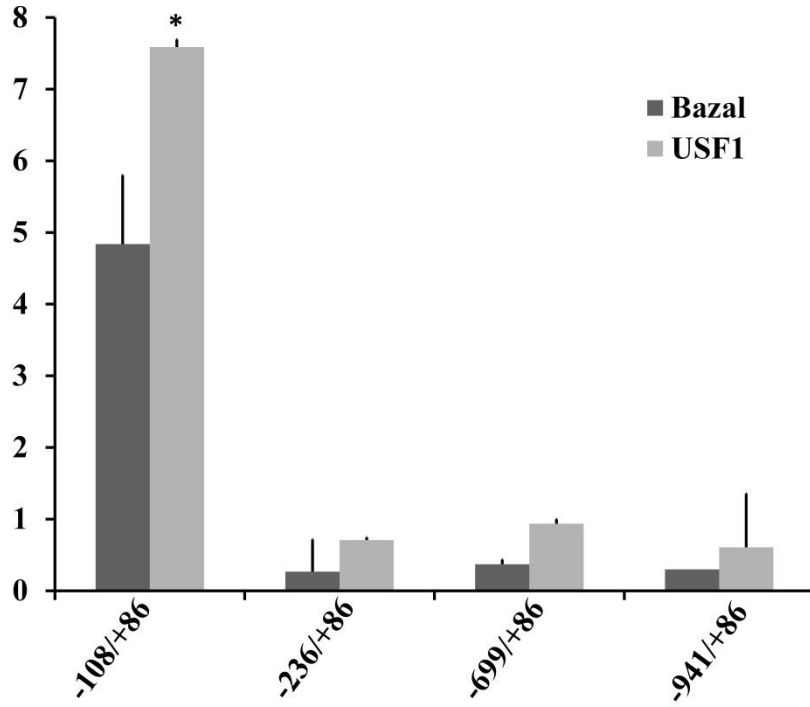
İnsan CAIII Promotoru Üstündeki Olası SP1 Bağlanma Bölgeleri	
+27/ +42	-251/ -271
-20/-40	-368/ -380
-41/ -57	-439/ -451
-109/ -125	-466/ -482
-123/ -143	-492/ -508
-126/ -146	-787/ -807
-245/ -261	-872/ -992
-248/ -264	-877/-889

4.1.3.3.2 İnsan CAIII Promotorunun USF1 ile Ko-Transfeksiyonu

Dört farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan CAIII promotor parçaları USF1 transkripsiyon faktörü ile birlikte Saos-2 hücrelerine transfeksiyonu yapılarak promotor parçalarının aktivitesi belirlenmiştir. Saos-2 modeline aktarımda Bölüm 3.2.3.2.1’de anlatılan kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır ve Bölüm 3.2.3.2.2’de anlatılan lusiferaz vektör sistemiyle aktivite belirlenmiştir.

Ekspresyon plasmidi Dr. Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi U.K.”den temin edilmiştir. Hücrelere 0.5 µg promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler, 2 µg transkripsiyon faktörü içeren plazmitler ve transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 µg SEAP vektörü de transfekte edilmiştir. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak promotor parçası içermeyen pMetLuc vektörü hücrelere transfekte edilmiştir. CAIII Promotor konstarklarının bazal ve ko-transfeksiyon aktiviteleri Şekil 4.36’ de verilmiştir.

3 tekrarlı olarak yapılan deney sonucunda en yüksek aktivite en küçük promotor parçası olan CAIII -108 / +86 parçasında gözlenmiş ve USF1 Transkripsiyon faktörünün 4 farklı CAIII Promotor konstrağına da upregüle ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.36 :Saos-2 Hücre hattında USF1 Transkripsiyon faktörünün İnsan CAIII promotor parçalarına etkisi.

4.1.3.3.3 İnsan CAIII mRNA'sının USF1 ile Regülasyonunun Belirlenmesi

mRNA düzeyinde CAIII ifadesinin belirlenmesi amacıyla USF1 transkripsiyon faktörü ile Saos-2 hücreleri bölüm 3.2.3.2.1'de anlatıldığı şekilde transfekte edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücre pelletleri toplanarak Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.4.2'de

anlatıldığı gibi RNA miktarları belirlenmiştir. Bölüm 3.2.4.4 anlatıldığı şekilde elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır.

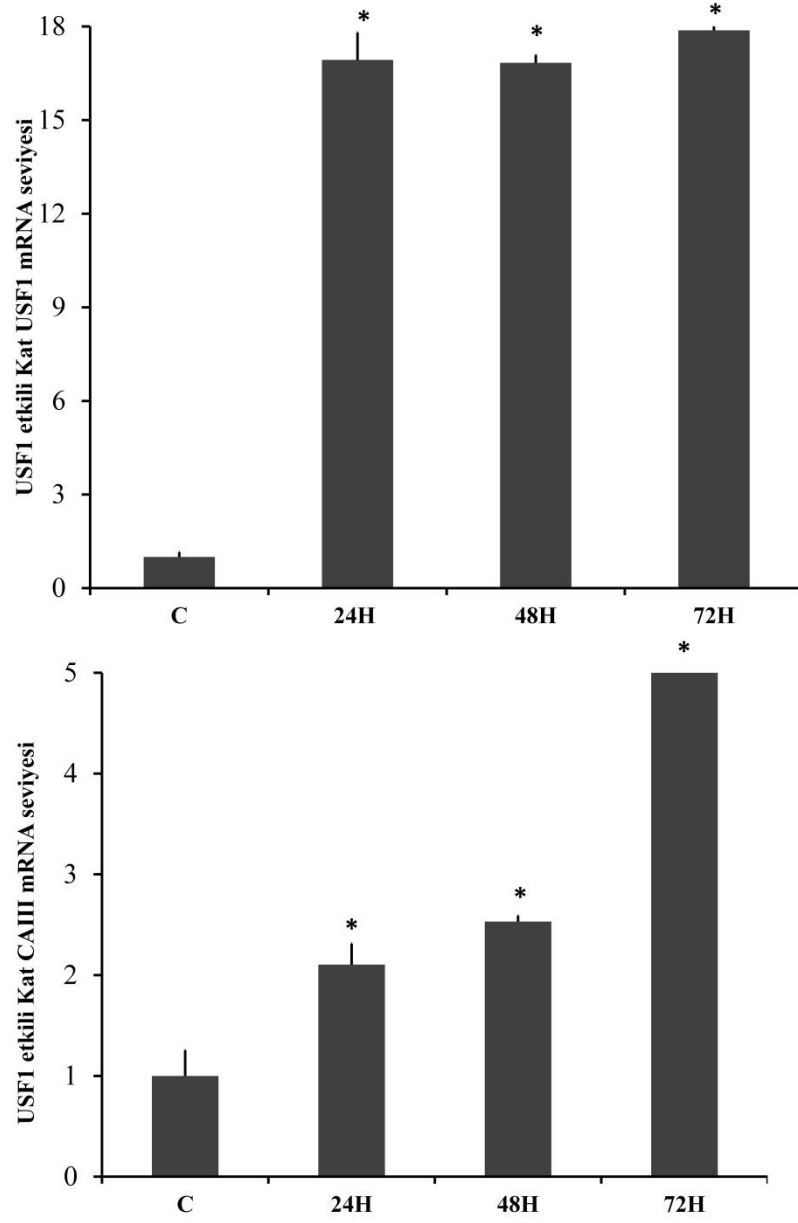
Sentezlenen cDNA'ların çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla Human- β -Mikroglobulin genleri kullanılarak bölüm 3.2.5.3'de anlatıldığı şekilde Semi Kantitatif PCR yapılmış ve sonuç % 2'lik agaroz jelde yürütülerek görünür hale getirilmiştir.

Çalıştığı belirlenen DNA'larda CAIII'ün ifadesinin belirlenmesi amacıyla Kantitatif Gerçek zamanlı PCR (Real-Time) yapılmıştır. Real Time PCR bölüm 3.2.5.4'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

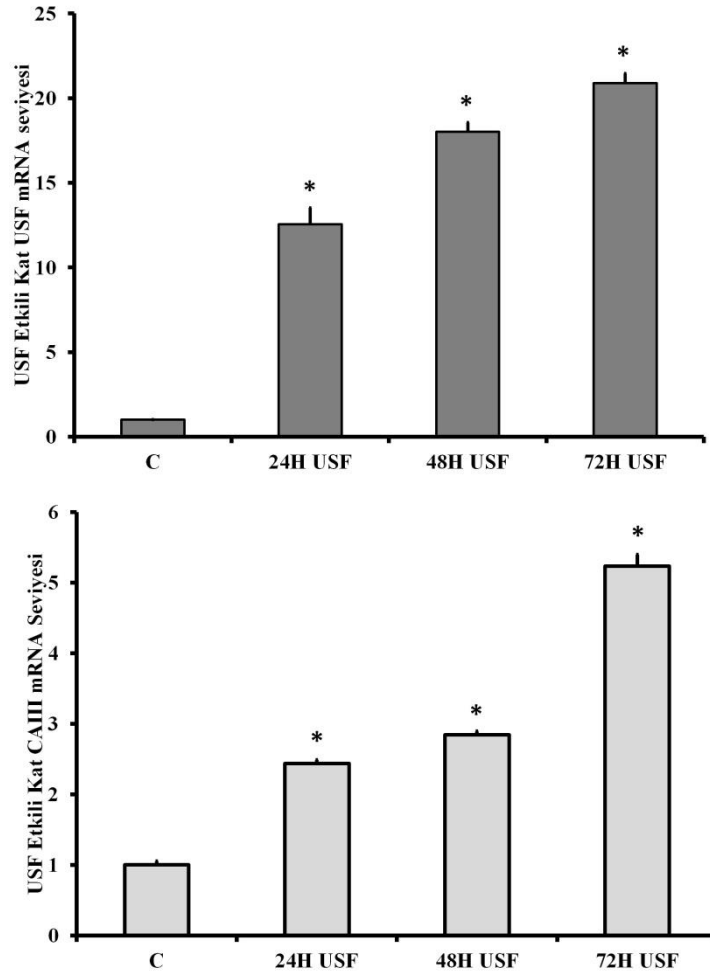
Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır.

USF1 transkripsiyon faktörünün İnsan CAIII mRNA ifadesi üzerine etkileri Şekil 3.37'de gösterilmektedir. Yapılan değerlendirme gösteriyor ki USF1 transkripsiyon faktörü CAIII mRNA'sını zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde erken saatlerde maksimum düzeyde aktive ettiği, geç saatlerde ise etkinin azaldığı gözlemlenmektedir.

Elde edilen etkinin dokuya mı bağla olup olmadığını belirlemek üzere farklı bir hücre hattı olan insan prostat kanser modeli PC3 hücrelerine USF1 ektopik olarak transfekte edilmiştir. Real-Time verilerine göre PC3 hücrelerinde de USF1 etkili CAIII mRNA seviyesi zamana bağlı artış göstermektedir (Şekil 4.38).



Şekil 4.37 :USF1 ile transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerindeki CAIII ve USF1 mRNA seviyesindeki değişim.



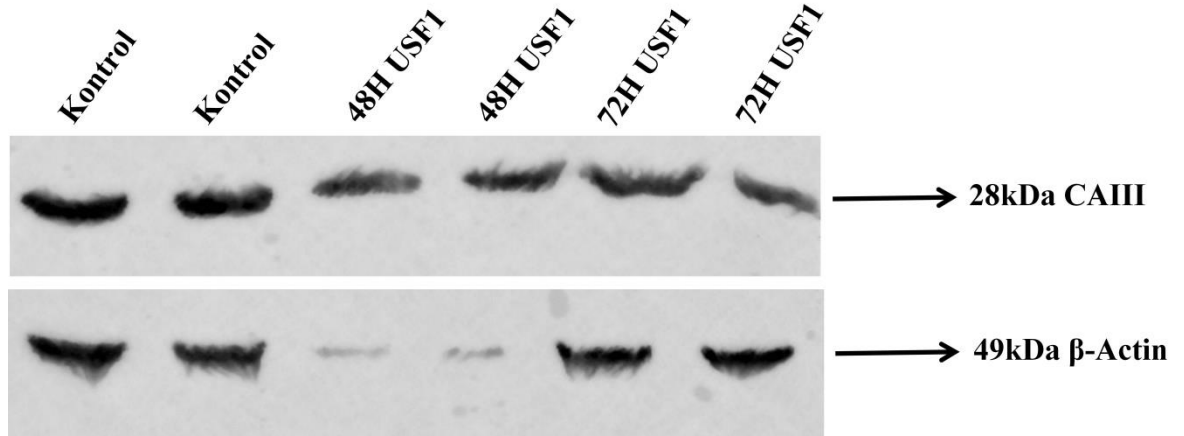
Şekil 4.38 : USF1 ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerindeki CAIII ve USF1 mRNA seviyesindeki değişim.

4.1.3.3.4 İnsan CAIII Proteininin USF1 ile Regülasyonunun Belirlenmesi

Seçilen Transkripsiyon faktörlerinin CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için çalışılacak hücre soyları Bölüm 3.2.3.1.6'da anlatıldığı gibi başlatılmış, Bölüm 3.2.3.1.7'de anlatıldığı gibi büyütülüp pasajlanmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna gelen hücre popülasyonu sayımı yapılarak 25 cm²'lik flask içinde 2.000.000 hücre olacak şekilde bölünüp, son hacmi 5 mL olacak şekilde % 10 FCS içeren DMEM eklenmiştir. Seçilen transkripsiyon faktörleri Saos-2 hücre hattında Bölüm 2.2.3.2.1'de anlatıldığı şekilde kalsiyum-fosfat presipitasyon metoduyla

kullanılan materyaller ve son hacim 5 kat olacak şekilde transfekte edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 zaman aralıklarında toplanmıştır. Bölüm 3.2.6.1.2’de anlatıldığı şekilde RIPA tekniği kullanılarak protein izolasyonları yapılmış ve Bölüm 3.2.6.1.3’de anlatıldığı gibi protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

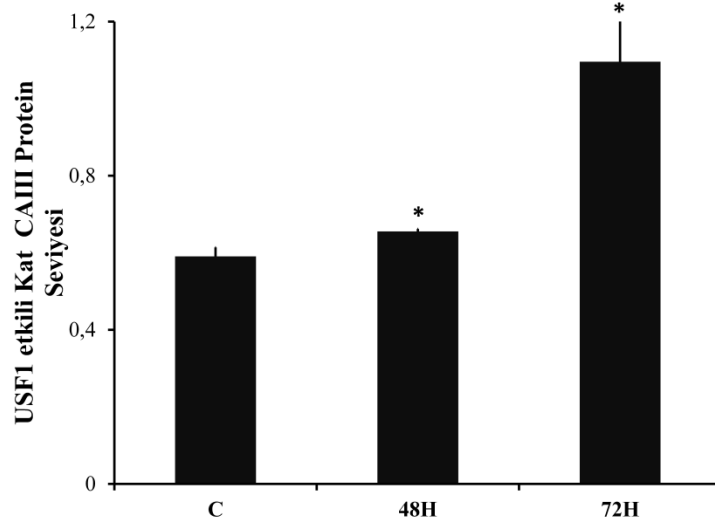
Elde edilen protein havuzları kullanılarak Western Blot yapılmıştır. Bu teknikler protein düzeyinde İnsan CAIII Geninin regülasyonu belirlenmiştir. Buna göre Saos Kontrol, Saos 24 sa USF1, Saos 48 sa USF1, Saos 72 sa USF1 örnekleri tek tekrarlı olarak çalışmış, İnsan CAIII Antikoru ve B-Aktin ile membranlar işaretlenmiştir. (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 :USF1 ile transfekte edilmiş Saos2 Protein ekstraktlarındaki İnsan CAIII ve B-Actin proteininin ifadesi.

Western Blot çalışması ile elde edilen örneklere ait bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar excelde grafik haline getirilerek etkinin değeri gösterilmiştir (Şekil 4.40).

Yapılan analiz sonucunda USF1 ile transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen protein ekstraktlarında CAIII protein ifadesinin arttığı, zamana bağlı olarak da bu artışın lineer bir doğru gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.40 :USF1 Transkripsiyon faktörü ile transfekste edilmiş Saso-2 hücrelerinde CAIII protein seviyesi.

4.1.4 DNA-Protein Etkileşiminin “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) Tekniği ile CAIII Dizisindeki olası Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgelerinin Belirlenmesi

İnsan CAIII geninin promotor analizinin yapılabilmesi için öncelikle muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Bu amaçla Matinspector programı kullanılmış ve olası bağlanmalar EK-C’de detaylı belirtilmiştir.

Olası bağlanmanın yoğun olduğu bölümler incelenerek bu bölgelere özel primerler (Prob) tasarlandı. Bu primerler olası bağlanma bölgelerini içermekte ve yapılacak olan EMSA deneyleri ile bu bağlanmaların spesikliği belirlendi. Primerler, makrogen firmasına sentezlettirildi. Tek zincirli ve yapışkan uç olarak sentezlenen primerler, biotinleme işlemi ile biotinlendi. Biotinlenen primerlerden Düz ve Ters primer bağlanma reaksiyonu ile çift zincirli hale getirildi.

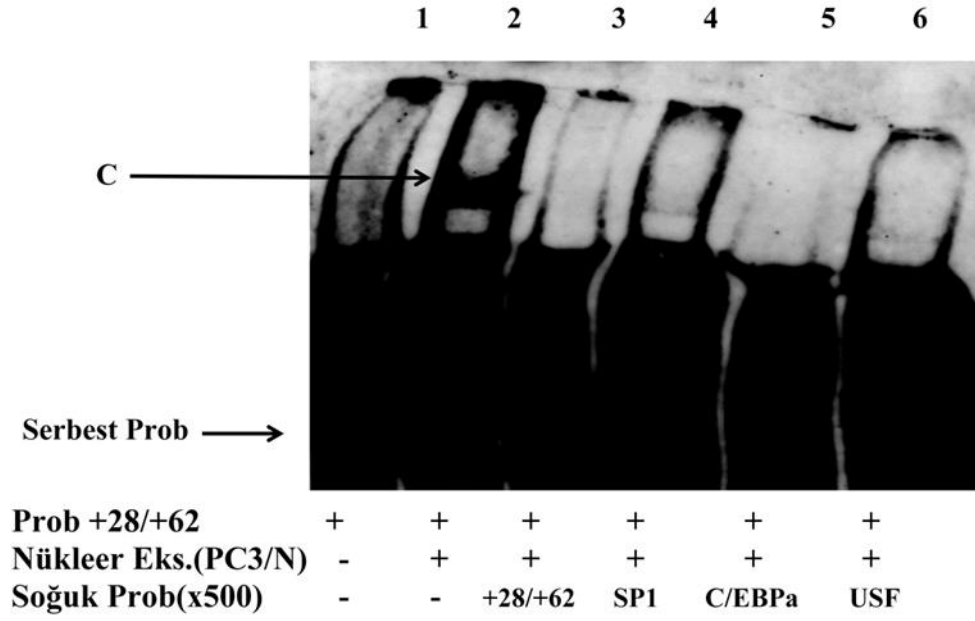
Çalışılan bölgelere olası bağlanan transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlanıp bağlanmadığı transkripsiyon faktörlerine ait korunmuş dizilerle yapılan EMSA çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu biyotinsiz korunmuş diziler (soğuk prob) ve biyotinli (sıcak prob) problemlerimiz yarışma deneylerine tabii tutularak bağlanmanın spesifikliği belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan bütün primerler Tablo 4.5’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5 : EMSA deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri.

Kullanılan Primerler	Amaç	5’- 3’ Diziler
USF1-F	Yarışma	TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT
USF1-R	Yarışma	TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT
C/EBP α -F	Yarışma	TGCAGATTGCGCAAT
C/EBP α -R	Yarışma	TGCATTGCGCAATCT
AP1-F	Yarışma	GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGA C
AP1-R	Yarışma	CCGCTGAGTCACGAAGGATCCCGCTGAGTCAC G
SP1-F	Yarışma	TAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAG
SP1-R	Yarışma	GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT
+28/+62F	Prob	CTGCACCACGCAGGGGAAGAGAAAGCAGGAG CCGTC
+28/+62R	Prob	TGGACGGCTCCTGCTTTCTTCCCCTGCGTGG TGC
-158/-134F	Prob	CCCCTTCGCCCACCTCCGCCCCCGTC
-158/-134R	Prob	GTGACGGGGGCGGAGGTGGGCGAAGG
-181/-153F	Prob	GAGCGCAGGGAGGGGCGTGGGTGCCCTTCG
-181/-153R	Prob	GGCGAAGGGGCACCCACGCCCTCCCTGCGC

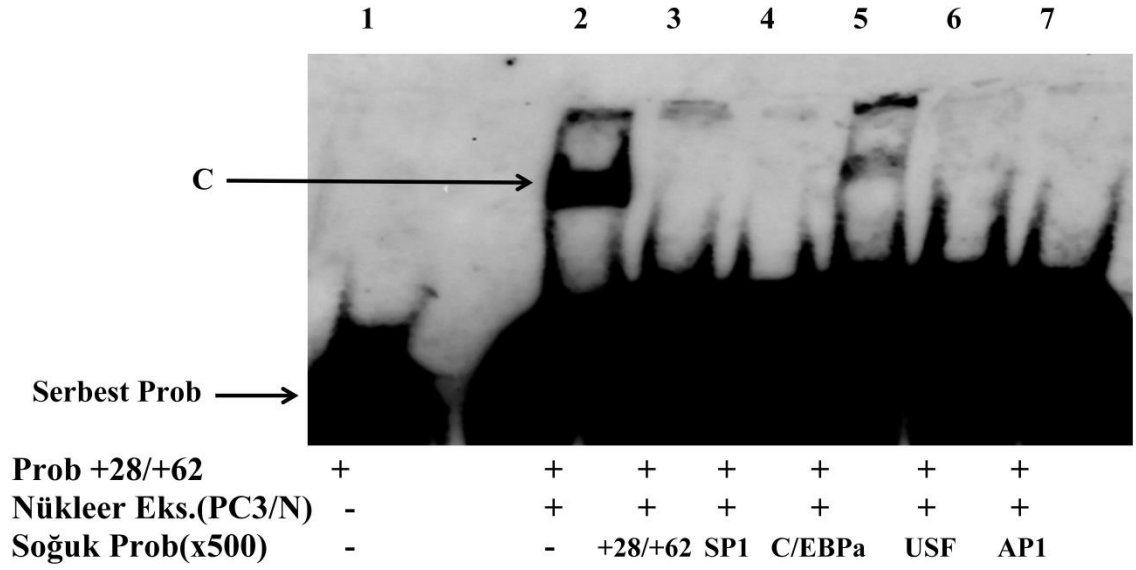
EMSA deneyleri bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi yapıldı. Öncelikle bölüm 3.2.7.1.1’de anlatıldığı şekilde PC3 ve Saos-2 hücre hatlarından nükleer ekstrakt hazırlandı. EMSA deneyleri için sentezlettiren primerler bölüm 3.2.7.1.2’de anlatıldığı gibi biyotinle işaretlendi. Yarışma deneyleri için kullanılan korunmuş dizileri içeren transkripsiyon faktörlerine ait primerlerde biyotinleme yapılmadı. Biyotinle işaretlenmiş ve yarışma deneyleri için kullanılacak primerler eşlenik dizileri ile bölüm 3.2.7.1.3’de anlatıldığı şekilde bağlanma reaksiyonuna tabii tutularak, bağlanmaları sağlandı. DNA-Protein kompleksinin oluşumu sağlamak ve seçilen dizilerin analiz edilebilmesi için bölüm 3.2.7.1.4’de anlatıldığı şekilde bağlanma reaksiyonları kuruldu. Analiz edilecek dizi ve olası transkripsiyon faktörlerine göre her deney planı için ayrı ayrı tüplerde reaksiyon kuruldu. İçinde nükleer ekstrakt bulunmayan kontrol reaksiyonu biyotinli primerler ile kurulmuş ve tek kuyu olacak şekilde çalışmıştır. Yarışma deneyleri için biyotinli CAIII primerleri ve en az 500 kat olarak reaksiyona sokulan biyotinsiz primerler aynı tüpte çalışıldı. Son olarak reaksiyon tüpleri 1 sa oda sıcaklığında bekletildi. Bağlanma reaksiyonları denatüre olmayan % 6’lık jelde +4°C sıcaklıkta 100V akımda yürütüldü. Jelde yürütülen örnekler istenen miktarda yürüdükten sonra soğuk 0,5 x TBE çözeltilisinde naylon membrana transfer edildi. Transfer işlemi 90 mA’de +4°C’de, 1 sa süreyle gerçekleştirildi. Transfer işleminin akabinde membrandaki DNA’ların sabitlenmesi için, membran 15 dk süreyle UV ışığına maruz bırakıldı. HRP bağlı streptavidin ile işaretlenen muhtemel kompleksler ECL ile muamele edilip ardından Fusion FX Vilber Lourmat görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Olası transkripsiyon faktörü bağlanma analizleri neticesinde yoğun bağlanmanın görüldüğü ve bu bölgeye özgü EMSA primerleri ürelen +28 / +62 CAIII Promotor bölgesine ait EMSA sonucu Şekil 4.41’da gösterilmektedir. PC3-Normoksia Nükleer ekstraktları ile yapılan reaksiyon sonucunda, +28 / +62 CAIII Promotor bölgesine SP1, C/EBP α ve USF1’nin bağlandığı yarışmalı deneylerle gösterilmiştir. Aynı deneyin 2. Kontrolü de yapılmış ve sonuçlar netleştirilmiştir.



