

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

**KARBONİK ANHİDRAZ 9 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL  
KONTROLÜNÜN MOLEKÜLER ANALİZİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Hatice YILDIRIM**

**Balıkesir, Eylül-2009**

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

KARBONİK ANHİDRAZ 9 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL  
KONTROLÜNÜN MOLEKÜLER ANALİZİ


DOKTORA TEZİ

Hatice YILDIRIM

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Feray KÖÇKAR

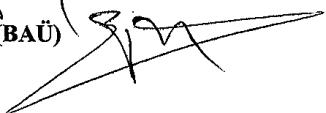
Sınav Tarihi: 28.09.2009

Jüri Üyeleri: Doç.Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL (Ü) 

Doç. Dr. Kemal Sami KORKMAZ (EÜ) 

Doç. Dr. Selma SİNAN (BAÜ) 

Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ) 

Balıkesir, Eylül-2009

Bu doktora alışması Balıkesir Üniversitesi 2007/ 09 No'lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Bu doktora alışması TUBİTAK TBAG 105T326No'lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### KARBONİK ANHİDRAZ 9 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL KONTROLÜNÜN MOLEKÜLER ANALİZİ

Hatice YILDIRIM

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

(Doktora Tezi/Tez danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR)

Balıkesir, 2009

Transmembran karbonik anhidraz enzimlerinden olan CAIX, tümör metabolizması ile ilişkili olarak bilinen en önemli enzimlerden biridir. CAIX tümörlü hücrelerin hücre içi ve hücre dışı pH düzenlenmesini sağlayarak hipoksik ve asidik koşullara adaptasyonunu sağlar. Özellikle katı tümörlerdeki CAIX ekspresyonu, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu enzimin biyobelirteç olarak kullanılmasına izin vermektedir.

Bu nedenle tümör biyolojisinde önemli olan *CA9* geninin regülasyonun aydınlatılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada, insan *CA9* geninin promotor bölgesi [-1251/+38] klonlanmış ve dizi analizi ile doğrulanmıştır. Transkripsiyonel aktivitenin detaylı analizi için dört farklı uzunlukta [-935/+38, -466/+38, -266/+38 ve -116/+38] kısaltılarak yapılan promotor parçaları hazırlanmış ve lusiferaz vektörüne klonlanmıştır. Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için, hazırlanan promotor mutantlarının hepatoma (Hep3B) hücrelerinde geçici transfeksiyon analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak en küçük promotor parçasının [-116/+38] bazal aktivite için yeterli olduğu bulunmuştur. [-266/+38] ve [-1251/+38] bölgelerini kapsayan promotor parçaları en yüksek transkripsiyonel aktiviteyi gösterirken, [-466/+38] bölgesini kapsayan promotor parçası ise en düşük aktivite göstermiştir.

Ayrıca Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$  ve IL-6 sitokinlerinin *CA9* mRNA seviyesine etkileri belirlenmiştir. RT-PZR çalışmaları sonucunda, TGF- $\beta$

uygulanmasının 72 saatte *CA9* mRNA seviyesinde yükselmeye sebep olduğu gözlemiştir. IL-6 uygulanmasının ise 24, 48 ve 72 saatte *CA9* mRNA seviyesinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Yine TGF- $\beta$  sitokinin CAIX protein seviyesindeki etkisi akış sitometri analizi ile belirlenmiştir. mRNA seviyesindeki artış ile bağlantılı olarak CAIX protein ifadesinde 72 saatte artış bulunmuştur. Son olarak TGF- $\beta$ 'nın *CA9* geninin transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı, beş farklı uzunluktaki promotor parçalarının transfekte edildiği hücrelere TGF- $\beta$  uygulanması ile belirlenmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** CAIX, transkripsiyonel kontrol, kanser, Hep3B, sitokin, klonlama, TGF- $\beta$ .

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CARBONIC ANHYDRASE 9 GENE**

**Hatice YILDIRIM**

**Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology**

**(PhD. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)**

**Balikesir-Turkey, 2009**

Membrane-associated carbonic anhydrase CAIX is one of the most important enzyme, that is related to tumor metabolism. CAIX exerts its biological effects to adaptation of hypoxia and asidification in tumor cells, via its influence on regulation of intracellular and extracellular pH. Specifically the expression pattern of CAIX in solid tumors has led to the use of CAIX as a biomarker, since it can provide evidence about tumor identification and prognosis.

Therefore, it is so important to evaluate the regulation of *CA9* gene that it is so crucial in tumor biology. In this work, the promoter region [-1251/+38] of *CA9* gene was cloned and confirmed by sequence analyzer. Four truncated constructs were prepared for detailed analysis of transcriptional activation and subcloned to luciferase reporter vector. Transient transfection analysis has performed in hepatoma cell line Hep3B using promoter mutants for determination of transcriptional activity. As a result, the smallest construct [-116/+38] was enough to exhibit the basal transcriptional activity. while [-266/38] and ([1251/+38] promoter constructs have the maximum transcriptional activity, [-466/+38] promoter construct has the minimum activity.

Furthermore, we have determined the effects of TGF- $\beta$  and IL-6 on mRNA levels of *CA9* expression in Hep3B cells. As a result of RT-PCR analysis, TGF- $\beta$  has increased the *CA9* mRNA levels at 72 hours after stimulation, while IL-6 has no

statistically important effect on *CA9* mRNA levels at any time. We have also determined the the effect of TGF- $\beta$  on protein levels of CAIX by flow cytometry. In concordance with the increase at mRNA level, CAIX protein level was increased by TGF- $\beta$  at 72h. Finally, the increase of transcriptional activity of *CA9* by TGF- $\beta$  was also evaluated by transfecting all truncated constructs to Hep3B cells and then stimulating by TGF- $\beta$ .

**KEYWORDS:** CAIX, transcriptional regulation, cancer, Hep3B, cytokine, cloning, TGF- $\beta$ .



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEYWORDS	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOL LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖNSÖZ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser	1
1.2 Kanser Biyolojisi	2
1.3 Transkripsiyonel Regülasyon	4
1.4 Transkripsiyonun Başlangıcı ve Genel Transkripsiyon Faktörleri	8
1.5 Hücre ve Doku Tipine Spesifik Transkripsiyon Başlangıcı	10
1.6 Transkripsiyonel Regülasyonda Görev Alan Diğer Transkripsiyon Faktörleri ve DNA Dizileri	12
1.7 Karbonik Anhidrazlar	14
1.7.1 Karbonik Anhidrazların Dağılımı ve Fizyolojik Önemleri	15
1.7.2 Karbonik Anhidraz IX	17
1.7.2.1 Hipoksiya, HIF-1 $\alpha$ ve CAIX	20
1.8 Sitokinler	23
1.8.1 TGF- $\beta$	24
1.8.2 IL-6	27
1.9 Çalışmanın Amacı	28
2. MATERYAL VE METOT	30
2.1 Materyal	30
2.1.1 Kimyasallar	30

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	32
2.1.3 Stok Solüsyonlar	34
2.1.3.1 Kandan DNA İzolasyonu Solüsyonları	34
2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	34
2.1.3.3 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	35
2.1.3.4 Transfeksiyon ,Lusiferas ve Beta-gal Aktivite Solüsyonları	35
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler	36
2.1.4.1. pGEMT easy	36
2.1.4.2 pGL2-basic	37
2.1.4.3 $\beta$ -Gal	37
2.1.4.4 RSV	38
2.2 Metotlar	38
2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	38
2.2.2 DNA İzolasyonu ve Klonlama	39
2.2.2.1 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	39
2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)	39
2.2.2.3 Primer Tasarımı	40
2.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi	40
2.2.2.5 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu	40
2.2.2.6 PCR Ürünlerinin T:A Klonlaması	40
2.2.2.7 Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)	41
2.2.2.8 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)	41
2.2.2.9 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi	41
2.2.2.10 Kompetent Hücre Hazırlanması	42
2.2.2.11 Transformasyon	42
2.2.2.12 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu	42
2.2.2.13 Bakteriyel Kültür Ortamı	43
2.2.2.14 Antibiyotikler	43
2.2.3 Hücre Kültürü Teknikleri	43
2.2.3.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması	43
2.2.3.2. FCS Hazırlanması	43
2.2.3.3. PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması	43
2.2.3.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları	44

2.2.3.5 Hücre Soyunun Başlatılması	44
2.2.3.6 Hücrelerin Büyütülmesi	44
2.2.3.7 Hücrelerin Pasajlanması	45
2.2.3.8 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı	45
2.2.3.9 Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması	46
2.2.3.10 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon	46
2.2.3.11 Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması	47
2.2.3.12 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	47
2.2.3.13 Beta-Galaktosidaz Aktivite Ölçümü	47
2.2.4 RNA İlişkili Teknikler	47
2.2.4.1 Toplam RNA İzolasyonu	47
2.2.4.2 Reverse Transkriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PCR)	48
2.2.4.3 cDNA Sentezi (RT)	48
2.2.4.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	48
2.2.5 Akış Sitometri Analizleri	49
2.2.5.1 Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması ve Analiz	49
2.2.6 İstatistiksel Analiz	49
3. BULGULAR	50
3.1. Genomik DNA İzolasyonu	51
3.2 CA9 Promotorunun Klonlanması	51
3.2.1 Primer Tasarımı	51
3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)	53
3.2.3 İnsan CA9 Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu	54
3.2.4 İnsan CA9 Promotorunun pGL2-Basic Vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu	56
3.2.5 Otomatik Dizi Analizi	57
3.2.6 İnsan CA9 Promotorunun Yeniden Klonlanması ve Dizi Analizi	60
3.3 Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Oluşturulması	60
3.3.1 973bç [-935/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması	62
3.3.2 304bç [-266/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması	63

3.3.3 504bç [-466/+38] Uzunluğında Promotor Parçası Oluşturulması	65
3.3.4 154bç [-116/+38] Uzunluğında Promotor Parçası Oluşturulması	69
3.4 İnsan <i>CA9</i> Geni Promotorunun Karakterizasyonu	73
3.5 İnsan <i>CA9</i> Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi	80
3.5.1 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi	80
3.6. Karaciğer Hücrelerinde IL-6 ve TGF- $\beta$ sitokinlerinin <i>CA9</i> Ekspresyonuna Etkileri	83
3.6.1 RT-PCR analizlerinin optimizasyonu	84
3.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları ve Optimizasyonu	86
3.6.3 Hep3B Hücre Hattında TGF- $\beta$ 'nin <i>CA9</i> Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	89
3.6.4 Hep3B Hücre Hattında IL-6'in <i>CA9</i> Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	93
3.6.5 Hep3B Hücre Hattında TGF- $\beta$ 'nin CAIX Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi (Akış Sitometri Analizi)	97
3.7 TGF- $\beta$ 'nin Karbonik Anhidraz 9 Transkripsiyonel Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi ve Sorumlu Promotor Bölgesinin Aydınlatılması	100
4. SONUÇ VE TARTIşMA	103
5. EKLER	113
6. KAYNAKLAR	121

