

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



**HİPOKSİK KOŞULLARDA FARKLI HÜCRE HATLARINDA VE *C.elegans*' DA  
KARBONİK ANHİDRAZ VII, KARBONİK ANHİDRAZ VII BENZERİ  
GENLERİN REGÜLASYONU**

**AYSU BOZKURT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU (Tez Danışmanı)  
Dr. Öğr. Üyesi Derya OKUYAN (Eş Danışman)  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR  
Prof. Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN

**BALIKESİR, TEMMUZ- 2023**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Hipoksik Koşullarda Farklı Hücre Hatlarında ve *C.elegans'* da Karbonik Anhidraz VII, Karbonik Anhidraz VII Benzeri Genlerin Regülasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Aysu BOZKURT**

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri Birimi BAP 2023/008 nolu proje ve TÜBİTAK 1002-A 123Z001 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### HIPOKSİK KOŞULLARDA FARKLI HÜCRE HATLARINDA VE *C.ELEGANS*' DA KARBONİK ANHİDRAZ VII, KARBONİK ANHİDRAZ VII BENZERİ GENLERİN REGÜLASYONU

#### YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYSU BOZKURT

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR.SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)

(EŞ DANIŞMAN: DR.ÖĞR.ÜYESİ DERYA OKUYAN)

BALIKESİR, TEMMUZ-2023

Karbonik anhidraz (CA)'lar karbondioksit hidrasyonunun ve dehidrasyonun tersine çevrilebilir bir reaksiyonunu katalize ederler böylece asit-baz ve iyon düzenlenmesini sağlayarak metabolik süreçlerde hayati bir rol oynarlar. CA ailesi üyesi olan CA VII kolon, karaciğer, iskelet kası ve beyinde ifade edilmektedir. Tümörlerde CA VII ekspresyonu, diğer izoformlara kıyasla çok daha düşüktür ve en yüksek ekspresyon kolorektal adenokarsinom, tiroid karsinomunda gözlenmektedir. Kanser hücreleri hızlı çoğalan doğaları gereği, ortamdaki besin ve oksijeni hızla tüketerek ortamı hipoksik hale getirir. Kanser hipoksik mikro çevresi çok sayıda genin regülasyonunda değişime sebep olabilen önemli bir yoldur. Bu çalışmada, CA VII geninin farklı kanser hücre hatlarında ifadesi ile hipoksik koşullardaki değişimi mRNA ve protein seviyesinde incelenmiştir. CoCl<sub>2</sub> ve sodyum sülfid ile kimyasal hipoksi modelinde çalışmalarımız sürdürülmüştür. Kolon kanseri hücre hatları (SW480 ve HT-29), sağlıklı insan endotel hücreleri (HUVEC), Karaciğer hücre hattı (Hep3B), prostat kanseri hücre hatlarında (PC3 ve LnCaP) CA VII geninin öncelikle ifadesi mRNA seviyesinde incelenmiş ve HUVEC hücre hattı dışında tüm hücre hatlarında mRNA seviyesinde ifadesi tespit edilmiştir. Çalışmamız kapsamında tüm sonuçlar değerlendirildiğinde hem mRNA hemde protein seviyesinde HT-29 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde CA VII seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Seçilen prostat kanseri modellerinden LnCap hücrelerinde de hem mRNA hem de protein seviyesinde CA VII seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın ikinci bir kolunda ise moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model organizma olan *C.elegans*' ta deneysel çalışmalar da planlanmıştır. Bu kapsamda *C.elegans*' ta CA VII benzeri genlerin (CAH 3, 4 ve 5) ifadesi ve hipoksik koşullardaki mRNA seviyesindeki değişimi incelenmiştir. Seçilen genlerin mRNA ifadesi *C.elegans*' ta gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** CA VII, kanser, hücre hattı, hipoksi, *C.elegans*, regülasyon

## ABSTRACT

**REGULATING OF CA VII, CA VII-LIKE GENE EXPRESSION IN DIFFERENT  
CELL LINES AND *C.ELEGANS*  
IN HYPOXIC CONDITIONS  
MASTER THESIS  
AYSU BOZKURT  
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**(SUPERVISOR: DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)  
(CO-SUPERVISOR: DR.ÖĞR.ÜYESİ DERYA OKUYAN)  
BALIKESİR, JULY- 2023**

Carbonic anhydrases (CAs), catalyze a reversible reaction of carbon dioxide hydration and dehydration, thus playing a vital role in metabolic processes by providing acid-base and ion regulation. CA VII is expressed in the colon, liver, skeletal muscle and brain. CA VII expression in tumors is much lower compared to other isoforms, with the highest expression observed in colorectal adenocarcinoma, thyroid carcinoma. In colorectal adenocarcinoma, CA VII upregulation is thought to serve as a marker for poor prognosis. Cancer cells, due to their rapidly proliferating nature, rapidly consume the nutrients and oxygen in the environment, making their microenvironment more hypoxic. Hypoxic microenvironment is an important pathway that can cause changes in the regulation of many genes in cancer. In this study, the expression of CA VII gene in different cancer cell lines and its changes in hypoxic conditions were investigated at the mRNA and protein levels. Our studies continued in the Chemical hypoxia model with CoCl<sub>2</sub> and sodium sulfide. The expression of CA VII gene in colon cancer cell lines (SW480 and HT-29), healthy human endothelial cells (HUVEC), Liver cell line (Hep3B), prostate cancer cell lines (PC3 and LnCaP) was primarily examined at the mRNA level. CA VII mRNA level was detected in all cell lines except HUVEC cell line. When all the results were evaluated within the scope of our study, it was determined that both mRNA and protein levels decreased statistically significantly in the HT-29 cell line. It was determined that CA VII level increased in both mRNA and protein levels in LnCap cells, which is one of the selected prostate cancer models. In a second arm of our study, experimental studies were also planned in *C.elegans*, which is a good model organism in molecular studies. In this context, the expression of CA VII-like genes (CAH 3, 4 and 5) and the change in mRNA level under hypoxic conditions in *C.elegans* were studied. mRNA expression of selected genes is shown in *C.elegans*.

**KEYWORDS:** CA VII, cancer, cell lines, hypoxia, *C.elegans*, regulation

Science Code / Codes : 20326, 20610

Page Number : 79

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Karbonik Anhidraz Genleri ve Özellikleri.....	2
1.1.1 Sitozolik Karbonik Anhidrazlar .....	2
1.1.2 Salgılanan Karbonik Anhidrazlar.....	3
1.1.3 Mitokondriyal Karbonik Anhidrazlar .....	3
1.1.4 Memrana Bağlı Karbonik Anhidrazlar .....	3
1.2 Karbonik Anhidrazlar ve Kanser .....	5
1.3 Karbonik Anhidraz VII (CA VII) .....	7
1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> ve CA VII Benzeri Genler .....	10
1.4.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> Hakkında Temel Bilgiler .....	10
1.4.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> ve Kanser .....	12
1.4.3 <i>C.elegans</i> ve hCA VII Benzeri Genler.....	13
1.5 Hipoksi ve Kanser.....	13
1.5.1 Hipoksi ve Karbonik Anhidrazlar .....	14
1.5.2 Kimyasal Hipoksi.....	15
1.6 Amaç .....	17
<b>2. MATERYAL VE METHOT.....</b>	<b>19</b>
2.1 Materyal .....	19
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	19
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Canlılar .....	20
2.2 Metot.....	20
2.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu ve Temizliği .....	20
2.2.2 Hücre Kültürü Teknikleri.....	21
2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı .....	21
2.2.2.1.1 FCS Hazırlanması.....	21
2.2.2.1.2 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması .....	21
2.2.2.1.3 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması .....	21
2.2.2.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları ile Yapılan İşlemler.....	21
2.2.3 mRNA ile İlgili Teknikler.....	22
2.2.3.1 Hücrelerden RNA İzolasyonu .....	22
2.2.3.2 RNA Miktar Tayini .....	22
2.2.3.3 RNA Formaldehid Jel Elektroforezi.....	22
2.2.3.4 cDNA Sentezi.....	23

2.2.3.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA Kontrolü .....	23
2.2.3.6	Agaroz Jel Elektroforezi .....	23
2.2.3.7	Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR) .....	23
2.2.4	Protein Tabanlı Teknikler .....	25
2.2.4.1	Western Blot .....	25
2.2.4.1.1.1	Deneyin Kurulması ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması .....	25
2.2.4.1.1.2	Protein Miktarlarının Belirlenmesi .....	26
2.2.4.1.1.3	SDS-PAGE .....	26
2.2.4.1.1.4	SDS Jelin Blotlanması .....	28
2.2.4.1.1.5	Bloklama .....	28
2.2.4.1.1.6	Memrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi .....	29
2.2.4.2	İmmünofloresans Boyama .....	29
2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i> ile İlgili Teknikler .....	30
2.3.1	Nematod Besiyeri (NGM) Hazırlanması .....	30
2.3.2	<i>E. coli</i> 'nin OP50 Suşu İçin TBX Agar Hazırlanması .....	30
2.3.3	<i>E. coli</i> OP50 Suşunun Hazırlanması .....	30
2.3.4	Hipoksik Ortam Oluşturulması .....	30
2.3.5	<i>Caenorhabditis elegans</i> 'lerden Total RNA İzolasyonu .....	31
2.3.6	Real-Time PZR Analizi .....	31
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>33</b>
3.1	Biyoinformatik Analizler .....	33
3.1.1	İnsan CA VII Geni Analizleri .....	33
3.1.2	<i>C.elegans</i> CA VII Benzeri Genlerin Analizleri .....	34
3.2	İnsan CA VII Geni mRNA Analizleri .....	34
3.2.1	Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu .....	34
3.2.2	Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	36
3.2.2.1	Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	36
3.2.2.2	SW480 ve HT-29 Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	38
3.2.3	Karaciğer Kanseri Hücre (Hep3B) Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	40
3.2.3.1	Hep3B Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	40
3.2.3.2	Hep3B Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	41
3.2.4	İnsan Sağlıklı Endotel Hücre Hattında (HUVEC) Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	42
3.2.4.1	HUVEC Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	42
3.2.5	Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	44
3.2.5.1	Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	44

3.2.5.2 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi .....	47
3.3 İnsan CA VII Geni Protein Analizleri .....	48
3.4 Çalışmada Kullanılan Tüm Hücre Hatlarında CA VII Geni Protein Analizleri (Western Blot/IFC).....	49
3.5 <i>C.elegans</i> CA VII Benzeri Genlerin mRNA Analizleri.....	55
3.5.1 Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu.....	55
3.5.2 <i>C.elegans</i> 'ta Hipoksik Modelde CA VII Benzeri Genlerin mRNA Analizleri.....	57
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
<b>5. KAYNAKLAR (APA) .....</b>	<b>63</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>69</b>
EK A: Kullanılan Markerlar .....	70
EK B: Biyoinformatik Analizler .....	71
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>79</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Karbonik anhidrazların fonksiyonu. ....	1
Şekil 1.2: CA VII'nin kromozomal lokalizasyonu (Gilbert vd., 1999).....	7
Şekil 2.1: Protein ölçümlerinde kullanılan bradford eğrisi. ....	26
Şekil 3.1: CA VII geni ekzonları. ....	33
Şekil 3.2: Farklı hücre hatlarında CA VII ifadesi. ....	35
Şekil 3.3: A: SW480, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz. ....	37
Şekil 3.4: A: HT29, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz. ....	38
Şekil 3.5: SW480 hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$ mRNA seviyesi. ....	39
Şekil 3.6: HT29 hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$ mRNA seviyesi. ....	39
Şekil 3.7: A: Hep3B, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz. ....	41
Şekil 3.8: Hep3B hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$ mRNA seviyesi. ....	42
Şekil 3.9: HUVEC, H $\beta$ 2 PZR agaroz jel görüntüsü. ....	43
Şekil 3.10: HUVEC, CA VII PZR agaroz jel görüntüsü. ....	44
Şekil 3.11: A: PC3, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz. ....	45
Şekil 3.12: A: LnCaP, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz. ....	46
Şekil 3.13: A: PC3, CA VII mRNA ifadesi, B: PC3, Hif1- $\alpha$ mRNA ifadesi, C: LnCaP, CA VII mRNA ifadesi, D: LnCaP Hif1- $\alpha$ mRNA ifadesi. ....	47
Şekil 3.14: Farklı hücre hatlarında CA VII'nin protein ifadesi (1: SW480 kolon kanseri hücre hattı, 2: HT-29 kolon kanseri hücre hattı, 3: LnCaP prostat kanseri hücre hattı (Kullanılan antikor CA VII (G-7): sc-166721).....	48
Şekil 3.15: SW480 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi ..... 49	49
Şekil 3.16: HT-29 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi ..... 50	50
Şekil 3.17: HT-29 ve SW480 hücre hatlarında CA VI proteininin IFC analizi. .... 50	50
Şekil 3.18: Hep3B hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi. .... 51	51
Şekil 3.19: HUVEC hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi ..... 51	51
Şekil 3.20: Hep3B ve HUVEC hücre hatlarında CA VII proteinini IFC analizi. .... 52	52
Şekil 3.21: PC3 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi ..... 53	53
Şekil 3.22: LnCaP hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi ..... 53	53
Şekil 3.23: PC3 ve LnCaP hücre hatlarında CA VII proteininin IFC analizi. .... 54	54
Şekil 3.24: <i>C. elegans</i> formaldehid jel elektroforezi RNA görüntüsü. .... 55	55
Şekil 3.25: CDC-42 PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü. .... 56	56
Şekil 3.26: CAH-3,4,5 PZR agaroz jel görüntüsü. .... 57	57
Şekil 3.27: <i>C. elegans</i> CA VII benzeri genler ve ceHIF1 geni mRNA ifadesi. .... 58	58

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> hCA izoformlarının yapısal özellikleri .....	4
<b>Tablo 1.2:</b> Akış Şeması.....	17
<b>Tablo 2.1:</b> Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	19
<b>Tablo 2.2:</b> Real- Time PZR Bileşenleri .....	24
<b>Tablo 2.3:</b> Real- Time PZR Koşulları .....	24
<b>Tablo 2.4:</b> Çalışmada Kullanılan Primerler .....	24
<b>Tablo 2.5:</b> RİPA Çözültisi Bileşenleri .....	25
<b>Tablo 2.6:</b> SDS-PAGE Jel İçeriği .....	27
<b>Tablo 2.7:</b> Western Blot'ta Kullanılan Solüsyonlar .....	27
<b>Tablo 2.8:</b> Çalışmada Kullanılan Antikolarların İnkübasyon Süreleri .....	28
<b>Tablo 2.9:</b> Çalışmada Kullanılan Primerler .....	32
<b>Tablo 3.1:</b> PZR Bileşenleri ve Miktarları .....	35
<b>Tablo 3.2:</b> PZR Koşulları.....	35
<b>Tablo 3.3:</b> SW480, H $\beta$ -2 PZR Bileşenleri ve Miktarları .....	36
<b>Tablo 3.4:</b> HT-29, H $\beta$ -2 PZR Bileşenleri ve Miktarları .....	37
<b>Tablo 3.5:</b> Hep3B, H $\beta$ -2 PZR Bileşenleri ve Miktarları.....	40
<b>Tablo 3.6:</b> HUVEC, H $\beta$ -2 PZR Bileşenleri ve Miktarları .....	43
<b>Tablo 3.7:</b> LnCaP, H $\beta$ -2 PZR Bileşenleri ve Miktarları.....	46
<b>Tablo 3.8:</b> CDC-42 PZR Bileşenleri.....	56
<b>Tablo 3.9:</b> CDC-42 PRZ Koşulları .....	56

## SEMBOL LİSTESİ

<b>CA</b>	: Karbonik anhidraz
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	: Kobalt klorür
<b>DEPC</b>	: Dietil pirokarbonat
<b>DEPC</b>	: Dietil pirokarbonat
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified eagles medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>FCS</b>	: Fetal sığır serum
<b>HIF</b>	: Hipoksi ile indüklenebilir faktörDietil pirokarbonat
<b>HT-29</b>	: Karaciğer kanseri hücre hattı
<b>HUVEC</b>	: Sağlıklı insan endotel hücre hattı
<b>Hβ2</b>	: Human beta-2 microglobulin
<b>LnCaP</b>	: Prostat kanseri hücre hattı
<b>LST</b>	: Laury pepto bios broth
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NaCl<sub>2</sub></b>	: Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NCBI</b>	: National center for biotechnology information
<b>NGM</b>	: Nematod besiyeri
<b>PBS</b>	: Fosfat buffer salin
<b>PC3</b>	: Prostat kanseri hücre hattı
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SDS</b>	: sodium dodesil sülfat
<b>SW480</b>	: Kolon kanseri hücre hattı

## ÖNSÖZ

Bu tez kapsamındaki çalışmalar Tübitak 1002-A 123Z001 nolu ve BAP 2023/008 nolu projeler ile desteklenmiştir. Deneyleerin tamamı Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, bana inanan, yol gösteren, maddi ve manevi her anlamda beni destekleyen, sevgisini ve bilgisini hiç esirgemeyen; disiplinini ve ahlaki duruşunu örnek aldığım değerli hocam Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na,

Tez çalışmam sırasında hep yanımda olan, zorlukları beraber aştığımız geç saatlere kadar benim için çabalayan değerli hocam Dr. Öğr.Üyesi Derya OKUYAN' a,

Çalışmalarımı yaparken desteklerini esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Doç. Dr. Esra TOKAY, Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU ve Araş.Gör. Serhad ONAT'na,

Bana bildiği herşeyi öğreten, her daim yardımına koşan, hep yanımda olan bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, sadece bir hoca değil aynı zamanda bana abla olan canım hocam Dr. Fatma POYRAZLI'ya,

Bu yola beraber başlayıp beraber yürüdüğüm takım arkadaşım Hanife AKTAŞ'a,

Bu süreçte birlikte omuz omuza çalıştığım, beraber ağladığımız, beraber güldüğümüz, her zaman ve her türlü yanımda olan, arkadaştan çok artık bir aile olduğumuz canım dostlarım Aylin TÜRKOĞLU, Canberk TOPRAK, Hazal Naz TÜRKMEN' e,

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, beni motive eden, her türlü nazımı çeken, hayatıma değer katan Hava ÖZDOĞAN ve Berkan NİYET'e,

Akademik yolda ilerlemeye beni teşvik eden, her zaman arkamda olan, hep elimden tutan ve düşmeme izin vermeyen canım aileme,

Sonsuz teşekkürler.

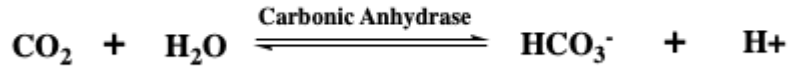
Bu yüksek lisans tezimi biricik yeğenim Öykü ÖZCAN'a ithaf ediyorum.

**Balıkesir, 2023**

**Aysu BOZKURT**

## 1. GİRİŞ

Nefes alıp vererek soluduğumuz hava, hücrelerimizde bulunan şeker ve yağın parçalanmasını sağlar. Bu parçalama işlemi havanın içerisinde bulunan oksijen ile gerçekleştirilir. Akciğerlere giden oksijen kan aracılığı ile tüm vücudumuza taşınır. Hücrelerdeki şekerin ve yağların parçalanması sonucunda ürün olarak karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) oluşur ve bu molekülün dışarı atılması gerekir. Kan bu noktada yine taşıma işlevi görür. Oluşan CO<sub>2</sub> hücrelerden dışarı yayılır ve kanda birkaç farklı şekilde taşınır: %10 civarı kan plazmasında çözünür, yaklaşık %20' si hemoglobine bağlanarak taşınır ve %70'lik büyük bir kısmı ise karbonik asite dönüştürülerek akciğerlerde taşınır. Karbonik anhidraz enzimi şekil 1.1' de gösterdiği gib CO<sub>2</sub> 'yi karbonik asite ve bikarbonata dönüşümünü katalize eder. Bu reaksiyon kendi kendine gerçekleşebilse de karbonik anhidraz enzimi reaksiyonu 1 milyon kata kadar arttırmaktadır.



**Şekil 1.1:** Karbonik anhidrazların fonksiyonu.

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), karbon dioksiti (CO<sub>2</sub>) bikarbonat ve protona çeviren çift yönlü bir reaksiyonu katalize eden enzimlerdir. Beyin, karaciğer, pankreas, akciğer, safra kesesi, böbrek, kaslar ve kırmızı kan hücrelerinde önemli ve çeşitli fonksiyonları üstlenen karbonik anhidrazlar tek bir izoenzim olmayıp farklı izoenzimlerden oluşan bir ailedir. Bu izoenzimler çeşitli dokularda farklı oranlarda farklı görevleri üstlenirler (Koltai vd., 2020).

1933'te ineklerin kan hücresinde keşfedilmiş olan karbonik anhidrazlar günümüze kadar pek çok enzimoloji, kimya, biyokimya, genetik, yapısal biyoloji gibi çalışmaların odağı olmasına rağmen hala yapı ve fonksiyonu anlaşılmamış üyeleri mevcuttur.

## 1.1 Karbonik Anhidraz Genleri ve Özellikleri

Prokaryot ve ökaryotlarda çok yaygın olarak bulunan CA' ların genetik olarak birbirinden farklı 7 alt grubu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - ve  $\eta$ -CA) bulunmaktadır. İnsanlarda bulunan CA' lar katalitik aktivite, doku dağılımı, inhibitörlere verilen yanıt ve hücrel lokalizasyonda farklılık gösteren 15 izoform  $\alpha$ -sınıfına aittir.  $\alpha$ -sınıfı karbonik anhidrazlar kendi aralarında sitosolik (CA I, II, III, VII ve XIII), salgılanan (CA VI), mitokondriyal (CA VA ve VB) ve membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV) olmak üzere 4 sınıfa ayrılır (Di Fiore vd., 2018). Diğer sınıfların üyesi olan CA'lar genellikle prokaryotik canlılarda bulunmaktadır.  $\alpha$ -sınıfı karbonik anhidrazlardan CA VIII, CA X ve CA XI izoformları dışındaki tüm izoformlar aktif bölgelerinde çinko iyonu içeren metalloenzimlerdir. CA VIII, X ve XI izoformları, aktif bölgede gerekli metal iyonuna sahip olmadıkları için CA ile ilişkili proteinler (CA-RP'ler) olarak adlandırılırlar (Nyman vd., 1964).

### 1.1.1 Sitozolik Karbonik Anhidrazlar

Sitozolik karbonik anhidrazlar insan dokularının tümünde ifade olmakla birlikte korunmuş enzimatik aktiviteye sahiplerdir ve pek çok fonksiyonel görevi üstlenirler. Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) üreterek kanın pH' ını korurlar (Kummola vd., 2005). CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik karbonik anhidrazlardır. CA I ve CA II kanın pH'ının korunması için gerekli CA'lardan olup kırmızı kemik iliği, kırmızı kan hücreleri, akciğer ve gözde bulunurlar. CA I' in fonksiyonlarını yerine getirememesi sonucu retinal ödem (Gao vd., 2008) CA II' nin işlevindeki değişiklikler sonucunda ise glokom, ödem, irtifa hastalığı ve epilepsi meydana gelebilir (Mincione vd., 2008; Supuran vd., 2008; Hen vd., 2011; De Simone vd., 2009; Swenson vd., 2007). En az anlaşılan izoformlardan olan CA III ve CA VII iskelet kası, beyin, karaciğer, kolon gibi oksijen tüketiminin çok fazla olduğu dokularda ifade olur. Bu izoformların reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu sırasında oksidatif hasar oluşan hücrelerde savunma sürecine katılabileceği düşünülmektedir (Del Giudice vd., 2013). CA VII ile epilepsi hastalığı ilişkilendirilmiştir (Hen vd., 2011; Ruusuvoori vd., 2011). Son yapılan çalışmalar CA III ve VII' nin bazı kanserlerle de ilişkili olabileceğini göstermektedir. Yine sitozolik CA' lardan olan CA XIII ekspresyonu böbrek, beyin, lenf düğümleri, tiroid, karaciğer, deri, yağ, yumuşak doku dahil olmak üzere çeşitli dokularda ve hem erkek hem de dişi üreme organlarında gözlenir. CA XIII' in, sperm hareketliliğinin

korunması ve normal dölleme süreci dahil olmak üzere üreme süreçlerinin pH düzenlenmesinde rol oynadığı varsayılmıştır (Kummola vd., 2005). CA XIII' in yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler kısırlıkla ilişkilendirilmiştir (Lehtonen vd., 2004).

### **1.1.2 Salgılanan Karbonik Anhidrazlar**

İnsan CA üyeleri arasında CA VI tek salgılanan izoformdur (Murakami vd., 1987). Gözyaşı, süt, insan serumunda, solunum yollarında, sindirim kanalının epitelyum yüzeyinde ve tükürükte bulunan CA VI' tümör oluşumunda görev almaktadır (Nishimori vd., 2007).

