

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



İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III (CAIII)
PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE GENİN
EKSPRESYON PROFİLİNİN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA OKUYAN

BALIKESİR, 2011

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



İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III (CAIII)
PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE GENİN
EKSPRESYON PROFİLİNİN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA OKUYAN

BALIKESİR, 2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

DERYA OKUYAN tarafından hazırlanan “İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III (CAIII) PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE GENİN EKSPRESYON PROFİLİNİN ANALİZİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.10.2011 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
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Üye
Yrd. Doç. Hatice YILDIRIM

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Hilmi NAMLI

.....

ÖZET

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ III (CAIII) PROMOTORUNUN
KLONLANMASI VE GENİN EKSPRESYON PROFİLİNİN ANALİZİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DERYA OKUYAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

BALIKESİR, 2011

İnsan Karbonik Anhidraz III geni (CAIII), karbonik anhidraz ailesinin diğer üyelerinden düşük CO₂ hidrataz aktivitesi ve sülfanamid inhibitörlerine karşı direnç gösterme özellikleriyle ayrılır. 8.kromozomun q22 bölgesine lokalize olan CAIII geni kasa spesiflik göstererek erkeklerde ve fetüslerde yüksek seviyelerde ifade olmaktadır.

İnsan CAIII geninin farklı hücre serilerinde ekspresyon profili için semi kantitatif RT-PZR çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla Kolon Karsinom Hücre Hattı HT-29, Osteosarkom Hücre hattı MG63 ve Saos-2, Karaciğer Kanser hücre hattı Hep3B, HUVEC, Meme Kanser hücre hattı MCF-7, Prostat Kanseri hücre hattı PC3 ve DU-145'ndan CAIII'ün ekspresyon seviyesine bakılmış ve sadece HT-29, MG63, Saos-2 ve HUVEC hücre hatlarında mRNA düzeyinde ekspre olduğu bulunmuştur. Sitokinlerin CAIII'ün ekspresyon seviyesinde etkisini belirlemek amaçlı seçilen sitokinler, TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IFN- γ , HT-29 hücre hattına uygulanmış ve zamana bağlı değişimi belirlemek için gerçek zamanlı qRT-PZR çalışmaları yapılmıştır. CAIII proteinin HT-29 hücre hattında protein düzeyinde ifadesi de western blot tekniği ile gösterilmiştir. CAIII'ün transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi amaçlı, İnsan CAIII geninin promotor bölgesi -939/+86 bç'lik bölgeden genomik PZR yöntemiyle PGEMT-easy içine klonlanmıştır. Transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi amaçlı lusiferaz haberci vektör içine alt klonlanmıştır. Ayrıca olası transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri biyoinformatik olarak analiz edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz III, CAIII, CA3, HT-29

ABSTRACT

CLONING OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE III (CAIII) PROMOTER AND EXPRESSION ANALYSIS OF GENE PROFILE

MSC THESIS

DERYA OKUYAN

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, 2011

Human Carbonic Anhydrase III (CAIII), differs from other members of the family of Carbonic anhydrase with lower CO₂ hydration activity and resistance to classical CA sulphonamides inhibitors. CAIII gene localized to the 8. Chromosome at q22 region is specifically high expressed in muscles in males and fetuses.

The expression profile of human CAIII gene was carried out by semi quantitative RT-PCR analysis in different cell lines. The mRNA expression of CAIII was determined from HT-29 (Colon carcinoma cells), MG63 (Osteosarcoma cells), Saos-2 (Osteosarcoma cells), HUVEC (Endothelial cells) although there is no expression was detected in MCF7 (Breast carcinoma cells), PC3 (Prostate carcinoma cells), DU145 (Prostate carcinoma cells) and Hep3B (Hepatoma cells) cell lines. In order to determine the effect of cytokines on the CAIII expression, TGF- β , TNF- α , IL-1 α IL-6 and IFN- γ cytokines were chosen and applied to HT-29 cells. Then, Real-Time qRT-PCR were carried out so as to determine the selected cytokines on the time dependent changes at mRNA level of CAIII. In addition, the presence of CAIII protein was demonstrated by western blot analysis. In order to determine transcriptional activity of CAIII promoter, -936/+86bp CAIII promoter region was amplified by PCR based approach and cloned into pGEM-T easy vector. In addition, the putative transcription factor binding motifs were analysed bioinformatically in the CAIII promoter.

KEYWORDS: Carbonic Anhydrase III, CAIII, CA3, HT-29

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 Anhidrazlar	1
1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	2
1.1.2 Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması	2
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı	3
1.1.4 Memeli Karbonik Anhidrazların Dağılımı ve Fizyolojik Önemi ..	4
1.1.4.1 Mitokondriyal Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	7
1.1.4.2 Farklı Vücut Sıvılarında Salgılanan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	7
1.1.4.3 Membrana Bağlı Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	7
1.1.4.4 Sitoplazmada Bulunan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	9
1.2 Karbonik Anhidraz III (CAIII)	10
1.2.1 CAIII hangi dokularda ifade olmaktadır?	10
1.2.2 CAIII Enziminin Yapısı ve Hücredeki Görevleri	12
1.2.3 CAIII ve Kanser	13
1.3 Sitokinler	14
1.3.1 Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	14
1.3.2 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)	16
1.3.3 İnterlökin-1 Ailesi (IL-1)	17
1.3.4 İnterlökin-6 (IL-6)	18
1.3.5 İnterferon Gamma (IFN- γ)	18
1.4 Çalışmanın Amacı	21
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Materyal	23
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	23
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler	26
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu	27
2.1.4 Bakteriyel Kültür Ortamı	28
2.1.5 Antibiyotikler	28
2.2 Metotlar	28
2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	28
2.2.2 DNA İzolasyonu ve Klonlama	29
2.2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	29
2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	29

2.2.2.3	Primer Tasarımı.....	30
2.2.2.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
2.2.2.5	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	30
2.2.2.6	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması.....	30
2.2.2.7	Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep).....	31
2.2.2.8	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi.....	31
2.2.2.9	Kompetent Hücre Hazırlanması.....	31
2.2.2.10	Transformasyon.....	32
2.2.3	Hücre Kültürü Teknikleri.....	32
2.2.3.1	Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması.....	32
2.2.3.2	FCS Hazırlanması	32
2.2.3.3	PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması.....	32
2.2.3.4	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	32
2.2.3.5	Hücre Soyunun Başlatılması	33
2.2.3.6	Hücrelerin Büyütülmesi	33
2.2.3.7	Hücrelerin Pasajlanması.....	33
2.2.3.8	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı.....	34
2.2.3.9	Hücrelerin -80°C'de Saklanması.....	35
2.2.3.10	HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması.....	35
2.2.4	Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları.....	35
2.2.4.1	Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu.....	35
2.2.4.2	RNA Ürününün Spektrofotometrik Ölçümü.....	36
2.2.4.3	Formaldehit (FA) Jel Elektroforezi.....	36
2.2.4.3.1	%1,2 FA Jel Hazırlanması	36
2.2.4.4	RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	36
2.2.4.5	Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi	37
2.2.4.6	Semi Kantitatif RT- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	38
2.2.4.7	Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile CA3 Gen İfadesinin İncelenmesi	38
2.2.5	Western Blot Analizi	39
2.2.5.1	Western Blot Solüsyonlarının Hazırlanması.....	39
2.2.5.2	Laemli Buffer Kullanılarak Protein Ekstraktlarının Hazırlanması	40
2.2.5.3	SDS PAGE.....	40
2.2.5.4	SDS jelinin Blotlanması.....	41
2.2.5.5	Proteinlerin Belirlenmesi	42
2.2.5.6	Sonuçların Filme Aktarılması	42
2.2.5.7	İstatistiksel Analiz:	42
3.	BULGULAR	43
3.1	Çalışma Planı:.....	43
3.2	CAIII'ün Promotor Bölgesinin Klonlanması ve Analizi.....	47
3.2.1	Genomik DNA İzolasyonu	47
3.2.2	Primer Tasarımı	48
3.2.3	CAIII promotorunun genomik DNA dan Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) ile amplifikasyonu	49
3.2.4	İnsan CAIII Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu.....	51
3.2.5	İnsan CA3 geninin promotor dizisinin analizi.....	52

3.2.6	İnsan CAIII Promotorunun Lusiferaz Haberci Vektörüne Klonlama Yapılması ve <i>E. Coli</i> 'ye Transformasyonu.....	54
3.2.7	İnsan CAIII promotorunda yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri.....	55
3.3	İnsan CA3 Geninin Ekspresyon Profili Analizi	56
3.3.1	Ekspresyon Çalışmaları amacıyla kullanılan Hücre Hatları	56
3.3.2	Farklı Hücre Hatlarında CA3'ün ekspresyonunun belirlenmesi.....	58
3.4	CAIII'ün HT-29 hücrelerinde protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesi	59
3.5	HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması	60
3.6	Gerçek Zamanlı qRT-PZR Çalışmaları	61
3.7	HT-29 Hücre Hattında Farklı Sitokinlerin CAIII Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	64
3.8	Protein Seviyesinde Etkilerinin Belirlenmesi.....	68
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	75
4.1	Gelecekteki Planlar.....	79
5.	KAYNAKLAR.....	80
6.	EKLER.....	92
6.1	Kullanılan Markerlar	92
6.2	Olası Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri.....	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) [26].....	4
Şekil 1.2: CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi [18].	6
Şekil 1.3: TNF- α ile indüklenmiş apoptozisin sinyal iletimi [69].	15
Şekil 1.4: Hücre proliferasyonunun TGF- β ile kontrolü [76].....	17
Şekil 1.5: IL-6 aracılığı ile gen ifadesinin kontrolü [92].	20
Şekil 1.6: IFN-gamma aracılığıyla gen ifadesinin kontrolü [92].....	21
Şekil 2.1: pGEM-T Easy plazmitin haritası.....	26
Şekil 2.2: pMetLuc-Reporter plazmitin haritası	27
Şekil 2. 3: Hemositometre	34
Şekil 3. 1: İnsan CAIII promotörünün klonlanması ve analizinin akış diyagramı.....	44
Şekil 3. 2: CAIII Geninin Ekspresyon profili çalışması ve analizinin akış diyagramı.....	46
Şekil 3. 3: Genomik DNA jel görüntüsü M: 1 kb Marker; 1: 1 no'lu örnek; 2: 2 no'lu örnek 3: 3 no'lu örnek	47
Şekil 3.4: CAIII Primerlerinin saç tokası oluşturma potansiyelleri (A) Forward Primer (B) Reverse Primer	49
Şekil 3. 5: İnsan CA3 geninin 1025 bp'lik promotörün jel görüntüsü M: 1 kb Marker; 1: örnek	51
Şekil 3. 6: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan promotörün EcoRI kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -1 kb marker, 1 -1. koloni, 2 -2. koloni, 3 - 3. koloni, 4 -4. Koloni, 5 -5. Koloni, 6 -6. Koloni.....	52
Şekil 3.7: Klonlanan ve dizi analizine gönderilen insan CAIII promotör dizisi ile CAIII klonunun karşılaştırılması	53
Şekil 3.8: pMetLuc vektörüne klonlanan CAIII promotörünün kesim sonuçlarının jel görüntüsü	54
Şekil 3.9: İnsan CAIII promotörün da yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri. Translasyonun başlangıç kodonu ATG kırmızı öile vurgulanmıştır. Muhtemel önemli olabilecek TF faktörü bağlanma bölgeleri ok ile gösterilmiştir. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi kırmızı ile, translasyonun başlangıç bölgesi ise pembe ile gösterilmiştir.....	55
Şekil 3.10: İnsan CAIII geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri: (A) HT-29 (İnsan Kolon Karsinomu), (B) DU145 (İnsan Prostat Karsinomu), (C) PC3 (İnsan Prostat Karsinomu), (D) MCF7 (İnsan Meme Karsinomu), (E) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), (F) MG63 (İnsan Kemik Karsinomu), (G) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu), (H) HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre) (10X40)	57
Şekil 3.11: İnsan CAIII Genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. M: 1 kb Marker, 1- MCF7, 2- Hep3B, 3- HT-29, 4- PC3, 5- DU145, 6- MG63, 7- HUVEC, 8- Saos-2	58

Şekil 3.12: İnsan CAIII Proteininin işaretlenmesinin film üzerindeki görüntüsü.....	59
Şekil 3.13: HT-29 sitokin deneyinden elde edilen cDNA'ların kontrolü amaçlı insan beta mikroglobulin-2 kullanılarak yapılan kontrol PZR'ı. M: 1 kb marker, 1- 24h Kontrol, 2- 24h TGF- β , 3- 24h TNF- α , 4- 24h IL-1, 5- 24h IL-6, 6- 24h IFN- γ , 7- 48h Kontrol, 8- 48h TGF- β 9- 48h TNF- α , 10- 48h IL-1, 11- 48h IL-6, 12- 48h IFN- γ , 13- 72h Kontrol, 14- 72h TGF- β , 15- 72h TNF- α , 16- 72h IL-1, 17- 72h IL-6, 18- 72h IFN- γ	61
Şekil 3.14: İnsan CA3 genine ait HT-29 sitokin deneyinin gerçek zamanlı qRT-PZR sonuçları.	63
Şekil 3.15: 500U/ml TGF- β 'nın CAIII'ün mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).	65
Şekil 3.16: 500 U/ml TNF- α 'nın CAIII mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).	66
Şekil 3.17: 500U/ml IL-1'in CAIII mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).	66
Şekil 3.18: 500U/ml IL-6'in CAIII mRNA seviyesine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).	67
Şekil 3.19: 500U/ml IFN- γ 'nın CAIII mRNA seviyesine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).	67
Şekil 3.20: 6-Kuyulu plakaya hücre ekimi	68
Şekil 3.21: CAIII ve H- β -2 Protein belirlemesi.....	71
Şekil 3.22: CAIII proteininin 500U/ml TGF- β sitokin sonuçları	72
Şekil 3.23: CAIII proteininin 500U/ml TNF- β sitokin sonuçları	72
Şekil 3.24: CAIII proteininin 500U/ml IL-1 α sitokin sonuçları.....	73
Şekil 3.22: CAIII proteininin 500U/ml IL-6 sitokin sonuçları.....	72
Şekil 3.22: CAIII proteininin 500U/ml IFN- γ sitokin sonuçları.....	724
Şekil 6.1: Fermentas 1kb DNA marker	72
Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein marker (Thermo)	93

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Karbonik Anhidraz Enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar.....	2
Tablo 1.2: α -CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri, katalitik aktiviteleri ve Sülfanamid inhibitörlerine karşı ilgileri.....	5
Tablo 1.3: İnsan CAIII geninin dokulardaki dağılımı [73, 74].....	12
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	23
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	24
Tablo 2.3: Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde birinci Kullanılan Bileşenler ve Programı.....	37
Tablo 2.4: Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde ikinci basamakta kullanılan bileşenler.....	37
Tablo 2.5: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR bileşenleri.....	38
Tablo 2.6: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR programı.....	39
Tablo 2.7: Western Blot Solüsyonları ve içerikleri:.....	40
Tablo 3.2: İnsan CAIII promotorunun amplifikasyonu için PZR içerikleri... 50	50
Tablo 3.3: İnsan CAIII promotor amplifikasyonu için PZR koşulları.....	50
Tablo 3.4: İnsan CAIII genine ait 595 bç'lık ürün veren primer çifti.....	56
Tablo 3.6: İnsan- β -2 mikroglobilin genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları.....	61
Tablo 3.5: İnsan CAIII genine ait 280bç'lık primerlerin uzunluk, tm ve dizi bilgileri.....	62
Tablo 3.7: İnsan CAIII geni için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu.....	62
Tablo 3.8: İnsan CAIII geni için Gerçek zamanlı PZR koşulları.....	63

SEMBOL LİSTESİ

CA	Karbonik Anhidrazlar
CAIII	Karbonik Anhidraz III izoenzimi
CAII	Karbonik Anhidraz II izoenzimi
CA3	Karbonik Anhidraz III Geni
FCS	Fetal Sığır Serumu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
IPTG	İzopropil β -D-Tiogalaktopiranozit
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DEPC	Dietilpirokarbonat
LB	Luria Broth
BSA	Sığır Serum Albumin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
FA	Formaldehit Agaroz
RPM	Dakikada ki Dönüş Sayısı
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
UV	Ultra-viyole
U	Enzim Ünitesi
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekrosiz Faktör
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IFN	İnterferon

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin deneysel kısmı Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarında, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve tez danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam sırasında bana engin bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, her zaman bana destek olan, ilgi ve yardımlarını asla esirgemeyen, akademik ve özel hayatındaki başarılarını örnek aldığım çok saygı değer hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Çalışma azmini ve akademik başarılarını örnek aldığım, çalışmalarım sırasında bana yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a,

Tezimin her aşamasında sonsuz sevgi ve anlayışıyla yanımda olan, beni sabırla dinleyip destek olup, çok sevdiğim hocam Arş. Gör. Sümeyye Aydoğan TÜRKOĞLU'na, en sıkıştığım anlarda yanımda olan, pratik çözümler sunan, kriz anlarımda beni sakinleştiren, abla sevgisini her zaman hissettiren canım hocam Arş. Gör. Meltem ALPER'e,

Her anımda hüznüme, sevincime, mutluluğuma, kederime ortak olan, desteklerini her zaman hissettiğim, beni asla yalnız bırakmayan, her zaman beni dinleyip, anlayışla karşılayan laboratuvar arkadaşlarım ve canım kardeşlerim A.Tuğşen AYDERMİR, Esra TOKAY, Gülinay SELÇUK, Merve KARAMAN, Serhad ONAT ve Feyzullah TOKAY'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi manevi hiç bir desteği benden esirgemeyen canım anneme, babama ve herşeyden çok sevdiğim kardeşime teşekkür ederim, iyi ki varsınız.....

Derya OKUYAN

1. GİRİŞ

1.1 Karbonik Anhidrazlar

Karbonik Anhidraz (CA) (Karbonat Hidroliyaz, Karbonat Dehidrataz, Karbonat Ahidraz, Karbonik asit Anhidraz E.C.4.2.1.1) Prokaryot, Ökaryot ve Archae 'da yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir [1-6].

İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen Karbonik Anhidraz, canlılarda CO_2 'in hidratasyonunu ve HCO_3^{-} iyonunun dehidrastasyonunu katalizleyen bir enzimdir [4, 7].



Karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlemeleri aracılığıyla bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki değişik bir çok alanda gaz değişimi, iyon transportu, su-elektrolit dengesi ve asit baz dengesinin sağlanması olaylarına katılmaktadırlar [8-10].

Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, böbreklerde, gastrik mukozada ve göz lensi gibi birçok farklı dokuda H^{+} ve HCO_3^{-} birikiminde rol oynamaktadır. Histokimyasal metotlarla tükrük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmıştır. Bu enzimin balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bulunması onun değişik rolleri olduğunu ayrıca ispatlanmıştır [4, 11-13].

1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO_2 molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyamide, aldehidin geminal diole hidratasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, Tablo 1.1'de gösterildiği gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [14, 15].

Tablo 1.1: Karbonik Anhidraz Enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar.

(1)	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
(2)	$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
(3)	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
(4)	$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH}(\text{OH})_2$
(5)	$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
(6)	$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
(7)	$\text{ArOPO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HPO}_3^{2-} + \text{ArOH}$
(8)	$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}$ (Ar= 2,4 dinitrofenil)
(9)	$\text{PhCH}_2\text{OCOC l} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
(10)	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$ (R=Me;Ph)

1.1.2 Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması

Bütün bilinen CA'lar, α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -CA olmak üzere beş CA gen ailesi olarak sınıflandırılmıştır [3-7]. α -sınıfının birçok izoformu bütün omurgalı dokularda bulunur. Bunun dışında, β - sınıfının izoformları, yüksek bitkilerde ve siyanobakterileri de içeren alglerde yaygındırlar. β ve γ izoformları, başta bakteriler

olmak üzere prokaryotların geniş bir aralığında bulunur. Tek δ -CA, marine diatom *Thalassosira weissfloggi*'de saptanmıştır [3-11]. ϵ -sınıfının temsilcisi son zamanlarda, *Chemolithotrophic* bakteride keşfedilmiştir [7]. Bu sınıfların aminoasit dizileri düzeyinde önemli benzerliği yoktur ve bütün katlanmalar onların bağımsız orijinleri olduğunu belirtir.

Akuatik fotosentetik organizmalarda çevredeki CO₂ yetersizliğinin üstesinden gelmek amacıyla CO₂ 'yi derişik hale getirici bir mekanizma olarak rol oynar [16, 24].

1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. İzoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.1'te gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuştur. Zn⁺² iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar [17-19, 39].

İnsan eritrosit CAI ve CAII izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve *Rhesus* maymunlarına ait CAI izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CAII izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CAIII izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [20, 21].

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CAII izoenzimi CAI izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında

hücrel yerleşimleri, sülfanamid inhibitörlerine karşı ilgileri ve katalitik aktiviteleri bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler (Tablo 1.2) [27-29].

Tablo 1.2: α -CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri, katalitik aktiviteleri ve Sülfanamid inhibitörlerine karşı ilgileri [28].

Izoenzim	Katalitik Aktivite	Sülfanamidlere İlgisi	Hücrel Yerleşim
CAI	Düşük	Orta	Sitoplazmik
CAII	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazmik
CAIII	Çok düşük	Çok düşük	Sitoplazmik
CAIV	Yüksek	Yüksek	Membranlar arası
CAV	Orta-yüksek ^a	Yüksek	Mitokondriyal
CAVI	Orta	Orta-düşük	Salgı(Hücre dışı)
CAIV	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazmik
CARP VIII	Akatalitik	*	Sitoplazmik
CAIX	Yüksek	Yüksek	Membran arası
CARP X	Akatalitik	*	Bilinmiyor
CARP XI	Akatalitik	*	Bilinmiyor
CAXII	Aktif	Bilinmiyor	Membran arası
CAXIII ^b	Çok yüksek	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CAXIV	Düşük	bilinmiyor	Membran arası

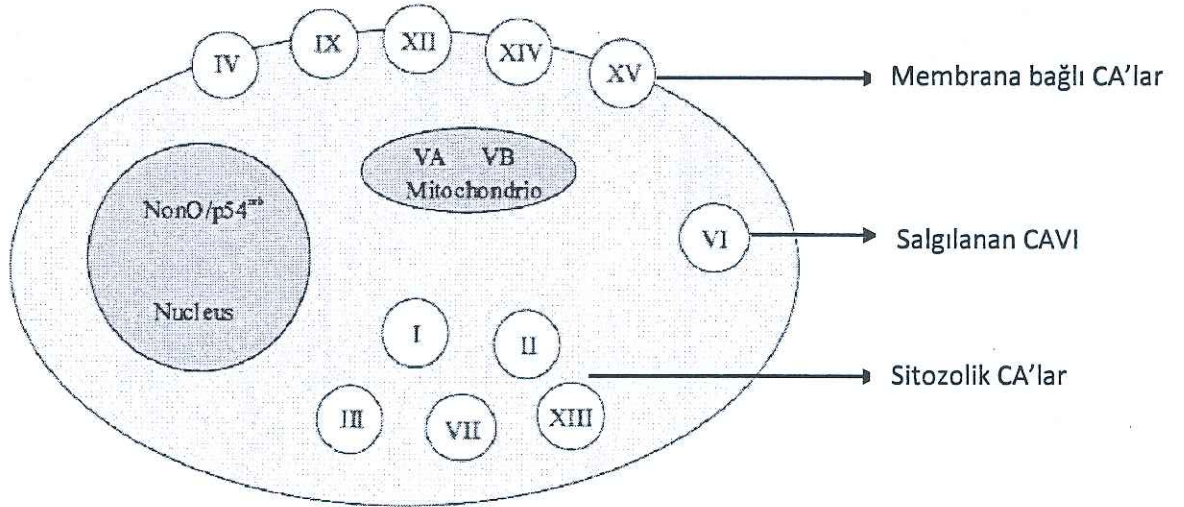
^apH 7,4 olduğu zaman orta, pH 8,2'den yüksek olduğu zaman yüksek.

^bCAXIII henüz protein olarak izole edilememiştir fakat ekspresyon seviyesinde tanımlanmıştır ve cDNA kütüphanesinde fareden elde edilen dizi bulunmaktadır.

Karbonik anhidraz enzimlerinin insanlardaki fizyolojik fonksiyonları uzun çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır ve günümüzde hala devam etmektedir. CA ilk olarak eritrositlerde bulunan ve insanda neredeyse bütün doku ve organlarda var olan izoenzimdir. CA izoenzimlerinin eritrositlerdeki en önemli fonksiyonları, doku

kılcallarında metabolizma sonucunda oluşan CO_2 'i H_2CO_3 'e dönüştürmeleri akciğer kapillerinde ise H_2CO_3 'ü CO_2 'e dönüştürerek solunum olayında yer almalarıdır. Böbrek tübüllerinde de sentezlenmekte olan CA' nın diğer önemli görevi, Na^+ ve H_2O 'nun geri emilimini sağlamaktır [25- 29, 37-41].