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Simge</b>	<b>Adı</b>
CA	(Carbonic Anhydrase) Karbonik anhidraz
CAIX	(Carbonic Anhydrase IX) Karbonik anhidraz IX izoenzimi
CA9	(Carbonic Anhydrase 9) Karbonik anhidraz 9 geni
CARP	(Carbonic Anhydrase Related Protein) Karbonik anhidraz ilişkili protein
HRE	(Hypoxia Responce Element) Hipoksi yanıt elemanı
HIF	(Hypoxia Induced Factor) Hipoksi uyarıcı faktör
HBS	(HIF Binding Site) HIF bağlanma bölgesi
RCC	(Renal Cell Carcinoaoma) Böbrek hücre karsinoması
VHL	(Von Hippel Lindau) Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geni
TGF	(Transforming Growth Factor) Transforme edici büyüme faktörü
IL	(Interleukin) İnterlökin
IFN	(Interferon) İnterferon
TNF	(tumor Necrosis Factor) Tümör nekroz faktörü
CSF	(Colony Stimulating Factor) Koloni uyarıcı faktör
PCR	(Polymerase Cahin Reaction) Polimeraz zincir reaksiyonu
TF	(Transcription Factor) Transkripsiyon faktörü
cDNA	(Complementary DNA) Komplementer DNA
FBS	(Fetal Bovine Serum) Doğmamış dana serumu
EDTA	(EthyleneDiamineTetraacetic Acid) Etilendiamintetra asetikasit
mRNA	(Messenger Ribonucleic Acid) Mesajcı ribonükleik asit
PI3K	(Phosphoinositide 3-kinase) Fosfoinositol 3 kinaz
MAPK	(Mitogen-activated protein kinase) Mitojen aktive protein kinaz
JAK	(Janus Kinase) Janus Kinazlar
ERK	(Extracellular signal-regulated kinases) Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz
CDK	(Cyclin dependent kinase) Siklin- Bağımlı Kinaz
CKI	(Cyclin dependent kinase inhibitor) Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitörü
TBP	(TATA Binding Protein) TATA bağlanma proteini
TAF	(TBP Associated Factor) TBP-ilişkili faktör
HAT	(Histone acetyltransferase) Histon asetil transferaz
CREB	(cAMP Responce Element Binding) cAMP yanıt elemanına bağlanan protein
C/EBP	(CCAAT Enhancer Binding protein) CCAAT enhansır bağlanma proteini
ODDD	(Oxygene Dependent Degradation Domain) Oksijen bağımlı yıkım domaini
BMP	(Bone Morphogenetic Protein) Kemik morfojenetik proteini
TBR	(TGF- $\beta$ receptor) TGF- $\beta$ reseptör
EMBL	(European Molecular Biology Laboratory) Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
DDBJ	(DNA Data Bank of Japan) Japonya DNA Veri Tabanı

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1. 1 Hücre siklusu ve kontrol noktaları	4
Şekil 1. 2 Gen ifadesi ve kontrol basamakları	6
Şekil 1. 3 Bazal transkripsiyonun başlangıç aşaması ve genel transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla RNA polimerazın promotora bağlanma aşaması	11
Şekil 1.4 Bazı düzenleyici DNA elementlerin yerleşimin şematik gösterimi	13
Şekil 1.5 CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi	15
Şekil 1.6 CAIX'un yapısal bölgeleri	17
Şekil 1.7 CAIX izoenziminin tümördeki pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi	19
Şekil 1. 8 Normal oksijen ve hipoksik koşullarda <i>CA9</i> geninin regülasyonu	22
Şekil 1. 9 TGF- $\beta$ aracılığı ile gen ekspresyonunun kontrolü	26
Şekil 1.10 IL-6 aracılığı ile gen ifadesinin kontrolü	28
Şekil 2.1 PGEMT-Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi	36
Şekil 2. 2 pGL2-Basic vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi	37
Şekil 2. 3 pCMV $\beta$ -Gal vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi	37
Şekil 2. 4 pRSV-Luc vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi	38
Şekil 2. 5 Hep3B hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi	44
Şekil 2. 6 Hemositometre	45
Şekil 3.1 İnsan <i>CA9</i> promotorunun klonlanması ve analizinin akış diyagramı	50
Şekil 3.2 Genomik DNA jel görüntüsü	51
Şekil 3.3 <i>CA9</i> Primerlerin saç tokası yapıları	52
Şekil 3.4 PCR reaksiyon sonucu jel görüntüsü	54

Şekil 3.5 Jelden geri kazanılan 1289 bç'lik promotorun jel görüntüsü	55
Şekil 3.6 pGEMT easy vektörüne klonlanan promotorun KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	55
Şekil 3.7 pGL2-basic vektörüne klonlanan promotorun KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	56
Şekil 3.8 Klonlanan ve dizi analizine gönderilen insan <i>CA9</i> promotor dizisi ile Z54349 gen bankası erişim numaralı DNA data bankasındaki insan <i>CA9</i> genomik klonunun karşılaştırılması	59
Şekil 3.9 İnsan <i>CA9</i> promotorunun yeniden klonlanması	60
Şekil 3.10 Rekombinant insan- <i>CA9</i> plazmiti kullanılarak farklı uzunluklarda promotor parçalarının oluşumunun şematik gösterimi	61
Şekil 3.11 İnsan <i>CA9</i> promotorunu içeren rekombinant pGL2-basic vektörünün SmaI ve NheI ile restriksiyon kesim sonucu jel görüntüsü	62
Şekil 3.12 pGL2-Basic vektörüne klonlanan 973bç [-935/+38] promotorun SmaI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	63
Şekil 3.13 973bç [-935/+38] <i>iCA9</i> promotor parçasını içeren rekombinant pGL2-basic vektörünün PvuII –NheI restriksiyon kesim sonucu jel görüntüsü	64
Şekil 3.14 pGL2-basic vektörüne klonlanan 304bç [-266/+38] promotorun NcoI ve HindIII ile kontrol kesim sonucu	65
Şekil 3.15 [-466/+38] <i>CA9</i> promotor bölgesine spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli	66
Şekil 3.16 504bç [-466/+38] uzunluğunda promotor parçası PCR sonucu jel görüntüsü	68
Şekil 3.17 pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 504bç [-466/+38] promotor parçasının KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	68
Şekil 3.18 pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 504bç [-466/+38] promotor parçası KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	69
Şekil 3.19 [-116/+38] <i>CA9</i> promotor bölgesine spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli	70
Şekil 3.20 154 bç [-116/+38] uzunluğunda promotor parçası PCR sonucu jel görüntüsü	72

Şekil 3.21 PGEM-T Easy vektörüne klonlanan 154bç [-116/+38] promotör parçasının KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	72
Şekil 3.22 pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 154bç [-116/+38] promotör parçası KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	73
Şekil 3.23 İnsan CA9 promotöründe yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri	77
Şekil 3.24 İnsan CA9 promotör bölgesinin <i>Mus musculus</i> CA9 promotör bölgesi ile karşılaştırılması	79
Şekil 3.25 CA9 promotör parçalarının bazal aktivitelerinin karşılaştırmalı analizi	82
Şekil 3.26 Farklı sitokinlerin CAIX ekspresyonuna etkilerinin analizi	83
Şekil 3.27 RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü	85
Şekil 3.28 ORF-CA9 Primerlerin saç tokası oluşturma potansiyelleri	86
Şekil 3.29 CA9 ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 30 döngülük PZR sonucu jel görüntüsü	88
Şekil 3.30 CA9 ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 20 döngülük PZR sonucu jel görüntüsü	88
Şekil 3.31 CA9 ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 25 döngülük PZR sonucu jel görüntüsü	89
Şekil 3.32 Hep3B hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat TGF- $\beta$ uygulamasının CA9 mRNA seviyesindeki etkileri	91
Şekil 3.33 Hep3B hücrelerinde 72 saat TGF- $\beta$ uygulamasının CA9 mRNA seviyesindeki etkileri	92
Şekil 3.34 Hep3B hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat IL-6 uygulamasının CA9 mRNA seviyesindeki etkileri	94
Şekil 3.35 Hep3B hücrelerinde 24 ve 48 saat IL-6 uygulamasının CA9 mRNA seviyesindeki etkileri(I)	95
Şekil 3.36 Hep3B hücrelerinde 24 ve 48 saat IL-6 uygulamasının CA9 mRNA seviyesindeki etkileri (II)	96
Şekil3.37 Hep3B hücrelerinde kontrol gruplarının CAIXakış sitometri analizi	98



Şekil 3.38 Hep3B hücrelerinde sitokin uygulanmış grupların CAIX akış sitometri analizi	99
Şekil 3.39 Hep3B hücrelerinde 72 saat TGF- $\beta$ uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri	100
Şekil 3.40 TGF- $\beta$ uygulamasının farklı uzunluklardaki insan CA9 promotor parçaları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması	102
Şekil 4.1 Farklı uzunluklardaki insan CA9 promotor parçalarının aktivitelerinin Hep3B hücrelerinde karşılaştırılması	108

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2. 1 Çalışmada kullanılan kimyasallar	30
Çizelge 2. 2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	32
Çizelge 2. 3 Kandan DNA izolasyonu solüsyonları	34
Çizelge 2. 4 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	34
Çizelge 2. 5 Formaldehit agaroz jel elektroforezi solüsyonları	35
Çizelge 2. 6 Transfeksiyon, Lusiferaz ve $\beta$ -gal Aktivite Solüsyonları	35
Çizelge 3.1. Dizayn edilen spesifik primerin dizisi, Tm değeri, ve uzunlukları	52
Çizelge 3.2 İnsan CA9 promotorunun amplifikasyonu için PCR koşulları	53
Çizelge 3.3 Dizayn edilen [-466/+38] CA9 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri, ve uzunluğu	66
Çizelge 3.4 504bç [-466/+38] promotor parçasının çoğaltılması için kullanılan PCR koşulları	67
Çizelge 3.5 Dizayn edilen [-116/+38] CA9 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri, ve uzunluğu	70
Çizelge 3.6 154bç [-116/+38] promotor parçasının çoğaltılması için kullanılan PCR koşullar	71
Çizelge 3.7 İnsan CA9 promotoru üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin lokasyonları	78
Çizelge 3.8 Dizayn edilen spesifik primerlerin dizisi ve uzunlukları	85
Çizelge 3.9 İnsan- $\beta$ -2 mikroglobilin genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları	87
Çizelge 3.10 CA9 dizisinin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları	87
Çizelge 4.1 Sitokinlerin farklı zaman aralıklarında CAIX mRNA seviyesine etkileri	109

## ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel bölümünün ilk kısmı Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji laboratuvarında, ikinci kısmı ise Erasmus Programı kapsamında bulunduğum İngiltere/Cardiff Üniversitesi, Dr. Dipak P. RAMJI'nin Moleküler Hücre Biyolojisi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez alışmalarım Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında yürütölmüş ve sonuçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yol gösteren ve her zaman destek olan, hem bilimsel yönüyle hem de bireysel olarak örnek aldığım çok değerli hocam, Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Sezai TÜRKEK ve Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a çalışmalarım sırasındaki destekleri, yönlendirmeleri ve ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca İngiltere'deki deneysel çalışmalarım sırasında beni destekleyen Dr. Dipak P. RAMJI'ye ve çalışma grubunda bulunan herkese çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman her konuda bana destek olan ve yardımını esirgemeyen değerli hocam, Doç. Dr. Selma SİNAN'a tüm kalbimle teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında birlikte çok iyi zaman geçirdiğimiz ve desteklerini her zaman hissettiğim grup arkadaşlarım, Arş. Gör Sümeyye A. TÜRKOĞLU ve Arş. Gör. Meltem AYDIN'a, ayrıca çok değerli yardımları ve desteği için Ferit KARANFİL'e çok teşekkürler.