### **1.1.3 Mitokondriyal Karbonik Anhidrazlar**

İlk olarak kobay akciğerinden izole edilmiş olan CA V tek mitokondriyal karbonik anhidrazdır (Nagao vd., 1993). CA V' in iki farklı izoformu (CA VA ve CA VB) vardır. CA VA, çeşitli biyokimyasal yollara aracılık ederken CA VB, bezler, bademcikler, lenf düğümleri, dalak, karaciğer, kolon, testis mitokondrilerinde ve beyin, akciğerler, kaslar, meme ile diğer organlarda ifade olur (Dodgson vd., 1984; Fujikawa-Adachi vd., 1999; Idrees vd., 2016). CA VA ve CA VB, obezite ile ilişkilendirilmiştir (De Simone vd., 2009).

### **1.1.4 Memrana Bağlı Karbonik Anhidrazlar**

Membrana bağlı karbonik anhidrazlar yüksek aktiviteye sahiptir. Membran ilişkili CA' lar, enzimin doğal yapısı ve işlevi için gerekli olan bir veya iki disülfür bağı içerir. Disülfür köprüsünün bazı indirgeyici maddelerle indirgenmesi, enzim aktivitesinin kaybına neden olur. CA IV, yapısı ve işlevi açısından kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiş olan ilk membran bağlantılı karbonik anhidrazdır. CA IV' ün yüksek ekspresyonu kemik iliği, karaciğer ve safra kesesinde gözlenirken pankreas, böbrek, beyin, yağ ve yumuşak dokularda düşük ekspresyon gözlenir (Carter vd., 1990). CA IV' te bulunan lider dizideki veya gen gövdesindeki mutasyonlar, insanlarda bir protein katlanma hastalığı olan retinitis pigmentosa-17'ye (RP-17) neden olur (Datta vd., 2009). CA IV, glokom ve felç ile de

ilişkilendirilmiştir (Matsui vd.,1996; Matsui vd. 2006). Membrana bağlı bir diğer izoform olan CA IX başlıca safra kesesi, mide, ince bağırsak, testis ve doudenum ve deride ekspre olmaktadır. CA XII ise kolon, beyin, endometriyum, safra kesesi, böbrek, pankreas, plesenta, deri, troid bezi, mide, tükürük bezi gibi pek çok dokuda ifade olan geniş bir yayılıma sahiptir. CA XII ve CA IX, insan kanserlerinde tümör belirteçleri olarak karakterize edilmiştir (Závada vd., 2003). En çok çalışılan karbonik anhidraz izoformları olmalarının yanı sıra kanserler ilişkili karbonik anhidrazlar olarak bilinilmektedirler. Tablo 1.1’ de tüm CA genleri ve ilişkili olduğu hastalıklar gösterilmiştir.

**Tablo 1.1:** hCA izoformlarının yapısal özellikleri.

<b>İzoenzim</b>	<b>Hücresel Lokalizasyon</b>	<b>İlgili Hastalık</b>
<b>hCA I</b>	Sitozolik	Reninal Ödem
<b>hCA II</b>	Sitozolik	Glokom Ödem İrtifa Hastalığı Epilepsi
<b>hCA III</b>	Sitozolik	Oksidatif Stres
<b>hCA IV</b>	Membrana bağlı	Glokom Retinitis pigmentosa Felç
<b>hCA VA</b>	Mitokondriyal	Obezite
<b>hCA VB</b>	Mitokondriyal	Obezite
<b>hCA VI</b>	Salgılanan	Tümör Oluşumu
<b>hCA VII</b>	Sitozolik	Epilepsi
<b>hCA IX</b>	Membrana bağlı	Kanser
<b>hCA XII</b>	Membrana bağlı	Kanser Glokom
<b>hCA XIII</b>	Sitozolik	Kısırlık
<b>hCA XIV</b>	Membrana bağlı	Epilepsi Retinopati



## 1.2 Karbonik Anhidrazlar ve Kanser

Vücutta bulunan dokuları oluşturan hücrelerden bir veya birkaçında meydana gelen anormal değişiklikler ve kontrolsüz hücre bölünmesi ile meydana gelen kanser ölüm oranının en yüksek olduğu hastalıklardan biridir. Kanser oluşumunda genetik ve çevresel faktörler etkili olsa da kanserleşme süreci ile ilgili mekanizmalar çok karmaşık olup, belirsizliğini koruyan çok fazla nokta vardır. Günümüzde pek çok kanser çeşidinde ifadesi artan belirteç genler tanımlanmıştır. Bu belirteç genlerin dışında tümör oluşumu, metastaz, anjiyogenez gibi hayati süreçlerde etkili olan çeşitli yolları etkileyen ve belirsizliğini koruyan pek çok gen vardır.

Bugüne kadar CA VI hariç tüm CA' lar farklı kanserler ile ilişkilendirilmiştir.

CA I' in kanserle ilişkili bir izoform olarak potansiyelini gösteren oldukça az sayıda çalışma vardır. Kanser genom atlasının (TCGA) cBioPortal'ı ve insan protein atlası dahil olmak üzere pek çok veritabanlarına göre, RNA dizilimine dayalı olarak akut miyeloid lösemi, kolorektal kanser ve renal karsinom hastalarında orta veya yüksek seviyelerde CA I mRNA'sı tespit edilmiştir (Uhlen vd., 2017). Bu verilerin yanı sıra CA I meme kanserinde tümör oluşumuna ve migrasyona katkıda bulunmaktadır (Zheng vd., 2015). Prostat kanseri hücrelerinde ifade olan, CA I' in susturulması sonucunda, azalan CA I protein ifadesi prostat tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomların malign potansiyelinin arttığı görülmüştür (Bánová Vulić vd., 2019). Meme kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde CA I mRNA ve CA I proteininin tümör hücrelerindeki aşırı ifadesi ECM proteinlerinin gen ifadesini değiştirmemektedir (Lakota vd., 2020).

CA II tümör damarında eksprese edilmektedir ancak normal damar endotelinde ifadesi bulunmamaktadır. Tümör endotelindeki CA II ekspresyonu, yemek borusu, böbrek ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere diğer kanserlerde de gözlenir. Bir in vitro anjiyogenez modelinde, normal insan damar endotel hücrelerinin CA II ekspresyonun, hücreler bir tümör ortamının göstergesi olan asidik ve hipoksik koşullarda kültürlendiğinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği görülmüştür (Yoshiura vd., 2015). Gastrointestinal stromal (özafagus, mide, anüs, kolon, ince ve kalın bağırsak) tümörlerde yapılan deneylerde CA II' nin ekspresyonunun yüksek olduğu gözlemiştir. Bu sonuçlar CA II' yi gastrointestinal stromal tümörlerde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini

göstermektedir (Parkkila vd., 2009). Bununla birlikte, diğer kanserlerde (astrozitomlar, oligodendrogliomlar, melanomlar, endokrin tümörler ve meme kanseri gibi) CA II upregülasyonu kötü prognoz, tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Liu vd., 2013).

CA III' ün tümörlerde ekspresyonu ve işlevine odaklanan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. İnsanlarda normal dokuya kıyasla hepatoselüler karsinomunda (HCC) CA I, II ve III ekspresyonlarının düştüğü bilinmektedir. CA III ekspresyonunun fokal adezyon kinaz (FAK) sinyal yolu yoluyla hepatoma hücrelerinin transformasyonunu ve metastazı desteklediğini göstermiştir (Dai vd., 2008). TCGA ve insan protein atlasına depolanan RNA dizilimi ve IHC verilerine göre, CA III ekspresyonu glioblastomlarda ve tiroid kanserlerinde olmak üzere, çoklu kanserlerde gözlenmiştir. CA III' ün HCC' nin metastatik progresyonunun sonraki aşamalarında yeniden eksprese edildiği ve karaciğer kanserinde metastaz gelişiminde önemli bir etkiye sahip olabileceği varsayılmıştır. Baş ve boyun kanserleri, melanom ve akciğer kanserlerinde CA III geninde mutasyonlar gözlenmiştir ve bu kanserlerde en yaygın olan mutasyonlar missense mutasyonlardır. Kolon kanseri ve osteosarkom hücrelerinde CA III ekspresyonu, TGF- $\beta$ ' nin, MAPK ve PI3K sinyal yolları aracılığıyla aşağı regüle edilmektedir (Turkoglu vd., 2019).

Kanserlerde CA IV mRNA ekspresyonu oldukça düşük olmasına rağmen, gliomlarda, renal hücreli karsinomlarda, tiroid kanserlerinde ve melanomlarda görülebilir (Cerami vd., 2012).

Bugüne kadar CA VI ile yapılan hiç bir çalışma bu izoenzimi tümörjenez, kanser ilerlemesi veya metastaz ile ilişkilendirmemiştir.

CA IX ve CA XII kanserle ilişkili karbonik anhidrazlar olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, kanser araştırmalarında en çok çalışılan karbonik anhidraz genleri CA IX ve CA XII' dir. CA IX, normal dokularda düşük ekspresyon sergilerken katı tümörlerde yüksek ekspresyon gösterir. Hem CA IX hem de CA XII' nin tümör oluşumu, kanser hücresi sinyali, tümör ilerlemesi ve metastaz sürecinde oynadığı yerleşik roller nedeniyle, preklinikte birçok CA IX/CA XII hedefli inhibitör incelenmiştir. Bu çalışmalar, CA IX/CA XII katalitik aktivitesinin inhibisyonunun, hem in vitro hem de in vivo olarak birkaç agresif kanserin büyümesini, proliferasyonunu ve metastatik potansiyelini azalttığını

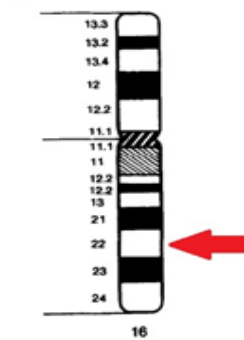
gösteren umut verici sonuçlar vermiştir (Montgomery vd., 1991). CA IX/XII aktivitelerinden herhangi birinin aktivitesinin azalması, tümör hücresinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu azaltan tümör mikro ortamının pH' ını etkilediği görülmektedir (Hewett-Emmett vd., 1996).

CA XIII için önemli bir fizyolojik fonksiyon veya doğrudan bir kanıt rapor edilmemiştir. Bununla birlikte, kolorektal kanser vakalarında CA XIII' ün aşağı regülasyonu görülmüştür ve bu gözlemlerin klinik önemi henüz belirlenmemiştir (Lakkis vd., 1996).

CA XIV mRNA'nın birçok kanserde yukarı regüle olduğu gösterilmiştir, en sık olarak melanomlar, gliomalar, karaciğer ve rahim kanserlerinde gözlenir (Cerami vd., 2012).

### 1.3 Karbonik Anhidraz VII (CA VII)

Karbonik anhidrazlar arasında en az araştırılan ve anlaşılan izoformlardan biri CA VII' dir. İlk defa 1991 yılında izole ve karakterize edilmiş (Montgomery vd., 1991) bu gen insanda 8q21 lokusunda bulunan diğer sitosolik CA'ların aksine 16q22'nin uzun kolunda yer alır. İnsan CA VII geninin uzunluğu 10 kb' dir. Altı intron ve yedi exon içerir (Hewett-Emmett vd., 1996).



Şekil 1.2: CA VII'nin kromozomal lokalizasyonu (Gilbert vd., 1999).

CA VII mRNA' sına, insan tükürük bezinde (Montgomery vd., 1991), fare hipokampusunda, fare serebellumda (Lakkis vd., 1996) ve sıçan akciğerinde rastlanmıştır (Bottcher vd., 1994). CA VII' nin inhibisyon profili, diğer sitozolik izoenzimlerle

karşılaştırıldığında oldukça farklıdır ve asetazolamid, metazolamid, etoksizolamid veya sülfonamid gibi inhibitörlerin varlığında kararlı bir afinite göstermemektedir ve daha seçici inhibitörlerin tasarlanmasına gereksinim vardır (Vullo vd., 2005). Yapılan bir çalışmada CA VII' nin, CA I piramidal nöronların elektrofizyolojik davranışını yöneten önemli bir gelişimsel anahtar olduğuna işaret etmektedir. hCA II' ye benzer şekilde, fizyolojik olarak en uygun CA izoenzimi olan hCA VII, karbondioksitin hidrasyonu için bir katalizör olarak çok yüksek verimlilik gösterir. Bununla birlikte, insan dokularında geniş çapta yayılmış olan CA II' nin aksine, CA VII daha sınırlı bir dağılıma sahiptir ve esas olarak tüm memelilerdeki korteks, hipokampus ve talamus bölgeleri gibi bazı beyin dokularında ve mide, doudeum, kolon, karaciğer ve iskelet kasında lokalizedir (Halimi vd., 2006).

CA VII, neredeyse yirmi yıl önce yeni bir CA izoenzimi olarak tanımlanmış ve CA katalitik aktivitesi 1996'da gösterilmiş olsa da bu izoenzimin özellikleri büyük ölçüde çözümlenmeden kalmıştır.

CA VII ile yapılan kanser araştırmaları oldukça sınırlıdır. CA VII ekspresyonunun kolorektal karsinomda (CRC) bir miktar prognostik değere sahiptir. CA VII ekspresyonu, hem mRNA hem de protein seviyelerinde CRC dokularında sıklıkla aşağı regüle edilmektedir. CA VII' nin azalan ekspresyonu, kötü yönlü farklılaşma, pozitif lenf nodu metastazı, ileri TNM (T-tümör boyutunu ifade eder, N- 'düğüm' durumunu ve M- 'metastazı' ifade eder) evresi ve olumsuz klinik sonuç ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu, CA VII' nin erken evre CRC 'li hastalar için bağımsız bir prognostik gösterge olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Bootorabi vd., 2011).

Astrositomlar (sinir hücrelerine destek sağlayan astrosit isimli hücrelerde başlayan tümörleşme), oligodendrogliomlar (oligodentrositler tarafından oluşturulan tümörler) ve karışık oligoastrositomalar (oligodendroglioma hem de astrositoma hücrelerinin birlikte oluşturduğu tümörler) olmak üzere üç farklı beyin tümörü kategorisinde CA VII ekspresyonuna bakılmıştır. Bulgular, lenf veya kan aracılığı ile vücuda yayılan tümörlerde CA VII ekspresyonunun daha yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçları, yüksek CA VII ekspresyonunun astrositom kaynaklı beyin tümörü bulunan hastalarda kötü prognoz belirteci olabileceğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda CA II, CA IX ve CA XII' nin hepsinin yaygın astrositomlarda prognostik belirteçler olarak benzer eğilimler gösterdiği görülmüştür (Haapasalo vd., 2007). CA VII, hastaların hayatta kalmasıyla

önemli bir korelasyona sahip başka bir CA izoenzimi olabileceğini göstermiştir. Astrositomlarda birkaç CA izoenziminin varlığı, yüksek derecede malign tümör dokularında asidik metabolik ürünlerin hızlı dönüşümünü sağlıyor olabileceği düşünülmektedir. CA II ve CA VII gibi sitozolik izoenzimler, hücre içinin daha verimli nötralizasyonuna katkıda bulunabilirken, zarla ilişkili enzimler CA IX ve CA XII, membran taşıma proteini ile birlikte protonların dışarı atılmasına veya uzaklaştırılmasına katılır. Bu mekanizmalar, tümör hücresi mikro ortamının CA inhibisyonu tarafından hedeflenebildiği kanser tedavisi için yeni fırsatlar sağlayabilir (Ahlskog vd., 2009; Pastoreková vd., 1992).

Tümörlerde CA VII ekspresyonu, pek çok CA izoformuna göre daha düşüktür ve en yüksek ekspresyon tiroid karsinomu, kolorektal adenokarsinom ve düşük dereceli beyin gliomalarında gözlenir. Kolorektal adenokarsinomda, CA VII yukarı regülasyonu, kötü prognoz için bir belirteç görevi görebilir. CA VII ile cBioPortal üzerinden yapılan bir biyoinformatik çalışmada CA VII amplifikasyonu olan en yüksek değişiklik meme kanseri hasta ksenograflarında gözlenmiştir, ardından malign periferik sinir tümörlerinde delesyonlar ve ardından desmoplastik melanomda mutasyonlar gözlenmiştir (Cerami vd., 2012). CA VII' nin IHC boyaması, zayıf ila orta derecede sitoplazmik ve ara sıra nükleer ekspresyon gösterir. Bununla birlikte, birkaç yumurtalık ve mide kanseri vakası güçlü bantlaşma sergilemiştir (Uhlen vd., 2017).

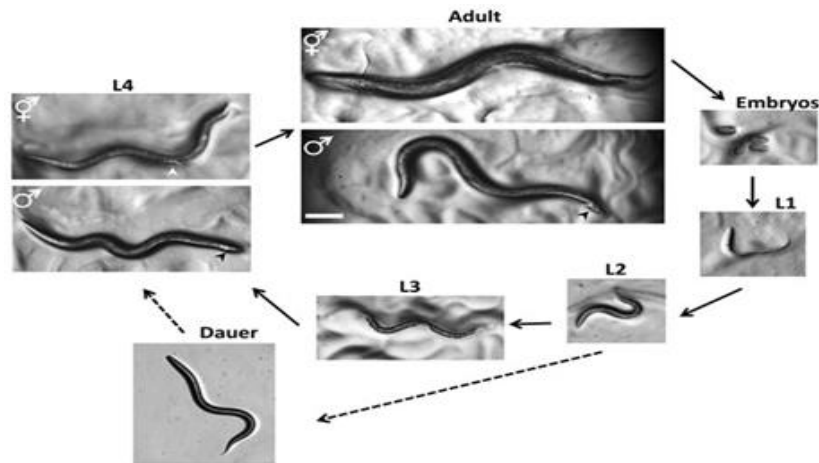
Kolorektal kanser üzerinde mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalar sonucunda, hem mRNA hem de protein seviyelerinde CA VII' nin CRC' de sıklıkla aşağı regüle edildiğini ve CA VII ekspresyonunun azalmasının, CRC hastalarının agresif klinik özellikleri ve kötü postoperatif prognozu ile yakından ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Özellikle erken evre tümörleri olan CRC' li hastalarda prognostik bir belirteç olarak CA VII' nin potansiyel kullanımına dair kanıt sağlamaktadır. 2015 yılında Yang ve ark.'nın kolorektal kanser üzerinde yaptığı bu çalışma CA VII ile yapılan diğer çalışmalara göre oldukça şaşırtıcı sonuçlar vermektedir. Diğer kanser türlerinde CA VII ifadesi artarken, kolorektal kanserde CA VII ifadesinin azalmaktadır. Farklı malignitelerde CA VII' nin prognostik değerine ilişkin tutarsız sonuçlar, prognostik etkisinin dokuya bağlı olabileceğini ve malignite tipine göre değiştiğini göstermektedir. CA VII' nin CRC' deki prognostik öneminin altında yatan mekanizma şu anda bilinmemektedir ve daha fazla araştırılma yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte, CRC'deki sonuçlar, intratümöral CA VII

ekspresyon durumunun belirlenmesinin, agresif CRC formları olan hastaların belirlenmesine yardımcı olabileceğini ve ayrıca bireyselleştirilmiş tedavi seçeneklerine rehberlik edebileceğini göstermektedir (Yang vd., 2015).

## 1.4 *Caenorhabditis elegans* ve CA VII Benzeri Genler

### 1.4.1 *Caenorhabditis elegans* Hakkında Temel Bilgiler

*Caenorhabditis elegans*, küçük ve özgür yaşayan bir nematodur. Yumurtadan çıkan larvalar 0.25 milimetre uzunluğunda ve yetişkinler 1 milimetre uzunluğundadır. Boyutlarının küçük olması, sebebi ile genellikle 100X'e kadar büyütme sağlayan diseksiyon mikroskopları veya 1000X'e kadar büyütme kapasitesine sahip olan bileşik mikroskoplar ile gözlemlenebilirler. Yaşamları boyunca şeffaf olmaları sebebiyle davranışları takip edilebilir ve gen ekspresyonları gözlemlenebilir. *C. elegans* hızlı bir yaşam döngüsüne sahiptir, şekil 1.3' te belirtildiği gibi yumurtadan yumurtlayan yetişkin haline gelmesi 25 ° 'de 3 gün sürer. Erkek ve hermafrodit bireyler vardır. Hermafrodit bireyler erkeklerle çiftleşerek genetik çeşitliliği sağlar. *C. elegans*'ın dört (L1-L4) larval dönemi vardır. Bu larval dönemler yaklaşık olarak 3 gün sürmektedir. Sonrasında canlılar üreyebilen erişkin forma gelirler.



Şekil 1.3: *C. elegans* büyüme döngüsü (Leica microsystems, 2012).

*C. elegans* protein kodlayan genlerin en az %38' i insan genomundaki ortologları tahmin etmiştir (Leica microsystems, 2012). İnsan genlerinin %60-80' inde *C. elegans* genomunda bir ortolog vardır ve insan hastalıkları ile ilişkili olduğu bilinen genlerin %40' ında *C. elegans*'in ortologları genleri mevcuttur (Shaye vd., 2011). Bu nedenle, *C. elegans*' taki birçok keşif, insan sağlığı ve hastalığı ile ilgilidir. *C. elegans*, genellikle toprak nematodu olarak yanlış tanımlansa da, bakteriyel besin kaynaklarının bol miktarda bulunduğu çürüyen bitkisel maddelerden kolay bir şekilde izole edilebilir (Kaletta vd., 2006). Laboratuvarda, hayvanlar normalde *Escherichia coli* bakterisini içeren agar plakaları üzerinde yetiştirilir. Hayvanlar bakterileri tükettiğinde, yağ kaynaklarını kullanırlar. Yiyecek olmadan, genç larva evrelerinin gelişimi duraksar. Bu durağanlığa girmenin bir sonucu olarak, hayvanlar en az bir ay boyunca hayatta kalabilirler (genellikle açlıktaki plakalar 15 ° 'de altı aya kadar yararlı bir şekilde tutulabilir) ve stoklar olarak sürekli besleme gerektirmezler. Sağlıklı, büyüyen hayvanlara ihtiyaç duyulduğunda, eski plakadan bir parça agar, bakterilerle yeni bir plakaya aktarılabilir. Hayvanlar yeni bakterilere taşınır ve gelişimlerine devam eder.

*C. elegans* embriyogenezi 20 ° 'de yaklaşık 16 saat sürer. Hayvanlar dört larva aşaması (L1-L4) ile yemeye ve gelişmeye başlar. L1 aşaması 16 saat uzunluğundadır; diğer aşamalar 12 saat uzunluğundadır. Her aşama uyuşukluk adı verilen uyku benzeri bir hareketsizlik dönemi ile sona ermektedir (Barrière vd., 2014). Bu dönemde yeni bir kütikül (dış kollajen tabaka) yapılır. Uyuşukluk eski kütikülün erimesi ile biter. L4 moltünden yaklaşık 12 saat sonra yetişkin hermafroditler, kendi ürettikleri spermilerin tümünü kullanana kadar 2-3 günlük bir süre için döl üretmeye başlarlar; sperm tükenmiş hermafrodit bir erkekle eşleşirse ek döl üretilebilir. Üreme döneminden sonra, hermafroditler yaşlanmadan ölmeden birkaç hafta daha yaşayabilirler. Bakteriler tükendiğinde ve hayvanlar kalabalık olduğunda, L2 larvaları alternatif bir yaşam döngüsünü aktive eder ve Almanca'da "dauer" larva denen forma geçerler (Raizen vd., 2008). Dauer larvada dış kollojen tabaka canlıyı komple sarar ve besin almasını engeller. Böylece gelişme durdurulur. Dauer kütikülü kimyasallara karşı geliştirilmiş dirence sahiptir, bu nedenle dauer çevresel streslere ve tostik maddelere karşı daha fazla koruma sağlar. Dauer larvaları aylarca hayatta kalabilir ve vahşi doğada en sık karşılaşılan dağılma şekli budur. Dauer larvaları bakterilerle plakalara aktarıldığında, dış kollojen tabaka erir ve biraz farklı L4 larvaları olarak gelişimlerine devam ederler. Genetik çalışmalar için güçlü bir sistem olmasının yanı sıra *C. elegans*, ökaryotik biyoloji için bir model olarak birçok

doğal avantaja sahiptir. Bu özellikler, küçük boyutu olmaları, yetiştirme kolaylığı, düşük bakım maliyeti, uzun süreli dondurularak saklanabilmeleri, hızlı üretim süresi, şeffaflık, değişmez hücre sayısı ve gelişimi ve besleme RNAi kullanarak gen aktivitesini azaltma yeteneğini içerir. Genellikle bahsedilmemesine rağmen, *C. elegans'* ın bir başka elverişli özelliği, organizmaların insanlar için oldukça iyi olmasıdır. Aslında vücut sıcaklıklarında yetişemedikleri için insanlarda yetişemezler. Bilinen kadarı ile *C.elegans'* a karşı alerjik reaksiyonlar belgelenmemiştir (Hars vd., 2007).