Memelilerde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan 15 farklı Karbonik Anhidraz izoenzimi tespit edilmiştir. Bunların çoğu baskın olarak farklılaşmış hücrelerle ilişkilidir ve çeşitli doku ve organlarda özelleşmiş fonksiyonları yerine getirirler (Şekil. 1.2). Beş çeşidi sitoplazma da bulunur (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), beş çeşidi hücre membranına bağlı olarak bulunur (CAIV, CAIX, CAXII, ve CAXV), iki çeşidinin mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir (CAVA ve CAVB). Bir çeşidi ise salgılanan bir enzimdir (CAVI). Ayrıca henüz sınıflandırılmamış bir formu olan NonO/p54^{nrb} tanımlanmıştır [36-40, 14-19]. Bunun dışında CA gen ailesine dahil üç çeşit Karbonik Anhidraz İlişkili Proteinler (CARP) de bulunmaktadır [20, 35].



Şekil 1.2: CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi [18].

1.1.4.1 Mitokondriyal Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CAV mitokondriyel matrikste lokalize olması ile CA'lar içerisinde tekdir. 16. kromozom üzerindedir ve CAVA ve CAVB olmak üzere iki farklı izoformu bulunmaktadır. CAVA karaciğer ve çizgili kaslarda ifade edilirken; CAVB beyin, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, bağırsak, testis, çizgili kaslarda ifade edilir. CAVA, hepatosit mitokondrilerinde glukoneogenesis ve ürogeneziste; CAVB, pankreastan insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar.[42, 43] Mitokondriyal CA'lar, adipositlerde ve sinir sisteminde de bulunmaktadır [32].

1.1.4.2 Farklı Vücut Sıvılarında Salgılanan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Bu grupta bulunan tek enzim CAVI'dır. CAVI, ilk olarak, koyun parotid bezi ve tükürükte 1979'da keşfedilmiştir [35, 36, 44, 45] ve insan tükürüğünden saflaştırılmıştır. CAVI geni, 1. kromozom üzerindedir ve 42 kDa molekül ağırlığındadır. Katalitik domaini transmembran CA'ların hücre dışı CA domainleri ile homoloji göstermektedir. CAVI, tükürük bezlerinde üretilir ve tükürük sıvısına salınır [46]. CAVI, bakteri plağı ve diş minesini arasındaki ince bir protein tabakasında yerleşmiştir. Gastrik mukusta CAVI bulunmaktadır, fakat gastrik yüzey epitel hücrelerinde ifade edilmemektedir ve tükürük orjinli olmalıdır. Bunlara ilave olarak, serum, l krimal bezler, pankreas, meme bezleri ve sütte CAVI'nın varlığı gösterilmektedir. Bu protein, t kr kte bikarbonat seviyesinin korunmasında önemli rol oynar. Ayrıca,  st gastrointestinal sistemde aşıırı asit seviyesini nötralize etmektedir. CAVI'nın kolostrumda aşıırı konsantrasyon da bulunması, gelişmekte olan gastrointestinal kanalın gelişme ve olgunlaşma sürecinde önemli rol oynamaktadır [9].

1.1.4.3 Membrana Bağlı Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Membranla ilişkisi tespit edilen ilk izoenzim olan CAIV, gastrointestinal sistemi döşeyen epitelyum hücrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 35 kDa'dur ve 17.kromozomda lokalize olmuştur. Bu protein, epitel hücrelerinin apikal plazma membranına bağlanırlar. Gastrointestinal sistemde aşıırı ifadesi gözlenirken, ince bağırsağın epitel hücrelerinde düşük seviyede ifade edilir.

Safra kesesi ve safra ile ilgili epitel hücrelerinde de ifadesi gözlenmiştir. Aynı zamanda akciğer, böbrek, göz, beyin, çizgili kas, kalp ve karaciğer, erkek üreme hücrelerinde de saptanmıştır. Otoimmün pankreatitisli hastalarda CAIV serum seviyesi, immun yanıt ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca akciğer ve böbrekte, beyin, kalp, karaciğer ve pankreasta da CAIV bulunmaktadır. CAIV ifadesinin otoimmün pankreatitis ile önemli bir korelasyonu gözlenmiştir [9, 10,15-18, 57-62].

CAXIV, 37.6 kDa molekül ağırlığında transmembran bir izoenzimdir. Geni, 1. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Bu protein ilk olarak fare böbreğinden izole edilmiştir. Farelerde CA14 mRNA'sı kalp, iskelet kası, karaciğer, beyin ve akciğerde bulunurken; insanlarda kalp, beyin, karaciğer, iskelet kası ve daha düşük seviyede incebağırsak, kolon, böbrek ve mesanede saptanmıştır. Ayrıca hem fare hem de insan beyin nöronal membran ve aksonlarında da gözlenmiştir [53]. Son zamanlarda keşfedilen düşük aktiviteli bir enzimdir [17]. CAIV ile oldukça benzerlik göstermektedir. En fazla böbrekte üretilmektedir. Beyin ve testis dokularında da ifadesi gözlenmektedir [9].

CAXII, birbirinden bağımsız olarak iki farklı grup tarafından klonlanmış ve karakterize edilmiştir. CA12 geni 15. kromozom üzerinde lokalize olmuştur [54]. CAXII, mRNA'sının varlığı çeşitli dokularda gösterilmektedir. Buna göre CAXII, Böbrek, kolon, pankreas, prostat, yumurtalık, testis, akciğer ve beyinde ifade olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, üreme hücreleri, endometriyum epitel hücrelerinde, serviksde bulunmuştur. Duedonum, jejenum ve ileumda ekspresyon gözlenmezken kolon ve rektumun epitel hücrelerinde bu proteinin üretildiği gösterilmiştir. CAXII, CAIX gibi bazı kanserlerde ve bazı tümör hücre serilerinde aşırı derecede ekspre olduğu gösterilmiştir. Glokomlu hastalarda da bu proteinin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır [55]. Çoğu kolorektal tümörde, CAXII'nin anormal ekspresyonu gözlenmiştir [56].

1.1.4.4 Sitoplazmada Bulunan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII stoplazmada bulunan beş Karbonik Anhidraz üyesidir.

CAI, 30 kDa moleküler ağırlığında sitoplazmik CA izoenzimlerinden biridir. CAI eritrositlerde saptanmıştır ve burada en fazla bulunan proteinlerden biridir. Eritrositlere ilave olarak kalın bağırsak epiteli, kornea epiteli, göz merceği, Langerhans adaları, plasenta ve fetal membranlarda daha düşük seviyede bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kronik miyeloproliferatif bozukluklarda CAI'in ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [57, 58].

CAII, 30kDa moleküler ağırlığında bir protein olup, insan CA2 geni, 17 kb uzunluğunda, CA1 ve CAIII genleri gibi 8. kromozom üzerinde bulunmaktadır. İlk başta eritrositlerde bulunmuştur. Daha sonra, çok farklı dokularda ekspresyonu gösterilmiştir. CAII, renal tubüllerde ve toplama kanallarında ürin asidifikasyonunda önemlidir [59]. CAII aynı zamanda mide de, gastrik hücreler tarafından H⁺ iyonu sekresyonu ve kemik resorpsiyonu için osteoklastlardan H⁺ iyonlarının tedarik edilmesine yardımcı olurlar. Ayrıca CAII pek çok biyolojik sıvının üretiminde yer alır. CAII, pankreatik kanalının epitelinde bol miktarda bulunurken kolorektal adenokarsinomlarda zayıf bir boyanma gözlenmektedir. Pankreatik kanaldan pankreatik sıvıya, karaciğer epitel hücrelerinden safraya ve aynı zamanda tükürük salgısına HCO₃⁻ salınımını sağlamaktadır. CAII aynı zamanda serebrospinal sıvının pH'ını düzenler. Distal kolonik epitelde elektrolit ve su dengesini sağlar. Öte yandan yağ asiti ve amino asit sentezine de katılırlar. CAII aynı zamanda bikarbonat/klorid taşıyıcılarının anyon değiştirici ailesinin üyeleriyle fonksiyonel ve fizyolojik olarak etkileşime girerek etki göstermektedir [60, 61].

İnsanlarda CAII eksikliği otozomal resesif bir hastalıktır. Bu sendrom, osteoporezis, renal tubuler asidozis ve serebral kalsifikasyon ile bağlantılıdır. CAII katalitik aktivite kaybı, CA2 genindeki farklı mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [31, 32, 62].

Sitoplazmada bulunan CAVII, memelilerde en fazla korunmuş olan izoenzimdir ve geni 16. kromozom üzerinde bulunmaktadır. CAVII mRNA'sı, insan

tükürük bezleri, sıçan ve farede akciğer ve beyin nöronlarında bulunduğu gösterilmiştir [9].

CAXIII, son zamanlarda karakterize edilen sitozolik bir izoenzimdir. İnsan dokularından timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste gözlenirken; fare dokularından dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testiste üretilmektedir. Diğer CA izoenzimleriyle karşılaştırıldığında oldukça geniş bir yayılım göstermektedir. Ayrıca embriyogenezde de rol oynamaktadır [63].

Tezimin amacını oluşturan, sitoplazmik bir enzim olan ve hakkında çok az bilgi bulunan CAIII ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmektedir.

1.2 Karbonik Anhidraz III (CAIII)

CAIII, CA2 gen yapısıyla oldukça benzerlik gösteren fakat bütün enzimler içinde düşük aktiviteye sahip bir izoenzimdir. CAIII geni (NM_005181) 8. Kromozomun q22 kolunda lokalize olmuş, 7 ekzona ve 6 introna sahip 10,3kb uzunluğunda bir gendir. 3' ucunun alt kısımlarında 270 bç büyüklüğünde pol(A) kuyruğu mevcuttur. 30 kDa molekül ağırlığına sahip, 259-260 amino asit rezidüsünden ibaret ve sitozolik yerleşimli monomerik bir proteindir [54].

1.2.1 CAIII hangi dokularda ifade olmaktadır?

Omurgalı iskelet kasları, özellikler tipI lifleri çok yüksek konsantrasyonlarda CAIII ihtiva ederler. Kastaki sitozolik proteinlerin yaklaşık %10 kadarı karbonik anhidrazlardır. CAIII sarkoplazmanın ana bileşenlerinden biridir ve insan uzuv kaslarında, kas dokusu 7 mg/g civarında CAIII ihtiva eder Erkeklerde iskelet kasları hem tipII (beyaz), hemde tipI (kırmızı) fiberleri bulundurur. Beyaz fiberler, glikolitik enzimlerce oldukça zengindir. Kırmızı fiberler ise myoglobin ve düşük ATPaz aktivitesi ile karakterizedir. Kaslar vücuttaki dağılım ve fiber yapılarına göre değişiklik gösterir. Bu bağlamda kaslardaki CAIII miktarı Tablo 1.3'de görüldüğü gibi belirlenmiştir [62]. Mesodermal kökenli hücrelerin kas hücrelerine farklılaşması olan miyogenez de üç faz bulunmaktadır. İlk faz, mononükleus yapısındaki

miyoblastın multinükleus yapısındaki miyotüblere dönüşümüdür. İkinci faz, kasılabilen yapının ortaya çıkması ve morfogenezis ile kas yapısının belirmesidir. Son faz ise, özgün kas fiberlerinin yetişkin kas fiberlerine farklılaşmasıdır: Tip I yavaş, oksidatif fiberler; tip 2A hızlı, glikolitik-oksidatif fiberler; tip 2B hızlı, glikolitik fiberler. Bu farklılaşmanın sağlanması tamamen hormonal ve nöronal sinyaller aracılığıyla olur [73, 74].

CAIII ayrıca kalp kası, adipoz dokuda, sindirim sistem dokuları, tükürük bezleri, prostat, süt bezleri gibi dokularda da düşük miktarda mevcuttur. CAIII'ün dokulardaki dağılımı Tablo 1.3'de gösterilmektedir [64].

Fetal ve yeni doğmuş bebeklerdeki CAIII seviyeleri incelendiği zaman ise, 10 haftalık fetal kaslarda CAIII'ün ifade olmaya başladığı ancak 15 haftalık olana kadar önemli miktarda sentezlenmediği gözlenmiştir. CAIII seviyesi 30 hafta süreyle takip edildiğinde, enzim seviyesinin hızla yükseldiği; bebek doğduğunda ise kaslardaki enzim seviyesinin yetişkinlerdeki oranın yarısına ulaştığı gözlenmiştir. Kas gelişiminde CAIII ekspresyonunun ikinci fazı, miyotom farklılaşması sırasında başlar ve bütün iskelet kaslarının gelişim süresince devam eder. Hamileliğin geç dönemlerinde, CAIII boyun ve etrafındaki yağ hücrelerinde ekspre olmaktadır. Doğum sonrasında ise iskelet kasında, yetişkin beyaz yağ dokusunda ve intervertebral diskte CAIII proteini yüksek seviyelerde bulunmaktadır [73, 74].

Görüldüğü gibi CAIII ekspresyonu embriyogenesisin erken evreleri sırasında mezodermal kökenli dokularında dikkat çekici hale gelmektedir ve bu da, CAIII'ün sahip olduğu fosfotaz aktivitesinin farklılaşma sırasında spesifik rol oynadığını ve defosforilasyon ile protein fonksiyonlarına aracı olması gibi özelliklerini akla getirmektedir [64].

Tablo 1.3: İnsan CAIII geninin dokulardaki dağılımı [73, 74].

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

1.2.2 CAIII Enziminin Yapısı ve Hücredeki Görevleri

Bu enzimin görevleriyle ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. CAIII üretimi, obez sıçanların karaciğer ve yağ dokusunda normal sıçanlara göre daha düşük aktiviteye sahiptir [65,66]. CAIII proteinin aktif bölgesinin kendine has bir yapısı vardır. Aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonuna bağlı amino asit rezidüleri lizin 64 ve arginin 64, arginin 67 ve arginin 197'dir. Ayrıca aktif bölgedeki hidrofobik kısımda fenilalanin 198 ve izolösin 207 vardır. Bu yapı farklılığından dolayı CAIII'ün aktif bölgesi diğer izoenzimlere göre daha dar bir kavite oluşturmaya meyildir. Aktif bölgenin bu özellikler CAIII'ün CO_2 hidratasyon aktivitesini ve CA inhibitörlerine ilgisini sınırlamaktadır.

CAIII, fosfotaz aktivitesine sahip tek karbonik anhidrazdır. Fosfatirozin residüsünü defosforilize eder. Ayrıca, düşük CO_2 miktarlarında hidratize yapma, sulfonamid inhibitörlerine karşı direnç gösterme özellikleriyle CA ailesinin diğer üyelerinden farklılık gösterir. CAIII diğer bir görevi de, iskelet kasında antioksidan özelliğe sahip olmasıdır. Hücreleri hidrojen peroksidin indüklediği apoptosisten

korur ve kanserin metastas yapmasıyla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir [67]. CAIII, oksidatif strese karşı hücrel cevapta rol oynar. Doku hasarı esnasında, çizgili kaslardan CAIII ve miyogloblin salınır. Miyokardiyal infeksiyonlarda miyogloblin salınımı doku hasarında önemli bir belirteçtir fakat miyokardiyal infeksiyonlara spesifik değildir. Bu belirtecin özgünlüğünü artırmak için aynı zamanda CAIII seviyesi de ölçülmektedir. Miyogloblin/CAIII oranı, miyokardiyal infeksiyon geçiren hastalarda önemlidir [68, 69].

CAIII'ün yüksek iskelet kası spesifikliği nedeniyle çeşitli nöromusküler hastalıklarda ve iskelet kası hasarına neden olan olaylarda AST (Aspartat Aminotransferaz) ve CK (Kreatin Kinaz)'dan daha spesifik bir markör olduğu, ayrıca serum CK yüksekliklerinin ayrıncı tanısında önemli bir markör olarak kullanılabileceği yapılan birçok araştırma ile ortaya konulmuştur [70].

1.2.3 CAIII ve Kanser

Son yıllarda yapılan CAIII ün kanser ile olan ilişkisi üzerinde durulmaktadır. CAIII özellikle Karaciğer karsinomda (HCC) hücre içi veya hücre dışı asidifikasyon aracılığıyla, FAK sinyal yolu üzerinden hücrelerin invazyonunu arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir ve CAIII ekspresyonunun önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin metastas ve invazyon kabiliyetlerini arttırdığı gösterilmiştir [69].

Aslında Karbonik Anhidrazların kanserle ilişkisi, sadece CAIII ile değil özellikle membran bağlı izoenzimler olan CAIX ve CAXII için de gösterilmiştir. CAIX ve CAXII nin kanserde özellikle hipoksik koşullarda ifadesinin arttığı ve ekspresyonunun kanserde kötü prognozla beraber eşlik ettiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle CAIX kanserde prognostik marker olarak kullanılabileceği ile ilgili pek çok çalışmada önerilmiştir [71, 72]. CAIII ün kanserle bağlantısı üzerine sınırlı çalışma olduğu göze çarpmaktadır.

CAIII ekspresyonu hakkında çok sınırlı bilgi bulunmasına rağmen gen transkripsiyonunun regülasyonu ile ilgili ana bilgiler bilinmektedir. CAIII 10 kb'lık genomik bölge tarafından kodlanmaktadır CAIII 1997 tarihinde klonlanmıştır. 631 bp'lık promotör yayınlanmıştır. Bu çalışmada CAIII promotörünün 631 bp'lık kısmı

genomik dizileme ile aydınlatılmış ancak CAIII transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır [69]. CAIII'ün son eksonun 3' ucu ile CAII geninin 5' ucu birbirleri üzerine denk gelmektedir. Bu iki gen arasındaki fiziksel bağlantı, birbirlerinin regülasyon seviyelerini etkilemektedirler [74].

İnsan CAIII geninin proksimal promotörü birçok özellik bakımından CAII geni ile ortak özellik göstermektedir. Her iki geninde Sp1 dizilerini içeren korunmuş üst dizi bölgeleri ve TATA kutuları %90 oranında tanımlanmıştır. Ayrıca her iki promotorda "housekeeping" genlerle ilişkili olan CpG-zengin adalar bakımından da ortaktır. Ancak ekspresyon seviyelerine bakıldığında CAII geninin CAIII'e oranla daha fazla ekspre olduğu gözlemlenmektedir [64,65].

Sıçan CAIII promotör bölgesinin kas ekspresyonunu direkt etkileyen cis-etkili dizileri içerdiği gösterilmiştir. -261 bp ile -7 bp arasındaki CAIII promotör parçası hücre transfeksiyon deneylerinde CAT haberci geninin ekspresyon seviyesini direkt etkiler [70, 71].

1.3 Sitokinler

1.3.1 Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

TNF α , bağışıklık yanıtı, enfeksiyon ajanlara direnç, tümörlere direnç, uyku düzenlenmesi ve embriyonik gelişim gibi değişik terapötik rollere sahiptir. TNF α aynı zamanda nekrotik ya da apoptotik hücre ölümünü indükler. TNF α , farklı hücrelerde çeşitli fonksiyonlara sahip pleiotropik etkili proinflamatuvar bir sitokindir [72, 73].

TNF α , Tip 1 ve Tip 2 reseptörlere (TNF-RI ve TNF-RII) bağlanmak suretiyle çeşitli sinyal yollarını aktive eder. Tip I transmembran reseptörler, ekstraselüler membranda sistenince zengin 5 tekrar, sitoplazmik kuyrukta ise ölüm domaini (DD) içerirler. TNF-RI ölüm domaini içerirken, TNF-RII böyle bir domain içermez. TNF-RII, özellikle hayatta kalma sinyallerini aktifleştirirken TNF-RI hem ölüm hem de hayatta kalma sinyallerini aktifleştirir [75]. TNF α ile indüklenmiş sinyal iletimi Şekil 1.3'de gösterilmiştir

1.3.2 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)

TGF- β , hücre proliferasyonu, hücre dışı matriks (ECM) sentezi, anjiyogenez, immun yanıt, apoptozis ve farklılaşma gibi pekçok biyolojik olayın regülasyonunda rol oynar. Farklı biyolojik görevleri nedeniyle, TGF- β ailesinin kanser patogenezi, otoimmün hastalık, doku fibrozisi, diyabet ve diğer hastalıklarda katkıda bulunduğu gösterilmiştir [81]. TGF- β ailesi homolog dimerik protein ailesi olup, bu aile içinde TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 olarak üç memeli izoformu vardır. TGF β izoformlarının bağlandığı çeşitli hücre yüzey reseptörleri (tip1, 2, 3, 4, 5, 6) vardır. T β R-I ve T β R-II Ser/Thr-spesifik protein kinazlar, TGF β ile indüklenmiş hücresel cevaptan sorumludurlar [82].

TGF β , tümör oluşumu sürecinde çift etkili rol oynar. Tümorigenezin ilk safhalarında bir tümör baskılayıcı gibi davranırken; ileri safhalarında tümör aktivatörü gibi davranır [83]. TGF- β epitel hücreleri için kuvvetli bir büyüme inhibitörüdür. Karsinoma hücrelerinin çoğunluğunda, TGF- β 'nın T β R-I /T β R-II sinyal yolağını indüklemesiyle meydana gelen transkripsiyonel aktivasyon sağlanır. Bu durumda TGF- β 'nın aşırı salgılanması, karsinoma hücrelerinin daha metastatik hale gelmesine sebep olur. Epitel ve endotel hücreleri TGF- β ile muamele edildiğinde; TGF- β 'nın hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak büyüme inhibisyonuna sebep olur [76, 84].

Bu reseptörlere bağlanmayla aktive olan T β R-I, Smad 2 ve Smad 3 moleküllerini fosforiller. Smad 2/ Smad 3/ Smad 4 oligomerleri nükleusa geçerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenlerler. Diğer bir fonksiyonu ise; hücreSEL büyümeYİ düzenlemesidir. Epitel hücreleri, endotel hücreleri, embriyonik fibroblastlar ve hematopoietik hücreleri de içeren çoğu hücre çeşitinde büyümeYİ inhibe ederken bazı mezenşimal hücrelerde büyümeYİ düzenler. TGF β , T β R-I /T β R-II/ Smad 2/3/4 kaskadını indükleyerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu model, Şekil 1.4'de gösterilmiştir [76].

gerçekleşir. Sitozolik IL-1 α hücre farklılaşması, büyümenin kontrolü ve bir dizi genin ekspresyonunu kontrol eder [80].

1.3.4 İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6 hücre büyümesi, genlerin aktivasyonu, proliferasyonu ve farklılaşma süreçlerini regüle ederek geniş bir spektrumdaki hücrel ve fizyolojik cevaplara, örneğin immun cevap, inflamasyon, hematopoez ve onkogeneze önemli roller üstlenmiştir. T-hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanarak inflamasyona cevapta önemli rol oynar. Özellikle kaslarda ve yağ dokularında enerji metabolizmasında görev alarak vücut sıcaklığının düşmesini sağlar [87].

Birçok hücre yüzeyinde bulunan IL-6 reseptörleri iki alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 1.6). Özellikle hücre hatları ile yapılan çalışmalarda hepatoma ve kemik iliğihücre hatlarında da IL-6 reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir. IL-6 reseptörünün α alt ünitesi ligand spesifikliğini sağlarken, diğer alt ünite GP 130 (Glikoprotein) ise IL-6 ailesindeki tüm reseptörler ile ortak özellik taşır. IL-6'in reseptörüne bağlanması ile JAK Kinazların (Janus Kinazlar) ve Ras-aracılı yolların aktivasyonu sağlanır. Aktive olmuş JAK Kinazlar, STAT3 (Signal Transducers and Transcription Activator) ve SHP2 [SH2 (Src Homologu-2) Domain-içeren Tirozin Fosfat] transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek aktive ederler. Fosforillenen STAT3 dimer oluşturarak çekirdeğe gider ve STAT3 bağlanma dizisi içeren genlerin regülasyonunu sağlar. Ras-aracılı yolda ise aktive olan JAK Kinazlar SH2'yi fosforilleyerek, GRB2, SHC ve Ras aracılığıyla sinyalin MAPKinaz yolağına ulaşmasını sağlar ve Elk1 ve NF-IL-6 (C/EBP- β) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır (Şekil 1.5) [88-90].

1.3.5 İnterferon Gamma (IFN- γ)

İnterferon-gamma (IFN- γ) interferonların tip II sınıfının tek üyesi olan bir dimerize olan çözümlü bir sitokindir. Tip II sınıfı IFN- γ 'nın da içinde bulunduğu ve ilk olarak makrofaj-aktive edici faktör olarak adlandırılan büyük bir protein ailesidir [91].

IFN- γ , viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı doğal ve adaptif bağışıklık için ve tümör kontrolü sağlayan önemli bir sitokindir. IFN- γ 'nın bağışıklık sistemindeki önemi; doğrudan viral replikasyonu inhibe eder ve antijenlerin immünomodülatör etkilerini ortadan kaldırır. IFN- γ , doğal öldürücü (NK) ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtının bir parçası olarak doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, CD4 ve CD8 sitotoksik T lenfosit (CTL) efektör T hücreleri tarafından üretilir [91].