En zor günlerimde hep yanımda olan, hem mutluluklarımı hem de dertlerimi paylaştığım çok değerli arkadaşlarım Tuğba O. SEVİNDİK, Aylin ER ve Selma ÇELEN'e, desteklerinden dolayı çok çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen canım annem ve canım babama çok ama çok teşekkür ederim. Ayrıca değerli kardeşlerime hem yardımları için hem de anlayış ve sabırları için minnettirim, iyi ki varsınız..

Son olarak varlığı ile hayatımı mutlu kılan, sevgili eşim Seyfettin Erkan YILDIRIM'a yaşamın her anındaki desteği, anlayışı ve sabrı için sonsuz teşekkür ederim.

Balıkesir, 2009-08-31

Hatice YILDIRIM

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kanser

Kanser genç-yaşlı, zengin-fakir, kadın-erkek ya da çocuk tüm insanları etkileyen ve önemi giderek artan, toplumsal bir sağlık sorunu durumundadır. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükseldi. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere tutulmaktadır. 60 yaşın üzerindeki grupta ise kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir. Yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı her iki cinste de yüksek olmakla birlikte, habis melanom dışındaki deri kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşüktür. [1,2]

Tedavisi ve tanısı bir çok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektiren kanser için, cerrahi ve radyoterapi gibi lokal tedavi yöntemleri ile birlikte kemoterapi yada immünoterapi gibi sistemik tedaviler de uygulanmaktadır. Bunun dışında her geçen gün kanser araştırmalarından elde edilen yeni gelişmeler kanser tedavisi için yeni umutlar vaat etmektedirler. Hücrenin mikroskobik düzeydeki yapısı ve işleyişine yönelik moleküler biyoloji çalışmaları, tıbbi yönelik nükleer alandaki yeni gelişmeler, daha az hasar ve daha güzel görüntü oluşturan yeni cerrahi teknikleri, kısaltılmış-süreli radyoterapi gibi yeni tıbbi tedaviler bugün kanserde hem yaşam kalitesini artırmakta hem de daha uzun yaşam ve düşük maliyeti getirmektedir. Sağlıklı yaşamı yöneten genlerin normalden sapmalarının, kanser de dahil olmak üzere, birçok hastalığın nedeni olduğu ortaya konulduktan sonra kanserin gen tedavisinin sağlanabilmesi için çok yönlü çalışmalar yapılmıştır. Üzerinde çalışılan

gen tedavisi tekniklerinin hedef aldıkları amaçlar şunlardır. (i) Değişikliği veya eksikliği ile kanser nedeni olabilen bazı genlerin sağlıklı genlerle değiştirilmesini, (ii) bağışıklık cevabının düzeltilmesini, (iii) kemoterapi ve radyoterapi veya diğer tedavileri daha duyarlı kılmak için tüm bu yaklaşımların birlikte uygulamasını, (iv) kanser ilaçlarının yüksek dozlarının yan etkilerine karşı daha dayanıklı olmasını sağlamak için kan-yapıcı ana hücreler içerisine gen yerleştirilmesine veya (v) kanser hücrelerinin yeni kan damarları yapımını önleme amacına yöneliktir.

Kanser; normal hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize edilir. Kanserli hücreler, normal kontrol mekanizmalarını kaybedip sürekli olarak çoğalır. Bunun sonucunda tümör oluşumu gerçekleşir. Oluşan hücreler embriyonik hücreleri ve dokuları andıran koloniler halinde bulunur ve bu hücreler tam farklılaşmamıştır. Hücreler normal dokulardan ayrılarak komşu dokulara doğru saldırganlık özelliği gösterirler. Bulunduğu yerden daha farklı ve yeni yerlere doğru gelişmeye meyil gösterirler ve kazanılmış bu özellik tip tüm kanser hücrelerinde aynen sürdürülür [3,4]. Halen tüm mekanizmaları tam olarak anlayamamış olan kanserin aydınlatılması ve her evrede tedavisinin mümkün hale getirilebilmesi için yoğun olarak çalışmalar sürmektedir. Kanser teşhis ve tedavi maliyeti en yüksek olan hastalıklardandır. Kişilerin ölümüne sebep olmasının yanı sıra, kişinin hayat kalitesini düşüren ve işgücü kaybına uğratan bir hastalıktır.

## **1.2 Kanser Biyolojisi**

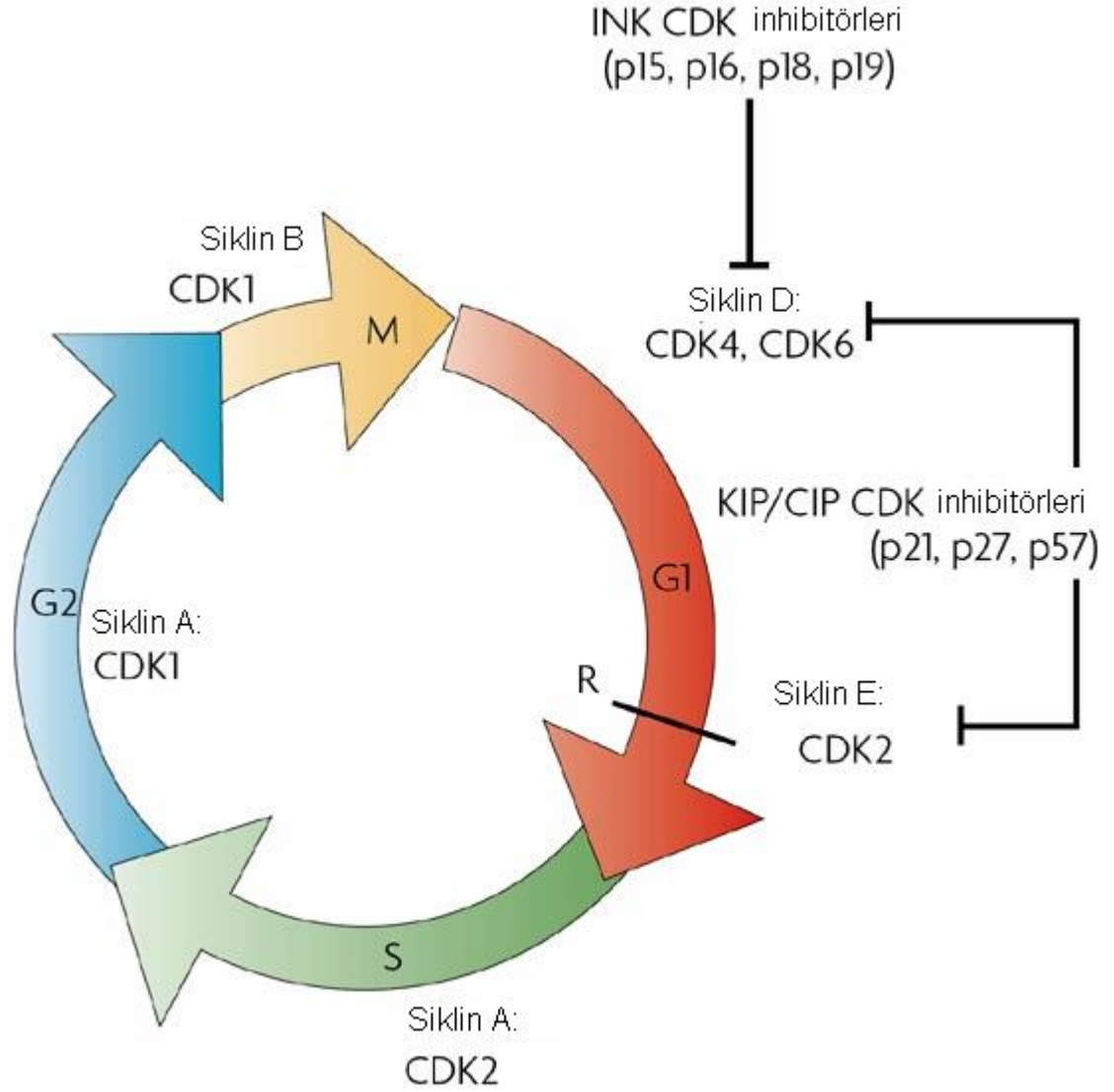
Çekirdeği olan her hücre teorik olarak çoğalabilme kabiliyetinde ise de, hücreleri çoğalma yeteneğine göre üç gruba ayırabiliriz. İlk grup kemik iliği ve gastrointestinal sistemin epitel hücreleri gibi sürekli ama kontrollü bir şekilde kendini yenileyen kök hücrelerden oluşmaktadır. İkinci grupta karaciğer hücreleri, periferik lenfosit ve makrofajlar gibi uyarıldığı zaman çoğalan hücreler yer alırken son grupta ise yaşam boyu bir kez çoğalan hücreler vardır. Bunlardan başka normal olmayan bir grup daha vardır ki; doğal olarak apoptozise uğramayan ölümsüz olduğu kabul edilen ve sürekli çoğalan kanser hücreleridir [5].

Her hücre, çoğalma, farklılaşma, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programların kontrolündedir [6]. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif ( $G_1$ ,  $G_2$ , S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen  $G_0$  fazında beklerler. Bir sıklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda, sinyal iletimi adı verilen bir ileti mekanizması (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforlar ya da nukleusa ulaşıp (STAT'da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu kontrol eder [7].

Hücre siklusu, siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CKI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karışık bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken, diğer taraftan da yıkılırlar. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise "ubikitin (ubiquitin)" metabolik yoluyla sağlanır. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür (Şekil 1.1).

Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'lerin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CKI'ler

(p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'lerin kendisi ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. [8].



Şekil 1. 3 Hücre siklusu ve kontrol noktaları [9].

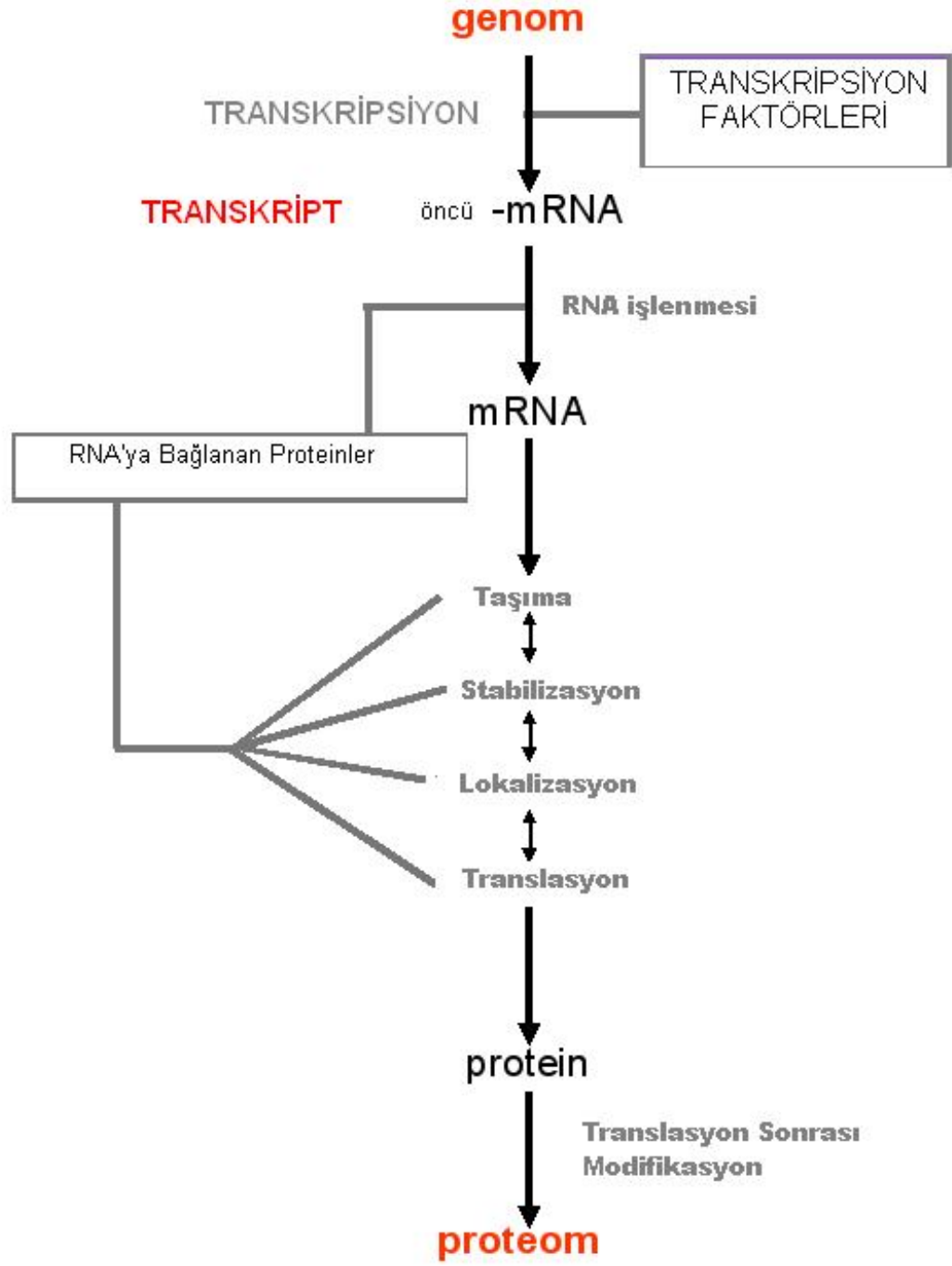
### 1.3 Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücrel farklılaşmanın ve her türlü hücrel işlevin odak noktasını oluşturmaktadır. Çok hücreli bir organizmanın tüm hücreleri aynı genetik

materyale sahip olmasına rağmen, hücre tipleri farklı fonksiyonlara sahiptir ve çevreden gelen sinyallere farklı cevaplar verir. Hücreler aynı genetik bilgiye sahip olmalarına rağmen, bu bilgi her hücre tipi için farklı şekillerde işlenmektedir. Organizma gen regülasyonu sayesinde, belirli bir hücre tipinde belirli bir gen takımını, farklı hücre tiplerinde ise diğer farklı gen takımını çalıştırabilme yeteneğine sahip olmaktadır. Çok hücreli organizmalarda gen regülasyonu, genomun özgün kısımlarını etkin hale geçiren, diğer genleri baskılayan kontrol mekanizmaları ile açıklanmaktadır [10]. Gen ekspresyonu sürecinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, hücrelerin çevresel uyarıcılara ve metabolik ihtiyaçlarına cevap verilmesi yani gelişiminin ve farklılaşmasının da kontrolü anlamına gelmektedir.

DNA'da şifrelenmiş olarak bulunan genetik bilginin protein şekline dönüşmesi süreci, DNA'nın RNA'ya transkripte olması, RNA'nın işlenmesi, protein sentezi (translasyon) ve post-translasyonel değişikliklerin yapıldığı basamaklardan oluşmaktadır [11] (Şekil 2). Bu basamakların her birinde gen ekspresyonunun kontrolü mümkün olsa da, hücrelerde mutlak gerekli olan ve maksimum enerji tasarrufu açısından da önem teşkil eden transkripsiyon basamağındaki kontrol en yaygın olanıdır ve genlerin çoğunluğunda bu basamakta regülasyon yapılmaktadır. Transkripsiyon basamağındaki kontrol genin ifade olup olmayacağına dair karar verilen kontrol aşaması olarak açıklanabilir [12].





Şekil 1. 4: Gen ifadesi ve kontrol basamakları [13].

Ökaryotlarda gen ifadesinin başlangıç aşaması, genin düzenleyici dizisi olan promotor bölgesine spesifik proteinlerin ve ardından RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve transkripsiyonun başlaması şeklinde gerçekleşmektedir [11,14]. RNA polimeraz II ökaryotlarda bulunan üç RNA polimerazdan bir tanesidir ve hücrede mRNA ve diğer birçok küçük RNA'ların transkripsiyonundan sorumlu olan enzimdir. RNA polimerazII'nin aktivitesi genellikle transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarı kısmında bulunan düzenleyici DNA dizileri (cis-acting elements) ile bağ yapabiren birtakım spesifik proteinler (trans-acting) arasındaki etkileşime bağlıdır [11,15,16,17]. Bu diziler genellikle transkripsiyonun başlangıç noktasının üst kısmında 5' bölgede bulunurlar. Transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumlu olan düzenleyici DNA dizileri; (i).Basal promotor elementleri; başlangıç noktasının tanımlanmasında ve transkripsiyonun bazal seviyede minimum oranda devam etmesinde kritik rol oynarlar [18]. (ii).Yukarı bölge düzenleyici elementler [11]. (iii). Enhansörler; promotör aktivitesini artırıcı dizilerdir [19,20]. (iv). Silensörler; enhansörlere benzer tarzda işlev görürler fakat transkripsiyonu baskılayıcı dizilerdir [21]. (v).Lokus kontrol bölgeleri, birçok geni içeren lokusun ekspresyonunu düzenleyici dizilerdir [22].

Trans-acting faktörler ya da transkripsiyon faktörleri spesifik DNA dizilerine bağlanarak, direkt ya da dolaylı olarak RNA polimeraz II ile etkileşerek transkripsiyonu etkilemektedirler. Genel transkripsiyon faktörleri II. sınıf genlerin çekirdek promotor dizilerine bağlanarak transkripsiyonun başlangıç aşamasında RNA polimeraz II ile etkileşirler. Düzenleyici transkripsiyon faktörleri ise fonksiyonlarını çekirdek promotorun alt ya da üst kısmında bulunan dizilere bağlanarak ve genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek gerçekleştirirler [23]. Çekirdek promotor elementleri, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun başlatılması için minimum düzeyde gerekli olan DNA elementlerini içermektedir. Çekirdek promotorlar transkripsiyonun başlangıç bölgesi olan +1 noktasını ve yaklaşık 35 nükleotitlik aşağı ve yukarı promotor bölgesini içermektedir. Genler arasında çekirdek promotor elementleri açısından varyasyonlar görünse de, genellikle TATA kutusu, TFIIB tanıma dizisi, başlatıcı ve aşağı çekirdek promotor elementi dizileri bulunmaktadır.[16,24,25].

## 1.4 Transkripsiyonun Başlangıcı ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyonun başlangıcı sırasında oluşan öncül-başlangıç kompleksinin oluşumuna dair iki farklı model vardır. Birincisi genel transkripsiyon faktörlerinin basamak basamak bağlanarak oluşan öncül-başlangıç kompleks oluşum modeli, daha güncel çalışmaların desteklediği diğer model ise RNA polimeraz II transkripsiyon kompleksinin “holoenzim” modelidir. Holoenzim modeline göre, genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II promotora tek basamakta bağlanırlar. Ayrıca aracı adı verilen çoklu protein kompleksi de RNA polimeraz II ve TFIIF ile ilişki halindedir.[20, 23, 26, 27]. İlk olarak, Young ve arkadaşları tarafından 1994 yılında mayada bulunan holoenzim komplekslerinin, neredeyse bütün genlerin ifadesi için aracı kompleksin gerekli olduğunu göstermiştir [28,29]. Memelilerde yapılan çalışmalar ise mayalarda bulunan aracı kompleksin alt üniteleri ile benzerlik gösteren (ortolog), 28 alt üniteden oluşan bir kompleksin varlığını göstermiştir. Henüz tam olarak holoenzim komplekslerinin transkripsiyondaki mekanizmaları aydınlatılmamıştır. Bununla beraber, mekanizmanın aracı kompleks, transkripsiyonel aktivatörler, RNA polimeraz II, genel transkripsiyon faktörleri ve ko-faktörler arasındaki kompleks bir ağı içerdiği kesindir [27].

RNA polimeraz II'nin ve TFII-A, -B, -D, -E, -F ve -H genel transkripsiyon faktörlerinin çekirdek promotor bölgeye bağlanması ile başlayan transkripsiyon, genel olarak aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır [23].

