

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



**YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE
KARBONİK ANHİDRAZ 9 PROMOTORUNUN
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE KARAMAN

BALIKESİR, ARALIK - 2013

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



**YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE
KARBONİK ANHİDRAZ 9 PROMOTORUNUN
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE KARAMAN

BALIKESİR, ARALIK - 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Merve KARAMAN tarafından hazırlanan **“YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE KARBONİK ANHİDRAZ 9 PROMOTORUNUN FONKSİYONEL ANALİZİ”** adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.12.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Eş Danışman

Prof.Dr. Feray KÖÇKAR

Üye

Doç.Dr Ekrem DÜNDAR

Üye

Yrd.Doç.Dr. Serap UZUNOĞLU

Üye

Yrd.Doç.Dr. Sümeyye A. TÜRKOĞLU

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 2013/57 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE KARBONİK ANHİDRAZ 9 PROMOTORUNUN FONKSİYONEL ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MERVE KARAMAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)
(EŞ DANIŞMAN: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, ARALIK - 2013

Karbonik anhidrazlar hayvanlardan, fotosentetik canlılara kadar neredeyse tüm canlı hücrelerde bulunan metaloenzimlerdir. Karbonik anhidraz 9 pH regülasyonunda rol oynayarak tümör hücrelerinin metastazında ve hücre büyümesinde önemli rol oynar. Katı tümörlerde CA9 ekspresyonu yüksektir ve biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

CA9 ve hipoksik koşulların ilişkisi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda hipoksik koşullarda CA9'un regülasyonda önemli olan ve genin promotorunda bulunan HRE bölgesi mutasyona uğratılmıştır. Transfeksiyon analizleri ile mutasyona uğratılan CA9 geninin regülasyonu özellikle hipoksik koşullarda incelenmiştir. Ayrıca tüm çalışmalar normal oksijen şartları altında da yapılmıştır. Normal oksijen seviyesinde ve hipoksik şartlarda HRE mutant olan CA9 promotorunun aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

Aynı zamanda çalışmamızın ikinci kısmında, TGF β sitokininin CA9 ekspresyon seviyesine etkileri hem hipoksik hem de normoksik koşullarda analiz edildi. Hem RNA hem de protein seviyesinde TGF β sitokini uygulanan gruplarda CA9 ekspresyonunun hipoksik şartlarda arttığı gözlemlendi. TGF β sitokinin etkisinin aydınlatılması ve sinyal yolağının belirlenmesi amacıyla da gerçek zamanlı PZR temelli mRNA analizleri ve protein analizleri yapıldı.

ANAHTAR KELİMELER: CA9, Hipoksiya, HRE, mutasyon

ABSTRACT

FUNCTIONAL ANALYSIS OF CARBONIC ANHYDRASE 9 PROMOTOR BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

MSC THESIS

MERVE KARAMAN

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)

SUPERVISOR: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR

BALIKESİR, DECEMBER 2013

Carbonic anhydrases are metalloenzymes that found in almost all organisms, animals to photosynthetic systems. Carbonic anhydrase 9 plays an important role in pH regulation processes critical for tumor cell growth and metastasis. CA9 expression in solid tumors is high and can be used as biomarker.

There are numerous studies on the relationship of CA9 and hypoxic conditions. In our study, promoter region of the CA9 that has an important role in the regulation of gene in hypoxic conditions, was mutated. Transfection assays with mutated gene, particularly under hypoxic conditions was studied for the analysis of the mutated gene regulation. In addition, all studies were performed under normal oxygen conditions. We obtained that under hypoxic and normal oxygen conditions, promoter activity of HRE mutated CA9 was decreased.

Also in the second part of this study, the effect of TGF β cytokine on CA9 expression level in both hypoxic and normoxic conditions were analyzed. Both RNA and protein level in the group treated with TGF β cytokine, increased CA9 expression was observed under hypoxic conditions. Real time PCR based mRNA analysis and protein analysis were done aiming to determine the signalling pathway of the TGF β cytokine.

KEYWORDS: CA9, Hypoxia, HRE, mutation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Karbonik Anhidraz Ailesi	1
1.1.1 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması ve Fonksiyonları	1
1.2 Karbonik Anhidraz 9	3
1.3 Karbonik Anhidraz 9 ve Kansere İlişkisi	5
1.4 Hipoksik Durum Nedir?	6
1.5 Hipoksiya Yolu ve CA9'u Regüle Etmesi	10
1.6 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF β) ve CA9'a Etkisi	12
1.7 Amaç	14
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1 Materyal	16
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler	16
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
2.1.3 DNA ile ilgili Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar	19
2.1.3.1 Transfeksiyon çalışmalarındaki solüsyonlar.....	19
2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezindeki Solüsyonlar	19
2.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Vektörler	20
2.1.3.4 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları	22
2.1.3.5 Bakteriyel Kültür Ortamı.....	22
2.1.3.6 Stok Antibiyotiklerin Hazırlanışı.....	22
2.1.3.7 Antibiyotik İçeren Katı Besiyerinin Hazırlanışı.....	22
2.1.3.8 Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi.....	22
2.1.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyallerin Hazırlanması	23
2.1.4.1 Hücre Kültüründe Medyumun Hazırlanması	23
2.1.4.2 FCS Hazırlanması.....	23
2.1.4.3 BSA Hazırlanması	23
2.1.4.4 PBS Hazırlanması.....	23
2.1.5 Proteinle ilgili Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	24
2.1.5.1 Western Blot Tekniğindeki Çözeltiler	24
2.1.5.2 İmmüno Floresans Tekniğindeki Çözeltiler	24
2.2 Metotlar	25

2.2.1	Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	25
2.2.2	DNA ile ilişkili teknikler	25
2.2.2.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	25
2.2.2.2	Primer Tasarımı	26
2.2.2.3	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	26
2.2.2.4	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu	26
2.2.2.5	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması	27
2.2.2.6	Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)	27
2.2.2.7	Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)	27
2.2.2.8	DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	28
2.2.2.9	Restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi	28
2.2.2.10	Kompetent Hücre Hazırlanması	28
2.2.2.11	Transformasyon	29
2.2.3	Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Teknikleri	29
2.2.4	Hücre Kültüründe Kullanılan Teknikler	31
2.2.4.1	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu	31
2.2.4.2	Hücre Soyunun Başlatılması	31
2.2.4.3	Hücrelerin Büyütülmesi	32
2.2.4.4	Hücrelerin Pasajlanması	32
2.2.4.5	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı	32
2.2.4.6	Hücrelerin -80°C 'de saklanması	33
2.2.5	Hücre kültüründe kurulan deneyler ve analiz yöntemleri	34
2.2.5.1	Sitotoksikite deneyinin kurulması	34
2.2.5.2	MTT Testi	34
2.2.5.3	Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon	35
2.2.5.4	Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	35
2.2.5.5	SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi	35
2.2.5.6	RNA Deneyinin Kurulması	36
2.2.5.7	Protein deneylerinin Kurulması	36
2.2.5.8	Sitokin deneylerinin kuruluşu	36
2.2.5.9	İnhibitör Deneylerinin kurulması	37
2.2.6	RNA ile İlgili Teknikler	37
2.2.6.1	RNA İzolasyonunun Yapılması	37
2.2.6.2	RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	37
2.2.6.3	RT- PZR Reaksiyonu	38
2.2.6.4	İnsan Beta Mikroglobulin Primerleri ile RNA'nın Q-PZR'la Kontrol Edilmesi	38
2.2.6.5	RealTime PZR	38
2.2.7	Protein ile ilgili Teknikler	39
2.2.7.1	SDS PAGE	39
2.2.7.2	Western Blot	39
2.2.7.3	İmmüno Floresans	40
3.	BULGULAR	41
3.1	pGL2 basic vektörü içindeki 154bp'lik hCA9 promotörünün pGEM-T easy vektörüne alt klonlama yapılması	41
3.2	pMetLuc reporter vektörüne alt klonlama	43
3.3	Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Tekniği ile HRE bölgesinde mutasyon oluşturulması ve DNA dizi analizinde kontrolü	44

3.4	pMetLuc vektörüne 9 tekrarlı HRE bölgesi eklenmesi (9XHRE)	46
3.5	hCA9 154 bç'lik Promotorun Fonksiyonel Analizi	47
3.5.1	Hep3B Hücre Hattında Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi	47
3.5.2	Mutant ve yabancı tip hCA9 154'bç'lik promotörün bazal aktivitesinin belirlenmesi	49
3.5.3	Mutant ve yabancı tip hCA9 154 bç'lik promotörün TGF β sitokini ile olan aktivitesinin belirlenmesi	52
3.6	TGF β 'nın Hep3B Hücre Hattında Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	53
3.7	TGF β Sitokinin CA9 ekspresyon seviyesine etkilerinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi	55
3.8	TGF β Sitokinin CA9 Protein Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi	57
3.9	Hep3B Hücre Modelinde İmmünofloresan Yönteminin Optimizasyonu	57
3.9.1	Hep3B Hücre Modelinde CA9 Protein Düzeyinin İmmünofloresan ile Belirlenmesi	58
3.9.2	Hep3B Hücre Modelinde CA9 Proteinini Üzerine TGF β Sitokinin Etkisinin İmmünofloresan İle Belirlenmesi	60
3.10	Bazı inhibitörlerin ve TGF β sitokinin CA9 ekspresyon seviyesine etkilerinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi	62
3.11	Bazı inhibitörlerin ve TGF β Sitokinin CA9 Protein Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Western Blot Analizi İle Belirlenmesi	64
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	66
5.	KAYNAKLAR	70
6.	EKLER	85

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Karbonik Anhidrazların Genel Tepkime denklemi	1
Şekil 1.2: Memeli hücrelerindeki karbonik anhidraz izoformlarının moleküler.	3
Şekil 1.3: CA9 proteinin ve geninin şematik gösterimi [35].	4
Şekil 1.4: Sağlıklı ve Kanser hücrelerinde CA9 ekspresyon seviyesi [39].	5
Şekil 1.5: Hif1 α , Hif2 α ve Hif3 α 'nın yapısal olarak domainlerinin gösterilmesi [63].	7
Şekil 1.6: Hipoksik ve Normoksik ortamlarda Hif1 α 'nın regülasyonunu	9
Şekil 1.7: CA9 promotörünün transkripsiyonuna değişik oksijen ve hücre yoğunluğu durumlarında SP1/SP3 ve HIF-1 transkripsiyon faktörlerinin etkisi [77].	11
Şekil 1.8: TGF- β Yolağı ve Gen Regülasyonu [93].	13
Şekil 1.9: İnsan CA9 promotörünün Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği ile Mutasyonu ve Moleküler Analizinin çalışma diyagramı	15
Şekil 2.1: pGEMT easy Vektörünün Restriksiyon Haritası, Klonlama Bölgesi	20
Şekil 2.2: pMet-Luc Reporter Vektörünün Restriksiyon Haritası	20
Şekil 2.3: Transfeksiyonda Kullanılan pMetLuc Kontrol Vektörü	21
Şekil 2.4: Transfeksiyonda Kullanılan SEAP Kontrol Vektörü	21
Şekil 2.5: Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği Temel Basamakları	30
Şekil 2.6: Hep3B hücrelerinin invert mikroskop ile görüntülenmesi	31
Şekil 2.7: Hücre sayımında kullanılan Thoma Lamı [91].	33
Şekil 2.8: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.	34
Şekil 3.1: 154 bp'lik PZR sonucu	42
Şekil 3.2: pGEM-T easy vektörü EcoRI ile kontrol kesimi	42
Şekil 3.3: pGEM-T easy vektörünün EcoRI enzimi ile kesim sonucu	43
Şekil 3.4: pMetLuc vektöründe BamHI ve XhoI enzimleriyle yapılan kesim. ..	44
Şekil 3.5: Data bankasında CA9 dizisi ile klonlanan dizinin karşılaştırılması .	44
Şekil 3.6: Data bankasında CA9 dizisi ile mutant dizinin karşılaştırılması	45
Şekil 3.7: 9X HRE primerlerinde oluşabilecek saç tokası yapıları.	46
Şekil 3.8: pMetLuc reporter vektörü ile 9XHRE dizilerin karşılaştırılması	47
Şekil 3.9: 48 ve 72 saat Lusiferaz /SEAP aktivitesi oranları	48
Şekil 3.10 : 48 ve 72 saat optimizasyon Lusiferaz aktivitesi	48
Şekil 3.11: 48 ve 72 saat optimizasyon SEAP aktivitesi	49
Şekil 3.12: 48 saat Normoksik Lusiferaz/SEAP bazal aktivite	50
Şekil 3.13: 72 saat Normoksik Lusiferaz/SEAP bazal aktivite	50
Şekil 3.14: 48 saat Hipoksiya Lusiferaz/SEAP bazal aktivite	51
Şekil 3.15: 72 saat Hipoksiya Lusiferaz/SEAP bazal aktivite	51
Şekil 3.16: 48 ve 72 saat Normoksia TGF β Lusiferaz/SEAP sonuçları	52
Şekil 3.17: 48 ve 72 saat Hipoksia TGF β Lusiferaz/SEAP sonuçları	53
Şekil 3.18: Hep3B hücrelerinde normoksik ortamda TGF β 'in sitotoksik etkisi	54
Şekil 3.19: Hep3B hücrelerinde hipoksik ortamda TGF β 'in sitotoksik etkisi ..	54

Şekil 3.20: Hep3B hücrelerinde Zaman aralıklarına göre normoksik koşullarda TGF β uygulanmış örneklerin Realtime PZR sonuçları.....	56
Şekil 3.21: Hep3B hücrelerinde zaman aralıklarına göre hipoksik koşullarda TGF β uygulanmış örneklerin Realtime PZR sonuçları.....	56
Şekil 3.24: 3h Normoksia floresans mikroskopi görüntüleri	59
Şekil 3.25: 6 saat hipoksiya floresans mikroskopi görüntüleri	59
Şekil 3.26: CA9 proteinine TGF sitokininin etkisinin belirlenmesi	60
Şekil 3.27 : CA9 proteinine TGF sitokininin etkisinin belirlenmesi	61
Şekil 3.28: CA9 proteini normoksik TGF β 'nın dansitometrik değerlendirilmesi	61
Şekil 3.29: CA9 proteini hipoksik TGF β dansitometrik değerlendirilmesi	62
Şekil 3.30: Normal oksijen koşullarında TGF β ve bazı inhibitörlerin CA9 ekspresyon seviyesine etkileri, Realtime PZR sonuçları	63
Şekil 3.31: Hipoksiya TGF β ve bazı inhibitörlerin CA9 ekspresyon seviyesine etkileri, Realtime PZR sonuçları	63
Şekil 3.32: Normal oksijen koşullarında CA9 proteinine inhibitörlerin etkisinin dansitometrik analizleri	65

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	16
Tablo 2.2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
Tablo 2.3: Salınan sistem ile geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler	19
Tablo 2.4: Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.....	19
Tablo 2.5: DH5 α Kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar	22
Tablo 2.6: Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler	24
Tablo 2.7: İmmünofloresan Tekniğinde Kullanılan Kimyasallar	25
Tablo 3.1: hCA9 154bç'lik promotörün klonlanmasında kullanılan primerler.	41
Tablo 3.2: PZR koşulları	41
Tablo 3.3: Mutageniz primerleri.....	45
Tablo 3.4: 9X HRE primer dizileri, forward primer altı çizili dizi HindIII , reverse primer altı çizili dizi XhoI tanıma bölgesi	46
Tablo 3.5: Real Time PZR primer bilgileri	55
Tablo 3.6: RealTime PZR koşulları	55

SEMBOL LİSTESİ

9XHRE	9 kez çoğaltılmış hipoksi reponse element dizisi
BSA	Sığır serum albümin
CA	(Carbonic Anhydrase) Karbonik anhidraz
CA9	(Carbonic Anhydrase 9) Karbonik anhidraz 9
CARP	(Carbonic Anhydrase Related Protein) Karbonik anhidraz ilişkili protein
cDNA	(Complementary DNA) Komplementer DNA
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
FBS	(Fetal Bovine Serum) Doğmamış dana serumu
HBS	(HIF Binding Site) HIF bağlanma bölgesi
HIF	(Hypoxia Induced Factor) Hipoksi uyarıcı faktör
HRE	(Hypoxia Responce Element) Hipoksi yanıt elemanı
IL	(Interleukin) İnterlökin
IPTG	İzopropil β -D-tiogalaktopiranozit
LB	Luria broth
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ODDD	(Oxygene Dependent Degradation Domain) Oksijen bağımlı yıkım domaini
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TF	(Transcription Factor) Transkripsiyon faktörü
TGF	(Transforming Growth Factor) Transforme edici büyüme faktörü
UV	Ultra viyole
VHL	(Von Hippel Lindau) Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geni

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi çalışmamın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyeleri Yrd. Doç.Dr.Hatice YILDIRIM ve Prof.Dr.Feray KÖÇKAR yönetiminde gerçekleştirilmiştir. .

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, tüm deneysel zorluklarda bilgi ve tecrübesiyle hep yanımda olan, yol gösteren ve her zaman desteklerini hissettiğim, Prof.Dr. Feray KÖÇKAR'a , bilimsel yönüyle çalışmalarımı aydınlatan tüm nezaketi ve hoşgörüsü ile yanımda olan çok değerli hocam, Yrd.Doç.Dr. Hatice YILDIRIM'a en içten minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın esnasında ve tezimin yazım aşamasında bana hep destek olan değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocam Yrd.Doç.Dr.Sümmeye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na ve yardımlarını desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Dr.Meltem ALPER AYDIN'a, Esra SOLMAZ TOKAY'a ve değerli, grup arkadaşlarım Tuğşen AYDEMİR, Derya OKUYAN, Gizem GÜLER, Serhad ONAT, Kubilay GÜNERHAN ve Ece CEYLAN'a

Yüksek lisans dönemi boyunca en eğlenceli ve güzel günlerimi geçirdiğim arkadaşlarım Ceylan TOPRAK, Nurten GÜNGÖR, Kadriye ZENGİN, Fatma GÜNGÖR, Mihrap Yaşar KAYA'ya,

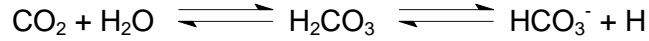
Hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini ve sevgilerini benden koşulsuzca esirgemeyen, öğrenim süremin onlarla başlayıp hala devam ettiği canım annem Sevilay KARAMAN, biricik babam Mehmet Zeki KARAMAN ve canım kardeşim Meltem Zeynep KARAMAN'a teşekkür ederim. .

1. GİRİŞ

1.1 Karbonik Anhidraz Ailesi

Karbonik Anhidraz enzimleri (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1) ilk olarak 1932 yılında kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmişlerdir. Mide ve böbrek ile yapılan çalışmalarda temel olarak asit baz dengesini sağladıkları belirlenmiştir [1]. Karbonik anhidrazlarla ilgili ilk derleme makale ise Maren (1967) tarafından yazılmıştır. 2000'lere gelindiğinde ise moleküler biyolojinin gelişmesi süreci hızlandırarak kırmızı kan hücrelerinde birçok CA izoformu keşfedilmesini sağlamıştır [2].

Karbondiyoksit molekülünün bikarbonat iyonu ve artı yüklü hidrojen iyonuna dönüşümünü katalizleyen bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki bir çok yerde gaz değişimi, iyon transportu ve asit-baz dengesinin sağlanması gibi olaylara katılmaktadırlar.



Şekil 1.1: Karbonik Anhidrazların Genel Tepkime denklemi

1.1.1 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması ve Fonksiyonları

Karbonik anhidrazlar canlıların hemen hemen hepsinde bulunmakla beraber pH dengesi, iyon transportu, glukoneogenesis, böbreklerde asit birikiminin düzenlenmesi, beyin sıvısının oluşumu, kemiklerin oluşumu gibi birçok metabolik aktivitede rol oynayan çinko metalloproteaz enzimlerdir.

Karbonik anhidrazların en çok bilinen 3 sınıfı α , β , γ 'dir. Evrimsel açıdan farklı kökenden gelip aynı görevi üstlendiklerinden dolayı konvergent evrime örnek gösterilmektedir. γ -sınıfı CA'lar ilkin canlılar arkealarda ve eubakterilerde bunun yanında bazı bitkilerde bulunmuştur. β -sınıfı CA'ların bitkilerde, alglerde, mantarlarda, arkealar, eubakterilerde ve bazı omurgasızlarda gen ekspresyonunun olduğu gözlemlenmiştir. Son olarakta *Drosophila*'da bulunduğu keşfedilmiştir. α -

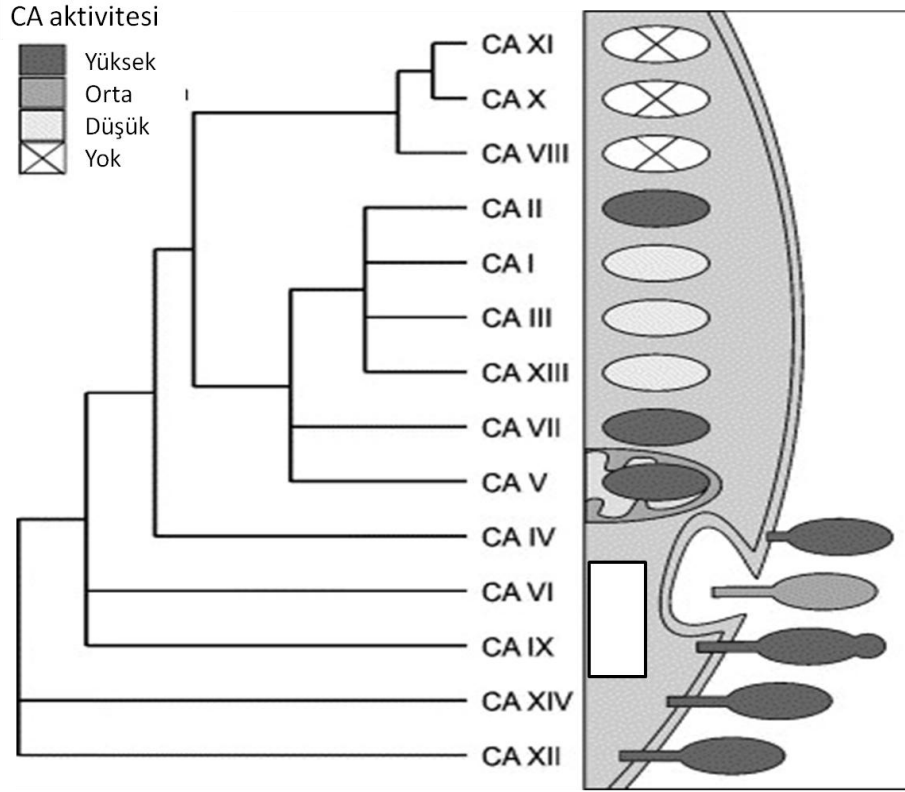
sınıfı CA'lar arkealar hariç diğer tüm canlılarda özellikle hayvanlarda gen ekspresyonunun baskın olduğu en büyük gruptur. Bu gruplara ek olarak deniz canlılarında özellikle diatomlarda bulunan δ ve ζ sınıflarında keşfedilmiştir [3, 4, 5].

CA molekülünün aktif bölgesinde α , β , δ ve γ -sınıfında çinko bulunmaktadır. γ -sınıfında çinko yerine demir, deniz canlılarına ait ζ -sınıfında da çinko yerine katmidyum bulunabilir.

α -sınıfı CA'lar ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi açıkça aydınlatılmıştır [6]. Sadece onüçünün katalitik aktivitesi ve bir tanesinin (CAXV) insanlarda yalancigen (psodogen) olarak inaktif halde bulunduğu gösterilmiştir [7]. Diğer CA'lara göre α -sınıfı CA'lar çoğunlukla monomerik haldedirler [1]. Üç tane CA-bağımlı protein (CARP VIII, X, XI) bulunmuştur ancak enzimatik bir fonksiyonları bulunmamaktadır [8,9].

α -sınıfı CA izoenzimlerin hücre içindeki dağılımları farklılık göstermektedir. CA I-III, CA VII memeli sitoplâzmlarında NHE1 izoformu Na(+)/H(+) değişimini sağlar, CA IV, CA9, CA XII ve CA XIV hücre zarında anyon değiştiricisi olarak bikarbonat iyonlarını taşımada görevlidir. CA VI süt ve tükürük salgılarında görevlidir. CAV A – CAV B mitokondride bulunmaktadır ve pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasında moleküler sinyal yolağında görev yapmaktadır. NonO/p54^{nbr} nükleusta bulunmaktadır (Şekil 1.1) [10-18].

CA II biyolojik sıvıların üretiminde önemli rol oynar örneğin midede gastrik paryatel hücrelerin H⁺ iyonu dengelenmesini sağlar. CA II ve CA IV proteinleri bazı türlerde (murine ve porcine) inaktif haldedir, bunun nedeni bikarbonatça zengin salgının üretilmesini sağladığı içindir [19-28]. Ayrıca birçok kanser türünde CAII ekspresyonunda azalma görülmekte. CAII'nin ektopik ekspresyonu yapıldığında endotelyumda ki melanomlarda, özefagus, böbrek, akciğer ve beyin kanserlerinde yeni damar oluşumuna neden olduğu görülmüştür [29].



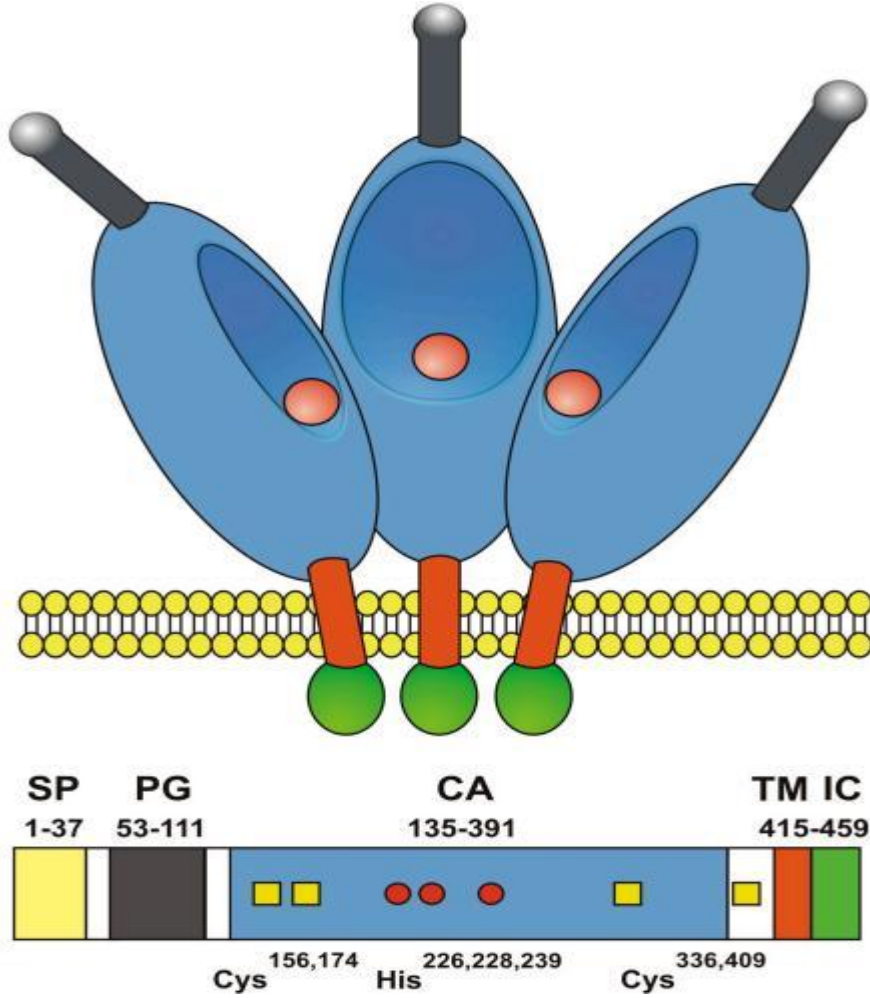
Şekil 1.2: Memeli hücrelerindeki karbonik anhidraz izoformlarının moleküler soy ağacı, yapısal yerleşimleri ve enzimatik aktivitelerinin şematik gösterimi [30].

CA9 hücre büyümesi, hücre adezyonu ve malin hücre invazyonunda görevlidir ve genel olarak CA9 ekspresyonunu normal böbrek dokularında görmek olası değilken kanserli dokular da aşırı ekspresyonunun olduğu görülmüştür. Böylece kanser biyobelirteçi olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

1.2 Karbonik Anhidraz 9

1986 yılında monoklonal antikor mAbG250 olarak böbrek kanseri hücrelerinde ve normal dokularda aynı ekspresyon modelini gösterdiği tanımlandı. Ancak bu ekspresyon seviyesindeki benzerlik normal böbrek hücrelerinde mAbG250 antijen ekspresyonu olmadığı onkogen aktivasyonu ya da viral bir enfeksiyonun neden oluştu bulunmuştur [31]. Günümüzün en önemli hastalıklarından birisi olan ve kanser ile ilişkisi tespit edilmiş olan CA9 proteini 1994 yılında MN/CA9 olarak tanımlanmış ve ilk kez 1997 de izole edilmiştir. Daha sonra 1999 yılında Pastörek ve arkadaşları tarafından promotörü karakterize edilmiştir [32].