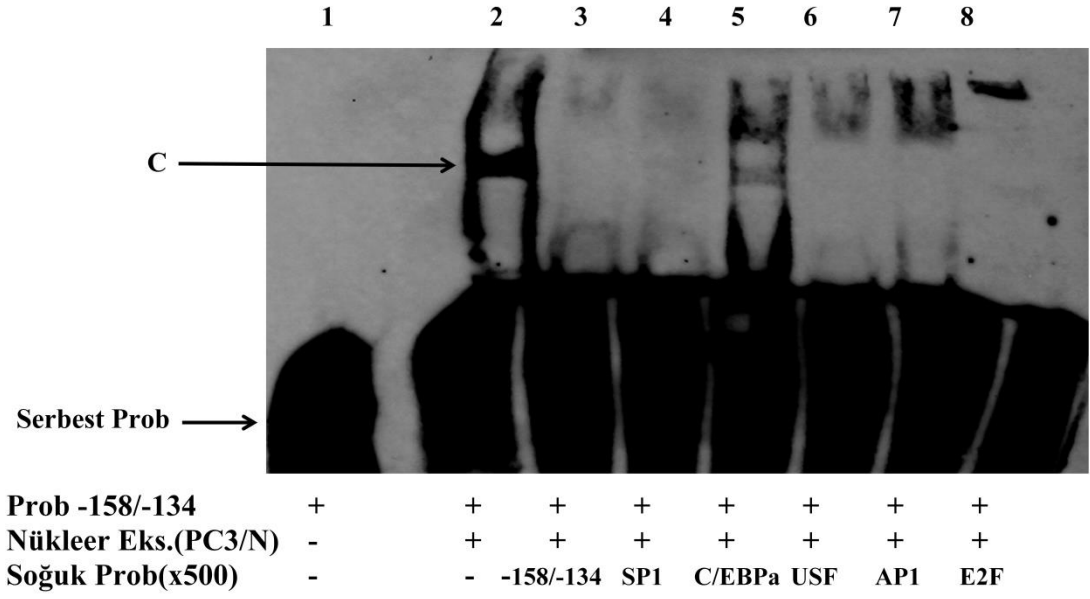
Şekil 4.41 : +28/+62 CAIII Promotor bölgesine ait EMSA sonucu.

CAIII promotoruna ait +28 / +62'lik bölgeye bağlanan SP1, C/EBP α , USF ve AP1 transkripsiyon faktörlerinin, CAIII transkripsiyonel regülasyonunu etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 : +28/ +62 CAIII Promotor bölgesine ait EMSA sonucu (2. Tekrar).

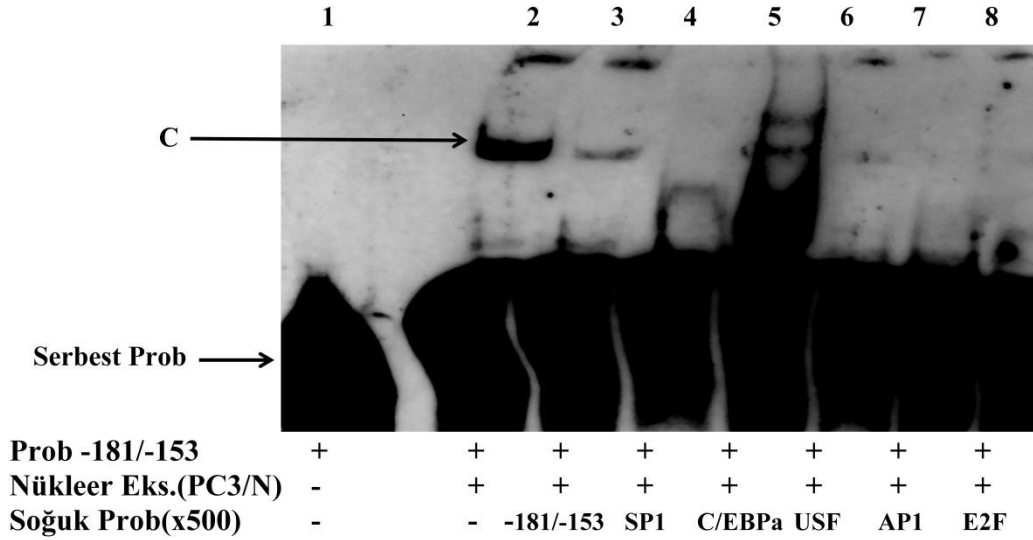
Yapılan biyoinformatik analizler dâhilinde incelenecek 2. Bölge olarak seçilen dizi -158/-134 CAIII Promotor bölgesine ait dizidir. Deneyler bu bölgeye özgü tasarlanan EMSA primerleriyle yapılmıştır. Nükleer ekstraktlar Saos-2, MG63, PC3 Normoksik ve PC3 Hipoksik olmak üzere 4 farklı ekstrakt eldesi yapılmış ve EMSA deneylerinde kullanılmıştır. Deneyin sonucu Şekil 4.43’de gösterilmektedir.



Şekil 4.44 : -158/-134 CAIII Promotor Bölgesine ait EMSA sonucu.

Yarışmalı EMSA ile elde edilen deneysel veriler doğrultusunda -158/-134 CAIII Promotor dizisine SP1, C/EBP α , USF, AP1 ve E2F transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı belirlenmiştir. Bu bağlanmaların spesifikliğı yarışma deneyleri için kullanılan transkripsiyon faktörlerinin korunmuş dizilerinden oluşan etiketsiz DNA parçalarıyla kontrol edilmektedir.

Yapılan biyoinformatik analizler dâhilin de incelenecek 3. Bölge olarak seçilen dizi -181 / -153 CAIII Promotor bölgesine ait dizidir. Deneyler bu bölgeye özgü tasarlanan EMSA primerleriyle yapılmıştır. Yapılan ilk deney farklı nükleer ekstraktların etkisinin belirlenmesi üzerinedir. Deneyin sonucu Şekil 4.45’de gösterilmektedir.



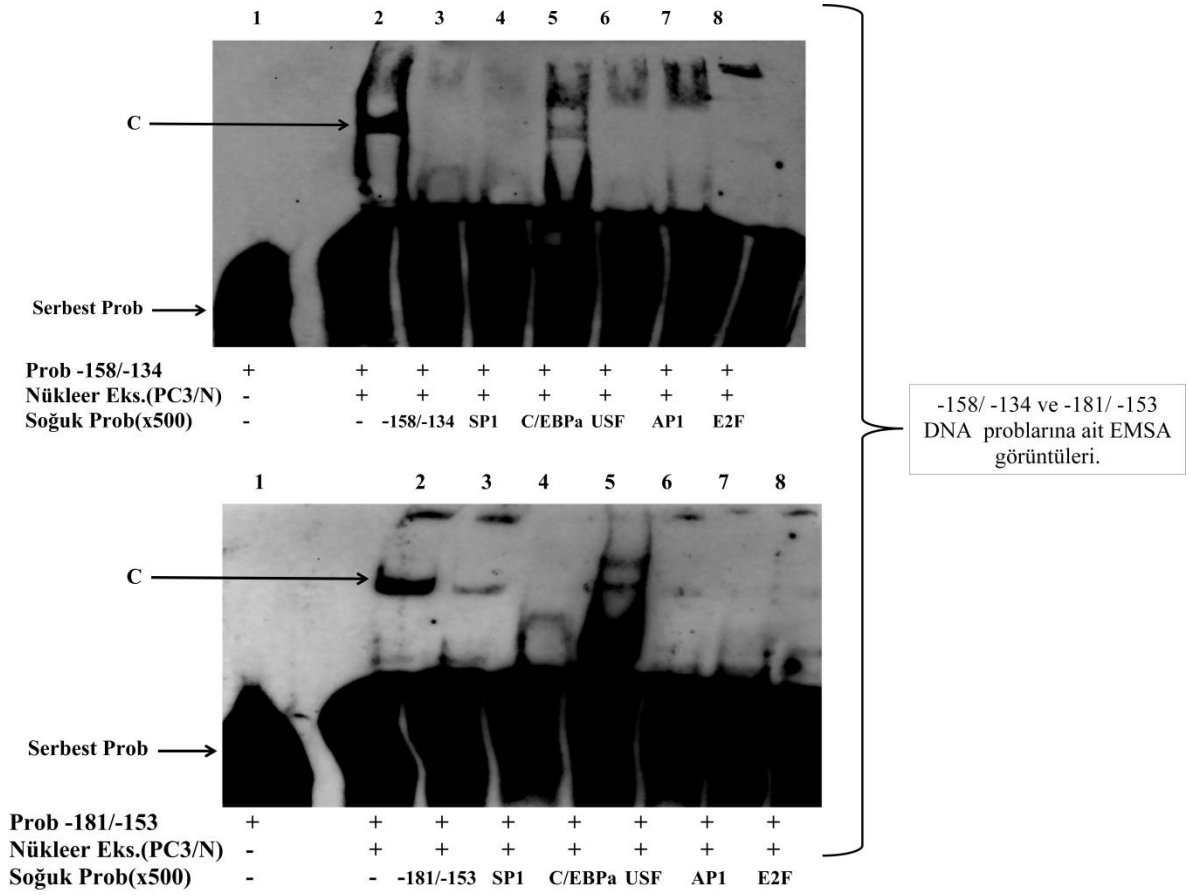
Şekil 4.46 : -181/-153 CAIII Promotor Bölgesine ait EMSA sonucu.

EMSA ile elde edilen deneysel veriler doğrultusunda -158/-134 CAIII Promotor dizisine SP1, C/EBP α , USF, AP1 ve E2F transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı belirlenmiştir. Bu bağlanmaların spesifikliğı yarışma deneyleri için kullanılan transkripsiyon faktörlerinin korunmuş dizilerinden oluşan etiketsiz DNA parçalarıyla kontrol edilmektedir.

4.1.5 İnsan CAIII Geninde Yönlendirilmiş Mutageniz Stratejisi

Yapılan EMSA analizleri sonucunda kesişme gösteren -181/-153 ve -158/-134 CAII promotor dizilerinde elde edilen deney sonuçlarının birebir aynı olduğu belirlenmiştir.

Çalışılmak istenen bölgenin belirlenmesinde EMSA deneyleri bizim için öncül olmuştur. Bu amaçla analiz edilen -181/-153 ve -158/-134'lik bölgelerin EMSA sonuçları baz alınmıştır. Bu iki farklı DNA bölgesi ile yapılan EMSA sonuçlarının birebir aynı olması (Şekil 4.47) , kesişen 5 bazlık diziden kaynaklanıp kaynaklanmadığını aklımıza getirdi. Bu sebeple kesişen 5 bazlık bölgede yönlendirilmiş mutageniz yapılması hedeflendi.



Şekil 4.47 : Mutagenез deneyleri için temel niteliğinde olan -181/-153 ve -158/-134'lik bölgelerin EMSA sonuçları.

4.1.5.1 İnsan CAIII Genine Ait Yönlendirilmiş Mutagenез Primer Dizayını

Yönlendirilmiş mutagenез yapılmayı hedeflenen bölgeyi içen 5 bazlık dizi 'AAAAA' tekrarlı dizisi ile değiştirilerek hedeflenen bölgede değişim yapılacaktır. Bu amaçla www.ncbi.nlm.nih.gov adresinden İnsan CAIII Geninin dizisi analiz edilerek hedef bölgelerin dizisi belirlenmiştir. Bu bölgeye uygun Düz ve Ters Primerler Tablo 4.6'de gösterilmektedir.

Tablo 4.6 : İnsan CAIII Genine Ait Yönlendirilmiş Mutagenez Primerleri.

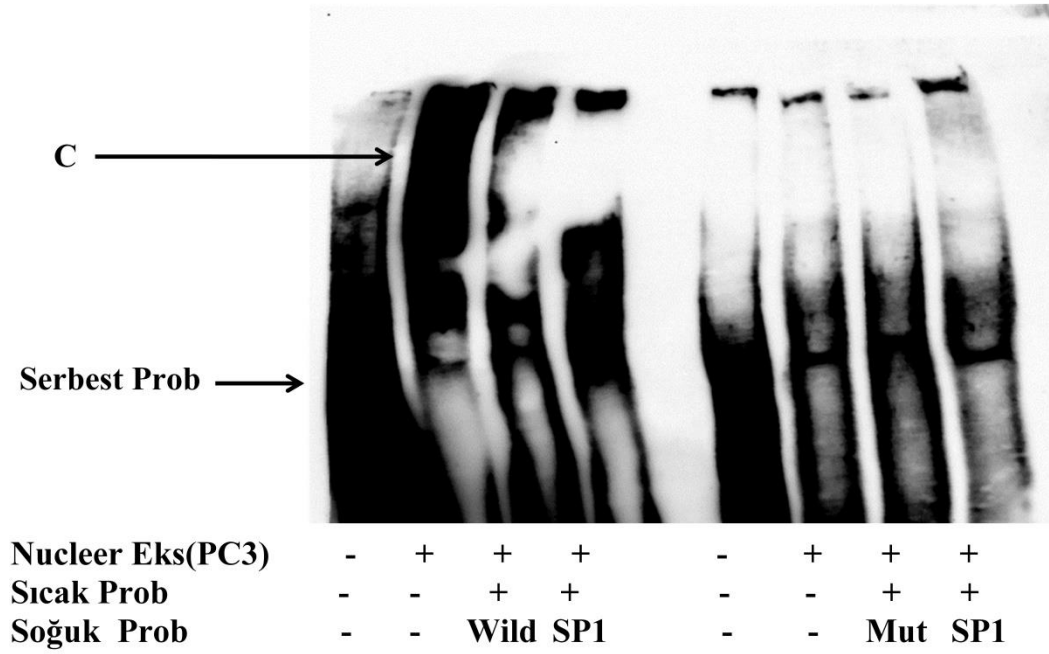
Primerin Adı	Primer Dizisi	Uzunluk (bç)	Tm (°C)
Forward Primer	5'-CGTGGGTGCC <u>AAAAAA</u> CCACCTCCGCCA-3'	30 baz	79
Reverse Primer	3'-TGGGCGGAGGTGGG <u>TTTTT</u> TGGCACCCACG-5'	30 baz	79

4.1.5.2 DNA-Protein Etkileşiminin EMSA “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) Tekniği ile CAIII Dizisindeki olası SP1 Bağlanma Bölgesinin Gösterilmesi

-181/-153 ve -158/-134'lik bölgelerinin kesişen 5 bazlık bölgesine bağlan SP1'i analiz etmek için EMSA tekniğine başvurulmuştur. Tablo 4.6'da gösterilen primerler, biyotinsiz korunmuş diziler (soğuk prob) ve biyotinli (sıcak prob) problemler olmak üzere yarışma deneylerine tabii tutularak bağlanmanın spesifikliği belirlenmiştir.

EMSA deneyleri bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi yapıldı. Öncelikle bölüm 3.2.7.1.1'de anlatıldığı şekilde PC3 hücre hatından nükleer ekstrakt hazırlandı. EMSA deneyleri için sentezlettiren primerler bölüm 3.2.7.1.2'de anlatıldığı gibi biyotinle işaretlendi. Yarışma deneyleri için kullanılan korunmuş dizileri içeren transkripsiyon faktörlerine ait primerlerde biyotinleme yapılmadı. Biyotinle işaretlenmiş ve yarışma deneyleri için kullanılacak primerler eşlenik dizileri ile bölüm 3.2.7.1.3'de anlatıldığı şekilde bağlanma reaksiyonuna tabii tutularak, bağlanmaları sağlandı. DNA-Protein kompleksinin oluşumu sağlamak ve seçilen dizilerin analiz edilebilmesi için bölüm 3.2.7.1.4'de anlatıldığı şekilde bağlanma reaksiyonları kuruldu. Analiz edilecek dizi ve mutasyon yapılan bölgeye ait problemlerin deney planına göre ayrı ayrı tüplerde reaksiyon kuruldu. İçinde nükleer ekstrakt bulunmayan kontrol reaksiyonu biyotinli primerler ile kurulmuş ve tek kuyu olacak şekilde çalışmıştır. Yarışma deneyleri için biyotinli CAIII primerleri ve en az 500 kat olarak reaksiyona sokulan biyotinsiz primerler aynı tüpte çalışıldı. Son olarak reaksiyon tüpleri 1 sa oda sıcaklığında bekletildi. Bağlanma

reaksiyonları denatüre olmayan % 6'lık jelde +4°C sıcaklıkta 100V akımda yürütüldü. Jelde yürütülen örnekler istenen miktarda yürüdükten sonra soğuk 0.5 x TBE çözeltisinde naylon membrana transfer edildi. Transfer işlemi 90 mA'de +4°C'de, 1 sa süreyle gerçekleştirildi. Transfer işleminin akabinde membrandaki DNA'ların sabitlenmesi için, membran 15 dk süreyle UV ışığına maruz bırakıldı. HRP bağlı streptavidin ile işaretlenen muhtemel kompleksler ECL ile muamele edilip ardından Fusion FX Vilber Lourmat görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Şekil 4.48).



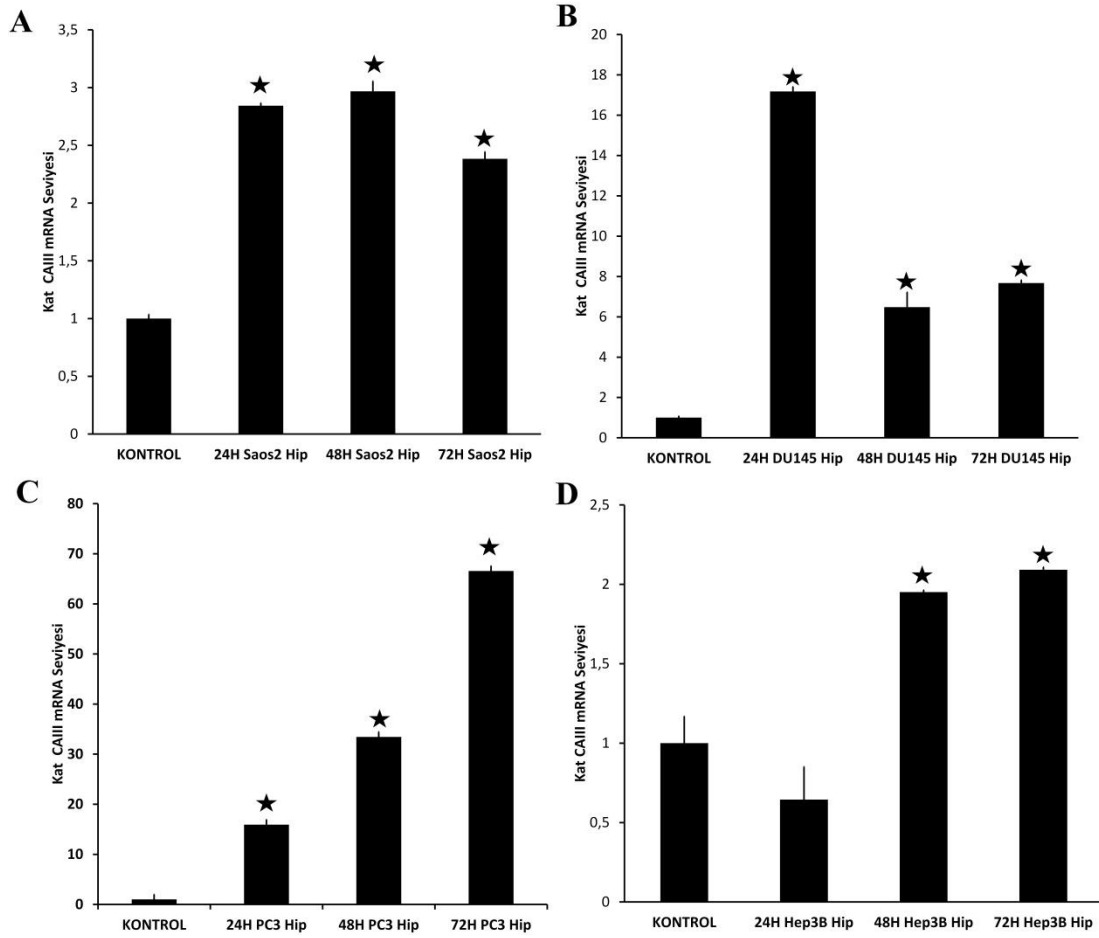
Şekil 4.48 : Hedef mutagenez bölgesine ait EMSA sonucu

4.2 İnsan CAIII Geninin Hipoksik ve Normoksik Koşullardaki Regülasyonunun Belirlenmesi

4.2.1 İnsan CAIII Geninin Hipoksik ve Normoksik Koşullarda mRNA Düzeyindeki İfadesinin Belirlenmesi

İnsan CAIII geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için çalışılacak hücre hatları Bölüm 3.2.3.1.5’de anlatıldığı gibi -80°C ’den çözülüp, bölüm 3.2.3.1.6’deki gibi büyütülüp pasajlanmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna geldikten sonra hücre sayımı yapılarak küçük flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde bölünüp, son hacmi 5 mL olacak şekilde flask içine %10 FCS içeren DMEM eklenmiştir. Hipoksik şartlar oluşturulmak istenen flasklara bölüm 3.2.3.1.9’da anlatıldığı şekilde CoCl_2 eklemesi yapılmış ve 24, 48 ve 72 zamanlarda hücre pelletlerinden bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı şekilde RNA izolasyonları yapılmış, bölüm 3.2.4.2’de anlatıldığı şekilde miktar tayini yapıldıktan sonra, bölüm 3.2.4.4’de anlatıldığı şekilde komplementer DNA (cDNA) eldesi yapılmıştır.