Hücrel yanıtı IFN- γ İnterferon gama reseptör 1 (IFNGR1) ve interferon gamma reseptör 2 (IFNGR2) oluşan bir heterodimerik reseptörü ile etkileşim yoluyla aktif hale getirilir. IFN- γ reseptöre bağlandığı zaman JAK-STAT yolu aktive olur. IFN- γ da hücre yüzeyinde bulunan glikozaminoglikan heparan sülfata bağlanır (Şekil 1.6) [91]

IFN- γ , interferon- α ve interferon- β aksine tüm hücreleri tarafından ifade edilebilir ve Th1 hücreleri, Tc hücreleri ve NK hücreleri tarafından salgılanır. IFN-gama'nın antiviral, immun düzenleyici ve anti-tümör özellikleri vardır. [91]

CAIII'ün kanserle olan ilişkisi çok net aydınlatılmamıştır. Literatür taraması yapıldığında bu konuyla ilgili çok sınırlı bilgi bulunmaktadır. Yine CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Bu çalışmanın amacı:

- (i) CAIII promotorunun klonlanması ve biyoinformatik analizi
- (ii) Transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için bir haberci sistem olan lusiferaz plazmidine klonlanması ve potansiyel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin analizi.
- (iii) Farklı kanser ve hücre modellerinde RT-PZR ile CAIII mRNA ifadesinin belirlenmesi
- (iv) İfadesi belirlenen seçilen bir hücre hattında bazı sitokinlerin, TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-6, IFN- γ CAIII mRNA ve protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesi.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Moleküler biyoloji materyalleri, klonlamada kullanılan vektörler ve RT-PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Promega, New England Biolabs ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Üretici
Proteinaz K	Boehringer Mannheim
Amonyum asetat	Merck
Tris Base	Sigma
NaCl	Sigma
EDTA	Riedel
Boric Asit	Merck
Beta-mercaptoethanol	Sigma
MgCl ₂	Merck
LB Borth	Sigma
LB Agar	Sigma
Ampicilin	Sigma
Gliserol	Merck
DMSO	Merck

Tablo 2.1'in devamı

Hepes	Sigma
DMEM	Sigma
FCS	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
L-Glutamine	Sigma
PBS	Sigma
Agaroz	Prona
Monoklonal Antikor (CAIII spesifik)	Sigma
β -Actin Antikor (sc-47778)	Santa Cruz
Goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)	Santa Cruz

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar

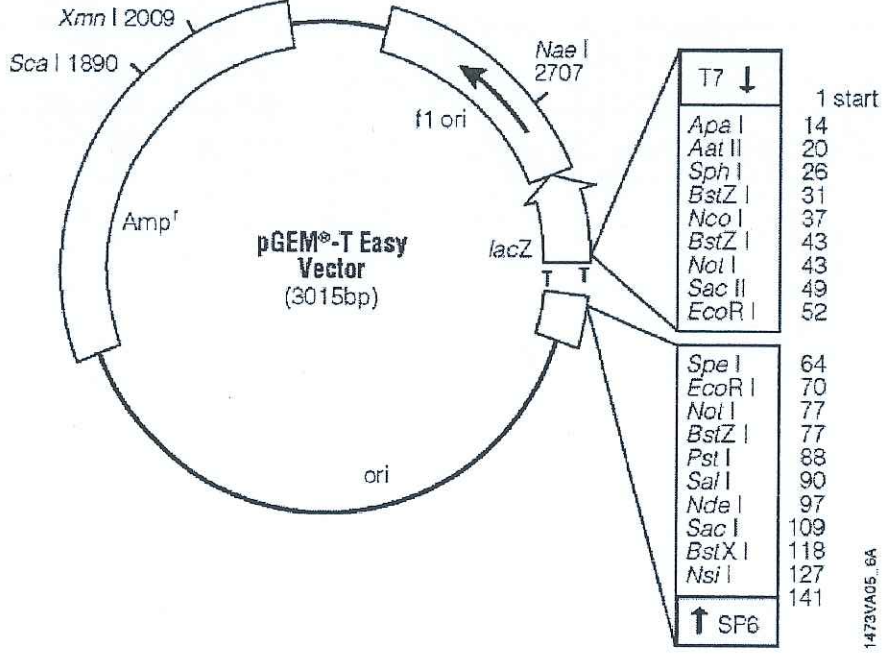
Kullanılan gereçler	Model
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair, ABD
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buz Dolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD

Tablo 2.2'nin devamı

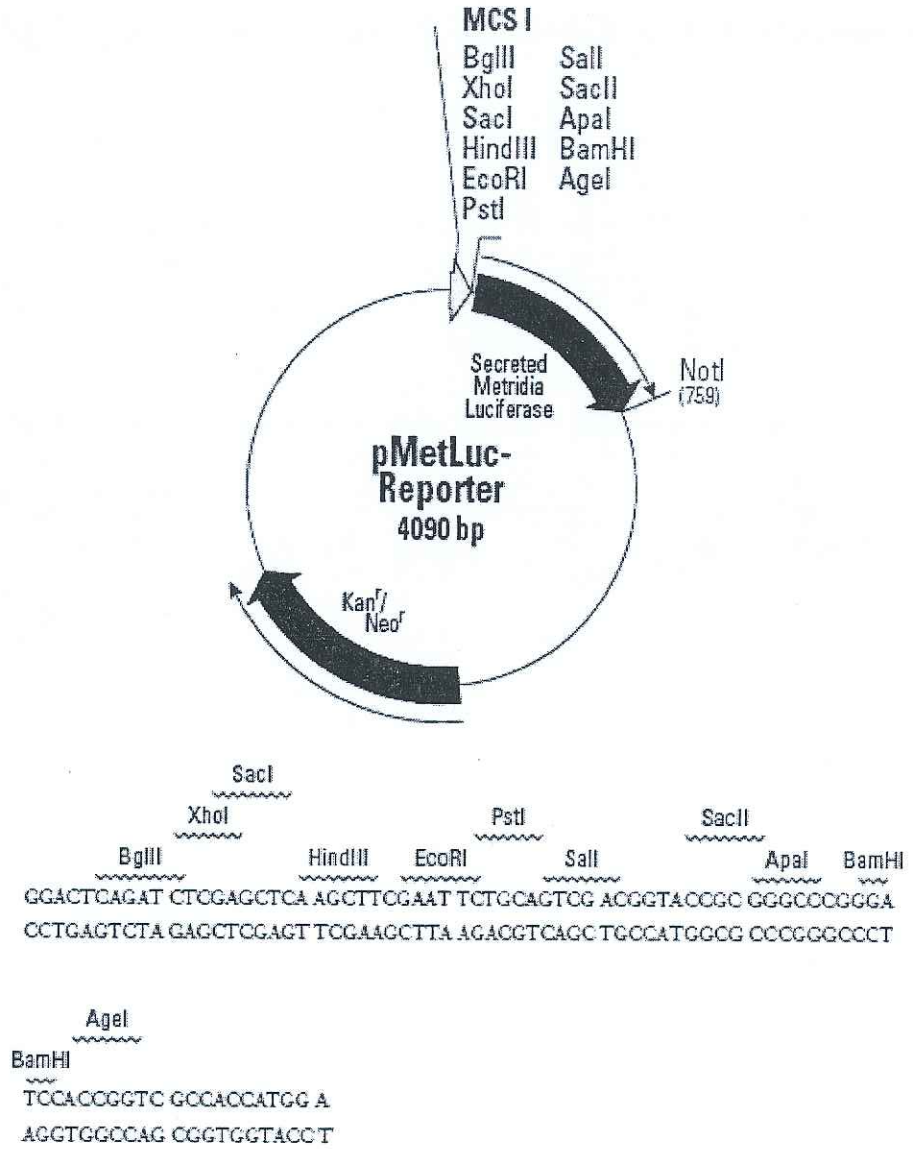
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
pH Metre	WTW, Almanya
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa.)
Santrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Gel görüntüleme	UVP, İngiltere
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
Mikro santrifüj	Thermo, ABD

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler

Çalışmada pGEM-T Easy (Promega) ve pMeT-Luc (Clontech) olmak üzere iki farklı vektör kullanılmıştır ve Plazmit haritaları sırasıyla, Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: pGEM-T Easy plazmitin haritası



Şekil 2.2: pMetLuc-Reporter plazmitin haritası

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli* XL1-blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)) ve *E.coli* DH5α (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) bakteri soyları kullanıldı.

2.1.4 Bakteriyel Kùltür Ortamı

E.coli için gerekli kùltür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanıldı. Toz halinde satın alınan bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde ddH₂O ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

2.1.5 Antibiyotikler

Ampicillin 100 mg/ml stok solusyon şeklinde hazırlandı, 0,22 µm filtre ile steril edilerek -20°C'de saklandı.

2.2 Metotlar

2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, epindorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kùltür ortamları 121°C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku Kùltürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon içeren sıvılarla temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 DNA İzolasyonu ve Klonlama

2.2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için, 400 µl EDTA'lı tüpten alınan kan 1,5 ml eppendorf tüpüne alınarak üzerine 1ml distile su ilave edildi ve 5 dakika süresince çalkalandı. 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım atıldı, üzerine yine 1 ml distile su katılarak çalkalandı ve 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj yapıldı. Üst kısım atıldıktan sonra çökelti üzerine 250 µl nüklei lizis tamponu, 20 µl %10'luk SDS ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek alt üst edilerek çalkalandı. Daha sonra 72°C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi, süre sonunda 175 µl doymuş amonyum asetat eklenerek çalkalandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj sonunda üst kısım temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 2 katı oranında absolu etanol eklendi. Eppendorf alt üst edilerek DNA'nın belirmesi gözlemlendi ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çökmesi sağlandı. Üst kısım uzaklaştırıldı ve çökelti üzerine 250 µl %75 etanol ilave edilerek tekrar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üst kısım atılarak DNA havada kurutuldu. Son olarak 250 µl distile suda DNA çözülerek -20 dondurucuda saklandı.

2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR reaksiyonları 50µl 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 (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 6 mM) ise her bir PZR reaksiyonu için optimize edildi. PCR 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 görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

2.2.2.3 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve www.idtdna.com adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Bunun için OligoAnalyzer 3.1 kullanıldı. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB DNA dizileri) bulunan DNA dizileri

ile blast yapılarak insan CAIII geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

2.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektrofrez

DNA elektrofrez için yatay jeller kullanıldı ve 90 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektrofrez tamponu olarak 0,5XTBE tercih edildi. Agaroz jele son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid ilave edildi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanıldı. Çalışmada genellikle %0,7-1 arasındaki konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektrofrezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için farklı büyüklüklerde DNA belirleyiciler kullanıldı. Elektrofrez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

2.2.2.5 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanları alındı.

2.2.2.6 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PZR ürünleri pGEM-T easy vektörüne protokolda belirtildiği şekliyle T:A klonlaması yapıldı (Promega). Buna göre 20 µl toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGEM-T vektör (50 ng), 15 µl insert DNA (jelden

kazanılan PZR ürünü), 2 µl 10 x T4 ligaz tamponu (Promega) ve 1 µl T4 DNA ligaz (Promega) +4 °C'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli* XL-1 blue kompetent hücrelerine transforme edildi. pGEMT easy'e yapılan klonlamalarda rekombinantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için ampisillin içeren LB agar besiyerlerine 100 µl IPTG (100 mM stok) ve 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı. pMet luc vektör için yapılan klonlamalarda, olası rekombinantların seçimi bireysel olarak kolonilerin restriksiyon enzim metodu ile tarandı.

2.2.2.7 Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

Küçük miktarlarda DNA izolasyonu için Miniprep DNA isolation kit (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapılır ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Kültür 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılır ve bakteri pelletine protokole uygun şekilde yapılan işlemlerden sonra DNA elüe edilir.

2.2.2.8 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak 50 µl toplam hacimde 37°C'de en az 2 saat inkübe edilerek kesim yapıldı. İki farklı enzimle aynı anda kesim yapıldığı durumlarda da iki enzimle aynı anda kesim yapılmasını sağlayan tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek değerlendirildi.

2.2.2.9 Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent hücre hazırlanması için 50mM kalsiyum klorür kullanıldı. Öncelikle 10ml LB besiyeri içine tek koloni *E.coli* XL1 blue yada DH5a ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra gecelik kültürden 100ml LB içine 100µl inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 5000 rpm'de 5dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. 50ml 50mM soğuk kalsiyum klorür ile pellet yeniden çözüldü ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant

uzaklaştırıldı. Pellet 10ml soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek 10ml %40'lık gliserol ilave edilerek ependorflara paylaştırıldı. -80 buzdolabında saklandı.

2.2.2.10 Transformasyon

Transformasyon için, 200 µl kompetent hücreye 5 µl (1-50ng arası) plazmit ilave edilerek buz üzerinde 40 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C'de 90saniye ısı şoku uygulandı. Hacim 800 µl LB ilave edilerek 1 ml'ye tamamlandı ve 37°C'de çalkalamalı etüvde bir saat inkübe edildi. Süre sonunda kültürden 200 µl, uygun antibiyotigi içeren LB agar besiyerine yayıldı ve bir gece inkübe edildi.

2.2.3 Hücre Kültürü Teknikleri

2.2.3.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine, L-Glutamine son konsantrasyonu 0,2 mM ve FCS son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.3.2 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) -20°C'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce 56°C 60 dakika ısı ile inaktive edildi ve tekrar -20°C de saklandı.

2.2.3.3 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml ddH₂O ile hazırlandı ve otoklavda steril edildi. 2-8°C'da saklandı.

2.2.3.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Bu çalışmada kullanılan İnsan kemik karsinom hücre hatları (MG63 ve Saos-2) Cardiff Üniversitesi'nden Dr. Kennent'den sağlanmıştır. İnsan karaciğer

karsinomu (Hep3B) hücre hattı Cardiff Üniversitesinden temin edildi. İnsan prostat karsinomu hücreleri, DU145 ve PC3, İnsan meme karsinomu MCF7 Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz tarafından gönderildi. İnsan kolon karsinoma (HT-29) hücre serisi Ankara Şap Enstitüsü'nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlandı.

Kullanılan bütün hücre hatları (HT-29, DU145, PC3, MCF7, Hep3B, HUVEC, MG63 ve Saos-2) 15 ml medyumda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0,2mM L-Glutamine ve %10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

2.2.3.5 Hücre Soyunun Başlatılması

-80°C buz dolabında saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80°C'den çıkarılan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler %10'luk FCS içeren medyuma alındı, alt üst edildi ve 1000 rpm'de 5dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

2.2.3.6 Hücrelerin Büyütülmesi

Kullanılan bütün hücre hatları (HT-29, DU145, PC3, MCF7, Hep3B, HUVEC, MG63 ve Saos2) 15ml medyumda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0,2mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

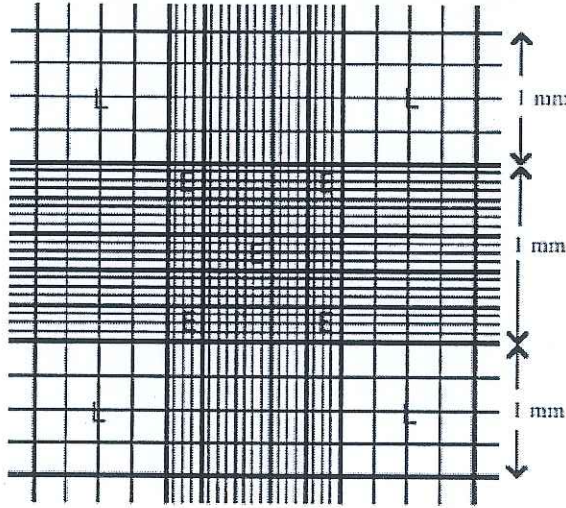
2.2.3.7 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 75cm² flasklar için 1,5 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü.

Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlenildi ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

2.2.3.8 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm² alan, 0.1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı (Şekil 2.3). Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilusyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmadı ve sayım yapıldı.



Şekil 2. 3: Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

2.2.3.9 Hücrelerin -80°C'de Saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm² flasklar için 1 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 soğuğa dayanıklı cryovial tüplerine konularak, etiketlendi ve -80°C derin dondurucuya konuldu.

2.2.3.10 HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması

HT-29 monolayer hücre kültürü 75 cm² kültür kabının yüzeyini %90-95 oranında kapladıktan sonra tripsinizasyon ile hücreler yüzeyden ayrıldı ve serumsuz olarak hazırlanan ve içinde %0,1 BSA (sığır serum albümin) bulunan DMEM ile homojenize edildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 2.000.000 hücre /cm²'de olacak şekilde 25 cm² lik kültür kaplarına alındı. Üzerlerine %0,1 BSA içeren ve FCS bulunmayan DMEM eklenerek son hacim 7,5 ml'ye tamamlandı. Uygulanacak sitokinler (TGFβ, TNFα, IL-1α, IL6, IFN-γ) 500 U/ml son konsantrasyon olacak şekilde kültür kaplarına uygulandı. 24, 48, 72 saat sürelerle 37°C, %5 CO₂ inkübatör de inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi için sitokin uygulanmamış kontrol grubu oluşturuldu. Her bir hücre kültür kabından hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden ayrıldı ve DMEM ile homojenize edildikten sonra hücre sayımları yapıldı.

2.2.4 Gerçek Zamanlı PZR Çalışmaları

2.2.4.1 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyonları QiaAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) hücre kültüründen total RNA izolasyonu yöntemine göre yapıldı. Yaklaşık olarak 3-3,5x10 hücre bulunan süspansiyon 800 rpm'de 5 dak. Santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pelet β-merkaptoetanol içeren 350 µl RLT tampon içinde pipet yardımıyla çözüldü. Lizat QIAshredder spin kolona uygulandı ve 14000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon atıldı ve homojenize lizat eşit

hacimde % 70'lik etanol içerisinde pipetlenerek karıştırıldı. QIAamp spin kolona uygulanır 15 san. 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 700 µl RW1 tampon kolona uygulandı. 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı üzerine 500 µl RPE tampon ilave edildi ve 15 saniye 10000 rpm'de kolon yıkandı. Kolona 500 µl RPE tampon ilave edildi 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon 1 dakika daha santrifüj yapılarak etanol tamamen uzaklaştırıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı 50 µl RNase-free water ile 1 dakika 10000 rpm'de elüsyon yapıldı. Elde edilen RNA elüsyonu, 65°C' de 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 10 dak. buzda bekletildi. Spektrofotometrik olarak konsantrasyon belirlenerek. Uzun süreli saklama amaçlı -80°C'de saklanmıştır.

2.2.4.2 RNA Ürününün Spektrofotometrik Ölçümü

RNA izolasyonu sonunda elde edilen elüsyonların 260 nm ve 280 nm'de absorbansları ölçüldü. A_{260}/A_{280} saflık oranları hesaplandı. RNA konsantrasyonu aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$C=A_{260} \times 40 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

2.2.4.3 Formaldehit (FA) Jel Elektroforezi

Elektroforez tankı %0,5'lik SDS ile yıkandı daha sonra RNAsız su ile yıkandı. Etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

2.2.4.3.1 %1,2 FA Jel Hazırlanması

1,2g agaroz ve 10ml 10x FA jel tampon RNaz'sız su ile 100ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında ısıtılarak agaroz eritildi. Su banyosunda soğutulduktan sonra 1,8 ml %37 formaldehit ve 1 µl etidyum bromid eklendi, karıştırıldı ve tanka döküldü.

2.2.4.4 RNA Örneklerinin Hazırlanması

1 hacim RNA yükleme tamponu 4 hacim RNA örneği ile karıştırıldı ve 5 dakika 65°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra buz üzerine alındı.

2.2.4.5 Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Hücre kültüründen elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için Fermentas Revers Transkripsiyon kit kullanıldı. RNA örnekleri buz içerisinde çözüldü ve her RNA kalıbından 1 µg olacak şekilde hesaplanarak ependorf tüpü içersine konulur. cDNA eldesinin ilk basamağı olan bu basamakta kullanılan ürünler ve PZR programı Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde birinci Kullanılan Bileşenler ve Programı

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

Bu basamak tamamlandıktan sonra, ikinci basamağa geçilir ve ardından cDNA sentezi tamamlanmış olur. İkinci basamakta kullanılan ürün ve ürün miktarları Tablo 2.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.4: Komplementer DNA (cDNA) Eldesinde ikinci basamakta kullanılan bileşenler

Bileşenler	Kullanılacak Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
Ribonükleaz İnhibitörü (20 u/µl)	1 µl
10mM dNTP karışımı	2 µl

RT Enzimi	1 µl
Son Hacim	20 µl
42°C 60 dakika	
72°C'de 10 dakika	

2.2.4.6 Semi Kantitatif RT- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İnsan karbonik anhidraz 3 için PZR koşulları, 1 döngü 96°C de 5dakika; 37 döngü 94°C de 60 saniye, 55°C de 45 saniye, 72°C de 60 saniye; ve en son uzatma döngüsü 72°C de 10 dakika olarak belirlendi. β-2-mikroglobilin için bağlanma sıcaklığı 60°C ve döngü sayısı 19 olacak şekilde değiştirildi. Bu koşullar PZR ürünü ve RNA kalıbı (cDNA) arasındaki direkt korelasyonu gösterecek şekilde optimize edildi. PZR sonuçları % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, Gel Doc documentation sistem ile fotoğraflandırıldı ve programı ile densitometrik analizleri yapıldı.

2.2.4.7 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile CAIII Gen İfadesinin İncelenmesi

SYBR Green kullanılarak PZR sırasında, ürünün saptanması logaritmik siklus döneminde miktar analizi yapılmasına olanak sağlar. mRNA ekspresyonu real-time RT-PZR tekniği aracılığıyla çalışıldı. cDNA, polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. Buna ilaveten normalizasyon için referans gen olarak İnsan β-2-mikroglobilin geni kullanıldı. Her kuyu için kullanılan ürünler ve miktarları Tablo 2.5'de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.5: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR bileşenleri

Bileşenler	Kullanılacak Miktar
Reverse Primer	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl

cDNA Kalıbı	1 µl
Master Mix	5 µl
dH2O	3 µl
Son Hacim	10 µl

96 kuyulu plaka her deney düzeneği 3 tekrarlı olarak çalışılabilecek şekilde dizayn edildi ve her kuyuya çizelgede verilen bileşenler koyuldu. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek plaka, filmle kaplanır ve 3000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılan palaka cihazın plaka konulacak gözüne yerleştirilir. Primerlerin sıcaklık değerleri (T_m) dikkate alınarak annealing sıcaklığı ve süresi belirlenir ve PZR programı oluşturulur. Deneyletimde kullandığım program Tablo 2.6.’de belirtilmiştir.

Tablo 2.6: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR programı

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	15 dakika
2	50	95°C	10 saniye
		55°C	10 saniye
		72°C	12 saniye
3	1	72°C	10 dakika

2.2.5 Western Blot Analizi

2.2.5.1 Western Blot Solüsyonlarının Hazırlanması

Tablo 2.7: Western Blot Solüsyonları ve içerikleri:

SOLUSYON	İÇERİĞİ
Laemli Buffer	0.125 M Tris-HCl(pH:6.8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β -2-Mercaptoetanol
Bromofenol mavi Solusyonu	%0.05 (w/v) bromophenol blue distile su içinde
SDS PAGE Alt Jel	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Üst Jel	1 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE(Yürütme Tampon Çözeltisi)	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol

2.2.5.2 Laemli Buffer Kullanılarak Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

Western blot çalışmaları için 6-kuyulu plaka kullanıldı ve her kuyuya 500.000 hücre olacak şekilde 24 saat öncesinde HT-29 hücrelerinin ekimi yapıldı. Deney gruplarının çalışma zamanları belirlenerek 24, 48 ve 72 saat dilimlerine ait hücreler istenilen zaman aralığına geldiğinde hücrelerinin medyumunu uzaklaştırılarak hücreler bir kez soğuk PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra taze hazırlanmış Laemli tamponundan 75 μ l direkt hücrelerin üzerine eklendi ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kazınarak ependorf tüpüne alındı. Protein ekstraktları 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bu basamakta ya direkt SDS PAGE uygulaması için kullanıldı yada daha sonra kullanılmak üzere -80 de saklandı.

2.2.5.3 SDS PAGE

Tablo 2.8: SDS PAGE Jelinin hazırlanması

JEL İÇERİĞİ	%10 AYIRMA JELİ	%5 YIĞMA JELİ
Üst Buffer	-	2.5 ml
Alt Buffer	2.5 ml	-

Akrilamid:Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH ₂ O	5 ml	6.25 ml
%10 (w/v)APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanarak, üst kısımda 3cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellendi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH₂O ile yüzey yıkandı ve kurutma kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından Yığma jeli döküldü ve tarak yerleştirildi. Yığma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş kurutma kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

Örneklerin Yüklenmesi, protein ekstraksiyonu Laemli tampon ile yapıldığı için örnekler yalnız bromofenol mavi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 10 µl Rainbow Marker yüklendi.