#### **1.4.2 *Caenorhabditis elegans* ve Kanser**

Kanserin altında yatan temele yönelik kapsamlı araştırmalar, hücrelerin tamamen habis bir duruma ulaşması için tanımlanmış bir dizi biyolojik aktivitedeki değişikliklerin gerekli olduğu konusunda genel bir fikir birliğine yol açmıştır. Onkojenik transformasyon ile ilişkili anahtar özellikler arasında hücre döngüsü düzensizliği, büyüme faktörü sinyallemesinden bağımsızlık, ölümsüzleştirme, metastaz ve istila, apoptozdan kaçınma, genomik kararsızlık ve anjiyogenezin indüklenmesi yer alır. Hemen hemen tüm habis kanserler, ilerlemeleri sırasında tanımlanan bu özelliklerin çoğunu veya tamamını edinse de, bu standartlaştırılmış özelliklere yol açan belirli mutasyon spektrumu, farklı kanser türleri arasında önemli ölçüde değişebilir. Tek başına bu gerçek, kanser biyolojisinin karmaşıklığını büyüklük sıralarına göre arttırmaktan sorumludur. Daha da önemlisi, onkojenik sürecin kapsamlı bir resmini elde etmek için gereken toplu anlayışlar, çok çeşitli tamamlayıcı yaklaşımlar gerektirecektir (Davis vd., 1995).

Genom dizilimi yapılan ilk metazoan olarak *C. elegans*, hem klasik genetik hem de modern fonksiyonel genomik yaklaşımlardan büyük ölçüde yararlanmıştır. Solucanın çeşitli özellikleri, onu kanser araştırmaları için oldukça uygun hale getirir. *C. elegans*, tamamen karakterize edilmiş ve esasen değişmez bir somatik hücre soyuna sahiptir, bu nedenle normal proliferasyonu ve modellenmeyi bozan fenotiplerin analizini kolaylaştırır (Hanahan vd., 2000; Sulston vd., 1977). Ayrıca, *C. elegans* gelişimin tüm aşamaları boyunca şeffaftır, bölünmeleri ve hareketleri de dahil olmak üzere tüm hücrelerin doğrudan görselleştirilmesine izin verir, bundan dolayı da genetik yolların ve protein fonksiyonlarının kapsamlı analizine olanak sağlar. Son olarak, kansere dahil olan birçok insan geni ve yolu *C. elegans'*ta yüksek oranda korunmuştur. Aslında, bu düzenleyici ağların *C. elegans'*ta ayrıştırılması genellikle daha kolaydır, çünkü ilgili gen aileleri daha



az üye içerir ve böylece genetik fazlalık fırsatını azaltır. Bunun örnekleri, neredeyse tüm insan kanserlerinde doğrudan veya dolaylı olarak rol oynadığı tahmin edilen pRb ve p53 tümör baskılayıcıları içerir. pRb ve p53 gen ailelerinin her biri memelilerde üç üye içerirken, *C. elegans* her bir ailenin yalnızca tek bir üyesini (sırasıyla LIN-35/pRb ve CEP-1/p53) içerir (Sulston vd., 1983; Sherr vd., 2000; Joseph vd., 2001; Sherr vd., 2002, 2004; Lu vd., 1998; Sage vd., 2000; Derry vd., 2001; Fasseas vd., 2010).

### 1.4.3 *C.elegans* ve hCA VII Benzeri Genler

CA'ları kodlayan genler çeşitli organizmalarda incelenmesine rağmen, *C. elegans*'ta CA'ları kodlayan genler hakkında çok az şey bilinmektedir. 2008 yılında *C.elegans* genomunda  $\alpha$ - CA sınıfından yalnızca CAH-4 keşfedilmiştir (Fasseas vd., 2011). 2009 yılında ise *C.elegans* genomunda  $\beta$ - CA geni tanımlanmıştır. Günümüzde ise Model organizma *C.elegans*'ın genomu altı  $\alpha$ -CA izoformu (cah-1, 2, 3, 4, 5 ve 6) kodlar ve bunlardan üçü katalitik aktivite için gerekli bileşenlerden (cah-1, 2 ve cah-1, 2 ve 6) yoksun olduğu bilinmektedir. Böylece, *C. elegans* hem katalitik CA'ların hem de evrimsel olarak korunmuş akatalitik proteinlerin işlevini ayırt etmek için yararlı bir indirgemeci model olabilir. CAH-1 ve CAH-2, sırasıyla % 75.9 ve % 84 homoloji ile insan CA-RP X (karbonik anhidraz ile ilgili protein 10) ile yakından ilişkilidir. Geri kalanlar insan CA VII ile ilgilidir. CAH -3; % 97.2, CAH-4, % 77.9; CAH-5, % 81 ve CAH-6, % 76.2 oranları ile hCAVII ile benzerlik gösterirler (Hall vd., 2008). CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 genleri kromozom-X üzerinde bulunur. CAH-3 4 ekzon, CAH-4 7 ekzon ve CAH-5 6 ekzon içerir. CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 genleri karbonat dehidrataz aktivitesinin sağlanması, hidrolizaz aktivitesinin sağlanması, liyaz aktivitesinin sağlanması, metal iyonlarının bağlanması, çinko iyonunun bağlanması gibi çeşitli görevleri üstlenirler (Zolfaghari vd., 2016). *C.elegans* 'ın neredeyse tüm nöronlarında CAH-4 ifade olmaktadır. Sherman ve ark. yaptığı bir çalışmada rekombinant CAH-4 proteininin çekirdek pH'ını düzenlediği gösterilmiştir (Sherman vd., 2012).

## 1.5 Hipoksi ve Kanser

Hipoksi, dokulara ve hücrelere oksijen gitmemesi ile indüklenen duruma denir. Oksijensiz kalan hücreler damarlaşma yolu ile farklı hücre ve dokulardan oksijen almaya çalışırlar. Bu durum kanser hücrelerinde yaygın olarak görülmektedir. Tümörlerin içerisinde bulunduğu

bu hipoksik mikroçevre, çeşitli kemoteropatik ilaçlara karşı direnç sağlar. Kanser hücreleri hızlı çoğalan doğaları gereği, oluşan tümörler ortamdaki besin ve oksijeni hızla tüketerek ortamı hipoksik hale getirir. Hipoksik ortamda bulunan tümörlerden salgılanan anjiyojenik faktörler damarlaşmayı ve tümör çapının büyümesini tetikler. Kısacası katı tümörlerin çevresi hipoksik alanlardır. Oksijensiz kalan bu yapılar anjiyojenez ile buldukları ortamlardan başka ortamlara çıkarlar (Türkoğlu vd., 2021). Hipoksi sırasında aktif hale gelen genlerden en önemli olanları hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (Hif1- $\alpha$ ) ve hipoksi ile indüklenebilir faktör (Hif2)'dir. Pek çok çalışmada HIF' in karsinleşme sürecinde rol aldığı bilinmektedir. Tümör dokularında Hif ekspresyonunun arttığı görülür (Türkoğlu vd., 2012). Hipoksik koşullarda, Hif yolağı (hypoxia inducible factor; hipoksiya ile indüklenebilir faktör) ve AMPK yolağı (AMP activated protein kinase; adenosin monofosfat aktive eden protein kinaz) devreye girer. Hif hücrelerin bulunduğu ortamdaki oksijen seviyesinin algılanmasından sorumludur. AMPK yolağı ise hücrede ATP miktarı azaldığında aktive olur ve katabolik süreçleri aktive ederken anabolik süreçleri inhibe eder. Kanser hücreleri, PTEN ve VHL gibi tümör baskılayıcı genleri inaktive edip, c-MYC gibi çeşitli onkogenlerin aktive ederek ve IGF-1, IGF-2 ve PDGF gibi çeşitli büyüme faktörü yollarının aktivasyonunun artırılması şeklinde Hif' i aktive etmek için çeşitli yollar geliştirmiştir (Türkoğlu vd., 2021). Hücrelerde hipoksik koşullarda Hif ile birlikte vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), eritropoietin, endotelin-1 ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi yolaklar da aktive olur (Türkoğlu vd., 2019).

### **1.5.1 Hipoksi ve Karbonik Anhidrazlar**

2001 yılında yapılan bir çalışmada CA IX ve CA XII' nin meme dokularında eksprese edildiğini ve bu karbonik anhidrazların meme kanserinde ekspresyon profilinin düzenlenmesinde hipoksinin baskın rol oynadığını göstermiştir (Wykoff vd., 2000).

Ivanov ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada 87 kanser hücre hattından ve 18 tümörden izole edilen dokularda normoksik ve hipoksik koşullar altında CA IX ve CA XII ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. İmmünohistokimya analizleri CA IX ve CA XII' nin çok sayıda normal dokuda ve epiteliyal tümörlerde yaygın bir şekilde ifade edildiğini ve hipoksi koşullarda bu ifade seviyesinin arttığını göstermiştir (Ivanov vd., 2001).

Proescholdt ve ark. yaptığı bir çalışmada farklı malignitedeki beyin tümörlerinde normal beyne kıyasla yüksek CA IX ve XII seviyelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçları normal beyin hücrelerine kıyasla, hipoksik ortamda bulunan hücrelerde CA IX ve CAXII ekspresyonun arttığını göstermiştir. Artan ekspresyon seviyesi hipoksinin bir indüksiyon faktörü olduğunu gösterir (Proescholdt vd., 2005).

CA IX geninin ifadesi in vivo tümör örneklerinde yalnızca hipoksik koşullarda ifade edilmektedir. Hif yolağı, CA IX geni için oldukça önemlidir. TGF- $\beta$  ve hipoksiyanın CA IX geni üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda gelecekte meme kanseri hücrelerinde metaztasların önüne geçilebilir (Kingsley vd., 2007). Yıldırım ve ark. yaptığı bir çalışmada TGF- $\beta$  sitokininin hipoksik koşullar altında Hep-3B hücrelerindeki CA IX ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Hipoksi ile indüklenen proteinler antikanser tedavisi için önemli hedeflerdir. Hepatom hücrelerinde CA IX' un TGF- $\beta$  aracılığı ile yukarı regülasyonunun altında yatan mekanizmaları anlamak hepatoselüler karsinomda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Yıldırım vd., 2017).

2020 yılında yapılan bir çalışmada, CA III 'ün prostat kanseri hücre hattında hipoksik koşullar taklit edildiğinde indüklenmiş CAIII mRNA ve protein ekspresyonuna yol açtığı bulunmuştur (Okuyan vd., 2020).

2022 yılında yapılan bir çalışmada, hipoksik koşullar altında büyütülen baş ve boyun skuamöz karsinom hücrelerinin, normoksik koşul altında büyütülen hücelere göre CA IX/XII genlerinin ekspresyon seviyesinin arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, ortama CA IX/XII inhibitörü olan SLC-0111'in eklenmesi tümör büyümesini ve yayılmasını azaltmıştır (Sarnella vd., 2022).

### **1.5.2 Kimyasal Hipoksi**

Hipoksi ile ilişkili insan hastalıklarını incelemek için, fiziksel ve kimyasal hipoksi modelleri gibi çeşitli hipoksi modelleri geliştirilmiştir. Fiziksel hipoksi modelleri hipoksik ortamı simüle etse ve hayvanlara ve hücelere hipoksi ile ilgili hakaretlere neden olsa da, bu modellerin kurulması, kontrol edilmesi kolay olmayan bir protokol gerektirir. Genellikle istenen % 95 nitrojen ve % 5 karbon dioksit gaz karışımını içeren gaz silindirleri ve hipoksi odaları, fiziksel hipoksi koşullarını üretmek ve sürdürmek için

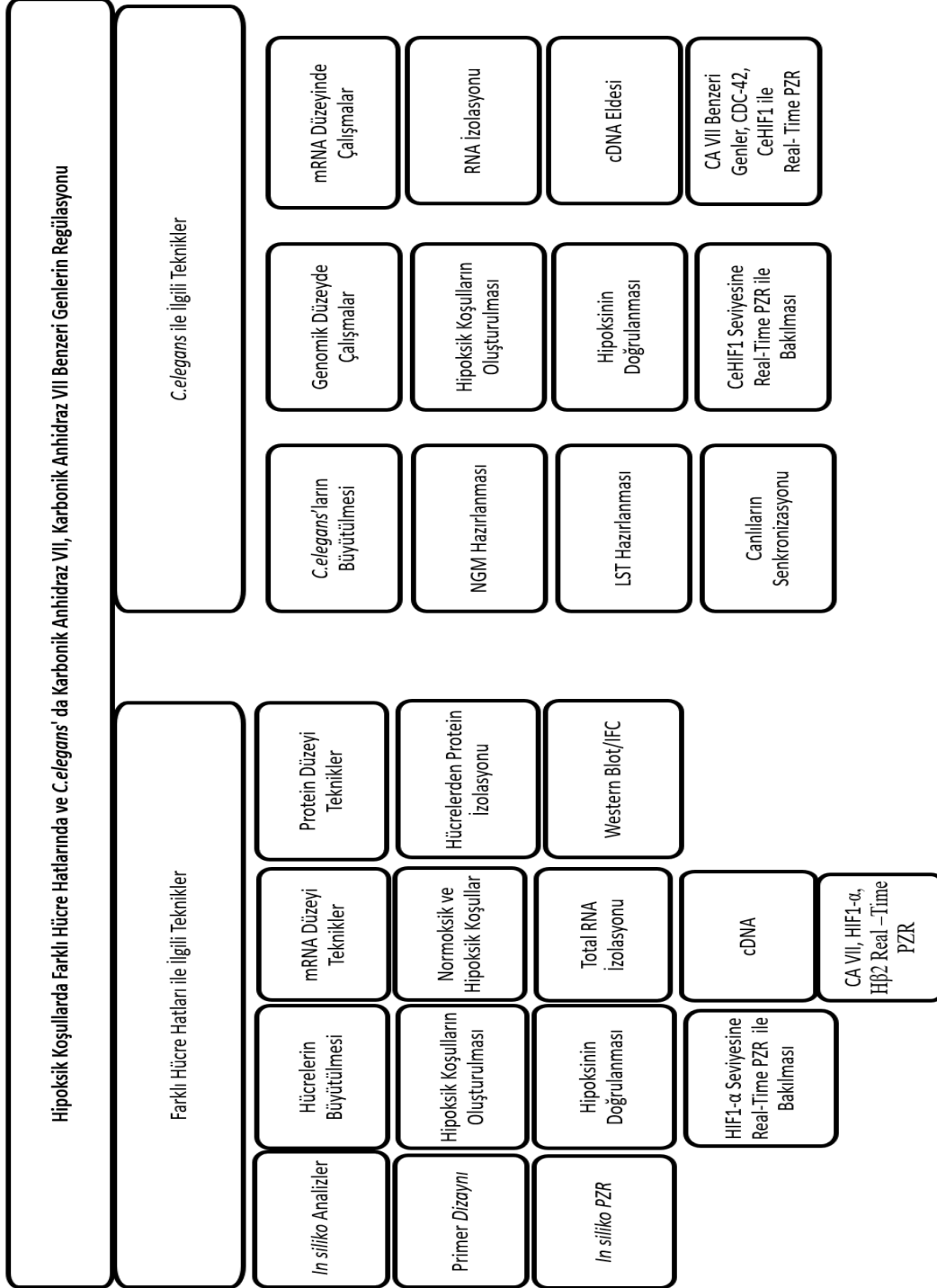
genellikle gereklidir. Oksijen konsantrasyonunu hassas bir şekilde kontrol etmek için oksijen analizörlerine de ihtiyaç vardır. Kimyasal hipoksi modellerinin oluşturulması için genellikle kobalt klorür, deferoksamin ve sodyum hiposülfid gibi hipoksiyi taklit eden ajanlar kullanılır (Abudara vd., 2002).

*C.elegans*'larda kimyasal hipoksiyi taklit etmede sodyum sülfid kullanılabilir. Sodyum sülfid'in su ile reaksiyonu kendiliğinden yanma ile sonuçlanmaz ve kükürt dioksit üretmez. Bu özellikler sodyum sülfid'i sodyum hiposülfitten daha avantajlı olduğunu göstermektedir (Jiang vd., 2010).

Hücre düzeyinde kimyasal hipoksi taklit edilirken  $CoCl_2$  kullanılır.  $CoCl_2$  ortamda bulunan prolin hidroksilazlar ile etkileşime girerek, prolin hidroksilazın Hif-1 $\alpha$ 'yı hidroksile etmesini engeller. Hidroksilasyon gerçekleşmediği için VHL ve Hif-1 $\alpha$  birbirine bağlanamaz ve degradesi olamayan Hif-1 $\alpha$  ortamda birikerek hedef genin promotöründe bulunan HRE bölgesine bağlanır (Türkoğlu vd., 2021).

## 1.6 Amaç

Tablo 1.2: Akış şeması.



Başta CA IX ve CA XII olmak üzere, CA I, CA II vb. genleri üzerinde yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Fakat CA VII geni üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Astrositomalar, oligodendroglomlar, oligoastroitomalar, yumurtalık kanseri, mide kanseri ve kolon kanserindeki tümörler ile CA VII hakkında araştırmalar yapılmasına rağmen, bunların dışındaki farklı kanser türlerinde ve kanser hücre hatlarında yapılmış CAVII regülasyonunu aydınlatmaya yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte *C.elegans*' ta insan CA VII genine en fazla benzeyen genler CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 'tir. İlgili genler hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Çalışmamız kapsamında; CA VII' nin farklı hücre modellerinde ve CA VII benzeri genlerin *C.elegans*' taki normal ve hipoksik koşullardaki ifadesi araştırılmıştır.

- i. *In silico* analizler ile primer dizaynı yapılarak hedef gen bölgelerinin çoğaltılması.
- ii. CoCl<sub>2</sub> ile PC3, LnCaP, HUVEC, SW480, Hep3B ve HT-29 hücrelerinde hipoksik model oluşturulması ve doğrulanması.
- iii. Çalışma kapsamındaki hücre hatlarında CA VII' nin ifadesinin hem normal hemde hipoksi koşullardaki ifadesinin Real- Time PZR ile mRNA düzeyinde ve western blot tekniği ile protein düzeyinde belirlenmesi.
- iv. Sodyum sülfid ile *C.elegans*' larda hipoksik model oluşturulması ve doğrulanması.
- v. İnsan genleri ile %60-80 benzer genler barındıran *C.elegans*' tan total RNA izolasyonu ile CA VII benzeri genler olan CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 ifadesinin normal ve hipoksik koşullar altındaki ifade profillerinin değişiminin mRNA seviyesinde Real-Time PZR ile belirlenmesi.

## 2. MATERYAL VE METHOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu araştıma çalışması sırasında kullanılan tüm malzemeler moleküler biyoloji deneylerinde kullanılabilir saflıkta ve sterillikte olup, PZR, RT-PZR deneyleri sırasında kullanılan enzimler ve kimyasallar Fermentas, LightCycler ve Thermo scientific firmaları tarafından temin edilmiştir.

**Tablo 2.1:** Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Satın alınan firma
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
Agar	Sigma
Agaroz	Sigma
Akrilamid-Bisakrilamid	Merck
Antibiyotik	Gibco
Beta-merkaptolanol	Merck
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	EuroClone
DMSO	Sigma
dNTP	Thermo Scientific
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Merck
Etanol	Sigma
Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
Formaldehid	Sigma
Gliserol	Merck
İzopropanol	Merck
Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
LST (Laurly Pepto Bios Broth)	Biolife
Magnezyum Klorür (MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Scientific
Metanol	Merck
NaCl <sub>2</sub> (Sodyum klorür)	Merck
NaOH (Sodyum hidroksit)	Merck
Nylon Membran	Millipore
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo Scientific
SDS (Sodyum dodecyl sulfate)	Sigma
Sodyum Sülfid	Sigma
Süt tozu	Sigma
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
Tween 20	Sigma

## **2.1.2 Çalışmada Kullanılan Canlılar**

Bu çalışmada kullanılan AB1 *C. elegans* suşu Minnesota Üniversitesi, Hep3B(İnsan Karaciğer Karsinomu ) hücre hattı Cardiff Üniversitesi Dr. Dipak P. Ramji' den, LnCaP (Prostat Kanseri) ve PC3 (Prostat Kanseri) hücre hatları hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü hocası Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz' dan; SW480 (Kolon Kanseri) hücre hattı Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümünden Prof. Dr. Sreperna Banerjee' nden; HT-29 (Kolon Kanseri) hücre hattı hücreleri Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Doç. Dr. Tuğba Boyueğmez' den, HUVEC (Sağlıklı İnsan Endotel Hücreleri) hücre hattı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümünden Prof. Dr. Berrin Tunca 'dan temin edilmiştir.

## **2.2 Metot**

### **2.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu ve Temizliği**

Çalışmada kullanılacak olan cam malzemelerin tamamı, hazırlanan solüsyonların bazıları, endodorflar, santrifüj tüpleri, pipet uçları, bakteri kültürleri 121°C' de 30 dakika otoklavda steril edildi sonrasında etüvde kurutularak kullanıldı.



## **2.2.2 Hücre Kültürü Teknikleri**

### **2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı**

#### **2.2.2.1.1.1 FCS Hazırlanması**

FCS (Fetal Calf Serum) ana stoğu -20° C' de saklanmaktadır. İlk kullanım öncesinde +4° C çözünmesi için bir gece bekletilir. Sonrasında dk ısı ile inaktive etmek için 37° C' de 15 dk ve 56°C' de 35 dk beklenir. Süre sonunda filtrelendir (0,22 µm) ve alikotlanarak -20° C de muhafaza edildi.

#### **2.2.2.1.1.2 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması**

Hücre kültürü medyumunu DMEM ve RPMI medyum içerisine FCS toplam hacimde %10 olacak şekilde eklendi. Antibiyotik olarak konsantrasyonu 100 ünite/mL olacak şekilde Penicillin veya 10 µg/mL son konsantrasyon olacak şekilde Streptomycin eklendi.

#### **2.2.2.1.1.3 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması**

Steril PBS (1 X) içerisinde, %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA çözüldü. Solüsyonun sterilizasyonu 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek sağlandı. -20° C' de saklandı.

#### **2.2.2.1.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları ile Yapılan İşlemler**

Hücreler uzun süreliğine -80° C' de saklandı. -80° C'den çıkarılan hücreler çözüldükten sonra 2 mL %10 FCS içeren DMEM' e (LnCaP'ler için RPMI medyum kullanıldı) alındı, 5 dakika 1000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak pellet %10 FCS içeren DMEM ile güzelce çözüldü. 75cm<sup>2</sup>'lik flasklara hücreler ekilerek %5 CO<sub>2</sub> içeren ve 37° C' sıcaklığında inkübatöre alındı. Hücreler flaskların %90' lık kısmını doldurunca flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve yaklaşık 1,5-3 mL Tripsin-EDTA eklenerek birkaç dakika inkübatörde hücrelerin kalkması beklendi Hücreler yüzeyden kalkınca Tripsin-EDTA' nın inaktive olması için 5 mL %10 FCS içeren medyum eklendi. Flas içerisindeki hücler falkonlara alındı ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak, pelletler 2 mL medyum içerisinde çözüldü ve flasklara aktarıldı. Flasklar %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatöre konuldu.

### 2.2.3 mRNA İle İlgili Teknikler

#### 2.2.3.1 Hücrelerden RNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılacak hücreler 6'lı well platelere 500.000 hücre olacak şekilde yayıldı. 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması beklendi. 24 saat sonunda hipoksi oluşturulacak gruplara 150mM CoCl<sub>2</sub> uygulandı ve hücreler 24, 48 ,72 olacak şekilde hipoksik ortamda tutuldu. Süresi dolan gruplardaki hücreler tripsin-edta ile kaldırıldı. Pellet haline getirilene hücrelerden ticari kitteki protolde belirtilen basmaklar gerçekleştirilerek RNA izolasyonu yapıldı. Ortamda bulunabilecek RNAaz'ları inhibe etmek için DEPC ile eller ve tüm yüzeyler iyi bir şekilde temizlendi. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

#### 2.2.3.2 RNA Miktar Tayini

Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar tayini için 260 - 280 nm'de absorbanları ölçülür. Kör değeri için 200 µL dH<sub>2</sub>O kullanılır, RNA ölçümleri için ise 195 µL dH<sub>2</sub>O ve 5 µL izole edilen RNA konuldu. Elde edilen absorban değerlerinin saflıklarını değerlendirmek için:

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

$$\text{Saflık} = A_{260}/A_{280} \text{ formülleri kullanıldı.}$$

#### 2.2.3.3 RNA Formaldehid Jel Elektroforezi

Kullanılacak tank, aparat ve cam malzemeler deney öncesinde sırasıyla %0,5' lik SDS, DEPC' li su ve etanol ile yıkandıktan sonra kurutuldu. 0,5 g agaroz tartılıp 50 mL DEPC' li su ve 5 mL 10 X FA jel tampon içerisine koyularak mikrodalgada kaynatıldı. Jelin sıcaklığı biraz düştüğünde 900 µL formaldehit ve 1 µL etidyum bromür jel içerisine eklenerek kasete döküldü. Donan jel 1X FA jel tamponu ile dolu tank içerisine alındı. 3 µL 2 X yükleme boyası ve 5 µL RNA örneği 65° C sıcaklıkta 10 dakika bekletildi ve buzda soğutulan örnekler kuyulara yüklendi. Jelde yürütme sonrasında RNA örnekleri jelde görüntülendi.