Elde edilen DNA’ların çalışıp çalışmadığını belirlemek için “House Keeping” gen olan H- β -2 Mikroglobulin kullanılarak bölüm 3.2.5.4’de anlatıldığı şekilde semi kantitatif PCR yapılmış ve sonuçlar agaroz jelde görüntülenmiştir. Çalıştığı belirlenen cDNA’lar kullanılarak CAIII’ün Hipoksik ve Normoksik şartlardaki ekspresyonunu belirlemek için kantitatif gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) yapılmıştır. Real-Time PCR, bölüm 3.2.5.5’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve aynı bölümde anlatılan Livak Metoduna göre analiz edilmiştir. Buna göre CAIII’ün Saos-2, Hep3B, DU-145 ve PC3’deki ekspresyon seviyesi şekil 4.49’da gösterilmiştir. Çalışılan tüm hücre hatlarında CAIII mRNA düzeyi hipoksik koşullarda artmaktadır.



Şekil 4.49 : CAIII'ün mRNA düzeyinde farklı hücre hatlarında hipoksik ve normoksik şartlardaki ekspresyonu (A: Saos2, B: Du145, C: PC3, D: Hep3B).

Hipoksik şartlarda mRNA düzeyinde CAIII ifadesine bakıldığında CAIII'ün özellikle PC3 hücre hattında dikkate değer artış gösterdiği görülmektedir. Normoksik şartlardaki ifadesi ile karşılaştırıldığında özellikle 72 saatte hipoksik şartlar sağlandığı CAIII mRNA'sının yaklaşık 70 kat artış gösterdiği görülmektedir.

4.2.2 İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin Belirlenmesi

4.2.2.1 İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin İmmünfloresan (IFC) Tekniği Kullanılarak Belirlenmesi

CAIII proteininin spesifik olarak lokalize olduğu hücre sel alanının belirlenmesi ve ifadesinin amacıyla IFC deneyleri yapılmıştır. PC3 hücre hatları Bölüm 3.2.3.1.5’de anlatıldığı gibi açılmış, Bölüm 3.2.3.1.6’de anlatıldığı şekilde büyütülmüş ve pasajlanmıştır. İstenen hücre yoğunluğuna geldiğinde ise canlı hücreler Bölüm 3.2.3.1.7’de anlatıldığı şekilde sayılır ve 24 kuyulu plakaların her kuyusuna önce yuvarlak lameller bırakılır, %10 FCS’li DMEM eklenir ve sonrada her kuyuda 125.000 hücre olacak şekilde hücreler ekilir. Hipoksik şartlar elde edilmek istenen kuyulara bölüm Bölüm 3.2.3.1.9’da anlatıldığı şekilde CoCl₂ uygulaması yapılmıştır.

Kuyular içindeki hücre yoğunluğu % 80-90 oranına geldiğinde kuyulardan medyum çekilir ve kuyular 2 defa PBS ile yıkanır. PBS ile % 4’lük seyreltme yapılmış paraformaldehit 2-3 mm kaplayacak şekilde kuyulara eklenir ve oda sıcaklığında 15 dk hücreler fiske edilir. Fiksasyon aşaması incelenecek proteine göre belirlenmelidir. Hücre iskeleti, membran bağlı proteinler ve diğer proteinlerin fiksasyon aşaması farklıdır.

Fiksatif PBS ile 2 defa yıkanarak kuyulardan uzaklaştırılır ve hücreler PBS içinde seyreltilmiş 0.1 % (v/v) Triton X-100’de 10 dk bekletilir. Bu işlem protein hücre zarında bulunmuyorsa antikorların hücre içine geçebilmesi için yapılır.

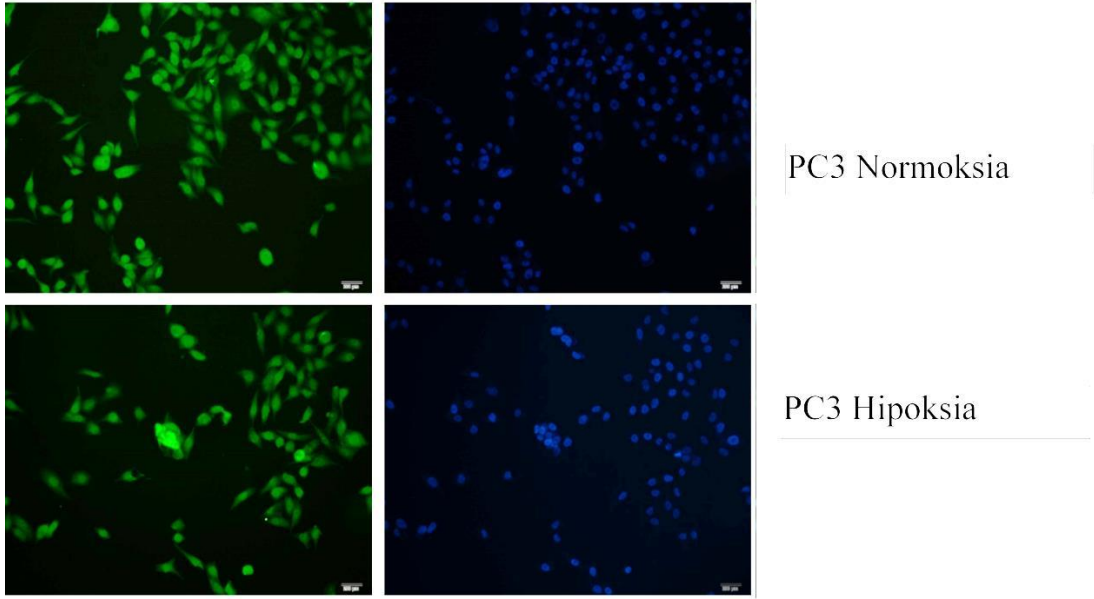
Triton X-100’ü uzaklaştırmak için hücreler 2 defa PBS ile yıkanır. Spesifik bağlanmaları engellemek için %1 BSA içeren PBS ile 1 sa oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. 1 sa sonunda %1 BSA içeren PBS’yi ortamdan uzaklaştırmak için 2 defa PBS ile yıkanır.

Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1/50 veya 1/100 oranında %1 BSA içeren PBS serum ile dilüye edilmiş 100 µL primer antikor eklenir. 60 dk oda sıcaklığında veya humid chamber de 1 gece yada 1 hafta +4°C’de inkübe edilir.

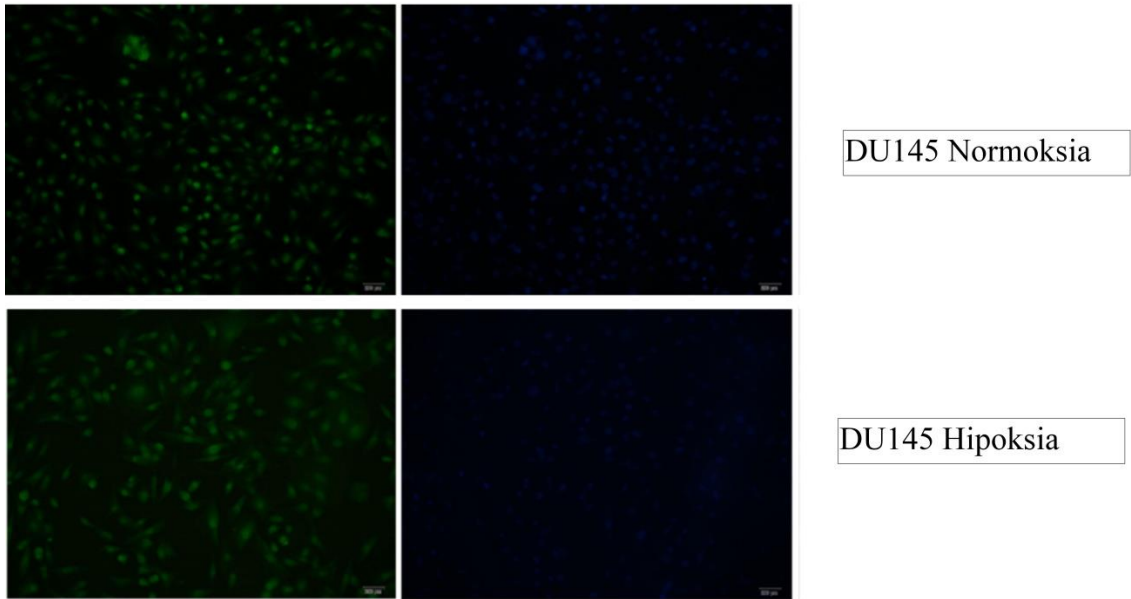
İstenilen sürenin sonunda primer antikor kuyulardan uzaklaştırılır ve kuyular 3’er defa PBS ile yıkanır. Bundan sonraki evreler karanlık ortamda gerçekleştirilecektir. Floroform konjugatı sekonder antikor 1/100 olacak şekilde %1 BSA içeren PBS serum ile hazırlanır ve kuyuya 200 µL eklenerek 1 sa kapalı kutuda inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında sekonder antikor kuyulardan çekilir ve 3’er defa PBS ile yıkanır.

Her kuyuya 2-3 µL DAPI eklenir, 15-20 sn beklendikten sonra PBS eklenerek ortam sulandırılır. Lamlara yuvarlak lameller kapatılmadan önce floresans sinyalin zamanla solmasını engelleyecek “Mounting Medyum (Antifade solüsyon)” damlatılır. Daha sonra yuvarlak lameller ısıtılmış iğne veya pens yardımıyla çıkartılıp ters çevrilerek lam üzerine konulur ve lamellerin 4 kenarı sabitlenir.

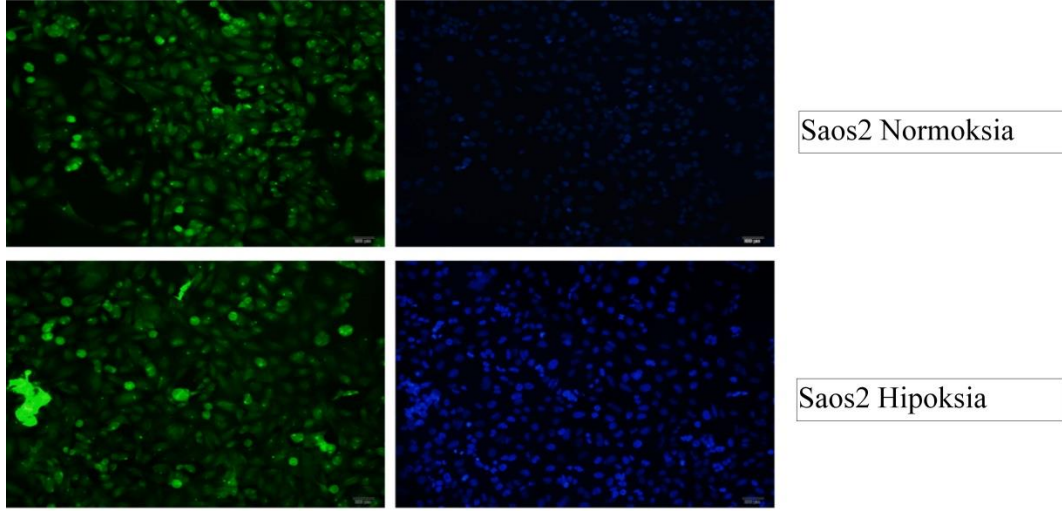
Preperatlar floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.50, 4.51, 4.52). Sonuçlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Normal oksijen koşullarına göre, hipoksik koşullarda CAIII protein seviyesi daha artmış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.50 : İnsan CAIII Proteinin Hipoksik ve normoksik şartlarda PC3 hücre hatlarındaki ifadesi.



Şekil 4.51 : İnsan CAIII Proteinin Hipoksik ve normoksik şartlarda DU145 hücre hatlarındaki ifadesi.



Şekil 4.52 : İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve normoksik şartlarda Saos-2 hücre hatlarındaki ifadesi.

4.2.2.2 İnsan CAIII Proteininin Hipoksik ve Normoksik Şartlardaki İfadesinin Western Blot Tekniği Kullanılarak Belirlenmesi

İnsan CAIII geninin protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için çalışılacak hücre hatları bölüm 3.2.3.1.5’de anlatıldığı gibi -80°C ’den çözülüp, Bölüm 3.2.3.1.6’deki gibi büyütülüp pasajlanmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna geldikten sonra hücre sayımı yapılarak küçük flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde bölünüp, son hacmi 5 ml olacak şekilde flask içine %10 FCS içeren DMEM eklenmiştir. Hipoksik şartlar oluşturulmak istenen flasklara bölüm 3.2.3.1.9’da anlatıldığı şekilde CoCl_2 eklemesi yapılmış ve 24, 48 ve 72 zamanlarda hücre pelletlerinden bölüm 3.2.6.1.2’de anlatıldığı gibi örneklerden RIPA tamponu kullanılarak protein izolasyonları yapılmıştır. Protein konsantrasyonları flourometrik olarak Qubit kullanılarak tayin edilmiş, daha kullanılmak üzere -80°C dolabına kaldırılmıştır.

Konsantrasyonları belirlenen örnekler son konsantrasyonları 50 μg olacak şekilde stoktan alınarak, üzerlerine 7.5 μL β -merkaptoethanol içeren yükleme boyası eklenmiş ve son hacim 30 μL olacak şekilde üst tampon ile istenen hacme

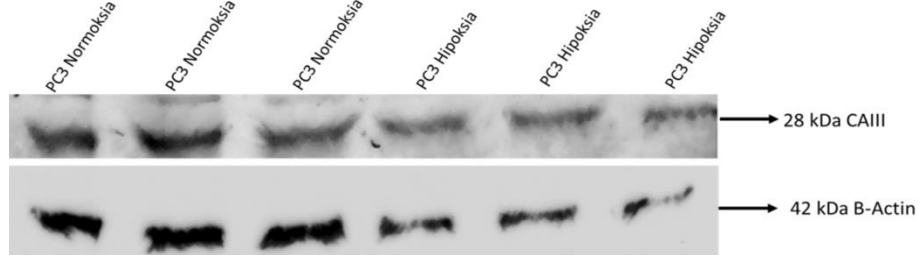
tamamlanmıştır. Örnekler 95°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Bölüm 3.2.6.1.4'de anlatıldığı gibi dökülen SDS-PAGE jelin her kuyusuna 30 µL örnek yüklenmiş ve 100 V'da yürütülmüştür.

Yürütülen jel, bölüm 3.2.6.1.5'de anlatıldığı şekilde blotlanmış, 1 gece sonunda western blot tekniğine geçilmiştir. Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (%5 yağsız süt tozu ve %0.1 Tween20 içeren 1X TBS) 1 sa horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılmış ve % 0.1 Tween20 içeren 1X TBS ile membranlar 5 dklık sürelerle 3 kez yıkanmıştır. Membran CAIII primer antikor (CA3 Polyclonal Antibody for Western blot- Pierce Antibody) ile 1/1500 dilüsyonda ya 1 gece +4°C'de ya da 3 sa 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda CAIII primer antikor çözeltisi uzaklaştırılmış ve % 0.1 Tween20 içeren 1X TBS ile membranlar 5 dklık sürelerle 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra 1/5000 dilüsyonda sekonder antikor (anti-rabbit) ile bir sa oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor uzaklaştırıldı, membran 5 dklık sürelerle 3 kez % 0.1 Tween20 içeren 1X TBS ile yıkandı ve görüntülemeye geçildi.

Bantlar ECL Western Blotting Substratı (Pierce) kullanılarak görüntülendi ve karanlık odada X-Ray filme basıldı. Film sırasıyla 2'şer dk developer ve fixer solüsyonlarında ve 1 dk suda bekletilerek tab edildi.

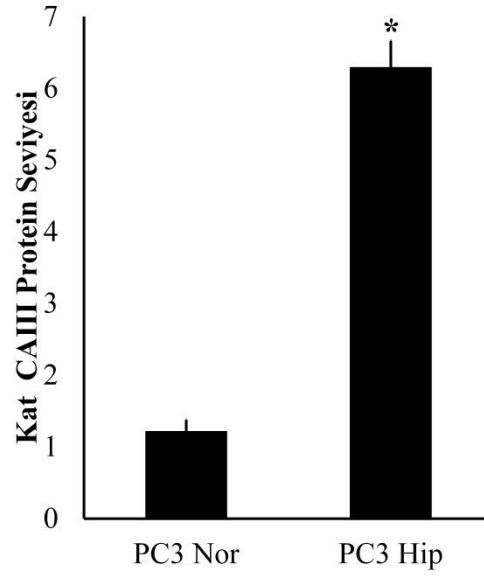
CAIII antikorunun firma bilgilerinde verilen bant görüntüsü EK-A'da gösterilmiştir. Buna göre bant büyüklüğü 28 kDa olması beklenmektedir. Antikor poliklonal olduğu için birçok bant vermekte ancak 28 kDa dolaylarında olan bant değerlendirilmeye tabii tutulacaktır.

CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi amacıyla PC3 hücre hattından hipoksik ve normoksik şartlarda elde edilen protein ekstraktlarında Western Blot tekniği kullanılmıştır. Sonuçlar şekil 4.53'da gösterilmektedir.



Şekil 4.53 : CAIII'ün protein düzeyindeki ifadesinin PC3 Hipoksia ve Normoksia protein ekstraktlarındaki sonucu.

Western Blot çalışması ile elde edilen örneklere ait bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar excelde grafik haline getirilerek etkinin değeri gösterilmiştir (Şekil 4.54).

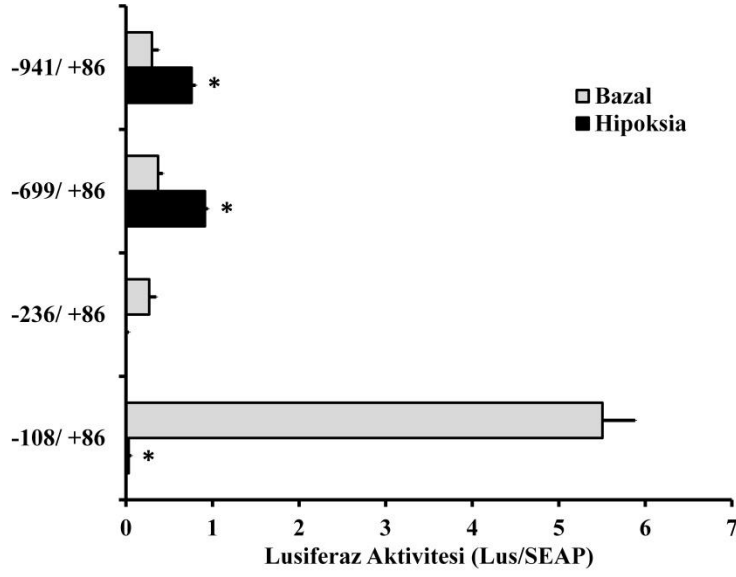


Şekil 4.54 : İnsan CAIII Proteininin PC3 Hücre hattında normoksik ve hipoksik şartlarda ifadesi.

PC3 hücre hattındaki hipoksik ve normoksik şartlarda yapılan Western Blot sonuçları gösteriyor ki, CAIII protein seviyesi hipoksik şartlardaki PC3'de artış göstermektedir.

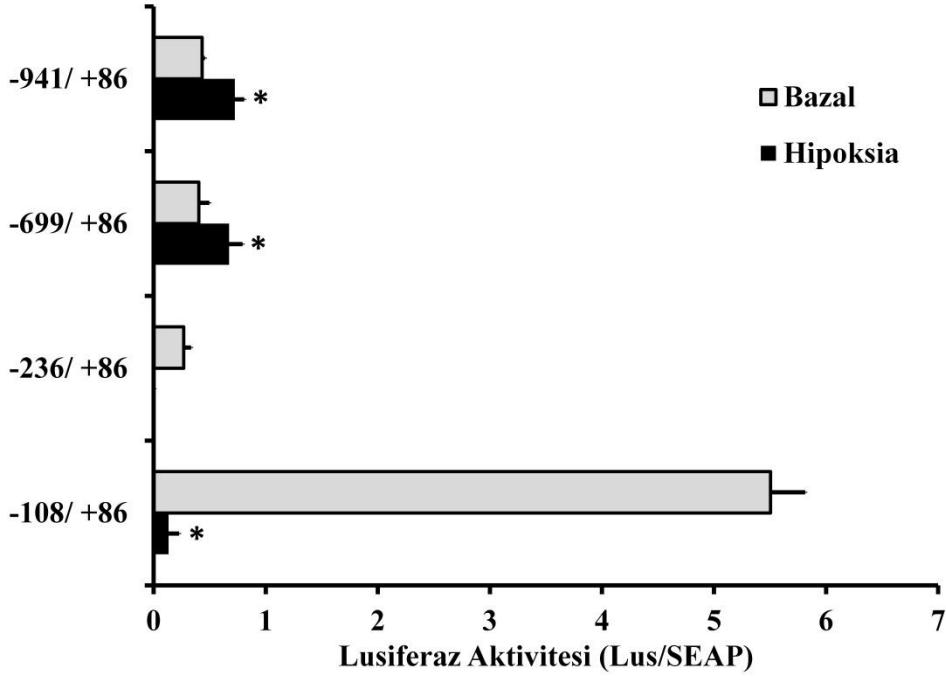
4.2.3 İnsan CAIII Promotor Konstraklarının Hipoksik ve Normoksik Koşullardaki Transkripsiyonel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Seçilen hücre hatları bölüm 3.2.3.1.5’de anlatıldığı şekilde -80°C ’den çıkartılıp, hücre soyu başlatıldı ve bölüm 3.2.3.1.6’de anlatıldığı gibi hücreler büyütülüp belirli bir yoğunluğa geldikten sonra hücre sayımı gerçekleştirilip, 12 kuyulu plakalara yaklaşık 250.000 hücre olacak şekilde hücreler yapılandırıldı. Kuyuların son hacmi $500\mu\text{L}$ ’ye %10 FCS’li DMEM ile tamamlandı. 1 gece sonra oluşturulan 4 farklı CAIII promotor konstracı bölüm 3.2.3.2.1’de anlatıldığı gibi seçilen hücre hatlarına transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 6 sa sonra bölüm 3.2.3.1.9’de anlatıldığı gibi hipoksik koşul oluşturulmak istenen kuyulardaki medyum CoCl_2 ’lu DMEM ile değiştirilmiş, normoksik koşulları devam ettirmek istenen kuyulardaki medyum ise %10 FCS içeren DMEM ile değiştirilmiştir. Transfeksiyon süresince 24, 48 ve 72 sa zaman aralıklarında kuyulardaki medyumlar toplanarak bölüm 3.2.3.2.2’de anlatıldığı gibi lusiferaz ve SEAP ölçümleri alınmıştır. Buna göre 4 farklı konstracın Lusiferaz/SEAP değerleri Şekil 4.55’de belirtilmiştir.