CA9 proteini 54 ve 58 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Yapı olarak bir sinyal peptit, proteoglikan bölgeye, CA aktif bölgesine, transmembran bölgesine ve hücre içi intrastoplazmik kuyruklara sahiptir [33]. Üç boyutlu yapısına bakıldığında proteinin plazma membranı ile ilişkili olduğu (Şekil 1.2) görülmekte. CA9 dimer halde bulunan bir proteindir ve 4 önemli domaini bulunmaktadır; N-terminal proteoglikan (PG) domaini, katalitik domain (CA), transmembran domain (TM) ve intrastoplazmik (IC) domaini [34]. CA9 geninin lokasyonu 9.kromozomun kısa kolunda p13.3 ile p13.2 arasında olan bölgededir.



Şekil 1.3: CA9 proteininin ve geninin şematik gösterimi [35].

Karbonik anhidraz ailesinde PG domain sadece CA9'da bulunmaktadır ve bu özellik hücre adezyon kuvveti, hücreler arası iletişimi sağlama gibi özellikler vermektedir [36]. Bu yapısal özellikten yola çıkarak tümör hücrelerine invazyon özelliği kazandırdığı düşünülmektedir. CA9'un katalitik domain tam aydınlatılmamasına rağmen evrimsel olarak korunduğu için diğer izoformlarında

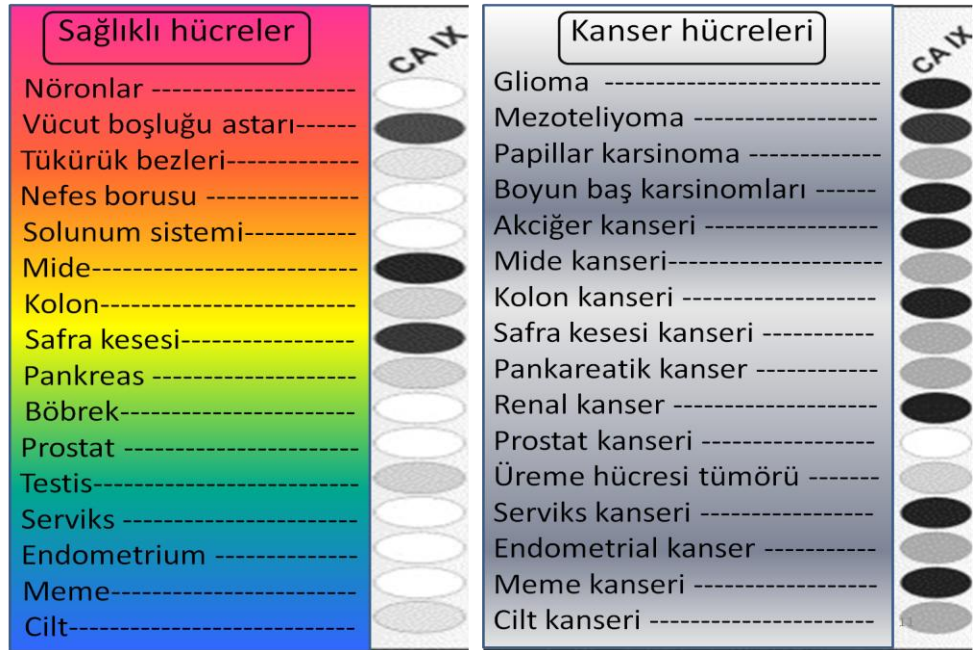
olduğu gibi fonksiyon göstermekte olduğu düşünülmektedir. Yüksek seviyede CA9 ekspresyonu serviks kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, beyin tümörü gibi birçok kanser çeşidi ile ilişkilendirilmiştir.

Metastatik özelliğe sahip böbrek kanseri ile yapılan bir çalışmada yüksek CA9 ekspresyonunun hastaların %62,5'inde tespit edilmiş. Oranın bir yıl içinde %83 ile %63 oranını ($p=0,01$) bulduğunu gözlemlenmiş [37].

CA9 aktivitesi etkisi altında önemli bir protein vardır. Memeli hücrelerinde özellikle epitel hücrelerde E-kaderin hücre adezyonunda anahtar rol oynar. B-kateninler E-kaderin ile ilişkili olup adherinlerin bağlanma bölgesinde önemli bir kompleks parçadır [38].

1.3 Karbonik Anhidraz 9 ve Kanser İlişkisi

CA9 transmembran protein olup bilinen kanser ilişkili karbonik anhidraz izoenzimlerindedir. Böbrek kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda CA9 ekspresyonunun arttığı görülürken normal böbrek hücre hattında CA9 ekspresyonu gözlenmemektedir.



Şekil 1.4: Sağlıklı ve Kanser hücrelerinde CA9 ekspresyon seviyesi [kaynak 39'dan modifiye edilmiştir]

CA9 ve CA 12 tümör ilişkili CA ailesi üyeleridir ve ekspresyonları hipoksiya ile indüklenmektedir. CA9 hücre büyümesi, hücre adezyonu ve malign hücre invazyonunda görevli olduğu için daha çok araştırılmıştır. Genel olarak CA9 ekspresyonunu normal dokular da görmek olası değilken kanserli dokular da aşırı ekspresyonunun olduğu görülmüştür [40-46]. Birçok çalışmada belirtilen CA9'un rolü; tümör hücre büyümesi, adezyonu ve tümörlü hücrelerin yaşamını desteklemektir [47-49]. Özellikle katı tümörlerde CA9 ekspresyonu, tümörün teşhisi ve gelişimi hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu enzim biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Bu membran bağlı tümör ilişkili izoenzimin ekstrasellüler pH'yı kontrol ettiği ve böylelikle katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkimesi bu enzimin sadece hipoksiya için değil ayrıca kanser tedavisi için de önemli olduğunu göstermektedir [50-51].

CA9 ile böbrek kanseri hastalarında klinik ve klinik öncesi yapılan çalışmada, kanser tanısını koymada ekspresyon seviyesindeki artışın yüksek dozda IL-2 uygulaması ile engellenebildiği gösterilmiştir [21].

Kanser hücre hatlarında CA9'a özgü tasarlanan RNAi ile yapılan çalışmalarda CA9'un hipoksiya ve normal oksijen koşullarında tümör hücrelerinin yaşaması ve varlığını sürdürebilmesi için önemli olduğunu, göstermiştir. CA9'a özgü tasarlanan RNAi uygulanan hücrelerde hipoksiya sebebiyle CA aktivitesi tamamen bloke edildiğinde, tümör hücrelerinin büyümelerinde gerileme ve hipoksik koşullardaki yaşamlarında yarı yarıya bir azalma olduğu gözlenmiştir [52-53].

1.4 Hipoksik Durum Nedir?

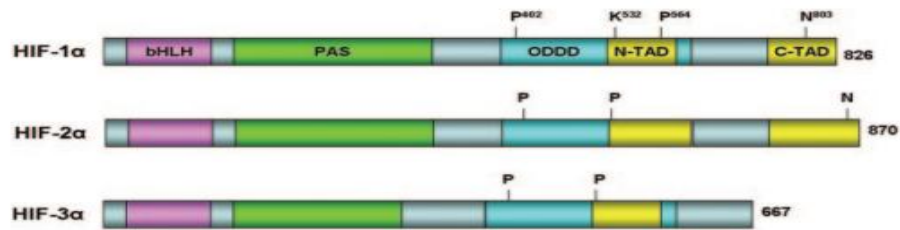
Katı tümörlerin kilit özelliklerinden biri de tümör merkezinde hipoksik bölgelerin varlığıdır. Tümörlerin boyutu büyüdükçe, hücreler yetersiz kalan oksijenini ve besinini kandan sağlar. Tümörler bu sorunu angiogenesisde önemli olan VEGF'in artan ekspresyonu ve tümörde damarlaşmayı arttırarak çözmektedirler. Sonuç olarak tümörün merkezindeki bölge ciddi şekilde hipoksik hale gelmektedir. Bu bağlamda, hipoksik koşullardaki tümör hücreleri incelendiğinde, oksijen yoğunluğu 5-10 mm/Hg aralığının altına düşmeye başlar başlamaz hücrelerin öldüğü belirlenmiştir [54]. Bu özel sistemin en önemli üyesi olan HIF-1 tümör hücreleri için

hayatta kalma genlerinden biridir ve enerji metabolizması, anjiyogenezis ve metastasta düzenleyicilerin aktivasyonundan sorumlu genlerdendir.

Mikroçevredeki hipoksiya halinde ise adaptasyon protein aktivite değişimleri ve gen ekspresyon değişimleriyle kontrol edilmektedir [55-57]. Hipoksi-indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) oksijen dengesinin temel düzenleyicisidir [58]. Oksijen miktarında azalma durumunda transkripsiyon faktörü olan Hif-1 proteininin transkripsiyonel aktivitesini sağlayarak ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde değişikliklerine neden olmaktadır [59].

Hif-1 proteini heterodimer halde bulunan transkripsiyonel komplekstir. Hücresel oksijen konsantrasyonu seviyesindeki değişimde hedef gen haline gelir. Bu proteinin kodlanması onkojenik oluşumlar, hücrelerin hayatta kalımı, proliferasyon invazyon ve metastas gibi süreçlerde önemlidir. Hif-1 heterodimer yapısı sürekli ekspre olan Hif1 β alt ünitesi ve düzenleyicisi Hif1 α alt ünitelerinden oluşmaktadır. Hif1 α alt ünitesi ekspresyonu ve transkripsiyonel aktivite düzeyi hücre içi oksijen miktarına bağlı olan bir proteindir [60].

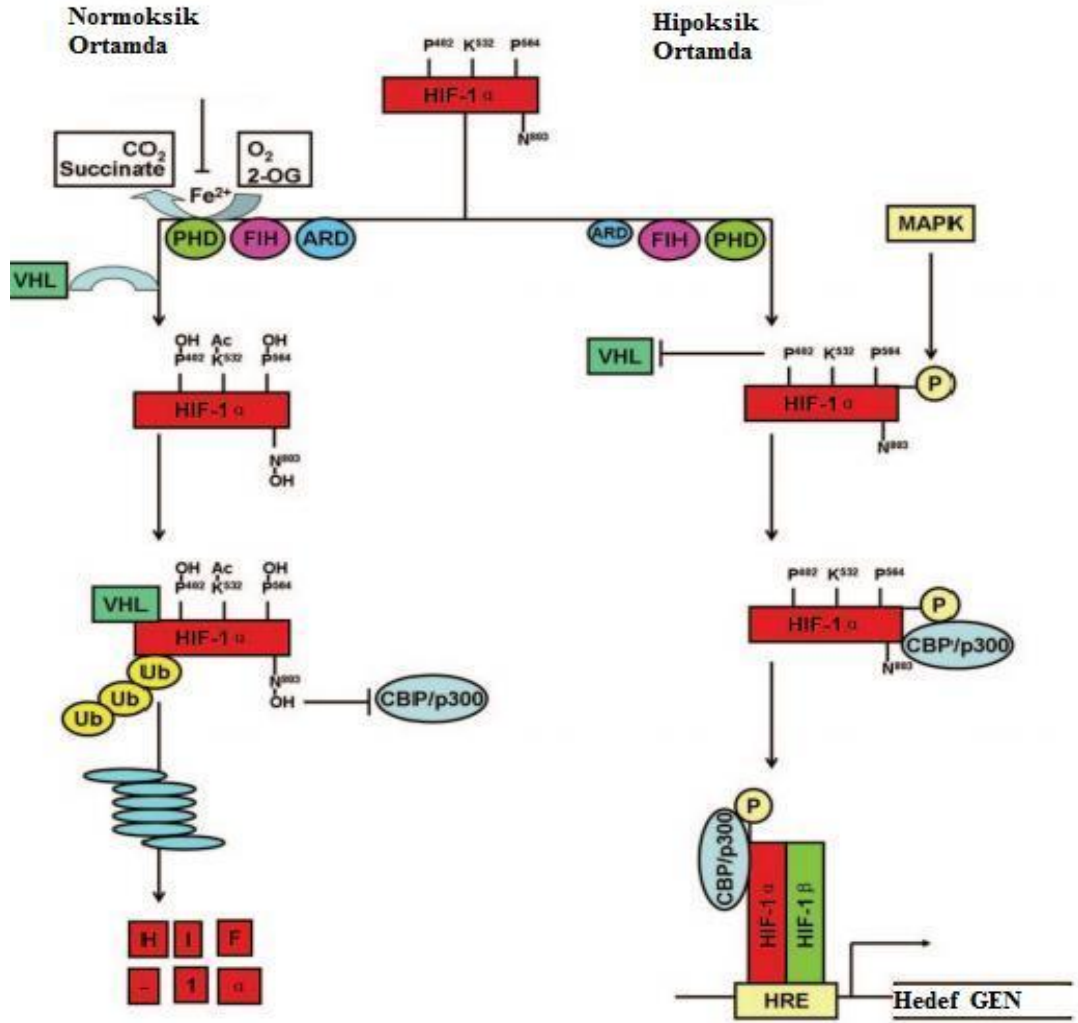
Hif1 α 'nın üç izoformu olduğu keşfedilmiştir bunlar; Hif1 α , Hif2 α ve Hif3 α 'dır (Şekil1.4). Hif1 α ve Hif2 α yapısal olarak benzerdir ve hızlı bir şekilde hipoksik koşullara yanıt verebilmektedirler. Hif3 α hakkında literatürde fazla bilgiye rastlanmamıştır ve tam olarak açıklanamamıştır. Bu izoformlarının haricinde çeşitli varyantları bulunmaktadır. Bu varyantları Hif1 α alt ünitesi gibi Hif'in gen ekspresyonunda görev almamaktadırlar. Hif1 α dokularda geniş bir dağılıma sahip iken Hif2 α hücre tiplerine özgüdür ve ayrı biyolojik rolü bulunmaktadır. Her ne kadar Hif-1 ve Hif-2 benzer şekilde regüle etselerde farklı genlerde görev alırlar [61]. Daha spesifik olarak; karaciğer hücrelerinde her iki izoformun farklı kinetik profilleri vardır. Hif1 α hipoksik yanıtta çok hızlı bir şekilde cevap verir ve bazal seviyeye erken döner. Hif2 α ekspresyonu geç olur ancak uzun sürelidir. Bu da iki alt ünitenin koordineli çalıştığını akla getirir [62].



Şekil 1.5: Hif1 α , Hif2 α ve Hif3 α 'nın yapısal olarak domainlerinin gösterilmesi [63].

Hif1 α ve Hif2 α bazik sarmal-halka-sarmal yapısına sahip bir transkripsiyon faktörüdür ve N-terminal kısmında PER-ARNT-SIM (PAS) domaini bulunmaktadır (Şekil1.4). Heterodimerizasyonu ve DNA'ya bağlanma bölgesi olan Hipoksiya Response Element (HRE)'e bağlanmayı bu domainle gerçekleştirmektedir. Hipoksik ortamda upregüle olan HIF proteini gen promotör bölgeleri üzerinde yer alan hipoksi yanıt elementi (HRE; **CGTG**) baz dizisine bağlanır [64]. Oksijen seviyesi duyarlılığı ve regülasyonu Oksijen Depended Degradation (ODD) domain olarak adlandırılan özelliğe dayanmaktadır. Bu domain Hif1 α regülasyonunda normoksik koşullarda Von Hippel Lindau proteini (pVHL) bölgesine bağlanarak proteinin ubiquitinlenmesini gerçekleştirir [65].

Prolinlerin hidroksillenmesi demir ve oksijen bağımlı olarak prolin hidroksilaz enzimlerince gerçekleşir. Hipoksi varlığında hidroksilaz enzimleri oksijen azlığına bağlı olarak fonksiyon göremezler ve Hif1 α proteini yıkımı engellenerek hücre içinde birikmeye başlar. Oksijen varlığında Hif1 α 'nın transkripsiyonel aktivasyonu da engellenmektedir. pVHL proteininin ve bir ko-represör olan HIF baskılayıcı faktör (F β H) proteininin üzerine, histon deasetilaz (HDAC) kompleks proteininin bağlanmasıyla HIF aktivasyonu baskılanır. Hif1 α proteini 803 nolu asparajin amino asitinin de hidroksillenmesi ile transkripsiyonel ko-aktivatör protein p300'ün bu bölgeye bağlanması engellenmektedir. Hipoksik koşullarda gerek Hif1 α 'nın yıkılmasına neden olan gerekse transkripsiyonel baskılanmasına neden olan enzimler çalışamazlar ve Hif1 α hücre sitoplazmasında birikir, çekirdek içine göç eder ve burada Hif1 β alt ünitesiyle birleşir. Bu sayede oksijen varlığında Hif1 α proteini yıkılırken, oksijen miktarı azalınca hücre içi HIF1 α protein miktarı artar ve transkripsiyonel olarak da aktif duruma geçer [55].



Şekil 1.6: Hipoksik ve Normoksik ortamlarda Hif1 α 'nın regülasyonunun şematik olarak gösterimi [55]

İnsan ve hayvanlardan elde edilen örneklerde Hif1 α 'nın mRNA ve protein seviyesinin kanser oluşumu sırasında artış olduğu görülmüş ve anjiyogenesis (VEGF), glukoz transport (GLUT1) ve PI3K/AKT yolağındaki artışla korele olduğu tespit edilmiştir [66]. Birçok tümörde Hif-1 proteininin aşırı ekspresyonu görülmüştür [67-68]. Hif yolağında Hif1 α 'nın aşırı ekspresyonunun radyoterapi ve kemoterapiye direç geliştirmesine yol açmaktadır. Tümör içerisinde hipoksiya gelişmesi tümörün agresif ve metastazik özellik kazandırmasına neden olmaktadır. HIF miktarının tümör evresi ve prognozuyla da korelasyon gösterdiği öne sürülmektedir [69].

Bu bağlamda, Hif1 α regülasyonunu anlamak Hif yolağı çalışmalarında bize kansere karşı tedavi stratejilerinde çeşitli bilgiler sağlayacaktır.

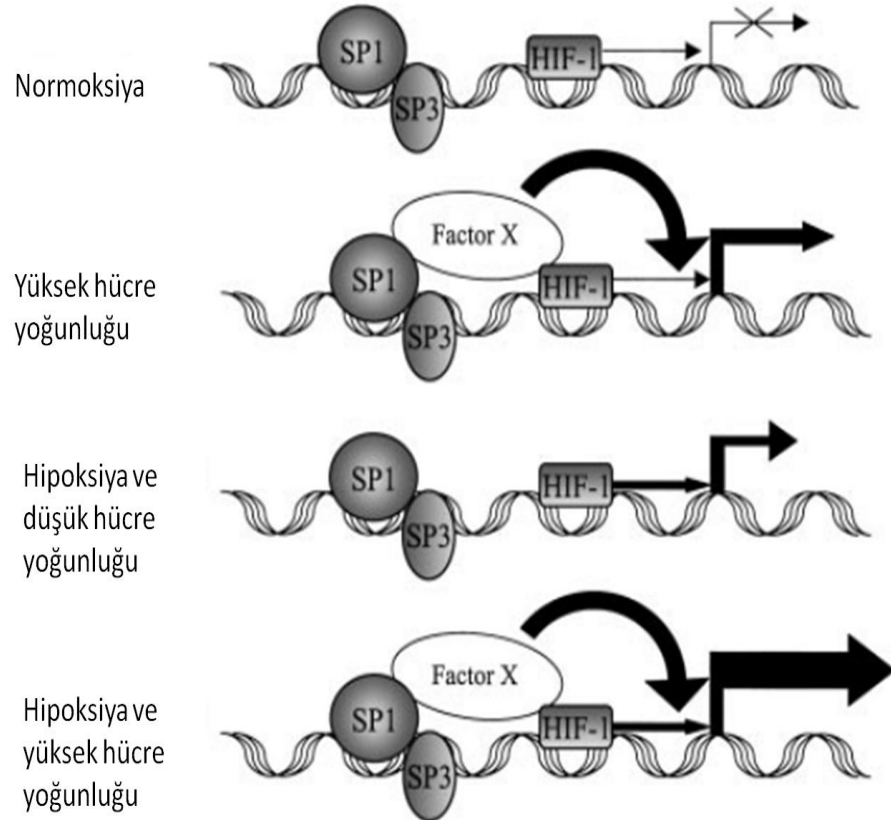
1.5 Hipoksiya Yolağı ve CA9'u Regüle Etmesi

Karbonik anhidraz enzimleri, pH'nın regülasyonu için önemlidirler ve literatürde tümörle ilişkili olan CA9'un sıkı bir şekilde HIF1 (Hipoksiya İnducible Factor) yolağı ile kontrol edildiği belirtilmiştir. Hipoksik koşullarda, Hif1 α yoluyla aktif hale gelen 50'den fazla gen bulunmaktadır. Bu genlerden CA9 hücre zarına lokalize olduğu ve kararlılığı nedeniyle güvenilir bir hipoksi belirteçidir [70-71].

CA9 ekspresyonu düşük oksijen varlığında artmakta ve CA9'un transkripsiyonu temel olarak Hipoksiya arttırıcı faktör (HIF-1) transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir [72]. Diğer pozitif regülatör elementlerinde CA9'da olan etkisi aydınlatılmasına rağmen (örneğin SP1 transkripsiyon faktörü) aşırı regülasyonu HIF-1 aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir. Buna örnek olarak Hipoksiya cevap faktörü (HRE) CA9 promotör bölgesinde yaygın olarak karakterize edilmiş ve tek başına CA9'un transkripsiyonel regülasyonunda önemli bir genetik faktör olduğu gösterilmiştir [73]. Diğer pozitif düzenleyicilerin CA9 transkripsiyonel kompleksinin düzgün sıralanması için önemli olduğu hipotezi öne sürülmüştür [74].

Tümörde oksijen yetersiz olduğu için enerji sağlamak için anaerobik glikolize gidilmektedir ve laktik asit ile H⁺ açığa çıkmaktadır. Sonuçta ortamın pH'ı değişir. Hipoksiya, asidik pH ile ilişkili olarak tümör büyümesini arttırıcı bir faktördür. Yüksek hücre yoğunluğunda, CA9 transkripsiyonunun artmasıyla çevresel hipoksiya meydana gelir. Bu durum SP1/SP3 ile HIF-1 beraber ekspresyonuna etki etmesiyle ilişkilidir (Şekil 1.5) [75-76].

Normal oksijen şartlarında CA9 promotor bölgesi bazal durumda bulunur. Yüksek hücre yoğunluğunda oluşan hipoksik koşullarda ise Faktör X ile SP1/SP3'ün kompleks oluşturmasıyla HIF-1'in transkripsiyonu arttırılır. Hücre yoğunluğuna bağlı olmayan hipoksi durumunda ise HIF-1'in normal transkripsiyonu söz konusudur. Hipoksik koşullarda ve düşük hücre yoğunluğu olduğu durumlarda ise SP1/SP3 transkripsiyon faktörleri HIF-1'intranskripsiyonunu aşırı derecede arttırır [69,77].



Şekil 1.7: CA9 promotörünün transkripsiyonuna değişik oksijen ve hücre yoğunluğu durumlarında SP1/SP3 ve HIF-1 transkripsiyon faktörlerinin etkisi [77]

Hipoksiyada inaktive olan VHL HIF-1'in hücre içerisinde birikmesine neden olur. CA9 ilişkili tümörlerde hipoksik şartların HIF-1 aktivasyonuna ve CA9'un upregülasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. CA9 promotöründe HIF-1 bağlanma bölgesi olduğu (HRE) biyoinformatik analizlerle gösterilmiştir [78]. Birçok çalışmada CA9'un aşırı ifadesi hücreler arası pH önemli rol oynadığı ve böylece tümörlü hücreler uygun ortam oluşturduğu tespit edilmiştir [79-81]. Hücreler arası bölgede düşük pH tümöre invazyon ve metastatik özelliği kazandırmaktadır [82-84].

İnsan kolon kanseri hücrelerinde HIF-1'in aşırı ifadesi Matrigel'de invazyon artışına neden olmuştur. HIF-1 proteini α -altbirim yönelik RNA engellenmesi (RNAi) ile invazyona etki ettiği görülmüştür [85]. Birçok çalışmada HIF-1 ekspresyonu ile CA9'un aşırı ifadenmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. İnvazyonun HIF-1 ile doğrudan etki gösteren objektif bilgi literatürde eksiktir.

1.6 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF β) ve CA9'a Etkisi

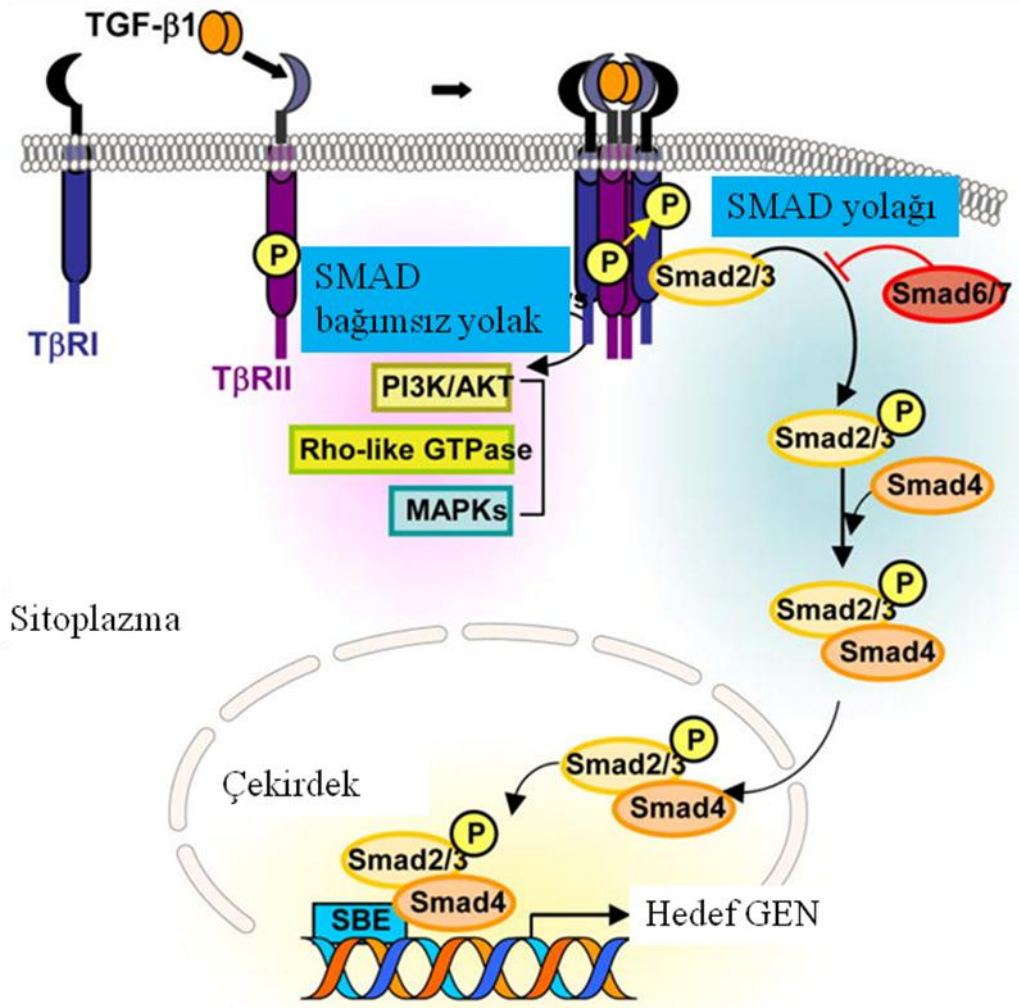
TGF- β (Transforming Growth Factor) bilinen en güçlü immun baskılayıcı faktördür. Tümör hücreleri tarafından salgılanan TGF- β düzeyi metastatik potansiyel ile doğru orantılıdır [86,87]. Çoğu önemli sitokinin salgılanmasını baskılar. Sitotoksik T-lenfositlerin diferansiye olmalarını engeller [36].

TGF- β ; 112 amino asitten oluşan aynı büyüklükte iki alt ünite içeren 25kDa ağırlığındaki peptidlerdir. Yapısal olarak transforme edici büyüme faktörü homolog dimerik protein ailesidir. α tek zincirli bir polipeptittir, β ise disülfid bağlı iki aminoasit zincirine sahip, dimerik bir polipeptittir [88,89]. Bu aile TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 olarak üç memeli izoformundan oluşmaktadır. Bu aile üyelerinin reseptörleri diğerlerinden farklı olarak serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir ve bu nedenle sinyal transdüksiyonunu farklı etkiler [86,69].