Jel 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 200 volt ve 126 mA akımda yaklaşık 45-50 dakika yürütüldü.

2.2.5.4 SDS jelinin Blotlanması

Proteinlerin elektroforetik transferi için, sistemi kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF (Immobilon-FL 0,45µm) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller cam levhalar arasından çıkarıldı, yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer buffer içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kurutma kağıtları ve PVDF membranlar (15 saniye metanolde aktive edilmiş) jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer buffer içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlamaya başlandı. Bunun için

transfer kasedi arasına sünger, kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma 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 15 volt akımda 12-18 saatte yapıldı.

2.2.5.5 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama membran yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Sonra membran primer antikor ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.

2.2.5.6 Sonuçların Filme Aktarılması

Membranlar 1-4 dakika arasında substratla muamele edildi. ECL sistemi (Pierce ECL Western Blotting Substrate-Thermo) kullanıldı ve Reagent A ve Reagent B solusyonlarından ayrı ayrı 1,5ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek filme membran bastırıldı; sırasıyla membran film üzerinde 10sn, 15sn, 30sn ve 60sn aralıklarla bastırıldı. Film, film makinesine verilerek sonuçlar görünür hale getirildi.

2.2.5.7 İstatistiksel Analiz:

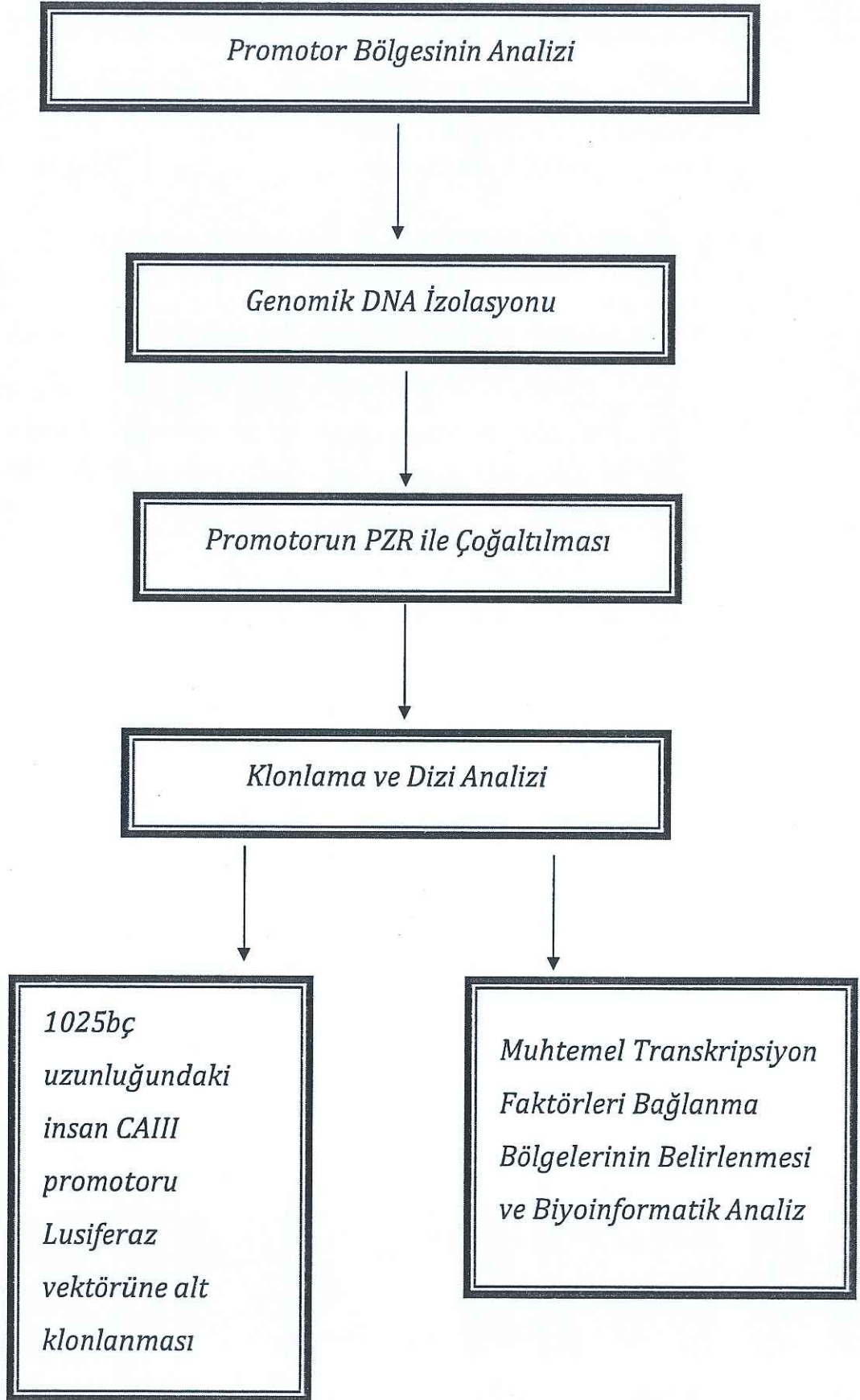
Real time PZR çalışmalarındaki kontrol ve deneysel gruplara ait cT değerleri ortalamaları ve standart sapmaları Minitab version 14 programı kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney grupları arasındaki istatistiksel analiz One way ANOVA testi kullanılarak hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1 Çalışma Planı:

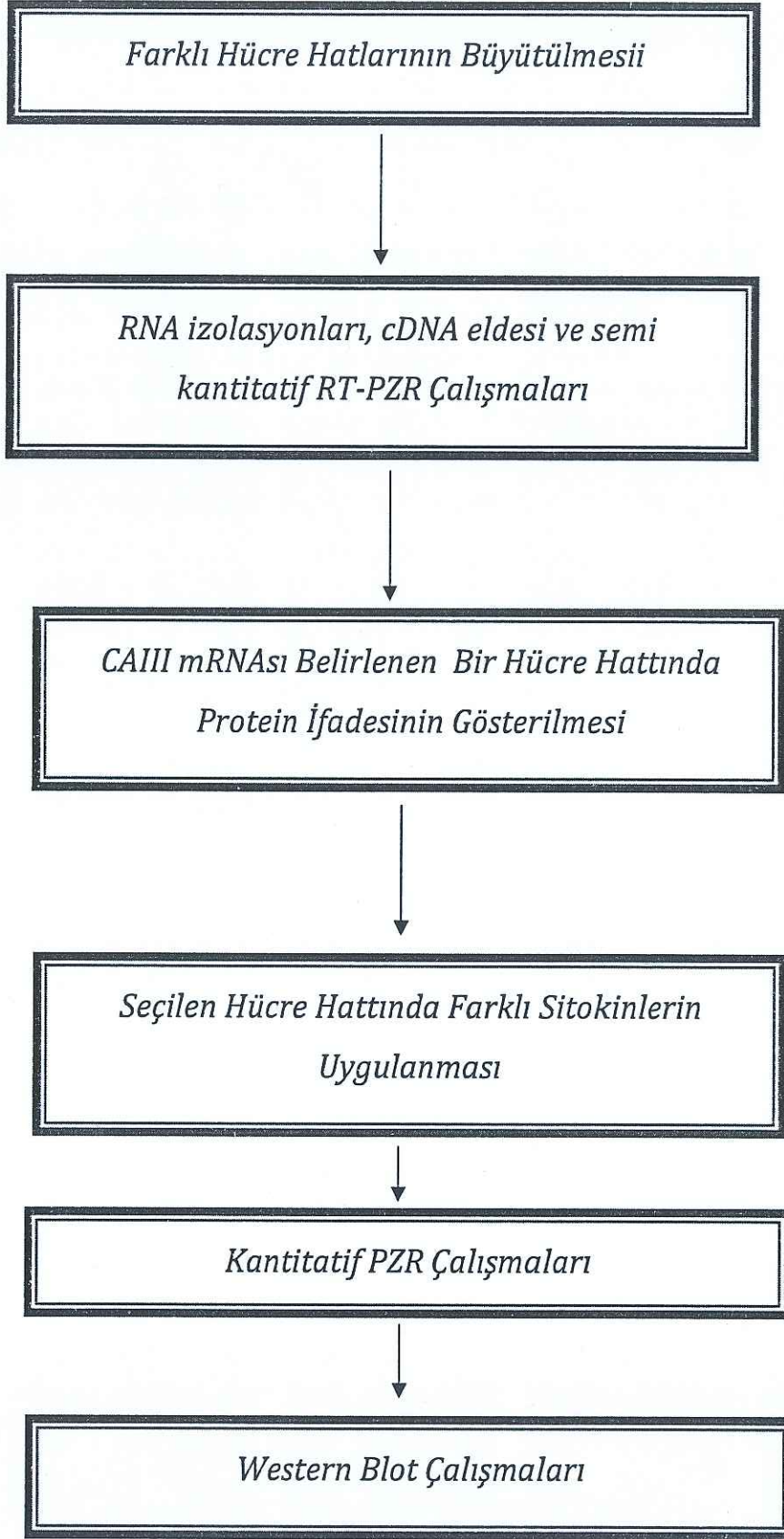
İnsan CAIII geninin regülasyonunun aydınlatılması amacıyla, çalışma iki basamak halinde yürütülmüştür.

- i. **CAIII promotor bölgesinin klonlanması ve analizi:** İlk olarak CAIII transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması ile ilgili olarak, insan CAIII promotor bölgesi klonlamak amacıyla kandan genomik DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra sırasıyla genin promotorunun çoğaltılması ve pGEMT-easy içerisine klonlanması ve dizi analizi çalışmaları gerçekleştirildi. -936/+86 arasındaki 1025bç lik CAIII promotoru pMmet-luc lusiferaz haberci vektörü içine alt klonlama yapılmıştır. Bu bölge için biyoinformatik çalışmaları ile promotordaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: İnsan CAIII promotorunun klonlanması ve analizinin akış diyagramı

- ii. **CAIII Geninin Ekspresyon Profilini Belirlenmesi:** Bu konudaki çalışmalar iki gruba ayrılmıştır. İlk grupta öncelikle farklı doku modellerine ait hücreler büyütüldü ve total RNA izolasyonu yapıldı. Semikantitatif RT-PZR ile bu hücre hatlarında CAIII ifade olup olmadığı gösterildi. İkinci grupta CAIII sitokinler tarafından regülasyonu konusunda çalışmalar için, mRNA düzeyinde varlığı gösterilen bir hücre hattında (HT-29 hücreleri) protein seviyesinde de var olup olmadığının anlaşılması için western blot çalışması yapıldı. Hem mRNA ve hemde protein düzeyinde varlığı gösterilen seçilen model hücrede, sitokin çalışmalarına başlanmıştır. Bunun için farklı sitokinler seçilerek zamana bağlı etkilerinin belirlenmesi amacıyla kantitatif PZR çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca etkisi görülen sitokinlerin etkilerinin protein düzeyinde sürüp sürmediğini anlaşılması için de western blot analizi ile doğrulanmıştır. Bununla ilgili akış diyagramda Şekil 3.2'den takip edilebilir.

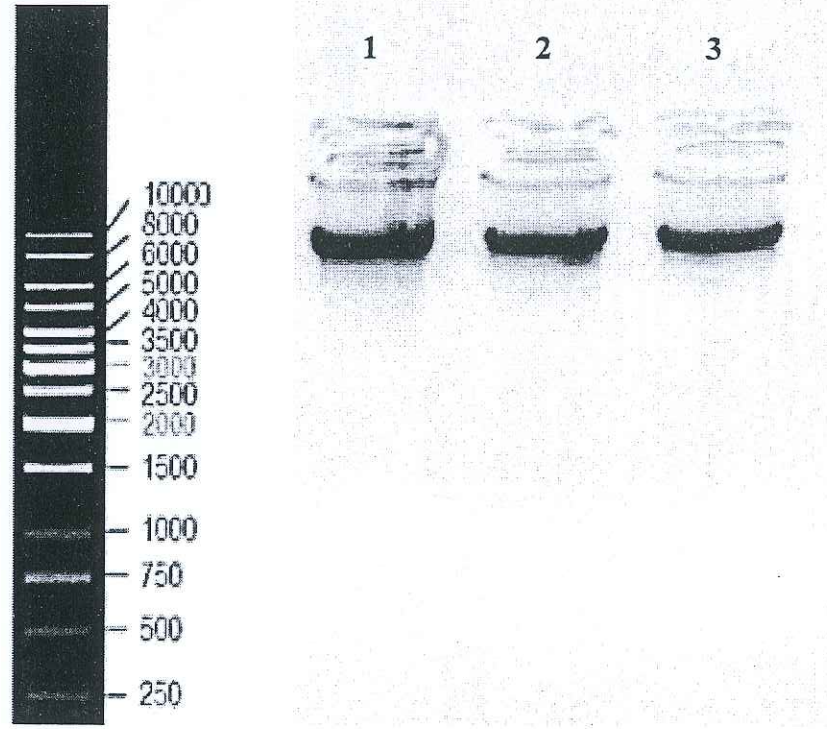


Şekil 3. 2: CAIII Geninin Ekspresyon profili çalışması ve analizinin akış diyagramı

3.2 CAIII'ün Promotor Bölgesinin Klonlanması ve Analizi

3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

İnsan CAIII promotorunun klonlanması amacıyla öncelikle Bölüm 2.2.2.1'de belirtildiği şekilde kandan genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA % 0,8 lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.



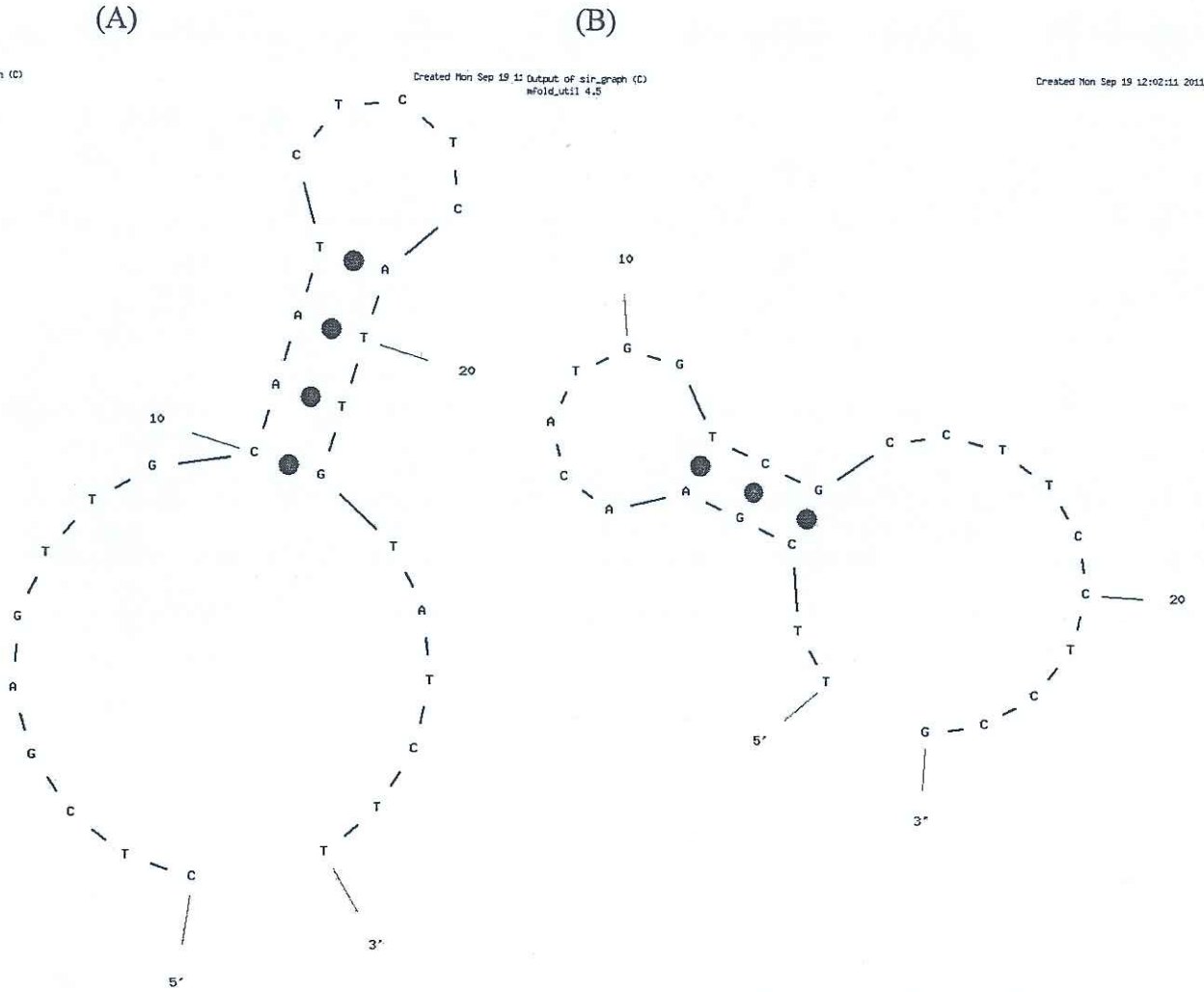
Şekil 3. 3: Genomik DNA jel görüntüsü M: 1 kb Marker; 1: 1 no'lu örnek; 2: 2 no'lu örnek 3: 3 no'lu örnek

3.2.2 Primer Tasarımı

CAIII geni genomik klon ilk olarak 1997 yılında izole edilmiş fakat bu genomik klonda 631 bp'lık dizi analiz tabi tutulmuştur. Bu yüzden insan genom projesiyle gen banka verilen diziler için NC 000008 gen bankası nolu diziler içinde 1025 bç'lik bölge seçildi. Primer tasarımı Bölüm 2.2.2.3'de belirtildiği şekilde yapıldı. Öncelikle insan CAIII promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapılarak, promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor diziyi kesmeyen enzimlerin pMeT-Luc vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi ve XhoI ve HindIII enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde olduğu görüldü. Sonuç olarak XhoI ve HindIII enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Promotor dizinin doğru yönde klonlanabilmesi için, XhoI kesim bölgesi forward primerde, HindIII kesim bölgesi ise reverse primerde kullanıldı (Tablo 3.1). Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotidlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Bunun için OligoAnalyzer 3.1 Programı kullanıldı (Şekil 3.4).

Tablo 3.1: Dizayn edilen spesifik primerin dizisi, Tm değeri, ve uzunlukları

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (oC)	Dizisi
CAIII Forward	28	78	CTCGAGTTGCAATCTCTCATTGTATCTT
CAIII Reverse	24	70	TTCGAACATGGTCGCCTTCCTCCG



Şekil 3.4: CAIII Primerlerinin saç tokası oluşturma potansiyelleri (A) Forward Primer (B) Reverse Primer

3.2.3 CAIII promotorunun genomik DNA dan Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) ile amplifikasyonu

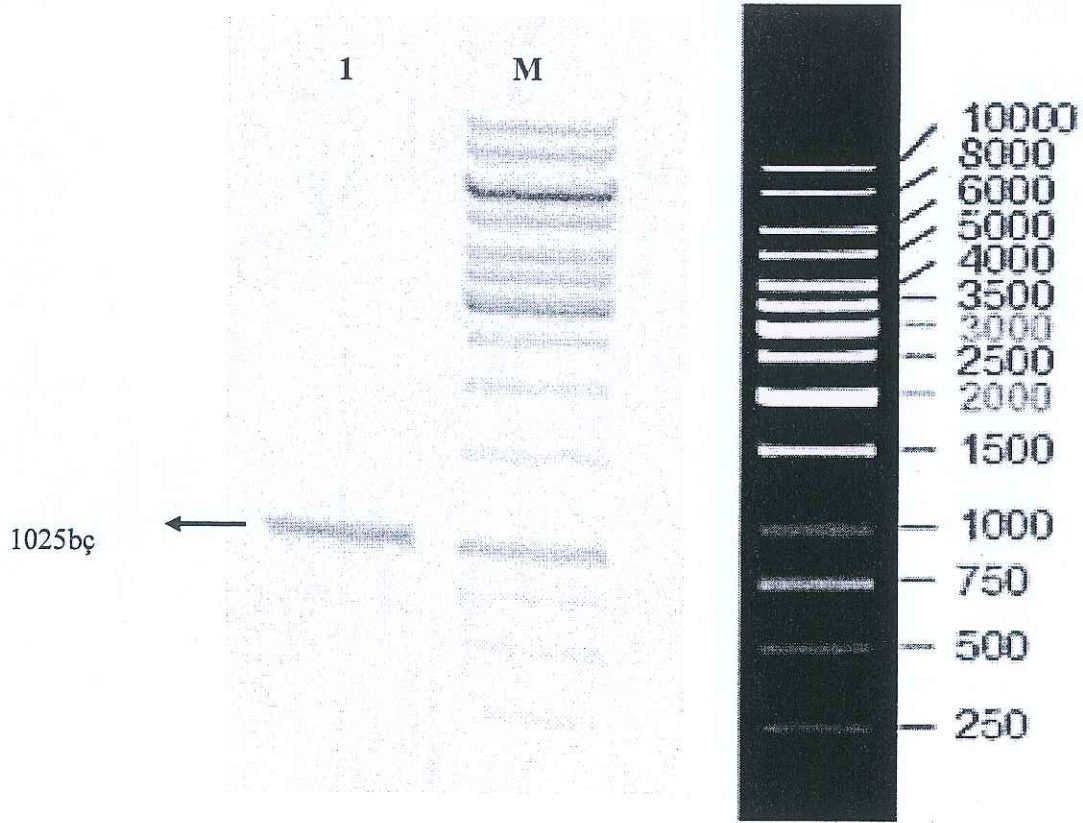
PZR reaksiyonları Bölüm 2.2.2.2. de belirtildiği şekilde 50µl hacimde yapıldı. Buna göre CAIII promotorunun çoğaltılması için en uygun şartların saptanabilmesi amacıyla ilk olarak MgCl₂ konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı değiştirilerek, tampon, distile su, dNTP karışımı, forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz miktarları sabit tutuldu. Tablo 3.2.'de belirtilen PZR programı kullanılarak promotor dizi çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1025 bç'lik insan CAIII promotoruna ait bant UVP Görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.5'de gösterildiği gibi 1. örnekte tek bir bant şeklinde beklenen moleküler ağırlıkta CAIII promotoru elde edildi.

Tablo 3.2: İnsan CAIII promotorunun amplifikasyonu için PZR içerikleri

Tüp İçeriği	1.Tüp	Pozitif Kontrol (GAPRDH)	Negatif Kontrol
gDNA	15 µl	5 µl	-----
MgCl ₂	4 µl	4 µl	4 µl
Taq Tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP	1 µl	1 µl	5 µl
Forward Primer	1 µl	1 µl	1 µl
Reverse Primer	1 µl	1 µl	1 µl
Taq DNA Polimeraz Enzimi	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
dH ₂ O	22,5 µl	32,5 µl	37,5 µl
Toplam Hacim	50µl	50 µl	50 µl

Tablo 3.3: İnsan CAIII promotor amplifikasyonu için PZR koşulları

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	4 dakika
2	38	94°C	1 dakika
		55°C	45 saniye
		72°C	1 dakika
3	1	72°C	10 dakika



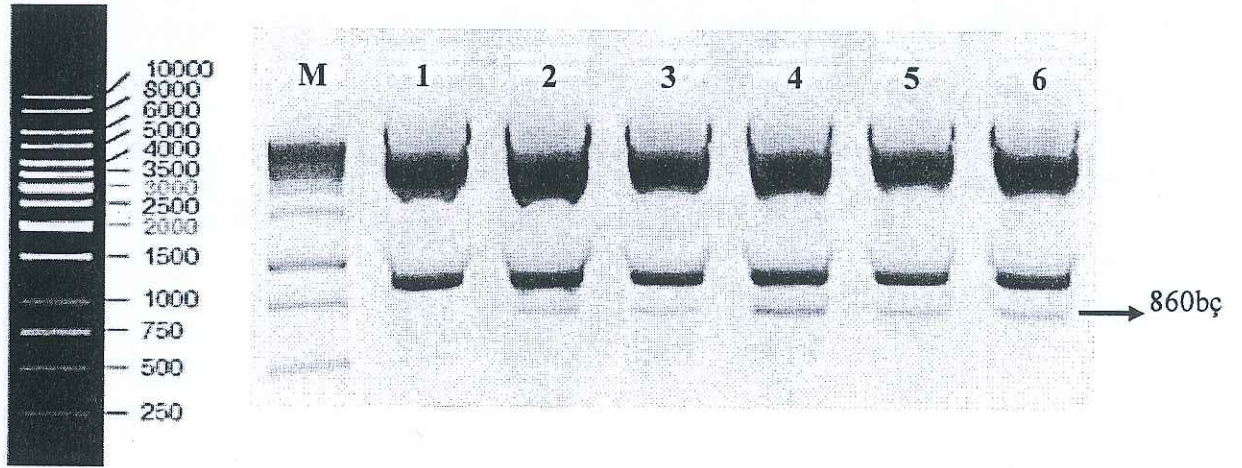
Şekil 3. 5: İnsan CA3 geninin 1025 bç'lik promotorun jel görüntüsü

M: 1 kb Marker; 1: örnek

3.2.4 İnsan CAIII Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

PZR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kullanıldı. Öncelikle PZR sonucu oluşan bantlar bölüm 2.2.2.5. belirtildiği gibi jelden geri kazanılarak klonlamaya hazır hale getirildi. Daha sonra üretici firma protokolüne göre pGEM-T Easy vektörü ile jelden geri kazanılan insan CAIII promotoru bir gece +4 °C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli XL-1 blue* hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere mavi-beyaz koloni seçimi yapılabilmesi amacıyla X-Gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz koloniler insan CAIII genini içeren pGEM-T easy vektörüne sahip hücrelerdir. Beyaz kolonilerden 6 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Qiaprep Spin

Miniprep (Qiagen) plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmitler EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol yapıldı ve EcoRI CAIII genini 860 bç ve 140 bç'lik bölgelerden kestiği için, bu parçaların gözlenmesi hedeflenmiştir. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.6.'da da görüldüğü gibi 6 kolonide bulunan vektörlerin 6 tanesi rekombinanttır ve insan CAIII promotor dizisini içermektedir.