**a) TFIID'nin Çekirdek Promotora Bağlanması** Bazal transkripsiyonun başlayabilmesi için, öncelikle TFIID kompleksi TATA kutusuna bağlanır. TFIID, TBP (TATA Binding Protein) ve TAF (TBP-Associated Factors ) adı verilen ilave faktörlerden oluşur. TFIID'nin TATA kutusunu tanımasını sağlayan TBP alt ünitesidir. Ayrıca TFIID, hem histon asetil transferaz (HAT) hem de kinaz aktivitesine sahiptir [30]. Kinaz aktivitesi ile kendi kendini fosforile ederken, HAT aktivitesi ile kromatinin yapısındaki değişiklikleri düzenleyerek genel transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlamaktadır [31-33].

**b) TFIIA ve TFIIB'nin Bağlanması** TBP ve TATA kutusu arasındaki etkileşim, TFIIA ve TFIIB gibi ilave faktörlerin bağlanması ile daha kararlı hale gelir. TFIIA, TBP-DNA kompleksine bağlanarak TBP'nin TATA kutusuna olan

afinitesini artırır. TFIIB ise RNA polimeraz II/TFIIF kompleksi ile TFIID arasında fiziksel bir bağlantı sağlaması açısından önemlidir [23,25].

**c) RNA polimeraz II/TFIIF Oluşumu ve Başlangıç Kompleksine Bağlanması** TFIID ve TFIIB'nin promotora bağlanması RNA polimerazın komplekse bağlanabilmesi için önkoşuldur. Ancak RNA polimeraz II, TFIIF olmaksızın tek başına bu komplekse bağlanamaz. TFIIF, RNA polimeraz II'nin transkripsiyondaki spesifikliğini ve etkinliğini artırır. Özellikle RNA polimeraz II'nin DNA üzerindeki promotor olmayan bölgelere bağlanmasını engelleyerek yanlış transkripsiyonları önler [16,23].

**d) TFIIE ve TFIIH'nin Başlangıç Kompleksine Bağlanması** RNA sentezi ancak TFIIE ve TFIIH'nin komplekse bağlanmasıyla başlayabilmektedir. TFIIE, RNA polimeraz II ve TFIIF'nin komplekse bağlanmasından sonra katılır. TFIIE bağlandıktan sonra, kinaz ve helikaz aktivitesi olan TFIIH'nin komplekse bağlanmasıyla, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatabilmesi için uygun şartlar sağlanmış olur [16, 34].

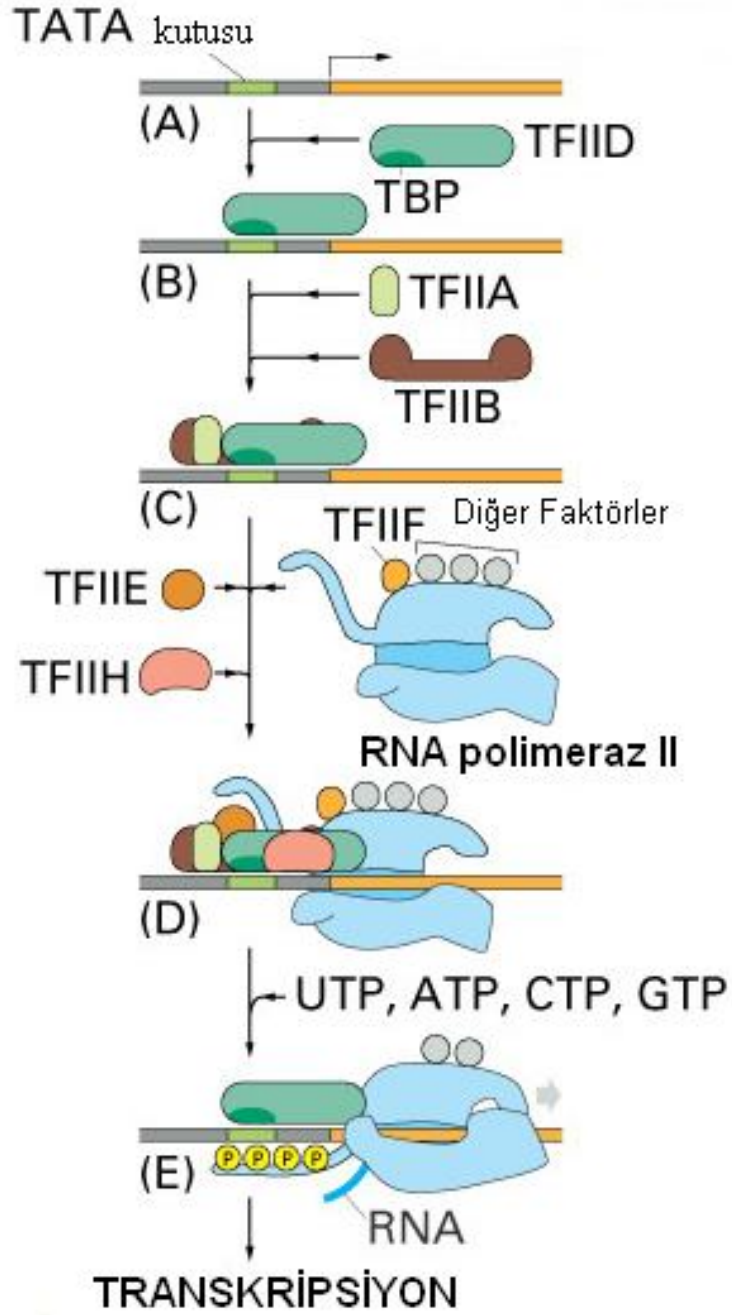
**e) Promotor Temizlenmesi ve mRNA Uzaması** mRNA'nın ilk fosfodiester bağının oluşmasının ardından, RNA transkriptinin uzaması, RNA polimeraz II'nin başlangıç kompleksinden ayrılmasına sebep olur. Buna promotor temizlenmesi adı verilir. Promotor temizlenmesinin ardından RNA transkripti DNA kalıbı boyunca uzamaya devam eder. Transkripsiyonun başlangıç aşamasından uzama aşamasına geçmesinde RNA polimeraz II'nin kovalent modifikasyonu etkilidir. RNA polimeraz II'nin büyük alt biriminin karboksi terminal domaininin fosforillenmesi ile RNA sentezinin başlaması aynı anda gerçekleşmektedir [16, 23].

RNA polimeraz II'nin promotoru tanıyıp bağlanmasından sonra, DNA kalıp zincirinin ilk nükleotidine komplementer olan birinci 5'-ribonükleozit trifosfatın takılmasını gerçekleştirerek sentezin başlama basamağını katalizler. Polimerizasyon bir sonraki komplementer ribonükleotitin girmesi ve bir öncekine fosfodiester bağı ile bağlanması şeklinde devam eder [10]. Uzama basamağı oldukça dinamik ve transkripsiyonun yüksek oranda kontrol edildiği basamaklardandır [35, 36, 37]. RNA pol II'ye bağlı TFIIE/H transkripsiyon faktörleri uzama sırasında DNA onarımında da görevlidirler. Transkripsiyonun sonlanması, RNA sentezine ara vermek olarak tanımlanabilir çünkü DNA kalıbından ayrılan RNA polimeraz II yeni mRNA'ların sentezinde kullanılmak üzere RNA polimeraz II havuzuna toplanır. Ökaryotlarda

transkripsiyonun sonlanması için belirgin sinyaller yoktur ve bu sürecin tam olarak moleküler mekanizmasının aydınlatılması için çalışmalar sürmektedir [36,38]. Sentezlenen RNA molekülü “işlenme” adı verilen ve olgun mRNA oluşmasını sağlayan basamaklardan sonra protein sentezinde kullanılır.

### **1.5 Hücre ve Doku Tipine Spesifik Transkripsiyon Başlangıcı**

Yakın geçmişe kadar, öncül başlangıç kompleksinin oluşturulduğu bazal transkripsiyon basamağının, organizmanın bütün hücre tiplerinde aynı olduğu düşünülüyordu. Ancak güncel çalışmalar, özellikle yüksek yapılı ökaryotlarda hücre tipine ve bazı durumlarda ise gene spesifik bazal transkripsiyon faktörlerinin homologlarının varlığını göstermiştir. Bu araştırmalar, TBP-benzeri proteinlere (TRF=TBP-related factor) ve dokuya spesifik birçok TFIID'nin TAF bileşenlerine homolog proteinlerin karakterizasyonlarına öncülük etmiştir [39]. Sonuç olarak, ökaryotlarda bazal transkripsiyon mekanizması hücre ya da dokuya spesifik bileşenlere sahiptir ve bu ökaryotlarda transkripsiyonun çeşitliliğini ve kompleksliğini artırmaktadır.



Şekil 1. 3: Bazal transkripsiyonun başlangıç aşaması ve genel transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla RNA polimerazın promotora bağlanma aşaması [40].

## 1.6 Transkripsiyonel Regülasyonda Görev Alan Diğer Transkripsiyon Faktörleri ve DNA Dizileri

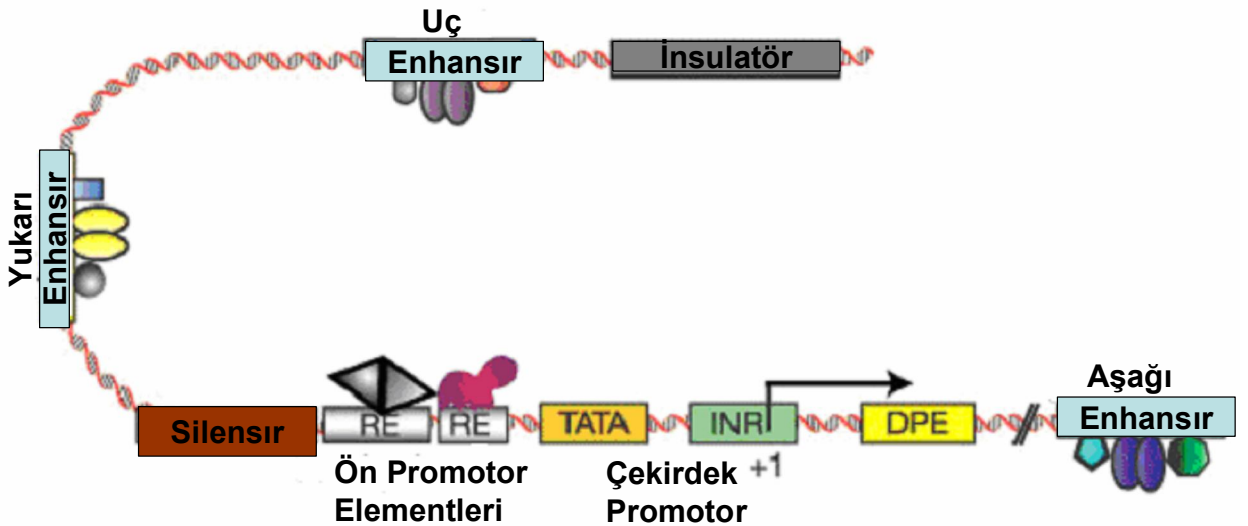
Yukarıda *in vitro* sistemlerde transkripsiyonun başlangıcı açıklanmıştır. Burada belirtildiği gibi çekirdek promotör dizileri, yalnızca RNA polimeraz II tarafından bazal transkripsiyonun başlatılmasında görev almaktadır. Bazal transkripsiyon *in vivo* olarak gözlenmez bu yalnızca *in vitro* transkripsiyonu tarif etmek için kullanılan bir terimdir. *In vivo* sistemlerde DNA paketlenmiş olarak bulunduğu ve bu durumun genellikle transkripsiyonel baskılanmaya yol açmasından dolayı, transkripsiyonda farklı transkripsiyon faktörleri görev almaktadır. Bu faktörler çekirdek promotör bölgeden uzakta bulunan DNA dizilerine (enhansır, silencer, insulator) bağlanarak ve merkezi promotora bağlanmış olan RNA polimeraz II ile etkileşerek transkripsiyonu düzenlerler (Şekil 1.4) [23].