Çeşitli hücrelerde; hücreyel göç, proliferasyon ve farklılaşma stimülasyonu ile birlikte inhibisyonunu da gerçekleştirebilen multifonksiyonel bir peptittir. Ekstraselüler matris formasyonu ve hücre yüzey moleküllerinin oluşmasında görev alır [86].

TGF β , tümör oluşumunda iki farklı etkisi bulunmaktadır. Tümör oluşumunun ilk safhasında tümör baskılayıcı gibi davranırken; ileri safhalarında tümörü aktive edici gibi davranır [69,90]. *In vivo* çalışmalar da TGF- β 'nin virüslere ve allojenik tümörlere karşı bağışıklık yanıtını baskıladığı gösterilmiştir. [91]

TGF- β sitokinlerin başlattığı hücre içi sinyal iletim kaskadını da bloke etmektedir (örneğin: protein tirozin kinazlar PTK, JAK2; mitojenle aktiflenen protein MAP; nükleer protein STAT1) [91]. MAP Kinaz ve ERK yolları TGF- β tarafından fosforillenerek aktif hale getirildikleri aynı zamanda bu yollar ile, SMAD proteinlerini etkilerler. MAP Kinaz yolağı ökaryotik hücrelerde gen ifadesinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bazı çalışmalar ERK yolağının SMAD proteinlerinin fosforillenerek pozitif etkileri olduğunu gösterirken, bazıları da SMAD 2/3/4 aktivasyonunun ERK yolağı ile, bu proteinlerin çekirdeğe yerleşimini engellediğini ve böylece SMAD aracılı transkripsiyonu durdurduğunu göstermiştir [53,92].



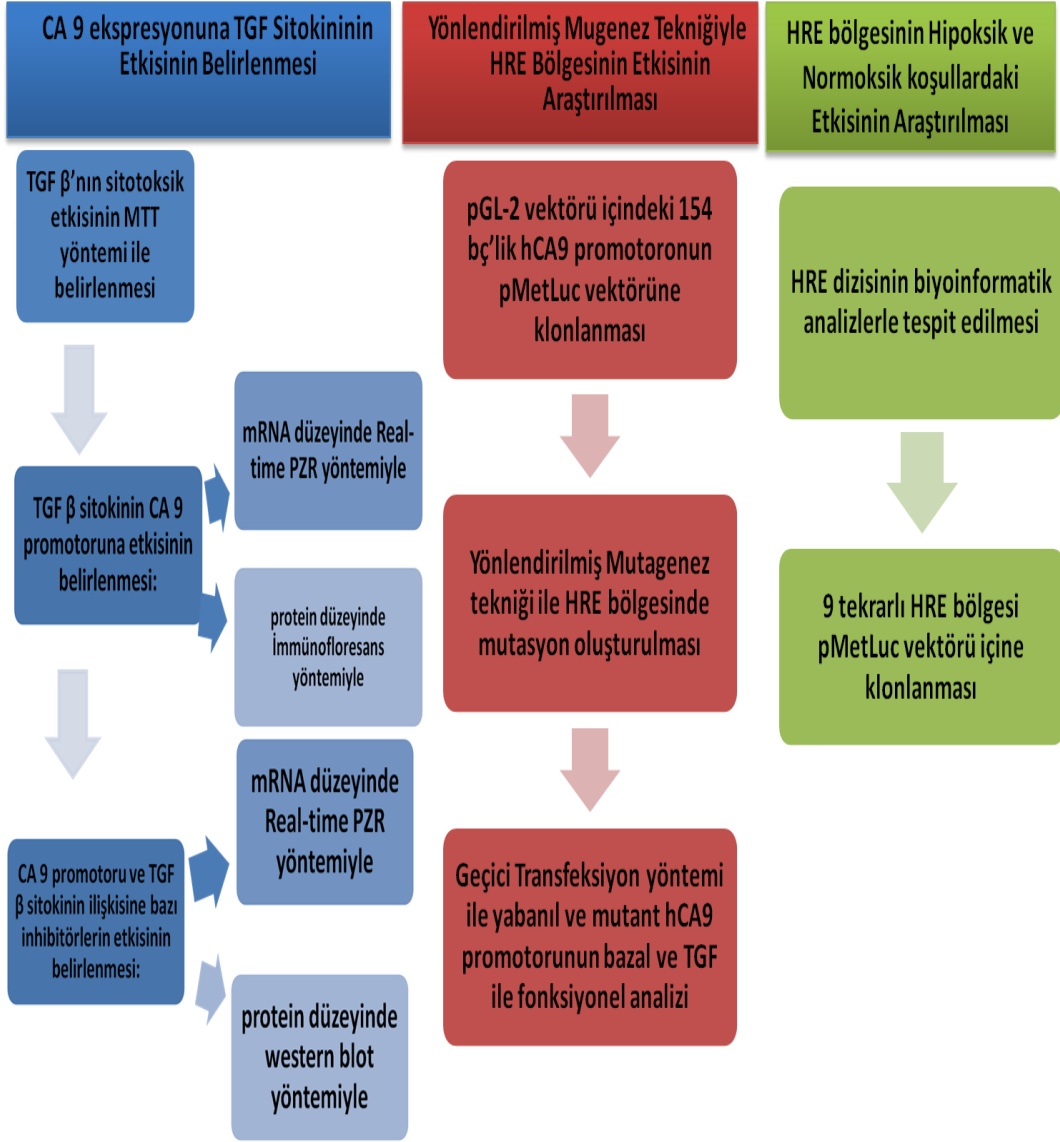
Şekil 1.8: TGF-β Yolağı ve Gen Regülasyonu [93].

1.7 Amaç

Bu tez çalışmasında TGF β bağlantılı, insan karbonik anhidraz 9 geninin regülasyonunun detaylandırılması amaçlanmıştır. CA9 promotorunun hipoksik cevap elementi taşıdığı ve hipoksik koşullar altında Hif 1 α tarafından regüle olduğu daha önce, Pastorek ve arkadaşlarınca gösterilmiştir [21]. Öte yandan TGF β sitokinin CA9 genin ifadesini mRNA ve protein düzeyinde arttırdığı Yıldırım ve Kockar tarafından ifade edilmiştir [94]. Çalışmamızın temel amacı; TGF β sitokinin etkisini hipoksik response element üzerinden mi yoksa farklı mekanizmalarla mı gerçekleştirdiğinin belirlenmesidir ve bu bağlamda aşağıda detayları verilen basamakların sırasıyla gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

1. PGL2 vektörüne klonlanmış hCA9 promoturunun 154 bç'lik kısmının salınan haberci vektör sistemi olan pMetLuc vektörü içine PCR stratejisi ile alt klonlama yapılması.
2. DNA dizileme ile klonlanan hCA9 promotorunun 154 bç'lik kısmının biyoinformatik programlarla doğrulanması.
3. Yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile pMetLuc içerisinde klonlanan hCA9 promotorunun 154 bç'lik dizisinde HRE dizisinin olduğu bölge Adenin bazı yerleştirilerek mutasyon yapılması.
4. HRE mutant ve yabanıl 154bç'lik promotor parçalarının geçici transfeksiyon yöntemi ile insan hepatoma hücrelerine (Hep3B) aktarılması, geçici ifadesinin oluşturulması, hipoksik ve normoksik ortamlarda karşılaştırılmalı fonksiyonel analizinin yapılması.
5. Bazal aktiviteleri geçici transfeksiyon ile belirlenen, yabanıl ve mutant hCA9 promotor bölgesine, TGF sitokininin etkisinin belirlenmesi.
6. HRE dizisinin normal oksijen koşulları altında ve hipoksik koşullar altında etkisinin araştırılması için 9 tekrarlı HRE bölgesi pMetLuc vektörü içine klonlanması.
7. TGF β sitokinin insan hepatoma hücrelerine (Hep3B) normoksik ve hipoksik koşullardaki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile araştırılması.
8. TGF β sitokinin CA9 promotoruna etkisinin normoksik ve hipoksik şartlar altında, mRNA düzeyinde Real-time PZR yöntemiyle ve protein düzeyinde İmmünofloresans yöntemi ile belirlenmesi.
9. CA9 promotörü ve TGF β sitokinin ilişkisine bazı inhibitörlerin etkisinin mRNA düzeyinde Real-time PZR yöntemiyle ve protein düzeyinde western blot yöntemi ile belirlenmesi (Şekil: 1.9).

İnsan CA 9 Promotorunun Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği ile Fonksiyonel Analizi



Şekil 1.9: İnsan CA9 promotorunun Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği ile Mutasyonu ve Moleküler Analizinin çalışma diyagramı

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler

Tablo 2.1: Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-20°C ve +4°C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD GFL, Almanya
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair, ABD
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Etüv	WTB German, Nüve Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Jel Görüntüleme	UVP, İngiltere
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Luminometre	Thermo, ABD
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
Otoklav	Hirayama, Japonya
Otomatik pipetler	Finnpipette
PZR cihazı	Biolab, Thermo
PH Metre	WTW, Almanya
Qubit	İnvitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1(Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan GO

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tümü moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Moleküler biyoloji materyalleri, klonlamada kullanılan vektörler ve PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Promega, New England Biolabs ve Fermentas firmalarından alınmıştır.

Tablo 2.2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

DNA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	Thermo Scientific
Genopure Plasmid Maxi Kit	Roche Applied Science
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Thermo Scientific
Nylon Membran	Thermo Scientific
pGEM-T Easy Vektör Sistemi	Promega
pGL2-basic Vektörü	Promega
Plasmid Maxi Prep Kiti	Fermentas
pMetLuc Haberci ve Kontrol vektörü	Clontech
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay Kiti	Clontech
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Fermentas,NEB
T4 DNA Ligaz Enzim ve Buffer	Fermentas
Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
CaCl ₂	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Gibco
EDTA	Sigma
Fetal Sığır Serum (FCS)	Sigma
Fosfat tamponu tabletleri (PBS)	Sigma
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin	Sigma

RNA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermentas
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
B -Merkaptoetanol	Sigma
Protein Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler	
Amonyum persülfat	Merck
B-aktin antikor	Sigma
CA9 antikor (monoklonal, anti-rabbit)	Sigma, Abcam
Page ruler plus prestained protein ladder (26619)	Thermo
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
PVDF Membran	Millipore
Sekonder antikor (monoklonal goat,anti-mouse)	Sigma
Sekonder antikor (monoklonal goat,anti-rabbit)	Abcam
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
Tris	Sigma
Sekonder Antikor Floresans Dye	invitrogen
Mounting medyum	İnvitrogen

2.1.3 DNA ile ilgili Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar

2.1.3.1 Transfeksiyon çalışmalarındaki solüsyonlar

Tablo 2.3: Salınan sistem ile geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler

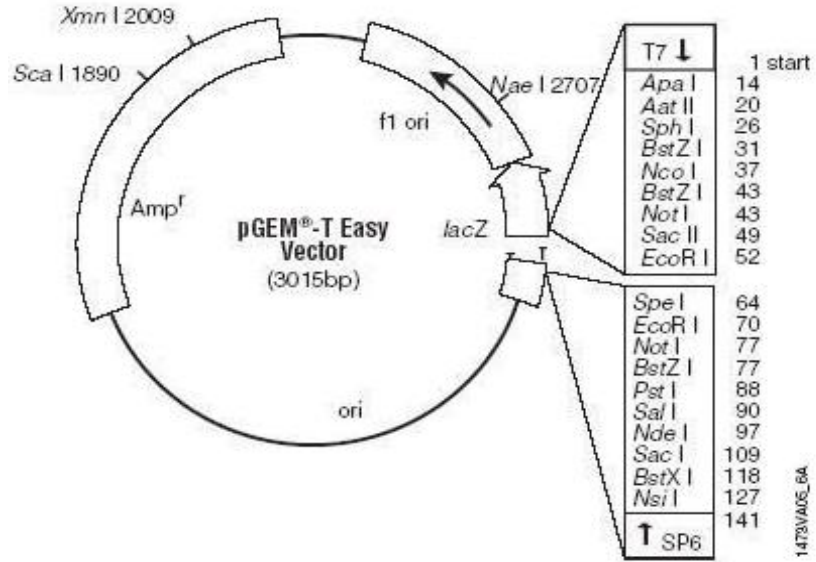
2mM CaCl ₂	14,7g CaCl ₂ , balon jode 50ml'ye saf su ile tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra filtre edilir ve +4 °C' de saklanır.
2X HEPES	1,6 g NaCl, 0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,3 g HEPES distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. pH 7,05 – 7,12 aralığında olmasına çok dikkat edilmeli. Otoklav yapılarak filtre edilir ve -20°C °C' de
10X Substrat Solusyonu	Liyofilize olarak gelen substrat, substrat tamponu ile çözülür.
1X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10X Substrat solusyonu, reaksiyon tampon ile 10kat olacak şekilde sulandırılır. Her ölçüm için 5µl kullanılır.
1X Dilüsyon Tamponu	5X dilüsyon tamponu ddH ₂ O ile 5 kat sulandırılarak her bir örnek'e 75 µl eklenerek kullanılır.

2.1.3.2 Agaroz Jel Elektrofrezindeki Solüsyonlar

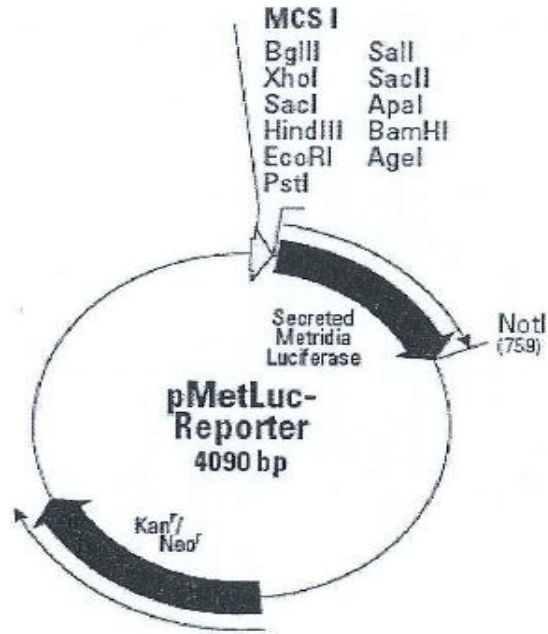
Tablo 2.4: Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

5X/L Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu pH:8,00	54g Tris Baz, 27,5g Borik Asit, 20ml 0,5M EDTA (pH:8,00) tartılır. Balon jodeye alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavlanır
0,5X/L TBE Tamponu pH:8,00	5X/L TBE tamponu 1:10 olacak şekilde sulandırılarak pH'sı ayarlanır ve otoklavlanır.
1kb DNA marker	1 µl (DNA ladder):2 µl (yükleme boyası):2 µl (steril distile su) oranlarında çözülür.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10mg/mL olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlanır. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edilir.

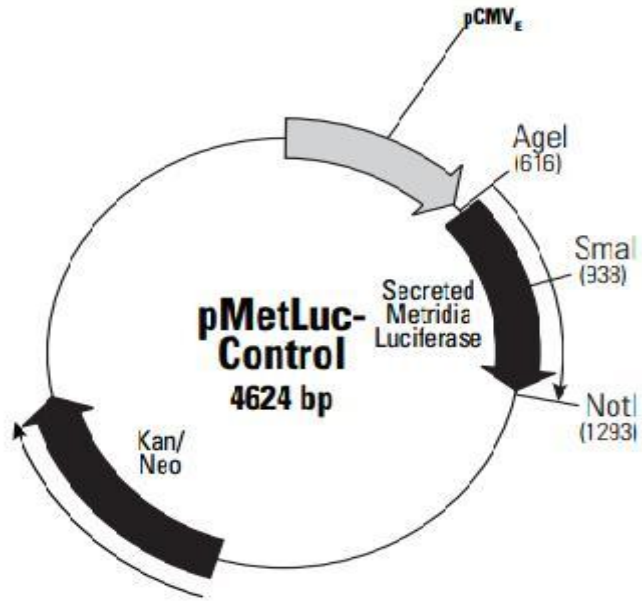
2.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Vektörler



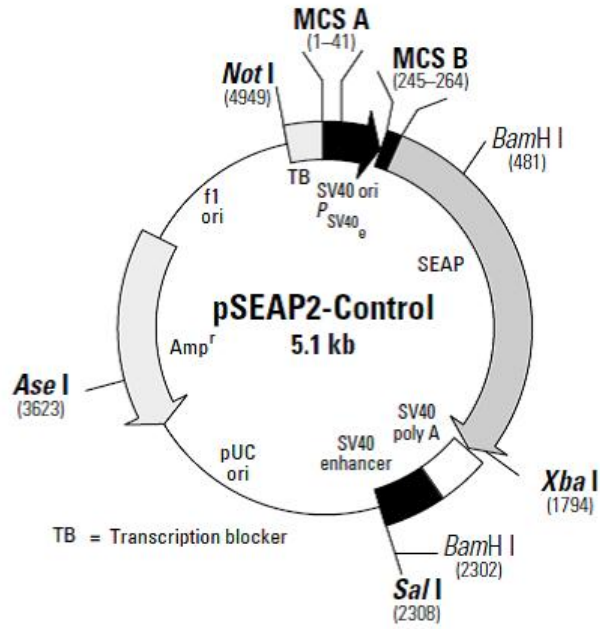
Şekil 2.1: pGEMT easy Vektörünün Restriksiyon Haritası ve Klonlama Bölgesi



Şekil 2.2: pMet-Luc Reporter Vektörünün Restriksiyon Haritası ve Klonlama Bölgesi



Şekil 2.3: Transfeksiyonda Kullanılan pMetLuc Kontrol Vektörü



Şekil 2.4: Transfeksiyonda Kullanılan SEAP Kontrol Vektörü

2.1.3.4 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli XL1-blue* (endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacI_q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk- mk+)) , *E.coli DH5α* (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1), One Shot® TOP10 *E.Coli* (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15Δ lacX74 recA1 ara D139Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG) kompetent hücreleri kullanıldı.

2.1.3.5 Bakteriyel Kültür Ortamı

E.coli için kültür ortamı olarak LB sıvı besi yeri kullanıldı. Toz halinde alınan bakteriyel medyum firmanın önerdiği miktarda ddH₂O ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

2.1.3.6 Stok Antibiyotiklerin Hazırlanışı

Ampicilin 100 mg/ml, kanamisin ise 50 mg/ml stok solüsyon olacak şekilde hazırlanarak 0,22 µm filtre ile steril edildi ve -20°C'de saklandı.

2.1.3.7 Antibiyotik İçeren Katı Besiyerinin Hazırlanışı

Katı besi yeri firmanın önerdiği gibi 8,75 gr LB-agar tartılır ve 250 ml distile su içinde çözülür. Otoklavlanır ardından ılımasıyla bereber ilgili antibiyotik eklenerek petrilere dökülür. Donmasının ardından parafilmle +4°C'ye kaldırılır.

2.1.3.8 Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltilisi

Tablo 2.5: DH5α Kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar

Kimyasal madde	Son konsantrasyon
1M CaCl ₂	100mM
%99 gliserol	%40

2.1.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyallerin Hazırlanması

2.1.4.1 Hücre Kültüründe Medyumun Hazırlanması

Hücre kültüründe ticari olarak alınan DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) medyumuna içine, son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde FCS eklendi. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.1.4.2 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) taşınması soğuk zincirle yapıldı ve -20 °C'de saklandı. Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C 30 dakika su banyosu kullanılarak inaktive edildi 0,22'lik steril filtrelerden geçirilerek tekrar -20°C'de saklandı.

2.1.4.3 BSA Hazırlanması

Stok %15'lik BSA hazırlanırken 0,75 gr BSA 5 ml PBS içinde çözüldü ve 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.1.4.4 PBS Hazırlanması

Tablet şeklinde satın alınan PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml dH₂O ile hazırlandı ve otoklavda steril edildi. 2-8°C'da saklandı.

2.1.5 Proteinile ilgili Çalışmalardaki Tampon ve Çözeltiler

2.1.5.1 Western Blot Tekniğindeki Çözeltiler

Tablo 2.6: Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Boyama Çözeltisi	0,25g Coomassie Brilliant Mavisi 250,100ml %95'lik Etanol, %10 Asetik Asit
Bromfenol Mavisi Solüsyonu	%0.05 (w/v) bromfenol mavisi distile su içinde çözülerek hazırlanır.
Laemli Tamponu	0.125 M Tris-HCl(pH:6.8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β -2-Merkaptoetanol
Renk Açma Çözeltisi	Hacimce %. 7,5 Asetik Asit, % 5 Metanol ve % 87,5 mL distile su
SDS PAGE Ayırma Jeli Tamponu	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yığıma Jeli Tamponu	1 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS
Temizleme Tamponu	1M Glycine, %1SDS, pH 2.5
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
Yükleme Boyası	1,4gr Tris, 4g SDS, 20gr Sükroz, 4mg Bromfenol mavisi,pH=6,8'eayarlanarak100mL'ye tamamlanır.

2.1.5.2 İmmüofloresans Tekniğindeki Çözeltiler

Tablo 2.7: İmmünofloresan Tekniğinde Kullanılan Kimyasallar

Triton X 100	PBS ile %0,1 ve 0,3 olacak şekilde seyreltilir
Bovine Serum Albumin (BSA)	1 gr tartılır ve üzerine 10 ml PBS eklenerek son konsantrasyonu %10 olacak şekilde tamamlanır
Paraform aldehyd	16 gr paraform aldehyd tartılır üzerine saf su eklenir ve 80°C'de magnetik karıştırıcıda eritilir. 0,22'lik filtreden geçirilerek steril edilir eppendorflara paylaştırıldı ve -20°C 'de saklandı. Eritildikten sonra tekrar kullanılmaz. Stok çözelti %16lık olacak şekilde hazırlanır. Kullanılırken %4'e seyreltilir.

2.2 Metotlar

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı tüm malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C'de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Çalışmaya başlamadan önce ortam ve pipetmenler %70'lik alkol ile temizlendi. Doku Kültürü Laboratuvarı her hafta düzenli olarak alkol ve virkon içeren sıvılarla temizlendi. UV lamba kullanılarak ortamda bulunan mikroorganizmaların en aza indirilmesi sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamındaki havanın sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 DNA ile ilişkili teknikler

2.2.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR reaksiyonları 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak yaklaşık 200 ng DNA, her bir primer son konsantrasyonu 2 µM, 1X Tampon (Fermentas)(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu (2 mM, 4 mM ve 6

mM) ise her bir PZR reaksiyonu için optimize edildi. PZR programı ve döngü sayısı primerlere ve kalıp DNA kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ancak 94°C'deki ilk denatürasyon basamağı ve Taq polimerazın optimum aktivasyon gösterdiği 72°C'de uzama basamağı her PZR reaksiyonu için aynı kullanılmıştır. PZR sonuçları agaroz jelde UV sistemi ile görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

2.2.2.2 Primer Tasarımı

Primer tasarımı yapmak için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov, www.idtdna.com ve www.bioinformatics.org/primerx/ adresleri kullanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences) bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan CA9 geni promoter ile en iyi benzerliği gösterdiği ve mutasyonunda belirgin şekilde tespit edilebilir olduğu görülmüştür.

2.2.2.3 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi yapmak üzere yatay jeller kullanıldı ve 90 volt elektrik akımında yaklaşık 30 dakika örnekler yürütüldü. Elektroferez tamponu olarak 0,5 X TBE kullanıldı. Agaroz jele son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisini tercih edildi. Çalışmada % 0,8 ve % 1 konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektroferezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünü tespit etmek için farklı büyüklüklerde DNA belirleyiciler kullanıldı. Elektroferez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

2.2.2.4 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

İstenilen büyüklükte olan DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden bistüri ile kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden geri kazanılan DNA'nın bir miktarı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alındı.

2.2.2.5 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PZR ürünleri pGEM-T easy vektörüne prosedürün önerdiği şekilde T:A klonlaması yapıldı. PZR ürünümüzde oluşan Adenin kuyrukları pGEM-T easy vektöründe kullanılan Timin nükleotidine dimer oluşturarak ligasyon bölgesi oluşturuldu. Buna göre 20 µl toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGEM-T vektör (50 ng), 15 µl iDNA (jelden kazanılan PZR ürünü), 2 µl 10 x T4 ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz (+4 °C'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli* DH10B ve DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi. Rekombinant kolonilerin seçimi mavi-beyaz koloni yöntemi ile yapıldı. Bunun için ampisillin içeren LB agar besiyerlerine 100 µl IPTG (100mM stok) ve 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı.

2.2.2.6 Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

Küçük miktarlarda DNA izolasyonu için Fermentas Miniprep DNA isolation kit kullanıldı. Kit prosedürüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisillin içeren 10 ml LB besiyerine transformasyonu yapılmış olan tek koloni ekim yapılır ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Kültür 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır ve bakteri pelletine prosedüre uygun olacak şekilde yapılan işlemlerin ardından DNA elüe edilir.

2.2.2.7 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için (Fermentas) Maxi Prep Kit kullanıldı. Kit prosedürüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 5-10 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapılır. 37°C de 8 saat 250 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda seyreltilir. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanılır. 37°C de 12-16 saat 250rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklenir. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştınca 4°C'de 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak prosedürün diğer basamakları yapılır. İşlem sonunda yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edilir.

2.2.2.8 DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Plazmid DNA İzole edildikten sonra miktarının ve saflığını belirlenmesi için iki yöntem kullanıldı. İlk yöntemde spektrofotometrik olarak ölçüm alındı. DNA dH₂O ile 40 kat sulandırılır ve kuvarz küvet kullanılarak spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alınır. İkinci yöntemde ise qubit (Invitrogen) kullanılarak ölçüm alındı. Qubitte ölçüm alabilmek için gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra okutulacak materyele göre standartları okutulur ardından örnekler içinde boya olan solüsyon ile seyreltilir. DNA'ya bağlanan boyanın ışımaya göre miktar belirlenir. A_{260}/A_{280} oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlenir. DNA konsantrasyonu (DNA miktarı = 50 µg/ml x A_{260} x seyreltme miktarı = µg/mL) DNA formülüne göre hesaplanır.

2.2.2.9 Restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA için önerilen tamponlar kullanılarak 30 µl son hacimde ve ticari alınan enzimlerin optimum sıcaklıklarına göre önerilen inkübasyon sürelerinde kesim yapıldı. İki farklı enzimle aynı anda kesim yapıldığı koşullarda da iki enzimle aynı anda kesim yapılmasını sağlayan tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

2.2.2.10 Kompetent Hücre Hazırlanması

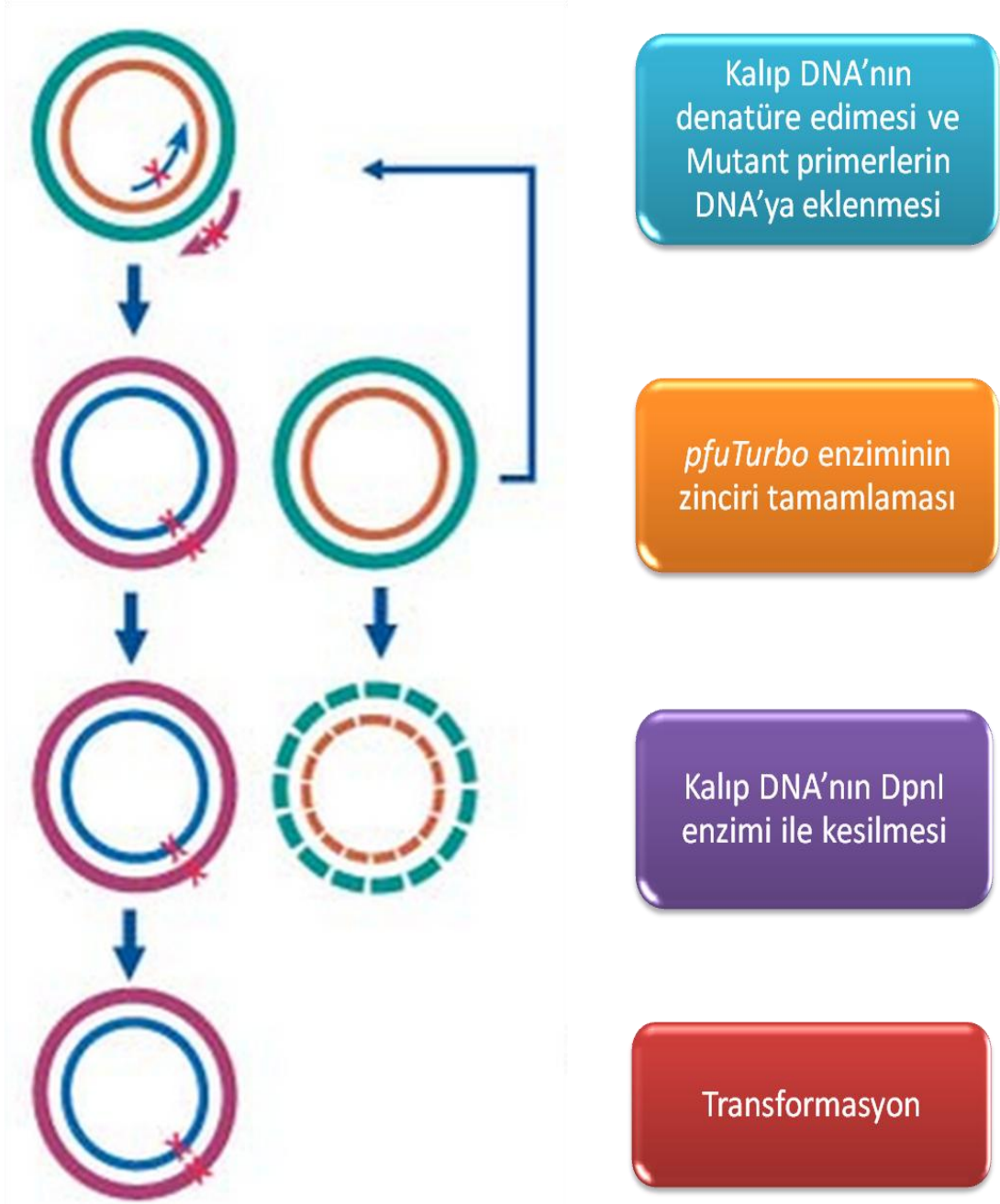
Kompetent hücre hazırlanması için 50 mM kalsiyum klorür kullanıldı. İlk olarak 10 ml LB besiyerine tek koloni *E.coli DH5α* ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübasyonu sağlandı. Daha sonra 16 saatlik kültürden 100 ml LB içine 100 µl inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlandı. 50 ml 50 mM soğuk kalsiyum klorür ile pellet çözüldü ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek üzerine 10 ml %40'luk gliserol eklenerek ependorflara paylaştırıldı. -80°C buzdolabında saklandı.