Şekil 3. 6: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan promotorun EcoRI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -1 kb marker, 1 -1. koloni, 2 -2. koloni, 3 - 3. koloni, 4 - 4. Koloni, 5 -5. Koloni, 6 -6. Koloni

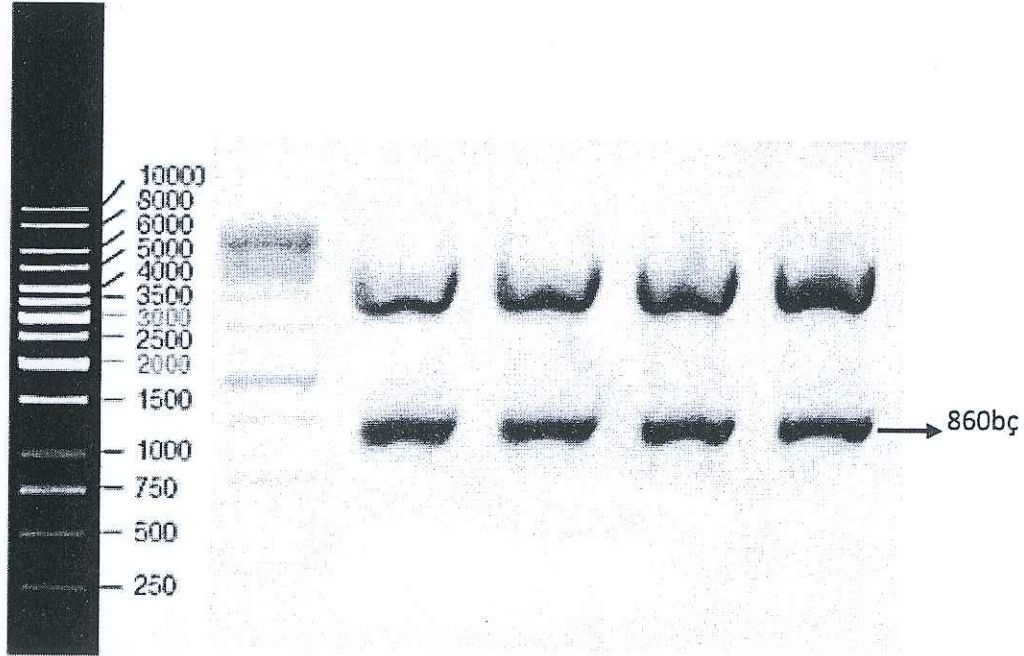
Oluşturulan rekombinant plazmitlerden 1. Koloni, insan CAIII promotorunun dizisinin kontrolü amacıyla sırasıyla REFGEN Biyoteknoloji, Ankara'ya dizi analizine gönderildi. Elde edilen dizi analiz sonuçları biyoinformatik olarak NCBI'da analiz edildi insan CAIII promotor dizisi ile karşılaştırıldı (Şekil 3.7). Şekilde de görüldüğü gibi dizi analizi sonucu ile gen bankasında bulunan dizi arasındaki uyum oldukça yüksektir bu nedenle 1. Koloniyle klonlama çalışmalarına devam edildi.

İnsan CAIII	CATGGTCGCCCTTCCTCCGTGCTGGACGGCTCCTGCTTTCTCTTCCCTGCGTGGTGCAGA 	64
8. Kromozom	CATGGTCGCCCTTCCTCCGTGCTGGACGGCTCCTGCTTTCTCTTCCCTGCGTGGTGCAGA 	38215483
İnsan CAIII	GTCGCCGCGAGCCCGCGCTTTTATGTAGCTGCCCCGCACACTGCATGGCCTTATTAGGTC 	124
8. Kromozom	GTCGCCGCGAGCCCGCGCTTTTATGTAGCTGCCCCGCACACTGCATGGCCTTATTAGGTC 	38215423
İnsan CAIII	AGCGAGGTGGGGCGGGGGCTAAACTAGATTGGGGTGGTGTGGGAGGCCGGTAGAG 	184
8. Kromozom	AGCGAGGTGGGGCGGGGGCTAAACTAGATTGGGGTGGTGTGGGAGGCCGGTAGAG 	38215363
İnsan CAIII	GAAGCCAATGAATTCCAAGAGCGGGACAGCTGTCGAGGTGACGGGGCGGAGGTGGGCGA 	244
8. Kromozom	GAAGCCAATGAATTCCAAGAGCGGGACAGCTGTCGAGGTGACGGGGCGGAGGTGGGCGA 	38215303
İnsan CAIII	AGGGGCACCCACGCCCTCCCTGCGCTCTCCCGGAGTCGTGGCTCCTGGCCCCCTCCATC 	304
8. Kromozom	AGGGGCACCCACGCCCTCCCTGCGCTCTCCCGGAGTCGTGGCTCCTGGCCCCCTCCATC 	38215243
İnsan CAIII	TCCTCTCCCTCTCTCAAACTGCAGGGTTCTAACCGGCCGACGTGCAGAAATGCA 	362
8. Kromozom	TCCTCTCTCTCTCTCAAACTGCAGGGTTCTAACCGGCCGACGTGCAGAAATGCA 	38215183
İnsan CAIII	GGCGGCCCTCACCTCGTCCCTCTCCTTCCATGCATTCTTGGGGATGGGGTGGGGG 	422
8. Kromozom	GGCGGCCCTCACCTCGTCCCTCTCCTTCCATGCATTCTTGGGGATGGGGTGGGGG 	38215123
İnsan CAIII	AGGGACAGGGTGTGCTAGTTGTGCTTGCCACGAACTAAAATCTACATCCCGCGGCTCT 	482
8. Kromozom	AGGGACAGGGTGTGCTAGTTGTGCTTGCCACGAACTAAAATCTACATCCCGCGGCTCT 	38215063
İnsan CAIII	TGCAGCCTCACTTAAAAGTTGCTTCAAGCGCAGGCTGGCTGTCTGGCTACGATCTTGGA 	542
8. Kromozom	TGCAGCCTCACTTAAAAGTTGCTTCAAGCGCAGGCTGGCTGTCTGGCTACGATCTTGGA 	38215003
İnsan CAIII	CACCTGTGCGAGTTTATTTGCTCTAGCGATCCGGTTACAGAGGCTGGAAAGAAGTCTGTT 	602
8. Kromozom	CACCTGTGCGAGTTTATTTGCTCTAGCGATCCGGTTACAGAGGCTGGAAAGAAGTCTGTT 	38214943
İnsan CAIII	TGTTTGCCTGCCCCCTAAGTTTACTCCCTTGCAGGCAACATGTAATACTTAGGAGCA 	662
8. Kromozom	TGTTTGCCTGCCCCCTAAGTTTACTCCCTTGCAGGCAACATGTAATACTTAGGAGCA 	38214883
İnsan CAIII	AAGGATGGGAAGAAAGGGTCCGGAGCAGGGTGAGAGGGTGAAGAGGCCCTCCAAGTCCGT 	722
8. Kromozom	AAGGATGGGAAGAAAGGGTCCGGAGCAGGGTGAGAGGGTGAAGAGGCCCTCCAAGTCCGT 	38214823
İnsan CAIII	TATCCTTAAAGAGATGGCCCTTTCTGGAATCGCACAGGCGGCATTTCCCAACCTAGCGG 	782
8. Kromozom	TATCCTTAAAGAGATGGCCCTTTCTGGAATCGCACAGGCGGCATTTCCCAACCTAGCGG 	38214763
İnsan CAIII	ATCCTTTTGGCTTGCAGGAAACCGAGGGCTGGATCTCAGAGAGCGCCAGATATCCAGGAG 	842
8. Kromozom	ATCCTTTTGGCTTGCAGGAAACCGAGGGCTGGATCTCAGAGAGCGCCAGATATCCAGGAG 	38214703
İnsan CAIII	ATGCTGGATCCCAGGTTACGCGGAGCTGGAGACTGGGATGATTAGCCCTCCCT 	901
8. Kromozom	ATGCTGGATCCCAGGTTACGCGGAGCTGGAGACTGGGATGATTAGCCCTCCCT 	38214643
İnsan CAIII	GAGCTGTCCCTCTGTTCTGAAATTCGAGATTCTTCTGAAGATTGGAGGCCCAAC 	954
8. Kromozom	GAGCTGTACCTCTGTTCTGAAATAAAGAAATTTCTGAAGATTGGAGGCCCAAC 	38214583
İnsan CAIII	ATAAAATGGAGTCTATTACTTAAACCTGGTCTAGGTCTCAAGATACAATGAGAG 	1012
8. Kromozom	ATAAAATG-AGTCAATTT-CTTAAACCTGGTCTAGGTCTCAAGATACAATGAGAG 	38214525
İnsan CAIII	ATTGCAA 1019 	
8. Kromozom	ATTGCAA 38214518	

Şekil 3.7: Klonlanan ve dizi analizine gönderilen insan CAIII promotor dizisi ile CAIII klonunun karşılaştırılması. 8 Kromozomla farklılık gösteren bazlar sarı ile gösterilmiştir.

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

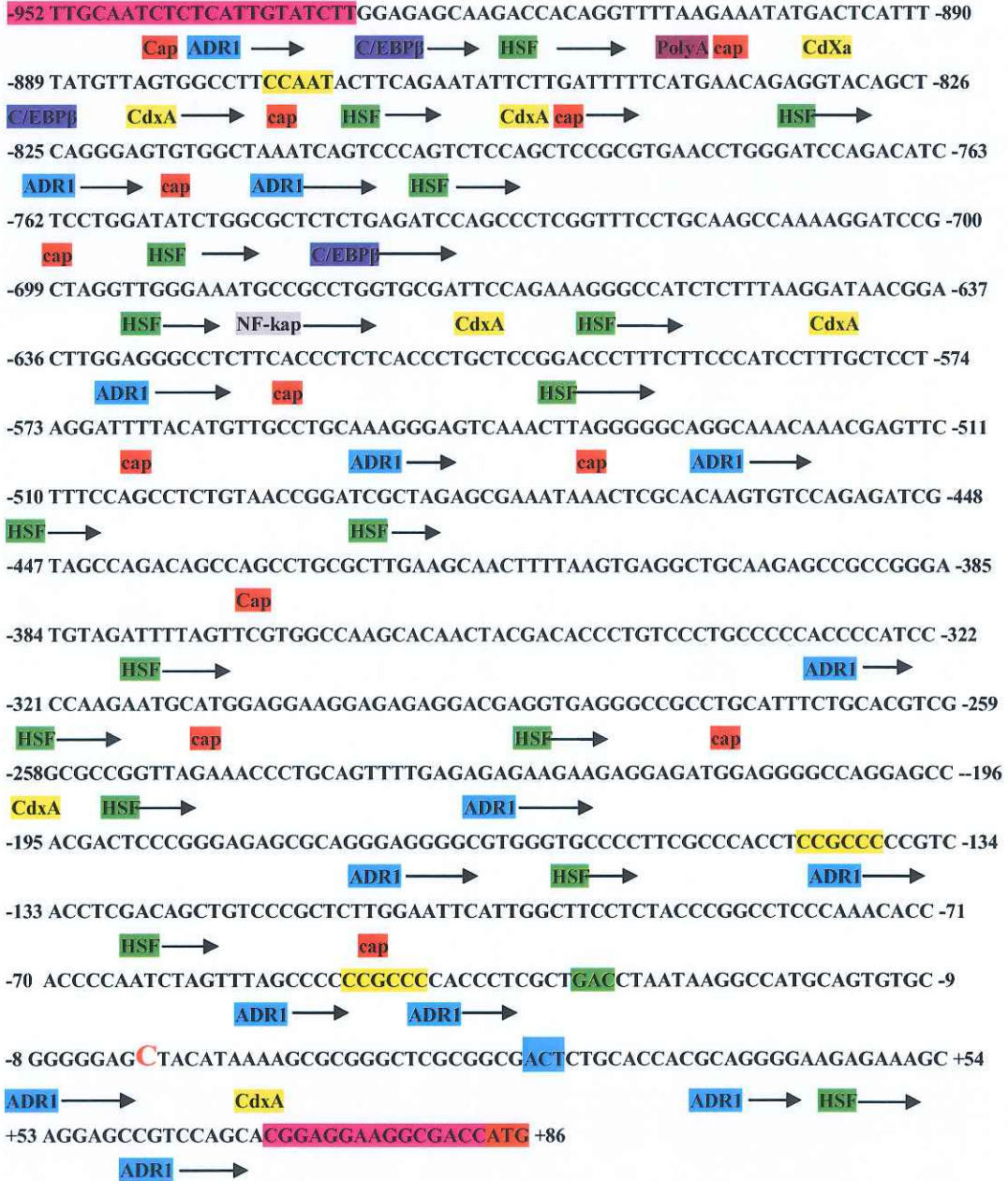
pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan CAIII promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMET-LuC lusiferaz reportör vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla öncelikle şekil 3.6'da görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra aynı şekilde XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilen pMET-Luc vektörü ile jelden geri kazanılan insan CAIII promotoru bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli* XL-1 blue hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 4 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi ekilen 4 kolonin hepsinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan CAIII promotor dizisini içermektedir.



Şekil 3.8: pMetLuc vektörüne klonlanan CAIII promotorunun kesim sonuçlarının jel görüntüsü

3.2.7 İnsan CAIII promotorunda yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri.

İnsan CAIII promotorunda bağlanabilecek muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Bu bölgeleri TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (Ver 1.3) programı kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.9: İnsan CAIII promotorunda yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri. Translasyonun başlangıç kodunu ATG kırmızı ile

vurgulanmıştır. Muhtemel önemli olabilecek TF faktörü bağlanma bölgeleri ok ile gösterilmiştir. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi kırmızı ile, translasyonun başlangıç bölgesi ise pembe ile gösterilmiştir.

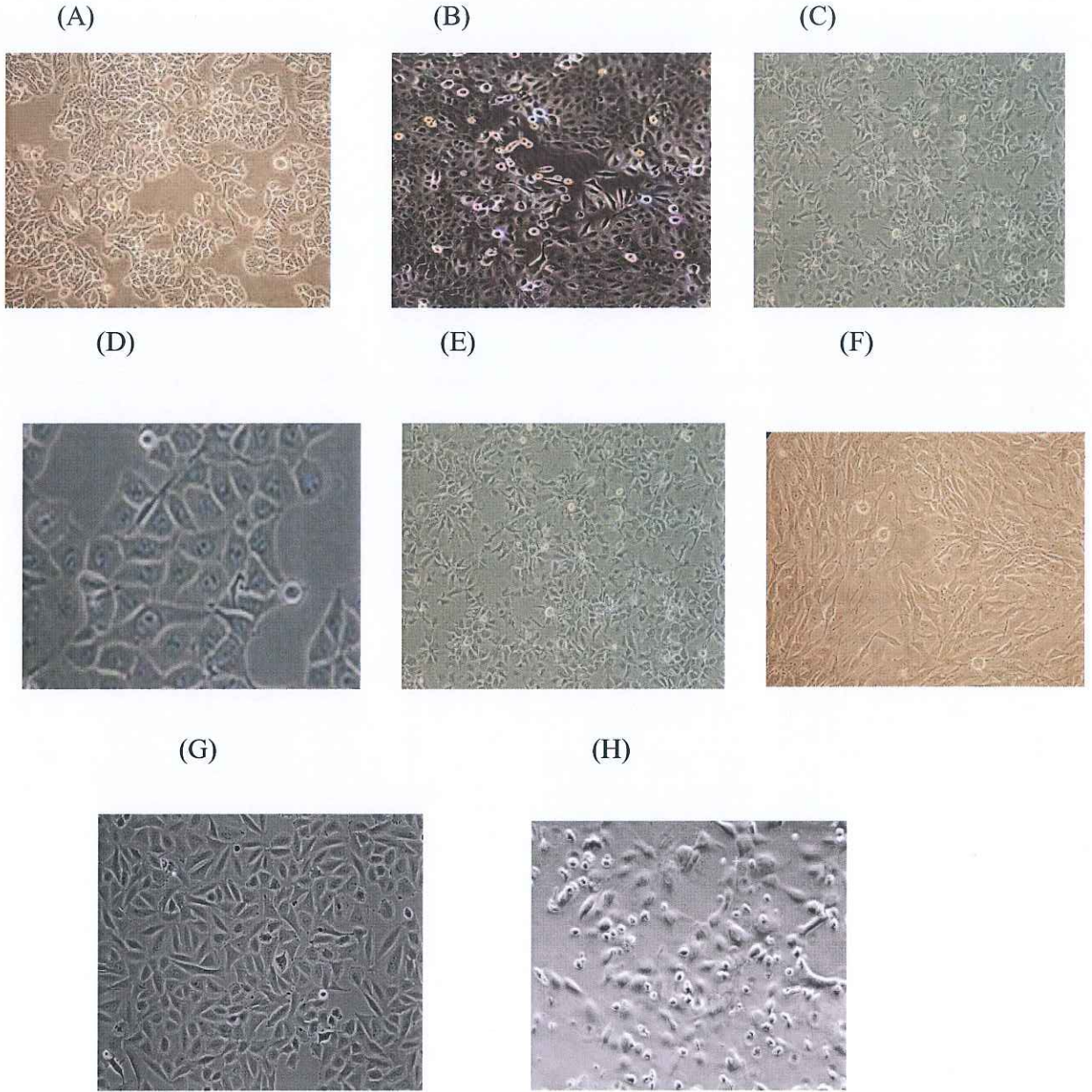
3.3 İnsan CAIII Geninin Ekspresyon Profili Analizi

3.3.1 Ekspresyon Çalışmaları amacıyla kullanılan Hücre Hatları

İnsan CAIII geninin hangi hücre hatlarında ekspres olduğuna dair yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda elimizde olan bütün hücre hatlarında tarama yaptık ve amaçla kullanılan hücre hatları ise şunlardır; HT-29 (İnsan kolon karsinomu), Hep3B (İnsan karaciğer karsinomu), PC3 (İnsan prostat karsinomu), DU145 (İnsan prostat karsinomu), MCF7 (İnsan meme karsinomu), MG63 (İnsan kemik karsinomu), Saos-2 (İnsan kemik karsinomu) ve HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre). Bu hücreler bölüm 2.2.3.6 belirtildiği gibi büyütülerek, yine Bölüm 2.2.4.1 belirtilen şekilde total RNA izolasyonları yapılmıştır. Primer tasarımı Bölüm 2.2.2.3'de belirtildiği şekilde yapıldı. NC_000008.10 nolu gen bank numaralı CAIII dizisi incelenerek iki farklı primer çifti tasarlanmıştır. Birinci primer çifti +1/+595. Arasında bulunup 595 baz çiftliktir. Bu primer çifti semi kantitatif RT-PZR deneylerinde kullanılmıştır.

Tablo 3.4: İnsan CAIII genine ait 595 bç'lık ürün veren primer çifti

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Dizi
CAIII Forward	24 bç	60,5 °C	5'TGGGAAGACCTGCCGAGTTGTATT-3'
CAIII Reverse	24 bç	60,5 °C	5'-TTTGAAGGAAGCTCTCACCACCCT-3'

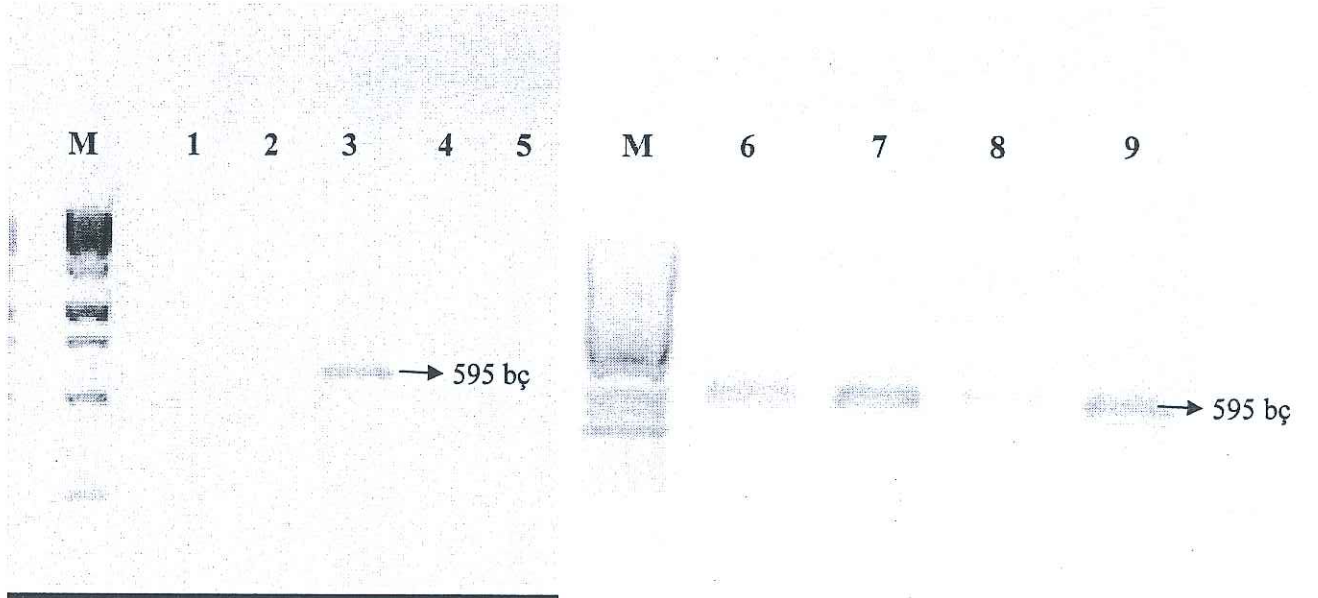


Şekil 3.10: İnsan CAIII geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri: (A) HT-29 (İnsan Kolon Karsinomu), (B) DU145 (İnsan Prostat Karsinomu), (C) PC3 (İnsan Prostat Karsinomu), (D) MCF7 (İnsan Meme Karsinomu), (E) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), (F) MG63 (İnsan Kemik Karsinomu), (G) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu), (H) HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre) (10X40)

3.3.2 Farklı Hücre Hatlarında CAIII'ün ekspresyonunun belirlenmesi

Hücre kültürü ortamında büyütülen farklı hücre hatlarına sayıp hücre soyları, istenilen pasaj numarasına geldikten sonra hücreler pelletler halinde toplandı. Bölüm 2.2.4.1'de bahsedilen RNA izolasyonu yöntemi ile pelletlerden RNA izolasyonları yapıldı ve ardından cDNA sentezi için Bölüm 2.2.4.5'deki cDNA sentez basamakları uygulandı.

Hazırlanan CAIII genine spesifik primer ve cDNA'lar kullanılarak PZR için en uygun şartların saptanabilmesi amacıyla ilk olarak tampon, distile su, dNTP karışımı, 595 bç'lik forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz miktarları sabit tutularak, MgCl₂ konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı değiştirildi. İstenilen bant kalınlığına ulaşıldıktan sonra insan CAIII genine ait PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve UVP görüntüleme ile fotoğrafları çekildi (Şekil 3.12).