#### **2.2.3.4 cDNA Sentezi**

İzole edilen RNA'ların miktarları 1 µg olacak şekilde miktarları hesaplandı. 1 µL Oligo dT eklenerek dH<sub>2</sub>O ile son hacmi 12,5 µL'ye tamamlandı. 65° C sıcaklıkta 5 dakika PZR cihazında reaksiyonun ilk basamağı tamamlandı. Her örnek için 4 µL RT Buffer, 2 µL dNTP, 0,5 µL Ribolock İnhibitör ve 1 µL Revers Transkriptazdan oluşan karışım her bir tüpe 7,5 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Örnekler 42° C sıcaklıkta 1 saat ve 72° C sıcaklıkta 10 dakika PZR cihazında tutularak ikinci basamak tamamlandı.

#### **2.2.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA Kontrolü**

Elde edilen cDNA örnekleri ile Hβ-2 PZR yapıldı. PZR reaksiyonlarının toplam hacmi 50 µl'dir. Kalıp olarak yaklaşık 1000ng cDNA kullanıldı. Primerlerin son konsantrasyonları 2 ng'dır. 200 mM her bir dNTP, 1 X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100) ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 2 mM'dir. PZR sonuçlarını görüntülemek için agaroz elektroforezi yapılmıştır.

#### **2.2.3.6 Agaroz Jel Elektroforezi**

%1 lik jel hazırlamak için, 1 gr Agar ve 100mL 0,5 X TBE erlen içerisinde mikrodalgada kaynatıldı sonrasında jel soğumaya bırakıldı. Jel içerisine kasete dökülmeden önce son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde Etidyum Bromür eklendi. Taraklar kaset içerisine yerleştirilip jel döküldü ve donması için bir süre beklendi. Jelin polimerleşmesinin ardından taraklar çıkarılarak kuyulara 20 µL örnek yüklendi. 20 µL hacime 3 µL boya eklendi. 0,5 X TBE ile dolu tank içerisine alınan jel 40 dk 90 V'da yürüldü sonrasında ise görüntülendi.

#### **2.2.3.7 Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR)**

Her deney 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 'LightCycler 480 SSYBR Green I Master' Real-Time PZR kiti kullanıldı. Tablo 2.3' te belirtilen koşullarda deney yapıldı. Kuyularda köpük oluşmamasına dikkat edildi. Plaka film ile kaplandı ve Roche markalı Real Time PZR cihazına yerleştirildi. Ct değerleri 2 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubundaki değerlerin ortalaması alınmıştır.

<b>BİLEŞENLER</b>	<b>MİKTAR</b>
cDNA	1 µL
Forward Primer	0,5 µL
Reverse Primer	0,5 µL
Master Mix	5 µL
ddH <sub>2</sub> O	3 µL
Son Hacim	10 µL

**Tablo 2.2:** Real- Time PZR bileşenleri.

<b>SICAKLIK</b>	<b>SÜRE</b>	<b>DÖNGÜ</b>
95°C	10 dk	1
95°C	10 sn	35
55°C	10 sn	
72°C	10 sn	
72°C	5 dk	1

**Tablo 2.3:** Real- Time PZR koşulları.

<b>PRİMERLER</b>	<b>FORWARD PRİMER DİZİSİ</b>	<b>REVERSE PRİMER DİZİSİ</b>
<b>CA VII</b>	5'-CTGCTTTAAGAGGCTGCTCCG-3'	5'-CCCTGGGCAATGGGATACAG-3'
<b>Hβ-2</b>	5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC '3	5'CATGTCTCCATCCCCTTAAC '3
<b>HIF1-α</b>	5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT-3'	5'-TGTCCTGTGACTTGTC-3'

**Tablo 2.4:** Çalışmada kullanılan primerler.

## 2.2.4 Protein Tabanlı Teknikler

### 2.2.4.1 Western Blot

#### 2.2.4.1.1.1 Deneyin Kurulması ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

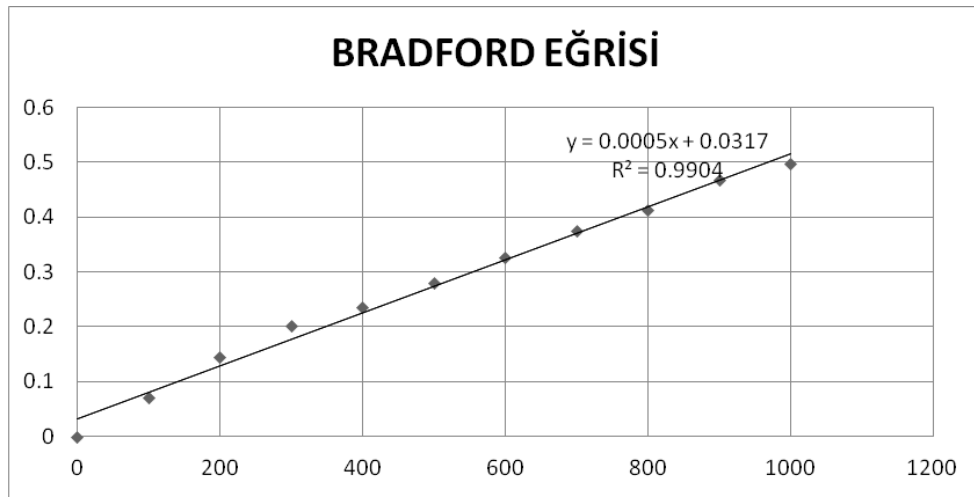
Hücreler protein izolasyonu için 24 saat önceden 6'lı well platelere 500.000 hücre olacak şekilde yayıldı ve bir gece yüzeye tutunmaları beklendi. Sonrasında 24,48, 72 saat deney gruplarına 150 mM konsantrasyonda  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Süresi biten deney grubundaki hücreler tablo 2.5' te belirtilen şekilde hazırlanan ripa buffer ile buz üzerinde kazındı. 40 dk boyunca buz üzerinde bekletilen ekstraktlara her 15 dk sonunda pipetaj yapıldı. 40 dk sonunda 13.000 rpm de 20 dk santrifüj ile hücre kalıntıları dibe çöktürüldü. Süpernetant kısım yeni bir ependorfa içerisine alındı ve  $-80^\circ\text{C}$  sıcaklıkta saklandı.

**Tablo 2.5:** RİPA çözeltisi bileşenleri.

MADDE	MİKTAR
Proteaz İnhibitörü	1 Tablet
140mM NaCl	7 mL
1mM EGTA	500 $\mu\text{l}$
1mM EDTA	100 $\mu\text{l}$
%1 Triton X100	500 $\mu\text{l}$
%0,1 SDS	10 mL
%0,1 Sodyum deoxycholate	0,05 g
10 mM TrisCl (pH:8)	500 $\mu\text{l}$

### 2.2.4.1.1.2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Protein miktarları Bradfor eğrisi oluşturularak belirlenmiştir. Öncelikle 1000 mg/ $\mu$ L-100mg/ $\mu$ L aralığında 10 farklı konsantrasyonda standart BSA çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan BSA çözeltileri 96'lı well platalere 5 $\mu$ L olacak şekilde konur. Üzerlerine 250 $\mu$ L Bradford reaktifi eklenir. 10 dk bekletildikten sonra 595nm' de absorbans ölçüldü. Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır. Bu koşullar ile hazırlanan Bradford eğrisi şekil 2.1' deki gibidir.



**Şekil 2.1:** Protein ölçümlerinde kullanılan bradford eğrisi.

Protein ekstraktlarından 2,5 $\mu$ L 96' lı wellere koyulup üzerine 2,5 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ilave eklendi. Üzerlerine 250 $\mu$ L Bradford reaktifi konup 595 nm'de absorbans alındı. Protein ekstraktlarının değerleri kör değerinden çıkarılarak eğrideki denklem kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.4.1.1.3 SDS-PAGE

Önceliköle ayırma jeli aşağıdaki tabloda gösterilen şekilde hazırlanarak, jel üst kısımda 2-3 cm kadar boşluk bırakılarak döküldü. Oluşan köpüklerin giderilmesi için izopropanol jel üzerine damlatıldı. 35-45 dakika jelin polimerize olması beklendi. Jel polimerleştikten sonra izopropanolü uzaklaştırmak kurutma kâğıdı kullanıldı. Ardından yığıma jeli döküldü.

Jelin donması beklenmeden hızlı bir şekilde kuyu oluşumu için tarak yerleştirildi. Yığıma jeli de polimerize olduktan sonra, tarak çıkarıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

**Tablo 2.6:** SDS-PAGE jel içeriği.

<b>%10 Ayırma Jeli</b>	<b>MİKTAR</b>	<b>%5 Yığıma Jeli</b>	<b>MİKTAR</b>
Alt Jel Buffer	2.5 mL	Üst Jel Buffer	2.5 mL
Akrilamid- Bisakrilamid (%30)	3.33 mL	Akrilamid- Bisakrilamid (%30)	0,833 mL
ddH <sub>2</sub> O	4.17 mL	ddH <sub>2</sub> O	5.41 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL	% 10 (w/v) APS	50 µL
TEMED	10 µL	TEMED	5 µL

Miktarları hesaplanan proteinler eşit mg hacimde jele yüklenmiştir. Her bir protein örneği için 900µL 4X Sample LaemLi Buffer içerisine 100µL β-merkaptotanol eklenerek bir karışım elde edildi. 7,5µl elde edilen karışımdan alınarak proteinlerin üzerine eklenip son miktar 22,5µL olacak şekilde tamamlanmıştır. Örnekler 95°C' de 5 dakika denatüre edildi. Jelin sonuna veya başına 5 µl Protein Ladder yüklendi.

Jelin yürütülmesi için, 1 X Running Buffer (0.1 (w/v) SDS içerir) tanka doldurularak 80 volta yaklaşık 240 dakika yürütüldü.

**Tablo 2.7:** Western Blot'ta kullanılan solüsyonlar.

<b>WESTERN BLOT SOLÜSYONLARI</b>	<b>İÇERİK</b>
SDS PAGE ALT JEL TAMPONU	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE ÜST JEL TAMPONU	1 M Tris-HCl (pH 6,8), % 10 (w/v) SDS
YÜRÜTME TAMPONU	25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 (w/v) SDS
TRANSFER TAMPONU	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10 X TBS	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4

#### 2.2.4.1.1.4 SDS Jelin Blotlanması

Transfer işlemi için PVDF membran kullanıldı. Transfer buffer yukarıdaki tablodaki şekilde hazırlanmıştır. Kullanılan transfer bufferın soğuk olması için örnekler jelde yürürken -20°C' de bekletildi. Yürütme işleminden sonra jel soğuk olan transfer buffer içerisine alındı. Transfer sistemine ait aparatlar ve süngerler de transfer buffer ile ıslatıldı. PVDF membran ve kurutma kağıtları jel ebatlarında kesildi. PVDF membran metanolde 1 dakika aktive edildikten sonra transfer buffera alındı. Transfer işlemi için transfer kasedi içerisine sırasıyla sünger, kurutma kâğıdı, jel, kurutma kağıdı, sünger koyularak sandiwich yapıldı. Bu işlem sırasında köpük oluşmamasına dikkat edildi. Kaset, transfer buffer ile dolurulan tank içerisine yerleştirildi ve 15 V akım ile gece boyu transfere bırakıldı.

#### 2.2.4.1.1.5 Bloklama

Taransfer işleminden sonra, proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar 20 mL bloklama çözeltisi içerisinde (1X TBS içerisinde, %0,1 (v/v) Tween20 ve %5 (w/v) yağsız süt tozu içerir) 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı. Sonrasında bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak membran 1X TBS ile 5 dk boyunca 3 kez membran yıkandı. Membran primer antikor ile aşağıdaki tabloda bakılacak genin proteininin çeşidine uygun olarak inkübasyon yapıldı. Sonrasında sekonder antikor ile bir saat oda sıcaklığında muamele edildi ve görüntülemeye alındı.

**Tablo 2.8:** Çalışmada kullanılan antikolarların inkübasyon süreleri.

ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER ANTİKORLAR	İNKÜBASYON SÜRESİ
CA VII	1 gece (12-18 saat)
β-Aktin	1-1.5 saat



#### **2.2.4.1.1.6 Memrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi**

Görüntüleme aşamasında membranlar 2-3 dakika ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting SubstrateThermo) substrat ile bekletildi. Ardından görüntüleme cihazında membran görüntülendi.

#### **2.2.4.2 İmmüno Floresans Boyama**

Hücre kültüründe büyütülen, Hep3B, LnCaP, PC3, HT-29, HUVEC ve SW480 hücreleri flasklardan Tripsin-Edta ile kaldırılarak sayıldı. 12 kuyulu plaka 250.000 hücre olacak şekilde hücreler yayıldı. Her bir kuyuya hücrelerin tutunmaları için yuvarlak lamel koyuldu. Hücreler 12-18 saat yüzeyen tutunması için 37° C' de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre bırakıldı. Süre sonunda hipoksi gruplarına son konsantrasyon 150mM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre içeren kuyulardaki medyumlar uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Sonrasında hücrelerin yüzeyini 2-3 mm kaplayacak şekilde %4 paraformaldehit eklenerek hücreler 15 dk fikse edildi. Süre bitiminde fiksatif uzaklaştırılarak hücreler %0,1 Triton X 100 içeren PBS' de 10 dk bekletildi. Bu işlem antikörlerin hücre içine girmesi için yapılmaktadır. 10 dk sonunda hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Spesifik bağlanmaların önüne geçmek için %1 oranında BSA içeren PBS çözeltisi ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen hücreler bu işlemden sonra tekrar PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1/50 oranında %1 BSA içeren PBS ile sulandırılan primer antikör eklenerek plakalar bir köpük içerisinde bulunan ıslak havlu kağıdın üzerine alındı ve 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Antikörlama bittikten sonra PBS ile tekrar yıkanan hücrelerin üzerine karanlık ortamda sekonder antikör ilave edildi ve primer antikorda olduğu gibi köpük içerisinde nemli bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Bundan sonraki basamaklar karanlıkta gerçekleştirildi. Sekonder antikörle muamelesi biten hücreler karanlıkta 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından hücre çekirdeklerini boyamak için ortama 1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2- fenilindol) eklendi. DAPI' yi tekrar ortamdan uzaklaştırıp PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya sinyalin solması önlemek amacıyla Mounting Medyum damlatıldı ve yuvarlak lameller 12 kuyulu plakalardan çıkartılarak lamellar üzerine ters gelecek şekilde kapatıldı. Deney görüntülerinin çekimlerinde "Olympus DP72" kullanıldı.

## 2.3 *Caenorhabditis elegans* ile İlgili Teknikler

### 2.3.1 Nematod Besiyeri (NGM) Hazırlanması

2,5 g peptone, 3 g NaCl, 20 g agar tartıldı üzerine 1 lt saf su eklenerek 120°C sıcaklıkta 15 dakika otaklavlandı. Otaklavdan çıkan NGM'nin 55°C sıcaklığa gelmesi beklendi. Sonrasında besiyerine 1mL kolesterol, 1 mL 1M MgSO<sub>4</sub>, 25 mL 1,5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 1mL 1M CaCl<sub>2</sub> ilave edildi. Besiyeri karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra petri kaplarına döküldü ve katılaşması beklendi. Katılaştıktan besiyerinin üzerine 400µL *E. coli* OP50 suşu yayıldı.

### 2.3.2 *E. coli*'nin OP50 Suşu İçin TBX Agar Hazırlanması

9,125 g TBX (Tryptone Bile Glucuronide Agar) agar tartıldı ve üzerine 250 mL saf su ilave edildi. 125°C sıcaklıkta 15 dakika otaklavlandı ve 55 °C'ye soğuması beklendi. Sonrasında petrilere döküldü. Katılaştıktan sonra kullanıma hazır hale gelen TBX'lere *E. coli* ekilip 37°C de 24 saat bekletilir. Bu işlem stok ile gelen *E. coli*'nin OP50 suşunu eğer olası bir kontaminasyon varsa ayırt etmek için yapılmaktadır.

### 2.3.3 *E. coli* OP50 Suşunun Hazırlanması

9,125 g Lauryl Sulfate Broth (LST) hassas terazide tartılıp 250 mL saf su eklenip, 121 °C de 15 dk otaklavlanır ve süre sonunda 37 °C ye soğutulur. Soğutulan LST' ye, bir kolonilik *E. coli* ekilip 37 °C de 24 saat etüvde bekletilir. Bulanıklık *E. coli*'nin ürettiğinin göstergesidir. Bu sıvıdan 400 µl alınıp daha önce hazırlamış olduğumuz NMG üzerine eklenir.

### 2.3.4 Hipoksik Ortam Oluşturulması

Hipokloritle muamele edilmiş yetişkin *elegans*lardan alınan embriyoların, 20°C' de M9 tamponunda 16 saat süreyle inkübe edilmesiyile L1 solucanları elde edilir. Solucanlar daha

sonra *E. coli* OP50 ile taze NGM agar plakalarına yayılır ve 3 gün boyunca 20 °C' de inkübe edilir. Hipoksi modelini oluşturmak için M9 tamponunda üç farklı konsantrasyonda (0.5, 1.0 ve 2.0 g/L) sodyum sülfid solüsyonları hazırlanır. 3. gün solucanlar M9 tamponu ile üç kez yıkanır ardından 1 mL taze inkübasyon solüsyonunda 1.5 mL tüplere aktarılır ve 26 °C' de farklı zaman aralıklarında inkübe edilir. İnkübasyondan sonra canlılar 20 °C' de 24 saat geri kazanıma izin vermek için NGM plakalarına aktarılır.

### **2.3.5 *Caenorhabditis elegans*'lardan Total RNA İzolasyonu**

M9 tamponu ile yıkanarak besiyerlerinden toplanan canlılar falkon içerisine konur ardından 1 saat buz üzerinde bekletilir. Üzerlerindeki M9 aspire edilerek falkon içerisine 5mL taze M9 eklenir ardından 15 dk buz üzerinde bekletilir. M9 tamponu tekrar aspire edilerek canlılar 1,5 mL' lik tüplere alınır. Tüpler santrifüj edilerek pellet oluşturulur. Süpernatant uzaklaştırılarak pelletin üzerine 1 mL Trizol ilave edilir. Tüpler sıvı nitrojene atılarak hızlıca dondurulur ardından 37°C'de eritilir, bu işlem 5 kere tekrarlanır. Son çözülmeden sonra 3200 rpm'de 30 sn santrifüj yapılır sonrasında örneklerin üzerine 200 µL kloroform ilave edilir. 15 sn kuvvetlice çalkalanan örnekler oda ısısında 15 dk inkübe edilir. Süre sonunda 15dk 12.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Sulu faz yeni tüpe alınır ve üzerine 500 µL izopropil alkol eklenir. 10 dk oda ısısında inkübe edilen örnekler 10 dk 12.000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant dikkatlice alınarak temiz tüpe konur. Üzerine 1 mL %75' lik etanol ilave edilir. 5 dk 7500 rpm'de santrifüj yapılır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakılır.

Kuruyan pelletler, 30-50µL ddH<sub>2</sub>O ile çözülür. RNA miktar tayini bölüm 2.2.3.2' de belirtilen şekilde yapılmıştır.

### **2.3.6 Real-Time PZR Analizi**

*C.elegans*'ta gerçekleştirecek bu analiz için 2.3.1.3'te belirtildiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında kontrol PZR'ı için *C.elegans*' larda normalizatör bir gen olan CDC-42 primerleri kullanılarak kuruldu. 2.3.1.6'da'de belirtilen şekilde Real-Time PZR yapılarak CAH-3, CAH-4, CAH-5 genlerinin deney gruplarındaki ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Ce-HIF primeri ile hipoksik koşullar doğrulanmıştır.

**Tablo 2.9:** Çalışmada kullanılan primerler.

PRİMERLER	ÜRÜN BÜYÜKLÜĞÜ	FORWARD PRİMER DİZİSİ	REVERSE PRİMER DİZİSİ
CAH-3	70 bç	5'AATCCGGAGACAGTGA CTCTCGTG -3'	5'-AACGACCTCTTGTTGCTGGC-3'
CAH-4	81bç	5'-ACAGCTCAACGTGCTCCGTAA-3'	5'-GGAAGATCGGATTCACGGTC-3'
CAH-5	84 bç	5'CACGATCTGAGACTCTGGCA-3'	5'-AGAACGCTTCCGTGTCTAGTGG-3'
CDC-42	203 bç	5'-AGCCATTCTGGCCGCTCTCG-3'	5'-GCAACCGCTTCTCGTTTGGC-3'
Ce-HIF	211 bç	5'-CAACGTGTTTATGGGCAAAT-3'	5'-CATTGCAAAAACGTCATCGTA-3'

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Biyoinformatik Analizler

İnsan karbonik anhidraz VII geninin (CA VII) (NM\_005182.2) dizisine ve *C.elegans*, CAH-3(NC\_003284.9), CAH-4(NC\_003284.9), CAH-5(NC\_003284.9) dizilerine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet sitesinden ulaşılmıştır. Blast, OligodT Analyzer, Reverso complement gibi programlar kullanılarak primerlerin dizaynı gerçekleştirilmiştir. Primerler tasarlanırken, bağlanma sıcaklıklarının yakın ve 55-60°C civarında olmasına, uzunluklarının 25-27 bp'yi geçmemesine, hedef gene spesifik bağlanmalarına ve saç tokası yapısı oluşumlarına dikkat edilmiştir.

##### 3.1.1 İnsan CA VII Geni Analizleri

NCBI, NM\_005182.2 kodlu dizi üzerinde çalışmaları yapılmıştır. İlgili genin primer dizaynı için CDS bölgesi bulunarak ekzon ve intronları işaretlenmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ekzon1- ekzon2 arasındaki 187 bp'lik bir bölgeyi çoğaltmaktadır.

```
1  ggggcccggag cgcgagcccg aacgagcggg cggagcccag cgggcccagg caccgctgag
61  ggggcccggag cggcatgacc ggcaccaccg gctggggcta cggcccaggac gaccgcccct
121 cgcattggca caagctgtat cccattggcc agggagatcg ccaatoacc atcaatata
181 tctccagcca ggctgtgtac tctccagccc tgcaaccact ggagctttcc tatgaggcct
241 gcatgtccct cagcatcacc aacaatggcc actctgtcca ggtagacttc aatgacagcg
301 atgaccgaac cgtggtgact gggggccccc tggaaaggcc ctaccgctc aagcagtttc
361 acttccactg gggcaagaag cagcatgtgg gttctgagca caccgtggac ggcaagtctc
421 tccccagcga gctgcatctg gttcactgga atgccaagaa gtacagcact tttggggag
481 cggcctcagg acctgatggc ctgactgtgg ttggttttt tttggagaca ggagacgagc
541 accccagcat gaatcgtctg acagatggcg tctacatggt cgggttcaag gdcaccaaac
601 cccagttcag ctgcttcaac cccaagtgc tctgctgac cagccggcac tactggacct
661 acccgggctc tctgacgact ccccactca gtdagagtgt cacctggatt gtgctccggg
721 agcccactctg catctctgaa aggcagatgg gaaagtccg gagcctgctt tttacctcgg
781 aggacgatga gaggatccac atggtgaaca acttccggcc accacagcca ctgaaaggcc
841 gcgtggtaaa ggcctccttc cgggctgag ctgcccactt gcctagccgg cccactagggc
901 accatcttct caaggcttc catgtcagca gacaccaaac catctgaggc ttccctccctg
961 gggggtgctg gggaccctcc ttcagccagt ttgctccttg gtcaccctgg aggcttctgg
1021 atgggacctc tgagtctggg gcacccttca gctgcccctg ggacaggaag gacagggact
1081 aagcagggtc caagcctggg gctgcccctg ctctccaaga cccaagacc ctgggaacct
1141 cctctggtct tcccactgg cagtggcagc agcccacc cggagcaca ctgtgatgg
```

Şekil 3.1: CA VII geni ekzonları.

(Yeşil 1. Ekzon, Gri 2. Ekzon, Mavi 3. Ekzon, Koyu Yeşil 4. Ekzon, Pembe 5. Ekzon, Kırmızı 6. Ekzon, Lacivert 7. Ekzon)

Nükleotit Blast yapıldığında tasarlanan primerler ilgili gene %100 bağlanmaktadır. Başka bir gen bölgesini %100 çoğaltmamakla birlikte, diğer genlere bağlanma olasılığı %70'in altında tutulmuştur. Bağlanma sıcaklıkları ileri primer için 55°C, geri primer için 57°C'dir.

### 3.1.2 *C.elegans* CA VII Benzeri Genlerin Analizleri

Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan *C.elegans*' ta, insan CA VII geni ile benzer genler taranmıştır. Literatür araştırmaları sonucunda CA VII benzeri genler bulunmuştur Bu genler CAH -3; %97.2, CAH-4, % 77.9; CAH-5, % 81 ve CAH-6, % 76.2 oranları ile hCAVII ile benzerlik gösterdiği 2008 yılında Hall ve ark. tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. İnsan CA genlerinin *C.elegans*' taki CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 genleri ile benzerlikleri bulmak için BioEdit programında tüm insan CA'ları (CA I, CA II.....,CA XII) ile CAH-3, CAH-4, CAH-5 genlerinin aminoasit dizileri hizalanmıştır. Blast ile ilgili genlerin benzerlikleri yüzde oranında bulunmuştur. Yapılan bu analizler Ek B' de gösterilmiştir.