2.2.2.11 Transformasyon

Transformasyon için, 200 µl kompetent hücrenin üzerine 5 µl (1-50ng arası) plazmit DNA eklenerek buz üzerinde ≈ 40 dakika bekletildi. 42 °C'de 90 saniye ısı şoku uygulandı. Üzerine 800 µl LB ilave edildi ve 37 °C'de çalkalamalı etüvde bir saat inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda kültürden 200 µl alınarak, uygun antibiyotik içeren LB agar besiyerine steril öze ile yayıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edilir.

2.2.3 Yönlendirilmiş Mutageniz Teknikleri

Stratagene Quick Change Site Directed Mutageniz kiti modifiye edilerek teknik uygulanmıştır. Temel olarak çift zincirli halkasal plasmitte PZR tekniği ile mutasyon oluşturulmak için kullanılan bu prosedür farklı kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek zincirli olan DNA'ya diğer yöntemlerde olduğu gibi ek klonlamaya gerek kalmamıştır. Mutageniz tekniğinin güvenilirliği için PZR'da *Taq polimeraz* enzimi yerine düşük ihtimalle yanlış bağlanma yapan *pfuTurbo* DNA polimeraz enzimi kullanılarak artırılmıştır. Kalıp DNA'yı tanıyacak ve mutasyonu oluşturacak primerler bölüm 2.2.2.2'deki koşullara uygun olacak şekilde dizayn edilmiştir. *DpnI* enzimi kullanılarak metilenmiş olan kalıp DNA'yı yeni sentezlenmiş DNA'dan ayırırız. *DpnI* enzimi ile seçilen mutant DNA kendini onarması için One shot kompetant hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonrası seçilen kolonilerin plazmid izolasyonları yapıldı. Plazmid DNA'lar dizi analizi ile kontrol edilir.

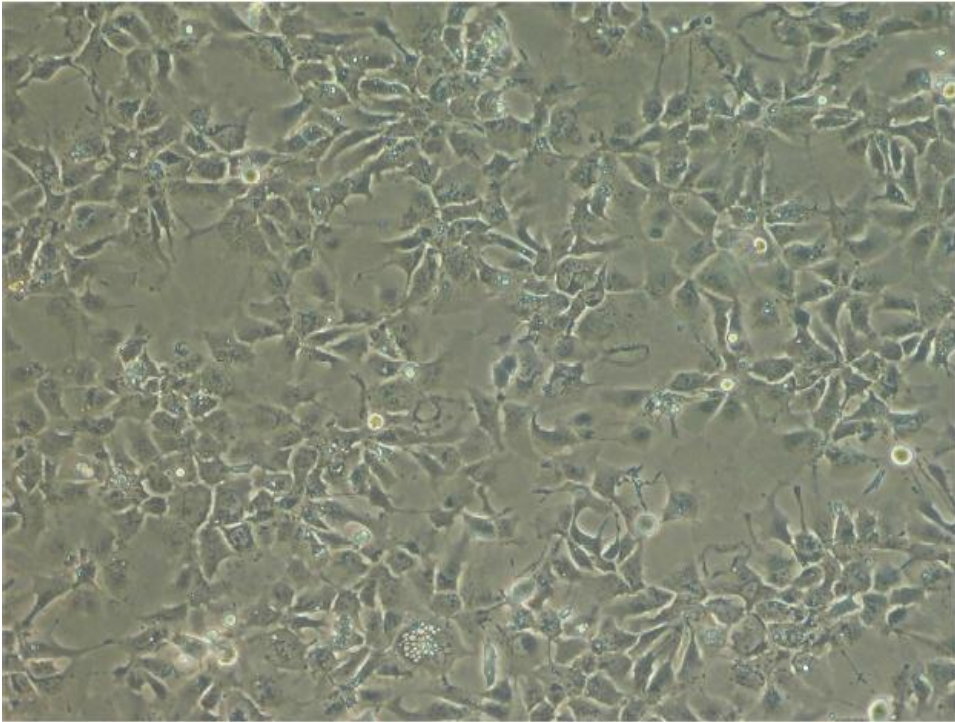


Şekil 2.5: Yönlendirilmiş Mutagenез Tekniği Temel Basamakları [90'dan adapte edilmiştir]

2.2.4 Hücree Kùltüründe Kullanılan Teknikler

2.2.4.1 Çalışmada Kullanılan Hücree Soyu

Çalışmanın tamamında karaciğer kanseri hücree hattı olan adherent Hep3B hücreeleeri kullanıldı.



Şekil 2.6: Hep3B hücreeleerinin invert mikroskop ile görüntülenmesi

2.2.4.2 Hücree Soyunun Başlatılması

-80°C dolabında muhafaza edilen hücree hatlarının büyütülmesi için -80°C °C den çıkarılan hücreeleer 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlı bir şekilde çözünmeleri gerçekleştirildi. Çözünen hücreeleer % 10 luk FCS içeren medyuma alındı ve 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C ,% 5 CO₂ içeren inkübatöre koyuldu.

2.2.4.3 Hücrelerin Büyütülmesi

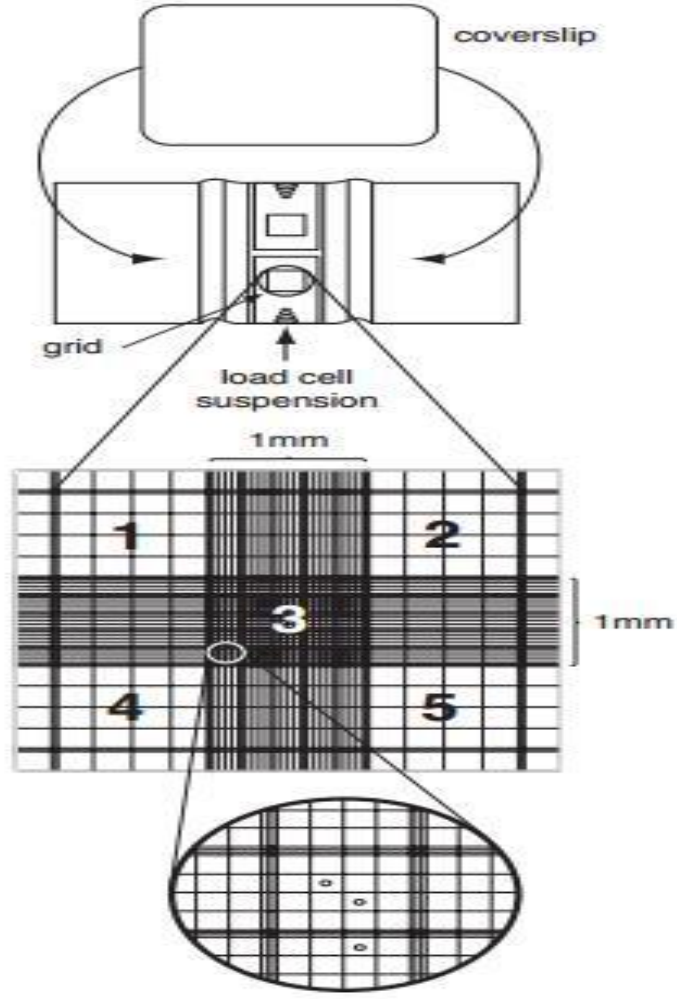
Hücreler 15 ml medyumda 75 cm² flasklarda, içerisinde, 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

2.2.4.4 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez önceden steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 FCS içeren medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlenidi ve 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

2.2.4.5 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0.1 mm derinliği olan ve böylece toplam hacmin hesaplanabildiği (10⁴) hemositometre lamı kullanıldı (Şekil 2.7). Ölü hücreleri ayırt etmek için hücre süspansiyonu ve eşit hacimde trypan mavisini (1:1) ile 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler difüzyon sonucunda mavi boyanırken canlı olanlar boyayı almadı ve renksiz olanlar sayıldı.



Şekil 2.7: Hücre sayımında kullanılan Thoma Lamı [91]

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı verilen formülle bulundu.
Toplam canlı hücre sayısı/ml = hemositometre sayım sonucu x 2 x 10⁴

2.2.4.6 Hücrelerin -80°C 'de saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez önceden steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü ve cryovial tüplerine konularak etiketlendi ve -80 °C derin dondurucuya konuldu.

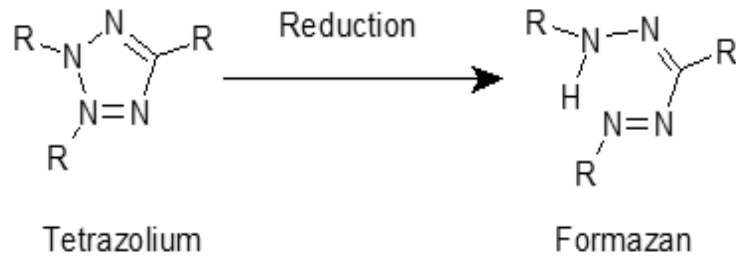
2.2.5 Hücre kültüründe kurulan deneyler ve analiz yöntemleri

2.2.5.1 Sitotoksite deneyinin kurulması

75 cm² flaskta büyümekte olan hücreler yüzeyi % 80 oranında kapladıklarında, içerisindeki medium uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA eklenir. 3-5 dakika CO₂ 'li inkübatörde inkübe edilir. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Supernatant uzaklaştırılır, pellet 10 ml kadar medium ile çözülür. Süspansiyondaki canlı hücre sayısını belirlemek için trypan mavisini uygulanır ve canlı hücre sayısı belirlenir. Hücre sayısı belirlendikten sonra 96 kuyucuklu plaka için hücre sayısı 5000 hücre / kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 5000 hücre son hacim 200 µl olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM medyumuna ekilmiştir. Hücre uygulaması yapıldıktan sonra 24 saat adherent hücrelerin yüzeye yapışması için bekletilmiştir. TGF sitokinleri farklı dozlarda uygulanmıştır. Ayrıca CoCl₂ ile hipoksik ortam oluşturulmuştur. 1, 3, 24, 48 ve 72 saatlerde MTT testi yapılarak 550 nm de absorbansları alınmıştır.

2.2.5.2 MTT Testi

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT 'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır (Şekil 2.8) .



Şekil 2.8: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.

Bu metoda göre istenilen inkübasyon periyodundan sonra (1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat) hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon sonucu belirlenen son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklenir ve 4 saat 37

°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilir. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılır, 0.004 M HCl içeren isopropanol ile kristaller çözülür ve spektrofotometre ile 550 nm dalga boyunda absorbanans alınır.

2.2.5.3 Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon

Kalsiyum–Fosfat presipitasyon metodu 12 kuyulu plakada yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 25X10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2X HEPES eklenerek yarım saat presipitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA: Kalsiyum-fosfat presipitasyonu oluşturduktan sonra karışım pipetaj yapmadan yavaşça damla damla kuyucuklara eklendi. Plate hafifçe sallanarak karışımın hücrelerin üzerine dağılması sağlandı. 6 saat sonra içerisinde transfeksiyon solusyonu olan medyum değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve %10 FCS içeren DMEM medyum eklendi. Eğer sitokin uygulaması yapılacaksa medyuma FCS yerine serum açlığı oluşturmak için BSA içeren medyum hazırlanarak eklenir. 48 ve 72 saat sonra ortama salınan lusiferaz ve SEAP aktivitesi alınan medyumla ölçüldü.

2.2.5.4 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lusiferaz ölçümleri, thermo luminoscan kullanılarak yapıldı. 96 kuyucuklu plakada belirlenen kuyulara lusiferaz enzimi içeren hücre medyumlarından 20 µl konuldu. Luminometre ayarı yapılarak 1X Substrat/Reaksiyon tamponu eklenerek aktivite ölçüldü.

2.2.5.5 SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi

Salınan sistem içine klonlanmış bölgenin aktivitesini ölçmek için 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda lusiferaz ve alkalın fosfataz enzimi içeren 25 µl hücre kültürü medyumunu 96 kuyucuklu plakalara koyulur. 1X dilüsyon tamponundan 75 µl medyumların üzerine eklenir. Plaka 65 °C'de yaklaşık 30 dakika inkübe edilir. 2-3 dk soğuması için buzda bekletilir ve oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Oda sıcaklığındaki SEAP substrat solusyonundan örneklere 100 µl eklenir ve örnekler

oda sıcaklığında 10-60 dakika bekletilir. İşlem sonunda örnekler luminometrede okutulur.

2.2.5.6 RNA Deneyinin Kurulması

RNA deneylerinin kurulması için işlem basamakları şöyledir; 25 cm²lik flasktan medyum uzaklaştırılır ve 5 ml PBS ile iki kez yıkanır. 500 µl Tripsin-EDTA eklendikten sonra 37°C'de etüvde 3 dk bekletilir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskopta kontrol edildikten sonra %10 FCS içeren DMEM besiyerinden 5 ml eklenerek RNA izolasyonu için bir falkona ayrılır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üst kısımda kalan medyum dikkatlice uzaklaştırılır. 1 ml PBS eklenerek pellet dikkatlice yıkanır ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Üst kısımda kalan PBS uzaklaştırılır ve hücre pelletleri -80°C'de muhafaza edilir.

2.2.5.7 Protein deneylerinin Kurulması

Yaklaşık 500.000 hücre içeren pelletler hemen buz üzerine alınarak işlemlere başlanır. Pelletin üzerine bölüm 2.1.5.1'de belirtildiği gibi hazırlanılan 300 µl soğuk Laemli tamponu eklenir. Pipet ile karıştırılarak hücrelerin lizis olması sağlanır. 1 dk boyunca hücreler vortekslenir ve 30 dk buz üzerinde bekletilir. 14000 g'de 30 dk süresince santrifüj edilir ve üstte kalan sıvı kısım alınarak protein analizleri için kullanılır.

2.2.5.8 Sitokin deneylerinin kuruluşu

Hücreler medyum uzaklaştırılarak PBS ile yıkanır tripsin-EDTA uygulanarak kaldırılır. Canlı hücreleri tespit edebilmek için tripan mavisi ile boyanarak sayılır ve ölü olan hücreler boyayı içine alarak mavi renkte gözükürler. %10 FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm² 'lik flaslara 2.000.000 hücre sayılarak eklenir. Adherent olan hücrelerin yüzeye yapışması için yaklaşık 24 saat beklenir. Yüzeye tutunan hücreler %0,1 BSA içeren DMEM besi yeri ile değiştirilir. 16 saat inkübasyondan sonra ilgili sitokinler uygulanır.

2.2.5.9 İnhibitör Deneylerinin kurulması

Hücreler medyum uzaklaştırılarak PBS ile yıkanır tripsin-EDTA uygulanarak kaldırılır. Canlı hücreleri tespit edebilmek için tripan mavisi ile boyanarak sayılır ve ölü olan hücreler boyayı içine alarak mavi renkte gözüktürler. %10 FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25cm² 'lik flasklara 2.000.000 hücre sayılarak eklenir. Adherent olan hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenir. Eğer inhibisyon deneyinde sitokin uygulaması yapılacaksa %0,1 BSA içeren DMEM besi yeri ile değiştirilir. 24 saat sonra inhibitörlerin uygulaması uygun görülen konsantrasyonlarda yapılır. Bir saatin sonunda sitokin uygulaması yapılır. 6 saat muamelenin sonunda her flask çöktürülerek, RNA ve protein için ayrılmış olarak -80°C'e kaldırılır.

2.2.6 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.6.1 RNA İzolasyonunun Yapılması

Hücre kültüründe kurulan deney ve kontrol örneklerinin RNA izolasyonu ticari kit ile (Fermentas) gerçekleştirildi.

2.2.6.2 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

RNA İzole edildikten sonra miktarının ve saflığını belirlenmesi için iki yöntem kullanıldı. İlk yöntemde spektrofotometrik olarak ölçüm alındı. RNA dH₂O ile 40 kat sulandırılır ve kuvarz küvet kullanılarak spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alınır. İkinci yöntemde ise qubit (Invitrogen) kullanılarak ölçüm alındı. Qubitte ölçüm alabilmek için gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra okutulacak materyele göre standartları okutulur ardından örnekler içinde boya olan solüsyon ile seyreltilir. RNA'ya bağlanan boyanın ışımaya göre miktar belirlenir. A_{260}/A_{280} oranı hesaplanarak DNA 'nın saflığı belirlenir. RNA miktarı = 40µg/ml x OD₂₆₀ x Seyreltme Faktörü= µg/mL RNA

2.2.6.3 RT- PZR Reaksiyonu

cDNA sentezi için tüpe öncelikle 11,5 µl son hacimde, 1 µg/mL RNA kalıbı, 200 pmol Anchored Oligo (dT)₂₃ primer eklenir ve 65°C'de 5dk ön inkübasyona bırakılır. Reaksiyona son konsantrasyonları 10 U Revert Aid Reverse Transkriptaz enzimi, 1X Reaksiyon Tamponu, 20U/µl RNaz inhibitörü ve 1 mM dNTP karışımı eklenerek 20µl'ye tamamlanır. Reaksiyon PZR makinesine konularak 37°C 'de 60 dk ve 70°C 'de 10 dk programı ayarlanır. Elde edilen cDNA -20°C 'de saklanır.

2.2.6.4 İnsan Beta Mikroglubulin Primerleri ile RNA'nın Q-PZR'la Kontrol Edilmesi

Elde edilen cDNA'nın kontrolü için PZR da kalıp olarak kullanılmış ve miktarının optimizasyonu yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullandığımız insan beta mikroglubulin primerlerinden son konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde bölüm 2.2.2.1 'de belirtildiği gibi PZR reaksiyonu hazırlandı. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve istenilen bantların büyüklüğü tespit edilir.

2.2.6.5 RealTime PZR

Realtime PZR çalışmaları 10 µl son hacimde 5 µl SYBR® Green PZR Master Mix, 1 µl cDNA, 100 ng/ µl 'lik forward ve reverse primerleri stoğundan 0,5'er µl ve 3 µl dH₂O kullanılarak yapılır. Sonuçlar $\Delta\Delta$ CT değerine göre değerlendirilir. Buna göre her bir cDNA en az iki tekrarlı olarak ilgili gen ve internal kontrol için çalışılır. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınır. İnternal kontrol genin Ct ortalamasından, ilgili genin Ct ortalaması çıkarılır. Daha sonra elde edilen değer 2'nin üssü olacak şekilde kuvveti alınır. Elde edilen kontrol grubu kendine bölünür ve 1 sayısı elde edilir. Daha sonra ilgili saatte çalışılan deney sonucu kontrol değerine bölünür ve 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edilir.

2.2.7 Protein ile ilgili Teknikler

2.2.7.1 SDS PAGE

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli bölüm 2.1.5.1'de belirtilen şekilde hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde dökülür ve hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellenir. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklenir. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı. Üzerine Yığıma jeli bölüm 2.1.5.1'de belirtildiği gibi hazırlandı ve örnekleri yükleyebileceğimiz kuyu oluşturabilmek için tarak yerleştirildi. Yığıma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi. Örneklerin Yüklenmesi, protein ekstraksiyonu Laemli buffer ile yapıldığı için örnekler protein miktarları belirlendikten sonra yaklaşık 20-40 ng olacak şekilde upper buffer ve bromophenol mavisi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 5 µl protein Büyüklük belirteci (Fermentas) yüklendi. Jelin yürütülmesi, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) her jele 0,4 amper akım gelecek şekilde yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

2.2.7.2 Western Blot

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller cam levhalar arasından çıkarılır, yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer buffer içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Whatman 3MM kağıt ve PVDF membranlar jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer buffer içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 100 volt akımda 60 dakika transfer yapıldı.

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween-20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için

%0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Membran primer antikor ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

Membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1,5 ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı.

2.2.7.3 İmmüno Floresans

24'lük kuyu plakelere önce medyum eklenir cover slipler tabana iyice yerleştirilir üzerine yaklaşık 125×10^3 olacak şekilde hücre yavaşça eklenir. Coversliplere yapışan hücelere uygulama yapılır. Eğer sitokin uygulaması yapılacaksa hücreler BSA'lı medyuma alınır ilgili sitokin uygulaması yapılır. Hücrelerin tutunması için gereken inkübasyon süresinin sonunda medyum uzaklaştırılır. PBS ile 2 kez yıkama yapılır. Hücrelerin fiksasyonu için % 4'lük parafilm ile yaklaşık 15 dk muamele yapılır. Paraformaldehid uzaklaştırılır ve 2 kez PBS ile yıkanır. Hücre zarından primer antikorun ve floresans boya içeren sekonder antikorun geçebilmesi için farklı konsantrasyonlarda Triton-X-100 ile muamele edilir. PBS ile yıkanarak Triton-X-100 ortamdan uzaklaştırılır. Spesifik olmayan proteinlere antikorun bağlanmaması için % 10 BSA içeren PBS ile 30 dk oda sıcaklığında bloklama işlemi yapılır. Sürenin sonunda solüsyon ortamdan uzaklaştırılır ve PBS ile yıkama yapılır. Bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de nemli bir ortamda primer antikorla muamele edilir. Ertesi sabah primer antikor uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapılır. Sekonder antikor ile yaklaşık 30 dk inkübe edilir. Uygulamanın sonunda PBS ile yıkama yapılır. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) uygulaması yapılır. Bu uygulama hücre çekirdeğinin boyanmasını sağlar. Lameller (Cover slipler) kapatma solüsyonu (mounting medyum) damlatılmış lam üzerine ters kapatılır. Lam üzerinde kaymamaları için karşılıklı olacak şekilde 4 yerden sabitleme işlemi yapılır. Preparat ilgili sekonder antikora uygun dalga boylarında floresan mikroskopunda görüntülenir.

3. BULGULAR

3.1 pGL2 basic vektörü içindeki 154bç'lik hCA9 promotörünün pGEM-T easy vektörüne alt klonlama yapılması

Yrd.Doç.Dr Hatice YILDIRIM'ın doktora çalışması sırasında oluşturduğu 154bç'lik insan CA9 (hCA9) promotörü içeren pGL2 vektöründen transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak için salınan lusiferaz haberci sistem içeren pMetLuc vektörüne klonlama yapıldı. İlk aşamada klonlama bölgesinde uygun enzimler bulunduran pGEM-T easy vektörüne PZR stratejisi ile alt klonlama yapıldı. İkinci aşamada pMetLuc vektörüne 154bç'lik promotör parçası aktarıldı. hCA9 154 bç lik promoter bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerler tablo3.1'de belirtilmiştir.

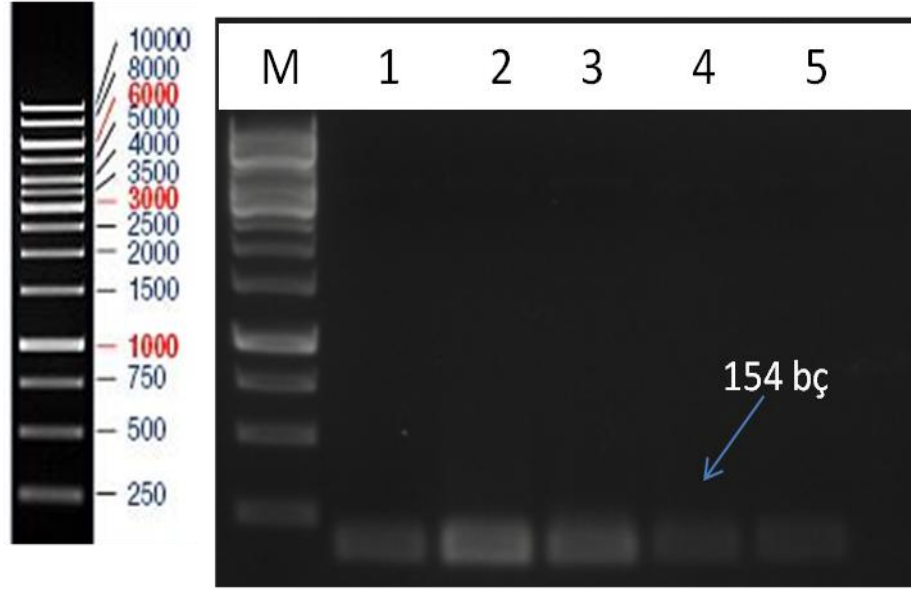
Tablo 3.1: hCA9 154bç'lik promoter bölgenin klonlanmasında kullanılan primerler

Primer	Uzunluk	Tm(°C)	Dizi
hCA9 154 bç'lik primer F	26	66,17	5'-GGT ACCCAG ACA AAC CTG TGA GACTT-3' KpnI kesim noktası
hCA9 154 bç'lik primer F	26	68,7	5'-GCT AGC CTG ACT GTG GGG TGT CCCAGC AC-3' Nhe I kesimbölgesi

Primerlerle yapılan PZR reaksiyonunda öncelikli olarak tablo 3.2'de belirtilen PZR şartları kullanıldı. Farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak en uygun olan PZR reaksiyonu tespit edildi. (Şekil 3.1) Kullanılan bu PZR reaksiyonu ile 154bç'lik istenilen bölge elde edildi. (Şekil 3.2) Bantlar jelden jel ekstraksiyon kiti ile geri kazanıldı.