Şekil 4.55 : Saos-2 hücre hattında CAIII promotor konstraklarının Hipoksik ve Normoksik şartlardaki etkinliği.

Hipoksik ve normoksik şartlarda CAIII promotor konstarklarının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aynı deney İnsan Prostat kanser modeli olan PC3'lerde de yapılmıştır. 4 farklı konstranın Lusiferaz/SEAP değerleri Şekil 4.56'de gösterilmiştir.



Şekil 4.56 : PC3 hücre hattında CAIII promotor konstraklarının Hipoksik ve Normoksik şartlardaki etkinliği.

Hem Saos-2 hem de PC3 hücre hatlarında yapılan transfeksiyon deneyleri sonucunda -941/+86 ve -699/+86 CAIII Promotor konstraklarının arasındaki bölgede HRE bölgesi olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden bu elementi taşıdıkları için hipoksik koşullarda regüler olmaktadır. Bu bölge delesyona görürüldüğünde CAIII transkripsiyonel aktivitesinde artış yerine azalış görülmektedir.

4.3 İnsan CAIII Prostat Kanseri Modelinde Aşırı İfadesinin Hücresel ve Moleküler Analizi

4.3.1 Primer Dizaynı

İnsan CAIII cDNA'sına ait bilgiler NM_005181.3 nosu ile GeneBank'a kaydedilmiştir. CAIII dizisinin başlangıç noktası ve bitiş noktası dikkate alınarak primer dizayn edilmiştir. Oluşturulacak ürünün büyüklüğü 786 bp'dir.

Kullanılacak olan pcDNA3.3 vektörünün uygun gördüğü primer dizayn metodları dikkate alınmıştır. Bu bağlamda primer dizaynları Tablo 4.9'da görüldüğü gibidir.

Tablo 4.7 : CAIII cDNA dizisine ait kullanılan forward ve reverse primerler.

	Dizi	Baz	Tm
Forward Primer	5' CACCATGGCCAAGGAGTGGGGCTA 3'	24 baz	60°C
Reverse Primer	5' TCATTTGAAGGAAGCTCTCAC CACCC 3'	26 baz	65°C

4.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) Bölüm 3.2.3.3. de belirtildiği şekilde 50 µL hacimde yapıldı. Buna göre CAIII cDNA'sının çoğaltılması için kullanılan MgCl₂ konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı, tampon, distile su, dNTP karışımı, forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz Tablo 4.10'da gösterilemektedir.

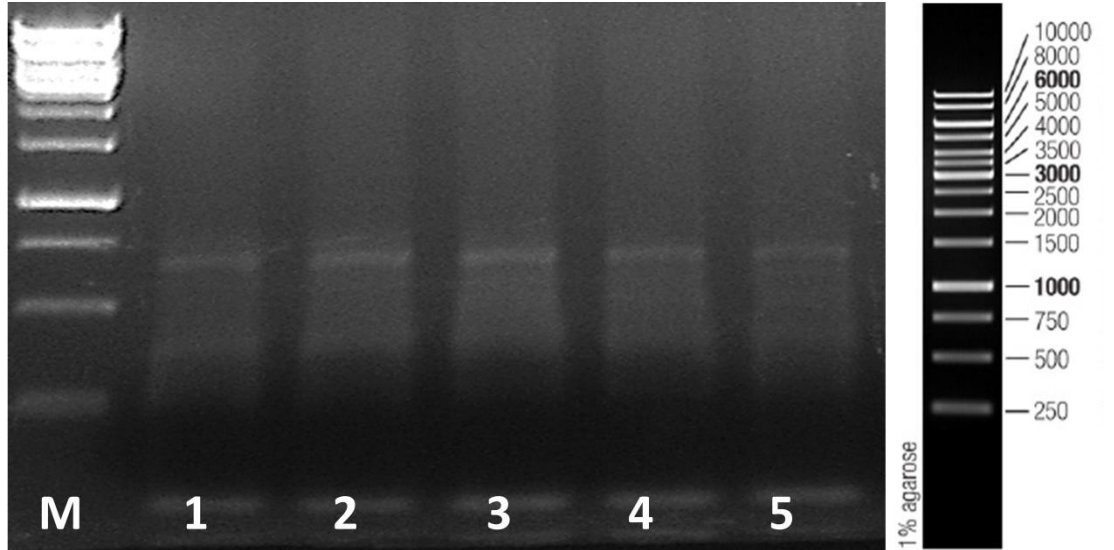
Tablo 4.11’da belirtilen PCR programı kullanılarak CAIII cDNA dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünlerden 5 µL’si agaroz jelde yürütüldü ve 786 bç’lik insan CAIII cDNA’sına ait bant UVP Görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi (Şekil 4. 57).

Tablo 4.8 : CAIII cDNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyonu

CAIII Promotor 38 SİKLUS	Örnek	N.K.	P.K.
cDNA kalıp (1µg)	5µL	-	1µL
10X Taq Buffer	5µL	5µL	5µL
MgCl ₂ (25mM)	4µL	4µL	2µL
dNTP mix (10mM)	1µL	1µL	1µL
Forward primer (100ng/µL)	1µL	1µL	1µL
Reverse Primer (100ng/µL)	1µL	1µL	1µL
Taq polimeraz (5U/ul)	1 µL	1 µL	1 µL
dH ₂ O	32 µL	37 µL	38 µL
Son hacim	50µL	50µL	50µL

Tablo 4.9 : CAIII cDNA'sını çoğaltmak için kullanılan PCR döngüsü.

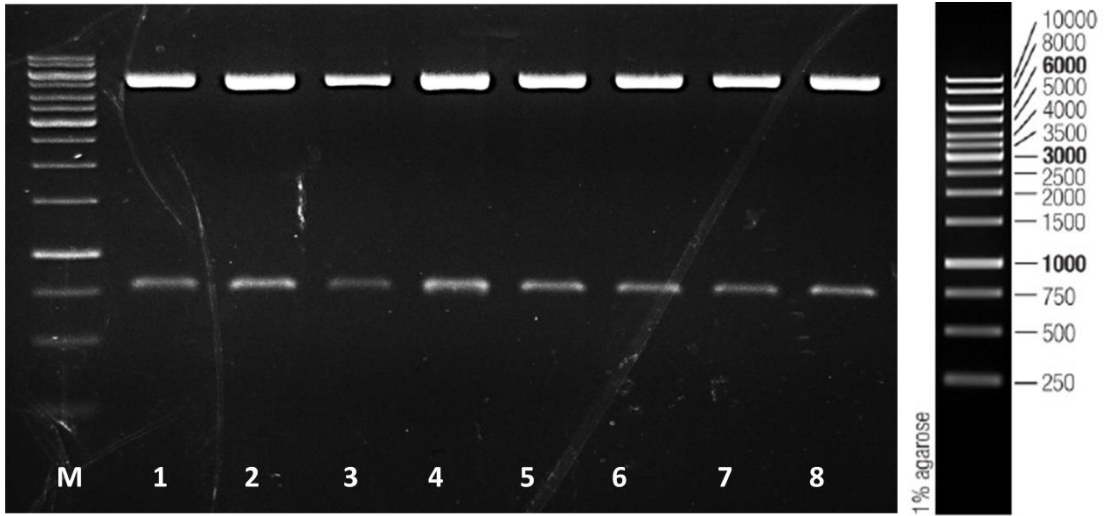
Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	4 dk
2	38	94°C	1 dk
		57°C	45 sn
		72°C	1 dk
3	1	72°C	10 dk



Şekil 4.57 : İnsan CAIII cDNA bölgesinin çoğaltılması için uygulanan PCR görüntü. (M: Marker, 1-5: Örnekler).

4.3.3 İnsan CAIII cDNA'sının Klonlanması

PCR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla pcDNA 3.3. TOPO vektörü (Invitrogen) kullanıldı. Öncelikle PCR sonucu oluşan bantlar kitte önerdiği şekilde ligasyona bırakıldı. Daha sonra üretici firma protokolüne göre ligasyon ürünü E.coli One-Shot hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kolonilerden 8 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) plazmit DNA izolasyonu kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmitler SacI ve PstI restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol yapıldı. Şekil 4.58'de görüldüğü gibi 8 kolonide bulunan vektörlerin 8 tanesi rekombinanttır ve insan CAIII cDNA dizisini içermektedir.



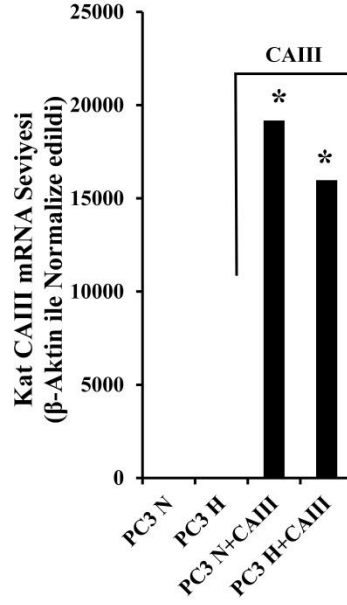
Şekil 4.58 : pcDNA 3.3 TOPO/CAIII cDNA ait plazmitinin SacI ve PstI restriksiyon enzimleri ile yapılan kontrol kesimi (M: Marker, 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni, 3: 3. Koloni, 4: 4. Koloni, 5: 5. Koloni, 6: 6. Koloni, 7: 7. Koloni, 8: 8. Koloni).

4.3.4 İnsan CAIII cDNA'sının Seçilen Hücelere Geçici Transfeksiyonu

Klonlanan CAIII cDNA'sı PC3 hücrelerine normoksik ve hipoksik koşullarda transfekte edilmiştir. Hücreler Bölüm 3.2.3.1.5'de anlatıldığı şekilde başlatılmış ve büyütülmüş, bölüm 3.2.3.1.6'da anlatıldığı gibi pasajlanmıştır. İstenen yoğunluğa gelen hücreler bölüm 3.2.3.1.7'de anlatıldığı gibi sayım yapılarak, canlı hücre popülasyonu belirlenmiştir.

Transfeksiyon için kalsiyum fosfat metodu kullanılmıştır. Bu amaçla PC3 hücrelerine CAIII cDNA'sı bölüm 3.2.3.2.1'de anlatıldığı şekilde transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon sonucunda hücreler kaldırılarak, bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonları yapılmış, bölüm 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi cDNA sentezi yapılmıştır.

CAIII cDNA'sının hücreler transfekte olup olmadığını belirlemek için bölüm 3.2.5.4'de anlatıldığı gibi kantitatif gerçek zamanlı (Real-Time PCR) PZR yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.59'de gösterilmiştir.

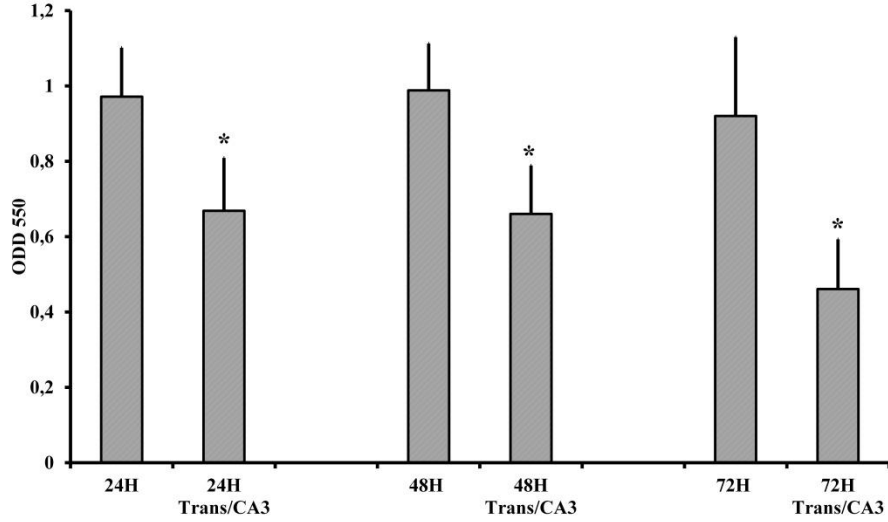


Şekil 4.59 : Hipoksik ve Normoksik şartlarda CAIII cDNA'sı ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerinde CAIII mRNA ifadesi.

4.3.1 İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) cDNA'sının aşırı ifadesinin Hücre Çoğalmasına Etkisi

İnsan CAIII cDNA'sının hücrenin canlılığı ve proliferasyonu üstüne etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT analizleri yapılmıştır. Bu bağlamda uygulanan teknik Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda CAIII'ün aşırı ifade edildiğinde, PC3 hücrelerinde antiproliferatif etkisi ortaya çıkmıştır (Şekil 4.60).



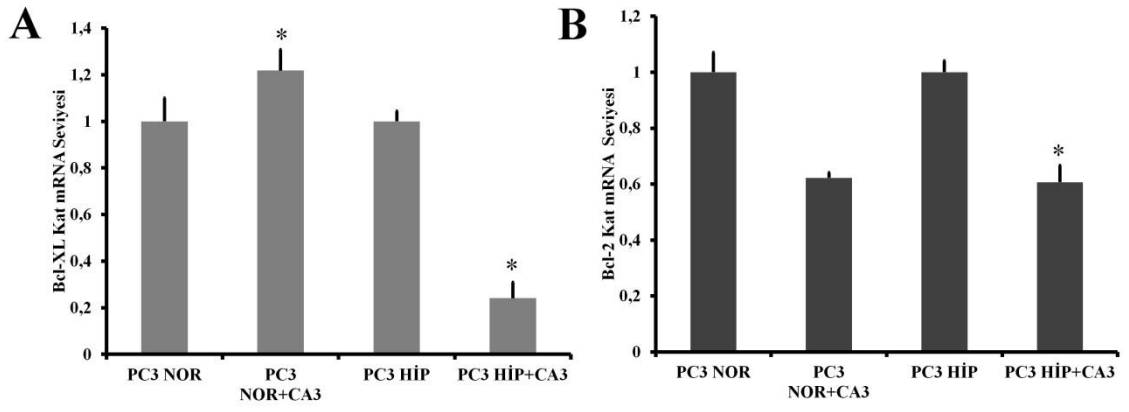
Şekil 4.60 : Hipoksik ve Normoksik şartlarda CAIII cDNA ile transfekte edilmiş PC3 hücrelerinde MTT etkinliği.

4.3.2 İnsan CAIII cDNA'sının Apoptotik Sürece Etkisi

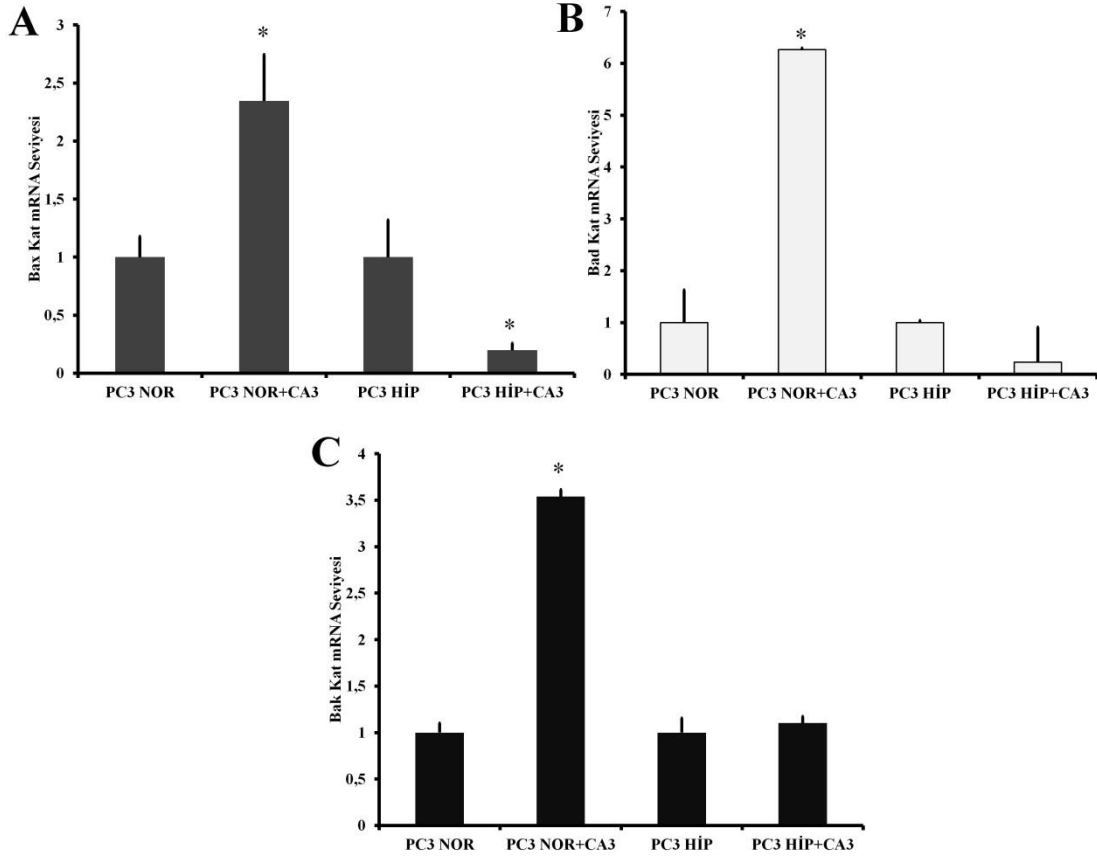
Apoptotik süreçte CAIII'ün etkisinin belirlenmesi amacıyla İnsan CAIII geninin cDNA halkasal bir şekilde PC3 hücrelerine transfekte edilmiş ve 24, 48 ve 72 sa zaman aralıklarında seçilen genlerin etkisine bakılmıştır.

Bu amaçla kullanılan genler Cyclin D1, p27, Bcl-XL, Bcl-2, Bax, Bak, ve Bad genleridir. Bu genlerden Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bcl-XL ve Bcl-2 genleri hücrenin apoptotik süreçten kurtulmasını sağlayan, hücrenin hayatta kalması ile ilgili olan genlerdir. Bax, Bak, ve Bad genleri ise apoptotik süreçte etkin rol oynayarak 'Ölüm Genleri' olarak adlandırılırlar. Cyclin D1 ve p27 hücre döngüsünde etkin rol oynayan önemli genlerdir. Birbirleri ile ters çalışan bu genler döngünün devamını veya döngünün sonlanarak ölüme yönlendirilmesini regüle ederler.

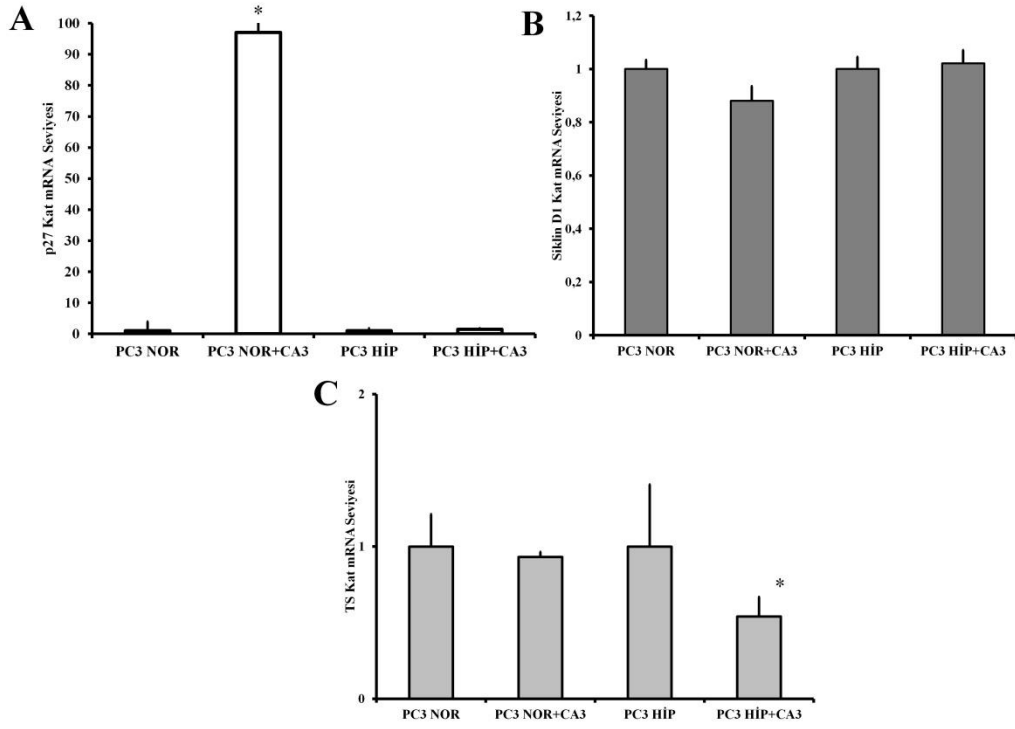
Bu amaçla apoptotik süreçte CAIII cDNA'sının prostat kanserindeki durumunun belirlenmesi için Real-Time PCR tekniği kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.61, 4.62 ve 4.63'de gösterilmektedir.



Şekil 4.61 : Bcl-XL ve Bcl-2 kat mRNA seviyeleri (A: Bcl-XL, B: Bcl-2).



Şekil 4.62 : Bax, Bad ve Bak kat mRNA seviyeleri (A: Bax, B: Bad, C: Bak)



Şekil 4.63 : p27, Siklin D1 ve TS kat mRNA seviyeleri (A: p27, B: Siklin D1, C: TS)

Yapılan ekstopik ekspresyon çalışmalarının sonucunda CAIII'ün apoptotik ve hayatta kalma genleri ile ilişkisi belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

İlk olarak koyunun iskelet kasında daha sonra sırasıyla kedi de, tavşan da ve insanda da keşfedilen İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) geni (NM_005181) 8. Kromozomun q22 kolunda lokalize olmuş, 7 ekzona ve 6 introna sahip 10,3 kb uzunluğunda bir gendir. Yaklaşık 30 kD ağırlığında, 259-260 amino asit rezidüsünden ibaret ve sitozolik yerleşimli monomerik bir proteindir. Moleküler boyutları, monomerik yapıları ve amino asit dizilimleri birbirleri ile benzerlik gösteren CAI, CAII ve CAIII izoenzimlerinden CAIII düşük hidratize yapma ve sülfonamid inhibitörüne karşı direnç gösterme özelliği ile diğer iki üyeden ayrılır (Tashian, 1981; Lloyd, 1986; 1987).

CAIII ekspresyonu ve genin transkripsiyonunun regülasyonu ile ilgili çok kısıtlı bilgiler bilinmektedir. CAIII 10 kb'lık genomik bölge tarafından kodlanmaktadır. CAIII'ün 1987 tarihinde 631 bp'lık promoter klonlanarak yayınlanmıştır. Bu çalışmada CAIII promotörü kısmi genomik dizileme ile aydınlatılmış ancak CAIII transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

CAIII promotörüne ait -941/ +86'lık bölgeyi kapsayan dizi bu tez kapsamında klonlanarak gen bankasına kayıt edilmiştir ([MF374499](#)). Sırasıyla -699/ +86, -236/ +86 ve -108/ +86 olmak üzere -941/ +86'lık klonlanmış dizi kullanılarak delesyon konstrakları yapılmıştır. Dört farklı delesyon promotör konstraklarının transkripsiyonel aktivitelerini belirlemek amaçlı transfeksiyon deneyleri yapılmıştır. "Core Promotor" bölgesini bulmayı amaçladığımız bu deneyler sayesinde CAIII promotörünün aktif bölgesinin ATG kodununa yakın olarak bulunan -108/ +86 dizilerini kapsayan konstrak üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu bölge RNA polimerazın ve belli transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölge olduğu için önemlidir. Ancak CAIII Promotörünün TATA kutusu bulunmamaktadır.