Ek B incelendiğinde tarafımızca yapılan benzerlik analizi sonuçlarına göre de insan CA VII genine en yüksek benzerlik gösteren *C.elegans* CA benzeri genleri CAH-3 (NC\_003284.9), CAH-4 (NC\_003284.9) ve CAH-5 (NC\_003284.9) tespit edildiğinde bu genleri ile çalışılmıştır. Tüm genler tek bir ekzonda bulunmaktadır. CAH-3 primerleri 70 bç, CAH-4 primerleri 81 bç ve CAH-5 primerleri ise 84 bç'li alanı çoğaltmaktadır ve tüm primerlerin dizileri tablo 2.9' da gösterilmiştir. Tüm CAH primerlerinin bağlanma sıcaklığı 55°C'dir (Hall vd., 2008).

## 3.2 İnsan CA VII Geni mRNA Analizleri

### 3.2.1 Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu

Çalışmalarımız öncesinde ekspresyon primerlerlerimizin çalıştığından emin olmak ve Real-Time PZR basamağındaki sıcaklığı belirlemek için standart PZR yapılmıştır. Real-Time PZR çalışmalarında normalizasyon için H $\beta$ -2 primerleri kullanılacağı için çalışmada bu primerler de kullanılmıştır. Kolon kanseri hücre hatları (SW480 ve HT-29), sağlıklı

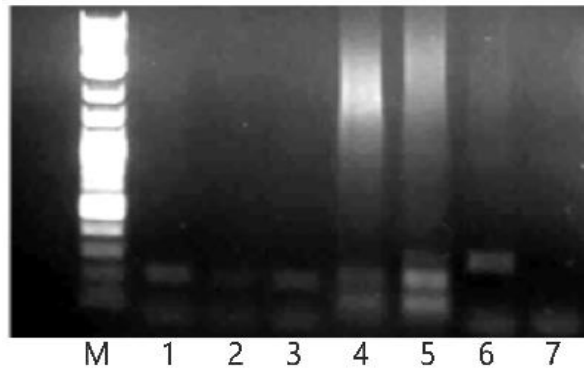
insan endotel hücreleri (HUVEC), Karaciğer hücre hattı (Hep3B), prostat kanseri hücre hatlarında (PC3 ve LnCaP) CA VII geninin ifadesine bakılmıştır.

**Tablo 3.1 :** PZR bileşenleri ve miktarları.

	SW480	HT-29	Hep3B	HUVEC	PC3
cDNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
CA VII İleri Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
CA VII Geri Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	38,5 µL	38,5 µL	38,5 µL	38,5 µL	38,5 µL

**Tablo 3.2:** PZR koşulları.

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



**Şekil 3.2:** Farklı hücre hatlarında CA VII ifadesi.

(M: 1Kb Marker, 1: SW480, 2: HT-29, 3: Hep3B, 4: HUVEC, 5: PC3, 6: Hβ-2, 7: Negatif kontrol)

Bu çalışmada hem primerin kontrolü sağlandı hemde, PZR koşulları optimize edildi. Bununla beraber çalışmalar içerisinde yer alan  $\text{CoCl}_2$  kullanılarak kimyasal hipoksi oluşturularak büyütülen deney gruplarındaki hücrelerde  $\text{CoCl}_2$ 'ün sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi kapsamında daha önce laboratuvarımızda yapılmış olan MTT testleri mevcut olduğundan tekrar bu çalışmalar yapılmadı (Poyrazlı, 2022).

### 3.2.2 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi

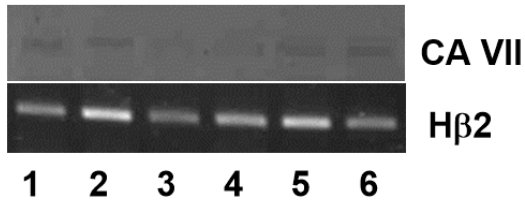
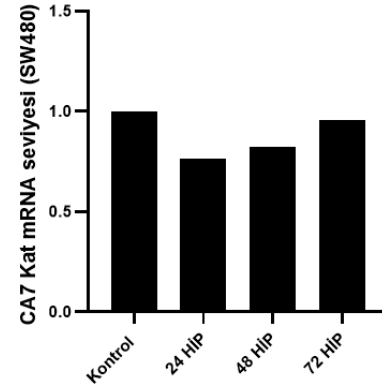
#### 3.2.2.1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

Duces C evresindeki hastalardan alınan dokulardan izole edilen ve kanser araştırmalarında kullanılan SW480 hücreleri epiteliyal morfolojidedirler. 1964'te kolon kanserli bir hastanın primer tümörlerinde izole edilen HT-29 hücreleri epiteliyal morfolojide olup günümüzde kanser araştırmaları ve toksikoloji araştırmalarında kullanılmaktadır. Çalışmamızda normoksik ve hipoksik ortamlarda farklı zaman aralıklarında inkübe edilen SW480 ve HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Öncelikle hücrelerden RNA eldesi 2.2.3.1'de anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. 2.2.3.4' te anlatılan şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA' ların çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için H $\beta$ -2 primerleri ile aşağıdaki koşullarda PZR kuruldu. PZR koşulları tablo 3.3'te gösterildiği gibidir.

**Tablo 3.3:** SW480, H $\beta$ -2 PZR bileşenleri ve miktarları.

	24 saat Normoksi	24 saat Hipoksi	48 saat Normoksi	48 saat Hipoksi	72 saat Normoksi	72 saat Hipoksi	Negatif Kontrol
cDNA	2 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	-
Buffer	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
dNTP	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
H $\beta$ -2 İleri Primer	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
H $\beta$ -2 Geri Primer	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Taq DNA Polimeraz	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	37,5 $\mu\text{L}$	36,5 $\mu\text{L}$	34,5 $\mu\text{L}$	36,5 $\mu\text{L}$	34,5 $\mu\text{L}$	34,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$



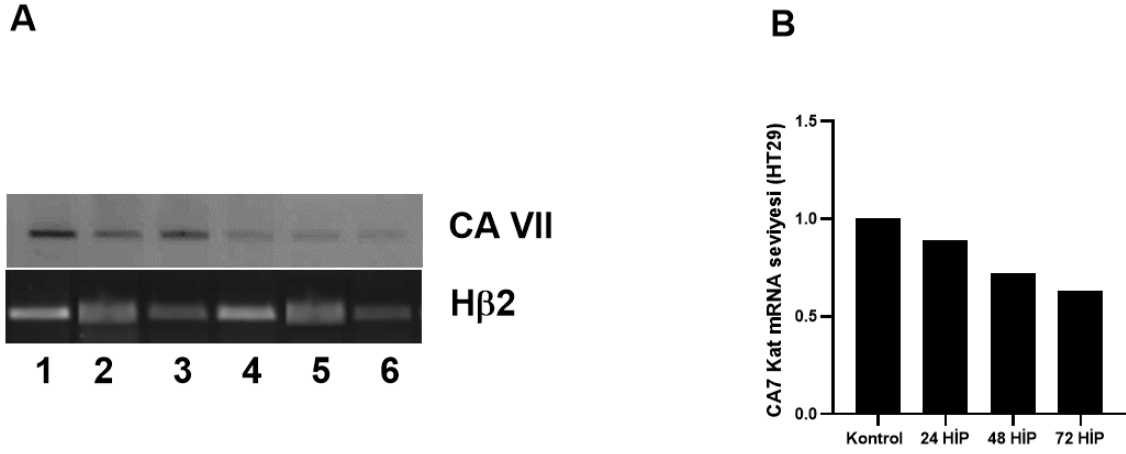
**A****B**

**Şekil 3.3:** A: SW480 hücre hattında, CA VII ve H $\beta$ 2 PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz.

Şekil 3.3' te yapılan densitometrik analizler sonucunda kontrol grubuna kıyasla 24 ve 48. saat dilimlerimde hipoksik koşullarda CA VII ifadesinin azaldığı gözlenmiştir.

**Tablo 3.4:** HT-29, H $\beta$ 2 PZR bileşenleri ve miktarları.

	24 saat Normoksi	24 saat Hipoksi	48 saat Normoksi	48 saat Hipoksi	72 saat Normoksi	72 saat Hipoksi	Negatif Kontrol
cDNA	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	-
Buffer	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
dNTP	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 İleri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 Geri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq DNA Polimeraz	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	39,5 $\mu$ L



**Şekil 3.4:** A: HT29 hücre hattında, CA VII ve H $\beta$ 2 PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz.

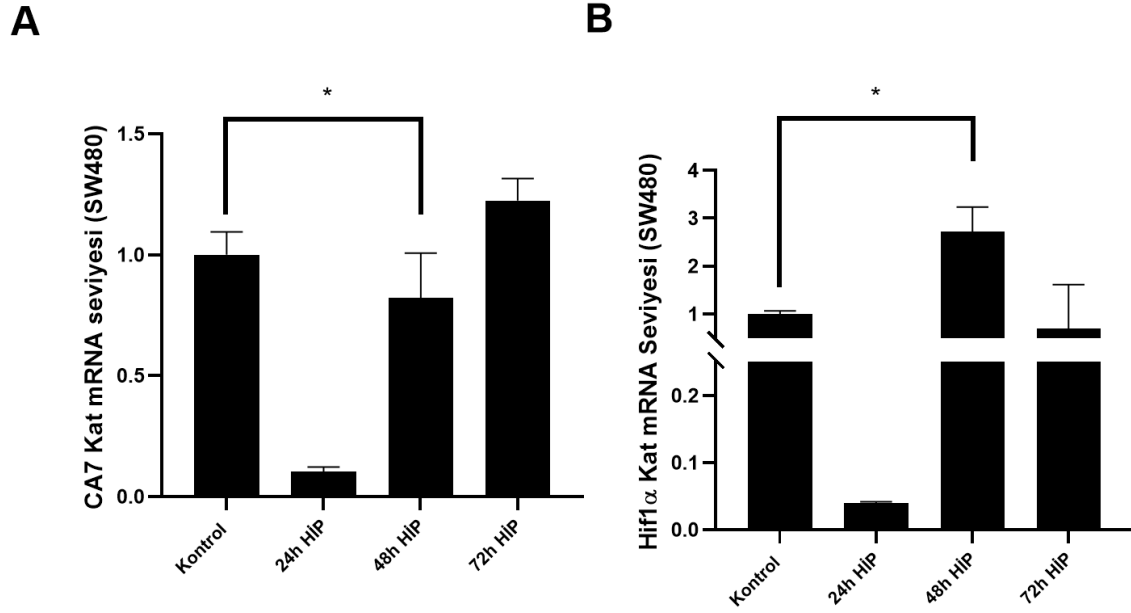
Şekil 3.4 incelendiğinde HT-29 hücreleri ile yapılan densitometrik analizin sonucunda kontrol grubuna kıyasla tüm saat dilimlerinde hipoksik koşullarda CA VII ifadesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

### 3.2.2.2 SW480 ve HT-29 Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

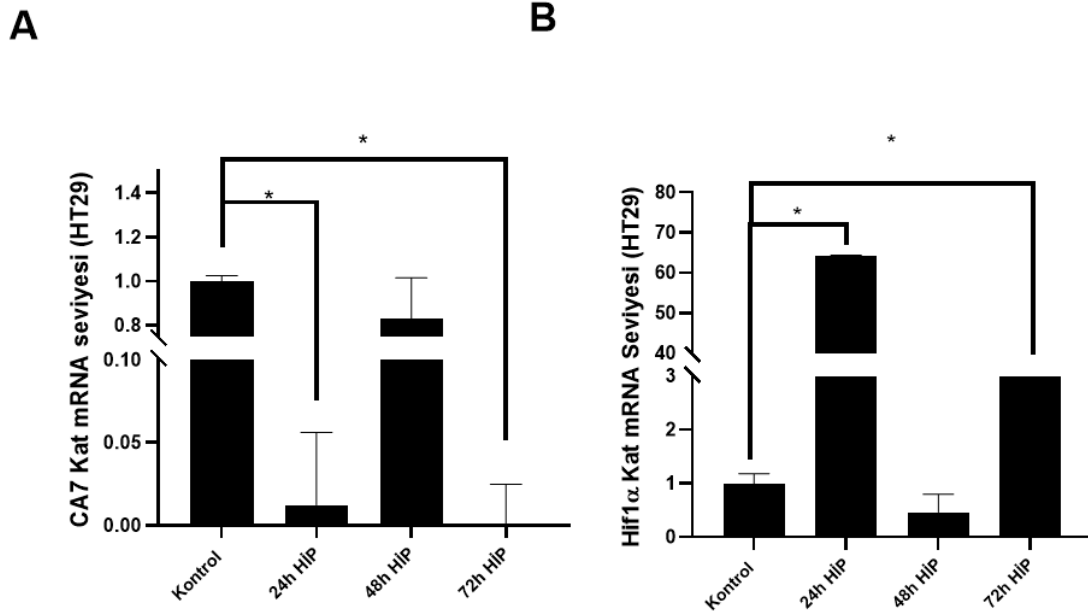
PZR analizinde jelde ifadesi gözlenen CA VII geninin ifadesinin belirlenmesinde daha hassas bir teknik olan Real-Time PZR kullanılmıştır. Hipoksinin doğrulanması için Hif1- $\alpha$  primerleri kullanılmıştır. Hif1- $\alpha$  ifadesindeki artış hipoksinin oluştuğunun kanıtı niteliğindedir. cDNA miktarları tablo 3.3 ve 3.4' te kullanılan miktarlar ile aynı olacak şekilde RT-PZR kurulmuştur. Teknikte kullanılan diğer bileşenlerin miktarları ve reaksiyon koşulları tablo 2.2 ve 2.3'te verilmiştir.

Şekil 3.5 incelendiğinde SW480 hücre hattında hipoksik koşulun yalnızca 48 saatte oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu zaman diliminde CA VII ifadesi incelendiğinde, normal hücre grubuna kıyasla CA VII ifadesinin 48. saat diliminde azalmaktadır bu sonuçlar densitometrik analizler koreledir.

Şekil 3.6 incelendiğinde HT-29 hücre hattında 24 ve 72 saat hipoksik gruplarda hipoksinin ana regülatörü olan Hif1- $\alpha$  seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. Bu zaman dilimlerinde HT-29 CA VII mRNA ifadesi incelendiğinde normal koşullara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.5: SW480 hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$  mRNA seviyesi.



Şekil 3.6: HT29 hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$  mRNA seviyesi.

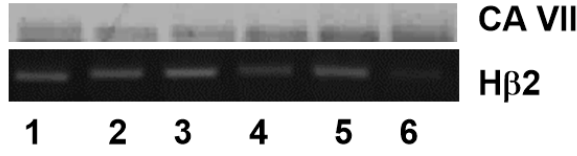
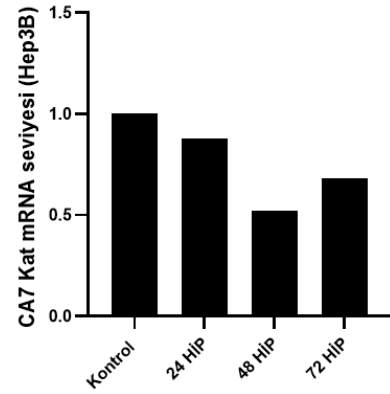
### 3.2.3 Karaciğer Kanseri Hücre (Hep3B) Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi

#### 3.2.3.1 Hep3B Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

Karaciğer kanseri olan siyahi bir çocuktan izole edilen, epiteliyal bir morfoloji sergileyen Hep3B hücreleri entegre bir Hepatit B virüsü genomu içerir. Çalışmalarımızda karaciğer kanserine model olarak Hep3B hücre hattı seçilmiştir. 6 farklı (24 saat normoksi, 24 saat hipoksi, 48 saat normoksi, 48 saat hipoksi, 72 saat normoksi, 72 saat hipoksi) deney grubu kullanılmıştır. Hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözülmüş ve bölüm 2.2.2.1.1.4' de anlatılan şekilde büyütülüp pasajlanmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaştığında sayılarak 6'lı plakalara 500.000 hücre olacak şekilde yayılmıştır. Hipoksik gruplara  $\text{CoCl}_2$  uygulanmıştır ve hücrelerden RNA izolasyonları 2.2.3.1'de anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. 2.2.3.4' te anlatılan şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA' ların kalitesini kontrol etmek için H $\beta$ -2 primerleri ile aşağıdaki koşullarda PZR kuruldu.

**Tablo 3.5:** Hep3B, H $\beta$ -2 PZR bileşenleri ve miktarları.

	24 saat Normoksi	24 saat Hipoksi	48 saat Normoksi	48 saat Hipoksi	72 saat Normoksi	72 saat Hipoksi	Negatif Kontrol
cDNA	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	-
Buffer	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
dNTP	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
H $\beta$ -2 İleri Primer	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
H $\beta$ -2 Geri Primer	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Taq DNA Polimeraz	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	38,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$	38,5 $\mu\text{L}$	39,5 $\mu\text{L}$

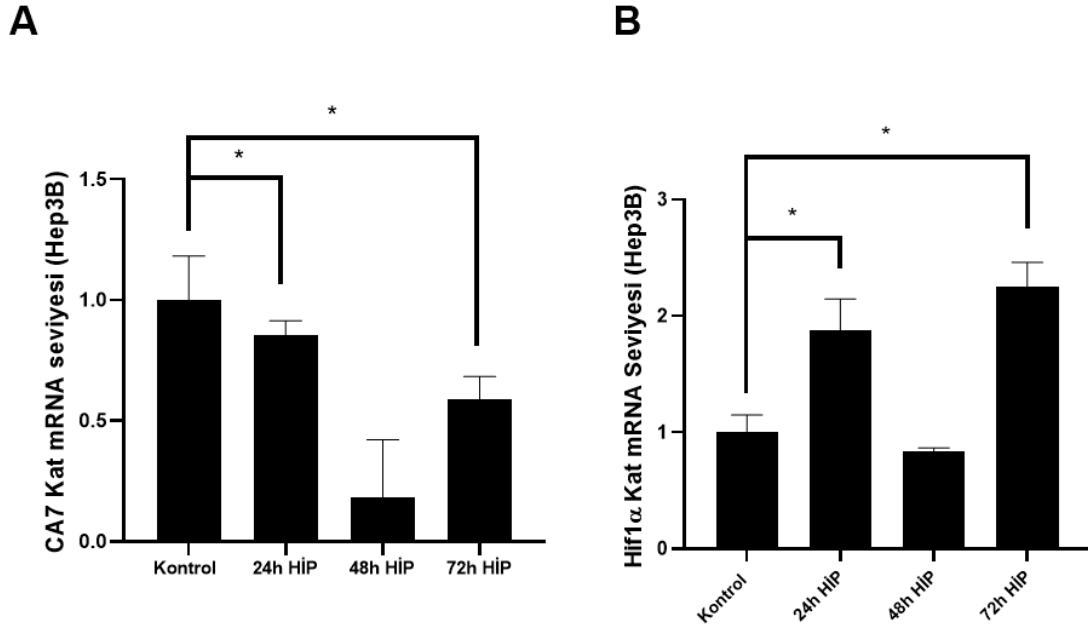
**A****B**

**Şekil 3.7:** A: Hep3B hücre hattında, CA VII ve Hβ2 PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz.

Şekil 3.7' de Hep3B hücreleri ile yapılan densitomerik analiz sonuçları tüm saat dilimlerinde hipoksik koşullarda CA VII ifadesinin azaldığını göstermektedir.

### 3.2.3.2 Hep3B Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

Hep3B hücre hattında CA VII ifadesi PZR ile kanıtlandıktan sonra ilgili genin ifadesine daha hassas bir teknik olan Real-Time PZR ile bakılmıştır. Hipoksiyi doğrulamak için Hif1-α ifadesine bakılmıştır. Hif1-α ifadesindeki artış hipoksinin oluştuğunun kanıtıdır.



**Şekil 3.8:** Hep3B hücre hattında CA VII ve Hif1- $\alpha$  mRNA seviyesi.

Şekil 3.8 incelendiğinde 24 ve 72 saatlik gruplarda hipoksinin başarılı bir şekilde oluştuğu gözlenmiştir. CA VII ifadesinin çalışılan tüm zaman dilimlerinde azaldığı tespit edilmiş ve 24 ve 72 saatlik zaman dilimlerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür.

### 3.2.4 İnsan Sağlıklı Endotel Hücre Hattında (HUVEC) Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi

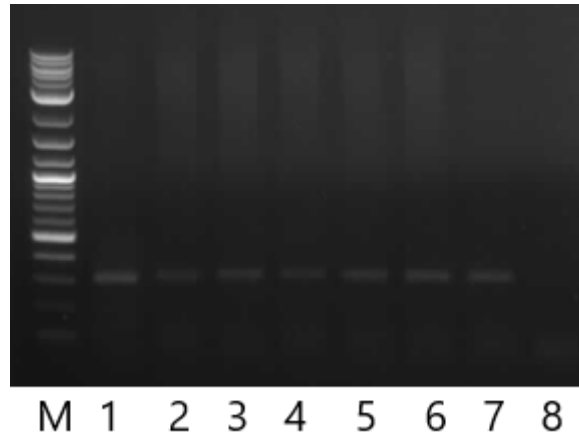
#### 3.2.4.1 HUVEC Hücre Hattında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

Göbek kordonu damarından izole edilen endotel hücre hattı olan HUVEC, sitotoksosite, kardiyovasküler hastalıklar gibi konuların araştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Çalışmamızda CA VII ifadesini kanser hücre hatlarında belirtirken, insan sağlıklı endotel hücre hattında da ifade profilinin gözlenmesi için HUVEC hücre hattı ile de deneyler yapıldı. Çalışmada 6 farklı (24 saat normoksi, 24 saat hipoksi, 48 saat normoksi, 48 saat hipoksi, 72 saat normoksi, 72 saat hipoksi) deney grubu kullanılmıştır. Öncelikle hücrelerden RNA eldesi 2.2.3.1’de anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. 2.2.3.4’te

anlatılan şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA'ların çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için H $\beta$ -2 primerleri ile aşağıdaki koşullarda PZR kuruldu.

**Tablo 3.6:** HUVEC, H $\beta$ 2 PZR bileşenleri ve miktarları.

	24 saat Normoksi	24 saat Hipoksi	48 saat Normoksi	48 saat Hipoksi	72 saat Normoksi	72 saat Hipoksi	Negatif Kontrol
cDNA	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	-
Buffer	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
dNTP	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 İleri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 Geri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq DNA Polimeraz	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	35,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	39,5 $\mu$ L

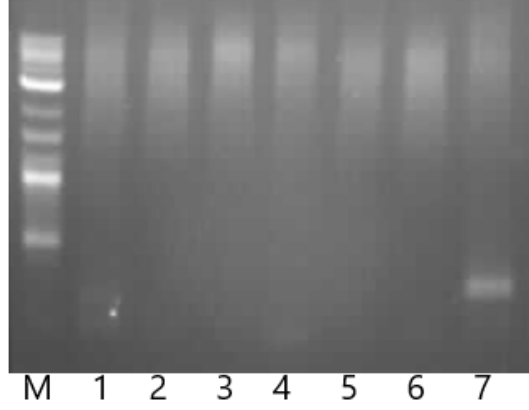


**Şekil 3.9:** HUVEC hücre hattında, H $\beta$ 2 PZR agaroz jel görüntüsü.

(M: 1kb marker, 1: 24 saat Normoksi, 2: 24 saat Hipoksi, 3: 48 saat Normoksi, 4: 48 saat Hipoksi, 5: 72 saat Normoksi, 6: 72 saat Hipoksi, 7: Negatif Kontrol)

Kurulan H $\beta$ 2 PZR bize hücrelerden izole ettiğimiz RNA'lardan elde edilen cDNA'ların çalıştığını ve tablo 3.7' de gösterilen miktarlarda tüm bantların eşit olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı HUVEC hücre hattında CA VII ifadesinin gözlenebilmesi için tablo 3.6'de

belirtilen miktarlarda kalıp DNA kullanılarak CA VII PZR'ı kurulmuştur. Reaksiyon koşulları tablo 3.2' de gösterilmiştir.



**Şekil 3.10:** HUVEC hücre hattında, CA VII PZR agaroz jel görüntüsü.

(M: 1kb marker, 1: 24 saat Normoksi, 2: 24 saat Hipoksi, 3: 48 saat Normoksi, 4: 48 saat Hipoksi, 5: 72 saat Normoksi, 6: 72 saat Hipoksi, 7: Pozitif Kontrol)

Şekil 3.10' te görüldüğü üzere HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72. saat dilimlerinde normoksik ve hipoksik koşullarda kurulan çok tekrarlı deneylerin hiçbirinde CA VII ifadesi gözlenmemiştir. Dolayısıyla Real-Time PZR ile CA VII ifadesine bakılmamıştır.