Enhansırlar genin transkripsiyon başlangıç bölgesine uzak ya da yakın olmalarından bağımsız olarak, pozitif yönde transkripsiyonu etkileyen ve diğer promotör dizileri gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlayan DNA dizileri olarak tanımlanmışlardır [41]. Enhansırlara bağlanan transkripsiyon faktörleri promotora bağlanan diğer proteinler ile etkileşerek, transkripsiyonu arttırırlar (Şekil 1.4) [11]. Zamana ve dokuya özgü gen ifadesinden sorumlu olan enhansırlar genin her iki tarafında, genden biraz uzakta ya da genin içinde bulunabilirler. Enhansırlar transkripsiyon etkinliğini arttırmada en az iki farklı işlev gösterirler. Bunlardan ilki transkripsiyon faktörlerinin enhansıra bağlanması ile kromatin yapısının değişmesidir. İkincisi ise DNA'yı bükerek ya da eğerek diğer enhansırları yapıya yaklaştırarak promotörün transkripsiyon faktörleri ve polimerazlar ile doğrudan kompleks oluşturmasını sağlamasıdır [10]. Baskılayıcılar da (silencer) benzer şekilde aktiviteye sahip olmalarına karşın, isimlerinden de anlaşıldığı gibi transkripsiyonu negatif yönde etkilenmesine sebep olan dizilerdir [42].

Baskılayıcı ya da aktivatör olarak isimlendirilen, genel transkripsiyon faktörlerinin dışındaki diğer transkripsiyon faktörleri hücre/doku spesifik genlerin

transkripsiyonunda ve regülasyonunda hayati öneme sahiptirler. Aktivatör proteinler, baskılayıcı moleküllerin promotordan uzaklaştırma, öncü-başlangıç kompleksinde konformasyonel değişiklikleri indüklemeye, promotor temizlenmesi ya da uzamayı teşvik etme gibi birçok farklı yöntemle mRNA sentezini kontrol eder [23]. Baskılayıcı proteinler “aktif” ya da “pasif” olarak iki grupta incelenirler. Aktif baskılayıcı proteinler direkt kromatini hedef alırlar ve histon deasetilasyonu ya da histon metilasyonu ile genlerin susturulmasını sağlarlar. Pasif proteinler ise aktivatör proteinlerin dominant-negatif inhibitörleri gibi davranarak, ya aktivatörlerin DNA bağlanma kapasitelerini azaltır (heterodomainler oluşturarak) ya da trans-aktivasyon potansiyellerini düşürerek aktivatör proteinlerin pozitif etkilerini nötrlerler [43].

DNA’ya bağlanmış haldeki transkripsiyon faktörlerine bağlanarak onların aktivitelerinde kritik öneme sahip olan ko-faktörler, ko-aktivatörler ve ko-represörler olarak ikiye ayrılırlar. CBP (CREB-binding protein) ve p300 ko-faktörlerinin, MyoD, AP-1, p53 ve C/EBP transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi için kritik öneme sahip oldukları gösterilmiştir [11,44]. Ayrıca karakterize edilen ko-represör proteinlerden bir tanesi olan NCoR, çekirdek reseptör-ko represörlerindedir ve gen susturulması sırasında histon deasetilazların toplanmasında etkilidir [45].



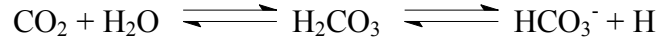
Şekil 1.4: Bazı düzenleyici DNA elementlerinin yerleşiminin şematik gösterimi [46].



## 1.7 Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidraz enzimleri (Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1), katalitik aktiviteleri için sıkıca bağlı  $Zn^{2+}$  iyonu içeren metaloenzimlerdir ve neredeyse bütün organizmalarda bulunmaktadırlar [47-49].

İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen Karbonik Anhidraz, canlılarda  $CO_2$  molekülünün hidratasyonunu ve  $HCO_3^-$  iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir [50,51].

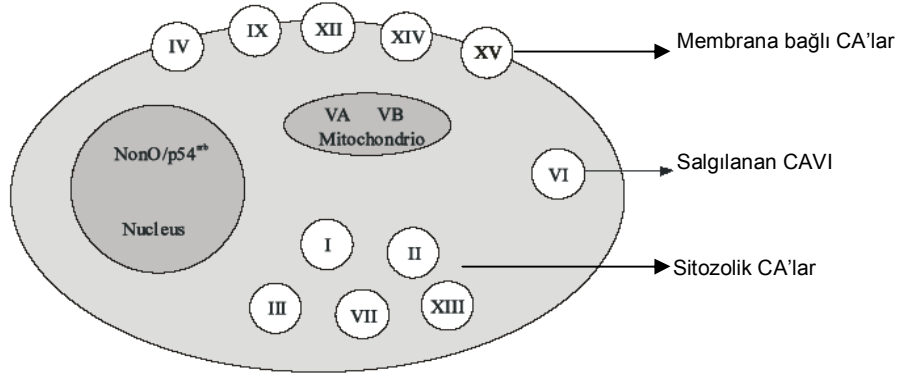


Karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlemeleri aracılığıyla bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki değişik bir çok alanda gaz değişimi, iyon transportu, su-elektrolit dengesi ve asit baz dengesinin sağlanması olaylarına katılmaktadırlar [52-59].

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 de rol oynamaktadır [60-62].

Memelilerde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. Bunların çoğu baskın olarak farklılaşmış hücrelerle ilişkilidir ve çeşitli doku ve organlarda özelleşmiş fonksiyonları yerine getirirler (Şekil.1.5). Beş çeşidi sitoplazmada bulunur (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), beş çeşidi hücre membranına bağlı olarak bulunur (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), iki çeşidinin mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir (CAVA ve CAVB). Bir çeşidi ise salgılanan bir enzimdir (CAVI). Ayrıca, henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54<sup>nrb</sup> tanımlanmıştır [63-68].

Bunun dışında CA gen ailesine dahil üç çeşit karbonik anhidraz ilişkili proteinler (CARP) de bulunmaktadır [69].



Şekil 1.5: CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi [53].

### 1.7.1 Karbonik Anhidrazların Dağılımı ve Fizyolojik Önemleri

Karbonik anhidraz enzimlerinin fizyolojik fonksiyonları genellikle insanda bulunan izoenzimlerin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır. CAII ilk olarak eritrositlerde bulunan ve insanda neredeyse bütün doku ve organlarda var olan izoenzimidir. CAI'de benzer şekilde eritrositlerde bulunan sitoplazmik bir izoenzimidir. CAI ve CAII izoenzimlerinin eritrositlerdeki en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarında metabolizma sonucu oluşan  $\text{CO}_2$ 'i  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'dönüştürmek, akciğer kapillerde ise  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'ü  $\text{CO}_2$ 'e dönüştürerek solunum olayında yer almalarıdır. Böbrek tubüllerinde de sentezlenmekte olan CAII'nin diğer önemli görevi,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'nun geri emilimini sağlamaktır. Eritrositlerde en bol olarak bulunan CAI enzimi, ayrıca göz lensinde, fetal membranlarda ve plasentada da bulunmaktadır [70-73].

Gen yapısı CAII'ye benzer olan CAIII izoenzimi, iskelet kası hücrelerinde baskın olarak bulunmaktadır [53,74]. CAIII insanda uterus, mesane, akciğer ve karaciğerde de bulunmaktadır [75,76]. CAIII'ün hücreleri oksidatif hasardan koruduğu şeklinde çalışmalar vardır.

Membranla ilişkili tespit edilen ilk izoenzim olan CAIV, gastrointestinal sistemi döşeyen epitelyum hücrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca akciğer

ve b6brekte, beyin, kalp, karaciğer ve pankreasta da CAIV bulunmaktadır. CAIV ifadesinin oto immün pankreatitis ile 6nemli bir korelasyonu g6zlenmiştir [77-80].

İnsanlarda CAVA ve CAVB olarak isimlendirilen iki adet mitokondriyal CAV izoenzimi bulunmaktadır. CAVA karaciğer ve iskelet kaslarında bulunurken, CAVB beyin, kalp, karaciğer ve b6brekte bulunmaktadır. CAVA 6rogenez ve glukoneogenezde g6rev yapmaktadır. CAVB ise bulunduğu organlara g6re farklı g6revler 6stlenmiştir [81,82].

İnsanlarda tek salgılanan CA izoenzimi olan CAVI, t6kr6k bezlerinden salgılanarak ağızda 6r6klere sebep olan bakterilerin 6rettiği asiti n6trleyerek dişlerin korunmasını sağlamaktadır [83,84]. CAVI ayrıca serumda, pankreasta, meme bezlerinde ve s6tde de bulunmaktadır [85-87].

Memelilerde 16. kromozom 6zerinde bulunan CAVII izoenzimi, mRNA seviyesinde insanda t6kr6k bezlerinde bulunmuştur [88].

CA-IX ve CA-XII izoenzimleri t6m6rl6 h6crelerde aktivitesini g6steren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir

İnsanda timuslarda, dalakta, ince bağırsaklarda, prostatta, yumurtalıklarda bulunan CAXIII izoenzimi son yıllarda karakterize edilen sitozolik enzimlerdendir [66, 89].

Yapısı CAXII ile benzerlik g6steren ve transmembran izoformlardan bir tanesi olan CAXIV, insanlarda 1. kromozom 6zerinde bulunmaktadır. CAXIV ilk olarak fare b6breklerinden izole edilmiştir. İnsanlarda beyin, kalp, karaciğer ve iskelet kasında CAXIV mRNA'sı bulunmuştur [90]. İmmunohistokimyasal 6alışmalar beyinde 6zellikle aksonlarda ve n6ronal membranlarda lokalize olan CAXIV'6n, sinaptik ge6işlerde etkili olduğu d6ř6n6lmektedir [91].