Biyoinformatik analizleri yapılan CAIII'ün promotör bölgesine bağlanan olası transkripsiyon faktörlerinin analizi MATINSPECTOR programı ile yapılmıştır. CAIII ün olası pek çok sayıda transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini içerdiği

belirlenmiştir (EkC). Ancak yoğun olarak bulunduğu tespit edilen, transkripsiyon faktörlerinden SP1, C/EBP α ve USF1 ileri analizler için incelmeye seçilmiştir.

Spesifik protein-1 diye isimlendirilen SP1 transkripsiyon faktörü GC-zengin 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(C/T)-3' korunmuş dizisine bağlanan ve C-Terminus domaininde DNA ile interaksiyona giren 3 ayrı C2H2-Tip Çinko parmak bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (Latchman, 1995b). SP1 Bağlanma Bölgesine sadece SP1 değil, SP2, SP3 ve SP4' transkripsiyon faktörleri de bağlanır. SP1, ailenin ilk olarak tanımlanan üyesi olduğundan bu ismi almaktadır. SP1, bazen TATA'sız promotorlarda transkripsiyonel aktivatör olarak görev alabilmektedir (Hoey, vd., 1993; Tanese, vd., 1996).

Yapılan kanser çalışmalarında, birçok kanser modelinde SP1 proteininin anormal seviyeleri gözlemlenmiştir. Birçok kanser türünde aşırı ifade ettirilen SP1'in tümörün evresi ve kötü prognoz üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir. Yine yapılan çalışmalara, Normal seviyelere inhibe edilerek veya susturularak getirilen SP1, tümör oluşumunu, tümörün büyümesini ve metastaz yapmasını azaltır. Ayrıca damar oluşumunda görevli olan Vasküler Büyüme Faktörü (VEGF) ile SP1 arasında ilişki bulunmaktadır. Bir pro-apoptotik protein olarak da iş gören SP1, p53 geni üzerinden tümör hücrelerini apoptoza indükler. Aşırı ifade ettiren SP1, hücre siklusunda inhibe etmektedir (Gill, vd., 1994; Marin, vd., 1997).

Yoğun yayılım gösteren epitel karakterli prostat kanserlerinde artmış SP1 ifadesi, kanserli hücrelerin apoptoza direnç göstermelerine ve de düşük riskten yükseğe doğru geçişe neden olmaktadır. SP1, prostat kanserinde direkt etki gösteren androjen reseptör, TGF- β ve c-Met gibi önemli genleri regüle etmektedir (Tanese, vd., 1996).

İnsan CAIII promotor konstraktlarının SP1 ile ko-transfeksiyon deneyleri incelendiğinde, bütün promotor konstraktlarının aktiviteleri SP1 transkripsiyon faktörü ile arttığı belirlenmiştir. Bütün konstraktlarda artış olmasına rağmen, -108/+86'lık bölgeyi kapsak konstraktaki artış maksimum düzeydedir. Yapılan biyoinformatik analizlerle de bu bölgeye bağlanan birçok SP1 transkripsiyon faktörünün olduğu gözlemlenmiştir. Promotor çalışmaları ile görülen etki mRNA ve protein düzeyinde de analiz edilmiştir. Osteosarkoma (Saos-2) ve Prostat Kanseri

(PC3) modeli olan iki farklı hücre hattında SP1'in aşırı ifadesi sağlanmış ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonları yapılmıştır. Zamana bağlı etkinin gözlemlenebilmesi için 24, 48 ve 72 sa zamanlarda hücre pelletleri toplanmış, izolasyonlar yapılmıştır. Yapılan mRNA ekspresyon çalışmalarında, SP1'in aşırı ifade edildiği seçilen hücre hatlarında CAIII mRNA seviyesi zamana bağlı artış göstermektedir. Özellikle 72 saatte alınan sonuçta CAIII mRNA seviyesi maksimum düzeye ulaşmaktadır. Western Blot tekniği ile yapılan CAIII protein seviyesi analizi ile SP1'in aşırı ifade ettirildiği hücre hatlarındaki CAIII protein seviyesi zamana bağlı artış göstermiştir. Promotor, mRNA ve protein düzeyinde etkisi belirlenen SP1'in spesifik olarak promotorda bağlandığı yerleri analiz etmek için EMSA deneyleri yapılmıştır. Seçilen hedef bölgelerde yapılan SP1 yarışmalı deneylerle SP1'in CAIII promotörü üzerine bağlandığı ve bu bağlanmanın spesifik olarak +62/+28, -153/-181 ve -134/-158 bölgelerinde olduğu belirlenmiştir. Özellikle prostat kanseri üzerinde SP1'in, CAIII regülasyonuna etkisi bu tez çalışması ile ilk defa aydınlatılmış oldu.

Seçilen bir diğer transkripsiyon faktörü özellikle adipoz dokunun farklılaşmasında anahtar role sahip olan CCAAT/Enhanser Bağlayıcı Protein Alfa (C/EBP α)'dır. Olgun adipoz dokunun toplam proteininin % 24'ünü oluşturan CAIII, yağ metabolizmasında aktif görev almaktadır. Özellikle obez ve normal ağırlığa sahip farelerde CAIII ekspresyon seviyesi arasında önemli derecede fark vardır (Cabiscol, 1996; Ramji, 2002)

Adipoz dokuda ayrıca oldukça fazla reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve lipid peroksidaz ürünleri bulunmaktadır. CAIII'ün hücreleri ROS'un sebep olduğu stresten koruduğu yine yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Cabiscol, 1996).

C/EBP α 'nın CAIII transkripsiyonel regülasyonu üzerine etkisini aydınlatmak için ilk olarak oluşturulan delesyon promotör konstrakları kullanılır, C/EBP α ile Ko-transfekte edilen promotör parçalarının aktiviteleri belirlenmiştir. Buna göre, bütün promotör konstraklarının aktiviteleri C/EBP α ile artmakta, en yüksek artış ise en küçük konstrak olan -108/+86'da gözlemlenmektedir. Promotör konstrakları üzerindeki bu etkinin mRNA ve Protein düzeyinde de ifadeleri belirlenmiştir. Real-Time PCR ve Western Blot deneyleri ile C/EBP α 'nın CAIII ekspresyon seviyesi üzerine etkileri zamana bağlı değerlendirilmiş, CAIII'ün ifadesinin özellikle erken

salerde daha fazla olmak üzere bütün zaman aralıklarında artış gösterdiği belirlenmiştir. C/EBP α 'nın CAIII promotoruna bağlandığı spesifik yerin analizi için EMSA deneyleri yapılmış ve C/EBP α 'nın promotor üzerinde bağlandığı ve bu bölgelerin +62/ +28, -134/-158 ve -153/-181 bölgeler olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız deneylerle CAIII ve C/EBP α ilişkisi aydınlatılmış, transkripsiyone regülasyonu üzerine etki gösterilmiştir. Literatür taramalarında CAIII ve C/EBP α ile ilgili herhangi bir veri bulunmamakta ve bu tez kapsamında bu ilişki ilk defa aydınlatılmaktadır.

Seçilen son transkripsiyon faktörü, hücrel stres durumlarında stres yanıtı olarak oluşturulan “Upstream Stimüle Edici Faktör-1” (USF1)'dir. TATA'lı ve TATA'sız promotorlerin regülasyonunda aktif rol oynayan USF1, özellikle TATA'sız promotorlarda Inr elementlerine bağlanarak genin regülasyonuna etki etmektedir. USF1 transkripsiyon faktörü hücrel duruma göre büyümeyi baskılayıcı ve proliferatif etki gösterebilir (Firlej, 2005). USF1 transkripsiyon faktörü TGF β 2, IGF2R ve hTERT üzerinden hücre proliferasyonunda, cdk4, Siklin B1 ve cdk1 gibi proteinlerle hücre döngüsünün regülasyonunda ve de p53, BRCA1 ya da APC gibi genlerle büyümeyi baskılayıcı etkilere sahiptir. USF1, strese yanıt oluşturan hassas bir transkripsiyon faktörüdür bu sebeple immün cevapta da görev almaktadır (Ge, 2003).

CAIII'ün hücrel stres durumlarında, özellikle radyoaktif oksijen radikallerinin yarattığı stresten hücreyi koruduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. USF1'inde strese yanıt oluşturmaya CAIII ve USF arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamıza sebep oldu.

Promotor kontrakları ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında, dört farklı konstrağında USF1 ile ko-transfeksiyonundan aldığımız sonuçlar bizi şaşırtmadı. Çünkü bütün delesyon promotor kontraklarında promotor aktivitesi artmakta, özelliklede ATG'ye yakın olan -108/ +86 promotor parçasındaki aktivite maksimum düzeydedir. TATA'sız promotorlarda Inr elementlerine bağlanmayı tercih eden USF1, TATA'sız bir promotor olan CAIII'de de bu bölgeyi tanıyıp bağlanmakta ve genin regülasyonunda görev almaktadır. USF1 ile transfekte edilen Saos-2 ve PC3 hücrelerinden izole edilen mRNA ve proteinlerle CAIII'ün ekspresyon seviyesi analiz edilmiştir. Elde edilen Real Time PCR ve Western Blot verilerine göre

CAIII'ün zamana bağılı olarak hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı gözlemlenmiştir. Bu da promotor konstarkları ile elde ettiğimiz verinin kuvvetlenmesini sağlamıştır. Ancak bağlanmanın spesifikliğini belirlemek amacıyla EMSA çalışmaları yapılmış ve hedef dizilere ait primerler dizayn edilmiştir. Biotinlenerek hazırlanan DNA problrımız ve USF1 korunmuş dizisi ile yapılan yarışmalı bağlanma deneylerinde USF1'in CAIII promotoruna spesifik olarak bağlandığı yerler belirlenmiştir. USF1'in CAIII promotoru üzerinde spesifik olarak bağlandığı ve bu bölgelerin +62/ +28, -134/-158 ve -153/-181 olduğu tespit edilmiştir.

Transkripsiyonel regülasyon, bir genin aktivitesinde çok önemli bir bölümü kapsamaktadır. DNA'yı tanıyıp bağlanan transkripsiyon faktörleri genin aktivitesinin artıp, azalmasını ya da sessiz kalmasına neden olmaktadır. Günümüz dünyası kanserle savaş halinde iken, kanserin aslında genlerin savaşı olduğu ve bu savaşta bizim görevimizin sadece dışarıdan müdahalelerle süreci yönetmek olduğu aşıkardır. Genlerin savaş halinde olduğu bu süreçte transkripsiyonel regülasyon oldukça dikkat çekmektedir. CAIII'ün özellikle bazı kanser modellerindeki ekspresyon seviyesi dikkat çekerken, transkripsiyon faktörleri ile bu seviyenin değiştirilmesi önemlidir. Özellikle sağlıklı prostat dokusunda ifade olan androjenik yanıtı CAIII, doku kanserleştiğinde ifadesinin azalması ve bu ifadenin hücre döngüsünde, apoptozda, ROS'a yanıtta, proliferasyonda görev alan SP1, C/EBP α ve USF1 ile artması daha da önemli bir sonuçtur. Bu transkripsiyon faktörleri ile aşırı ifade olan CAIII, belirli kanser türlerinde etkisi daha da detaylı incelenmelidir.

Karbonik anhidraz ailesinin asli görevinin karbondioksit (CO₂) ve bikarbonat (HCO₃⁻) arasındaki geri dönüşümlü reaksiyonu katalizlemek olduğu bilinmektedir. Hücrenin asit-baz dengesini sağlayan bu önemli reaksiyon özellikle kanserleşme süresinde dikkatimizi çekmektedir. Kanser hücrelerinin aktif büyüyen dokular olduğu, beslenmeye ve O₂ oldukça fazla ihtiyaç duydukları, bunun doğrultusunda CO₂ üretimlerinin maksimum düzeyde olduğu bu sebeple CA'ların kanserleşmede altının çizildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lau1, Lin, Bénard, 2017).

Kanser dokusu az oksijen koşullarında, hafif asidik ortamları tercih ederler. Özellikle "Hipoksik" diye adlandırılan düşük oksijen koşulları hem CA ailesi üyeleri

hem de kanser dokuları için önemlidir. CA'ların promotorlarında bulunan "Hipoksiya Yanıt Elementler"ine (HRE) bağlanan HIF-1, genin transkripsiyonel regülasyonunda etki gösterir. Özellikle CAIX ve CAXII gibi aile üyelerinin hipoksik yanıtları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Sowa, 2017).

İnsan ve hayvanlardan elde edilen örneklerde Hif1 α 'nın mRNA ve protein seviyesinin kanser oluşumu sırasında artış olduğu görülmüş. Ayrıca anjiyogenesis (VEGF), glukoz transport (GLUT1) ve PI3K/AKT yollarının kullanılarak kanser sürecini hızlandırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Nakamura, K., Zen, Y., Sato, Y., Kozaka, K., Matsui, O., Harada, K., Nakanuma, Y., 2007). Tümör içerisinde hipoksik ortamın oluşması, tümöre agresif ve metastazik özellik kazandırmasına neden olmaktadır. Bu nedenle HIF-1 miktarının tümör evresi ve prognozuyla da korelasyon gösterdiği öne sürülmektedir (Semenza, 2002; Brahmini Horn, Pouyssegur, 2006).

Biyoinformatik olarak analiz edilen CAIII promotorunda da olası HRE bölgesi mevcuttur. Bu sebeple bu tez kapsamında CAIII'ün Hipoksik durumlardaki transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmak amaçlanmıştır. Özellikle seksüel dimorfizm gösteren CAIII'ün hipoksik şartlardaki ifadesini belirlemek amacıyla iki farklı prostat kanser modeli (DU-145 ve PC3), osteosarkoma kanser modeli (Saos-2) ve hepatoselüler hücre (Hep3B) modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

CAIII'ün hipoksik durumlarıdaki mRNA düzeyindeki ifadesini belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucunda CAIII'ün hipoksik şartlar oluşturulduğunda ifadesi zamana ve hücre modeline bağlı olarak üzere armakta ve artışın miktarı değişmektedir. Özellikle androjen bağımsız prostat kanser modeli olan PC3 hücre hattındaki CAIII mRNA seviyesinin maksimum düzeye ulaştığı görülmektedir. Bu etkinin protein düzeyinde de analizi için IFC yapılmış ve sonuçta özellikle androjen bağımsız ve metastatik karakteri daha güçlü olan prostat hücre modeli PC3'lerde CAIII'ün protein düzeyi artmaktadır. Real- Time PCR ve IFC tekniği ile elde edilen bilgiler dâhilinde, sağlıklı prostat dokusunda ifade olurken, doku kanserleştikten sonra ifade olmayan CAIII geni hipoksik şartlar sağlandığında yeniden ifade olduğu özellikle metastatik karakteri kuvvetli PC3 hücre hattında maksimum düzeyde bulunduğu yapılan analizlerle gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda Western Blot tekniği ile hipoksik ve normoksik şartlarda PC3 hücre hattındaki CAIII

protein seviyesi analiz edilmiş ve hipoksik şartlardaki CAIII ifadesinin dikkate değer bir artış gösterdiği bulunmuştur.

Hipoksik şartlarda, prostat kanser modeli olan PC3'lerde CAIII'ün ifade artışı promotor üzerindeki HRE bölgesinin analiz etmemize neden olmuştur. CoCl₂ ile oluşturulan hipoksik ortamda 4 farklı CAIII promotor konstarklarının transkripsiyonel aktiviteleri belirlenmiş ve özellikle -941/ +86 ve -699/ +86 bölgeleri kapsayan promotor konstarklarının bazala kıyasla aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu etkinin sadece prostat dokusuna özel olup olmadığını belirlemek amacıyla non-prostat modeli olarak osteosarkoma hücre modeli Saos-2'larda da transfeksiyon deneyleri yapılmış ve aynı etki bu hücre hattında da görülmüştür. Bilindiği üzere HIF-1 transkripsiyon faktörünün promotor üzerinde tanıyıp bağlandığı özel bölgeler mevcuttur. Bu bölgelere HIF Bağlı Element (HRE) denir. Olası transkripsiyon faktörü bağlanma analiz programı olan MATINSPECTOR'dan alınan verilere göre CAIII promotorunda HRE bölgesinin -268/ -252 bölgeler arasında olması muhtemeldir. Deneysel olarak aldığımız sonuçlarda bize insan CAIII promotorunda HRE bölgesinin olduğu ve bu bölgenin -236/ +86 bölgenin önünde olduğu, delesyon konstrağı yapılırken HRE bölgesi çıkartıldığı için -236/ +86 ve -108/ +86'lık bölgelerde hipoksik şartlar sağlandığında her hangi bir transkripsiyonel aktivite görülmemesine sebep olmaktadır.

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, hücre içi ve hücre dışı pek çok sinyal tarafından aktifleşen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, iki temel yolak üzerinden kontrol edilir. (Fuchs ve Steller, 2011). Evrimsel süreçte canlılara çok önemli özellikler kazandıran apoptoz mekanizması, fizyolojik şartlardaki çok hücreli organizmalarda, hem gelişim esnasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesini sağlar. (Hague ve Paraskeva, 2004). Apoptoz mekanizması istenmeyen hücrelerin yok edilmesi gibi kritik öneme sahip görevleri üstelendiği gibi pek çok hastalık ile de yakından ilişkilidir. Apoptozun aşırı aktif olması, istenmeyen sayıda hücre kaybına neden olarak iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olur. Yetersiz apoptoz ise otoimmün hastalıklara ve kansere neden olabilmektedir. Fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması veya hücrenin oksidatif stres, hipoksi, iyonize radyasyon, UV ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etkenlerin etkisinde kalması

sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin yok edilebilmesi için apoptotik mekanizma tetiklenebilmektedir. (Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio, ve De Laurenzi, 2012).

Apoptozis sırasında hücrede birtakım metabolik ve fizyolojik olaylar gerçekleşir. Apoptosis uyarısı alan hücrenin nükleus, sitoplazma ve hücre yüzeyinde değişiklikler meydana gelir. Hücre komşu hücrelerle bağlantısını kopararak uzaklaşır, su kaybederek büzülür ve kalsiyum iyonlarını girişiyle hücre yoğunluğu artar. Kromatin yoğunlaşır, piknotik bir görüntü oluşur ve DNA nükleozomlarından kesilir. Hücre zarındaki fosfatidil serin zarın iç yüzeyinden dış yüzeyine transloke olur ve hücre yüzeyi bozulmaya başlar. Bu sırada çekirdek parçalanır. Hücre tomurcuk şeklinde zarla sarılı apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptoziste enflamasyon görülmez (Bellamy, Malcomson, Harrison, ve Wyllie, 1995).

Pek çok farklı molekül tarafından regüle edilen apoptoz mekanizması, kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde aktifleşmelerini sağlayan iki yolak tarafından ifade olmaktadır. Hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize edilen “ekstrinsik yolak” ve mitokondri-apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize edilen “intrinsik yolak” (Favaloro, vd., 2012).

Hücre içinde oluşturulan sinyallerle uyarılan intrinsik yolda proapoptotik Bid tarafından antiapoptotik Bcl-2 inaktive edilir, Bax ve Bak aktifleşir. Bu şekilde mitokondriyon membranında por oluşumu indüklenerek porlardan sitokrom-c, Smac, Endo-G, Ca⁺⁺ ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınır. AIF çekirdeği parçalarken Endo-G DNA'yı parçalar. Sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 da efektör kaspazlardan kaspaz-3'ü aktifleştirir ve hücre ölüme gider (Bellamy, vd., 1995).

Mitokondriden sitokrom c salınmasını kontrol eden Bcl-2 ailesi proteinlerinin ilk keşfedilen üyesi Bcl-2'dir. Bcl-2'nin, hücre ölümünü engelleyici bir rolü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gross, 1999). Bcl-2 ailesi ile bugüne kadar yapılan çalışmalar da benzer homoloji gösteren 20 gen tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesine ait bu proteinler fonksiyonel ve yapısal kriterlere göre ayrıldığında üç farklı grup halinde incelenir. Grup-I; Anti-apoptotik özellik gösterenler (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w,

Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3 ve Bcl-B), Grup-II; pro-apoptotik özellik gösterenler (Bax, Bak, Bok/Mtd) ve Grup III; (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) (Cory, Huang, ve Adams, 2003).

Bax ve Bak doğrudan sitokrom c salınmasını sağlamaktadır (Wei, Zong, Cheng, 2001). Bax ve Bad proteinlerinin genlerinden birinin delesyonunda ise apoptoz kısmen engellenmektedir. Bu iki genin tamamen delesyonu ise apoptozun baskılanmasına neden olmaktadır. Bu sonuçlar apoptozun intrinsik yolağında birlikte çalıştıklarının en önemli göstergesi olmaktadır. (Wolter, Hsu, Smith, Nechushtan, Xi, Youle, 1997). Bax proteini apoptozu seçmemi hücrelerin sitoplazma ya da mitokondri zarına zayıf halde bağlı olarak bulunur. Eğer hücre apoptoza indüklenir ise Bax, mitokondri dış membranına transloke olarak konformasyonunu değiştirmektedir. (Antonsson, Montessuit, Sanchez, ve Martinou, 2001). Bak proteini ise normalde mitokondri dış membranında bulunurken apoptoz sırasında konformasyonel bir değişim geçirerek membranın iç taraflarına göç eder (Epanand, Martinou, Montessuit, Epanand, ve Yip, 2002). Bax ve/veya Bak proteinlerinin mitokondri dış membranındaki bu değişimleri, sitokrom c salınmasını sağlamak için zar yüzeyinde por oluşturmakla görevli oldukları düşünülmektedir. Ancak porun yapısı ve por oluşum mekanizması tam olarak henüz aydınlatılamamıştır. (Antonsson, vd., 2001; Epanand, vd., 2002).

Bax ve Bak proteinlerinin mitokondriye geçişi ve bu proteinlerin mitokondri membranında por oluşturarak apoptozu başlatması grup III (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar grup III üyesi proteinlerin etkilerini iki temel mekanizma üzerinden gösterdiklerini ortaya koymaktadır (Kuwana, Bouchier-Hayes, ve Chipuk, 2005). Bax ile Bim ya da tBid gibi grup III üyeleri doğrudan etkileşerek, Bax proteinlerinin mitokondri membranına göçünü sağlamaktadırlar. Bid proteinin ekstrinsik yolak başlatıcısı kaspaz-8 tarafından kesilmesilerek tBid'in oluşumu sağlanır. Bu durum özellikle apoptozun intrinsik-ekstrinsik yolları arasındaki ilişkinin ortaya konulması açısından Bid proteini önemini göstermektedir (Billen, Shamas-Din, ve Andrews, 2008).

Hücre döngüsü, hücre proliferasyonuna, yaşlanmaya veya apoptoza neden olabilecek önemli birçok proteine ev sahipliği yapar. Hücreler, farklı siklinlerin CDK

altbirimleri ile etkileşimleri yoluyla hücre döngüsünün çeşitli safhaları boyunca ilerleme kaydederler. Hücre döngüsünün farklı aşamalarında aktif olarak bilinen, birkaç tanınmış sınıflar veya siklin türleri bulunmaktadır. D ve E tipi siklinler, hücre döngüsünün G1-S faz geçişiyle ilişkilidir (Abde ve Ben, 2009).