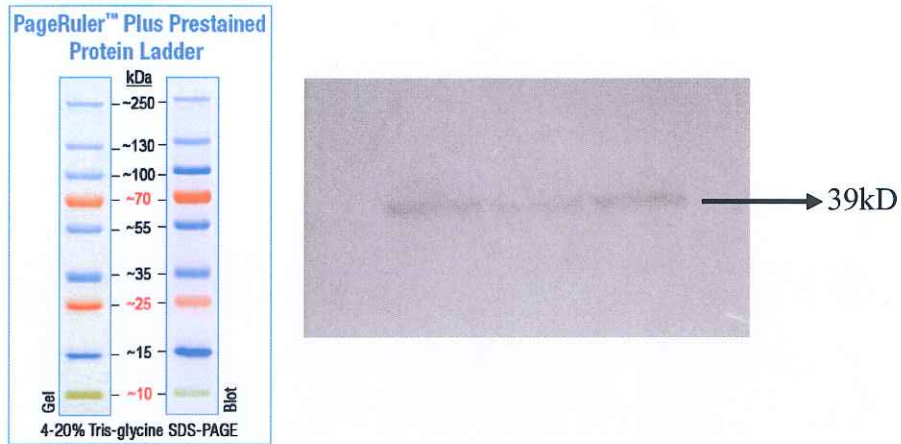


Şekil 3.11: İnsan CAIII Genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. M: 1 kb Marker, 1- MCF7, 2- Hep3B, 3- HT-29, 4- PC3, 5- DU145, 6- MG63, 7- HUVEC, 8- Saos-2

Jel görüntülerinde de görüldüğü gibi CAIII geninin HT-29, MG63, Saos2 ve HUVEC hücre hatlarında ekspre olduğu belirlenmiştir. CAIII mRNA sı DU-145, PC-3, MCF-7 ve Hep3B hücrelerde bulunmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar çok sayıda tekrar edilmiştir.

3.4 CAIII'ün HT-29 hücrelerinde protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesi

CAIII'ün mRNA düzeyinde HT-29 hücrelerinde ifadesinin belirlenmesinden sonra model hücre olarak muhtemel seçeceğimiz HT-29 hücrelerinde protein düzeyinde var olup olmadığını göstermek için western blot çalışması yapılmıştır. Buna göre hücreler Bölüm 2.2.3.6'da belirtildiği gibi büyütülmüştür. Büyütülen hücreler Laemli ekstraksiyon protokolu kullanılarak total protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen protein ekstraktları SDS Page yüklenmiş 1 gece +4 C de transfere bırakılmıştır. Transfer sonrası protein bandlarının transfer olduğunu gözlemek için SDS jeli transfer sonrası boyanmıştır. Western blot Bölüm 2.2.5 açıklandığı üzere gerçekleştirilmiş, primer antikor olara 1:400 dilüsyonda CAIII antikoruna (Sigma) kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak 1:5000 dilüsyonda anti-rabbit antikoruna (Santa Cruz) kullanılmıştır. 200µg/ml konsantrasyonda protein kullanılarak CAIII proteininin işaretlenmesi yapılmıştır (Şekil 3.11). Sonuçta 39 kDa lık CAIII proteinin HT-29 hücrelerinde varlığı tespit edilmiştir. Farklı protein konsantrasyonları SDS jeli yüklenmiştir.



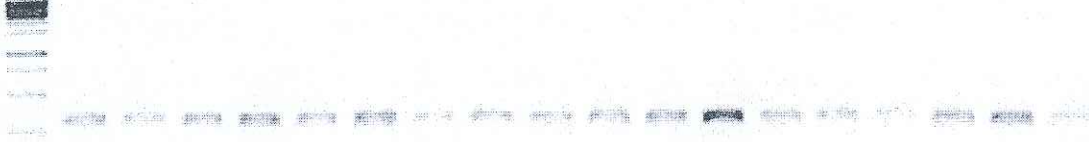
Şekil 3.12: İnsan CAIII Proteininin işaretlenmesinin film üzerindeki görüntüsü

3.5 HT-29 Monolayer Hücre Kültürüne Sitokin Uygulanması

HT-29 monolayer hücre kültürü 75 cm² kültür kabının yüzeyini %90-95 oranında kapladıktan sonra tripsinizasyon ile hücreler yüzeyden ayrıldı ve DMEM ile homojenize edildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 2.000.000 hücre/cm²'de olacak şekilde 25 cm²'lik kültür kaplarına alındı. %0,1 BSA içeren serumsuz DMEM her flaska 7,5 ml eklendi. Uygulanacak sitokinler (TGFβ, TNFα, IL-1, IL-6, IFN-γ) 500U/ml son konsantrasyon olacak şekilde kültür kaplarına uygulandı. 24, 48, 72 saat sürelerle 37°C, %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi için sitokin uygulanmamış kontrol grubu oluşturuldu. İnkübasyon süreleri sonunda her bir hücre kültür kabındaki hücrelerin morfolojik görüntüleri dijital kamera ile çekilip kaydedildi. Her bir hücre kültür kabından hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden ayrıldı ve DMEM ile homojenize edildikten sonra hücre sayımları yapıldı ve hücrelerin canlılıkları incelendi.

Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi Bölüm 2.2.5.1 ve Bölüm 2.2.5.2'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. RNA miktarı ve saflığı RNA elektroforezi ve spektroskopik olarak belirlenmiştir. RT reaksiyonlarında aynı miktarda RNA kullanılmaya dikkat edilerek cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'nın Kantitatif PZR çalışmalarından önce kullanılabilmesi için sq RT-PZR şartları ile kontrolü yapılmıştır. Bunun için insan-β-2-mikroglobulin primerleri kullanılmıştır. İnsan β-2-mikroglobulin geni insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan bir gendir. Bu gen aynı zamanda normalizasyon amaçlı kullanılmıştır ve tüm deney ve kontrol gruplarında insan β-2-mikroglobulin PZR reaksiyonları da yapılmıştır. Ürünler agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü ve UVP ile görüntülendi (Şekil 3.12).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



Şekil 3.13: HT-29 sitokin deneyinden elde edilen cDNA'ların kontrolü amaçlı insan beta mikroglobulin-2 kullanılarak yapılan kontrol PZR'ı. M: 1 kb marker, 1- 24h Kontrol, 2- 24h TGF- β , 3- 24h TNF- α , 4- 24h IL-1, 5- 24h IL-6, 6- 24h IFN- γ , 7- 48h Kontrol, 8- 48h TGF- β 9- 48h TNF- α , 10- 48h IL-1, 11- 48h IL-6, 12- 48h IFN- γ , 13- 72h Kontrol, 14- 72h TGF- β , 15- 72h TNF- α , 16- 72h IL-1, 17- 72h IL-6, 18- 72h IFN- γ

Tablo 3.6: İnsan- β -2 mikroglobulin genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	5 dakika
2	19	95°C	30 saniye
		60°C	1 dakika
		72°C	2 dakika
3	1	72°C	8 dakika

3.6 Gerçek Zamanlı qRT-PZR Çalışmaları

İnsan CAIII geninin mRNA düzeyindeki etkisini daha hassas ve daha hızlı analiz etmek amacıyla Real-Time PZR tekniği kullanılmıştır. cDNA'ların kontrolü Şekil 3. 12'da gösterildiği gibi insan β -mikroglobulin-2 genine ait spesifik primerler kullanılarak yapılmış ve ardından aynı Real-Time plakası üzerinde aynı cDNA'larla insan CAIII ve insan β -mikroglobulin-2 genine ait primerlerle PZR programı başlatılmıştır. Kuyulardaki ürün içeriğine ve PZR programına dair bilgi Tablo 3.7 ve

Tablo 3.8'de gösterilmektedir. Temsili olarak bir qRT-PZR deney sonucu Şekil 3.9 belirtildiği gibi gerçekleşmiştir.

Yapılan kantitatif RT-PZR deneylerinde ayrıca +124/+404 arasındaki hedeflenen 280 bç'lik bölge de daha sonra tasarlanmıştır. Bazı semi kantitatif PZR ve tüm kantitatif PZR çalışmalarında bu ikinci primer seti kullanılmıştır. Tasarlanan primerlere ait dizi, Tm ve baz uzunluk bilgileri ise çizelge 3.4 ve çizelge 3.5'de bulunmaktadır.

Tablo 3.5: İnsan CAIII genine ait 280bç'lik primerlerin uzunluk, tm ve dizi bilgileri

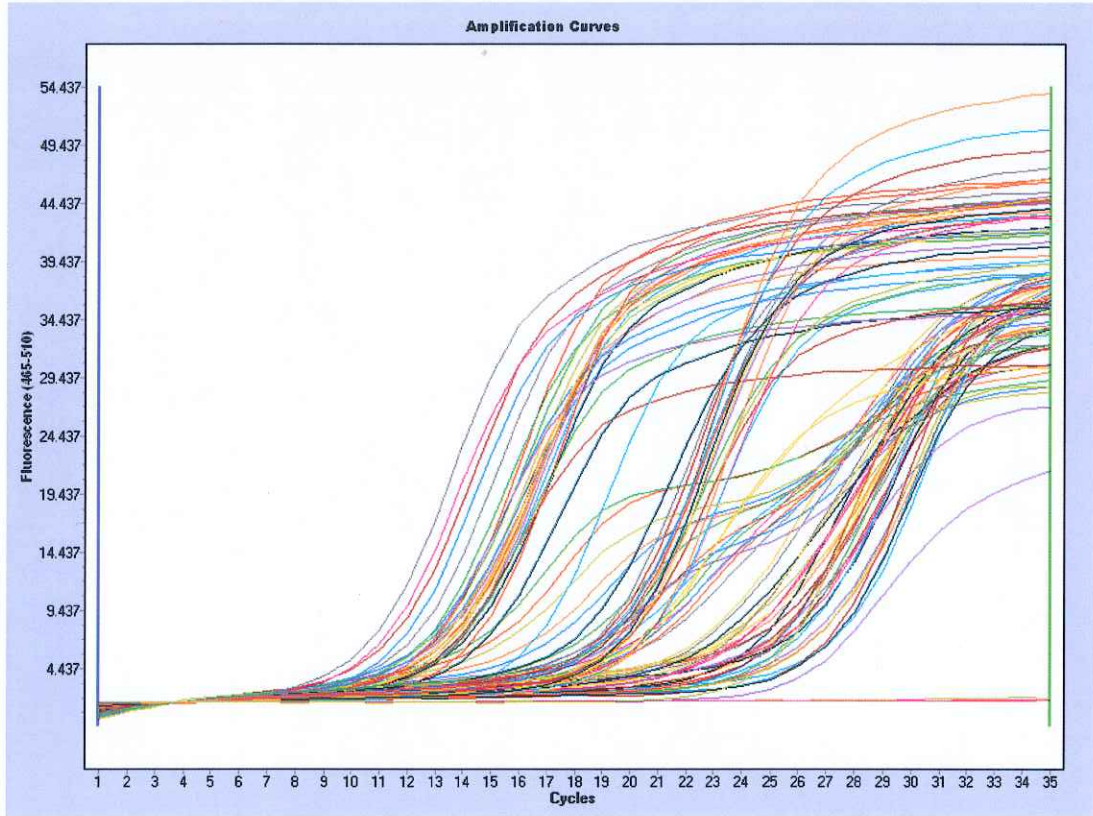
Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Dizisi
CAIII Forward	29 bç	61.9 °C	TGG GAA GAC CTG CCG AGT TGT ATT TGA TG
CAIII Reverse	28 bç	65 °C	TTG ATA GGC TGT GGA GGT CGC CAG TTG C

Tablo 3.7: İnsan CAIII geni için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu

	Örnek	Negatif Kontrol
SYBR Green master mix	5 µl	5 µl
dH2O	3 µl	3 µl
cDNA	1 µl	-
Forward primer	0,5 µl	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl	0,5 µl
Toplam	10 µl	10 µl

Tablo 3.8: İnsan CAIII geni için Gerçek zamanlı PZR koşulları

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	15 dakika
2	50	95°C	10 saniye
		55°C	10 saniye
		72°C	12 saniye
3	1	72°C	10 dakika



Şekil 3.14: İnsan CAIII genine ait HT-29 sitokin deneyinin gerçek zamanlı qRT-PZR sonuçları.

3.7 HT-29 Hücre Hattında Farklı Sitokinlerin CAIII Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

İmmun yanıtta, kanserde, kalp hastalıkları ve şeker hastalığı gibi birçok hastalıkta önemli görevleri bulunan TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IFN- γ sitokinlerinin HT-29 hücrelerindeki CAIII mRNA ekspresyon seviyesine etkileri Gerçek Zamanlı PZR analizi kullanılarak belirlendi.

HT-29 hücreleri 25cm²'lik flasklara yayıldıktan bir gün sonra, 500U/ml olarak uygulanan sitokinler 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi için izole edilen RNA'dan kullanıldı.

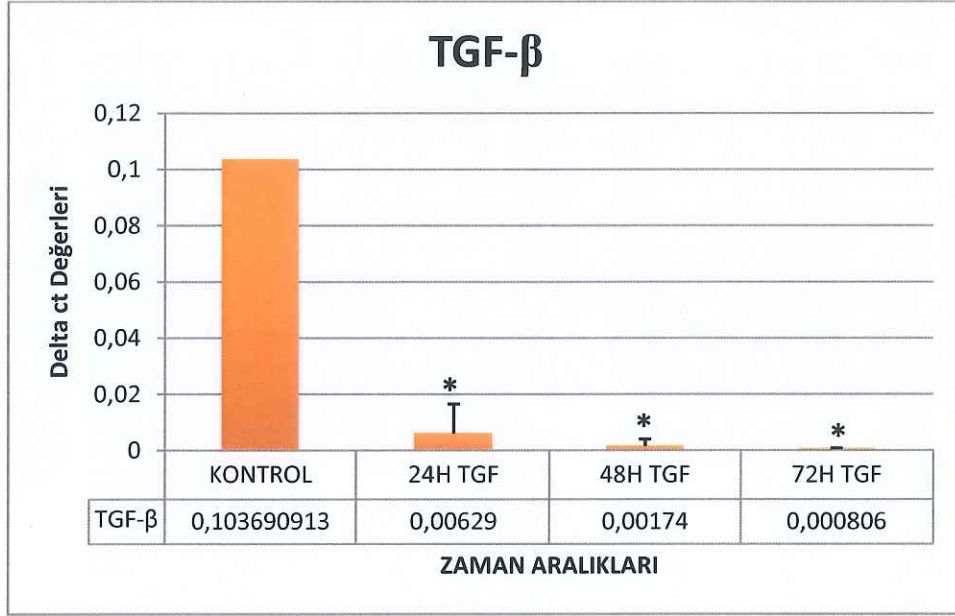
CAIII ve insan- β -2mikroglobulin genlerinin çoğaltılması için kullanılan PZR koşulları ve içerikleri Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'da gösterilmiştir. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human- β -mikroglobülin 2 geninin Ct değerleri ile bulunan Ct değerinin formülü aşağıdaki gibidir;

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

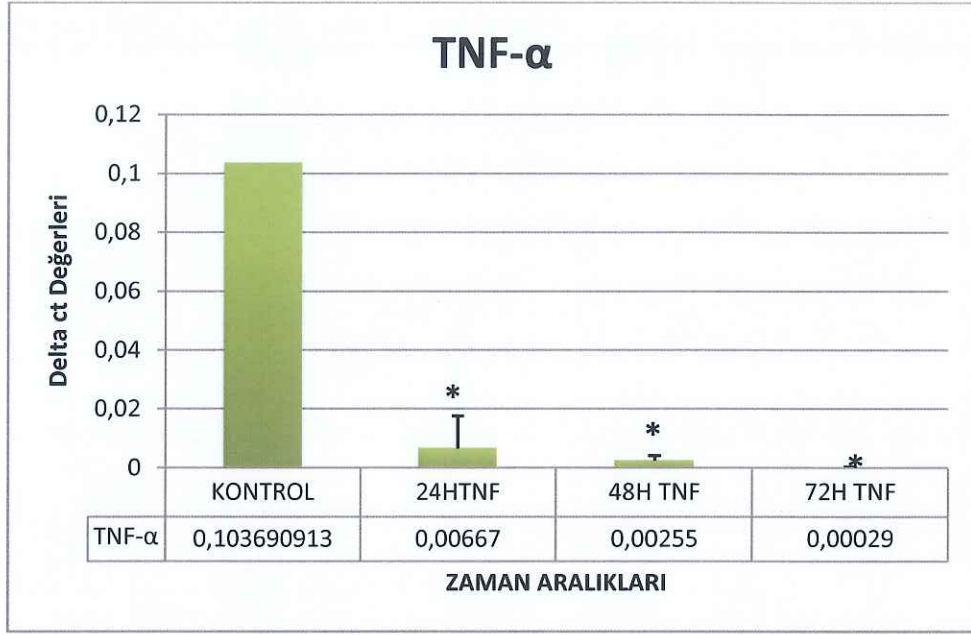
$$\text{Hedef ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

Gerçek zamanlı qRT-PZR sonuçları analiz edildiğinde her zaman sitokin grubuna ait grafikler şekil 3.13, şekil 3.14, şekil 3.15, şekil 3.16 ve şekil 3.17 de görülmektedir. Her zaman dilimie ait sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her sitokinin zamana bağlı değişimi görülmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 500 u\ml TGF- β 'nın, 500U/ml TNF- α , 500U/ml IL-1 α 'ın ve 500U/ml IFN- γ 'nın CAIII'ün mRNA düzeyindeki ekspresyonunu azalttığını, 500U/ml IL-6'in ise 24 saatte CAIII'ün mRNA düzeyindeki ekspresyonunu arttırdığını diğer zaman aralıklarında ise sitokinlerin CAIII mRNA'sı üzerindeki inhibe edici etkinin ortadan kalktığı görülmektedir. Kontrol gruplarıyla deneylerin arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olup olmadığı One way ANOVA testi

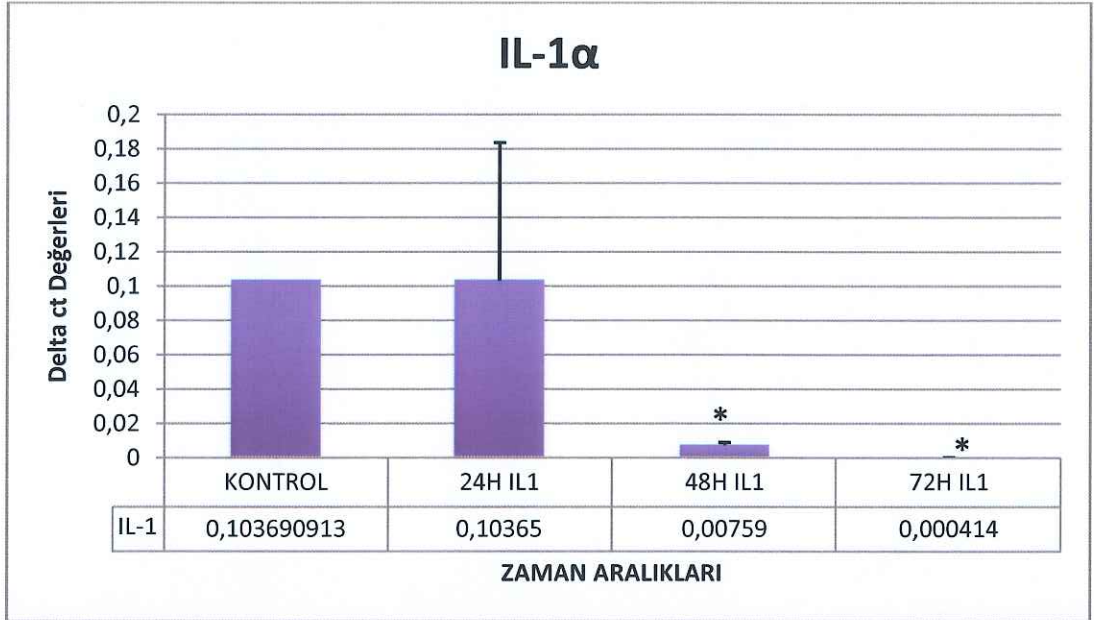
kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre istatistikî olarak önemli sonuçlar * ile grafiklerde belirtilmiştir.



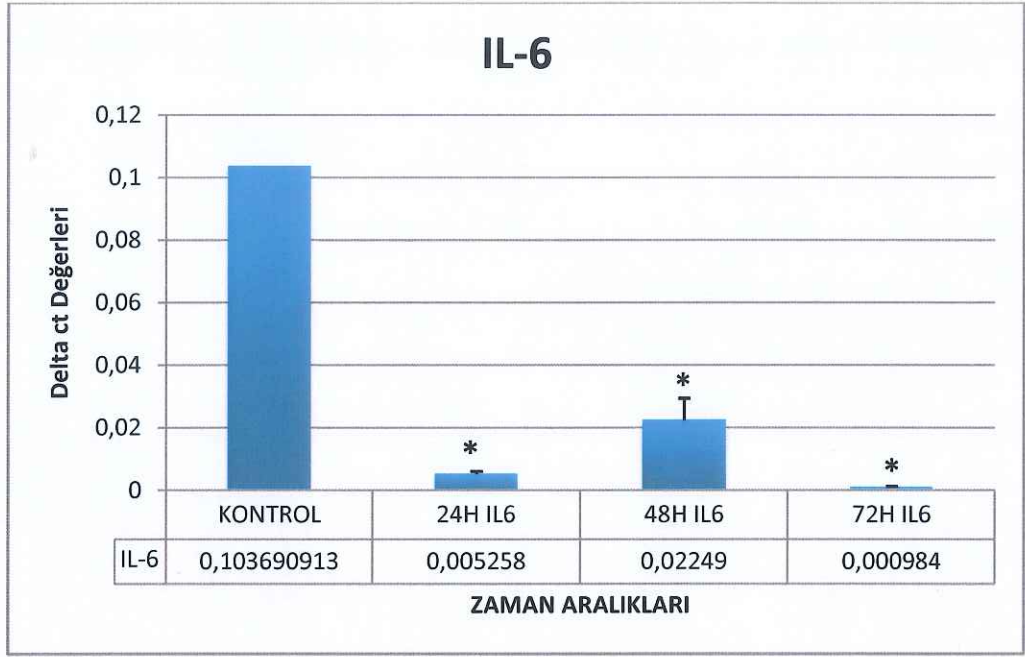
Şekil 3.15: 500U/ml TGF- β 'nın CAIII'ün mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).



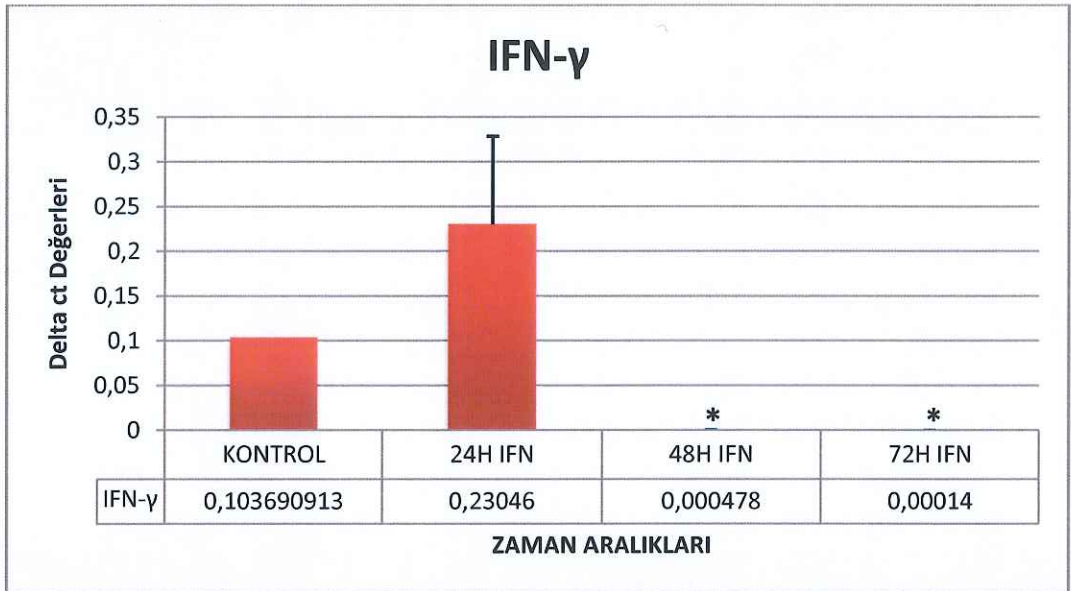
Şekil 3.16: 500 U/ml TNF- α 'nın CAIII mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).



Şekil 3.17: 500U/ml IL-1 α 'ın CAIII mRNA düzeyine etki sonuçları (p<0.05 olan değerler * ile işaretlendi).



Şekil 3.18: 500U/ml IL-6'in CAIII mRNA seviyesine etki sonuçları ($p < 0.05$ olan değerler * ile işaretlendi).



Şekil 3.19: 500U/ml IFN- γ 'nın CAIII mRNA seviyesine etki sonuçları ($p < 0.05$ olan değerler * ile işaretlendi).