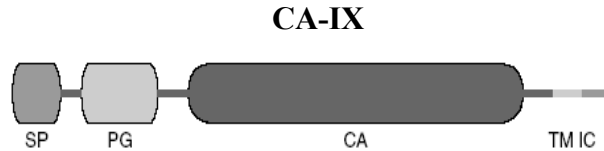
2005 yılında Hilvo ve arkadaşları tarafından karakterize edilen CAXV, yapısı ve özellikleri ile CAIV'e benzerlik gösterir ve membrana bağlı olarak bulunur [67].

Memelilerde ayrıca CA domainine sahip ancak CA aktivitesi göstermeyen, üç tane CA-ilişkili protein (CARP VIII, X, XI) bulunmaktadır [69].

### 1.7.2 Karbonik Anhidraz IX

1994 yılında Pastorek ve grubu tarafından klonlanan tümör ilişkili karbonik anhidraz IX (CAIX), ilk olarak serviks kanseri hücre hattı olan Hela'dan elde edilmiştir [53,92,93]. 1996 yılında Opavsky ve arkadaşları tarafından karakterizasyonu yapılmıştır [94]. Karbonik anhidraz IX insanlarda bulunan 15 farklı CA izoformundan biridir ve hücre dışı karbonik Anhidraz domaini içeren transmembran bir proteindir [95]. CAIX'un protein kodlayan dizisi 11 ekson içermektedir, yaklaşık 11 kb büyüklüğündedir ve 9. kromozomun p12-p13 bölgesinde bulunmaktadır. Northern blot çalışmaları CAIX geninin transkripsiyonu sonucunda 1,5 kb uzunluğunda mRNA transkripti oluştuğunu göstermiştir. Oluşan mRNA 54 ve 58 kDa büyüklüğünde iki transmembran proteini şeklinde işlenmektedir. Kanser hücre hatlarından elde edilen ve normal dokulardan elde edilen CAIX cDNA dizileri karşılaştırıldığında, tümör hücreleri ve normal hücrelerde farklı fonksiyonlara sebep olabilecek herhangi bir mutasyon bulunamamıştır [94, 96-99].

CAIX, yapı olarak bir sinyal peptid, proteoglikan bölge, karbonik anhidraz aktif bölgesi, transmembran bölgeleri ve hücre içi kuyruklara sahiptir (Şekil.1. 6) [100].



Şekil 1.6: CAIX'un yapısal bölgeleri [100].

(**SP**: sinyal peptid bölgesi , **PG**: proteoglikan bölge, **CA** : karbonik anhidraz aktif bölgesi

**TM**: trans membran bölge, **IC**: intrastoplazmik kuyruklar)

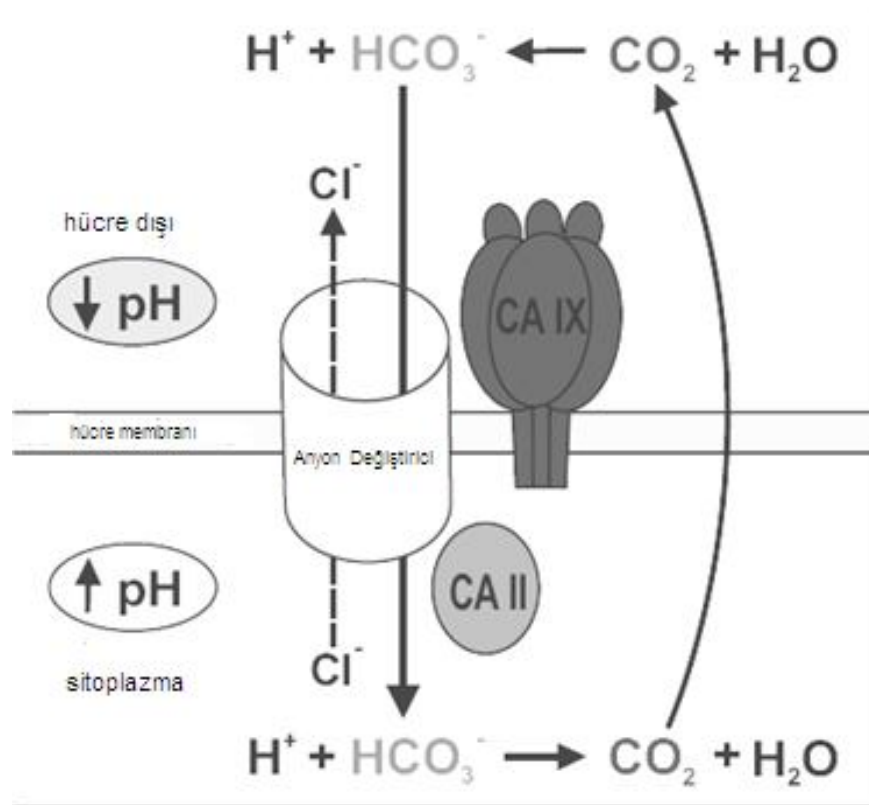
CAIX'un normal olarak ifade olduğu yerler sindirim sistemi epitellerinde bazolateral plazma membranlarıdır. Aynı zamanda midenin ve safra kesesinin mukozasında bulunur [97,98,101]. Duodenum, ince bağırsağın ilk bölümlerinde ifadesi daha fazla iken rektuma doğru gittikçe azalır [102]. Mide epitelinin aksine bağırsak epitelinde ifadesi daha çok hızlı çoğalan alanlardadır. Bu nedenle CAIX'un hücre farklılaşması ve çoğalmasında rolü olduğu düşünülmektedir. [103]. Pankreas ve safra kanallarındaki epitelde, erkek üreme organlarında ve vücut boşluklarını döşeyen mezotelde de CAIX bulunur. Normal dokulardaki CAIX ekspresyonu hücre orijini, hücre farklılaşması, iyon transferleri ve hücrel hipoksik koşullar ile yakından ilişkili görünmektedir. Birçok örnekte, HIF1- $\alpha$  protein ekspresyonu ölçülerek yapılan çalışmalar sonucunda, CAIX ekspresyonu ve hipoksiya paternleri birbiri ile uyumlu bulunmuştur[104].

Katı tümörlerdeki CAIX ifadesi Karbonik Anhidraz izoformları arasında eşsizdir ve CAIX'un hücrel hipoksiya belirteci olarak kullanılmasına izin vermektedir [105]. İnsan malignan tümörlerinde, yüksek düzeydeki CAIX ifadesi dikkat çekici şekilde serviks kanserlerinde ve böbrek kanserlerinde görülmektedir. Daha düşük düzeydeki ifade ise diğer kanser tiplerinde örneğin göğüs kanseri, akciğer kanseri, baş ve boyun kanserlerinde görülmektedir. Ancak ilginç olarak CAIX pozitif olan dokulardan köken alan tümörlerde CAIX ekspresyonu azalmış ya da yoktur [98,106-108].

Tümörlerdeki CAIX ifadesi tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermektedir. Örneğin beyin ve akciğer kanserlerinde CAIX varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir [109]. Yine farklı meme kanseri hücre hatlarında CAIX spesifik RNAi ile yapılan çalışmalar, CAIX'un hipoksi ve normal oksijen koşullarında tümör hücrelerinin yaşaması ve varlığını sürdürmesi için önemli olduğunu, CAIX'un biyolojik etkisini mikroçevredeki pH'ı etkileyerek gerçekleştirdiğini göstermiştir. CAIX spesifik RNAi ile muamele edilen hücrelerde hipoksiya sebepli Karbonik Anhidraz aktivitesi tamamen bloke edildiğinde, büyümelerinde gerileme ve hipoksi koşullarındaki yaşamlarında %50 azalma olduğu gözlenmiştir [110].

Karbonik anhidrazlar çinko içeren metaloenzimlerdir ve karbondioksite bikarbonat ve protona dönüşümünü dönüşümlü olarak katalize ederler ve böylelikle

pH'nın regülasyonunda önemli rol oynarlar. Tümör hücreleri, oksijen yetersizliğine bağlı olarak ağırlıklı olarak glikolitik metabolizmadan yararlanırlar, laktat ve protonları hücre dışına atarak hücre içi pH seviyesini fizyolojik limitler içinde tutarlar. Yakın zamandaki güncel çalışmalar, bikarbonat transporterları ile kooperatif kompleksler oluşturarak CAIX'un mikroçevredeki pH seviyesinin devamlılığında da rol oynadığını göstermektedir. Hücre içi Karbonik Anhidrazlar hücre içindeki bikarbonatların protonlarla nötralizasyonunu sağlamaktadır ve karbondioksit oluşumu sağlanmaktadır. Karbondioksit serbestçe hücre membranına doğru difüze olarak hücre dışı alana çıkmaktadır. Burada ise hücre dışı karbonik anhidrazlar tarafından yakalanarak tekrar bikarbonat ve protona dönüştürülmektedir. Bu tüm süreç protonların hücreden çıkarılmasını ve katı tümörlerin en önemli göstergesi olan hücre dışı asitliğe katkısını içermektedir (Şekil1.7).



Şekil 1.7: CAIX izoenziminin tümördeki pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi [53, 111]

Tümörlerdeki oksijen yetersizliği yani hipoksik koşullar, tümör saldırısını kolaylaştıran hücre dışı ortamın asidifikasyonu ile bağlantılıdır [112]. Ayrıca hipoksiya, asidik pH ile ilişkili olarak tümör büyümesini arttırıcı bir faktördür. Karbonik anhidraz enzimleri, pH'nın düzenlenmesi için önemlidirler ve literatürde tümör ile ilişkili olan CAIX'un sıkı bir şekilde HIF1 sinyal iletim yolu ile kontrol edildiği belirtilmiştir. Yüksek hücre yoğunluğunda, CAIX transkripsiyonunun artmasıyla çevresel hipoksiya meydana gelir. Bu durum SP1 ile HIF-1 beraber etkisiyle ilgilidir ve PI3K sinyal iletim yoluna göre işlemektedir. Hipoksiya ve hücre yoğunluğu CAIX ekspresyonu için önemli rol oynamaktadır, buna göre en yüksek CAIX ifadesi; hücre yoğunluğunun yüksek ancak oksijen yoğunluğunun düşük olduğu koşullarında gerçekleşmektedir [113]. Hipoksiya ve hücre yoğunluğu birbiri ile ilişkili ancak farklı iki yol aracılığı ile CAIX promotorunu aktive etmektedir.