Siklin D1 (proto-onkogen), birçok farklı hücre tipinde G1 ila S fazı progresyonunun önemli bir regülatörüdür. Siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 (CDK4 ve CDK6) ile siklin D1'in oluşturduğu kompleks, retinoblastoma proteinini (RB) fosforilatlayarak veya inaktive ederek hücre döngüsü regüle ederler. Son yapılan çalışmalar, siklin D1'in çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve histon deasetilaz (HDAC3) aktivitesini regüle ederek transkripsiyonel modülatör olarak işlev gördüğünü göstermiştir. Siklin D1 meme, özofagus, mesane ve akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi için önemlidir. Siklin D1 aşırı ekspresyonu kanserlerde sık görülen bir olaydır, ancak bu artış ifade yalnızca gen amplifikasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaz. Artmış siklin D1 seviyeleri çoğunlukla, translasyon sonrası seviyedeki kusurlu regülasyonundan kaynaklanmaktadır (John, 2007).

Hücre döngüsü ilerlemesi siklinler ve bunların ilişkili siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından yönlendirilir. p27, siklin E-CDK2'nin bir inhibitörü olarak keşfedildi, ancak o zamandan beri hem hücre döngüsü indükleyen hem de inhibe eden iki farklı görevi üstlendiği belirlendi. G0'da, p27 translasyonu ve protein stabilitesi, nükleer siklin E-CDK2'yi bağlanıp, inaktifleştirdiği zaman maksimum seviyededir. G1'in başında, p27 D tipi siklin-CDK'lerin düzenlenmesinde görev alır. G1'de p27'nin aşamalı olarak azalması, siklin E-CDK2 ve siklin A-CDK2'nin G1-S geçişini harekete geçirmesine izin verir (Chu, 2008). p27'den yoksun olan farelerde, çok organlı hiperplazi, artan vücut boyu ve kanser kaynaklı tümörlere duyarlılık görülür ve bu da p27'nin hem doku genişlemesini hem de hücre çoğalmasını kontrol etmek için bir tümör süpresör görevi gördüğünü gösterir (Kiyokawa, Kineman, Manova-Todorova, Soares, Hoffman, ve Ono, 1996).

Hücre döngüsü inhibisyonu, nükleer p27 seviyesinden kaynaklanmaktadır. Pek çok kanserde, çekirdekteki p27'nin azalmasından ziyade sitoplazmik p27'nin yanlış lokalizasyon gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Sitoplazmik p27, kanser hücresi invazyonunu hızlandırmak için hücre döngüsünden bağımsız bir

kanserojenik fonksiyon gösterir. Ayrıca TAT-p27 protein transdüksiyonunun, Rac bağımlı hücre hareketliliğini arttırdığı gösterilmiştir (Medema, Kops, Bos, ve Burgering, 2000).

Bazı genlerin ektopik olarak kanserli hücelere transfekte edilmesi özellikle kanser dokusunun büyümesine ve kanserli dokunun karakter yapısının değişmesine etki edebilmektedir. Bu etkiyide apoptotik ve anti-apoptotik yolak ve proteinler üzerinden gerçekleştirmektedir. Özellikler Bcl-2 ailesinin üyelerinin rolü literatürde de belirtildiği gibi oldukça fazladır. Ancak yapılan araştırmalarda İnsan CAIII cDNA'sının ektopik ekspresyonu ile ilgili veriler olmaması ve özellikle CAIII'ün bazı sağlıklı hücrelerde ifade olup, kanserleşme sürecindeki hücrelerde ifadesinin baskılanması farklı transfeksiyon metodları ile CAIII cDNA'sının hücreye etkisinin analiz etmemize neden olmuştur. Kanserleşme sürecinde baskılanan bu genin ön deneyleri sonucunda özellikle prostat kanser modellerinde etkisi merak uyandırıcı olmuştur. PCR tekniği ile çoğaltılıp pcDNA 3.3 vektörüne klonlanan cDNA dizisi, halkasal olarak PC3 hücrelerine transfekte edilmiştir. İlk olarak proliferatif etkisi incelenen CAIII, hücre canlılığına olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı belirlenmiştir.

Seçilen bazı anti-apoptotik ve proapoptotik genlerin CAIII transfekte hücrelerdeki mRNA seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda hipoksik ve normoksik şartlar oluşturularak seçilen genler incelendiğinde özellikle normoksik şartlar altında CAIII ile transfekte olan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla artan Bcl-2 ifadesi kanserli hücrelerde azalış göstererek anti-apoptotik yolağını kapattığını, bunula koorele olarak apoptotik genler olan Bax, Bad ve Bak'ın yine CAIII ile transfekte edilmiş normoksik şartlardaki PC3 hücrelerindeki artan ifadesi CAIII'ün hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bize göstermektedir.

Hücre siklusunun kontrol ve devam genlerinden olan p27'nin ifadesi incelendiğinde ise özellikle normoksik şartlar altında CAIII ile transfekte hücrelerde artan tümör supressör olarak bilinen p27 ifadesi bize kanserli hücrelerin baskılanma sürecine girdiğini göstermektedir.

Bu veriler özellikle normoksik şartlar sağlandığında, normalde sağlıklı prostat dokusunda var iken kanserleşme sürecinde ifadesi baskılanan CAIII'ün ortama

tekrardan ektopik olarak verildiğinde süreci nasıl yönettiğini görmemizi sağlamış olmuştur. Kanser hücreleri CAIII iile transfekte olduğunda anti-apoptotik yollarını kapatarak, apoptotik süreci başlatmakta ve ölüme yönelmektedir. Bu da bize kanserleşme sürecinde neden CAIII'ün prostat dokusunda ifade olmadığını göstermektedir.

Bu tez kapsamında İnsan CAIII geninin transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmıştır. Literatürde transkripsiyon faktörleri ile her hangi bir çalışma yapılmamış olan CAIII'ün SP1, C/EBP α ve USF1 transkripsiyon faktörleri ile regülasyonu bu tez kapsamında aydınlatılmıştır. CAIII'ün ifadesini arttıran bu transkripsiyon faktörleri özellikle kanser ve kanserleşme sürecinde aktif rol oynamaktadır. Yine bu transkripsiyon faktörleri ve CAIII'ün ekspresyon seviyesi osteosarkoma ve prostat kanserlerinde ilk defa aydınlatılmıştır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda hipoksik karakteri ile ilgili her hangi bir çalışmaya rastlanılmayan CAIII'ün hipoksik ve normoksik şartlardaki ekspresyon farklılığı, CAIII'ün hipoksik şartlarda prostat kanser modelindeki regülasyonu bu tez kapsamında aydınlatılmıştır. Ektopik olarak ifade edilen CAIII'ün, prostat kanser modelinde apoptotik, metastatik ve proliferatif karakteri bu tez kapsamında aydınlatılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Abde, M. A., and Ben, H. P., (2009). p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.*, 10, e19.

Alver, A., Ucar, F., Keha, E. E., Kalay, E., Ovali, E., (2004). Effects of leptin and insulin on CA III expression in rat adipose tissue. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 19, 279–281.

Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev.*, 112, 4421–4468.

Andrews, G.K., Lee, D.K., Ravindra, R., Lichtlen, P., Sirito, M., Sawadogo, M., and Schaffner, W., (2001). The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *Embo. J.*, 20, 1114–1122

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., Martinou, J. C., (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 276, 11615–11623.

Atchley, W. R., and Fitch, W. M., (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5172-5176.

Bauer, M., Hamm, A. C., Bonaus, M., Jacob, A., Jaekel, J., Schorle, H., (2004). Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes. *Physiological genomics*, 17, 230–244.

Billen, L. P., Shamas-Din, A., and Andrews, D. W., (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 27, 47.

Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., Cedar, H., (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371, 435-438.

Bedford, D. C., Kasper, L. H., Fukuyama, T., Brindle, P. K., (2010). Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics*, 2010, 5, 9–15.

Behre, G., Singh S. M., Liu H., Bortolin L. T., Christopeit M., Radomska H. S., Rangatia J., Hiddemann W., Friedman A. D., Tenen D. G., (2002). Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem.*, 277, 26293-26299.

Bellamy, C. O. C., Malcomson, R. D. G., Harrison D. J., Wyllie, A. H., (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*, 6, 3–16.

Berns, A. (1994). Is p53 the only real tumour suppressor gene?. *Curr. Biol.*, 4, 137-139.

Bouchard, V., Demers, M. J., Thibodeau, S., (2007). Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: Differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/ Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol.*, 212, 717– 728.

Bourne, H. R. and Varmus, H. E. (1992). Oncogenes and cell proliferation. *Curr. Opin. Gener. Dev.*, 2, 1-57.

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., ve Levine, S. S., (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947–56.

Brahmini Horn, C, Pouyssegur, J., (2006). The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*, 93, 73-78.

Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 349–383

Buck, M., Poli, V., Hunter, T., Chojkier M., (2001). C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell*, 8, 807-816.

Bungert, J., Kober, I., During, F., and Seifart, K.H. (1992). Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. *J. Mol. Biol.*, 223, 885–898

Cabiscol, E., and Levine, R. L. (1995) Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *J. Biol. Chem.* 270, 14742–14747

Cabiscol, E., Levine, R. L., (1996). The phosphatase activity of carbonicanhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4170–4174.

Calkhoven, C. F., Bouwman, P. R., Snippe, L., Ab, G. (1994). Translation start site multiplicity of the CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA is dictated by a small 5' open reading frame. *Nucleic Acids Res*, 22, 5540-5547.

Cameron, R. A., Chow, S. H., Berney, K., Chiu, T. Y., ve Yuan, Q. A., (2005). An evolutionary constraint: strongly disfavored class of change in DNA sequence during divergence of cis-regulatory modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11769–74.

Cantor, A. B., (2005). GATA transcription factors in hematologic disease. *Int. J. Hematol.*, 81, 378–84.

Carey, M., Smale, S. T., (2000). *Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press

Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., Hopkins, D. A., (1979). Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochem. Genetics*, 17, 837.

Cesena T. I., Cardinaux J. R., Kwok R., Schwartz J., (2007). CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem.*, 282, 956-967.

Chegwidden, W. and Carter, N., (2000). Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidden WR, Carter ND and Edwards YH (eds), *The carbonic anhydrases. New Horizons, Birkhauser Verlag*, 13-28.

Chai, Y. C., Jung, C. H., Lii, C. K., (1991). Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III; characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. *Arch Biochem Biophys*, 284, 270–278.

Chiang, C. M., Roeder, R. G., (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science*, 267, 531–536.

Chu I. M., Hengst L., Slingerland J. M., (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8, 253–67.

Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. (1995). Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2782–2790.

Conaway J. W., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely T. J., (2005). The mammalian Mediator complex. *FEBS Lett* 579, 904–8.

Conaway, R. C., ve Conaway, J. W., (2011). Function and regulation of the Mediator complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 225–230.

Cortes-Canteli, M., Pignatelli, M., Santos, A., Perez-Castillo, A. (2002). CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277, 5460-5467.

Cory, S., Huang, D. C., Adams, J. M., (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22, 8590–607.

Courey, A. J., Holtzman, D. A., Jackson, S. P., Tjian, R., (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 59, 827-836.

Dai H. Y., Hong, C. C., Liang, S. C., Yan, M. D., Lai, G. M., Cheng, A. L., and Chuang S.E., (2008). Carbonic Anhydrase III Promotes Transformation and Invasion Capability in Hepatoma Cells Through FAK Signaling Pathway. *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 47, 956–963.

Dathan, N.A., Alterio, V., Troiano, E., (2014). Biochemical characterization of the chloroplastic beta-carbonic anhydrase from *Flaveria bidentis* (L.) “Kuntze”. *J Enz Inhib Med Chem.*, 29, 500–504.

Datta, P. K., Raychaudhuri, P., Bagchi, S., (1995). Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5444-5452.

Davidson E. H., Jacobs H. T. and Britten R. J. (1983). Very short repeats and coordinate induction of genes. *Nature*, 301, 468-410.

Davies, K. J. A., Quantanilla, A. T., Brooks, G. A., and Parker, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1198–1205

Dodgson, S. J., Quistorff, B., Ridderstrale, Y., (1993). Carbonic anhydrases in cytosol, nucleus, and membranes of rat liver. *J Appl Physiol.*, 75, 1186–1193.

Dynan, W. S., Tjian, R., (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35, 79-87.

Edmondson D. F. and Olson E. N. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Bioi. Chem.*, 268, 755-758.

Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y., (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxiainducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci.*, 94,4273–4278

Epand, R. F., Martinou, J. C., Montessuit, S., Epand, R. M., Yip, C. M., (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun*, 298, 744–749.

Fairall, L., Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., Rhodes, D. (1993). The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*, 366, 483–487

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V., (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4, 330-49.

Feng, H. Z., Jin, J. P., (2016). Carbonic Anhydrase III Is Expressed in Mouse Skeletal Muscles Independent of Fiber Type-Specific Myofilament Protein Isoforms and Plays a Role in Fatigue Resistance. *Front Physiol.*, 7, 597.

Ferre-D'Amare, A. R., Pognonec, P., Roeder, R.G., and Burley, S.K. (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *Embo. J.*, 13, 180–189.

Ferreiro, J. A., Powell, N. G., Karabetsou, N., Kent, N.A., Mellor, J., and Waters, R. (2004). Cbf1p modulates chromatin structure, transcription and repair at the *Saccharomyces cerevisiae* MET16 locus. *Nucleic Acids Res.* 32, 1617–1626.

Firlej, V., Bocquet, B., Desbiens, X., de Launoit, Y., and ChotteauLelievre, A. (2005). Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J. Biol. Chem.* 280, 887–898.

Frémont, P., Charest, P. M., Côté, C., and Rogers, P. A., (1988). Carbonic anhydrase III in skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and biochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 775–782.

Fuchs Y. and Steller H., (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147, 742-758.

Galibert, M. D., Boucontet, L., Goding, C. R., and Meo, T. (1997). Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J. Immunol.*, 159, 6176–6183.

Ge, Y., Jensen, T.L., Matherly, L.H., and Taub, J.W. (2003). Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J. Biol. Chem.*, 278, 49901–49910.

Gerweck, L. E., Vijayappa, S., Kozin, S., (2006). Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther.*, 5, 1275–1279.

Gibson, D. M., Titchener, E. B., Wakil, S. J., (1958). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. V. Bicarbonate requirement for the synthesis of long-chain fatty acids. *Biochimica et biophysica acta.*, 30, 376–383.

Gidoni, D., Dynan, W. S., Tjian, R., (1984). Multiple specific contact between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature*, 312, 409-413.

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., Tjian, R, (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFIII10 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 192–196.

Green, M. R., (2005). Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol. Cell*, 18, 399–402.

Gross, A., (1999). McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 1899–911.

Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., Bradfeld, C. A., (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 α . *Gene Expr.*, 7, 205–213.

Hagen, G., Dennig, J., Preiss, A., Beato, M., Suske, G., (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J. Biol. Chem.*, 270, 24989-24994.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M., Suske, G., (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20, 5519-5525.

Hague A., and Paraskeva, C., (2004). Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Nature Cell Death and Differentiation*, 1-7.

Hanna-Rose W. and Hansen U. (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *TIGS*, 12, 229-234.

Harguindey, S., Orive, G., Pedraz, J. L., Paradiso, A., Reshkin, S. J., (2005). The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin—one single nature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Rev Cancer*, 1756, 1–24.

Harrison S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA binding domains. *Nature*, 353, 715-719.

Henrion, A. A., Martinez, A., Mattei, M. G., Kahn, A., and Raymondjean, M. (1995). Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse. *Genomics*, 25, 36–43.

Henrion, A. A., Vaulont, S., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1996). Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family. *Mamm. Genome* 7, 803–809

Herschbach B. M. and Johnson A. D. (1993). Transcriptional repression in eukaryotes. *Annual Rev. Cell Biol.*, 9, 479-509.

Hewett-Emmett D., (2000). Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families.” In: Chegwiddden W.R., Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases—New horizons. Basel: Birkhauser Verlag*, 29, 78.

Hoey, T., Weinzierl, R. O. J., Gill, G., Chen, J. L., Dynlacht, B. D., Tjian, R., (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell*, 72, 247-260.

Hunt, T., (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell. Biol.* 2, 213–222.

Imtaiyaz, H. M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., and Sly, W. S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1570–1582.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 464–468.

Jain, R., Police, S., Phelps, K., Pekala, P.H., (1999). Tumour necrosis factor- α regulates expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs) α and β and determines the occupation of the C/EBP site in the promoter of the insulin-responsive glucosetransporter gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 338, 737- 743.

Jeffery, S., Edwards, Y. H., and Carter, N., (1980). Distribution of CAIII in fetal and adult human tissue. *Biochem. Genet.*, 18, 843-849.

Jeffery, S., Wilson, C. A., Mode, A., Gustafsson, J. A., and Carter, N., (1986). Effects of hypophysectomy and growth hormone infusion on rat hepatic carbonic anhydrases. *I. Endocrinol.*, 110, 123-126.

Jenkins, R. R., (1988). Free radical chemistry: relation to exercise. *Sports Med.* 5, 156–170

Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., Semenza, G. L., (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.*, 271, 17771–17778.

John, P. A., (2007). The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer*, 6, 24.

Johnson, P.F., McKnight, S.L., (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*, 58, 799-839.

Kadonga, J. T., Jones, K. A., and Tjian, R. (1986). Promoter-specific activation of polymerase II transcription by SP1. *Trends Biochem. Sci.*, 1, 20

Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., Tjian, R., (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 51, 1079–1090.

Kageyama R., Ishibashi M., Takebayashi K., and Tomita K., (1997). bHLH Transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 1389-1399.

Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L., (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci.*, 94, 5667–5672.

Kannan, K. K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lövgren, S., Ohlsson, A., Petef, M., (1975). Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B: Three-dimensional structure at a nominal 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 51–55.

Karlseder, J., Rotheneder, H., Wintersberger, E., (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1659–1667.

Kaulen, H., Pognonec, P., Gregor, P. D., and Roeder, R. G., (1991). The *Xenopus* B1 factor is closely related to the mammalian activator USF and is implicated in the developmental regulation of TFIIIA gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 412–424.

Kim J., Cantwell C. A., Johnson P. F., Pfarr C. M., Williams S. C., (2002). Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem*, 277, 38037-38044.

Kim, G., Selengut, J., and Levine, R. L. (2000) Carbonic anhydrase III: the phosphatase activity is extrinsic. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 334–340.

Kim, G., Lee, T. H., Wetzel, P., Geers, C., Robinson, M. A., Myers, T. G., (2004). Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span. *Molecular and cellular biology*, 24, 9942–9947

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27Kip1. *Cell*, 85, 721–32.

Koester, M. K., Pullan, L. M., and Noltman, E. A., (1981). The β -nitrophenyl phosphatase activity of muscle carbonic anhydrase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 632-642.

Kornberg T. B. (1993). Understanding the homeodomain. *J. Biol. Chem.*, 268, 26813-26816.

Kowenz-Leutz E., Leutz A., (1999). A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell*, 4, 735-743.

Kozlowski, M.T., Gan, L., Venuti, J.M., Sawadogo, M., and Klein, W.H. (1991). Sea urchin USF: a helix-loop-helix protein active in embryonic ectoderm cells. *Dev. Biol.* 148, 625–630.

Kuo, W. H., Chiang, W. L., Yang, S. F., (2003). The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci.*, 73, 2211–2223

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 17, 525–535.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J., McKnight, S. L. (1988). Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev*, 2, 786-800.

Landschulz W, Johnson P, MacKnight S., (1998). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240,1759-1764

Latchman D. S. (1995a). *Gene Regulation-A Eukaryotic Perspective*, 2nd edn, p. 271. Chapman and Hall, London.

Latchman D. S. (1995b). *Eukaryotic Transcription Factors*, 2nd edn. Academic Press. New York.

Latchman D. S. (1996b). Inhibitory transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28, 965-974.

Latchman D. S. (1997). Transcription Factors: An Overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 1305-1312.

Lau1, J., Lin, K., Bénard, F., (2017). Past, Present, and Future: Development of Theranostic Agents Targeting Carbonic Anhydrase IX. *Theranostics*, 7, 4322-4339.

Lee, J. S., Galvin, K. M., Shi, Y., (1993). Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6145-6149.

Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K. G., (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 273, 28545-28548.

Lii, C. K., Chai, Y. C., Zhao, W., Thomas, J. A., and Hendrich, S., (1994). S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 231–239.

Lin, F. T., MacDougald, O. A., Diehl, A. M., Lane, M.D. (1993). A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimetabolic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9606-9610.

Lin, Q., Luo, X., and Sawadogo, M. (1994). Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF. *J. Biol. Chem.* 269, 23894–23903.

Lindskog, S., (1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, 1.

Littlewood T. and Evan G. (1995). Helix-loop-helix. *Protein Profile*, 2, 62 1-702.

Liu, M., Whetstine, J.R., Payton, S.G., Ge, Y., Flatley, R.M., and Matherly, L.H. (2004). Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem. J.* 383, 249–257.

Liu Y, Nonnemacher M.R., Wigdahl B. (2009). CCAAT/enhancer-binding proteins and the pathogenesis of retrovirus infection. *Future Microbiol.*, 4, 299–321.

Lloyd, J., McMillan, S., Hopkinson, D. A., and Edwards, Y. H., (1986). Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of a cDNA encoding human muscle carbonic anhydrase. *Gene*, 41, 233-239.

Lloyd, J., Brownson, C., Tweedie, S., Charlton, J., and Edwards, Y. H., (1987). Human muscle carbonic anhydrase: gene structure and DNA methylation patterns in fetal and adult tissues. *Genes Dev.*, 1, 594-602.

Luedde, T., Duderstadt, M., Streetz, K. L., Tacke, F., Kubicka, S., Manns, M. P. (2004). C/EBP beta isoforms LIP and LAP modulate progression of the cell cycle in the regenerating mouse liver. *Hepatology*, 40, 356-365.

Lutticken C., Wegenka U. M., Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A. G., Wilks A. F., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Barbieri G., Pellegrini S., Sendtner M., Heinrich P. C. and Horn F. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263, 89-92.

Lynch, C. J., Brennan, W. A. Jr., Vary, T. C., Carter, N., Dodgson, S. J., (1993). Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats. *The American journal of physiology*, 264, 621–630

MacDougald, O. A., Cornelius, P., Liu, R., Lane, M.D. (1995). Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 270, 647-654.

Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., Bird, A. P., (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* 8, 2282-2292.

Maclin, L. J., and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.

Malik, S., Roeder, R. G., (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* 30, 256-63.

Mallis, R. J., Poland, B. W., Chatterjee, T. K., (2000). Crystal structure of S-glutathiolated carbonic anhydrase III. *FEBS Lett.*, 482, 237-241.

Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M.C., Lenz, H.J., and Ladner, R.D. (2003). A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.*, 63, 2898-2904

Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., Philipsen, S., (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, 89, 619-628.

Meisterernst, M., Horikoshi, M., and Roeder, R.G. (1990). Recombinant yeast TFIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9153-9157.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., Burgering, B. M., (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404,782-7.