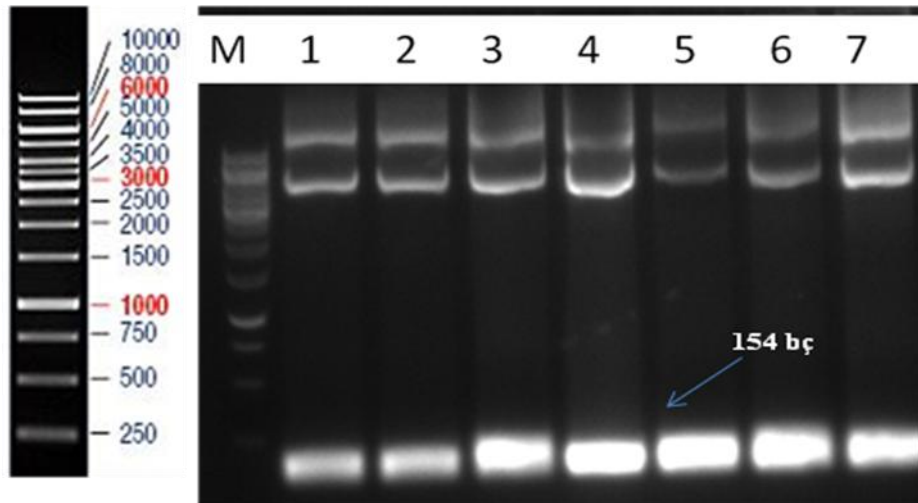
Tablo 3.2: PZR koşulları

94°C	2'	35 Döngü
94 °C	1'	
61°C	45''	
72°C	1'	
72°C	10'	



Şekil 3.1: 154 bp'lik PZR sonucu (M; marker, 1; 2 μ l MgCl₂, 2 ve 3; 4 μ l MgCl₂, 4 ve 5; 6 μ l MgCl₂ konsantrasyonda PZR ile elde edilen 154bç'lik promotör parçaları)

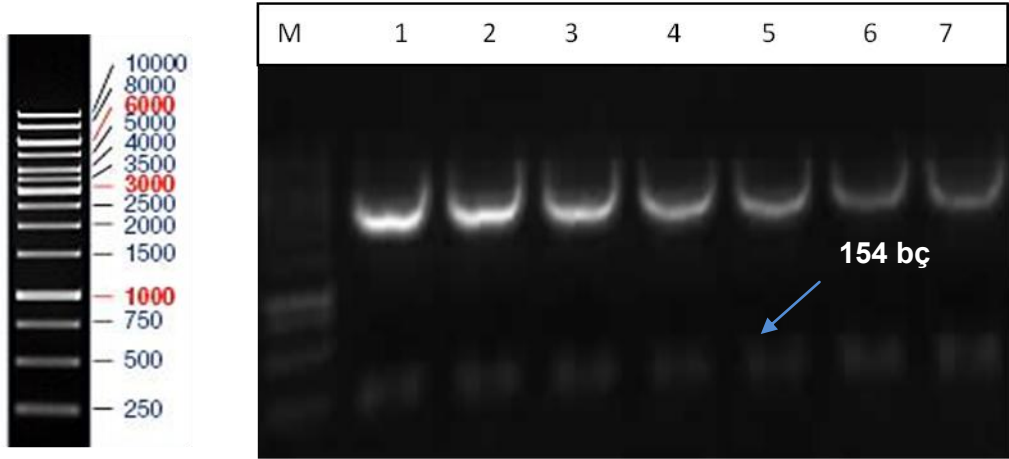
Jelden geri kazanılan 154 bç'lik bantlar PGEM-T easy vektörü ile ligasyona bırakıldı. Ligasyon +4 C'de 1 gece yapıldı. Ligasyondan sonra transformasyon aşamasına geçildi. Transformasyon bölüm 2.2.2.11'de belirtildiği gibi yapıldı. pGEM-T easy vektör sisteminde bulunan ampisilin direnci ve mavi beyaz koloni seçimi özelliklerinden yararlanarak rekombinant koloni seçildi ve EcoRI enzimi ile kontrol kesimi yapıldı sonuçları Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2: pGEM-T easy vektörü EcoRI ile kontrol kesimi (M; 1kb marker 1-2; 1. Koloni, 3-5; 2. Koloni 6-7; 3. Koloni)

3.2 pMetLuc reporter vektörüne alt klonlama

pGEM-T easy ve pMetLuc vektörlerinde ortak bulunan restriksiyon endonükleaz enzimleri tespit edildi. pGEM-T easy vektöründe iki tane EcoRI kesim bölgesi bulunmakta böylece 154bç'lik kısmı tek enzimle kesildi.

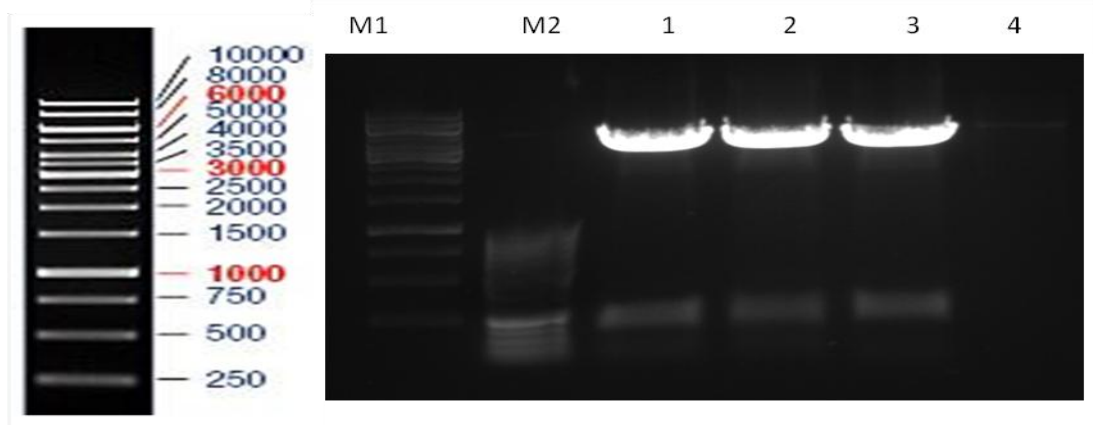


Şekil 3.3: pGEM-T easy vektörünün EcoRI enzimi ile kesim sonucu (M 50bp marker, 1-3; 1. Koloni 4-7; 2. Koloniden elde edilen plazmidlerin kesim sonuçları)

Jelde görülen bantlar bölüm 2.2.4'te belirtildiği gibi jelden geri kazanıldı. pMetLuc vektöründe ise tek EcoRI enzim kesim bölgesi bulunmakta. Vektörü EcoRI enzimi ile kesitip ve vektörü doğrusal hale getirdik. Doğrusal hale gelen vektörün ligasyon aşamasında tekrar kendi üzerine yapışmasını engellemek için alkalik fosfataz ile 37°C'de 2 saat muamele edildi. PZR pürifikasyon kiti kullanılarak ortamdan enzim ve buffer gibi bileşenler uzaklaştırıldı.

Ligasyon koşullarını belirlemek için kesilmemiş pMetLuc vektörü, kesilmiş pMetLuc vektörü, jelden geri kazanılan 154 bç'lik bölge 5 µl olacak şekilde %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Ligasyonun kontrolü yapıldıktan sonra ligasyon ürünleri *E.coli* DH5α suşundaki kompetan hücrelere bölüm 2.2.11'de belirtildiği gibi transforme edildi. Transformasyon sonucu petrilere oluşan kolonilerden pMetLuc vektöründe bulunan Kanamisin direncinden yararlanarak rekombinant koloniler seçildi. Tek koloni ekimi yapılarak bölüm 2.2.2.6 'da belirtilen şekilde DNA izolasyonu ve kesimi BamHI ve XhoI enzimleriyle kesimi yapıldı. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4: pMetLuc vektöründe rekombinant kolonilerin tespit edilmesi için BamHI ve XhoI enzimleriyle yapılan kesim (M1 1kb'lık marker, M2 50bp'lık marker, 1,2,3; 1. Koloni, 4; 2. Koloniden yapılan plazmid izolasyonu)

Dizinin vektördeki doğrultusunun tespit edilebilmesi için dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonuçları MEGA 5 programı ile DNA dizisi açıldı. Şekil 3.5'te belirtildiği gibi NCBI blast ile doğru şekilde yerleştirilmiş koloni tespit edildi.

```

Z54349      CAGACAAACCTGTGAGACTTTGGCTCCATCTCTGCAAAAGGGCGCTCTGTGAGTCAGCCT 60
|
CA9 154bç   CAGACAAACCTGTGAGACTTTGGCTCCATCTCTGCAAAAGGGCGCTCTGTGAGTCAGCCT 90

Z54349      GCTCCCCTCCAGGCTTGCTCCTCCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAATGCACGTACAGCCC 120
|
CA9 154bç   GCTCCCCTCCAGGCTTGCTCCTCCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAATGCACGTACAGCCC 149

Z54349      GTACACACCGTGTGCTGGGACACCCACAGTCAG 154
|
CA9 154bç   GTACACACCGTGTGCTGGGACACCCACAGTCAG 183

```

Şekil 3.5: Data bankasında Z54349 koduyla bulunan CA9 dizisi ile klonlanan dizinin karşılaştırılması

Dizi analizi sonucunda pMetLuc vektörünün içine doğru oryantasyonda klonlanan rekombinant koloni tespit edildi.

3.3 Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği ile HRE bölgesinde mutasyon oluşturulması ve DNA dizi analizinde kontrolü

Yönlendirilmiş mutageniz tekniği Stratagene QuikChange site-directed mutagenesis kiti modifiye edilerek bölüm 2.2.3 belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Mutagenез primerleri Primer X programında 80 °C'nin üzerinde olmamasına, mutagenез oluşturulacak bölgenin primerin ortasında olmasına ve %GC içeriğini göz önüne alarak çalışılmıştır. [94] Oluşturulan primerler tablo3.3'teki gibidir.

Tablo 3.3: Mutagenез primerleri

Primerin adı	Tm	Uzunluk bç	Primer dizisi (5'-3')
HRE mutant 154bç	72	36	AGCTCTCGTTTCCAAAAAAAAAAAAAGCC CGTACACA
HRE mutant 154bç	72	36	TGTGTACGGGCTTTTTTTTTTTTTGGA AACGAGAGCT

PZR sonrası oluşan ürünlerin kalıp DNA'dan ayrılması için olan temel teknik bölüm 2.2.3'te belirtildiği gibi *DpnI* enzimi ile kesilmesidir. *DpnI* enzimi ile kesim yapılarak metilenmiş kalıp DNA ortamdan uzaklaştırılır ve sadece mutant DNA kalmış olur.

Kesim sonuçları One Shot® TOP10 *E. Coli* suşundaki kompetan hücrelere bölüm 2.2.2.11'de belirtildiği gibi transforme edildi. Transformasyon sonucu petrielerde oluşan kolonilerden pMetLuc vektöründe bulunan Kanamsin direncinden yararlanarak rekombinant koloniler seçildi.

Tek koloni ekimi yapılarak bölüm 2.2.6'da belirtilen şekilde DNA izolasyonu yapıldı ve dizinin vektördeki mutasyonunun tespit edilebilmesi için dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonuçları MEGA5 programı ile histogramları açıldı. Şekil 3.6'da belirtildiği gibi NCBI blast ile mutant koloni tespit edildi.

```

Z54349      CCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAATGCACGTACAGCCCGTACACACCGTGTGCTGGGACAC  143
|||||
Mutant      CCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAAAAAAAAAAAAAGCCCGTACACACCGTGTGCTGGGACAC  59

Z54349      CCCACAGTCAG  154
|||||
Mutant      CCCACAGTCAG  70

```

Şekil 3.6: Data bankasında Z54349 koduyla bulunan CA9 dizisi ile mutant dizinin karşılaştırılması

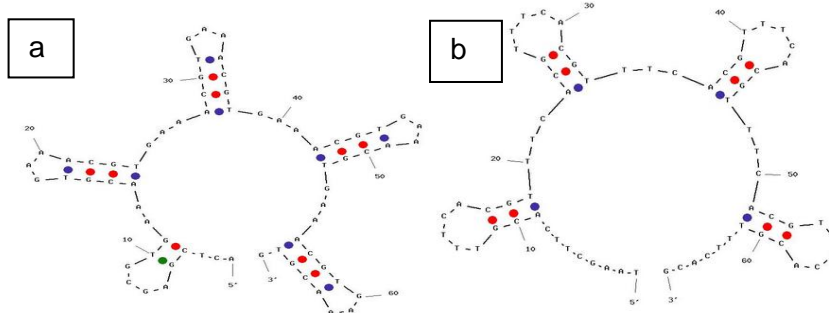
Mutant koloni tespit edildikten sonra geçici transfeksiyon ile fonksiyonel analizini yapabilmek için bölüm 2.2.2.7’de belirtildiği gibi büyük ölçekli plazmid DNA izolasyonu yapıldı.

3.4 pMetLuc vektörüne 9 tekrarlı HRE bölgesi eklenmesi (9XHRE)

HRE bölgesinin fonksiyonel analizini yapabilmek için çoğaltılmış HRE bölgesinin haberci vektör olan pMetLuc içerisine klonlanması gerçekleştirildi. Korunmuş HRE dizisi saptandıktan sonra primer dizaynı yapıldı. Daha önceden en iyi ikili kesim enzimleri HindIII ve XhoI olduğu tespit edilen pMetLuc vektörü ile ligasyona kolayca bırakabilmek için iki adet restriksiyon kesim bölgesi eklendi. EMSA tekniğinde de kullanabilmek için proteinlerin bağlanmasını sağlayacak bağlanma bölgesi dışına Adenin bazı eklendi. Primerler bölüm 2.2.2.2’de belirtildiği gibi olası saç tokası yapıları oligoanalyzer programında analiz edilerek tablo 3.4 ‘deki şekilde dizayn edildi (Şekil 3.7). HindIII ve XhoI enzimleriyle kesilmiş pMetLuc vektörü ile son konsantrasyonu 100 ng olan primerler ile son hacim 20 µl olacak şekilde T₄ ligaz enzimi ile 95°C ‘de 5 dk ligasyona bırakıldı.

Tablo 3.4: 9X HRE primer dizileri, forward primer altı çizili dizi HindIII , reverse primer altı çizili dizi XhoI tanıma bölgesi

Primerin adı	Tm	Uzunluk bç	Primer dizisi (5’-3’)
9X HRE F	81	67	<u>ACTCGAGCGT</u> GAAACGTGAAACGTGAAACGTGAAA CGTGAACGTGAAACGTGAAACGTGAAA CGTG
9X HRE R	78	67	<u>TAAGCTT</u> CAGTTTCACGTTTCACGTTTCACGTTTCA CGTTTCACGTTTCACGTTTCACGTTTCACG



Şekil 3.7: 9X HRE (a) forward ve (b) reverse primerlerinde oluşabilecek saç tokası yapıları.

Ligasyon örnekleri oda sıcaklığına geldikten sonra bölüm 2.2.2.11'de belirtildiği gibi transforme edildi. Transformasyon sonuçları Kanamisinli petrilere ekildi. Büyüyen kolonilerden sıvı besi yerine tek koloni ekimi yapıldı. Bakteriler çöktürüldü ve bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği gibi plasmid izolasyonu yapıldı. Plazmidler dizi analizi için REFGEN gen araştırma ve biyoteknoloji'ye yollandı.

```

9XHRE      CCAACATCGACATCGTGGGCCTGGAAGGCAAGTTCGGCATCACCAACCTGGAAACCGACC 226
          |||
pMetLuc    CCAACATCGACATCGTGGGCCTGGAAGGCAAGTTCGGCATCACCAACCTGGAAACCGACC 380
          |||
9XHRE      ACTCGAGCGTGaaaCGTGaaaCGTGaaaCGTGaaaCGTGaaaCGTG 286
          |||
pMetLuc    ACTCGAGCACGtttCACGtttCACGtttCACGtttCACGtttCACGtttCGTG 440
          |||
9XHRE      aaaCGTGaaaCGTGtaagccttGTGGCCACCGAGACCGACGCCAACCGGGGCAAGAT 346
          |||
pMetLuc    tttGCACtttGCAC TAAGCTTGTGGCCACCGAGACCGACGCCAACCGGGGCAAGATGC 500
          |||

```

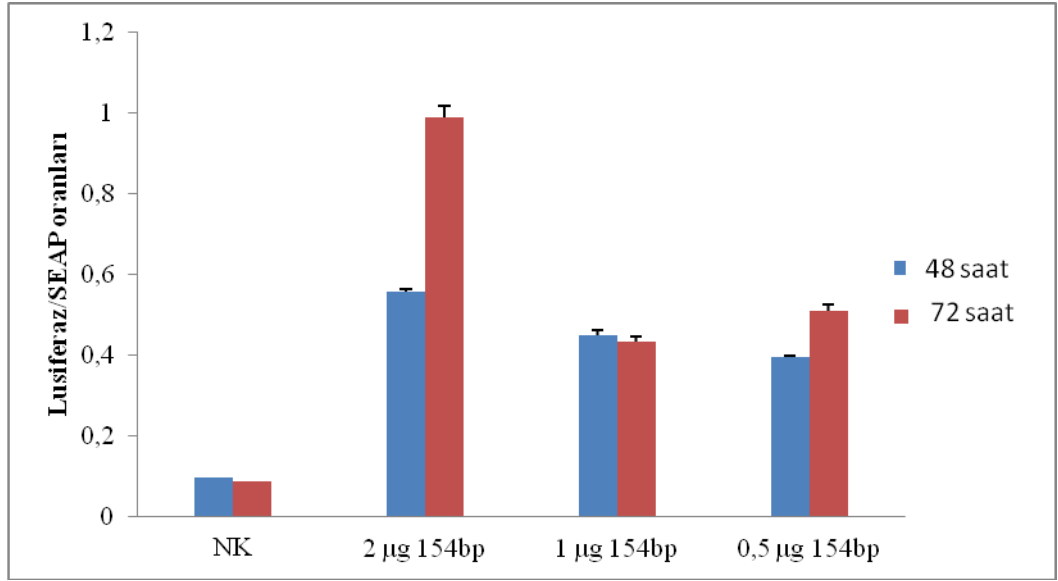
Şekil 3.8: pMetLuc reporter vektörü ile 9XHRE pMetLuc dizilerin karşılaştırılması

Dizi analizi sonuçları MEGA5 programı ile histogramları açıldı. Şekil 3.8'de belirtildiği gibi NCBI blast ile mutant koloni tespit edildi.

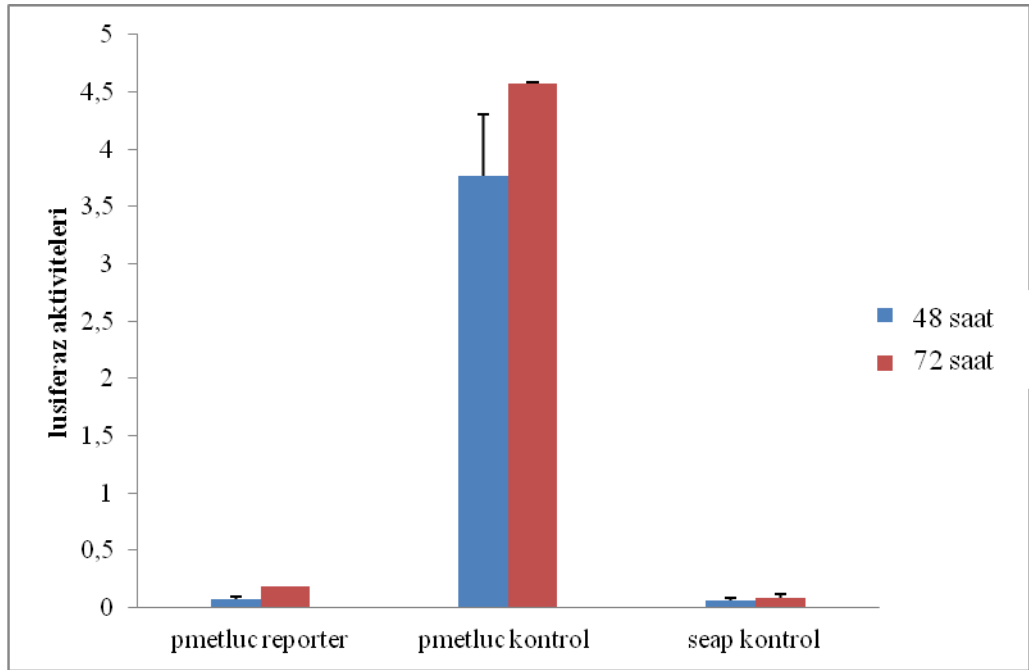
3.5 hCA9 154 bç'lik Promotorun Fonksiyonel Analizi

3.5.1 Hep3B Hücre Hattında Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi

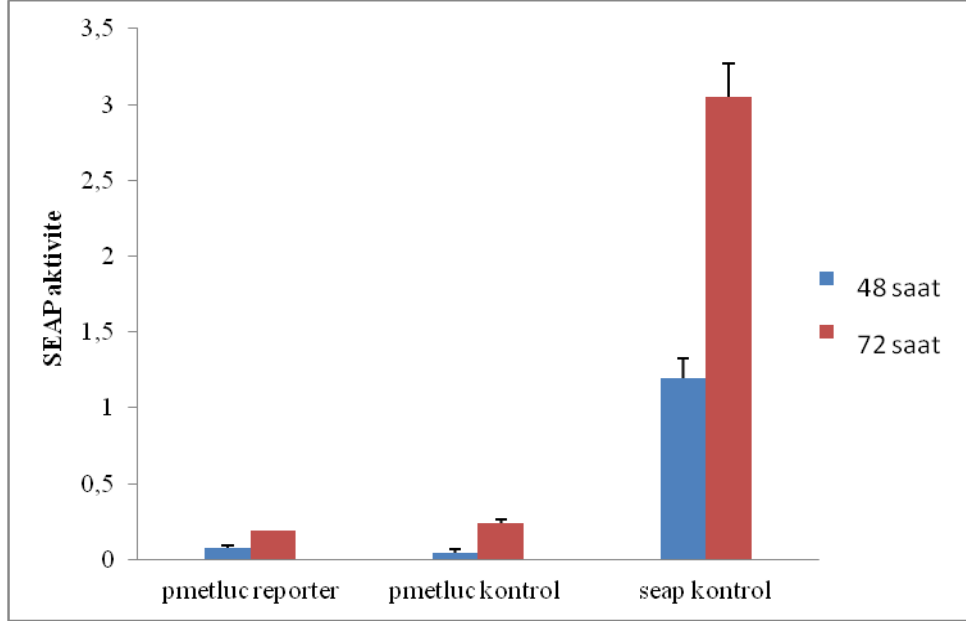
Geçici Transfeksiyon çalışmaları kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemiyle Hep3B hücre hattında yapıldı. Hem 2X HEPES'in kontrolü hemde Hep3B hücrelerinde transfeksiyonun optimizasyonu için öncelikle pMetLuc Kontrol, pMetLuc Reporter, pSeap 2-Basic, pSeap 2-Kontrol vektörleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat önce hücreler 12 kuyucuklu plakalara 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Transfekte edilecek 0,5µg 154 bç DNA, 1 µg 154 bç DNA, 2 µg 154 bç DNA ve 2M CaCl₂ ayrı ayrı tüpler içinde bölüm 2.2.5.12'de belirtildiği gibi hazırlandı. Lusiferaz/Seap oranları MiniTab16 (ANOVA One Way) programında istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 3.9). Hep3B hücre hattına transfeksiyonu yapılan kontrol gruplarının pMetLuc Kontrol, pMetLuc haberci vektörü ve pSeap2 Kontrol vektörlerinin lusiferaz aktiviteleri Şekil 3.10'da verilmiştir. pMetLuc Kontrol, pMetLuc haberci vektörü ve pSeap2 Kontrol vektörlerinin alkalın fosfataz aktiviteleri Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.9: 48 ve 72 saat Lusiferaz /SEAP aktivitesi oranları



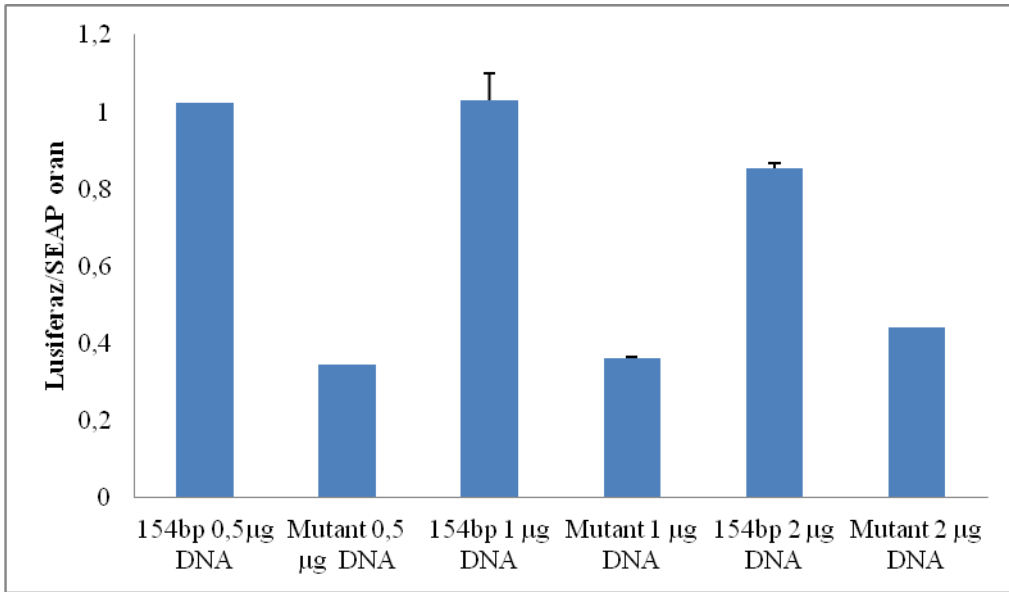
Şekil 3.10 : 48 ve 72 saat optimizasyon Lusiferaz aktivitesi



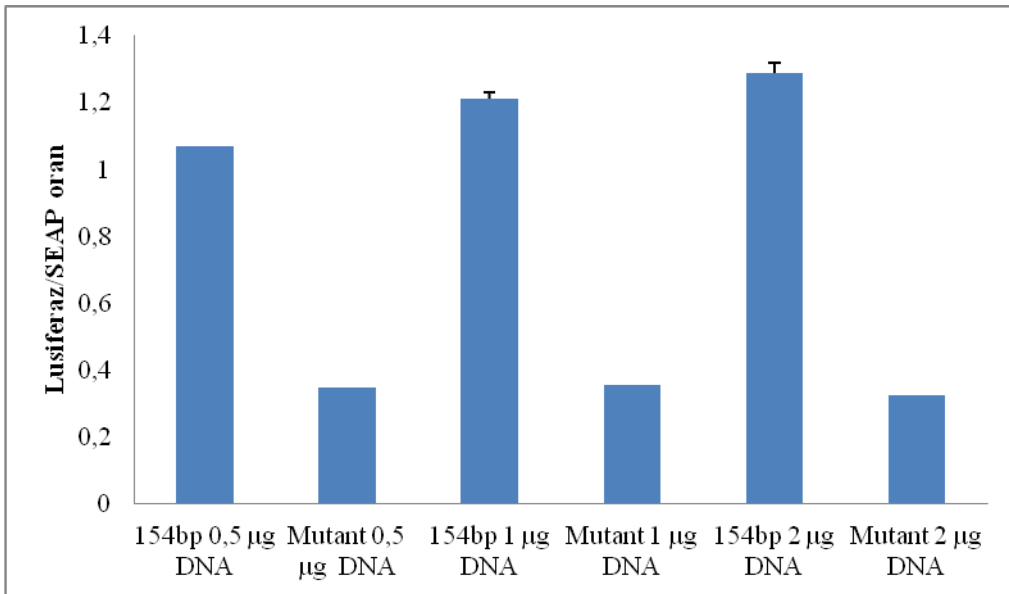
Şekil 3.11: 48 ve 72 saat optimizasyon SEAP aktivitesi

3.5.2 Mutant ve yabancı tip hCA9 154'bc'lik promotörün bazal aktivitesinin belirlenmesi

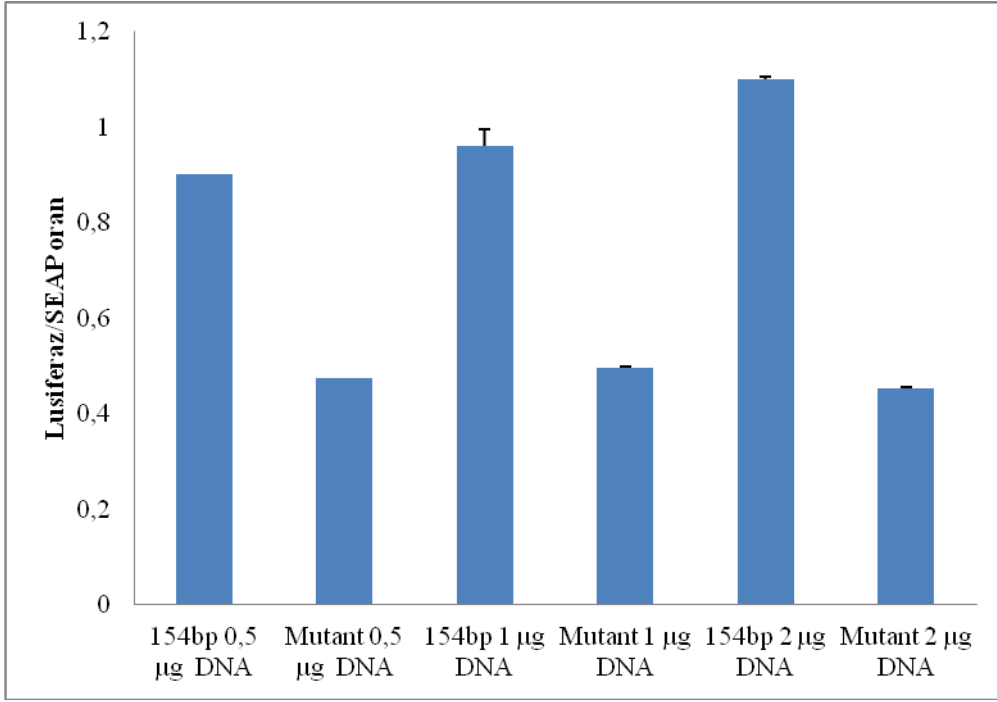
hCA9 promotor bölgesine ait 154 bc ve HRE mutant 154 bc büyüklüğünde ve pMetLuc haberci vektörü içine klonlandığı dizi analizi ile doğrulanmış parçaların bazal aktivitelerine geçici transfeksiyon analizi olan kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemiyle bakıldı. Hücrelere 0,5 µg, 1 µg ve 2 µg promotor plazmitleri ile birlikte normalizasyonları için 0,5 µg PSEAP 2 Basic vektörü de transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak yüksek miktarda lusiferaz aktivitesi gösteren pMetLuc Kontrol plazmiti kullanıldı. Salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de pSEAP-2 Kontrol vektörü kullanıldı. Hiposik ortamın oluşturulması için CoCl₂ kullanıldı. Lusiferaz salınımı için gereken 48 ve 72 saat süreleri sonrasında medyum alınarak bölüm 2.2.5.13 ve bölüm 2.2.5.14'te belirtilen şekilde aktiviteleri ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesi ile normalize edilerek MiniTab16 (ANOVA One Way) programında hesaplandı (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15) .