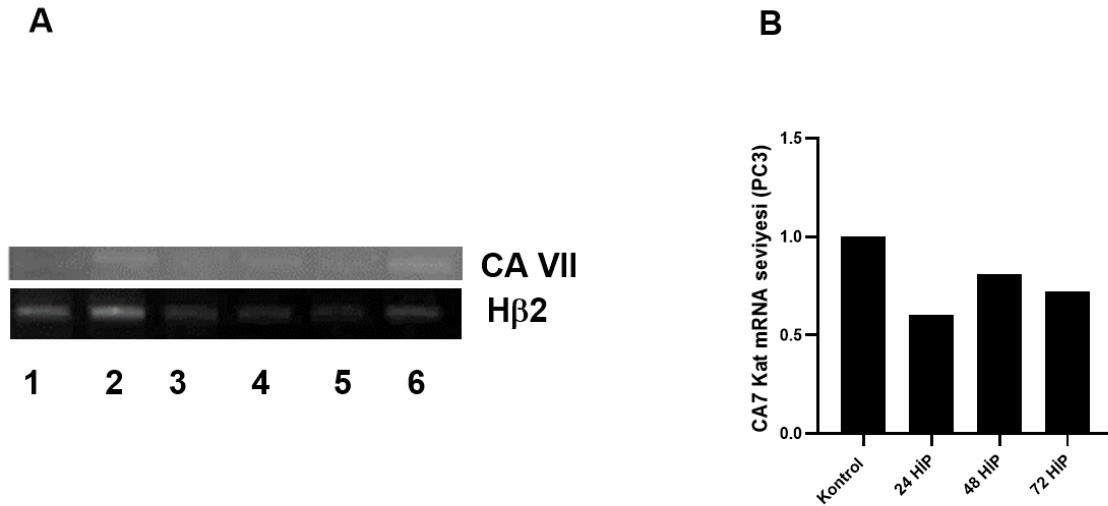
### **3.2.5 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda CA VII İfadesinin Gösterilmesi**

#### **3.2.5.1 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi**

PC3, prostat kanseri araştırmalarında ve ilaç geliştirmede kullanılan, epiteliyal morfolojiye sahip bir insan prostat kanseri hücre hattıdır. PC3 hücreleri, ilerlemiş prostat kanseri hücrelerindeki biyokimyasal değişikliklerin araştırılmasında ve bunların kemoterapötik ajanlara tepkilerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Onkolojide yaygın olarak kullanılan bir prostat kanseri hücre hattı da LnCaP'lerdir. İlk olarak bir erkeğin lenf nodu



metastazından izole edilen androjene duyarlı olan hücreler epitaryal morfoloji gösterirler. Çalışmamızda bu iki farklı prostat kanseri hücre hatları deneyler kurulmuştur. PC3 hücre hatlarında 24, 48, 72. saat dilimlerinde normoksik ve hipoksik koşullarda kurulmuştur. LnCaP hücre hattında ise geç saat dilimlerinde hücrelerin bulunduğu kültür kaplarından kalkmaları sebebi ile 6, 24 ve 48 saat dilimlerinde normoksik ve hipoksik koşullarda RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bölüm 2.2.3.4' te anlatılan şekilde cDNA eldesi gerçekleştirilerek cDNA'ların çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için H $\beta$ 2 primerleri ile PZR kurulmuştur. LnCaP hücre hattında H $\beta$ 2 PZR tablo 3.7' de belirtilen miktarlarda kurulmuştur. Her iki hücre hattında PZR sıcaklık ve döngüleri tablo 3.2' de verilmiştir. H $\beta$  2 PZR ile cDNA'ların çalıştığını kontrol ettikten sonra bu hücre hatları ile CA VII ifadesinin gözlenmesi için PZR kurulmuştur.

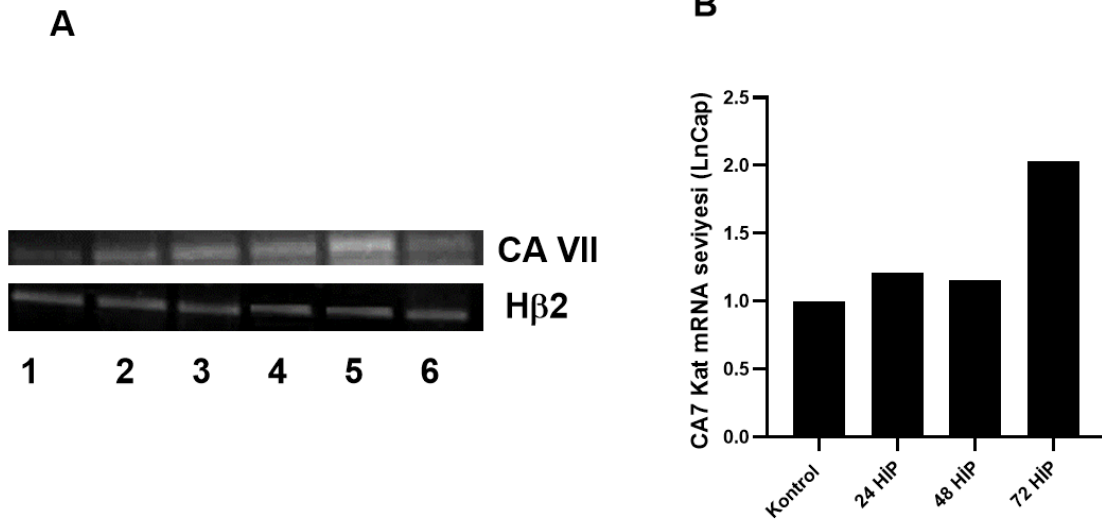


**Şekil 3.11:** A: PC3 hücre hattında, CA VII ve H $\beta$ 2 PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz.

Şekil 3.11 incelendiğinde tüm zaman dilimlerinde CA VII ifadesinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

**Tablo 3.7:** LnCaP, H $\beta$ 2 PZR bileşenleri ve miktarları.

	24 saat Normoksi	24 saat Hipoksi	48 saat Normoksi	48 saat Hipoksi	72 saat Normoksi	72 saat Hipoksi	Negatif Kontrol
cDNA	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	4 $\mu$ L	1 $\mu$ L	4 $\mu$ L	1 $\mu$ L	-
Buffer	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
dNTP	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 İleri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
H $\beta$ -2 Geri Primer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq DNA Polimeraz	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	35,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L	39,5 $\mu$ L



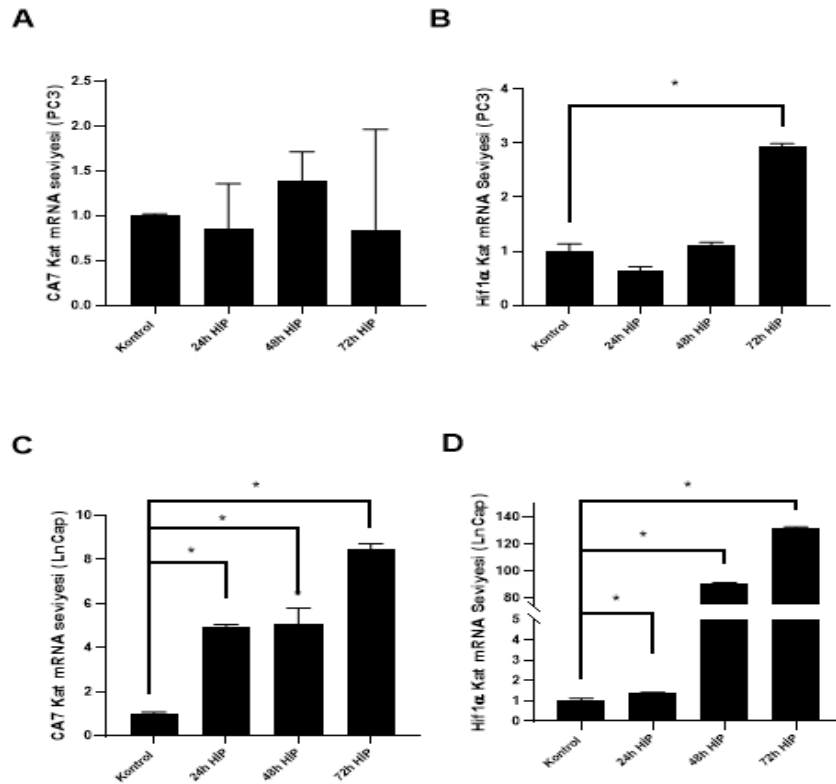
**Şekil 3.12:** A: LnCaP, H $\beta$ 2 ve CA VII PZR jel görüntüsü (1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi), B: Densitometrik analiz.

Şekil 3.12 incelendiğinde LnCap hücrelerinde tüm zaman dilimlerinde hipoksik koşullarda CA VII ifadesinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

### 3.2.5.2 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Normal ve Hipoksik Koşullarda Real- Time PZR ile CA VII İfadesinin Gösterilmesi

Çalışmada kullanılan prostat kanseri hücre hatlarında CA VII ifadesi gözlenmiştir. Hem deney gruplarında oluşturulan hipoksinin doğrulanması hem de CA VII ifadesindeki değişiminin belirlenebilmesi için Real-Time PZR kurulmuştur. Kalıp DNA'lar PC3 ve LnCaP hücre hatlarında kurulan H $\beta$ 2 PZR' ında kullanılan miktarlarda kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları ve Real-Time PZR bileşenleri tablo 2.2 ve 2.3 'te gösterilmiştir.

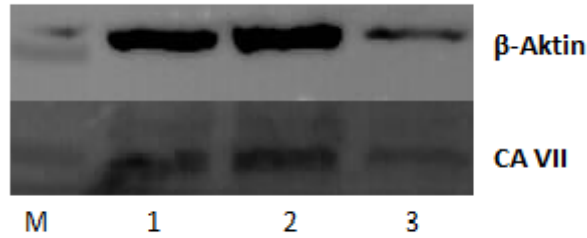
Şekil 3.13 incelendiğinde PC3 hücre hattında 72 saat diliminde artan Hif1- $\alpha$  seviyesi hipoksiyi doğrulamaktadır. Bu saat dilimin kontrol grubuna kıyasla CA VII ifadesi azalmaktadır ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. LnCaP hücre hattındaki sonuçlar incelendiğinde 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde hipoksinin başarılı bir şekilde oluştuğu ve CA VII mRNA ifadesinin bu zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.13: A: PC3, CA VII mRNA ifadesi, B: PC3, Hif1- $\alpha$  mRNA ifadesi, C: LnCaP, CA VII mRNA ifadesi, D: LnCaP Hif1- $\alpha$  mRNA ifadesi.

### 3.3 İnsan CA VII Geni Protein Analizleri

SW480, HT-29, HUVEC, HEP-3B, PC3 ve LnCaP hücre hatlarında CA VII ifadesinin protein seviyesinde tespit etmek amacıyla hücreler büyütüldü. Yeterli büyüklüğe ulaşan hücreler sayılarak 6'lı plakalara 500.000 hücre olacak şekilde yayıldı. 1 gece yüzeye tutunması beklenen hücrelere 24,48 ve 72. saatlerde CoCl<sub>2</sub> uygulanarak hipoksi oluşturuldu. Zamanı dolan deney gruplarındaki hücreler Ripa Buffer ile bir spatula kullanılarak bölüm 2.2.4.1.1' de anlatıldığı şekilde protein izolasyonları gerçekleştirildi. Ardından bölüm 2.4.1.1.2' de anlatıldığı şekilde proteinlerin miktarları ölçüldü. SDS jellere elde edilen proteinlerden yaklaşık 35 µg yüklendi ve 80V da yürütme bölüm 2.2.4.1.1.4' te anlatıldığı şekilde yapıldı. Ardından SDS jel bölüm 2.3.2.1.1.4' te anlatıldığı şekilde 1 gece blotlandı. Transferden alınan proteinlerin bantlarının görüntülenmesi bölüm 2.2.4.1.1.6' te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Western blotta görüntülenen membranlardaki bantlar İmaj J programında analiz edildi. Çalışmada kullanılan Santa Cruz Biotechnology' den temin edilen antikorlardan CA VII (G-7): sc-166721 yalnızca 1 kez çalışmıştır. Sonraki çoklu denemelerde başarılı sonuç alınamamıştır.



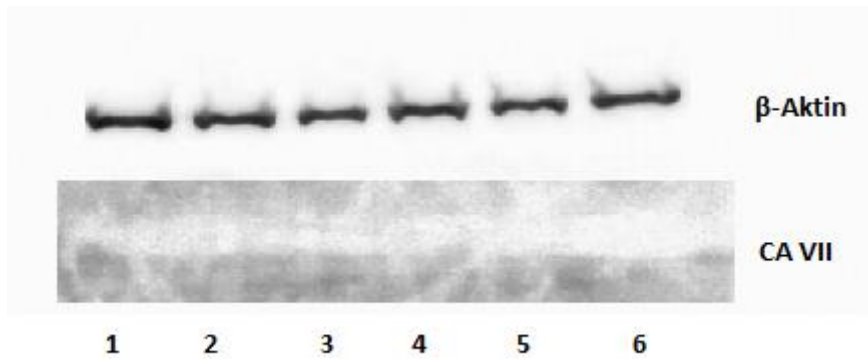
**Şekil 3.14:** Farklı hücre hatlarında CA VII'nin protein ifadesi (1: SW480 kolon kanseri hücre hattı, 2: HT-29 kolon kanseri hücre hattı, 3: LnCaP prostat kanseri hücre hattı (Kullanılan antikor CA VII (G-7): sc-166721).

Firmaya antikorun çoklu denemelerde çalışmadığı rapor edilmiş ve firmadan ikinci kez antikor alınmıştır. Temin edilen CA VII (G-7): sc-166783 kodlu 2. CA VII antikor ise hiç çalışmamıştır. Bazı durumlarda western blot tekniğinde çalışmayan antikorlar IFC tekniğinde çalışmaktadır. Bu sebeple IFC deneylerinde CA VII (G-7): sc-166783 antikoru

kullanılmıştır. Çalışmamız kapsamında olan hücre hatlarıyla 24 saat diliminde normal ve hipoksik koşullarda bölüm 2.2.4.2' de anlatılan şekilde IFC deneyleri yapıldı.

### 3.4 Çalışmada Kullanılan Tüm Hücre Hatlarında CA VII Geni Protein Analizleri (Western Blot/IFC)

Çalışmada SW480, HT-29, HUVEC, Hep3B, PC3, LnCaP hücre hatları kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde normal ve hipoksik koşullarda RNA izolasyonları yapılmıştır (LnCaP hariç, bu hücre hatında 6, 24, 48 saat dilimlerinde deneyler kurulmuştur). Western blot ile CA VII ifadesi antikor çalışmadığı için gözlenememiştir. IFC deneyinde 24 saat diliminde normal ve hipoksik ortamda kurulan deneylerde ise CA VII ifadesi protein seviyesinde belirlenmiştir.



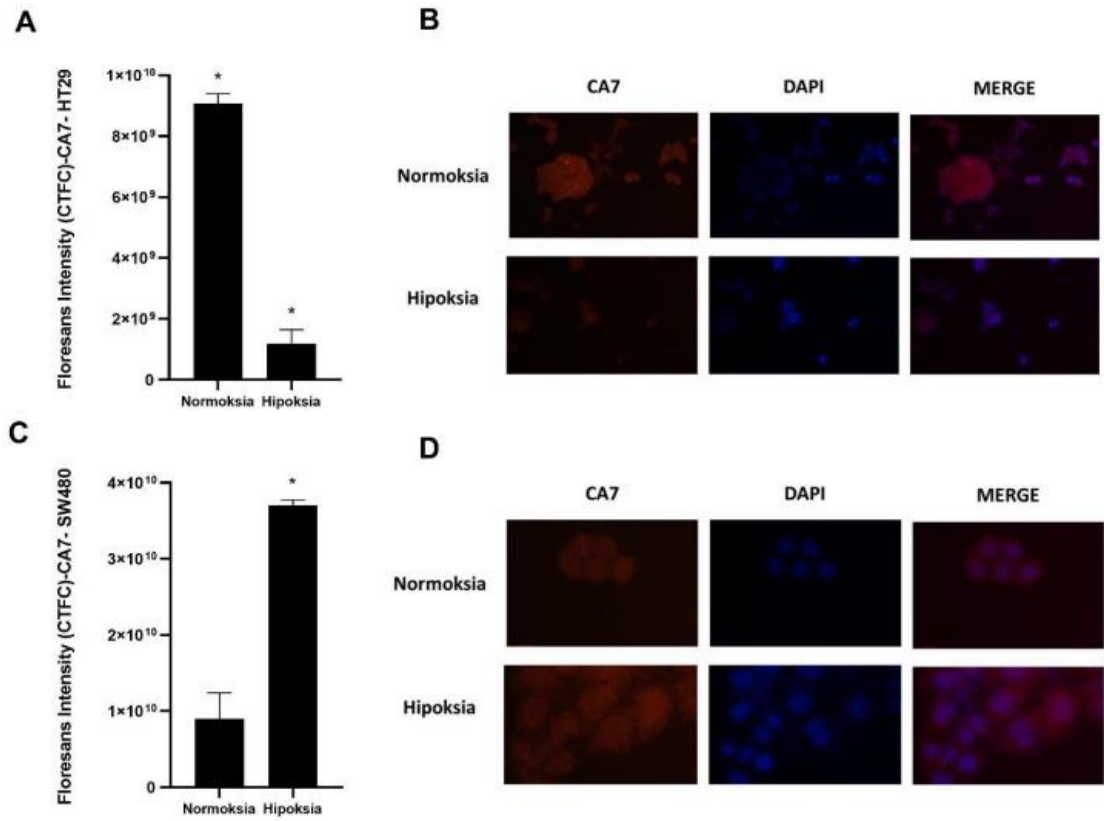
**Şekil 3.15:** SW480 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



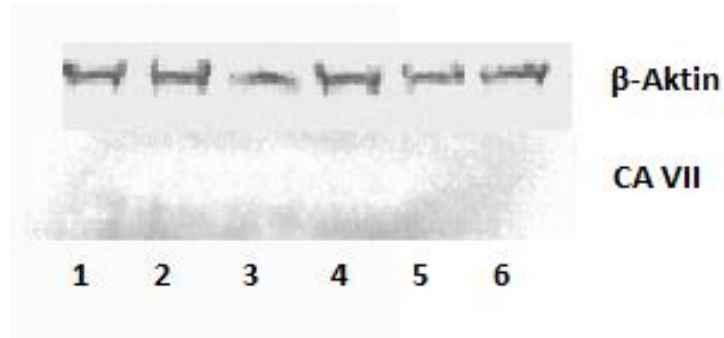
**Şekil 3.16:** HT-29 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



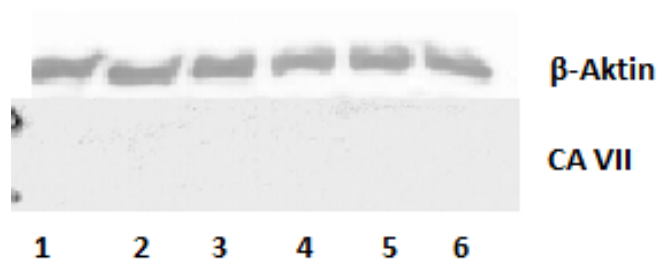
**Şekil 3.17:** HT-29 ve SW480 hücre hatlarında CA VII proteininin IFC analizi.

IFC analizlerine göre SW480 ve HT-29 hücre hatlarında protein düzeyinde CA VII ifadesi gözlenmektedir. Bununla beraber şekil 3.17’de A ve B’ ye bakıldığında HT-29 hücre hattında hipoksik koşullarda CA VII ifadesinin azaldığı görülmektedir. C ve D’ de ise hipoksik koşullarda SW480 hücre hattında CA VII ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar özellikle HT-29 hücre hattı için mRNA analizleri ile örtüşmektedir.



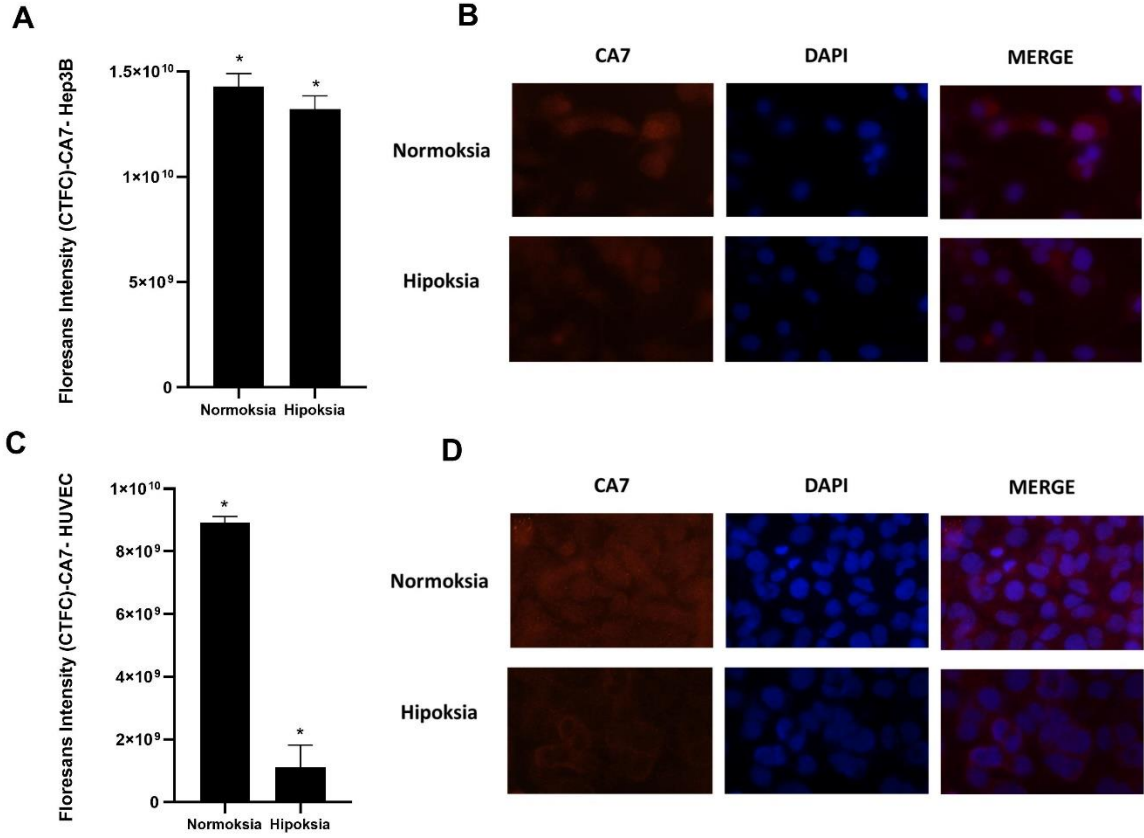
Şekil 3.18: Hep3B hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



Şekil 3.19: HUVEC hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

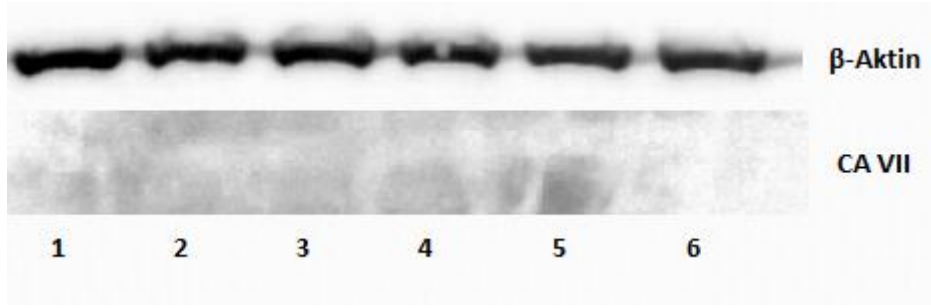
(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



**Şekil 3.20:** Hep3B ve HUVEC hücre hatlarında CA VII proteininin IFC analizi.

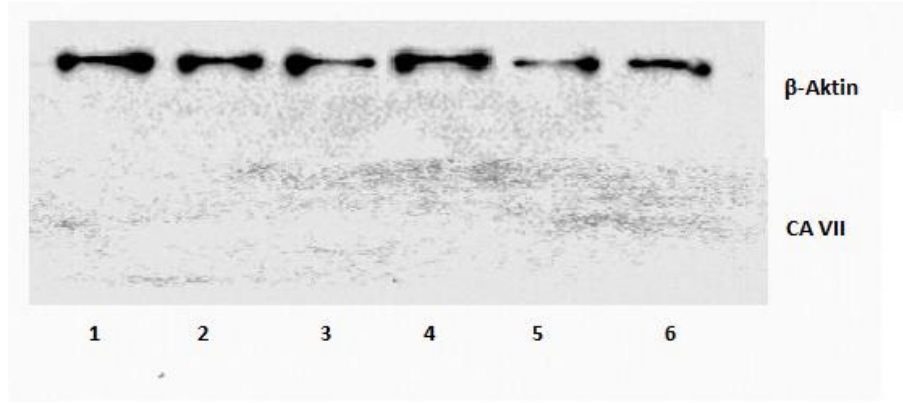
Şekil 3.20’ te görüldüğü üzere Hep3B hücre hattında hipoksik koşullarda CA VII ifadesi normal koşullara kıyasla az bir düşüş göstermektedir. Bu sonuç CA VII mRNA sonucu ile koreledir. mRNA seviyesinde HUVEC hücre hattında CA VII seviyesi tespit edilemezken protein düzeyinde bu hücre hattında CA VII proteini tespit edilmiştir. Ayrıca bu hücre hattında normal ortama kıyasla hipoksik ortamdaki hücrelerde CA VII ifadesinde ciddi bir düşüş tespit edilmiştir.