Mitchell P. J. and Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science*, 245, 371-378.

Murata, Y.H.G.K., Rogers, K.T., Udvardi, A.J., Horowitz, J.M., (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J. Biol. Chem.* 269, 20674-20681.

Nakajima T., Kinoshita S., Sasagawa T., Sasaki K., Naruto M., Kishimoto T. and Akira S. (1993). Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 2207- 2211.

Nakamura, K., Zen, Y., Sato, Y., Kozaka, K., Matsui, O., Harada, K. , Nakanuma, Y., (2007). Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Human Pathology*, 38, 1532-1546,

Nerlov C, Ziff E. B., (1995). CCAAT/enhancer binding protein–alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability cooperate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J.*, 14, 4318-4328.

Nikolev D. B. and Burley S. K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 15-22.

Nogradi, A., (1998). The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol.*, 153, 1-4.

North, S., Espanel, X., Bantignies, F., Viollet, B., Vallet, V., Jalinot, P., Brun, G., and Gillet, G. (1999). Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene*, 18, 1945–1955.

Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D., (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10, 2657–83.

Ossipow, V., Descombes, P., Schibler, U. (1993). CCAAT/enhancerbinding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8219-8223.

Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.*, 55, 2752–2755.

Pascal, E., Tjian, R., (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 5, 1646–1656.

Pavletich, N. P., Pabo, C. O., (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1Å°. *Science*, 252, 809-817.

Pawar, S.A., Szentirmay, M.N., Hermeking, H., and Sawadogo, M. (2004). Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene*, 23, 6125–6135

Pedersen T. A., Kowenz-Leutz E., Leutz A., Nerlov C., (2001). Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev.*, 15, 3208-3216.

Pelham H. R. B. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp70* heat shock gene. *Cell*, 30, 517-528.

Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclindependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, 79, 181–184.

Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 4032–4043.

Prendergast, G. C., and Ziff, E. B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186–189

Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J., (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem.*, 272, 11205–11214

Raisanen, S. R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P. L., and Vaananen, H. K. (1999). Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB J.*, 13, 513 – 522.

Rangwala, S.M., Lazar, M.A. (2000). Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr*, 20, 535-559.

Ramji D. P., Vitelli A., Tronche F., Cortese R. And Ciliberto G. (1993). The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/ NF-IL6 and C/EBP/NF-IL6B are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucl. Acids Res.*, 21, 289-294.

Ramji, D. P., Foka, P., (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 365, 561-575.

Rhodes D. and Klug A. (1993). Zinc finger structure. *Scient. Am.*, 268, 32-39.

Robert-Pachot, M., Desbos, A., Moreira, A., Becchi, M., Tebib, J., Bonnin, M., Aitsiselmi, T., Bienvenu, J., Fabien, N., (2007a). Carbonic anhydrase III: A new target for autoantibodies in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 40, 380–389.

Robert-Pachot, M., Desbos, A., Moreira, A., Becchi, M., Tebib, J., Bonnin, M., Aitsiselmi, T., Bienvenu, J., Fabien, N., (2007b). A new target for autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci.*, 1108, 382–391.

Robertson, N., Potter, C., Harris, A.L., (2004). Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res*, 64, 6160–6165.

Roeder R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *TIBS*, 21, 327-334.

Roeder, R., G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* 579, 909–915.

Ross S. E., Erickson R. L., Hemati N., MacDougald O. A., (1999). Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol.*, 19, 8433-8441.

Ross S. E., Radomska H. S., Wu B., Zhang P., Winnay J. N., Bajnok L., Wright W. S., Schaufele F., Tenen D. G., MacDougald O. A., (2004). Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. *Mol Cell Biol.*, 24, 675-686.

Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G., Tjian, R., (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer binding protein Sp1. *Nature*, 397, 446-450.

Sanyal, G., Swenson, E. R., Pessah, N. I. And Maren, T. H., (1982). The carbon dioxide hydration activity of skeletal muscle carbonic anhydrase: inhibition by sulfonamides and anions. *Mol. Pharmacol.*, 22, 211-220.

Sawadogo, M., Van Dyke, M. W., Gregor, P. D., and Roeder, R. G. (1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 263, 11985–11993.

Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., Wang, G. L., (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.*, 269, 23757–23763.

Semenza, G. L., (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.*, 14, 1983–1991.

Semenza, G.L., (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 62-67.

Shiels, A., Jeffery, S., Phillips, I. R., Shephard, E. A., Wilson, C. A., Carter, N. D., (1983). Sexual differentiation of rat liver carbonic anhydrase III. *Biochim Biophys Acta.*, 760, 335–342

Shima, K., (1984). Human muscle carbonic anhydrase III (CA-III). Purification, immunohistochemical localization in the human skeletal muscle and its clinical application to the neuromuscular disease. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 59, 98–116

Sly, W. S., and Hu, P. Y., (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 5, 50-60.

Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). The “initiator” as a transcription control element. *Cell*, 57, 103–113.

Sowa, T., Menju, T., Chen, T., Takahashi, K., Nishikawa, S., Nakanishi, T., Shikuma, K., Motoyama, H., Hijiya, K., Aoyama, A., Sato, T., Sonobe, M., Harada, H., (2017). Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression. *Cancer Med.*, 6, 288–297.

Stanton, L. W., Ponte, P. A., Coleman, R. T., Snyder, M. A., (1991). Expression of CA III in rodent models of obesity. *Molecular endocrinology*, 5, 860–866.

Supuran, C.T., (2008). *Nat. Rev. Drug Disc.*, 7, 168.

Supuran, C. T., (2010). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 3467.

Supuran, C.T., Capasso, C., (2014). Targeting carbonic anhydrases, in: *Targeting Carbonic Anhydrases*, pp. 1–169.

Supran, C. T., De Simone, G., (2015). Carbonic anhydrases as biocatalysts: from theory to medical and industrial applications. *Amsterdam: Elsevier*.

Suske, G., (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 238, 291-300.

Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovičová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.*, 577, 439–445.

Taatjes, D., J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem. Sci.* 35, 315–322.

Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L., Admon, A., (1996). Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13611-13616.

Tashian, R. E., Hewett-Emmett D., ve Goodman, M., (1980). Evolutionary diversity in the structure and activity of carbonic anhydrase. *Protides of the Biological Fluids*, 28, 153-156

Thomas, J. A., Poland, B., and Honzatko, R. (1995). Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319,1–9.

Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D. W., (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.*, 11, 72–82.

Timchenko, N. A., Harris, T. E., Wilde, M., Bilyeu, T. A., BurgessBeusse, B. L., Finegold, M. J. (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol*, 17, 7353-7361.

Travers A. (1993). DNA-Protein interactions. *Chapman and Hall*, London.

Tweedie, S., Edwards, Y., (1989). Mouse carbonic anhydrase III: nucleotide sequence and expression studies. *Biochem. Genet.* 27, 17–30.

Tweedie, S., Morrison, K., Charlton, J., Edwards, Y., (1991). CAIII a marker for early myogenesis: expression studies in cultured myogenic cells. *Somatic Cell Mol. Genet.*, 17, 215–228.

Ullah, M. S., Davies, A. J., Halestrap, A. P., (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem.*, 281, 9030–9037.

Vaananen, H. K., Paloniemi, M., and Vuori, J. (1985). Purification and localization of human carbonic anhydrase. III. Typing of skeletal muscle fibers in paraffin embedded sections. *Histochemistry* 83, 231–235.

Vaananen, H. K., Takala, T., and Morris, D. C., (1986). Immunoelectron microscopic localization of carbonic anhydrase III in rat skeletal muscle. *Histochemistry*, 86, 175-179.

Venta, P. J., Montgomery, J. C., Tashian, R. E., (1987). Molecular genetics of carbonic anhydrase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.*, 14, 59-67.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304–51.

Wang G. L., Jiang B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L., (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci.*, 92, 5504–5510

Wang G. L., Iakova P., Wilde M., Awad S., Timchenko N. A., (2004). Liver tumors escape negative control of proliferation via PI3K/Akt-mediated block of C/EBP alpha growth inhibitory activity. *Genes Dev.*, 18, 912-925.

Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.*, 2, 1136–1143

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*,; 292, 727–730.

Whittington, D. A., Waheed, A., Ulmasov, B., (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9545–9550.

Wilson, B. G., ve Roberts, C. W., (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 481–492.

Wistrand, P., Carter, N., and Asmark, H., (1987). Induction of rat muscle carbonic anhydrase by denervation demonstrated with immunofluorescence. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86, 177-184.

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., Youle, R. J., (1997). Movements of bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.*, 139, 1281–1292.

Wood S. M., Ratcliffe P. J., O'Rourke J. F., Dachs G. U., Gleadle J. M., Maxwell P. H., Pugh C. W., Stratford I. J., (1997). Hypoxia Response Elements. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 9, 327-332.

Yeo, J. C., ve Ng, H.H. (2013). The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* 23, 20–32.

Yamanaka, R., Kim, G.D., Radomska, H.S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L.T., Antonson, P., (1997). CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6462-6467.

Zenke, M., Grunstrom, T., Mattes, H., Wintzerith, M., Schatz, C., Wildeman, A., Chambon, P., (1986). Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function. *EMBO J.* 5, 387–397.

Ziello, J. E., Jovin, I. S., Huang, Y., (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.*, 80, 51–60.

Zahnow, C. A., (2002). CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 4, 113-121.

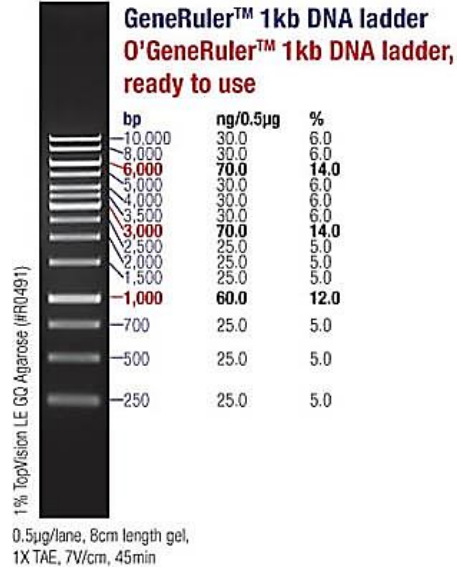
Zhang, F., Xu, X., Zhou, B., He, Z., Zhai, Q., (2011). Gene expression profile change and associated physiological and pathological effects in mouse liver induced by fasting and refeeding. *PLoS one.*, 6, e27553.

Zheng, A., Rahkila, P., Vuori, J., Rasi, S., Takala, T., and Väänänen, H. K. (1992). Quantification of carbonic anhydrase III and myoglobin in different fiber types of human psoas muscle. *Histochemistry*, 97, 77–81.

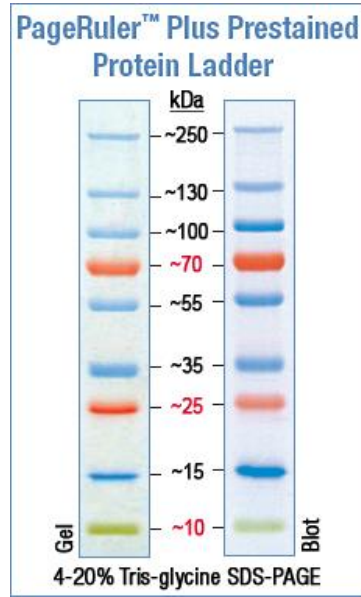
EKLER

7. EKLER

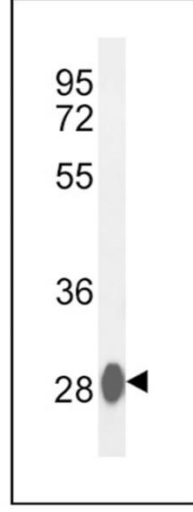
EK –A DNA Büyüklük Belirteçleri



Şekil A.7.1 : 1kb DNA Marker (Fermentas)



Şekil A.7.2 : Page Ruler Protein MArker 26620/Fermentas



CA3 Antibody WB using PA5-25977

Western blot analysis using a CA3 polyclonal antibody (Product # PA5-25977) in mouse liver tissue lysates (35ug per lane).

Şekil A.7.3 : İnsan Karbonik Anhidraz III (CAIII) Poliklonal antikorunun görüntüsü (Pierce Antibody)

EK-B CAIII cDNA Bilgileri

Homo sapiens carbonic anhydrase 3 (CA3), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_005181.3

LOCUS NM_005181 1753 bp mRNA linear PRI 02-OCT-2017

DEFINITION Homo sapiens carbonic anhydrase 3 (CA3), mRNA.

ACCESSION NM_005181

VERSION NM_005181.3

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Min HJ, Hong SC, Yang HS, Mun SK and Lee SY.

TITLE Expression of CAIII and Hsp70 Is Increased the Mucous Membrane of the Posterior Commissure in Laryngopharyngeal Reflux Disease

JOURNAL Yonsei Med. J. 57 (2), 469-474 (2016)

PUBMED [26847302](#)

REMARK GeneRIF: CAIII and Hsp70 expressions were higher in LPRD patients that in non-LPRD patients, suggesting the possibility as one of biomarker in LPRD diagnosis.

REFERENCE 2 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Iizumi K, Kimura U, Ogawa H, Takamori K and Yamakura F.

TITLE Importance of tryptophan nitration of carbonic anhydrase III for the morbidity of atopic dermatitis

JOURNAL Free Radic. Biol. Med. 73, 75-83 (2014)

PUBMED [24838180](#)

REMARK GeneRIF: this study detected the formation and colocalization of 6-nitrotryptophan-containing proteins and CAIII in the skin of atopic dermatitis patients, not only in the lesional part but also in the nonlesional part, through histochemical analyses

REFERENCE 3 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Evans DM, Zhu G, Dy V, Heath AC, Madden PA, Kemp JP, McMahon G, St Pourcain B, Timpson NJ, Golding J, Lawlor DA, Steer C, Montgomery GW, Martin NG, Smith GD and Whitfield JB.

TITLE Genome-wide association study identifies loci affecting blood copper, selenium and zinc

JOURNAL Hum. Mol. Genet. 22 (19), 3998-4006 (2013)

PUBMED [23720494](#)

REFERENCE 4 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Saito R, Watanabe H, Asano T, Suzuki E, Iwadata H, Kobayashi H and Ohira H.

TITLE Anti-carbonic anhydrase III autoantibodies in vasculitis syndrome

JOURNAL Int J Rheum Dis 16 (3), 339-346 (2013)

PUBMED [23981757](#)

REMARK GeneRIF: Report that anti-CAIII antibodies may be useful for

diagnosing microscopic polyangiitis.

REFERENCE 5 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Liu C, Wei Y, Wang J, Pi L, Huang J and Wang P.

TITLE Carbonic anhydrases III and IV autoantibodies in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, diabetes, hypertensive renal disease, and heart failure

JOURNAL Clin. Dev. Immunol. 2012, 354594 (2012)

PUBMED [23049597](#)

REMARK GeneRIF: The generation of CA III and IV autoantibodies, antioxidant enzymes, and cytokines might influence each other.

REFERENCE 6 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Oikarinen A, Vuori J, Autio P, Annala AP, Palatsi R, Kiistala U and Vaananen K.

TITLE Comparison of muscle-derived serum carbonic anhydrase III and myoglobin in dermatological patients: effects of isotretinoin treatment

JOURNAL Acta Derm. Venereol. 72 (5), 352-354 (1992)

PUBMED [1361281](#)

REFERENCE 7 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Oguni M, Setogawa T, Tanaka O, Shinohara H and Kato K.

TITLE Immunohistochemical study of carbonic anhydrase III in the extraocular muscles of human embryos

JOURNAL Acta Anat (Basel) 144 (4), 316-319 (1992)

PUBMED [1414196](#)

REFERENCE 8 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Vuori J, Rasi S, Takala T and Vaananen K.

TITLE Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of myoglobin and carbonic anhydrase III in serum

JOURNAL Clin. Chem. 37 (12), 2087-2092 (1991)

PUBMED [1764784](#)

REFERENCE 9 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Shamsutdinov,N.Sh., Islamov,R.I. and Valuillin,V.V.

TITLE [Carbonic anhydrase III--a marker of the myoepithelial cells of human salivary glands]

JOURNAL Biull Eksp Biol Med 111 (3), 320-321 (1991)

PUBMED [1905166](#)

REFERENCE 10 (bases 1 to 1753)

AUTHORS Carter,N., Jeffery,S., Shiels,A., Edwards,Y., Tipler,T. and Hopkinson,D.A.

TITLE Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle

JOURNAL Biochem. Genet. 17 (9-10), 837-854 (1979)

PUBMED [120192](#)

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [DA421884.1](#), [AK313254.1](#) and [AC084734.4](#).

On Oct 4, 2008 this sequence version replaced gi:[6996001](#).

Summary: Carbonic anhydrase III (CAIII) is a member of a multigene family (at least six separate genes are known) that encodes

carbonic anhydrase isozymes. These carbonic anhydrases are a class of metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide and are differentially expressed in a number of cell types. The expression of the CA3 gene is strictly tissue specific and present at high levels in skeletal muscle and much lower levels in cardiac and smooth muscle. A proportion of carriers of Duchenne muscle dystrophy have a higher CA3 level than normal. The gene spans 10.3 kb and contains seven exons and six introns. [provided by RefSeq, Oct 2008].

Sequence Note: This RefSeq record was created from transcript and genomic sequence data because no single transcript was available for the full length of the gene. The extent of this transcript is supported by transcript alignments.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Gene record to access additional publications.

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: AK096880.1, EU794596.1

[ECO:0000332]

RNAseq introns :: single sample supports all introns
 SAMEA1965299, SAMEA1968189
 [ECO:0000348]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: full length.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-74	DA421884.1	1-74	
	75-866	AK313254.1	44-835	
	867-1753	AC084734.4	82873-83759	c

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1753
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="8"
 /map="8q21.2"

gene 1..1753
 /gene="CA3"
 /gene_synonym="CAIII; Car3"
 /note="carbonic anhydrase 3"
 /db_xref="GeneID:761"
 /db_xref="HGNC:HGNC:1374"
 /db_xref="MIM:114750"

exon 1..117
 /gene="CA3"
 /gene_synonym="CAIII; Car3"
 /inference="alignment:Splign:1.39.8"

CDS 84..866
 /gene="CA3"

```

/gene_synonym="CAIII; Car3"
/EC_number="4.2.1.1"
/note="CA-III; carbonate dehydratase III; HEL-S-167mP;
epididymis secretory sperm binding protein Li 167mP;
carbonic anhydrase III, muscle specific"
/codon_start=1
/product="carbonic anhydrase 3"
/protein_id="NP_005172.1"
/db_xref="CCDS:CCDS6238.1"
/db_xref="GeneID:761"
/db_xref="HGNC:HGNC:1374"
/db_xref="MIM:114750"

/translation="MAKEWGYASHNGPDHWHELFPNAKGENQSPVELHTKDIRHDPSL
QPWSVSYDGGSAKTILNNGKTCRVVFDPTYDRSMLRGGPLPGPYRLRQFHLHWGSSDD
HGSEHTVDGVKYAAELHLVHWNPKYNTFKEALKQRDGIIVIGIFLKGHENGEFQIFL
DALDKIKTKGKEAPFTKFDPSCLFPACRDYWTYQGSFTTPPCEECIVWLLLKEPMTVS
SDQMAKLRSLSSAENEPVPLVSNWRPPQPINNRVVRASFK"
misc feature 87..89
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="N-acetylalanine. {ECO:0000250|UniProtKB:P07450};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
acetylation site"
misc feature 168..170
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
misc feature 210..212
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
misc feature 225..227
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};

```

propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 231..233
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 246..248
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 273..284
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
Region: Involved in proton transfer"
[misc feature](#) 300..302
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphothreonine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 363..365
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/note="zinc (catalytic); metal-binding site"
[misc feature](#) 369..371
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/note="zinc (catalytic); metal-binding site"
[misc feature](#) 438..440
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/note="zinc (catalytic); metal-binding site"
[misc feature](#) 462..464
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphotyrosine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};

propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 468..470
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphothreonine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 609..611
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphothreonine. {ECO:0000250|UniProtKB:P16015};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 627..629
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="S-glutathionyl cysteine. {ECO:0000250}; propagated
from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3); modified site"
[misc feature](#) 642..644
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="S-glutathionyl cysteine. {ECO:0000250}; propagated
from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3); modified site"
[misc feature](#) 675..680
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
Region: Substrate binding.
{ECO:0000250|UniProtKB:P00918}"
[misc feature](#) 729..731
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphothreonine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
[misc feature](#) 738..740
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"

```

/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Phosphoserine. {ECO:0000250|UniProtKB:P14141};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07451.3);
phosphorylation site"
exon 118..315
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon 316..434
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon 435..527
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon 528..590
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon 591..746
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
STS 662..864
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/standard_name="D8S1367E"
/db_xref="UniSTS:151181"
exon 747..1753
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
STS 894..1206
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/standard_name="G60292"
/db_xref="UniSTS:137397"
STS 910..1135
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/standard_name="SHGC-35614"
/db_xref="UniSTS:51872"
STS 1480..1659
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
/standard_name="G54016"
/db_xref="UniSTS:109398"
STS 1631..1731
/gene="CA3"

```

```

/gene_synonym="CAIII; Car3"
/standard_name="WI-16407"
/db_xref="UniSTS:59232"
regulatory 1733..1738
/regulatory_class="polyA_signal_sequence"
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"
polyA site 1753
/gene="CA3"
/gene_synonym="CAIII; Car3"

```

ORIGIN

```

1 acataaaagc gcgggctcgc ggcgactctg caccacgcag ggggaagagaa agcaggagcc
61 gtccagcacg gaggaaggcg accatggcca aggagtgggg ctacgccagt cacaacggtc
121 ctgaccactg gcatgaactt ttcccaaatg ccaaggggga aaaccagtcg cccgttgagc
181 tgcatactaa agacatcagg catgaccctt ctctgcagcc atggtctgtg tcttatgatg
241 gtggctctgc caagaccatc ctgaataatg ggaagacctg ccgagtgtga tttgatgata
301 cttatgatag gtcaatgctg agagggggtc ctctccctgg accctaccga cttcgccagt
361 ttcatcttca ctggggctct tcgggatgac atggctctga gcacaccgtg gatggagtca
421 agtatgcagc ggagcttcat ttggttctact ggaacccgaa gtataaact tttaaagaag
481 ccctgaagca gcgcgatggg atcgctgtga ttggcatttt tctgaagata ggacatgaga
541 atggcgagtt ccagattttc cttgatgcat tggacaagat taagacaaag ggcaaggagg
601 cgcccttcac aaagtttgac ccacctctgc tgttcccggc atgccgggac tactggacct
661 accagggtc attcaccacg ccgcctctgc agaatgcat tgtgtggctg ctgctgaagg
721 agcccatgac cgtgagctct gaccagatgg ccaagctgcg gagcctcctc tccagtgtg
781 agaacgagcc cccagtgcct cttgtgagca actggcgacc tccacagcct atcaataaca
841 ggggtgtgag agcttccttc aatgaggct gctggatctt gccctcttca ggaaggaa
901 cctaccattg gagagcttgg ttccttgcct ccttctggtg ctccttactc caagtctatt
961 tcatttttcc aactgagca atgaatgtga gagatgtggt caccaagatc taagttactt
1021 gttgaaagaa agttacttcc gacaagatct aatatgaaag catagatttc acatttgatc
1081 tctgtaataa tcatctttcc tataaaagta gcatttttgg taaagtttca aagaagaaga
1141 aacagagatg gaagagtaaa gatattttta aaatggctag ctattgggca ccagttttcc
1201 tgttatctaa aatttcacac aacttcattg tttttatttt tatattatga gttgtccatc
1261 ttaaagaaat atgagtaatt ctacatgtag tagagggtga tgaagatcat ataacaatta
1321 aacataagcc agaaattaaa atgactatag acagcaagaa ttgagctaata aatatgtttt
1381 aactcttaac accagcaaga agtcagtcatt ttattgaagt tttagctact aagattactt
1441 ggttttgatt accagtgaaa agaaaacaca atacaatcag gagttttcaa atttttgatt
1501 cagtatttga atttcttctt cataaatgta gttgaattta tcctagtatt tttctttacc
1561 tgaaggaggg ccatttattt ttaatttcac tacatttttc tttgcatgat tattaaaata
1621 aaaactgcct ctggttggtt tctcactgga ggctggaatg aatgatcact agaacacaaa
1681 agagtgaatg atgacacttg aagtcaaagc agttgtactg atcaccagaa ccaataaaga
1741 cataaatgga aaa