3.8 Protein Seviyesinde Etkilerinin Belirlenmesi

39 kD büyüklüğe sahip insan CAIII proteinini belirlemek amacıyla, ekspresyon deneylerinde kullandığımız kolon karsinom hücre hattı olan HT-29 hücre hattını Bölüm 2.2.3.6'daki metod kullanılarak büyütülmesi sağlandı. Büyüyen hücrelerin sayımı Bölüm 2.2.3.8'de anlatıldığı şekilde yapıldı. 6-kuyulu plakaların her kuyusuna 500.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: 6-Kuyulu plakaya hücre ekimi

Üzerlerine %0,1 BSA içeren ve FCS bulunmayan DMEM eklenerek son hacim 2ml'ye tamamlandı. Uygulanacak sitokinler (TGF β , TNF α , IL-1 α , IL-6, IFN- γ) 500U/ml son konsantrasyon olacak şekilde her kuyuya ayrı ayrı uygulandı. 24, 48, 72 saat sürelerle 37°C, %5 CO₂ inkübatör de inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi için sitokin uygulanmamış kontrol grubu oluşturuldu.

24, 48 ve 72 zaman dilimleri sonunda Bölüm 2.2.5.2'de anlatıldığı şekilde Laemli buffer kullanılarak protein ekstraktları oluşturuldu ve ekstraktlar 100°C'de 10 dakika inkübe edilerek protein denatürasyonu sağlandı. Bölüm 2.2.5.3'de anlatılan SDS PAGE metodu kullanılarak jel döküldü. Protein ekstraksiyonu Laemli tampon ile yapıldığı için örnekler yalnız bromofenol mavi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 10 μ l Rainbow Marker yüklendi.

Jel, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 200 volt ve 126 mA akımda yaklaşık 45-50 dakika yürütüldü.

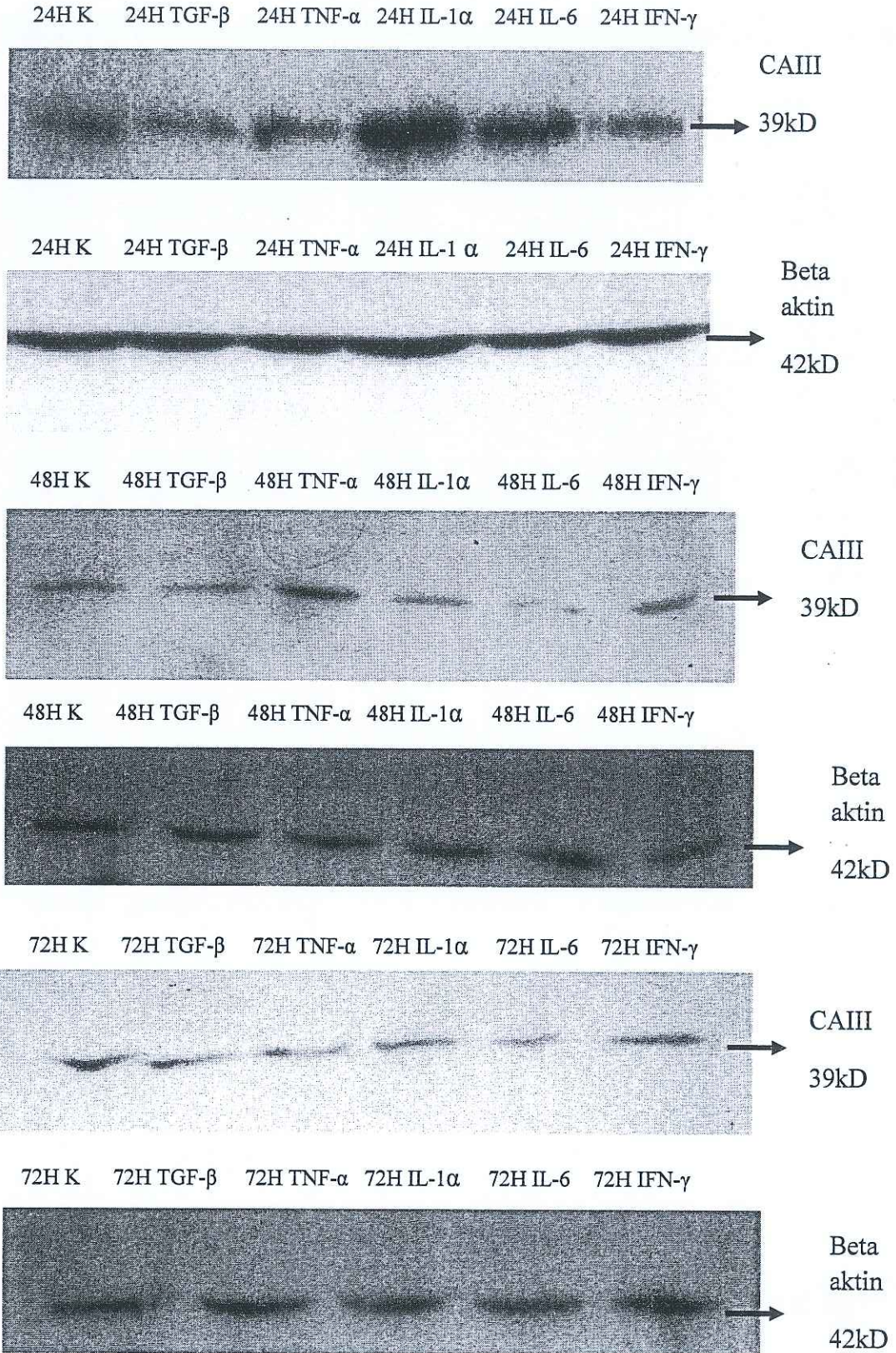
Örneklerin jelde yürümesi tamamlandıktan sonra SDS jelinin blotlaması Bölüm 2.2.5.4'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Proteinlerin transferi için PVDF (Immobilon-FL 0,45µm) membranlar kullanıldı. Membran, jel, kutuma kağıtları ve süngerlerden oluşan sandviç yapısı, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 15 volt akımda 12-18 saatte yapıldı.

12-18 saat sonunda membran bir petri kabına alınarak %5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS içeren 10ml Blocking Buffer içinde oda sıcaklığında bir saat horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Böylece olan membrandaki proteinlerin membrana hapsolmesi sağlanmış oldu. Bir saatin sonunda 5 dakika aralıklarla %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile 3 defa yıkama yapılarak blocking bufferin ortamdan uzaklaşması sağlandı.

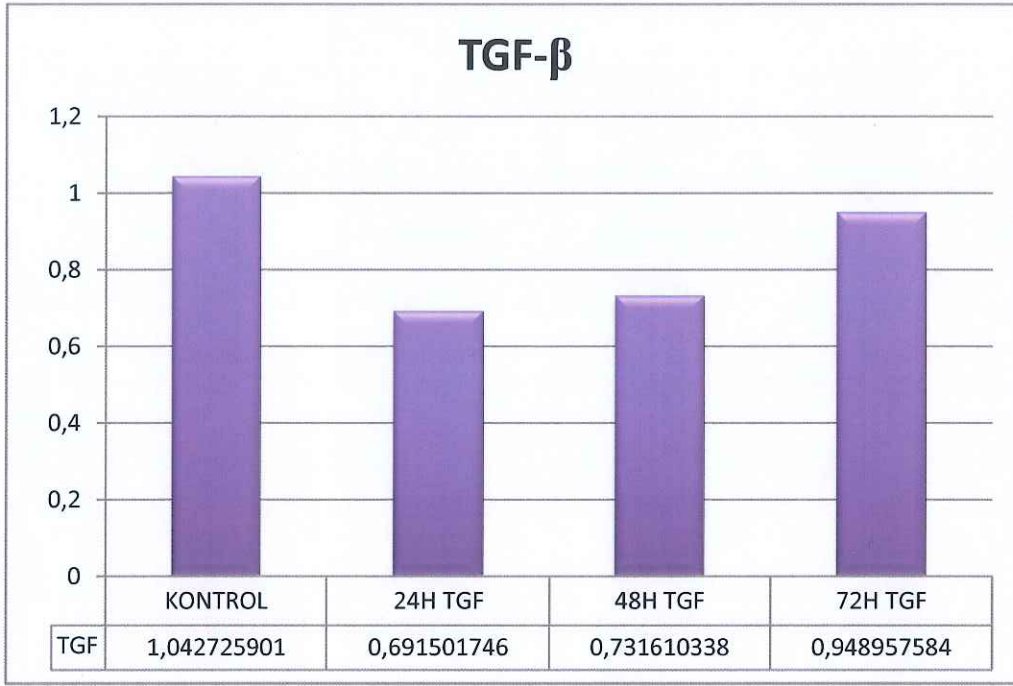
Yeni bir petri kabına alınan membraların oda sıcaklığında 1:400 oranında CAIII primer antikör bulunan %5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 10ml 1X TBS içinde 2,5 saat boyunca çalkalayıcıda inkübasyonu sağlandı. Ardından 5 dakika aralıklarla %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile 3 defa yıkama yapılarak membrana bağlanmayan primer antikörlerin ortamdan uzaklaşması sağlandı. daha sonra 1:5000 oranında Anti-mouse IgG Sekonder Antikoru bulunan %5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 10ml 1X TBS içinde 1-1,5 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 1-1,5 saatin sonunda ortamın bağlanmayan sekonder antikörlerden arındırılması için 10 dakika aralıklarla %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile 3 defa yıkama yapıldı.

Proteinlerin belirlenmesi ve sonuçların filme aktarımı Bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Membranlar 1-4 dakika arasında substratla muamele edildi. ECL sistemi (Pierce ECL Western Blotting Substrate-Thermo) kullanıldı ve Reagent A ve Reagent B solüsyonlarından ayrı ayrı 1,5ml alınarak membran üzerine uygulandı. Karanlık odada film ve membran 30 saniye ve 1 dakika ayrı ayrı muamele edilerek film, film makinasına verilmiştir. Işıma yapan CAIII proteini filmde karartı şeklinde bantların oluşmasına neden olmuştur (Şekil 3. 21). Westren blot deneyinin film üzerindeki CAIII ve Human Beta Aktin bantları denstrometrik olarak analiz

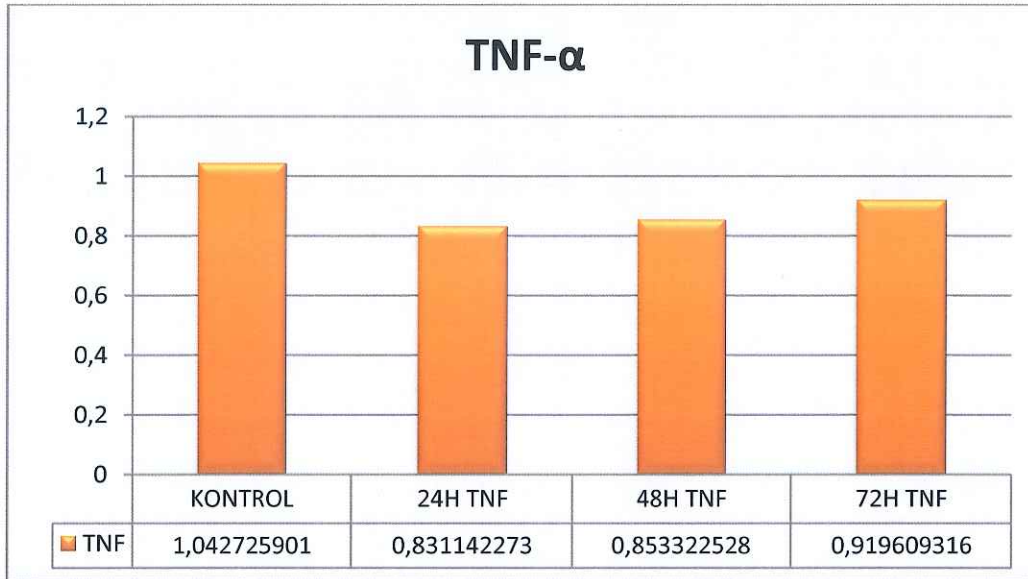
edildiğinde Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'da gösterilen grafik oluşturulmuş ve her sitokin için 24, 48 ve 72 saat sonucundaki etkileri gösterilmiştir. Grafiklerde de görüldüğü üzere sitokinlerin CAIII'ün protein düzeyinde de baskılayıcı etkisi bulunmaktadır. Böylece sitokinlerin CAIII'ün mRNA düzeyinde gösterdiği etki protein düzeyinde de gösterilmiş ve sonuçların uyumlu olduğu grafiksel analizlerle de belirtilmiştir.



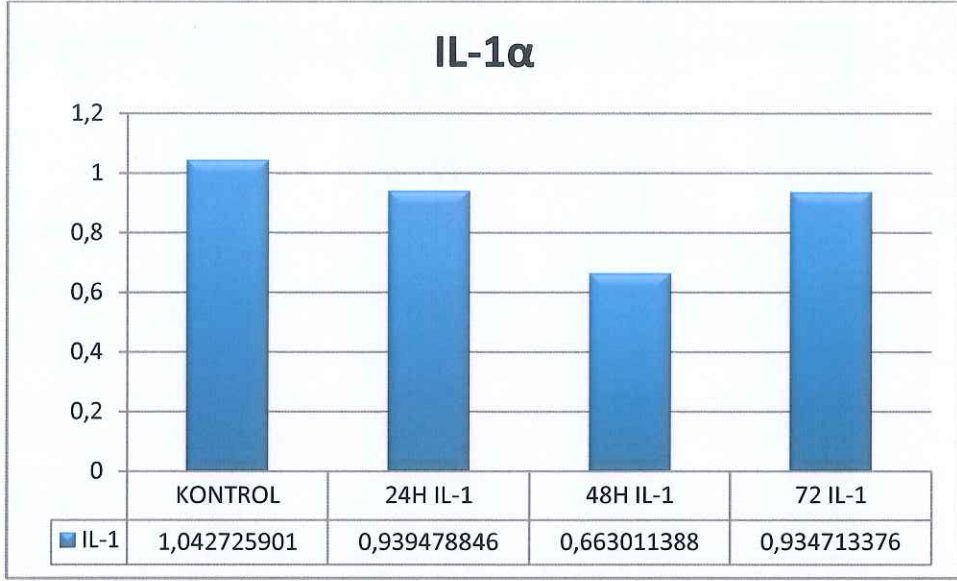
Şekil 3.21: CAIII ve β -Aktin Protein belirlemesi



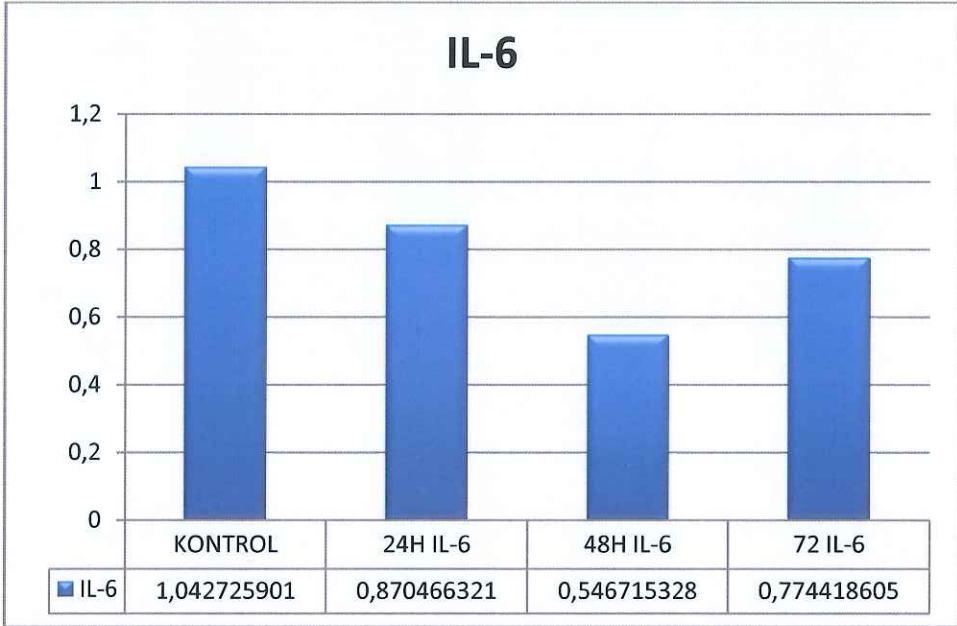
Şekil 3.22: CAIII proteininin 500U/ml TGF- β sitokin sonuçları



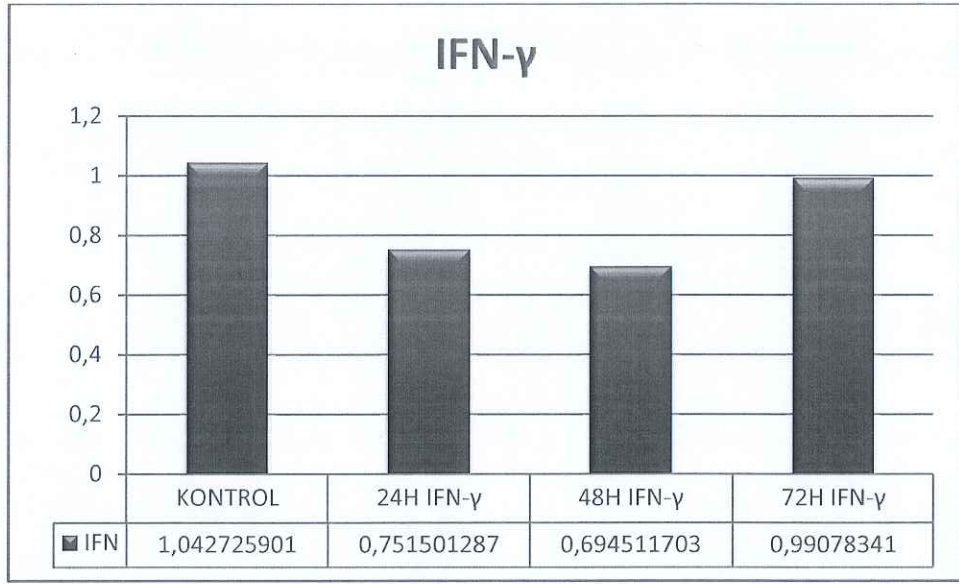
Şekil 3.23: CAIII proteininin 500U/ml TNF- α sitokin sonuçları



Şekil 3.24: CAIII proteininin 500U/ml IL-1 α sitokin sonuçları



Şekil 3.25: CAIII proteininin 500U/ml IL-6 sitokin sonuçları



Şekil 3.26: CAIII proteininin 500U/ml IFN- γ sitokin sonuçları

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

CO₂'in hidratazyonunu katalizleyen bir enzim ailesinin üyesi olan Karbonik Anhidraz III (CAIII), kromozom 8'in q22 koluna lokalize, 7 ekzon, 6 introna sahiptir 10,3 kb büyüklüğünde bir gendir [56].

CAIII iskelet kasına spesifiktir ve sarkoplazmadaki proteinlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Özellikle kas fiberlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan CAIII soleus kası diye adlandırılan bacak kasında oldukça fazla ekspresyon olurken uyluk kemiğini saran kaslardan biri olan anterior tibialis ve göğüs kaslarında bulunmamaktadır [55].

Kas çalıştıkça glikojenin yıkılarak laktik aside dönüşmesiyle ortamın asidikleşme oranı artmaktadır. Bu metabolikler hidrojen iyonlarının artmasını ve kas yorgunluğunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. CAIII hidrataz aktivitesiyle, intraselüler pH'ı ve asit-baz dengesini regüle ederek kas yorgunluğu ortadan kaldırır ve ortamın eski haline dönmesini sağlar [45].

Kas eksersizleri sırasında kas yorgunluğunu tetikleyen serbest radikaller ve çeşitli reaktif oksijen türleri (ROS) açığa çıkar. CAIII hücreleri oksidatif hasarlardan koruyan anti-oksidatif aktiviteye sahiptir. NIH-3T3 hücrelerinde yapılan çalışmalar gösteriyor ki; CAIII eksprese etmeyen hücrelerde ROS etkisiyle oluşan H₂O₂ hücrelerin ölerek ortamdaki yok olmasına neden olmuştur, ancak transfekte edilen hücreler CAIII ekspres ettiklerinde hücrelerin oksidatif stresinin azaldığı ve apoptotik hücrelerin azaldığı gözlemlenmiştir [63-65].

Yapılan bir araştırmada anestezi uygulanmış hastaların iskelet kaslarındaki CAIII protein seviyesinin normal insanların iskelet kaslarındaki CAIII protein seviyesinden daha az olduğu görülmüştür. Anestezi kaslarda yorgunluğu ve gevşekliği etkisi yaratmaktadır. Bunun nedeni de anestezi almış hastaların iskelet kaslarında CAIII'ün yetersiz gelmesidir. Başka bir çalışmada ise, hipoksik durumda vastus lateralis kasının CAIII mRNA konsantrasyonu normaksiya durumundakine oranla %74 arttığı görülmüştür. Bu sonuçlardan dolayı, CAIII'ün iskelet kasındaki

protein seviyesinin ve aktivitesinin kas yorgunluğu ve kas gevşekliği ile değişim gösterdiği belirtilmiştir [60].

Erkeklerdeki kas oranının bayanlardakine oranla daha fazla olmasından dolayı CAIII, erkeklerde daha yüksek oranlarda ekspre olmaktadır. Ayrıca gastrulasyon aşamasında CAIII mRNAsı öncül notokord mezoderminde ilk olarak ekspre olmaya başlar. Hamileliğin geç aşamalarında ise notokort kalıntıları olan vertebratanın anterioposteriyör aksisinde CAIII kalıntıları gözlenmiştir. Ayrıca yine fetal kaslar üzerinde yapılan çalışmalarda, 10 haftalık fetal kaslarında ekspre olmaya başladığı 30. Haftaya gelindiğinde ise enzim seviyesinin hızla yükseldiği; bebek doğduğunda ise kaslardaki enzim seviyesinin yetişkinlerdeki oranın yarısına ulaştığı gözlenmiştir [60-65].

Bir başka çalışmada ise hepatoselüler karsinomlu (HCC) hastalarda CAIII'ün ekspresyon seviyesinin komşu dokulardakine oranla çok az ekspre olduğu bulunmuştur. CAIII, iki adet sülfhidroksil grubuna sahiptir ve bundan dolayı hücreleri serbest radikallerin etkisinden ve oksidatif stresle ortaya çıkan apoptozisten korur. Bu özelliklerinden dolayı CAIII'ün HCC'de araştırılması gereken özel bir gen olduğu düşünülmektedir [56].

CAIII, CAII ve CAI genleri yan yana lokalizedirler ve amino bakımından %65 oranında benzerlik göstermektedirler. Ancak çok geniş bir ailenin üyesi olan CAIII; düşük CO₂ hidratize etkisi, defosforile fosfotirozin rezidülerine sahip olma, fosfataz aktivitesi ve sulfanamid inhibitörlerine direnç gösterme kabiliyeti gibi özellikleriyle ailenin diğer üyelerinden ayrılmaktadır. CAII ve CAI'e bu kadar çok benzerlik göstermesine rağmen bu iki genden daha az ekspresyon ve biyolojik aktivite gösteren CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonu henüz net olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmalarımızın amacı CAIII'ün transkripsiyonel regülasyonunu açıklığa kavuşturmadır[65].

Bu nedenle öncelikli olarak CAIII geninin dizisi gen bankasında tarandı ve analiz edildi. +86/-939bp'lik promotör bölgesine özel primerler dizayn edilerek, bu bölgenin çoğaltılması ve klonlanması sağlandı. Bu amaçla öncelikli olarak sağlıklı bir erkek bireyden kan alınarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. İstenilen bölgeye ait primerler dizayn edilerek CAIII promotör bölgesi klonlanmıştır. Ayrıca 1025 bp'lik CAIII promotör dizisinin olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri

analiz edildi. Yapılan bu analizler, 1025 bç lik promotor bölgesinde pek çok transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi bulunmuştur. Sıçan CAIII promotorunda fonksiyonel regülasyonun aydınlatılması sonucu, transkripsiyon faktörü ile regüle olduğu anlaşılmıştır. Aynı transkripsiyon faktörleri insan CAIII promotor bölgesinde de olup olmadığı biyoinformatik analizlerle tespit edilmiş ve bu bölgelerin gerçekte aktif olup olmadığı ancak fonksiyonel testlerle mümkün olacaktır. Bunun için transkripsiyonel regülasyonunun çalışılması için haberci bir vektör sistem olan pMet-luc lusiferaz vektörü içine CAIII promotoru klonlanmıştır. Çalışmada gelecekte yapılacak ilk deneyler arasında olacaktır.