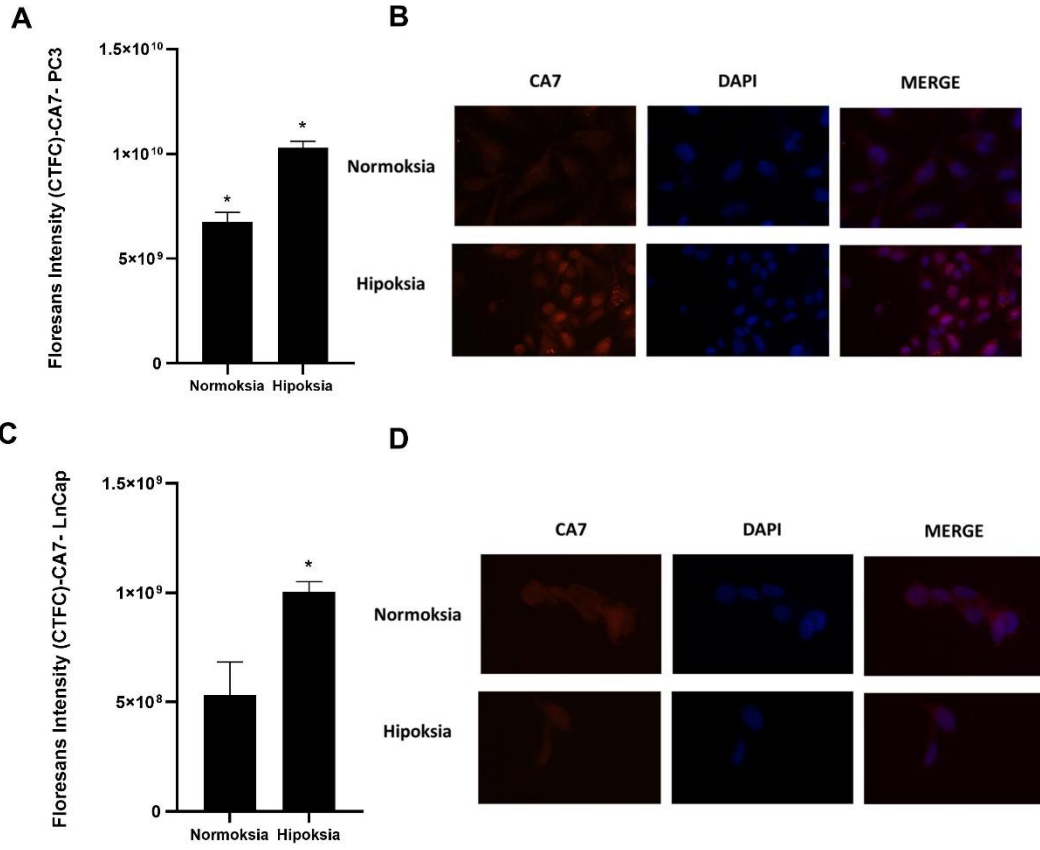
**Şekil 3.21:** PC3 hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



**Şekil 3.22:** LnCaP hücre hattında CA VII protein ifadesinin western blot analizi.

(1: 24 saat normoksi, 2: 24 saat hipoksi, 3: 48 saat normoksi, 4: 48 saat hipoksi, 5: 72 saat normoksi, 6: 72 saat hipoksi)



**Şekil 3.23:** PC3 ve LnCaP hücre hatlarında CA VII proteininin IFC analizi.

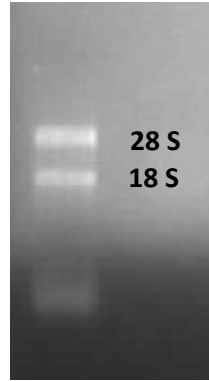
Western blot analizi ile protein ifadesi belirlenemeyen PC3 ve LnCaP hücre hatlarında yapılan IFC analizleri şekil 3.23’ de gösterilmiştir. Sonuçlara göre iki farklı prostat kanseri hücre hattında da normal ortama kıyasla hipoksik ortamda CA VII ifadesinde önemli bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlar LnCaP hücre hattı için mRNA seviyesi ile uyumludur.

### 3.5 *C.elegans* CA VII Benzeri Genlerin mRNA Analizleri

#### 3.5.1 Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu

Çalışmalarımıza başlamadan önce ekspresyon primerlerimizin çalıştığından emin olmak ve Real-Time PZR basamağındaki sıcaklığı belirlemek için standart PZR yapılmıştır. Real-Time PZR çalışmalarında normalizasyon için CDC-42 primerleri kullanılacağı için çalışmada bu primerler de kullanılmıştır. *C.elegans* genomunda CA VII benzeri genler olarak seçilen CAH-3 (NC\_003284.9), CAH-4 (NC\_003284.9) ve CAH-5 (NC\_003284.9) genleri ile çalışılmıştır. Tüm primerlerin dizileri tablo 2.9’ da verilmiştir. Çalışmada hipoksinin oluşturulması için sodyum sülfid kullanılmıştır. Hipoksinin doğrulanması için Real-Time PZR ile ceHIF-1 geninin ifadesine bakılmıştır.

İlk olarak *C.elegans*’ lardan total RNA izolasyonu bölüm 2.3.5’ te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. RNA’ların miktarları ölçülmüş ve formaldehid jel elektroforezinde RNA bantı gözlemlenmiştir. Sonrasında RNA’lardan cDNA eldesi bölüm 2.2.3.4’ te anlatılan protokolle yapılmıştır. cDNA’ların kalitesinin belirlenmesi için normalizatör bir gen olan CDC-42’ nin primerleri kullanılarak PZR kurulmuştur.



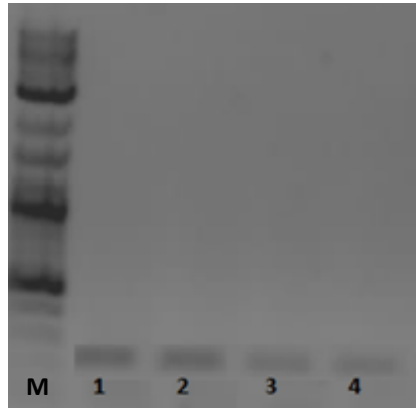
**Şekil 3.24:** *C.elegans* formaldehid jel elektroforezi RNA görüntüsü.

**Tablo 3.8:** CDC-42 PZR bileşenleri.

	1- 4000ng	2- 3000ng	3- 2000ng	4- 1000ng
cDNA	4 µL	3 µL	2 µL	1 µL
Buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Hβ-2 İleri Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Hβ-2 Geri Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	35,5 µL	36,5 µL	37,5 µL	38,5 µL

**Tablo 3.9:** CDC-42 PRZ koşulları.

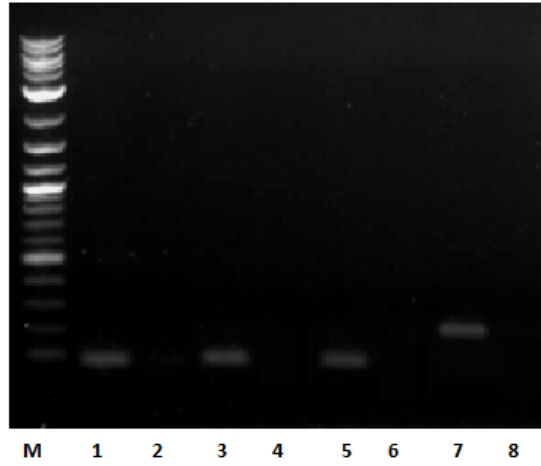
94 °C	3 dk	35 Döngü
94 °C	45 sn	
55°C	45 sn	
72 °C	45 sn	
72 °C	10 dk	



**Şekil 3.25:** CDC-42 PZR agaroz jel elektroforez görüntüsü.

(1: 4000ng cDNA kalıbı ile yapılan PZR sonucu, 2: 3000ng cDNA kalıbı ile yapılan PZR sonucu, 3: 2000ng cDNA kalıbı ile yapılan PZR sonucu, 4:1000ng cDNA kalıbı ile yapılan PZR sonucu, M: Marker 100 kb)

CDC-42 PZR ile cDNA'ların çalıştığını kanıtladıktan sonra CAH-3, CAH-4, CAH-5 primerleri kullanılarak tablo 3.8 ve 3.9' da belirtilen şekilde PZR kuruldu.

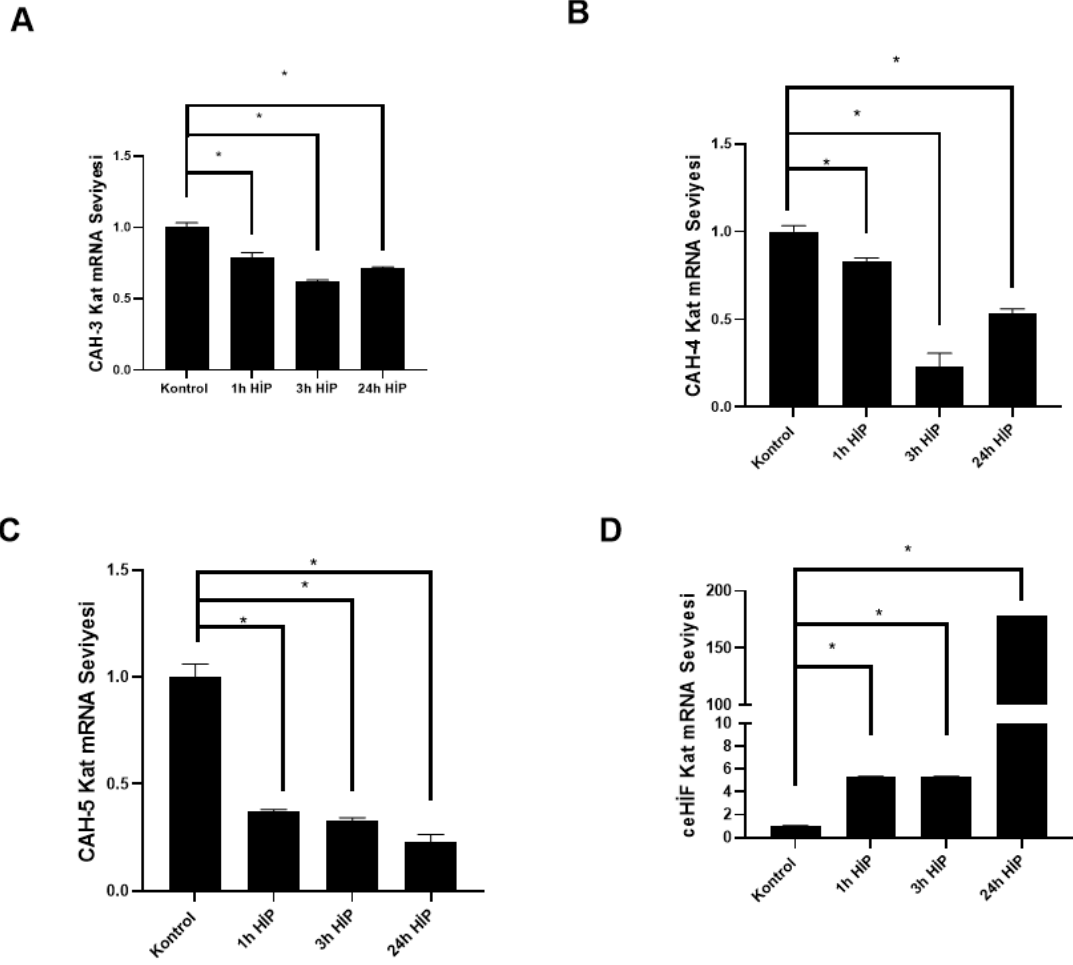


**Şekil 3.26:** CAH-3,4,5 PZR agaroz jel görüntüsü.

(M: 100bç, 1: CAH-3, 2: CAH-3 negatif kontrol, 3: CAH-4, 4: CAH-4 negatif kontrol, 5: CAH-5, 6: CAH-5 negatif kontrol, 7: CDC-42, 8: CDC-42 negatif kontrol)

### 3.5.2 C.elegans'ta Hipoksik Modelde CA VII Benzeri Genlerin mRNA Analizleri

Nematod besiyeri bölüm 2.3.1' de anlatılan şekilde hazırlanmıştır. Canlıların besin kaynağı olan OP50 suşunu için sıvı besi yeri bölüm 2.3.3'te anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Petri kaplarına dökülen besiyeri üzerine OP50 ekilmiş ve bir gece bakterilerin yüzeye tutunması sağlanmıştır. Sonraki gün eski NGM'lerden alınan canlılar yeni ortama totalde 5000 canlı olacak şekilde aktarılmıştır. 3 gün boyunca canlılar buldukları ortamda üremeleri için oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre sonunda bölüm 2.3.6'te anlatıldığı üzere hipoksi oluşturulmuştur ve canlılardan total RNA izolasyonu kısım 2.3.5'teki gibi gerçekleştirilmiştir. Hipoksinin doğrulanması için ceHIF1 (NM\_001373210.2) primerleri tasarlanmıştır. ceHIF1 ifadesindeki artış hipoksinin oluştuğuna kanıt oluşturur. ceHIF1 ifadesinin artışı Real-Time PZR ile ölçülmüştür.



Şekil 3.27: *C.elegans* CA VII benzeri genler ve ceHIF1 geni mRNA ifadesi.

Şekil 3.27’ de görüldüğü üzere ceHIF1 seviyesindeki artma anlamlı olup ortamın hipoksik olduğunu doğrulamaktadır. CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 genlerinin ifadesi normal koşullara kıyasla hipoksik koşullarda tüm zaman dilimlerinde düşmektedir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbonik anhidrazlar, yaklaşık 90 yılı aşkın süredir çalışılmaktadır. 1933'teki keşfinden bu zamana kadar pek çok alanda bilimsel keşfin ön safhalarında yer almışlardır. Karbonik anhidrazlar (CA'lar), karbondioksit hidrasyonunun ve dehidrasyonun tersine çevrilebilir bir reaksiyonunu katalize ederler, asit-baz ve iyon düzenlenmesini sağlayarak metabolik süreçlerde hayati bir rol oynarlar. CA'lar, sitosolik (CA I, II, III, VII, VIII, X, XI, XIII); mitokondriyal (CA VA, VB); salgılanan (CA VI) ve membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV, XV) olanlar şeklinde dört farklı grupta incelenir (Hewett-Emmett vd., 1996).

Tüm izoformlar ile kıyaslandığında CA VII' nin ifadesi hem sağlıklı dokularda hem de tümörlerde daha düşüktür. İnsan genom atlas verilerine göre CA VII ifadesi beyin, sindirim sistemi organları, böbrek, akciğer, kolon ve testislerde bulunmaktadır. Yapılan literatür taramalarında CA VII geninin ifadesi bugüne kadar çeşitli beyin tümörlerinde, kolon kanseri, mide kanseri ve yumurtalık kanseri bireylerden alınan doku örneklerinde incelenmiştir. Özellikle Yang ve ark. yaptığı çalışmada kolon kanseri dokularında CA VII ifadesinin azaldığı ve bu durumun kanserin ilerlemesine yol açtığı bulunmuştur (Uhlen vd., 2017; Booterab vd., 2013; Yang vd., 2015).

Hipoksi, pek çok hastalıkta ve başlıca kanserde meydana gelen dokulara oksijen gitmemesi durumudur. Bu durum normal dokulardaki oksijenin azalmasına yol açmaktadır. Normal dokularda oluşan hipoksik mikro çevre proliferasyona sebep olur. Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri (Hif) promotordaki hedef dizilere bağlanıp çok fazla geni etkilemektedir.

İnsanlardaki çoğu kanser türünde Hif-1 $\alpha$ ' nın aşırı ifade edilmesine rağmen bu genin kanserleşmede nasıl bir rol üstlendiği günümüzde tam olarak anlaşılmamıştır.

Çalışmamızda kolon kanseri hücre hatları SW480 ve HT-29, sağlıklı insan endotel hücre hattı HUVEC, karaciğer kanseri hücre hattı Hep3B, prostat kanseri hücre hatları PC3 ve LnCaP kullanılarak CoCl<sub>2</sub> ile kimyasal hipoksik modeller oluşturulmuştur. Hem normal koşulların hem de hipoksik koşulların doğrulanmasında mRNA seviyesinde PZR ve Real-

Time PZR, protein seviyesinde ise western blot ve IFC teknikleri kullanılmıştır. CoCl<sub>2</sub>' nin sitotoksik aktivitesine daha önceki çalışmalardan bakılmıştır.

Çalışmada kullanılan 6 farklı hücre hattına sahip olan hücreler kültür ortamında büyütüldü, son konsantrasyon 150 mM olmak üzere CoCl<sub>2</sub> eklenerek kimyasal hipoksi taklit edildi. 24, 48, 72. saatlerde normoksik ve hipoksik gruplardan alınan pelletlerden RNA izolasyonları gerçekleştirildi sonrasında ölçüm yapıldı ve cDNA sentezlendi. Hipoksinin oluşup oluşmadığını anlamak için Hif-1 $\alpha$  seviyesine Real-Time PZR ile bakılmıştır. Sonuçlar Livac metoduna göre analiz edilmiştir.

mRNA düzeyindeki analizler için CA VII ekspresyon primeri tasarlanmış ve bu primerlerin optimizasyon çalışması yapılmıştır. 187 bp büyüklüğünde bir alanı çoğaltan CA VII primerleri 55°C bağlanma sıcaklığında çalışmıştır. Real-Time PZR'da da bu sıcaklık kullanılmıştır. Normalizatör gen olarak H $\beta$ 2 kullanılmıştır.

Kolon kanseri hücre hatlarındaki deney grubunda yapılan Real-Time PZR sonuçlarına göre SW480 hücre hattında kimyasal hipoksi yalnızca 48. saat dilimin de oluşmuştur. Şekil 3.7'de gösterildiği üzere hipoksik ortamın oluştuğu 48. saat diliminde CA VII ifadesi incelendiğinde, normal hücre grubuna kıyasla CA VII ifadesinin azaldığı ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Ayrıca şekil 3.3' de SW480 hücrelerinde aynı saat dilimlerinde yapılan densitometrik analizde de 48. saat diliminde CA VII ifadesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Şekil 3.4' de gösterildiği üzere HT-29 hattında normal ortama kıyasla hipoksik ortamda yetişen hücrelerde tüm zaman dilimlerinde CA VII ifadesinin azaldığı gözlemlenmiş ve daha hassas bir teknik olan Real-Time PZR ile yapılan deneyler değerlendirildiğinde ise şekil 3.8' de gösterildiği gibi 24 ve 72 saat hipoksik gruplarda hipoksinin ana regülatörü olan Hif-1 $\alpha$  seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. Bu zaman dilimlerinde HT-29 CA VII mRNA ifadesi incelendiğinde normal koşullara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Karaciğer kanseri hücre hattındaki modelimiz olan Hep3B ile yapılan Real-Time PZR sonuçları (şekil 3.11) incelendiğinde 24 ve 72 saatlik gruplarda hipoksinin başarılı bir şekilde oluştuğu gözlemlenmiştir. CA VII ifadesinin çalışılan tüm zaman dilimlerinde azaldığı



tespit edilmiş ancak 72 saatteki azalma istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Bu sonuçlar şekil 3.7’ de gösterilen densitometrik analizler ile koreledir.

İnsan sağlıklı endotel hücreleri olan HUVEC’ lerde, CA VII primerleri kullanılarak yapılan çok tekrarlı PZR’larda tespit edilebilir düzeyde ifade görülmediği için Real-time PZR’a başvurulmamıştır.

Prostat kanseri hücre hattı hücrelerimizden olan PC3’lerle gerçekleştirilen deneylerde şekil 3.11’ de gösterdiği gibi 72. saat diliminde CA VII ifadesinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca şekil 3.18’de gerçekleştirilen analizde de 72 saat diliminde hipoksinin oluştuğu ve CA VII ifadesinin düştüğü gözlemlenmesine rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bir diğer hücre hattı olan LnCaP’ lerde 24, 48 ve 72. saatlerde hipoksi oluşmuştur. Bununla birlikte hipoksik koşullarda CA VII ifadesinin arttığı görülmektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ve sonuçlar şekil 3.12’ de gösterilen densitometrik analizler ile koreledir.

Çalışmamızda protein seviyesinde CA VII seviyesinin tespiti için western blot ve IFC teknikleri kullanılmıştır. Fakat ticari olan antikor western blot teniği ile çalıştırılmamıştır. IFC tekniğinde aynı antikor kullanılmış ve CA VII proteinleri gözlenmiştir. CA VII geninin protein seviyesindeki tespitinin gerçekleştirilmesi için IFC tekniği kullanılmıştır. SW480 ve HT-29 hücrelerinin oluşturduğu deney gruplarının IFC analizi şekil 3.22’de gösterilmiştir. Buna göre SW480’lerde normoksiyaya göre hipoksik grupta CA VII protein seviyesinde bir artış gözlenirken HT-29 hücrelerindeki hipoksik grubun CA VII seviyesi normal koşullardaki hücrelere göre düşüş göstermiştir. Protein düzeyinde elde edilen bu sonuçlar mRNA düzeyinde tespit edilen sonuçlar ile uyumludur koreledir.

Şekil 3.25’ te Hep3B ve HUVEC hücre hatları ile kurulan IFC deneylerinin analizleri verilmiştir. Bu sonuçlara göre, normal koşullara kıyasla hem Hep3B hem de HUVEC hücrelerinde CA VII ifadesinin protein düzeyinde azaldığı sonucuna varılmıştır. Hep3B hücrelerinde mRNA düzeyinde de CA VII ifadesinin azalması IFC sonuçlarını destekler niteliktedir.

Prostat kanseri hücre hatlarında model olarak kullanılan PC3 ve LnCaP'lerin IFC analizleri şekil 3.28'de verilmiştir. Sonuçlara göre iki farklı prostat kanseri hücre hattında da normal ortama kıyasla hipoksik ortamda CA VII ifadesinde önemli bir artış saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada kanser ilgili çok sayıda üyeyi içeren karbonik anhidraz ailesinde CA VII gen ifadesi mRNA ve protein düzeyinde farklı hücre hatlarında çalışılmıştır. Literatür incelendiğinde Yang ve ark. 2015 yılında kolorektal kanser dokuların yaptığı çalışmada da azalan CA VII ifadesi görülmüştür. Bu sonuçlar neticesinde azalan CA VII ifadesinin kötü prognoz ile ilişkisi vurgulanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız HT-29 kolon kanseri hücre hattındaki azalan CA VII ifadesi Yang ve ark. yaptığı çalışmayı desteklemektedir. Çalışmada kullanılan HUVEC, Hep3B, PC3 ve LnCaP hücre hatlarında CA VII ifadesinin araştırılmasına yönelik literatürde bir bilgi bulunmamaktadır ve tarafımızca ilk defa sunulmuştur. Farklı malignitelerde ve kanser tiplerindeki CA VII' nin prognostik değerine ilişkin tutarsız sonuçlar, prognostik etkisinin dokuya bağlı olabileceğini ve malignite tipine göre değiştiğini göstermektedir. CA VII' nin kanserleşme sürecindeki prognostik öneminin altında yatan mekanizma şu anda bilinmemektedir ve daha fazla araştırılma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda bu genin kanserde etkin bir mekanizma olan hipoksideki durumu geniş bir hücre modeli yelpazesinde ortaya konmuştur. Ayrıca iyi bir model organizma olan *C. elegans*'lardaki CA VII benzeri genlerin ifadeleri de çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada artan ceHIF ifadesi hipoksinin oluştuğunu kanıtlamaktadır. CAH-3, CAH-4 ve CAH-5 genlerinin ifadesi tüm saat gruplarında normal ortama kıyasla hipoksik ortamda azalmıştır. *C.elegans*'ta hipoksik koşullarda CA VII benzeri genlerinin ifadesi ile ilgili yapılan bu çalışma ilk defa literatüre tarafımızca sunulmuştur. Çalışma sonuçları insan hücre modelleri ile koreledir. Çalışmamız kapsamında elde edilen tüm verilerin kanser ilgili bir gen olan CA VII' nin ileri regülasyonunu aydınlatmaya yönelik yapılacak olan çalışmalara önemli bir yol gösterici olacağı kanaatindeyiz. Tüm bu çalışmalar tüm insanlığı etkileyen covid 19 salgını süresinde zorlu koşullarda yapılmaya çalışılmıştır. Hem malzeme temini hemde fiziki koşulların yetersizliği çalışmayı zorlaştırmış olsa da tamamlanabilmiştir.