```

EK-C MATINSPECTOR PROGRAMIN ANALIZI

Matrix Family	Detailed Family Information	Start	End	Strand	Sequence
V\$EV11	EV11-myleoid transforming protein	-935	-919	-	aagatacaatgaGAGAt
V\$DMRT	DM domain-containing transcription factors	-934	-914	-	tctccaagaTACAatgagaga
V\$NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	-926	-912	+	tgtatcttGGAGagc
V\$HAML	Human acute myelogenous leukemia factors	-914	-900	-	acctGTGGtcttgct
V\$ZF06	C2H2 zinc finger transcription factors 6	-912	-900	+	caaGACCacaggt
V\$GRHL	Grainyhead-like transcription factors	-908	-896	+	accacaGGTTta
V\$ABDB	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	-904	-888	-	atattctTAAAacctg
V\$CEBP	Ccaat/Enhancer Binding Protein	-902	-888	+	ggttttaaGAAAtat
V\$AP1R	MAF and AP1 related factors	-896	-876	-	ataaaaTGAGtcatatttctt
V\$RORA	v-ERB and RAR-related orphan receptor alpha	-897	-875	-	cataaaatgaGTCAtatttctta
V\$AP1F	AP1, Activating protein 1	-891	-879	+	atatgACTCattt
V\$AP1F	AP1, Activating protein 1	-891	-879	-	aatgAGTCat
V\$AP1R	MAF and AP1 related factors	-894	-874	+	gaaataTGACtcatattttagt
V\$ABDB	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	-885	-869	-	cactaacaTAAAatgag
V\$PARF	PAR/bZIP family	-884	-868	+	tcattttatGTTAgtgg
V\$ZF10	C2H2 zinc finger transcription factors 10	-877	-863	+	atgTTAGtgccctc
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-874	-850	-	ttctGAAGtattggaagccactaa
V\$HEAT	Heat shock factors	-865	-841	+	ttccaacttcAGAAatattcttga
V\$ARID	AT rich interactive domain factor	-862	-842	-	caagaATATtctgaagtattg
V\$ARID	AT rich interactive domain factor	-855	-835	+	tcagaATATtcttgattttc
V\$HEAT	Heat shock factors	-856	-832	-	catgaaaaatcaAGAAatattctgaa
V\$HEAT	Heat shock factors	-855	-831	+	tcagaatattcttgattTTCAtga
V\$HNF6	Onecut homeodomain factor HNF6	-849	-833	-	atgaaaaaTCAAgata
V\$HOXC	HOX - PBX complexes	-847	-831	+	ttctTGATttttcatga
V\$HEAT	Heat shock factors	-845	-821	+	cttgattttcaTGAAcagaggtac
V\$STEM	Motif composed of binding sites for pluripotency or stem cell factors	-842	-824	-	cctctgtTCATgaaaaatc
V\$BNCF	Basonuclein rDNA transcription factor (Poll)	-836	-818	-	gctgtacctcTGTTcatga
V\$PAX6	PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	-831	-813	+	aacagaggtACAGctcagg
V\$PLZF	C2H2 zinc finger protein PLZF	-826	-812	+	aggTACAgctcaggg
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-829	-807	+	caGAGGtacagctcaggaggagt
V\$HOXC	HOX - PBX complexes	-809	-793	-	ggactGATTtagccaca
V\$AP1R	MAF and AP1 related factors	-809	-789	+	tgtgGCTAaatcagctcccagt
V\$GF11	Growth factor independence transcriptional repressor	-804	-790	+	ctaAATCagctcccag
V\$EBOX	E-box binding factors	-783	-771	+	gctccgCGTGaac
V\$HESF	Vertebrate homologues of	-784	-770	-	ggttcaCGCGgagct

	enhancer of split complex				
V\$HESF	Vertebrate homologues of enhancer of split complex	-783	-769	+	gctccgCGTgaacct
V\$SMAD	Vertebrate SMAD family of transcription factors	-765	-755	-	gatGTCTggat
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-761	-743	-	agatATCCaggagatgtct
V\$NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	-758	-744	+	catctcctGGATatc
V\$NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	-758	-744	-	gatatccaGGAGatg
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-759	-741	+	acatCTCCtggatatctgg
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-729	-705	-	gcttgaggaaaccGAGGgctggat
V\$ZFX	Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors	-722	-710	+	cctcgGTTTctcg
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-721	-703	-	tggcttgcaGGAaaccgag
V\$BTBF	BTB/POZ (broad complex, TramTrack, Bric-a-brac/pox viruses and zinc fingers) transcription factor	-716	-706	+	tttcCTGCaag
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-719	-701	+	cggttctctGCAAgccaaa
O\$MTEN	Core promoter motif ten elements	-704	-684	-	ccaacctAGCGgatcctttg
V\$OVOL	OVO homolog-like transcription factors	-699	-685	+	ggatccGCTAaggttg
V\$CEBP	Ccaat/Enhancer Binding Protein	-691	-677	+	taggttgGAAAtgc
V\$RBPJ	RBPJ - kappa	-690	-678	+	aggTGGGaaatg
V\$IKRS	Ikaros zinc finger family	-689	-677	+	ggttGGGAaatgc
V\$PARF	PAR/bZIP family	-691	-675	-	cggcTTTCcaaccta
V\$NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	-687	-673	-	ggcgcatTTCCcaa
V\$NFKB	Nuclear factor kappa B/c-rel	-687	-673	+	ttGGGAaatgcccc
V\$CTCF	CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	-685	-659	-	ctggaatcgaccaggCGGCatttccc
V\$BCL6	POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	-669	-653	-	cccttcTGGAatcgca
V\$HEAT	Heat shock factors	-673	-649	-	atggcccttctGGAAtcgcaccag
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-670	-652	-	gcccttctGGAAtcgcac
V\$HEAT	Heat shock factors	-672	-648	+	tggtgcgattccAGAAaggccatc
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-668	-650	+	gcgattccaGAAaggcca
V\$SRFF	Serum response element binding factor	-666	-648	+	gattcCAGAaaggccatc
V\$HAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	-659	-639	-	ccttaagagaTGGCcttctc
V\$YYIF	Activator/repressor binding to transcription initiation site	-657	-637	+	aaggCCATctcttaagat
V\$GATA	GATA binding factors	-643	-631	+	taagGATAacgga
V\$OVOL	OVO homolog-like transcription factors	-642	-628	-	aagtccGTTAtcctt
V\$MYBL	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	-640	-626	+	ggatAACGgacttg
V\$HNFP	Histone nuclear factor P	-636	-624	+	aaCGGActtggag
V\$DICE	Downstream Immunoglobulin Control Element, critical for B cell activity and specificity	-624	-610	+	gggcCTCTcacct

V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-620	-596	-	cggaGCAGggtgagagggtgaagag
V\$MOKF	Mouse Krueppel like factor	-606	-586	+	accctgctccggaCCCTttct
V\$KLFS	Krueppel like transcription factors	-584	-568	-	taggagcAAAGgatggg
V\$NR2F	Nuclear receptor subfamily 2 factors	-588	-564	-	atcctaggagCAAAGgatgggaaga
V\$LEFF	LEF1/TCF	-583	-567	-	ctaggagCAAAGgatgg
O\$VTBP	Vertebrate TATA binding protein factor	-571	-555	-	acatgTAAAatcctagg
V\$OCT1	Octamer binding protein	-568	-554	-	aaCATGtaaaatcct
V\$IRXF	Iroquois homeobox transcription factors	-564	-552	-	gcaaCATGtaaaa
V\$IRXF	Iroquois homeobox transcription factors	-563	-551	+	ttaCATGttgcc
V\$MYT1	MYT1 C2HC zinc finger protein	-541	-529	-	cctAAGTtgact
V\$GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	-536	-522	-	cctgcCCCCtaagtt
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-537	-515	-	ttgttcctgCCCCtaagttt
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-533	-517	+	ttaggGGGCaggcaaac
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-532	-510	+	taGGGGgcaggcaacaacagag
V\$FKHD	Fork head domain factors	-527	-511	+	ggcagcAAACaacga
V\$HOMF	Homeodomain transcription factors	-524	-506	+	aggcaaacAAACgagttct
V\$HZIP	Homeodomain-leucine zipper transcription factors	-519	-505	-	aagaaCTCGttgtt
V\$SORY	SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	-523	-499	+	ggcaaACAaAcgagttcttccage
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-510	-494	-	cagaGGCTggaagaac
V\$GRHL	Grainyhead-like transcription factors	-495	-483	-	cgatccGGTTaca
V\$MEF3	MEF3 binding sites	-495	-483	-	cgaTCCGgttaca
V\$ETSF	Human and murine ETS1 factors	-496	-476	+	ctgtaacCGGAtcgtagagc
V\$PAX5	PAX-2/5/8 binding sites	-492	-464	+	aaccggtatcgtagAGCGaataaactcg
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-484	-468	+	cgtagagcGAAAtaaa
V\$ARID	AT rich interactive domain factor	-482	-462	-	tgcgagTTTAttcgtctag
V\$CDXF	Vertebrate caudal related homeodomain protein	-479	-461	-	gtcgagfTTATtcgctc
V\$GZF1	GDNF-inducible zinc finger gene 1	-474	-462	-	TGCGagtttattt
V\$RUSH	SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif	-463	-453	-	ggacACTTgtg
V\$NR2F	Nuclear receptor subfamily 2 factors	-463	-439	+	cacaagtgccagaGATCgtagcca
V\$GATA	GATA binding factors	-453	-441	+	cagAGATcgtagc
V\$IRFF	Interferon regulatory factors	-455	-435	+	tccaGAGAtcgtagccagaca
V\$SMAD	Vertebrate SMAD family of transcription factors	-443	-433	-	gctGTCTggct
V\$MYT1	MYT1 C2HC zinc finger protein	-420	-408	-	taaAAGTtgcttc
V\$HOMF	Homeodomain transcription factors	-420	-402	+	gaagcaactTTAAgtgag
V\$HBOX	Homeobox transcription factors	-419	-401	+	aagcaactTTTAagtgagg
V\$HOMF	Homeodomain transcription factors	-416	-398	+	caactTTAAgtgaggctg

V\$HOMF	Homeodomain transcription factors	-415	-397	-	gcagcctcacTTAAaagtt
V\$NKXH	NKX homeodomain factors	-414	-396	+	acttttaAGTGaggctgca
V\$DMTF	Cyclin D binding myb-like transcription factor	-390	-378	+	cgccgGGATgtag
V\$FAST	FAST-1 SMAD interacting proteins	-387	-371	+	cgggaTGTAgttttag
V\$GATA	GATA binding factors	-382	-370	+	tgtAGATtttagt
V\$GREF	Glucocorticoid responsive and related elements	-362	-344	-	ggtgtcgtagtGTGCttg
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-353	-337	-	gggacagGGTGtcgtag
V\$GREF	Glucocorticoid responsive and related elements	-353	-335	-	cagGGACagggtgtcgtag
V\$GREF	Glucocorticoid responsive and related elements	-353	-335	+	ctacgacaccTGTcctg
V\$BNCF	Basonuclein rDNA transcription factor (Poll)	-352	-334	+	tacgacaccTGTcctgc
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-350	-328	-	gtGGGGgcaggacagggtgtcg
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-343	-327	-	ggtggGGGCagggacag
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-346	-322	-	gatgggtgggggcaGGGAcagggt
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-344	-322	+	cctgtccctgcCCCaccctc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-340	-324	-	tgggtggGGCaggga
V\$MTF1	Metal induced transcription factor	-339	-325	+	ccctGCCcccacccc
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-342	-320	+	tgtccctgccCCAcccacccc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-338	-322	-	gatggggTGGGggcagg
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-336	-324	-	tgggtGGGGgca
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-337	-321	-	ggatggGGTGggggcag
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-336	-320	-	gggatgGGGTgggggca
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-338	-316	+	cctgccCCAcccacccc
V\$ZF05	C2H2 zinc finger transcription factors 5	-334	-320	-	gggatgGGGTggggg
V\$RREB	Ras-responsive element binding protein	-333	-319	+	cCCCaccatcccc
V\$STAT	Signal transducer and activator of transcription	-327	-309	+	cccaTCCCaagaatgcat
V\$ETSF	Human and murine ETS1 factors	-313	-293	+	tgcattgaGGAaggagagagg
V\$NR2F	Nuclear receptor subfamily 2 factors	-308	-284	+	ggaggaAGGAgagaggacaggtga
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-304	-280	+	gaaggagagagacgAGGTgagggc
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-294	-282	+	ggacGAGGtgagg
V\$CREB	cAMP-responsive element binding proteins	-273	-253	-	cggcgccgACGTgcagaaatg
V\$HIF1	Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	-270	-254	-	ggcgccgaCGTGcagaa
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-268	-252	+	ctgcACGTcggcgccgg
V\$E2F1	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-266	-250	-	aaccgGCGCcgactg
V\$E2F2	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-263	-247	+	cgctcgGCGCcggttaga
V\$GRHL	Grainyhead-like transcription factors	-259	-247	+	ggcgccGGTTaga
V\$MYBL	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	-260	-246	-	ttcTAACcggcgccg

O\$TF3C	General transcription factor IIIC, GTF3C	-253	-243	+	GGTTagaaacc
V\$EVII	EVII-myleoid transforming protein	-230	-214	+	gagagAAGAagaggaga
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-225	-201	+	aagaagaggagatgGAGGggccagg
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-215	-203	+	gatggaGGGGcca
V\$NOLF	Neuron-specific olfactory factor	-200	-178	-	gcgctcTCCCgggagtcgtgct
V\$NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	-195	-181	-	ctCTCCcgggagtcg
V\$NGRE	"Negative" glucocorticoid response elements	-194	-180	+	gaCTCCcgggagagc
V\$NOLF	Neuron-specific olfactory factor	-197	-175	+	cacgacTCCCgggagagcgcagg
V\$MTF1	Metal induced transcription factor	-188	-174	-	ccctGCGCtctcccg
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-181	-165	+	gcgcagGGAGgggcgtg
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-178	-166	+	caggGAGGggcgt
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-179	-163	+	gcaggagGGGCgtggg
V\$KLFS	Krueppel like transcription factors	-177	-161	+	agggaGGGcgtgggtg
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-176	-160	+	gggaGGGGcgtgggtgc
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-179	-157	-	ggggcaCCCACcccctccctgc
V\$AHRR	AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors	-179	-155	+	gcaggagggGCGTgggtgccctt
V\$HASF	HIF-1 ancillary sequence family	-172	-162	-	accCACGcccc
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-177	-155	-	aagggGCACccacgccccctct
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-173	-157	+	aggggcgTGGGtgcgcc
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-175	-153	-	cgaaggggcacCCACgccccctc
V\$HICF	Krueppel-like C2H2 zinc finger factors hypermethylated in cancer	-165	-153	+	gggTGCCccttcg
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-168	-146	+	cgtggGTGCcccttcgccacct
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-165	-141	-	ggcgGAGGtggcggaaggggcaccc
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-158	-136	+	ccttcgCCCAcctccgccccct
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-154	-138	-	ggggGCGGaggtggggg
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-155	-133	+	tcgccacctccgCCCCcgtcac
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-151	-135	-	gacgggGGCGgaggtgg
V\$KLFS	Krueppel like transcription factors	-150	-134	-	tgacgggGGCGgaggtg
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-152	-130	+	cccacctccgCCCCcgtcacctc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-148	-132	-	ggtgacggGGGCggagg
V\$INSM	Insulinoma associated factors	-146	-134	-	tgacGGGGcgga
V\$CREB	cAMP-responsive element binding proteins	-148	-128	-	tcgaggTGACggggcgagg
V\$CREB	cAMP-responsive element binding proteins	-145	-125	-	ctgtcaggTGACggggcggg
V\$BRAC	Brachyury gene, mesoderm developmental factor	-142	-122	-	cagctgtcgaGGTGacggggg
V\$MYO D	Myoblast determining factors	-133	-117	+	cctcgACAGctgtcccg
V\$MYO D	Myoblast determining factors	-132	-116	-	gcgggACAGctgtcgag
O\$XCPE	Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element	-124	-114	-	gaGCGGgacag

	for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters				
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-127	-111	-	caagAGCGggacagctg
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-125	-109	-	tccaagagcgGGACagc
V\$PAX5	PAX-2/5/8 binding sites	-129	-101	-	caatgaattccaagAGCGggacagctgctc
V\$BCL6	POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	-121	-105	-	gaaTTCCAagagcggga
V\$CLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	-113	-95	-	ggaagcCAATgaattccaa
V\$CAAT	CCAAT binding factors	-110	-96	-	gaagCCAATgaattc
V\$ETSF	Human and murine ETS1 factors	-107	-87	-	cgggtagAGGAagccaatgaa
V\$CTCF	CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	-104	-78	-	ttgggagccgggtagaGGAAgccaat
V\$RREB	Ras-responsive element binding protein	-83	-69	+	tCCCAaacaccaccc
V\$GLIF	GLI zinc finger family	-78	-64	+	aacaccaCCCCaatc
V\$GCMF	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	-76	-62	+	caccaCCCCaatcta
V\$HNF1	Hepatic Nuclear Factor 1	-69	-53	+	ccaatctaGTTTtagccc
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-61	-45	-	ggggcGGGGggctaaac
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-64	-42	+	ctagtttagcCCCCcgccccacc
V\$GLIF	GLI zinc finger family	-59	-45	+	ttagCCCCccgcccc
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-58	-46	-	gggaggGGGgcta
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	-59	-43	-	gtgggGCGGggggctaa
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-62	-40	+	agtttagccccCCGCcccaccct
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-58	-42	-	ggtggggCGGGgggcta
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-56	-44	-	tgggGCGGggggc
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-57	-41	-	gggtgGGGCggggggct
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-56	-40	-	aggggtgGCGGgggggc
V\$PLAG	Pleomorphic adenoma gene	-59	-37	-	gcGAGGgtggggcggggggctaa
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-59	-37	+	ttagcccccgCCCCaccctcgc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-54	-38	-	cgagggtgGGCggggg
V\$MAZF	Myc associated zinc fingers	-51	-39	-	gagggtGGGgagg
V\$SP1F	GC-Box factors SP1/GC	-52	-36	-	agcgagGGTgggcggg
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-51	-35	-	cagcgaGGGTggggcgg
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-49	-33	-	gtcagcgAGGTggggc
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-47	-31	-	aggtcagcgaGGGTggg
V\$RXRF	RXR heterodimer binding sites	-49	-25	-	cttattagtcagcGAGGtggggc
V\$RORA	v-ERB and RAR-related orphan receptor alpha	-45	-23	-	gccttattagGTCagcgagggtg
V\$CREB	cAMP-responsive element binding proteins	-42	-22	+	cctgcTGACctaataaggcc
V\$HOXF	Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	-39	-21	-	tggccTTATtagtcagc
V\$NR2F	Nuclear receptor subfamily 2	-42	-18	-	gcatggccttattaGGTCagcgagg

	factors				
V\$HBOX	Homeobox transcription factors	-38	-20	-	atggccTTATtaggtcagc
V\$LHXF	Lim homeodomain factors	-40	-18	+	tcgctgacctAATAagccatgc
V\$SRFF	Serum response element binding factor	-38	-20	-	atggccttaTAgGtcagc
V\$BRN5	Brn-5 POU domain factors	-39	-17	-	tgcattggccttATTAggtcagcg
V\$HBOX	Homeobox transcription factors	-37	-19	+	ctgaccTAATAagccatg
V\$LHXF	Lim homeodomain factors	-39	-17	-	tgcattggcctTATTtaggtcagcg
V\$SRFF	Serum response element binding factor	-37	-19	+	ctgacctaaTAAGccatg
V\$HOXF	Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	-36	-18	+	tgaccTAATAagccatgc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-18	-2	+	cagtgtgCGGGggagct
V\$INSM	Insulinoma associated factors	-15	-3	+	tgtgcGGGGgagc
V\$EGRF	EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	-16	0	+	gtgtgcGGGGagctac
O\$XCPE	Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	-12	-2	+	gcGGGGgagct
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-18	4	-	ttatgtagctCCCCcgcacactg
V\$KLFS	Krüppel like transcription factors	-14	2	+	gtgcgGGGGagctacat
V\$ZF02	C2H2 zinc finger transcription factors 2	-15	7	-	ctttatgtagctCCCCcgca
V\$PARF	PAR/bZIP family	-7	9	-	cgcttTTATgtagctcc
V\$LEFF	LEF1/TCF	-4	12	+	gctacatAAAAgcgcg
O\$VTBP	Vertebrate TATA binding protein factor	-3	13	+	ctacaTAAAagcgcg
V\$GZF1	GDNF-inducible zinc finger gene 1	-1	11	-	CGCGctttatgt
V\$E2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	2	18	+	taaaaGCCGCgggctcgc
V\$NRF1	Nuclear respiratory factor 1	3	19	-	cgCGAGCccgcgcttt
V\$NRF1	Nuclear respiratory factor 1	4	20	+	aaaGCCGCgggctcgcg
V\$HESF	Vertebrate homologues of enhancer of split complex	9	23	-	tcgccgcGAGCccgc
V\$PAX5	PAX-2/5/8 binding sites	8	36	-	gcgtggTGCAGagtcgccgcgagcccg
V\$EBOX	E-box binding factors	28	40	+	gcaCCACgcaggg
V\$NOLF	Neuron-specific olfactory factor	26	48	-	ttctctTCCCctgcgtggtgcag
V\$ETSF	Human and murine ETS1 factors	32	52	+	cacgcaggGAAAgagaagca
V\$ZF35	Zinc finger protein ZNF35	36	48	+	caggggAAGAgaa
V\$IRFF	Interferon regulatory factors	36	56	+	caggggaagaGAAAgcaggag
V\$PRDF	Positive regulatory domain I binding factor	40	58	+	ggaagaGAAAgcaggagcc
V\$BARB	Barbiturate-inducible element box from pro-eukaryotic genes	43	57	+	agagAAAGcaggagc
V\$GABF	GA-boxes	38	62	+	ggggaAGAGaaagcaggagccgtcc
V\$ETSF	Human and murine ETS1 factors	63	83	+	agcacggaGAAAgcgacat