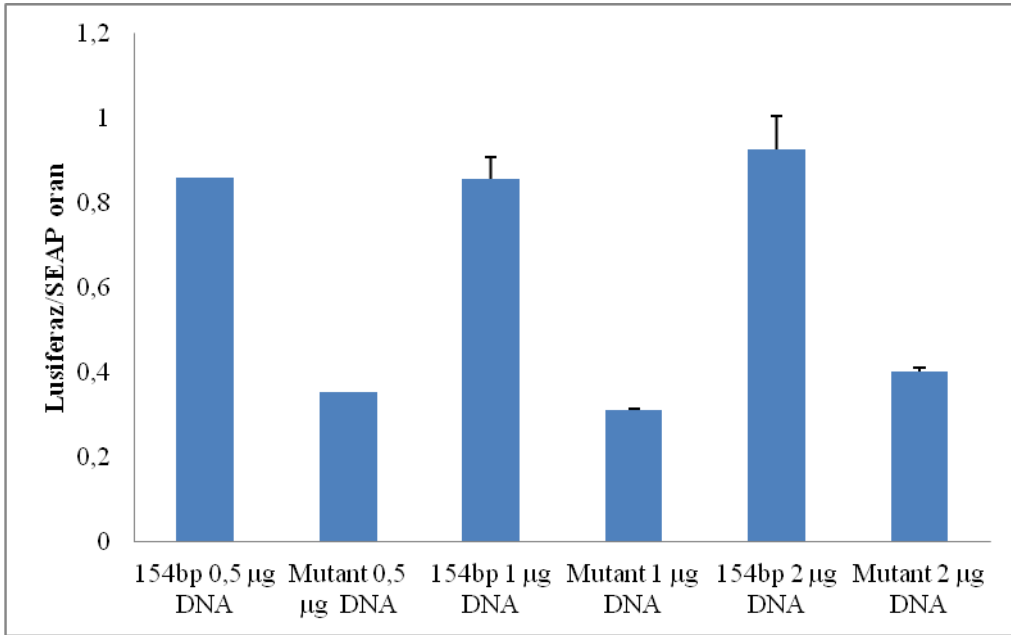
Şekil 3.12: 48 saat Normoksik Lusiferaz/SEAP bazal aktivite



Şekil 3.13: 72 saat Normoksik Lusiferaz/SEAP bazal aktivite



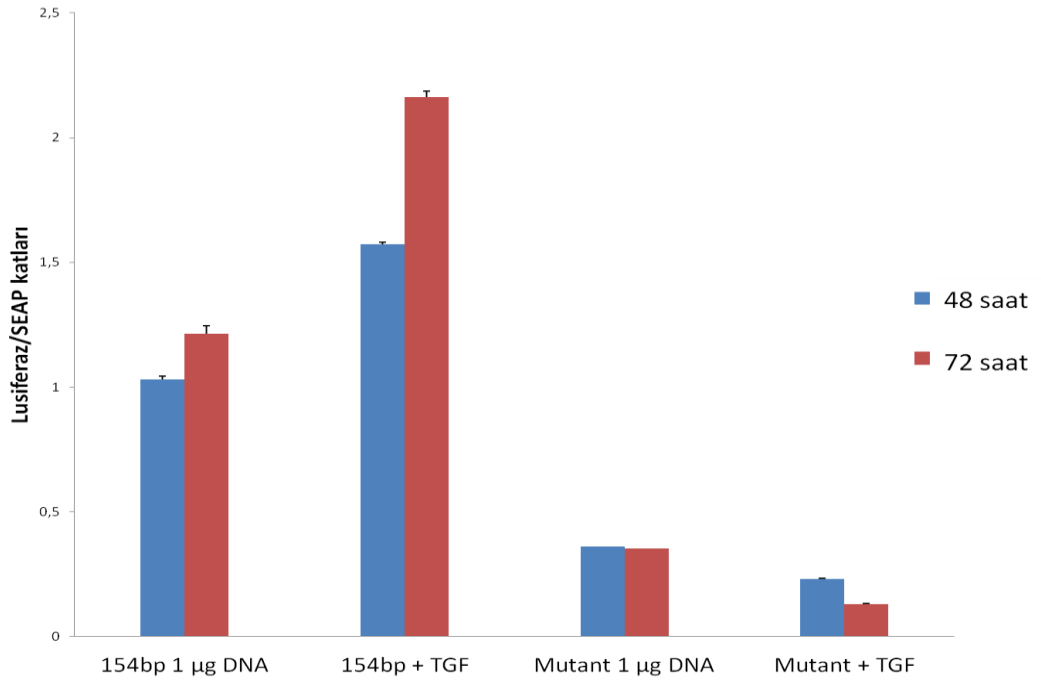
Şekil 3.14: 48 saat Hipoksiya Lusiferaz/SEAP bazal aktivite



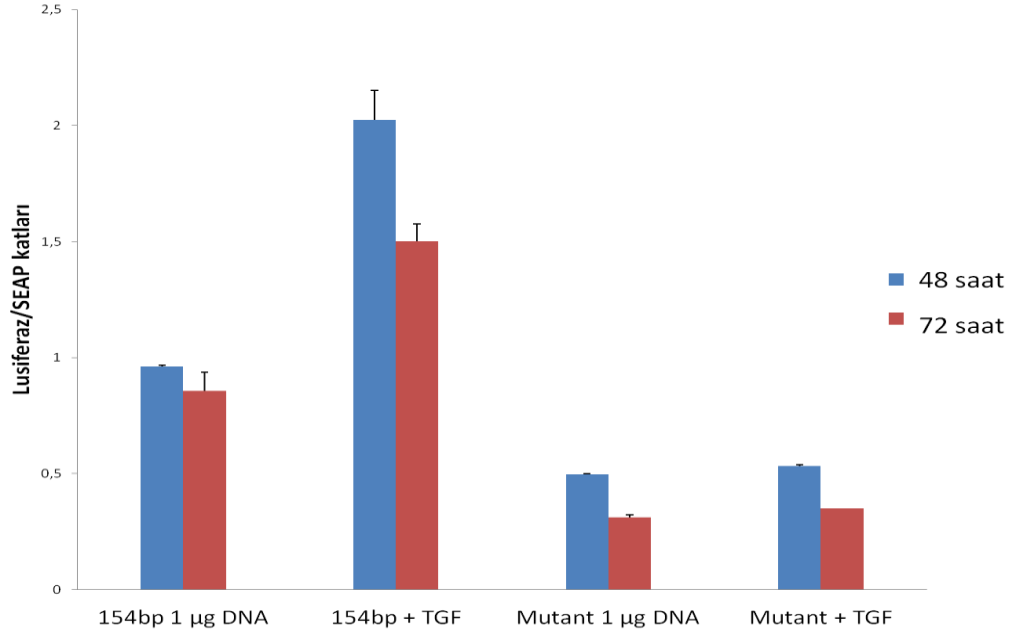
Şekil 3.15: 72 saat Hipoksiya Lusiferaz/SEAP bazal aktivite

3.5.3 Mutant ve yabancı tip *hCA9* 154 bç'lik promotörün TGF β sitokini ile olan aktivitesinin belirlenmesi

hCA9 promotor bölgesine ait 154 bç ve HRE mutant 154 bç büyüklüğünde ve pMetLuc Reporter vektörü içindeki optimizasyonu yapılmış miktarlardan 1 μ g'lık miktarın bazal aktivite için yeterli olduğu saptanmıştır ve TGF β ile olan aktivitelere geçici transfeksiyon analizi olan kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemiyle bakıldı. 1 μ g promotor plazmitleri ile birlikte normalizasyonları için 0,5 μ g pSEAP2-Basic vektörü ile transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak fazla miktarda lusiferaz aktivitesi gösteren pMetLuc Kontrol plazmiti kullanıldı. Salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de pSEAP-2 Kontrol vektörü kullanıldı. Hiposik ortamın oluşturulması için CoCl₂ kullanıldı. Hipoksik uyarıdan yaklaşık bir saat sonra TGF β sitokini ile muamele elden transfeksiyon sonuçları 48 ve 72 saat lusiferaz salınımı için gereken süreleri sonrasında medyum alınarak bölüm 2.2.2.13 ve bölüm 2.2.2.14'de belirtilen şekilde aktivite ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesi ile normalize edilerek MiniTab16 (ANOVA One Way) programında hesaplandı (Şekil 3.16, Şekil 3.17).



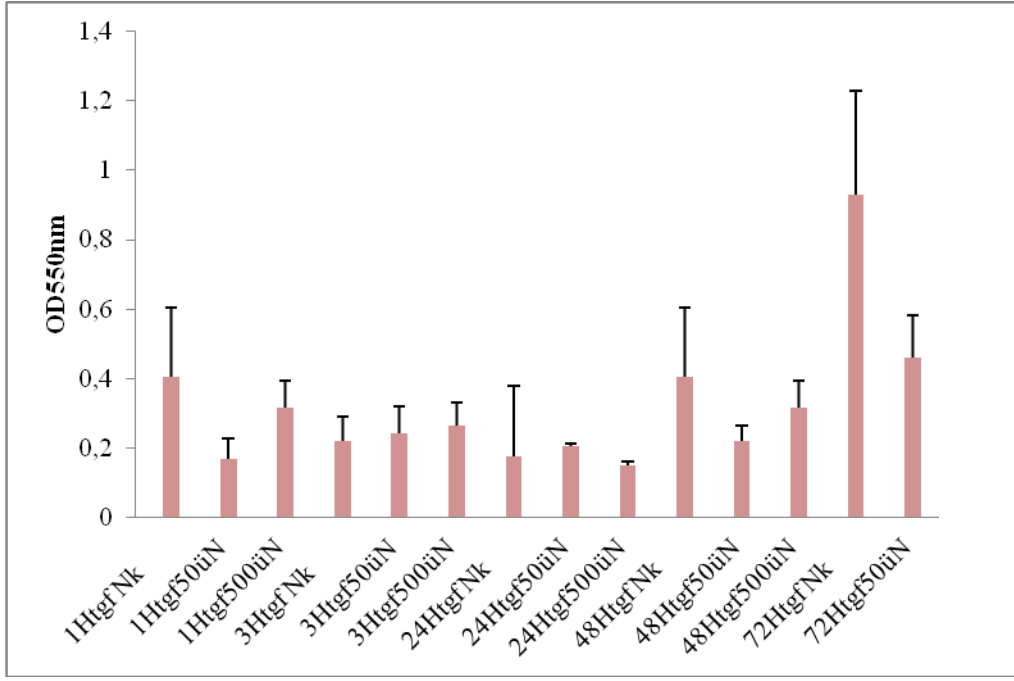
Şekil 3.16: 48 ve 72 saat Normoksia 200 unite /ml TGF β uygulanan Lusiferaz/SEAP transfeksiyon sonuçları



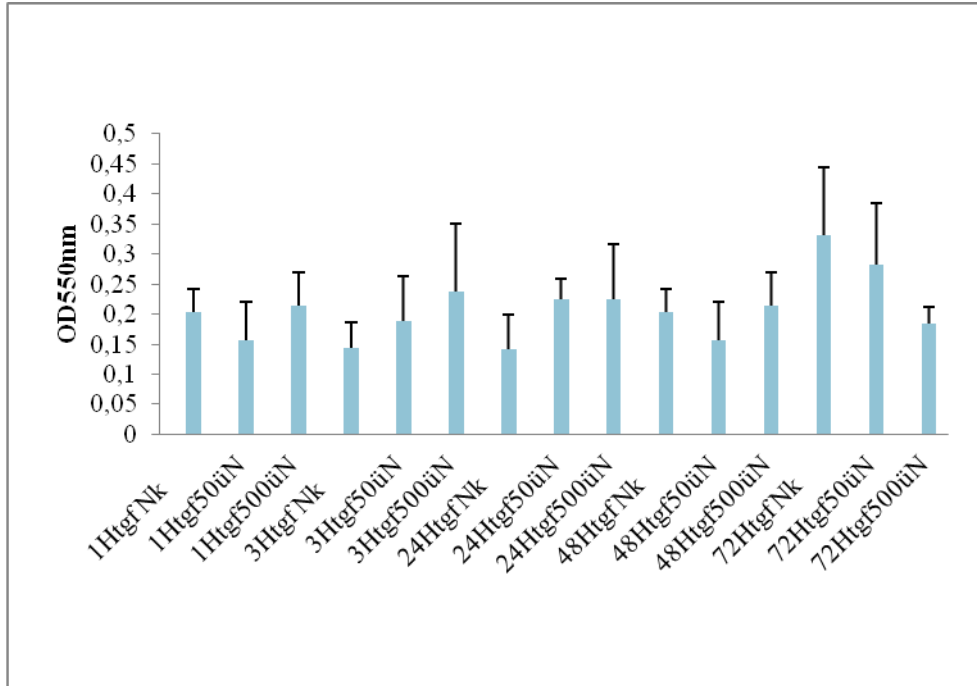
Şekil 3.17: 48 ve 72 saat Hipoksia 200 ünite/ml TGF β uygulanmış Lusiferaz/SEAP transfeksiyon sonuçları

3.6 TGFβ'nın Hep3B Hücre Hattında Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Hep3B hücrelerinde son konsantrasyonu 50 ng/µl ve 500 ng/µl olacak şekilde TGF β uygulanması gerçekleştirildi. Hep3B hücrelerinde normoksi ve CoCl₂ uygulanarak oluşturulan hipoksi koşullarında sitokin uygulaması yapılmıştır. 1, 3, 24, 48, 72 zaman aralıklarında MTT testi uygulanarak sitotoksik etkisi araştırıldı. Sonuçlar MiniTab16 programı kullanılarak Anova one way testi ile analiz edildi (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmektedir (p>0,05).



Şekil 3.18: Hep3B hücrelerinde normoksik ortamda TGFβ'in sitotoksik etkisi



Şekil 3.19: Hep3B hücrelerinde hipoksik ortamda TGFβ'in sitotoksik etkisi

3.7. TGFβ Sitokinin CA9 ekspresyon seviyesine etkilerinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi

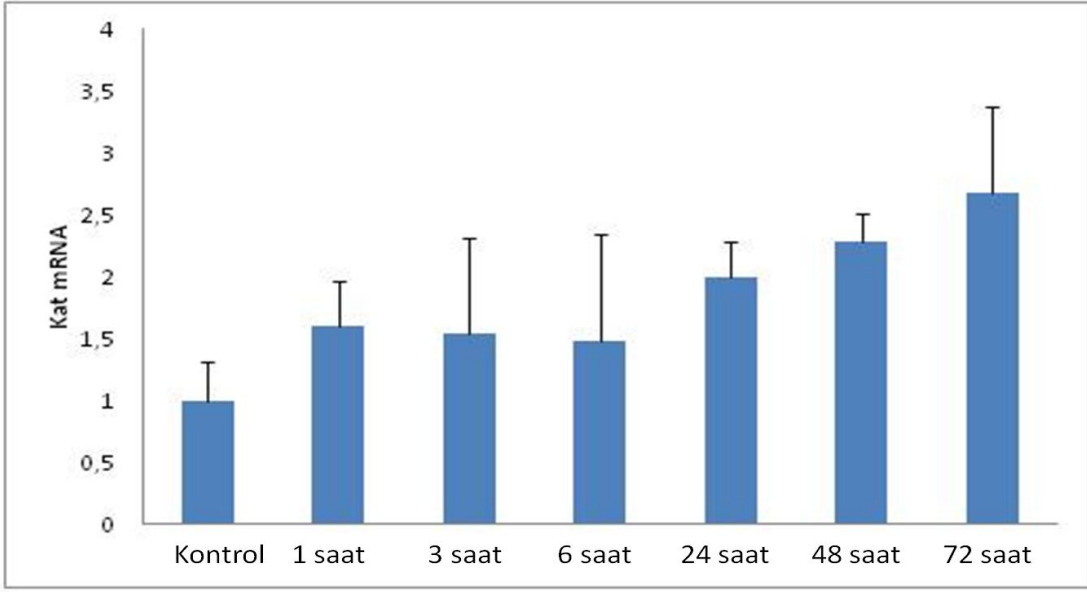
Hep3B hücreleri 25 cm²'lik küçük flasklara yaklaşık 2 milyon olacak şekilde eklendi. Bir gece hücrelerin flaskın yüzeyine tutunmaları için beklendi. Normal oksijen koşullarında ve CoCl₂ ile uyarılarak oluşturulan hipoksik koşullarda çalışmalar yapıldı. Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra 200 ü/ml olacak şekilde TGF β sitokini eklendi. Sonuçlar 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonrasında alınarak pelletler -80°C'e kaldırıldı. RNA izolasyonları bölüm 2.2.6.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.6.3'te belirtildiği gibi RNA'nın saflığı belirlendi. cDNA eldesi için bölüm 2.2.6.4'te belirtildiği gibi revers transkriptaz enzimi ile reaksiyon oluşturuldu. CA9 ve insan beta 2 mikroglobulin primerleri ile real time PZR yapıldı. Real time PZR 10 µl son hacimde 5 µl SYBR[®] Green PZR Master Mix, 1 µl cDNA, 100ng/ µl'lik insan beta 2 micoglobulin ve CA9 forward ve reverse primerleri stoğundan 0,5'er µl ve 3 µl dH₂O kullanılarak yapıldı. PZR'nin döngü koşulları tablo 3.6 ve Primer bilgileri tablo 3.5'te gösterilmiştir. İnsan beta mikroglobulinin primerleri normalizasyon amaçlı kullanılmıştır. Sonuçlar $\Delta\Delta$ CT değerine göre bölüm 2.2.6.5'te belirtildiği gibi değerlendirildi (Şekil 3.20 ve Şekil 3.21) .

Tablo 3.5: Real Time PZR primer bilgileri

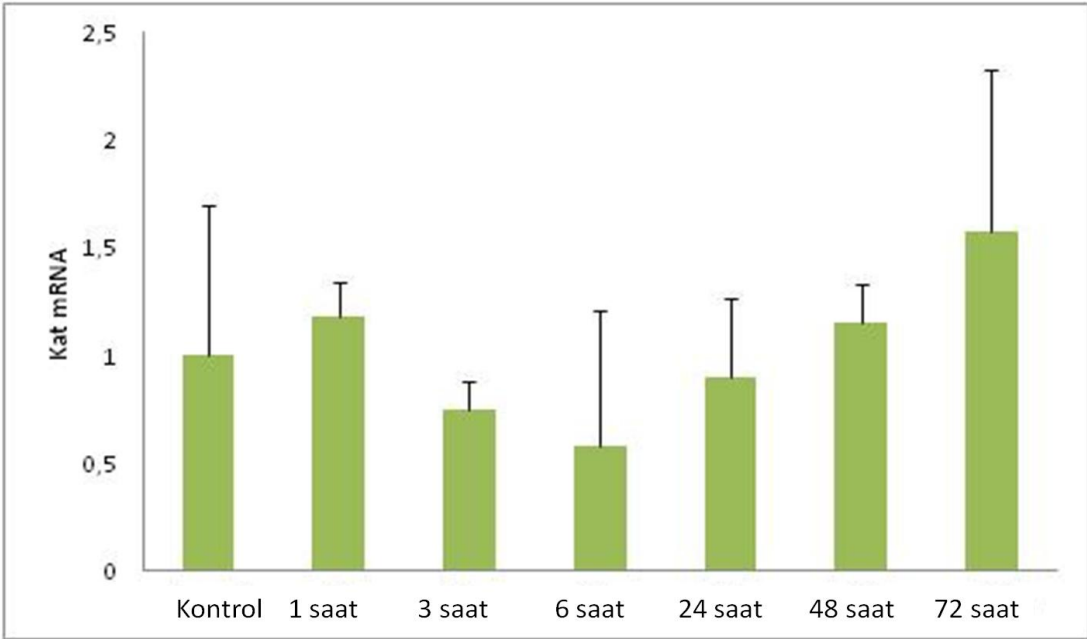
Primerin adı	Tm	Uzunluk bç	Primer Dizisi
CA9 ekspresyon F	63	20	5'-TCTCATCTGCACAAGGAACG-3'
CA9 ekspresyon R	63	20	5'-ACTTCAGCCGCTACTTCCAA-3'
İnsan beta 2 micro F	60	20	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
İnsan beta 2 micro R	60	21	5'-CATGTCTCCATCCCCTTAACT-3'

Tablo 3.6: RealTime PZR koşulları

Basamaklar	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön ısıtma	1	95 °C	10 dk
Çoğatma	40	95 °C	10 sn
		51 °C	10 sn
		72°C	10 sn
Erime ısısı	1	95°C	5 sn
		65°C	1 dk
		97°C	---
Soğutma	1	40°C	30 sn



Şekil 3.20: Hep3B hücrelerinde Zaman aralıklarına göre normoksik koşullarda TGF β uygulanmış örneklerin Realtime PZR sonuçları



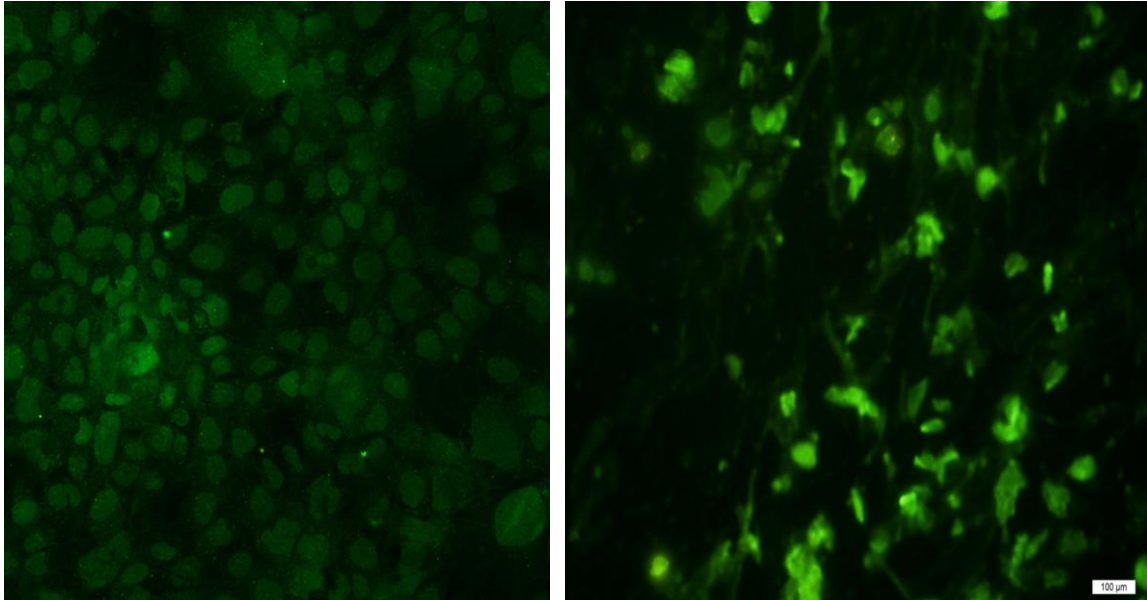
Şekil 3.21: Hep3B hücrelerinde zaman aralıklarına göre hipoksik koşullarda TGF β uygulanmış örneklerin Realtime PZR sonuçları

Buna göre TGF β normoksik durumlarda CA9 mRNA sını artırmaktadır. Hipoksik koşullarda ise CA9 mRNA'sının 1 saatten sonra 6 saate kadar düştüğü ve 6 saatten sonra arttığı görülmüştür.

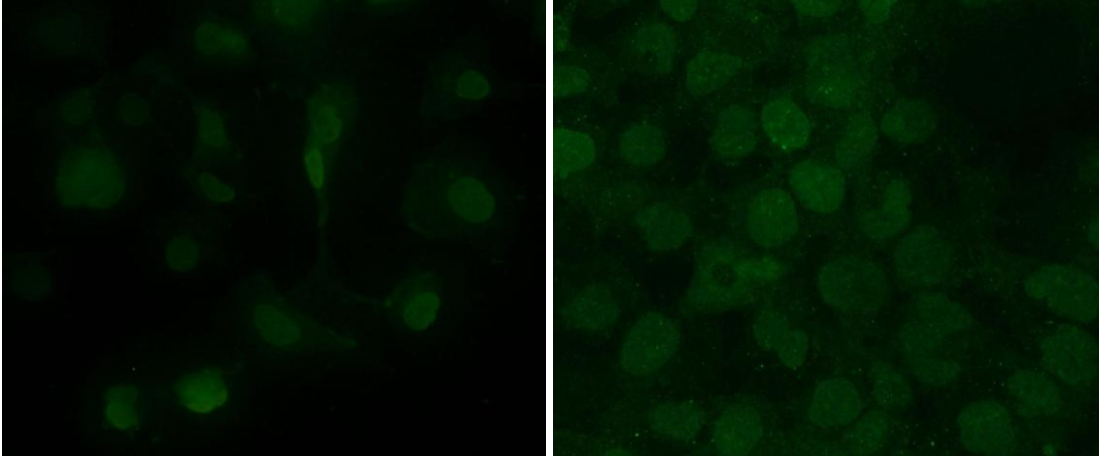
3.8 TGFβ Sitokinin CA9 Protein Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

3.9 Hep3B Hücre Modelinde İmmüno Floresan Yönteminin Optimizasyonu

Bölüm 2.2.8.3'te belirtildiği gibi deney kuruldu paraformaldehid ile hücreler coverslip yüzeyine sabitlendikten sonra boyanın hücre zarından geçmesini sağlamak için yapılan Triton-X-100 muamelesinin uygunluğu için % 0,1 % 0,2 ve % 0,3'lük Triton-X-100 PBS ile seyreltilerek hazırlandı. % 0,1'lik Triton-X-100 miktarının hücre membranına bağlı olan CA9 proteini için yeterli olduğu ancak DAPI ile yapılan çekirdek boyamaları için yeterli olmadığı tespit edildi. % 0,2'lik Triton-X-100 oranının her iki boyama içinde uygun olduğu tespit edildi (Şekil 3.22). Bloklama için FCS ve BSA olmak üzere farklı iki ajan kullanıldı. % 10 ve % 5 oranında kullanılan FCS'nin bloklama aşaması için yeterli olmadığı tespit edildi. % 5 oranında kullanılan BSA'nın bloklamada kullanılabileceği ancak %10 oranında kullanılan BSA kadar iyi olmadığı görülmüştür (Şekil 3.23). CA9 primer antikoru için yapılan optimizasyonda oda sıcaklığında yapılan 1 ve 3 saatlik muamelede görüntülemeye sorun oluşturduğu görülmüştür. Bir gece +4°C'de nemli bir ortamda primer antikora muamele edildiğinde spesifik görüntüler elde edilmiştir. Sekonder antikor ile yaklaşık 30 dk inkübe edildiğinde arka görüntüde spesifik olmayan bağlanmalar görülmemiştir.