## 5. KAYNAKLAR (APA)

- Abudara V, Jiang RG, Eyzaguirre C. Behavior of junction channels between rat glomus cells during normoxia and hypoxia. *J Neurophysiol.* 2002 Aug;88(2):639-49. doi: 10.1152/jn.2002.88.2.639. PMID: 12163517.
- Ahlskog JK, Schliemann C, Mårilind J, Qureshi U, Ammar A, Pedley RB, Neri D. Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *Br J Cancer.* 2009 Aug 18;101(4):645-57. doi: 10.1038/sj.bjc.6605200. Epub 2009 Jul 21. PMID: 19623173; PMCID: PMC2736829.
- Bánová Vulić R, Zdurienčíková M, Tyčiaková S, Benada O, Dubrovčáková M, Lakota J, Škultéty Ľ. Silencing of carbonic anhydrase I enhances the malignant potential of exosomes secreted by prostatic tumour cells. *J Cell Mol Med.* 2019 May;23(5):3641-3655. doi: 10.1111/jcmm.14265. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30916466; PMCID: PMC6484292.
- Barrière A, Félix MA. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook.* 2014 May 2:1-19. doi: 10.1895/wormbook.1.115.2. PMID: 24803426.
- Bootorabi, F., Haapasalo, J., Smith, E., Haapasalo, H. and Parkkila, S. (2011) Carbonic anhydrase VII—a potential prognostic marker in gliomas. *Health*, 3, 6-12. doi: 10.4236/health.2011.31002.
- Bottcher, A. Waheed, W.S. Sly, Membraneassociated carbonic anhydrase from the crab gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian Cas, *Arch. Biochem. Biophys.*, 312 (1994) 429-435
- Carter, N.D.; Fryer, A.; Grant, A.G.; Hume, R.; Strange, R.G.; Wistrand, P.J. Membrane specific carbonic anhydrase (CAIV) expression in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1026, 113–116.
- Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data: Figure 1. *Cancer Discov.* 2012, 2, 401–404.

- Dai HY, Hong CC, Liang SC, Yan MD, Lai GM, Cheng AL, Chuang SE. Carbonic anhydrase III promotes transformation and invasion capability in hepatoma cells through FAK signaling pathway. *Mol Carcinog.* 2008 Dec;47(12):956-63. doi:10.1002/mc.20448. PMID: 18444244.
- Datta R, Waheed A, Bonapace G, Shah GN, Sly WS. Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis-inducing mutations in carbonic anhydrase IV. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(9):3437e42.
- Davis MW, Somerville D, Lee RY, Lockery S, Avery L, Fambrough DM. Mutasyonlar *Caenorhabditis elegans* . 1995;15 : 8408-8418.
- De Simone G, Scozzafava A, Supuran CT. Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? *Chem Biol Drug Des* 2009;74(3):317e21.
- Del Giudice R, Monti DM, Truppo E, Arciello A, Supuran CT, De Simone G, Monti SM. Human carbonic anhydrase VII protects cells from oxidative damage. *Biol Chem.* 2013 Oct;394(10):1343-8. doi: 10.1515/hsz-2013-0204. PMID: 23851572.
- Derry, W. B., Putzke, A. P., & Rothman, J. H. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*, 294(5542), 591-595.
- Di Fiore A, Monti DM, Scaloni A, De Simone G, Monti SM. Protective Role of Carbonic Anhydrases III and VII in Cellular Defense Mechanisms upon Redox Unbalance. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Aug 5;2018:2018306. doi: 10.1155/2018/2018306. PMID: 30154947; PMCID: PMC6098850.
- Dodgson, S.J.; Forster, R.E.; Storey, B.T. The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1984, 429, 516–524.
- Fasseas, M. K., Tsikou, D., Flemetakis, E., & Katinakis, P. (2010). Molecular and biochemical analysis of the  $\beta$  class carbonic anhydrases in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology reports*, 37, 2941-2950.
- Fasseas, M. K., Tsikou, D., Flemetakis, E., & Katinakis, P. (2011). Molecular and biochemical analysis of the  $\alpha$  class carbonic anhydrases in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology reports*, 38, 1777-1785.

- Fujikawa-Adachi, K.; Nishimori, I.; Taguchi, T.; Onishi, S. Human carbonic anhydrase XIV (CA14): CDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics* 1999, 61, 74–81.
- Gao BB, Chen X, Timothy N, Aiello LP, Feener EP. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* 2008;7(6):2516e25.
- Gilbert F. Disease genes and chromosomes: disease maps of the human genome. Chromosome 16. *Genet Test*. 1999;3(2):243-54. doi: 10.1089/gte.1999.3.243. No abstract available. Citation on PubMed
- Haapasalo, J., Nordfors, K., Järvelä, S., Bragge, H., Rantala, I., Parkkila, A. K., Haapasalo, H., & Parkkila, S. (2007). Carbonic anhydrase II in the endothelium of glial tumors: a potential target for therapy. *Neuro-oncology*, 9(3), 308–313. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-001>
- Hall, R. A., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Klappa, P., & Mühlischlegel, F. A. (2008). External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4b in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and biochemical parasitology*, 161(2), 140-149.
- Halmi P, Parkkila S, Honkaniemi J. Expression of carbonic anhydrases II, IV, VII, VIII and XII in rat brain after kainic acid induced status epilepticus. *Neurochem Int*. 2006 Jan;48(1):24-30. doi: 10.1016/j.neuint.2005.08.007. Epub 2005 Nov 4. PMID: 16271802.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hars, E. S., Qi, H., Jin, S. V., Cai, L., Hu, C., & Liu, L. F. (2007). Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy*, 3(2), 93-95.
- Hen N, Bialer M, Yagen B, Maresca A, Aggarwal M, Robbins AH, et al. Anticonvulsant 4-aminobenzenesulfonamide derivatives with branched-alkylamide moieties: X-ray crystallography and inhibition studies of human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, and XIV. *J Med Chem* 2011;54(11):3977e81.

- Hen N, Bialer M, Yagen B, Maresca A, Aggarwal M, Robbins AH, et al. Anticonvulsant 4-aminobenzenesulfonamide derivatives with branched-alkylamide moieties: X-ray crystallography and inhibition studies of human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, and XIV. *J Med Chem* 2011;54(11):3977e81
- Hewett-Emmett D, Tashian RE. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol Phylogenet Evol.* 1996 Feb;5(1):50-77. doi: 10.1006/mpev.1996.0006. PMID: 8673298.
- Idrees, D.; Kumar, S.; Rehman, S.A.A.; Gourinath, S.; Islam, A.; Ahmad, F.; Imtaiyaz Hassan, M. Cloning, expression, purification and characterization of human mitochondrial carbonic anhydrase VA. *3 Biotech* 2016, 6.
- Ivanov, S., Liao, S. Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M. J., Proescholdt, M. A., Oldfield, E. H., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M. I., & Stanbridge, E. J. (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *The American journal of pathology*, 158(3), 905–919. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64038-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64038-2)
- Jiang B, Ren C, Li Y, Lu Y, Li W, Wu Y, Gao Y, Ratcliffe PJ, Liu H, Zhang C. Sodium sulfite is a potential hypoxia inducer that mimics hypoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Inorg Chem.* 2011 Feb;16(2):267-74. doi: 10.1007/s00775-010-0723-1. Epub 2010 Oct 30. PMID: 21057967.
- Joseph R. Nevins, The Rb/E2F pathway and cancer, *Human Molecular Genetics*, Volume 10, Issue 7, 1 April 2001, Pages 699–703, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.699>
- Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 May;5(5):387-98. doi: 10.1038/nrd2031. PMID: 16672925.
- Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2007 Oct;6(10):2609-17. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0234. PMID: 17938257.

- Koltai, Tomas (2020). An Innovative Approach to Understanding and Treating Cancer: Targeting pH || Carbonic anhydrases, 157–176. doi:10.1016/B978-0-12-819059-3.000071
- Kummola, L.; Hämäläinen, J.M.; Kivelä, J.; Kivelä, A.J.; Saarnio, J.; Karttunen, T.; Parkkila, S. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. *BMC Cancer* 2005, 5, 41.
- Kummola, L.; Hämäläinen, J.M.; Kivelä, J.; Kivelä, A.J.; Saarnio, J.; Karttunen, T.; Parkkila, S. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. *BMC Cancer* 2005, 5, 41.
- Lakkis MM, Bergenhem NC, Tashian RE. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in *E. coli* and demonstration of its CO<sub>2</sub> hydrase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Sep 4;226(1):268-72. doi: 10.1006/bbrc.1996.1344. PMID: 8806625.
- Lakota J, Dubrovčáková M. Overexpression of CA1 mRNA and the CA I Protein in Tumor Cells Does Not Change the Gene Expression of the ECM Proteins. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 18;21(2):639. doi: 10.3390/ijms21020639. PMID: 31963697; PMCID: PMC7014291.
- Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, Casini A, Scozzafava A, Supuran CT, et al. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem* 2004;279(4):2719e27.
- Liu, L.-C. Overexpression of carbonic anhydrase II and Ki-67 proteins in prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *World J. Gastroenterol.* 2013, 19, 2473.
- Lu X, Horvitz HR. lin-35 and lin-53, two genes that antagonize a *C. elegans* Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell.* 1998 Dec 23;95(7):981-91. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81722-5. PMID: 9875852.
- Matsui H, Murakami M, Wynns GC, Conroy CW, Mead A, Maren TH, et al. Membrane carbonic anhydrase (IV) and ciliary epithelium. Carbonic anhydrase activity is present in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of rabbit eyes. *Exp Eye Res* 1996;62(4):409e17.

- Mincione F, Scozzafava A, Supuran CT. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr Pharmaceut Des* 2008;14(7):649e54.
- Montgomery JC, Venta PJ, Eddy RL, Fukushima YS, Shows TB, Tashian RE. Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16. *Genomics*. 1991 Dec;11(4):835-48. doi: 10.1016/0888-7543(91)90006-z. PMID: 1783392.
- Murakami, H.; Sly, W.S. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 1382–1388.
- Nagao, Y.; Platero, J.S.; Waheed, A.; Sly, W.S. Human mitochondrial carbonic anhydrase: CDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 7623–7627.
- Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J Med Chem* 2007;50(2):381e8.
- Nyman, P.; Lindskog, S. Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochim. Biophys. Acta* 1964, 85, 141–151.
- Okuyan D, Aydogan Turkoglu S, Kockar F. Carbonic anhydrase III is a new target of HIF1 $\alpha$  in prostate cancer model. *Gene*. 2020 Dec 15;762:145034. doi: 10.1016/j.gene.2020.145034. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32777521.
- Parkkila, S., Lasota, J., Fletcher, J. et al. Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 23, 743–750 (2010). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.189>
- Pastoreková, S.; Zavadová, Z.; Kostál, M.; Babusíková, O.; Závada, J. A novel quasi-viral agent, Matu, is a two-component system. *Virology* 1992, 187, 620–626
- Poyrazlı, F. (2022). Prostat kanserinde normal ve hipoksik koşullarda KLK4 geninin TGF- $\beta$  ile regülasyonu (Doktora tezi). Balıkesir Üniversitesi Kurumsal Akademik Arşiv veri tarafından erişildi.



- Proescholdt, M. A., Mayer, C., Kubitza, M., Schubert, T., Liao, S. Y., Stanbridge, E. J., Ivanov, S., Oldfield, E. H., Brawanski, A., & Merrill, M. J. (2005). Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro-oncology*, 7(4), 465–475. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000025>
- Raizen DM, Zimmerman JE, Maycock MH, Ta UD, You YJ, Sundaram MV, Pack AI. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*. 2008 Jan 31;451(7178):569-72. doi: 10.1038/nature06535. Epub 2008 Jan 9. Erratum in: *Nature*. 2008 Jun 12;453(7197):952. PMID: 18185515.
- Ruusuvuori E, Li H, Huttu K, Palva JM, Smirnov S, Rivera C, et al. Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 2004;24(11):2699e707.
- Sage J, Mulligan GJ, Attardi LD, Miller A, Chen S, Williams B, Theodorou E, Jacks T. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev*. 2000 Dec 1;14(23):3037-50. doi: 10.1101/gad.843200. PMID: 11114892; PMCID: PMC317090.
- Sarnella, A., Ferrara, Y., Auletta, L., Albanese, S., Cerchia, L., Alterio, V., De Simone, G., Supuran, C. T., & Zannetti, A. (2022). Inhibition of carbonic anhydrases IX/XII by SLC-0111 boosts cisplatin effects in hampering head and neck squamous carcinoma cell growth and invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 41(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02345-x>
- Shaye DD, Greenwald I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One*. 2011;6(5):e20085. doi: 10.1371/journal.pone.0020085. Epub 2011 May 25. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/annotation/f5ffb738-a176-4a43-b0e0-249cdea45fe0. PMID: 21647448; PMCID: PMC3102077.
- Sherman, T. A., Rongali, S. C., Matthews, T. A., Pfeiffer, J., & Nehrke, K. (2012). Identification of a nuclear carbonic anhydrase in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(4), 808-817.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002 Aug;2(2):103-12. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2. PMID: 12204530.

- Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):235-46. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01075-4. PMID: 14744434.
- Sherr, C.J. (2000) The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revised. *Cancer Research*, 60, 3689-3695.
- Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1977 Mar;56(1):110-56. doi: 10.1016/0012-1606(77)90158-0. PMID: 838129.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1983 Nov;100(1):64-119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4. PMID: 6684600.
- Supuran CT. Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharmaceut Des* 2008;14(7):641e8.
- Swenson ER, Teppema LJ. Prevention of acute mountain sickness by acetazolamide: as yet an unfinished story. *J Appl Physiol* 2007;102(4):1305e7.
- Tang Y, Xu H, Du X, Lit L, Walker W, Lu A, et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(8):1089e102.
- Turkoglu, S. A., Okuyan, D., & Kockar, F. (2019). TGF- $\beta$  downregulates CAIII expression via MAPK and PI3K signaling pathways in colon carcinoma and osteosarcoma cells. *Archives of Biological Sciences*, 71(3), 393-401.
- Türkoğlu, S. A., & Köçkar, F. (2012). Expression of Gapdh, B-Actin And B-2-microglobulin genes under chemically induced hypoxic conditions in Hep3b and Pc3 cells. *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(3), 1-6.
- Türkoğlu, S. A., Poyrazlı, F., Babacan, D., & Köçkar, F. (2021). Hipoksi ve Kanser. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(3), 450-463.
- Türkoğlu, S. A., Tosun, S. G., & Köçkar, F. Farklı Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 İfadesinin Değişimi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 19(1), 22-33.

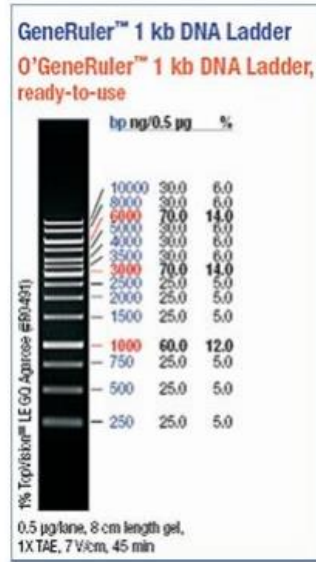
- Uhlen, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjöstedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhorji, G.; Benfeitas, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. Apathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 2017.
- Vullo D, Voipio J, Innocenti A, Rivera C, Ranki H, Scozzafava A, Kaila K, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005 Feb 15;15(4):971-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.12.052. PMID: 15686895.
- Work Efficiently in Developmental Biology with Stereo and Confocal Microscopy: C. Elegans. 2016 Sep; Leica microsystems. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/applied/work-efficiently-in-developmental-biology-with-stereo-and-confocal-microscopy-c-elegans>.
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):7075-83. PMID: 11156414.
- Yang GZ, Hu L, Cai J, Chen HY, Zhang Y, Feng D, Qi CY, Zhai YX, Gong H, Fu H, Cai QP, Gao CF. Prognostic value of carbonic anhydrase VII expression in colorectal carcinoma. *BMC Cancer.* 2015 Apr 1;15:209. doi: 10.1186/s12885-015-1216-y. PMID: 25885898; PMCID: PMC4406128.
- Yildirim, H., Karaman, M., & Köçkar, F. (2017). The role of hypoxia response element in TGFβ-induced carbonic anhydrase IX expression in Hep3B human hepatoma cells. *Archives of Biological Sciences*, 69(4), 593-601.
- Yoshiura K, Nakaoka T, Nishishita T, Sato K, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Takahashi TA, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Oyaizu N, Yamashita N. Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy. *Clin Cancer Res.* 2005 Nov 15;11(22):8201-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0816. PMID:16299253.
- Závada, J., Zavadová, Z., Zát'ovicová, M., Hyršl, L., & Kawaciuk, I. (2003). Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *British journal of cancer*, 89(6), 1067–1071. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601264>.

Zheng G, Peng C, Jia X, Gu Y, Zhang Z, Deng Y, Wang C, Li N, Yin J, Liu X, Lu M, Tang H, He Z. ZEB1 transcriptionally regulated carbonic anhydrase 9 mediates the chemoresistance of tongue cancer via maintaining intracellular pH. *Mol Cancer*. 2015 Apr 15;14:84. doi: 10.1186/s12943-015-0357-6. PMID: 25890268; PMCID: PMC4404088.

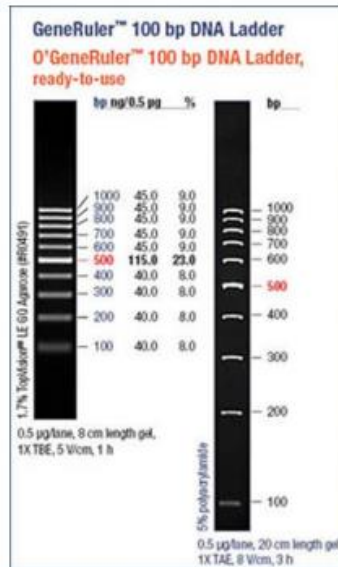
Zolfaghari Emameh, R., Barker, H. R., Syrjänen, L., Urbański, L., Supuran, C. T., & Parkkila, S. (2016). Identification and inhibition of carbonic anhydrases from nematodes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup4), 176-184.

# **EKLER**

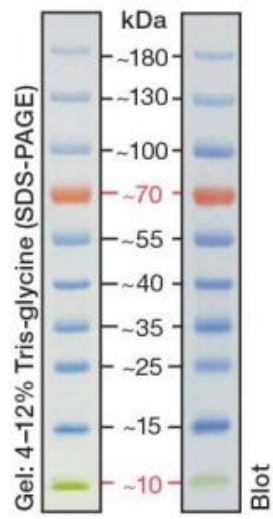
## EK A: Kullanılan Markerlar



Şekil A.1: Fermentas 1kb Marker

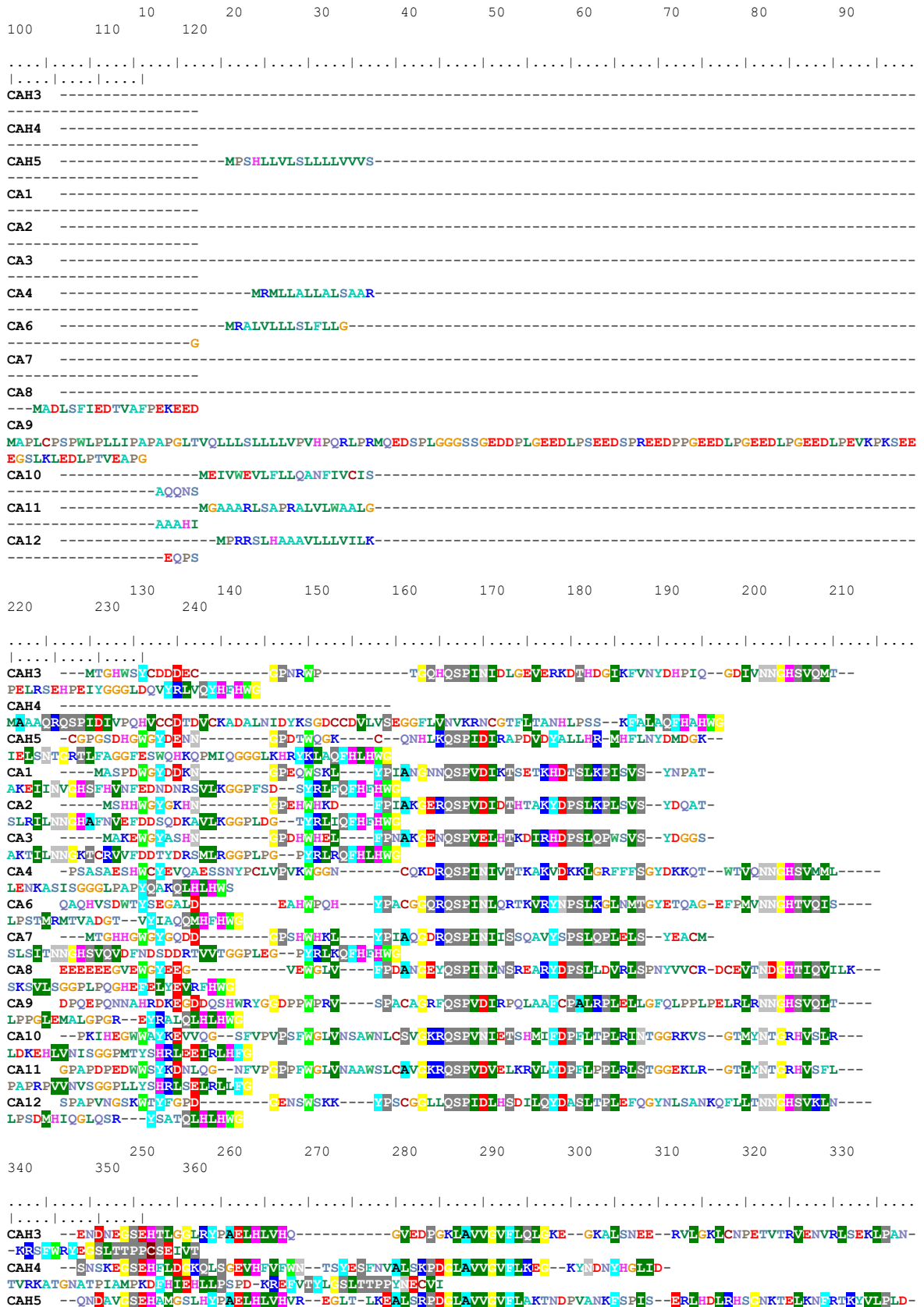


Şekil A.2: Thermo Scientific 100 bç Marker



**Şekil A.3: PageRuler Prestained Protein marker**

## EK B: Biyoinformatik Analizler







**Tablo B.1: İnsan CA ailesi üyelerinin aminoait dizileri ile ve *C.elegans* CAH aminoait dizilerinin benzerlik oranları**

	<b>CeCAH-3</b>	<b>CeCAH-4</b>	<b>CeCAH-5</b>
<b>hCA 1</b>	96%	<b>91%</b>	96%
<b>hCA 2</b>	<b>98%</b>	<b>91%</b>	<b>97%</b>
<b>hCA 3</b>	<b>98%</b>	91%	96%
<b>hCA 4</b>	83%	64%	77%
<b>hCA 6</b>	81%	76%	74%
<b>hCA 7</b>	<b>97%</b>	<b>79%</b>	<b>96%</b>
<b>hCA 8</b>	82%	85%	88%
<b>hCA 9</b>	53%	50%	57%
<b>hCA 10</b>	73%	74%	55%
<b>hCA 11</b>	80%	72%	83%
<b>hCA 12</b>	71%	62%	80%

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Aysu BOZKURT

Doğum tarihi ve yeri : 10/08/1998

e-posta : aysubozkurt49@gmail.com

## Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD	2023
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2020
Lise	Özel Ümit Temel Lisesi	2016

## Yayın Listesi

### Projeler

1. Monosodyum Glutamat ve Bütil Hidroksi Toluen'nin *Caenorhabditis Elegans'* ta yumurta Verimi, Yaşama Yüzdesi ve Fiziksel Büyüme Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması/ TÜBİTAK 2209-A
2. Farklı Hücre Hatlarında Hipoksik ve Normoksik Koşullarda Karbonik Anhidraz 7 (CA VII) Geninin Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi/ TÜBİTAK 1002- A, **123Z001**
3. Hipoksik Koşullarda Farklı Hücre Hatlarında ve *C.elegans*'da Karbonik Anhidraz 7, Karbonik Anhidraz Benzeri Gen İfadesinin Real Time PCR ve Western Blot ile Belirlenmesi/ BAP, **2023/008**

### Bildiriler

- Fatma Poyrazlı 1, Aysu Bozkurt 2, Seçkin Şenkaya 2, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu 2, Monosodyum Glutamat (Msg)' ın *Caenorhabditis Elegans* Ve İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücresi (Huvec) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması , ICHES-IDU

### Kongreler

- Aysu Bozkurt<sup>1</sup>, Fatma Poyrazlı<sup>1</sup>, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu<sup>2</sup> Karbonik Anhidraz 7 Gen İfadesinin SW480 ve HUVEC Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda Belirlenmesi, 5.UBBK [Tezden türetilmiştir]