Yapılan literatür taramalarında CAIII geninin doku ekspresyonu ile ilgili çok sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Asit-baz dengesinin sağlanmasında, bir çok hastalığın işleyişinde ve kanserde tanısında ve tedavisinde çok önemli bir yere sahip olan CA ailesinin iskelet kasına spesiflik gösteren üyesi, CAIII'ün ekspresyonunu belirlemek amacıyla belirli hücre hatlarındaki ifadesine bakıldı. Bu amaçla öncelikli olarak CAIII genine spesifik, +1/+595 bç'lik bölgeyi çoğaltan primerler dizayn edildi. HT-29, DU145, PC3, MCF7, Hep3B, Saos2, MG63 ve HUVEC hücre hatlarından elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonları yapıldı. cDNA eldesi sağlanarak, RT-PZR tekniği ile hücre hatlarındaki ekspresyonu belirlendi. Agaroz jel elektroforezi ile belirlenen sonuçlara göre CAIII'ün HT-29, MG63, Saos2 ve HUVEC hücre hatlarında ekspre olduğu belirlendi. Buna karşın Hep3B, DU145, PC3 ve MCF7 İfade olmadığı belirlenmiştir. Literatür taramaları incelendiğinde öncesinde CAIII'ün ekspresyonu ile ilgili bu hücre hatlarında bir bilgi verilmediği ve bu konunun aydınlatılması tarafımızca yapılmıştır.

Sitokinlerin biyolojik sistemlerdeki etkileri oldukça fazladır. Bu nedenle çalışmamızda sitokinlerin CAIII mRNA'sı üzerine etkisini belirlemek amacıyla CAIII'ün ekspresyonu belirlenen bu hücre hatlarından HT-29 seçilerek, sitokinlerin CAIII'ün ekspresyon seviyesinde etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IFN- γ sitokinlerinin her birinden 500U/ml olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde hücre pelletleri toplanarak, bu pelletlerden RNA izolasyonları ardından da cDNA sentezleri yapıldı. Dizayn edilen spesifik primerler kullanılarak qRT-PZR tekniğiyle HT-29 hücre hattında sitokinlerin CAIII ekspresyonuna etkileri belirlendi. Ct değerleri analiz edilerek oluşturulan grafiklerde

bütün sitokinlerin CAIII'ün ekspresyon seviyesini analiz ettik. CAIII, kasa spesifik bir protein olduğu için sitokinlerin kas dokusu üzerindeki etkilerine baktığımızda bir çoğunun nekrotik karakterleri baskıladığını, apoptotik faaliyetleri sınırlandırdığını görmekteyiz. Özellikle bu sitokinlerle ilgili yapılan çalışmalarda, IL-1 α 'nın kas dokularında nekrotik faaliyeti azalttığı ve apoptotik süreci sınırladığı; IL-6'in sarkoplazma üzerinde sarkoplazmik retikulum inhibe ederek ATPaz aktivitesini e etmekte; TNF- α 'nın kas dokusu üzerinde birçok etkisinin olduğunu ve özellikle hücre siklusunu, kanser sürecini, nörolojik hastalıkları, anormal kas durumlarını, organizma zararlarında etkin rol oynadığını, kanser hücre hattında yapılan çalışmalarda TNF- α uygulanan hücre hattı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, TNF- α uygulanan hücre hattında gen ekspresyon seviyelerinin oldukça düştüğü; IL-6 mRNA'sı kas eksersizleri sırasında düşük seviyelerde ekspre olurken, tümörlü kas dokusunda IL-6 ekspresyon seviyesi oldukça fazla artış göstermekte olduğunu; TGF- β , normal kas dokusunun büyümesi, farklılaşması, rejenerere ve stres durumlarında aktif rol oynayarak ortam şartlarının eski hale dönmesi için sinyal molekül görevi yapmakta olduğunu; IFN- γ 'nin ise direnç gösterme ve stress koşullarında etkin olduğu belirtilmiştir. Bizde yaptığımız çalışmalarda HT-29 hücre hattına uygulanan TGF- β 'nın, TNF- α 'nın, IL-1 α 'nın, IL-6'in ve IFN- γ 'nin CAIII mRNA'sı üzerindeki etkisinin bu yapılan çalışmalarla koorele göstermekte olduğunu ve Real-Time PZR sonuçlarımızda da bu sitokinlerin CAIII mRNA seviyesini azalttığı gösterilmiştir [92- 96].

mRNA düzeyinde ifade eliken CAIII geninin kolon karsinom hücre hattı olan HT-29 hücre hattında protein düzeyinde ekspre olduğunu belirlemek üzere, Western Blot çalışmaları yapıldı. 39 kD'luk CAIII proteinin HT-29 hücre hattında belirlendi. Sitokinlerin CAIII geninin protein düzeyinde etkisinin belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saat ilgili sitokinle muamele edilen hücrelere CAIII'e spesifik monoklonal antikor kullanılarak, Western blot çalışması yapıldı. Western blot sonucunda CAIII protein düzeyinde sitokin uygulaması sonucu mRNA düzeyindeki sitokin etkileri ile koreledir. Zaman bağlı değişim grafikleri incelendiğinde, her zaman dilimi için kullanılan 500U/ml TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IFN- γ sitokinleri CAIII'ün protein düzeyinde de baskılanmasına neden olmuştur.

4.1 Gelecekteki Planlar

Gelecekteki çalışmalarımızda, insan CAIII genine ait olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri transkripsiyon deneyleriyle belirlenecek; farklı uzunluklardaki konstraklar oluşturularak promotör dizisinin aktif dizisi belirlenecektir. mRNA düzeyinde etkisi olan sitokinlerin CAIII promotörü üzerindeki etkileride transfekte edilen promotör parçalarına sitokin uygulanmasıyla tespit edilecektir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, T., "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Inhibition of Human Tumor Associated Isozymes IX and Cytosolic Isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2298, (2007).
- [2] Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Sulfonylated Amino Acid Hydroxamates with Mmp Inhibitory Properties Act as Efficient Inhibitors of CA Isozymes I, II, and IV, and N4 Hydroxysulfonamides Inhibit Both These Zinc Enzymes 1", *J. Med. Chem.*, 43, 3677, (2000).
- [3] Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Pharmacol. Ther.*, 74, 1, (1997).
- [4] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med. Chem. Imm., Endoc. & Metab. Agents*, 1, 61, (2001).
- [5] http://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic_anhydrase (16.07.2011).
- [6] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase as Targets for Medicinal Chemistry", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007).
- [7] Maren, T. H. , "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition.", *Physiol. Rev.*, 47, 595, (1967).
- [8] Kopacek, J., Barathova, M., Dequiedt, F., Sepelakova, J., Kettmann, R., Pastorek, J., Pastorekova, S., "MAPK pathway contributes to density- and hypoxia- induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1729, 41-49, (2005).

- [9] Leppilampi, M., "Functional And Immunohistological Studies On Cancer Associated Carbonic Anhydrase IX, Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University Of Oulu, (2006).
- [10] Maren, T.H., "The kinetics of HCO_3^- synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO_2 elimination." *Annu Rev Physiol*, 50, 695, (1998).
- [11] Chegwidan, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., "In the carbonic Anhydrase New Horizons", Birkhauser Verlag, Basel, 343-363,(2000).
- [12] Keha, E.E., "Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu", Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).
- [13] Wistrand, P.J., "The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO_2 by the human erythrocyte", *Acta Physiologica Scandinavica*, 343, (1981).
- [14] Kaiser, E.T., and Lo, K.W., "The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane", *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912, (1969).
- [15] Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., "Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat", *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170, (1989).
- [16] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T, "Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators and Their Use in Therapy", *Expert Opin. Ther., Patents*, 16, 1627, (2006).
- [17] Wistrand, P.J., "The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO_2 by the human erythrocyte", *Acta Physiologica Scandinavica*, 343, (1981).
- [18] Schcer, A., Dietsch, P., "A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase", *Annals New York Acad. Sci.*, 429, 241, (1984).

- [19] Armstrong, J., Myers, Mc.D., Verpoorte, J.A., and Edsall, J.T., "Purification and properties of human erythrocyte Carbonic anhydrase", *J. Biol. Chem.*, 214, 5137, (1966).
- [20] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., "On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and Medical Research", *Molecular Structure and Regulation*, 7, 79, (1983).
- [21] Deutsch, H.F., "Carbonic anhydrase", *Int. J. Biochem.*, 19, 100, (1987).
- [22] Wistrand, P.J., "Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase", *J. Med. Sci.*, 85, 75, (1980).
- [23] Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., "Localization of Carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture", *J. Appl. Physiol.*, 53, 914, (1982).
- [24] Lin, K.T.D., Deutsch, H.F., "Human Carbonic anhydrase XII, the complete structure of the CA isoenzyme", *J. Biol. Chem.*, 249, 2329, (1974).
- [25] Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., Hopkins, D.A., "Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle", *Biochem. Genetics*, 17, 837, (1979).
- [26] <http://talks.php.net/presentations/slides/mdb/images/> (01.08.2006)
- [27] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy." *Exp Opin Ther Patents*, 12, 217–242, (2002).
- [28] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential." *Exp Opin Ther Patents*, 10, 575–600, (2000).

- [29] Hewett-Emmett D., " Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families." In: Chegwiddden W.R., Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases—New horizons*. Basel: Birkhauser Verlag, 29, 78, (2000).
- [30] Smith, K. S., Cosper, N.J., Stalhandske, C., Scott, R.A., Ferry, J.G., "Structural and Kinetic Characterization of an Archaeal B-Class Carbonic Anhydrase", *Journal of Bacteriology*, 182, 6605, (2000).
- [31] Lönnerholm, G., Selking, O., Wistrand, P.J., "Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract." *Gastroenterology*, 88, 1151, (1985).
- [32] Venta, P.J., Montgomery, J.C., Tashian, R.E., "Molecular genetics of carbonic anhydrase isozymes". *Isozymes Curr Top Biol Med Res*, 14, 59, (1987).
- [33] Sasaki, K., Igarashi, S.I., Amasaki, T., Amasaki, H., Nishita, T., Kano, Y., Asari, M., "Comparative immunohistolocalization of carbonic anhydrase isozymes I, II and III in equine and bovine digestive tract." *Histochem J*, 25, 304, (1993).
- [34] Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Rajaniemi, H., Parkkila, S., Milovanov, A.P., Castellucci, M., Kaufmann, P., "Immunohistochemistry of carbonic anhydrase in human placenta and fetal membranes." *Histochemistry*, 101, 91, (1994).
- [35] Tashian, R.E., Hewewtt-Emmett, D., Carter, N.D., Bergenhem, N.C.H., "Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. In:Chegwiddden WR, Carter ND & Edwards YH (eds) *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*." Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 105-120, (2000).
- [36] Sly, W.S., ve Hu, P. Y. "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." *Annu Rev Biochem*, 5, 50, (1995).
- [37] Parkkila, S., Parkkila, A. K., Juvonen, T., Waheed, A., Sly, W. S., Saarnio, J., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H. "Membrane-bound carbonic anhydrase

IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium." *Hepatology*, 24, 2719, (1996).

[38] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S. "Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family." *J Biol Chem*, 279, 2719, (2004).

[39] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., "Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anydrase." *Biochem J*, 392, 83, (2005).

[40] Chen, J.C., ve Chesler, M., "pH transients evoked by excitatory synaptic transmission are increased by inhibition of extracellular carbonic anhydrase." *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7786, (1992).

[41] Karhumma, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., "Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase." *J Biol Chem*, 275, 16044, (2000).

[42] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Tagychi, T., Onishi, S., "Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to choromosome X." *J Biol Chem*, 274, 21228, (1999).

[43] Shah, G.N., Hewett-Emmett, D., Grubb, J.H., Migas, M.C., Fleming, R.E., Waheed, A., Sly, W.S., "Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: diffrences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distint physiological roles." *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 1677, (2000).

[44] Fernley, G., "Secreted carbonic anhydrases", *From Biochemistry and Genetics to Phisiology and Clinical Medicine*, 178-185, (1991).

- [45] Fernley, R., Wright, R. and Coghlan, J. "A novel carbonic anhydrase from the ovine parotid gland", *FEBS Lett*, 105, 299-302, (1979).
- [46] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Rajaniemi, H., "Distribution of carbonic anhydrase isoenzymes I,II and VI in the human alimentary tract", *Gut*, 35, 646-50, (1994).
- [47] Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatozilovaa, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E.J., Zavada, J., Burny, A., Kettman, R., "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment." *Oncogene*, 9, 2877, (1994).
- [48] Parkkila, S., ve Parkkila, A.K., "Carbonic anhydrase in the alimentary tract, Roles of the Diffirent isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastroinstinal canal." *Scand J Gastroenterol*, 31, 305, (1996).
- [49] Lindskog, S., "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacol ther* 71, 1, (1997).
- [50] Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M.H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B.E., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., "Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel*Lindau transgenes." *Proc NAtl Acad Sci USA*, 95, 12596, (1998).
- [51] Chegwiddden, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., "In the Carbonic Anhydrase New horizons." *Birkhauser Verlang, Basel*, 343-363, (2000).
- [52] Hewett-Emmett, D., ve Tashian, R.E., "Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of the α -, β - and, γ -carbonic anhydrase gene families." *Mol Phylogenet Evol*, 5, 50, (1996).

- [53] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Shah, G.N., Grubb, J.H., Waheed, A., Sly, "Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons in mouse and human brain", *Proc Natl Acad Sci*, 98, 1918-1923, (2001).
- [54] Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Göttert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shah, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh, M., Sly, W.S., "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cancers", *Proc Natl Acad Sci*, 95, 7608-7613, (1998).
- [55] Liao, S.Y., Ivanov, S., Ivanova, A., Ghosh, S., Cote, M.A., Keefe, K., Coca-Prados, M., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., "Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma", *J Med Genet.*, 40, 257-261, (2003).
- [56] Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, T.S., Rajaniemi, H., "Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors", *Digestive Diseases and Sciences*, 46, 2179-2186, (2001).
- [57] Bonapace, G., Iuliano, F., Molica, S., Peta, A., Strisciuglio, P., "Cytosolic carbonic anhydrase activity in chronic myeloid disorders with different clinical phenotype", *Biochim Biophys Acta*, 1689, 179-181, (2004).
- [58] Hilvo, M., "Expression studies on carbonic anhydrase IX." Master Thesis, Institute of Medical Department, University of Tampere, Italy, (2005)
- [59] Chegwidan, W. and Carter, N., "Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidan WR, Carter ND and Edwards YH (eds), *The carbonic anhydrases*. New Horizons, Birkhauser Verlag, 13-28, (2000).

- [60] Parkkila, S., "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumor progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU International*, 101, 16-21, (2008).
- [61] Gramlich, T., Hennigar, R.A., Spicer, S.S., Schulte, B.A., "Immunohistochemical localization of sodium-potassium-stimulated adenosine triphosphatase and carbonic anhydrase in human colon and colonic neoplasms", *Arch Pathol Lab Med*, 114, 415-9, (1990).
- [62] Bonapace, G., Iuliano, F., Molica, S., Peta, A., Strisciuglio, P., "Cytosolic carbonic anhydrase activity in chronic myeloid disorders with different clinical phenotype", *Biochim Biophys Acta*, 1689, 179-181, (2004).
- [63] Kim, S.J., Rabbani, Z.N., Vollmer, R.T., Schreiber, E.G., Oosterwijk, E., Dewhurst, M.W., Vujaskovic, Z., Kelley, M.J., "Carbonic anhydrase IX in early-stage non-small cell lung cancer", *Clin Cancer Res*, 10, 7925-7933, (2004).
- [64] Lynch, C.J., Brennan, W.A., Vary, T.C., Carter, N., Dodgson, S.J., "Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats", *Am J Physiol*, 264, 621-630, (1993).
- [65] Hilvo, M., Rafajova, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S., "Expression of carbonic anhydrase IX in mouse tissues", *J Histochem Cytochem*, 52, 1313-1321, (2004).
- [66] Huei-Yue, D., Chih-Chen, H., San-Chi, L., Ming-De Y., Gi-Ming L., Ann-Lii, C., Shuang-En, C., "Carbonic Anhydrase III Promotes Transformation and Invasion Capability in Hepatoma Cells Through FAK Signaling Pathway." *Molecular Carcinogenesis*, 47, 956-963, (2008).
- [67] Vaananen, H.K., Syrjala, H., Rahkila, P., Vuori, J., Melamies, L.M., Myllyla, V., Takala, T.E., "Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction", *Clin Chem.*, 36, 635-638, (1990).

- [68] Beuerle, J.R., Azzay, H.M., Styba, G., Duh, S.H., Christenson, R.H., "Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise and myocardial infarction patients", *Clin Chim Acta*, 295, 215-228, (2000),.
- [69] Cabisco, E., Levine, R.L., "The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4170-4174, (1996)
- [70] Yıldırım, H., "Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi" , Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Balıkesir, (2009).
- [71] Iliçaklı, S. R., "Bazı Sitokinlerin İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde CAIX İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009)
- [72] Jones, C.M., Lyons, M., Hogan, B.L., "Expression of TGF-beta-related genes during mouse embryo whisker morphogenesis" *Ann N Y Acad Sci.*, 26, 339-44, (1991).
- [73] Lynch, C.J., Hazen, S.A., Horetsky, R.L., Carter, N.D., Dodgson, S.J., "Differentiation-dependent expression of carbonic anhydrase II and III in 3T3 adipocytes." *Am J Physiol.*, 265, 234-43, (1993).
- [74] Sudhir, G., "A Decision between life and death during TNF-a-induced signaling", 22(4), (2002).
- [75] Idriss, H., Naismith, J.H., "TNFa and TNF Receptor Superfamily: Structure-Function relationship(s)", *Mic Res Tech* , 50, 184-195, (2000).
- [76] Beyaert, R., Fiers, W., "Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity What we do understand and what we do not", *FEBS Lett*, 340, 9-16, (1994).

[77] Wajant, H., Grell, M., Scheurich, P., "TNF receptor associated factors in cytokine signaling", *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10, 15-26, (1999).

[78] Arch, R., Thompson, C.B., "4-1BB and OX40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor sub-family that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor κ -B", *Mol Cell Biol*, 18, 558-65, (1998).

[79] Lee, S., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C., and Choi, Y., "TRAF2 is essential for JNK but not NF- κ -B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival", *Immunity*, 7, 703-13, (1997).

[80] Roberts, A., "TGF- β signaling from receptors to the nucleus", *Microbes and Infection*, 1265-1273, (1999).

[81] Huang, S. and Huang, J. "TGF-B Control of Cell Proliferation", *J Cell Biochem*, 96, 447-462 , (2005).

[82] Akhurst, R.J., Derynck, R., "TGF-13 signaling in cancer a double-edged sword", *Trends Cell Biol* , 11, 44-51, (2001).

[83] Jakowlew, S., "Transforming growth factor-B in cancer and metastasis", *Cancer Met Rev*, 25, 435-457, (2006),.

[84] Apte, R. and Voronov, E., "Is interleukin-1 a good or a bad guy in tumor immunobiology and immunotherapy?", *Immunological Rev*, 222, 222-24,1(2008).

[85] Apte, R.N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M.R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., Voronov, E., "The involvement IL-1A in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions", *Cancer Met Rev*, 25, 387-408, (2006).

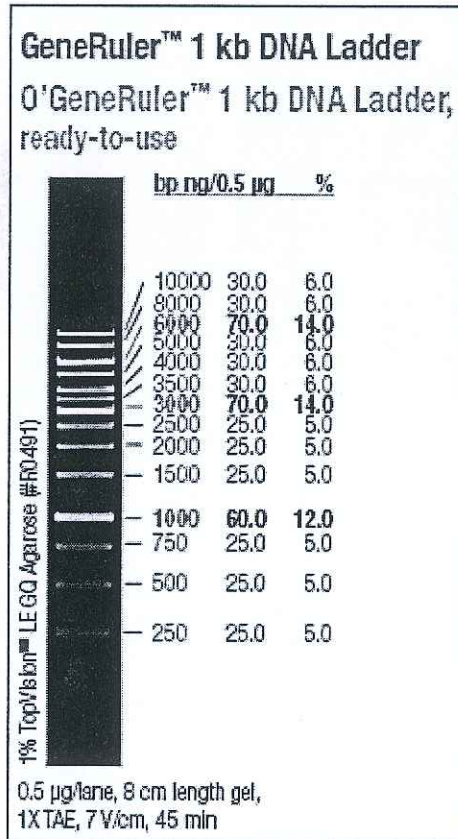
[86] http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_6 (16.09.2011)

- [87] Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., Graeve, L., "Interleukin-6-type cytokine signalling through the GP130/Jak/STAT pathway." *Biochem J*, 334, 297, (1998).
- [88] Hirono, T., Ishihara, K., Hibi, M., "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors." *Oncogene*, 19, 2548, (2000).
- [89] http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway (16.09.2011)
- [90] <http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon-gamma> (16.09.2011)
- [91] http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/images/signalpathway/ifn_gamma.gif (16.09.2011)
- [92] Tyesha, N., Burks, I., and Ronald, D., "Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies." *Skeletal Muscle*, 1, 19, (2011).
- [93] James A. C., and Kristen A. B., "Interleukin-6 as a Key Regulator of Muscle Mass during Cachexia" *Exerc Sport Sci Rev.*, 38, 168–176, (2010).
- [94] Murray C.H. C., Sara T., Nichola L. F., Martin R. B., "Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis Induces Interleukin-1–Directed Inflammation" *Circulation Research*, 106, 363-372, (2010).
- [95] Emiel F. M. W., "Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Proc Am Thorac Soc.*, 2, 26–33, (2005).
- [96] Shephali B., Siva K. P., Sanjay K. G., Saurabh D., Robert F. L., Ashok K., "Tumor Necrosis Factor- α Regulates Distinct Molecular Pathways and Gene Networks in Cultured Skeletal Muscle Cells" *PLoS ONE*, 5, 10, (2010).

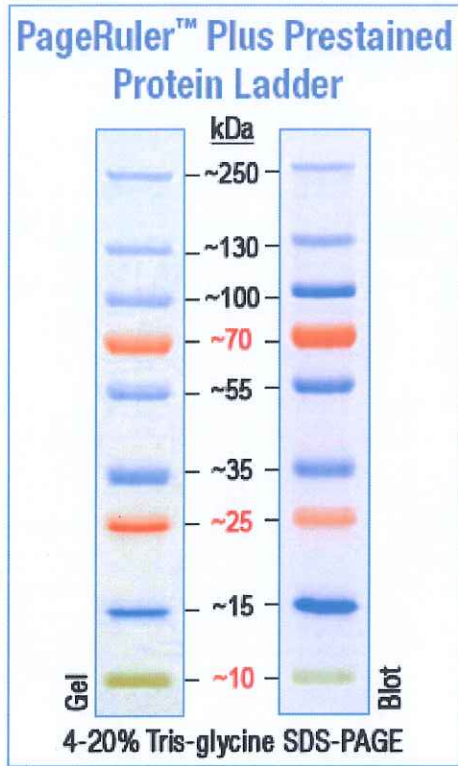
EKLER

6. EKLER

6.1 Kullanılan Markerlar



Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA marker



Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein marker (Thermo)

6.2 Olası Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri

TFMATRIX entries with High-scoring:

1	TTGCAATCTC TCATTGTATC TTGGAGAGCA AGACCACAGG TTTTAAGAAA	entry	score
		<-----	AML-1a 100.0
		----->	HSF 100.0
		----->	HSF 96.0
	----->		NIT2 95.0
		<-----	Poly A 93.8
		-	GCN4 91.3
		-----	C/EBPb 88.7
	----->		ADR1 87.7
		<-----	cap 87.4
		<-----	Ttk 69 86.7
	----->		cap 85.3
		---	CdxA 85.0
51	TATGACTCAT TTTATGTTAG TGGCCTTCCA ATACTTCAGA ATATTCTTGA	entry	score
		----->	HSF2 98.1
		<-----	HSF2 98.1
	<-----		AP-1 95.5
		----->	HSF 95.4
		<-----	HSF 95.4
	----->		AP-1 94.3
		----->	HSF 94.3
		<-----	HSF 94.3
	----->		AP-1 93.7
		----->	HSF1 93.5
		<-----	HSF1 93.5
	----->		CdxA 92.1
	----->		GCN4 91.3
	----->		CdxA 91.0
	<-----		GCN4 89.9
	-->		C/EBPb 88.7
		<--	Brn-2 88.1
	----->		cap 87.7
	-----		cap 87.4
		<--	Pbx-1 87.3
	----->		Oct-1 86.9
	----->		AP-1 86.3
	----->		AP-1 85.6
	----->		cap 85.5
	---->		CdxA 85.0
		<-----	CdxA 85.0
101	TTTTTCATGA ACAGAGGTAC AGCTCAGGGA GTGTGGCTAA ATCAGTCCCA	entr	score
		----->	cap 98.1
	----->		p300 95.0
	-----	---	cap 91.3
			Brn-2 88.1
	----->		ADR1 87.7
	-----		Pbx-1 87.3
	>		Oct-1 86.9
		<-----	cap 86.7
	----->		HSF 86.3
151	GTCTCCAGCT CCGCGTGAAC CTGGGATCCA GACATCTCCT GGATATCTGG	entry	score
	----->		cap 91.3
		----->	NIT2 91.2
		<-----	GATA-2 89.7
		<-----	NIT2 88.8
	<-----		ADR1 87.7
	<-----		ADR1 87.7
	----->		StuAp 87.7
		<-----	GATA-1 87.3
	----->		HSF 86.3
		-----	E2F 86.2
		<-----	GATA-2 85.8
	----->		GATA-2 85.8
		<-----	GATA-1 85.3