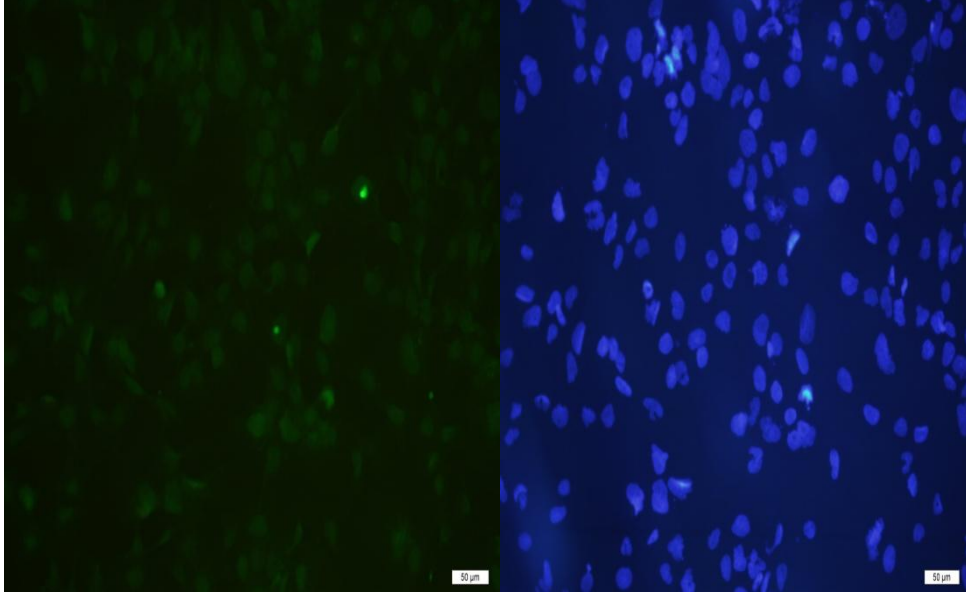
Şekil 3.22 : İmmüno floresans optimizasyonu (a) 0,1 Triton-X-100 muamelesi (b) 0,3 Triton-X-100 muamelesi



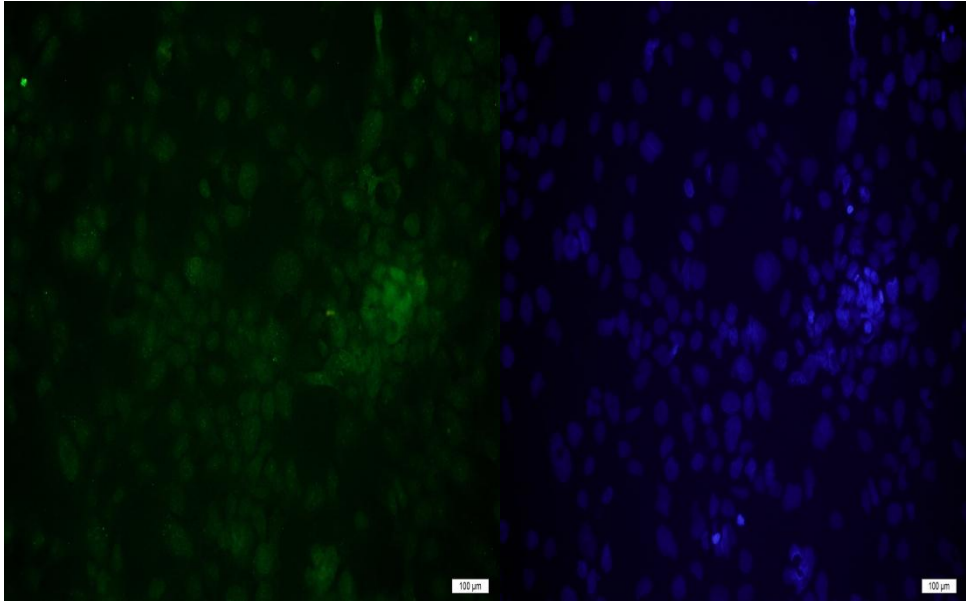
Şekil 3.23: İmmüno Floresans optimisasyonu (a) FCS ile bloklama (b) BSA ile bloklama

3.9.1 Hep3B Hücre Modelinde CA9 Protein Düzeyinin İmmüno Floresan ile Belirlenmesi

Bölüm 2.2.8.3'de belirtildiği gibi hücreler hazırlanır. Bloklama aşamasından sonra CA9 primer antikorunu bir gece +4°C'de nemli bir ortamda lameler üzerine kaplayacak şekilde muamele edildi. Ertesi sabah primer antikor uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor ile yaklaşık 30 dk inkübe edildi. Uygulamanın sonunda sekonder antikor kalıntısı görmemek için PBS ile yıkama yapılır. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) uygulaması yapıldı. Lameller, mounting medyum damlatılmış lam üzerine ters kapatıldı. Preparat ilgili sekonder antikora uygun 420-510 nm dalga boyunda floresan mikroskopunda görüntülendi.



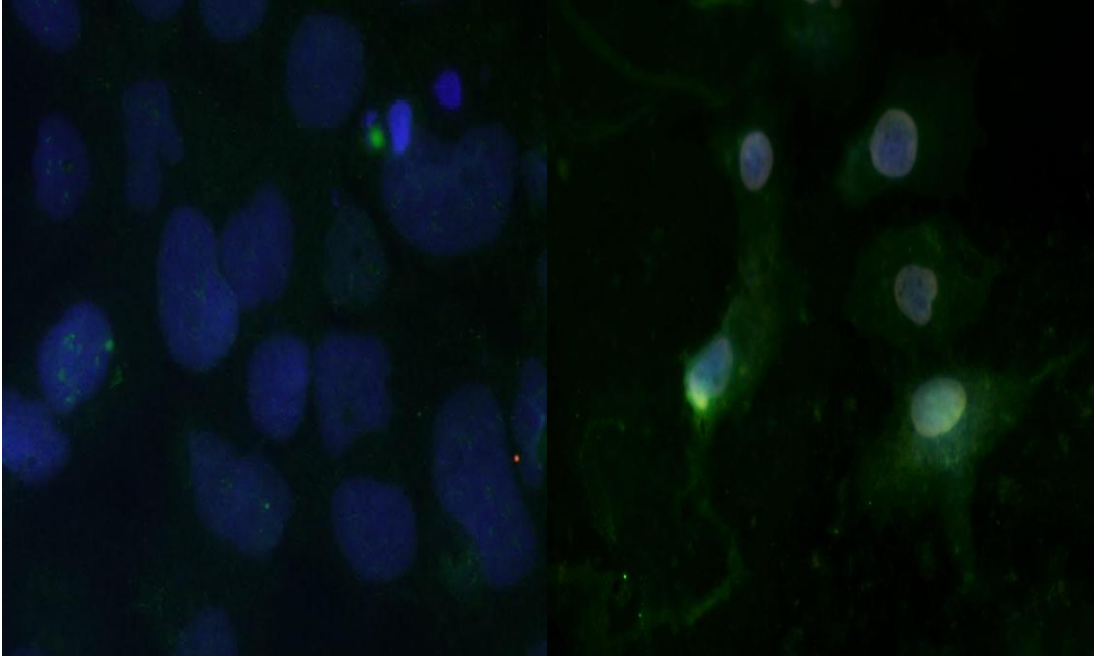
Şekil 3.22: 3h Normoksia (a) CA9 ekspresyonu (b) DAPI boyaması floresans mikroskopi görüntüleri



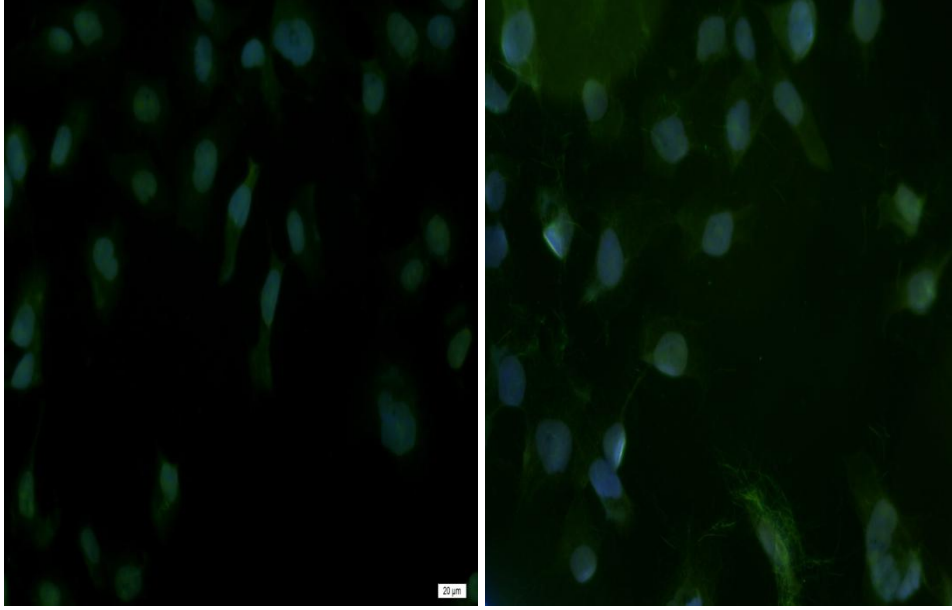
Şekil 3.23: 6 saat hipoksiya (a) CA9 ekspresyonu (b) DAPI boyaması floresans mikroskopi görüntüleri

3.9.2 Hep3B Hücre Modelinde CA9 Proteinini Üzerine TGF β Sitokinin Etkisinin İmmüno Floresan İle Belirlenmesi

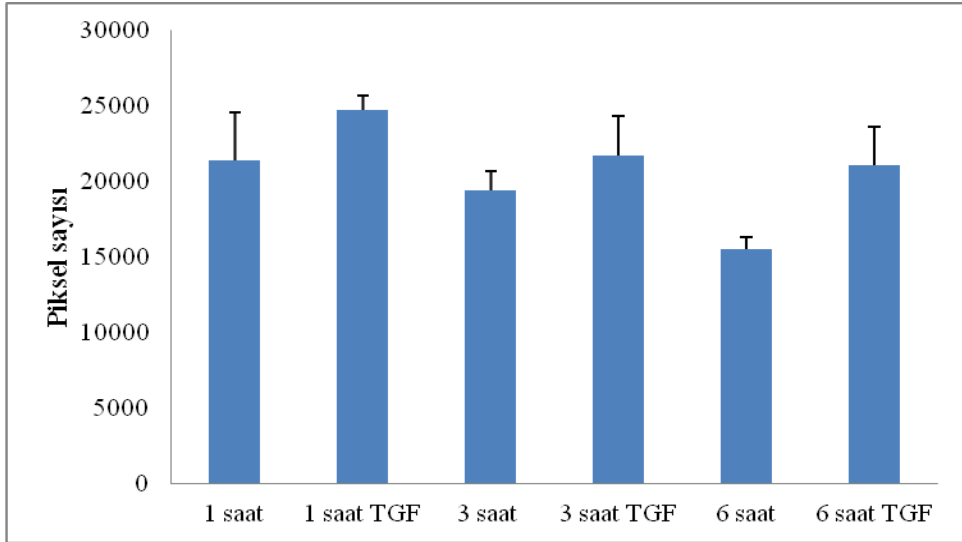
Sitokin uygulaması yapılacağı için hücrelere besin açlığına bırakılmak için BSA'lı ortama alınır. 24 saat sonrası Bölüm 2.2.8.3'de belirtildiği gibi hücreler hazırlanır. Yukarıdaki bölümde belirtildiği gibi preparat hazırlanması yapıldı. Florasans görüntüleri alınarak İmage J programında densitometrik analiz yapıldı [91] . Sonuçların değerlendirilmesinde, çok sayıda tekli hücre kullanıldı (Şekil 3.26 ve Şekil 3.27). Grafik olarak değerlendirildiğinde hipoksiik koşullar altında TGF β uygulaması CA9 proteini düzeyinde istatistik olarak anlamlı olacak artış göstermiştir. Normal oksijen koşullarında da aynı artışın devam ettiği gözlenmiştir. (Tablo 3.25 ve Tablo 3.26)



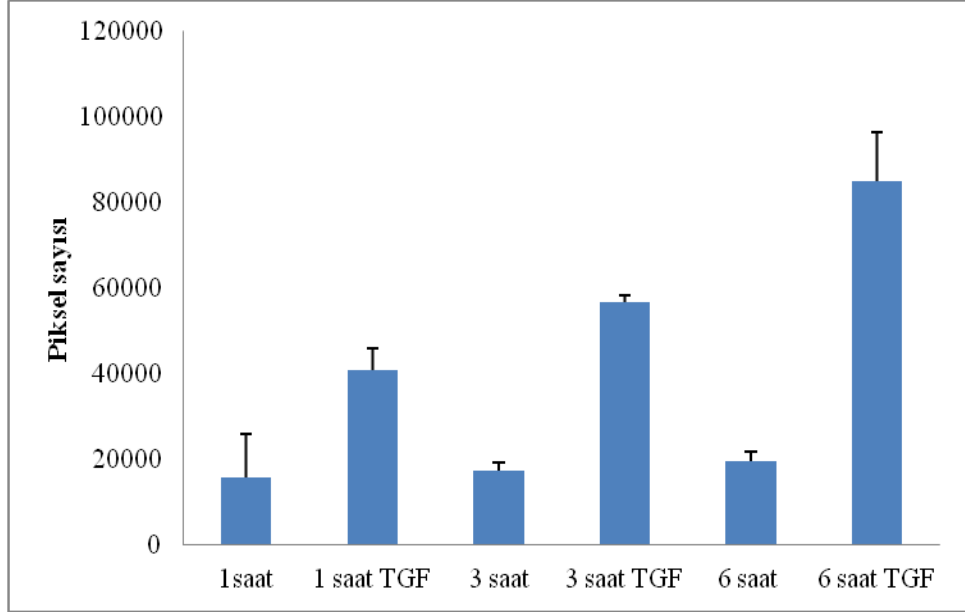
Şekil 3.24: CA9 proteinine TGF sitokininin etkisinin belirlenmesi (a) 1 saat Normosik (b) 1 saat Normoksik TGF uygulanmış



Şekil 3.25 : CA9 proteinine TGF sitokininin etkisinin belirlenmesi (a) 1 saat Hipoksik (b) 1 saat hipoksik TGF uygulanmış



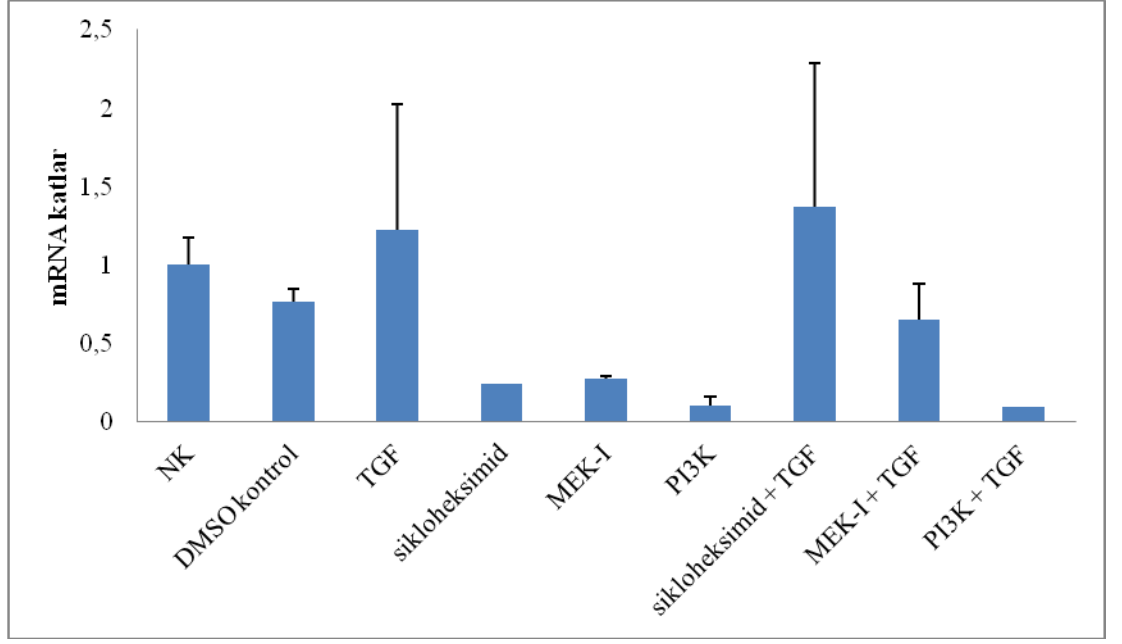
Şekil 3.26: CA9 proteinine normoksik şartlarda TGF β sitokinin etkisi İmmüno Floresan sonuçlarının dansitometrik olarak değerlendirilmesi



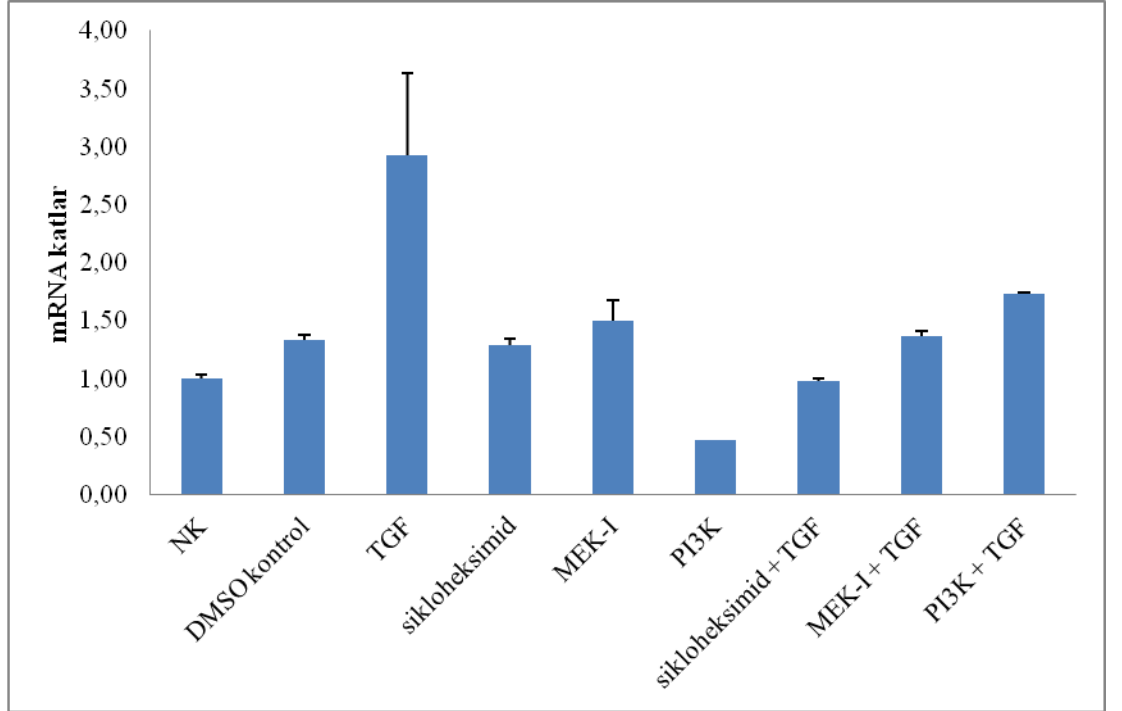
Şekil 3.27: CA9 proteinine hipoksik şartlarda TGF β sitokinin etkisi İmmüno Floresan sonuçlarının dansitometrik olarak değerlendirilmesi

3.10 Bazı inhibitörlerin ve TGF β sitokinin CA9 ekspresyon seviyesine etkilerinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi

Hücreler bölüm 2.2.6'de belirtildiği gibi hazırlanır ve eppendorflara çöktürülerek, RNA ve protein için ayrılmış olarak -80°C 'e kaldırılır. Alınan örnekler bölüm 2.2.7.1 ve bölüm 2.2.7.2'de belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapılır ve miktarı belirlenir. mRNA'dan bölüm 2.2.7.3 ve bölüm 2.2.7.4'te belirtildiği gibi cDNA elde edilir ve Realtime PZR 3 tekrarlı olacak şekilde kurulur. Sonuçlar $\Delta\Delta\text{CT}$ değerleri hesaplandıktan sonra MiniTab16 istatistiksel analiz programında Oneway ANOVA medodu ile değerlendirilerek analiz edildi. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda normal oksijen şartları altında MEK-1 ve sikloheksimid (ökaryotik ribozomlarda peptidil transferaz aktivitesini inhibe eder) inhibitörlerinin mRNA düzeyinde azalışa neden olduğu görülmüştür. Yine aynı deney hipoksik koşullar altında yapılmış ve wortmannin inhibitörünün CA9 mRNA düzeyinde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir.



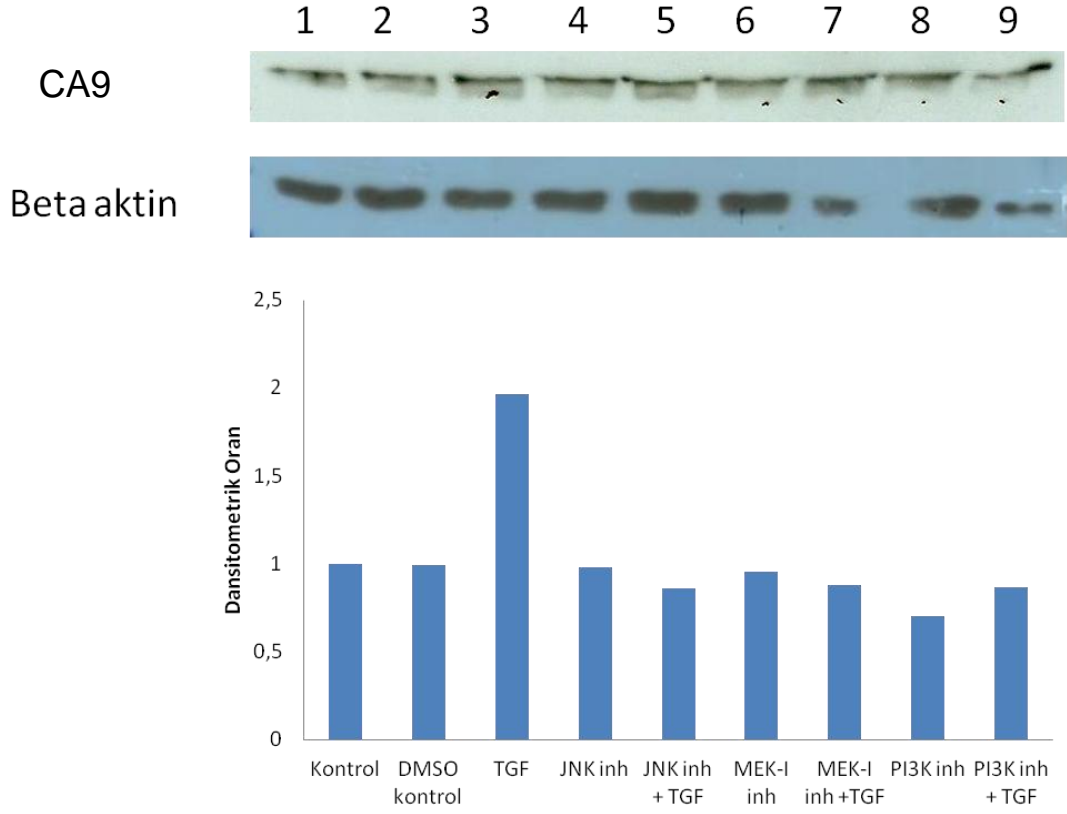
Şekil 3.28: Normal oksijen koşullarında TGF β ve bazı inhibitörlerin CA9 ekspresyon seviyesine etkileri, Realtime PZR sonuçları



Şekil 3.29: Hipoksiya TGF β ve bazı inhibitörlerin CA9 ekspresyon seviyesine etkileri, Realtime PZR sonuçları

3.11 Bazı inhibitörlerin ve TGF β Sitokinin CA9 Protein Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Western Blot Analizi İle Belirlenmesi

Hücreler bölüm 2.2.6'da belirtildiği gibi hazırlandı ve eppendorflara çöktürülerek, protein için ayrılmış olarak -80°C 'e kaldırıldı. Deney gruplarına JNK, MEK-1 ve PI3K inhibitörleri ve TGF sitokini uygulandı. Alınan örnekler bölüm 2.1.5.1'de belirtildiği gibi hazırlanan laemli çözeltisi ile total protein elde edildi ve bölüm miktarı belirlendi. Proteinler bölüm 2.2.8.1'de belirtildiği gibi SDS jel elektroforezinde yürütülerek büyüklüklerine göre ayrıldı. Bölüm 2.2.8.2'de belirtildiği gibi western blot işlemleri gerçekleştirildi. Proteinlerin transfer edildiği membrana CA9 spesifik primer antikoru ve normalizasyonun gerçekleştirilmesi içinde beta aktin antikoru ile muamele edildi. Sekonder antikor olarak CA9 primerine spesifik anti-rabbit uygulandı. Membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL substratla muamele edildi. Otoradyoaktif olarak belirlenen bantlar dansitometrik olarak İmage J programı ile analiz edildi. Değerlendirmeler sonucunda normal oksijen şartları altında yapılan bu deneyde JNK ve MEK-1 inhibitörlerinin CA9 proteini üzerine etkisinin değiştirici olmadığını ancak PI3K inhibitörünün azaltıcı etkisi olduğu görüldü. TGF sitokininin CA9 protein düzeyinde inhibitörler üzerine anlamlı bir etkisi görülmedi.



Şekil 3.30: Normal oksijen koşullarında CA9 proteinine inhibitörlerin etkisinin dansitometrik analizleri (1 Kontrol, 2 DMSO Kontrol, 3 TGF uygulaması, 4 JNK inhibitörü uygulaması, 5 JNK inh + TGF uygulaması, 6 MEK-I uygulaması, 7 MEK-I + TGF uygulaması, 8 PI3K uygulaması, 9 PI3K + TGF uygulaması)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kansere karşı birçok modern tanı ve tedavi yaklaşım stratejileri çok sayıda araştırmaya hedef olmaktadır. Kansere Moleküler biyolojisi çalışanların temel amacı kanserin altında yatan nedenleri açığa kavuşturmak ve tedavisine yönelik stratejiler geliştirmektir. Bu stratejilerde genellikle ilgili moleküllerin hedeflenmesi temel alınır. Potansiyel hedefler, moleküllerin etkilerini düzenleyici, genlerin ve proteinlerin fonksiyonel olan parçalarını, tümör gelişimini etkileyen, ekspresyon paternini ve malign tümörleri tanıyan aynı zamanda yok etmeye çalışan bir araç sağlamaktır [97].

Birçok katı tümörde olduğu gibi karaciğer kanseri hipoksiya ile karakterize edilmektedir. Karaciğer hücrelerinde hipoksik şartlar yâda düşük oksijen seviyesinde hücrel metabolik aktivite canlılığını korumak için farklı adaptasyonlar göstermektedir. Tümörün büyümesini etkileyen çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra hipoksik koşullar oluşması ile oluşan hücrel cevap birçok genin etkisi ile olmaktadır.

Karbonik anhidrazlar enzimatik aktiviteleri için çinko iyonu içeren metaloenzimlerdir. Hemen hemen tüm canlı hücrelerde karbondioksit molekülünün hidrotasyonunu katalizlemek için karbonik anhidraz enzimleri bulunmaktadır.

Membran bağımlı CA9 geni ile ilgili ilk çalışmalar, 1996 yılında Opavsky ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak CA9 geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Genin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili ilk bilgilerin edinildiği bu çalışmada, transkripsiyonun başlangıcında görevli olan TATA kutusunun olmadığı ve TATA-less bir promotor olduğu gösterilmiştir [53]

Literatüre genel olarak bakıldığında yapılan çalışmalarda güçlü bir şekilde hipoksiya'nın CA9 regülasyonunda önemli rolü olduğu görülmektedir. CA9 promotorunun -3/-10 bç arasında bulunan -173 baz çiftlik bölgesi HRE (hypoxia response element) bölgesi ve HRE bölgesine bağlanan HIF1 (hipoxia inducible factor) aracılığı ile transkripsiyonun kontrolü hipoksiya açısından karakterize edilmesine rağmen, normal oksijen koşullarına ve diğer hücrel uyarılara nasıl cevap verdiği konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır [111]. CA9'un hipoksiya ve in vivo tümör oluşumunda hipoksiya belirteçleri arasındaki bağlantı kesin olarak moleküler yöntemlerle doğrulanmış değildir.

Çalışmamız kapsamında CA9'un ekspresyonunun kontrolünde önemli olan hipoksiya transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesi olan (RCGTG) dizisini, HRE bölgesinin etkisini araştırmak için mutasyona uğrattık. *İn-vitro* yönlendirilmiş mutageniz tekniği proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, gen ekspresyonu, vektör ve enzim aktivitelerinin modifiye edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. HRE bölgesinin mutasyonu için öncelikle biyoinformatik analiz ve literatür taramalarıyla RCGTG dizisini belirledikten sonra *hCA9* 154 bp'lik promotör bölgesindeki dizi mutasyona uğratıldı. Mutasyonla bölgedeki nükleotitler A bazı ile değiştirildi. Bu mutasyonu hipoksik ve normoksik ortamda fonksiyonel olarak analiz ettiğimize yabancı tip olan *hCA9* promotör bölgesine oranla aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı azalış görüldü. Ayrıca bölgenin 9kez artarda eklenmesiyle oluşturulan 9XHRE bölgesi pMetLuc vektörüne klonlandı ve dizi analizi ile doğrulandı

Karbonik anhidraz enzim ailesinden membrana bağlı olarak bulunan CA9, katı tümör ile ilişkili olarak bilinen enzimlerdendir. CA9 enzimi, içerdiği hücre dışı membrana bağlı enzim aktif bölgesi ile CO₂'in bikarbonat ve protona hidratasyonu reaksiyonunu katalizler. Karbonik anhidraz 9 tümörlü hücrelerin hipoksik ve asidik koşullardaki adaptasyonunu sağlar. Tümörlerdeki CA9 ekspresyonu, tümörün tanısı ve ilerleyişi hakkında bilgi vermesi nedeniyle biyobelirteç olarak kullanılmaktadır Böylece CA9'un ifadesinin belirlenmesi mühim bir hale gelmektedir. CA9 'un normal dokulardaki ifadesi yok denilecek kadar azdır. Bu ifadenin tam tersi olarak tümörlü dokularda hipoksik koşullar ile artan CA9 ekspresyonu çeşitli tümörlerle olan bağlantısını kanıtlar niteliktedir [99]. Tümörlü Hücrelerdeki artış CA9 promotöründe bulunan HRE bölgesine bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in bağlanması ile gerçekleşir. Bu nedenlerden dolayı CA9, tümör hipoksiyası açısından güçlü bir belirteç olarak dikkati çekmektedir [100]. CA9 E-kaderin ile hücre-hücre adezyonu aracılığı ile de tümör invazyonunda görev alır [69].

Mesane hücrelerinde yapılan çalışmada CA9 ekspresyonuna rastlanmazken mesane kanseri hücrelerinde aşırı derecede ekspre olduğu ve bu ekspresyonun invaziv karakterde olan mesane hücre hattında daha da arttığı gözlemlenmiştir [98].

Sitokinler kısaca; hücrelerel düzenleyici proteinlerdir, çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özelleşmiş hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkileyen biyolojik moleküllerdir [101]. Sitokinlerin tümör metabolizmasında, hücre çoğalması, farklılaşması ve invazyonu gibi kanser

açısından önemli olaylarda görev almaktadırlar. Kanserde immunedavide kullanılmaları da sitokin çalışmalarının önemini daha fazla arttırmaktadır [69].

TGF β , çeşitli hücre tiplerinde malin değişimi ve tümör gelişimini destekler. TGF β üretimi birçok kanser türünde komşu hücrelerindeki salınımla karşılaştırıldığında artmakta olduğu görülmüştür [102]. Onkogenlerin aktif olduğu hücrelerde transformasyonu TGF β geninin transkripsiyonunu başlatır [69,103, 104]. Genel olarak tüm hücre tiplerinin matriks sentezini artırır, kemik hücreleri için kemotaktiktir ve farklılaşma durumu, kültür koşulları ve TGF- β konsantrasyonuna bağlı olarak proliferasyonlarını artırabilir ya da azaltabilir. Osteoblastların ve prekürsörlerinin farklılaşma durumunda ve tip I kollajen gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin artışı gözlemlenmiştir [105]. TGF- β reseptörleri periodontal hücreler ve dokulardan ekspresyona olur ve hasarlı dokularda artmaktadır. Ayrıca TGF- β 1 matriks metalloproteinaz ve plazminojen aktivatörlerinin sentezini azaltarak bağdokusu matriksinin yıkımını yavaşlatır [106,107]. TGF β 'nın tümör hücrelerinin üzerinde iki etkisi bulunmaktadır. Tümör gelişiminin ilk safhasında tümör yaşamını baskılar. İlerleyen safhalarda tümör hücrelerin invazyonunu, proliferasyonunu ve metastazını teşvik eder [69, 108]. Aslında, TGF- β 'nın hücre aktiviteleri üzerindeki çift yönlü etkisi nedeniyle elde edilen veriler; yapılan çalışmaların koşullarına, ortamdaki diğer büyüme faktörlerine ve hücre popülasyonuna bağlı olarak değişiklikler gösterebilir [107].

Hep3B hücrelerinde normoksi ve CoCl₂ uygulanarak oluşturulan hipoksi koşullarda 1, 3, 24, 48, 72 zaman aralıklarında TGF- β sitokininin sitotoksik etkisi MTT testi uygulanarak araştırıldı. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı bulunmuştur (p>0,05).

TGF β nın CA9 protein seviyesine etkilerinin araştırıldığı çalışmamız kapsamında, literatürde normoksik durumlarda TGF- β sitokininin CA9 mRNA'sını arttırdığı gösterilmiştir [110]. Normal oksijen koşullarında yapılan çalışmalarımız literatürdeki veriler ile korelasyon göstermekte, hipoksik koşullarda ise CA9 mRNA'sındaki artışın 6 saatten sonra başladığı görülmüştür.

Tümörlü dokulardaki aşırı ifadelenenmiş CA9 ekspresyonunu gösteren immunohistokimyasal çalışmalar bulunmaktadır. Hep3B hücre hattı ve diğer hücre hatları ile yapılan *in vitro* çalışmalarda pH değişimi, hipoksiya ya da hücre yoğunluğu gibi faktörlere bağlı olarak CA9 ekspresyonunun değişimini göstermektedir [35, 36]. Farklı sitokinler kullanarak Blokve ark. tarafından yapılan çalışmada, böbrek kanseri hücre hatlarında IL-1- β ve IL-4'ün CAIX ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Bunun yanında IL-13 ve TGF- β CA9 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı bulunmuştur [109]. Başka bir çalışmada ise Hep3B hücre hattı kullanılarak IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin CA9 mRNA seviyelerine etkilerinin belirlenen, IL-6 uygulamasının mRNA seviyesinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TNF- α uygulamasında ise Hep3B hücrelerinde CA9 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Sitokinlerin hücrelerin immun cevabın oluşmasındaki etkileri ve özellikle interlökinlerin hücre büyümesi, tümör nekroz faktörlerin ise kanserli hücrelerin yıkımı üzerindeki etkileri dikkate alındığında, CA9 ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olan sitokinler kanserin sitokinlerle kombine terapileri için çok önem taşımaktadırlar [110].

Farklı inhibitörler ve TGF β kullanılarak yapılan inhibisyon deneyleri ile hem mRNA seviyesindeki CA9 düzeyindeki değişmeler hem de protein seviyesindeki değişimler belirlendi. Çalışmamızın istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda Hep3B hücre modelinde CA9 mRNA düzeyinde TGF β sitokininin etkisi normal oksijen şartları altında PI3K, MEK-I ve sikloheksimid inhibitörleri ile azalmaya neden olduğu belirlendi. Hipoksik koşullar altında ise PI3K inhibitörünün CA9 mRNA düzeyinde dşre neden oluğu tespit edildi. Protein seviyesinde ise normal oksijen koşullarında yalnızca PI3K uygulanan grupta CA9 seviyesinde bir azalma belirlendi.

5. KAYNAKLAR

[1] Gilmour, K.M "Perspectives on Carbonic Anhydrase". *Comparative Biochemistry and Physiology*,157, 193–197. (2010).

[2] Hewatt, E. "Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families". *MEDLINE* 90, 29-76. (2000).

[3] Lindskog,S "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrases". *Pharmacology & Therapeutics* 74, 1–20. (1999).

[4] Gilmour, K. "Perspectives on carbonic anhydrase". *Comparative Biochemistry and Physiology* 157, 193-197. (2010).

[5] McDevitt, E. and Lambert, A. "Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members". (*BBA*) - *Proteins and Proteomics* 1814, 1854–1861. (2011).

[6] Supuran, C.T., "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators" ,*Rev.*7, 1-14. (2008).

[7] Hilvo, M. Tolavanen, A., "Molecular evolution and selction pressure in alpha-class" *Biochem.J.* 392, 83-92, (2005).

[8] Lovejoy,D.A., Emmett,D., Porter.,C.A. et al, "Evolutionarily conserved,"acatalytic"carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine", *Genomics.* 54, 484–493. (1998).

[9] Aspatwar, A., Tolvanen, M.E., Parkkila, S., "Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins", *BMC Mol. Biol.* 11, 25, (2010).

[10] Breton, S., "The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases", *JOP. J. Pancreas*, 2, 159. (2001).

[11] Vullo, D., Nishimori, I., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Activators: An Activation Study of the Human Mitochondrial Isoforms VA and VB with Amino Acids and Amines", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 1336. , (2007).

[12] Casey, J. R., Morgan, P.E., Vullo, D., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Design of Selective, Membrane-Impermeant Inhibitors Targeting the Human Tumor-Associated Isozyme IX", *J. Med. Chem.*, 47, 2337, (2003).

[13] Wilkinson, B. L., Bornaghi, L.F., Houston, T.A., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Poulsen, S.A., "Inhibition of Membrane-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes IX, XII and XIV with a Library of Glycoconjugate Benzene-sulfonamides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 987, (2007).

[14] Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrases as Drug Targets-an Overview." *Curr Top Med. Chem.*, 7, 820-825, (2007).

[15] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S.: "Characterization of Ca XIII, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Isozyme Family", *JBC Papers*, 279, 2719-272, (2003).

- [16] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Yuri, K., Onishi, S., "cDNA Sequence, mRNA Expression, and Chromosomal Localization of Human Carbonic Anhydrase- Related Protein, Ca-Rp XII", *Biochimica et Biophysica Acta*, , 1431, 510-518, (1999).
- [17] Maren, T. H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., and Godman, D.R. "Renal and Cerebrospinal fluid formation pharmacology of high molecular weight Carbonic Anhydrase Inhibitor", *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 98-104, (1997).
- [18] Şahin, A., Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulaması, Doktora Tezi Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, 2008
- [19] J.W, Vince, R.A. Reithmeier, "Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-/HCO₃-exchanger", *J. Biol. Chem.* 273, 28430–28437, (1998).
- [20] D. Sterling, B.V. Alvarez, J.R. Casey, "The extracellular component of transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl-/HCO₃-exchanger binds carbonic anhydrase IV", *J. Biol. Chem.* 277, 25239–25246, (2002).
- [21] Morgan, P.E., Pastorekova, S., Stuart-Tilley A.K., Alper S.L., Casey J.R., "Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CA9, with bicarbonate transporters", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C738–C748. (2007)
- [22] Piermarini, P.M., Kim, E.Y., Boron, W.F., "Evidence against a direct interaction between intracellular carbonic anhydrase II and pure C-terminal domains of SLC4 bicarbonate transporters", *J. Biol. Chem.* 282, 1409–1421, (2007)

- [23] Vince, J.W., Carlsson, U., Reithmeier, R.A., "Localization of the Cl-/HCO₃ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II", *Biochemistry* 39, 13344–13349, (2000).
- [24] Li, X., Y. Liu, B.V. Alvarez, J.R. Casey, L. Fliegel, A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity, *Biochemistry*, 45, 2414–2424, (2006).
- [25] Li, X. B., Alvarez, J.R., Casey, R.A. Reithmeier, L., "Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger", *J. Biol. Chem*, 277, 36085–36091, (2002).
- [26] Roush, E.D., Fierke, C.A., "Purification and characterization of a carbonic anhydrase II inhibitor from porcine plasma", *Biochemistry*, 31, 12536–12542, (1992).
- [27] Wuebbens, M.W. E.D., Roush, C.M. Decastro, C.A., "Cloning, sequencing, and recombinant expression of the porcine inhibitor of carbonic anhydrase: a novel member of the transferrin family", *Biochemistry*, 36, 4327–4336, (1997).
- [28] Wang, F., Lothrop, A.P., .at all, "A novel murine protein with no effect on iron homoeostasis is homologous with transferrin and is the putative inhibitor of carbonic anhydrase", *Biochem. J*, 406, 85–95, (2007).
- [29] Parkkila, S., "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU Int*. 101, 16-21, (2008).
- [30] Pastorekov, S., Zivada, J., "Carbonic anhydrase IX (CA9) as a potential target for cancer therapy", *Cancer Therapy*, 2, 245-262, (2004).
- [31] Oosterwijk, E., "Carbonic anhydrase IX: historical and future perspectives" , *BJU International*, 101, 2–7, (2008).

- [32] Kaluz, S., Kaluzova, M., et al. "Transcriptional Regulation of the *MN/CA9* Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase", *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 32588–32595, (1999).
- [33] Pastorekova, S and Pastorek, J., *Carbonic anhydrase it's inhibitors and activators*, CRC press, 256-274, (2004).
- [34] Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C.T., et al., "Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX". *PNAS*. 106, 16233-16238, (2009).
- [35] Supuran, C. T., "Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism " *World. J. Clin. Oncol.*, 98-103, (2012)
- [36] Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A.M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S.M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Jänis, J., Valjakka, J., Pastoreková, S., Pastorek, J., Kulomaa, M.S., Nordlund, H.R., Supuran, C.T., Parkkila, S., "Biochemical characterization of CA9, one of the most active carbonic anhydrase isozymes", *J. Biol. Chem.* 283, 27799–27809, (2008).
- [37] Beldegrun, A. and Shuch, E., "Salvage-targeted kidney cancer therapy in patients progressing on high-dose interleukin-2 immunotherapy: the UCLA experience" *Cancer J.*, 19, 89-96, (2013).
- [38] Baum, B., Georgiou, M., "Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling", *J. Cell. Biol.*, 192, 07-17, (2011).
- [39] Pastorekova, S., Pastorek, J., "Carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia", *BJU International*, 101, 8-15, (2005).
- [40] Supuran, C. T., 'Design In Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications/ Bioorg', *Nat. Rev. Drug Disc.*, 7, 168, (2008).

- [41] Supuran, C. T. "Carbonic Anhydrases as Drug Targets General Presentation. In Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications", *J. Biol. Chem*, 15–3, (2008).
- [42] Svastova, E.; Hulíková, A.; Rafajova, M.; Zatovicova, M.; Gibadulinova, A.; Casini, A.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Pastorek, J.; Pastorekova, S. "Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH" *FEBS Lett*, 57, 439-445, (2004).
- [43] Ebbesen, P., Pettersen, E. O., Gorr, T. A., Jobst, G., Williams, K., Kienninger, J., Wenger, R. H., Pastorekova, S., Dubois, L., Lambin, P., Wouters, B. G., Supuran, C. T., Poellinger, L., Ratcliffe, P., Kanopka, A., Görlach, A., Gasmann, M., Harris, A. L., Maxwell, P., Scozzafava, A. J., "Synthesis of some pyrazolyl benzenesulfonamide derivatives as dual anti-inflammatory antimicrobial agents", *Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 24, 296-309, (2009).
- [44] Pastorekova, P., Pastorek, S., Supuran, C. T., "Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects" *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*, 19, 199-229, (2004).
- [45] Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., De Simone, G., *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors*, Wiley pres, 73-139, (2009).
- [46] Supuran, C. T. "Design In Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications/ Bioorg". *Med. Chem.*, 347, 3467–3474, (2010).
- [47] Chegwidan, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., "The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals", *Exs.* 90, 343–363, (2000).
- [48] Potter, C.P., Harris, A.L., "Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer", *Br J Cancer* 89, 2–7, (2003).

- [49] Robertson, N., Potter, C., Harris, A.L., "Role of Carbonic Anhydrase IX in Human Tumor Cell Growth, Survival, and Invasion" *Cancer Research*, 64, 6160-6165, (2004).
- [50] Olive L. P., Aquina-Parsons, A., MacPhail, H.S., Liao, S.Y, Raleigh, J.A., Lerman, I. M and Stanbridge J. E., "Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic cells in cervical cancer" *Cancer Research*, 61, 8924-8929, (2001).
- [51] Özensoy, Ö. Kanser ilişkili Karbonik anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin Ekspresyonu, saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlgisinin Araştırılması Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [52] Robertson,N., Potter,C., Haris, A.L., "The role of carbonic anhydrase IX, in human tumor cell growth, survival and invasion." *Cancer Research* 64, 6160. (2004)
- [53] Yıldırım, H., Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [54] Chaudary, N., Hill, R.P. "Hypoxia and Metastasis". *Clin Cancer Res.* 13, 9-19, (2007).
- [55] Boutilier, RG., St-Pierre, J., "Surviving hypoxia without really dying" *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 126, 481-90, (2000).
- [56] Semenza, GL., "HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus" *Cell* ,107, 1-3, (2001).
- [57] Haris, AL. "Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth", *Nat Rev Cancer*, 2, 38-47, (2001).

- [58] Semenza, G.L., "Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences", *Biochem Pharmacol*, 59, 47–53, (2000).
- [59] TOYLU, A., Hepatosellüler Karsinoma Hücre Dizilerinde, Hipoksive Radyasyon Stresine Karşı Hücrenin Direnç Geliştirmesinde HGF Sinyal İletimi Sisteminin Rolünün Belirlenmesi, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, (2008).
- [60] Mylonis, I., and Simos, G., "The Involvement of the ERK-Hypoxia-Angiogenesis Signaling Axis and HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma, Hepatocellular Carcinoma" *Basic Research*, 51, 978-953, (2012).
- [61] Poon, E.; Harris, A. L., Ashcroft, M., "Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer", *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, 1462-3994 (2009).
- [62] Wiesener, M. S., Jurgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Horstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H., Eckardt, K. U., "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs", *Faseb Journal*, 17, 271-273, (2003).
- [63] Qingdong, K., and Nelson, C.M., "Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)" *MolFarm*, 71-73, (2006).
- [64] Semenza, G.L., "Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology", *Trends in Molecular Medicine*, 7, 345-350, (2001).
- [65] Semenza, G. L., "Targeting HIF-1 for cancer therapy", *Nature Reviews Cancer*, 3, 721-732, (2003).
- [66] Nakamura, K., Zen, Y., Sato, Y., Kozaka, K., Matsui, O., Harada, K., Nakanuma, Y., "Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver" *Human Pathology*, 38, 1532-1546, (2007).

- [67] Semenza, G.L., "HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics" *Trends in Molecular Medicine*, 8, 62-67, (2002).
- [68] Brahmini Horn, C, Pouyssegur, J. "The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion", *Bull Cancer*, 93, 73-78, (2006).
- [69] Sağkan Ilıkçı, R., Bazı sitokinlerin insan kolon kanseri hücrelerinde CAIX ifade düzeylerine etkilerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009)
- [70] Potter, C. and Harris, A.L., "Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor hypoxia, survival pathway and therapy target", *Cell Cycle*, 3, 164-167, (2004).
- [71] Chen, C.L., Chu, J.S., Su, W.C., Huang, S.C., Lee, W.Y., "Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1alpha, GLUT1, and CA9", *Virchows Arch.*, 457, 53-61, (2010).
- [72] Kaluz, S., Kaluzova, M., Stanbridge, E.J., "ERK pathway activates expression of the tumor-associated marker CA9 in HIF-1-dependent and HIF-1-independent way", *Proc Amer Assoc Cancer Res.*, 45 97-105, (2004).
- [73] Karbonik anhidraz 9 şematik hali [online]. (02 ekim 2012)
http://burgundy.cmmt.ubc.ca/medg421/wiki/index.php/Carbonic_Anhydrase_9#_ref-5
- [74] Kaluzova, M., Pastorekova, S., Svastova, E., Pastorek, J., Standbridge, E.J., Kaluz, S., 'Characterization of the MN/CA9 promoter proximal region: a role for specificity protein (SP) and activator protein 1 (AP) factors' *Biochem. J.* 669-677, (2001).

- [75] Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. "Hypoxia-inducible factor1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 5510–5514, (1995).
- [76] Stefan, K., Kaluzova', M., and Eric, J., "Expression of the Hypoxia Marker Carbonic Anhydrase IX Is Critically Dependent on SP1 Activity. Identification of a Novel Type of Hypoxia-responsive Enhancer", *Cancer Res.* 63, 917–922, (2003).
- [77] Siu, W.K., Ma, R.C., Lam, C.W., Mak, C.M., Yuen, Y.P., Lo, F.M., Chan, K.W., Lam, S.F., Ling, S.C., Tong, S.F., So, W.Y., Chow, C.C., Tang, M.H., Tam, W.H., Chan, A.Y.," Molecular basis of von Hippel-Lindau syndrome in Chinese patients", *Chin Med J (Engl)*., 124 , 237-41, (2011).
- [78] Lou, Y., McDonald,P.C., Oloumi, A., Chia, S.K., Ostlund, C., Ahmadi, A., Kyle, A., Auf dem Keller, U., Leung, S., Huntsman, D.G., Clarke, B., Sutherland, B.W., Waterhouse, D., Bally, M.B., Roskelley, C.D., Overall, C.M., Minchinton, A., Pacchiano, F., Carta, F., Scozzafava, A., Touisni, N., Winum, J.Y., Supuran, C.T., Dedhar, S.," Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors", *Cancer Research*. Online first version, (2011).
- [79] Swietach, P., Hulikova, A., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L.," New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation", *Oncogene*, 29, 6509-6521, (2010).
- [80] Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C.T., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., " The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular ph in three-dimensional tumor cell growths", *J Biol Chem.*, 284 , 20299-20310, (2009).
- [81] Smith, K.S., Ferry J.G.," Prokaryotic carbonic anhydrases", *FEMS Microbiol Rev.*, 24, 335-366, (2000).

- [82] Martínez-Zaguila'n, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., and Hendrix, M. J., " Hypoxia-induced expression of carbonic anhydrase 9 is dependent on the unfolded protein response", *Clin. Exp. Metastasis* 14, 176–186 (1996).
- [83] Moellering, R. E., Black, K. C., Krishnamurty, C., Baggett, B. K., Stafford, P., Rain, M., Gatenby, R. A., and Gillies, R., " Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes", *J. Clin. Exp. Metastasis* 25, 411–425, (2008).
- [84] Stubbs, M., McSheehy, P. M., Griffiths, J. R., and Bashford, C. L., " Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment", *Mol. Med. Today* 6, 15–19, (2000).
- [85] Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G.L.," Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1", *Cancer Res.*, 63 (5), 1138-43, (2003).
- [86] Bulgurcuoğlu Sibel, Özsaüt Bilge, Attar Erkut, "Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi", *Artemis*, Vol 4(1) 18-26, (2003).
- [87] Güzel, A.İ., Fare Lizozom ve İnterlökin-2 Genlerinin Klonlanması ve Malign Melanomlarda Anti-Tümoral DNA Aşısı Olarak Kullanılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana, 2006.
- [88] Berberoğlu, A., "Role of Growth Factor on Periodontal Tissue Healing" *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 114-121, (2007).
- [89] Sporn, MB., Roberts, AB., Wakefield, LM., Assoian, RK.," Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure", *Science*, 233,532-534, (1986).
- [90] Akhurst, R.J., Derynck, R., "TGF-13 signaling in cancer a double-edged sword", *Trends Cell Biol*, 11(11) , 44-51, (2001).

- [91] Onkoloji de Hedefli Tedavi Yaklaşımı Doç. Dr. Gökhan Demir İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi No: 37 • Aralık 2003; s. 17-30
- [92] Yang, S.H., Sharrocks, A.D., Whitmarsh, A.J., "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades" ,*Gene*, 320,3, (2003).
- [93] TGF- β signaling via TAK1 pathway: Role in kidney fibrosis Mary E. Choi, MD, Yan Ding, MD, PhD, and Sung Il Kim, PhD *Semin Nephrol.* 2012 May ; 32(3): 244–252
- [94] Yıldırım, H. Ve KÖÇKAR, F.," Bazı Sitokinlerin Hep3B Hücrelerinde CA9 Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi ", *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2 (2), 7, (2009).
- [95] Primer dizayn programı [online] (12 mayıs 2012) <http://www.bioinformatics.org/primerx/>
- [96] İmagej programı [online] (27 haziran 2012) <http://www.imagej.com>
- [97] Pastorekova,S.,Svastova,E., Pastorek,J., "Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy" *Trends Cell Biol*, 17 , 47-52, (2006).
- [98] Tobias Klatter, MD, David B. Seligson, MD, "Carbonic Anhydrase IX in Bladder" *American Cancer Society* 42, 75-79 (2001).
- [99] Parkkila, S., "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU International*, 101, 16-21, (2008).

- [100] Pastorekova, S., Pastorek, J., "Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia", *BJU International*, 101, 8-15, (2008).
- [101] Güneş, H., "Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri ", *Tr. J. of Biology*, 23, 283–292, (1999).
- [102] Derynck, R., Goeddel, DV., Ullrich, A., Gutterman, JU., WilliamsRD., Bringman TS., Berger, WH:, "Synthesis messenger RNA for transforming growth factor a and b and the epidermal growth factor receptor by human tumors", *Cancer Res*, 47, 707-712. (1987).
- [103] Birchenall-Roberts, M., Ruscetti, FW., Kasper, J., Lee, HD:, Friedman, R. et al., "Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the Ap-1 complex", *Mol Cell Biol*, 10, 4978-4983. (1990).
- [104] Geiser, A., Kim, S., Roberts, AB., Sporn, MB., "Characterization of the mouse mouse transforming growth factor-B1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene", *Mol Cell Biol*, 11, 84-92, (1991).
- [105] Cochran, DL., Wozney, JM., "Biological mediators for periodontal regeneration", *Periodontol 2000*, 19, 40-58, (1999).
- [106] Javelaud D, Mauviel A., " Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles", *Int J Biochem Cell Biol.*, 36, 1161-1165, (2002).
- [107] Berberoğlu, A., "Role of Growth Factor on Periodontal Tissue Healing", *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 3, 114-121, (2007).
- [108] Akhurst, R.J., Derynck, R., "TGF- β signaling in cancer a double-edged sword", *Trends Cell Biol.* , 11, 44, (2001).

[109] Malik, S. ve Roeder, R. G. "Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex", *Trends Biochem Sci.*, 30, 256,(2005).

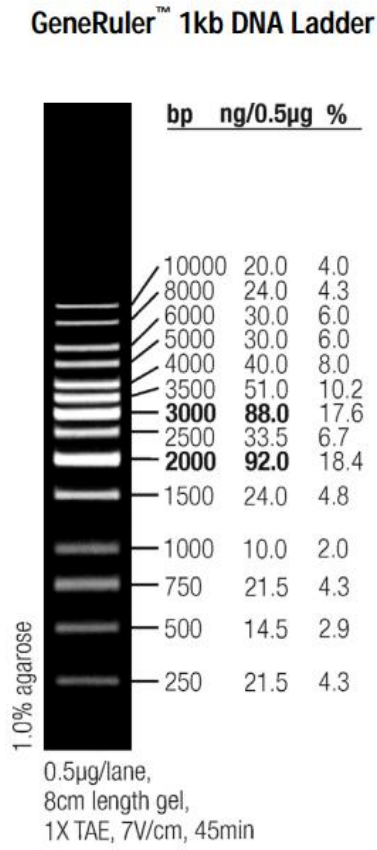
[110] Yıldırım, H., "Bazı Sitokinlerin Hep3B Hücrelerinde CA9 Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi", *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2 (2), 79-84, (2009).

[111] Kaluz, S.,Kaluzova, M.,Opavsky, R., Pastorekova, S.,Gibadulinova, A., Dequiedti ,F.,Kettmann, R.,Pastorek, J., "Transcriptional Regulation of the MN/CAIX Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase." *The Journal of Biological Chemistry*, 32588, 274, ,(1999).

EKLER

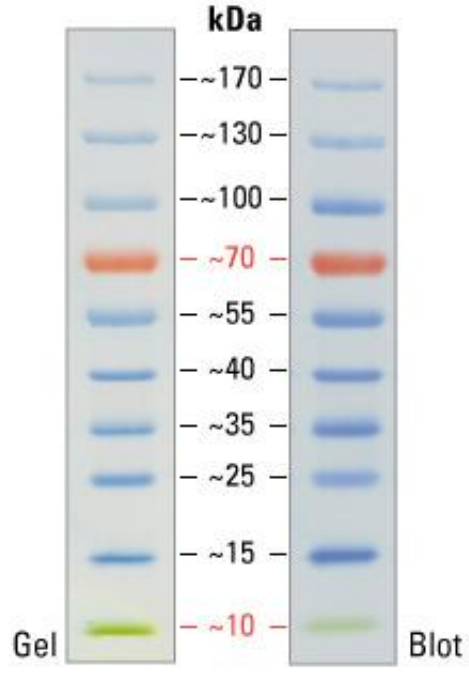
6. EKLER

EK A DNA Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci

EK B Protein Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci

EK C

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998
 Query: unclassified (154 bases)
 Taxonomy: Vertebrate
 Threshold: 85.0 point

TFMATRIX entries with High-scoring:

```

1 CAGCACAACC TGTCGACATC TGTCGCAAG GGGGCTCTGT entry      score
  -- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00199>M00199</A> AP-1 97.9
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00173>M00173</A> AP-1 93.8
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00037>M00037</A> NF-E2 90.1
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00199>M00199</A> AP-1 89.6
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00077>M00077</A> GATA-3 87.2
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00050>M00050</A> E2F 86.2
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00075>M00075</A> GATA-1 85.7
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00085>M00085</A> ZID 85.5

51 GAGTCAGCCT GCTCCCTCC AGGCTTGTC CTCGCCACC CAGCTCTGT entry      score
  -----> <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00199>M00199</A> AP-1 97.9
  -----> <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00173>M00173</A> AP-1 93.8
  -----> &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00083>M00083</A> MZF1 93.0
  -----> <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00037>M00037</A> NF-E2 90.1
  -----> <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00199>M00199</A> AP-1 89.6
  -----> &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00083>M00083</A> MZF1 87.8
  -----> &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00084>M00084</A> MZF1 85.5

101 TTCATGCA CGTAGCCC GTACACCG TGTCGTGGA CACCCACAG entry      score
     &lt;!-- <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00271>M00271</A> AML-1a 87.4
     -----> <A HREF=http://www.cbrc.jp/ntbin/bgset_tfmatrix?M00221>M00221</A> SREBF- 85.9
  
```

151 TCAG entry score

Total 13 high-scoring sites found.
 Max score: 97.9 point, Min score: 85.5 point