#### 1.7.2.1 Hipoksiya, HIF-1 $\alpha$ ve CAIX

CAIX geninin promotoru DNase I footprinting'den korunan 5 bölge içermektedir. Bunlar transkripsiyon başlama noktasından başlayarak PR1-PR5 bölgeleridir. PR1 ve PR2 bölgeleri SP1/3 ve AP1 transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve CAIX transkripsiyonunun aktivasyonu için kritik öneme sahiptirler. PR4 delesyonu ise promotor aktivitesinde artışa neden olduğu için, transkripsiyonu negatif yönde etkilediği ve baskılayıcı olarak görev yaptığı bulunmuştur. CAIX geninin transkripsiyon başlangıcı ve PR1 bölgesi arasındaki promotor dizisi HRE (hypoxia response element) bağlanma domaini içerir ve bu element HIF1 (hypoxia inducible factor) tarafından tanınır. HIF1 ise hipoksiyaya yanıt olarak transkripsiyonun kontrolünü sağlar [113,114].

Şimdiye kadar karakterize edilen bütün HRE'ler yapısal olarak korunmuş G/ACGTg şeklinde HIF bağlanma bölgesi (HBS= HIF binding site) dizilerine sahiptirler. Korunmuş HBS bölgesi hipoksiya tarafından aktivasyon için gereklidir ancak tek başına HBS yeterli değildir. Korunmamış fakat fonksiyonel olarak kritik önemli olan diziler, HRE'nin bütünleyici parçalarıdır. TACGTG şeklindeki HBS, transkripsiyonun başlangıç noktasının hemen üst kısmındadır (-3,-10bp). HBS bölgesinde mutasyona sahip olan CA9 promotorunun inaktive olmasından ve HIF1- $\alpha$

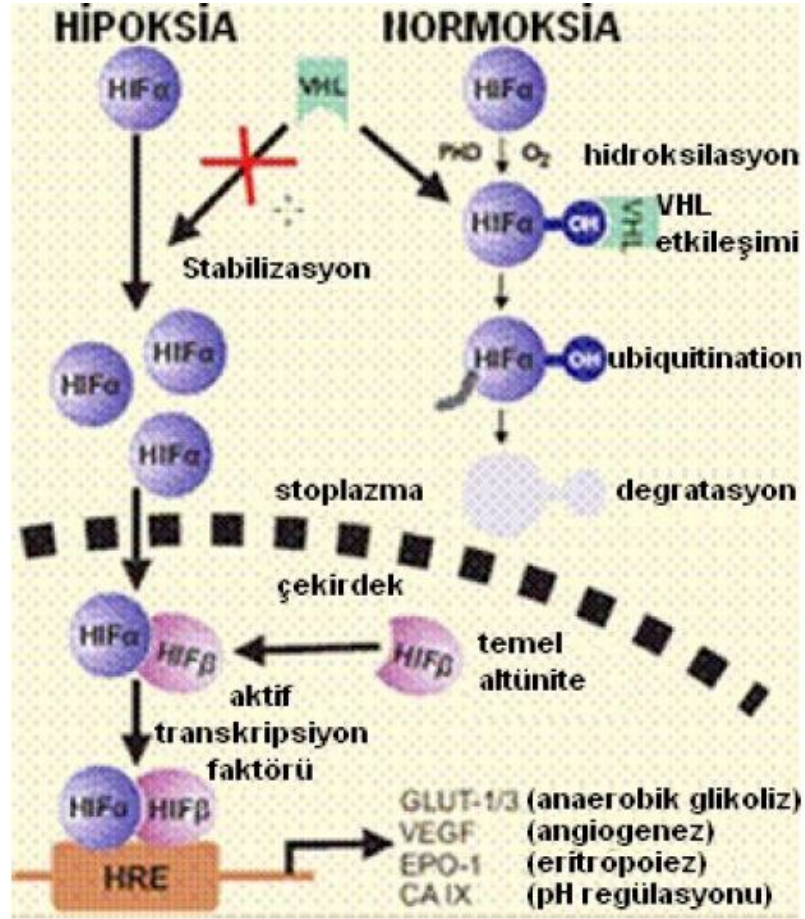
içermeyen hücrelerde hiç promotör aktivitesinin gözlenmemesinden dolayı, *CA9* promotöründeki en kritik düzenleyici element HBS bölgesidir. Bu durum, HIF 1 kompleksinin *CA9* promotöründeki HRE'ye bağlanmasının transkripsiyonel mekanizma için ilk koşul olduğunu desteklemektedir

*CA9* promotöründe HRE bölgesinin tanımlanmasından sonra yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler, *CA9* regülasyonundaki HIF-1 yolağının kritik rolünü destekler nitelikte olmuştur. *CA9* transkripsiyonunu kontrol ettiği bilinen yolakların, faktörlerin ve deneysel koşulların büyük kısmının, HIF-1 $\alpha$  stabilitesini regüle ederek ya da HIF-1 transkripsiyonel aktivitesini kontrol ederek veya her ikisini birlikte yaparak HIF-1 $\alpha$  yolağı üzerinde birleşiyor olması dikkate değer bir durumdur. Hipoksiya ile indüklenebilen genlerin HRE'lerine bağlanarak transaktive eden HIF transkripsiyon faktörü O<sub>2</sub> tarafından kontrol edilen  $\alpha$  ve sürekli sentezlenen  $\beta$  alt ünitelerinin birleşiminden oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 $\alpha$  iki farklı tipteki oksijen sensörü aracılığıyla regüle edilmektedir. Bunlardan birincisi oksijen bağımlı degradasyon domaininin hidrosillenmesini içerir. Oksijen varlığında, prolin-4-hidroksilazlar tarafından HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen bağımlı degradasyon domainindeki (ODDD) 462. ve 564. prolin rezidülerinin hidrosillenmesi sağlanır. Hidrosillenmiş domainler, HIF-1 $\alpha$ 'nın von Hippel Lindau (VHL) proteinleri tarafından özel olarak tanınmasını sağlar. VHL ve diğer protein bileşenleri, E3 ubiquitin-ligaz kompleksi oluşturarak, HIF-1 $\alpha$ 'nın ubiquitinilasyonuna sebep olurlar ve bu durum HIF-1 $\alpha$  proteinin 26S proteozom tarafından degradasyona uğulanır. Fakat hipoksi koşullarında, bu aminoasitler oksijen azlığından dolayı hidroksilazlar tarafından modifiye edilemezler. Böylece VHL aracılığı ile degradasyon ve HIF-1 aracılığı ile inaktivasyon engellenir. Bu durum ise ortamda HIF-1 $\alpha$  'nın birikmesine, HIF-1 $\alpha$  ile  $\beta$ 'nin dimerler oluşturmasına, hedef genlerdeki HRE bölgelerine bağlanmaya, kofaktörler ile etkileşmesine neden olur ve HIF-1 transaktivasyon kapasitesi uyarılır. Bunun dışında, HIF-1 $\alpha$ , normal oksijen koşullarda farklı hücre dışı sinyaller aracılığıyla, PI3K ile MAPK sinyal iletim yolları gibi yollar aracılığı ile ya da onkogenik değişiklikler ile de artabilir.

ODDD'ye ek olarak, HIF- $\alpha$ , N-terminal (NAD) ve C-terminal (CAD) olmak üzere 2 adet aktivasyon domaini içermektedir. Transkripsiyonel regülasyonda



görevli ikinci tipteki oksijen sensörü, CAD'nin transkripsiyonel aktivitesinin regülasyonunu kontrol etmektedir. Bu kontrolü oksijen bağımlı-asparajinil hidroksilaz faktör inhibitörü (FIH-1) aracılığıyla yapar. FIH-1, HIF-1 $\alpha$ 'nın CAD bölgesinde bulunan N803 asparajin rezidüsünü hidroksilleyerek, transkripsiyonel ko-aktivatörler olan p300/CBP ile etkileşmelerini engellemektedir.



Şekil 1.8: Normal oksijen ve hipoksik koşullarda CA9 geninin regülasyonu [70]

HIF-1 hipoksiya koşullarında CAIX'un transkripsiyonunu güçlü şekilde aktive eder fakat tam bir aktivasyon için SP1/3 transkripsiyon faktörünün PR1 e bağlanması gereklidir [3].

CA9 regülasyonunda hipoksiyanın direkt rolü, *in vivo* tümör örneklerindeki CA9 immuno tarama çalışmalarından ortaya çıkarılmıştır. Bu örneklerde CA9'un hipoksik bölgelerle güçlü şekilde sınırlandığı gözlenmiştir. Ayrıca CA9 ekspresyonunda hipoksiya ve HIF-1'in dikkat çekici etkisi *in vitro* olarak da

gösterilmiştir. Buna göre hücre hatlarının büyük bir kısmında yalnızca hipoksik koşullarda *CA9* ekspresyonu gözlenmektedir. Elde edilen bu bulgular, HIF yolağının, *CA9* için önemli olduğunu desteklemiştir.

Hipoksiyaya ek olarak, diğer ajanlar ve genetik faktörlerde HIF yolağını inhibe edebilir ve *CA9* ekspresyonunu indükleyebilir. Mutasyonların inaktivasyonu ya da VHL'nin epigenetik olarak susturulması, genellikle böbrek hücre kanseri (renal cell karsinoma, RCC) durumlarında, direkt olarak *CA9*'un ve diğer hipoksiya ile indüklenebilen genlerin aşırı derecede ifadesi ile bağlantılıdır, hatta bu durum normal oksijen koşullarında da görülür. Bu VHL mutasyonları HIF-bozunma yolağını poliubikitinasyon basamağında bozar ve transkripsiyonel olarak aktif HIF'lerin toplanmasına neden olur. PHD'ler ve FIH-1 hidroksilazlar aynı faktörlere (oksijen, demir, oksoglutarat) bağımlıdır ve bunların birlikte inhibisyonları da aktif HIF'lerin toplanmasına neden olur. Bu hidroksilazların inhibisyonu örneğin demir şelatları, demir analogları, 2-OG analoglarının tümü *CA9* ekspresyonunun güçlü aktivatörleridir. HIF-1 fonksiyonu için transkripsiyonel yardımcı aktivatör olan p300/CBP'nin kritik rolü ile ilgili olarak, p300/CBP'nin yarışmalı inhibitörü olan adenoviral E1A'nın aşırı ifadesi, RCC hücrelerindeki *CA9* ekspresyonunu güçlü şekilde azaltabilmektedir.

Toplu olarak bakıldığında, elde edilen çalışmalar güçlü şekilde hipoksiyanın *CA9* regülasyonunda önemli olduğu görülmektedir fakat *CA9*, hipoksiya ve *in vivo* katı tümörlerdeki hipoksiya markerları arasındaki korelasyon kesin değildir ve kontrolde diğer mekanizmalar etkili olabilirler.

### **1.8 Sitokinler**

HücreSEL düzenleyici proteinler olan sitokinler, çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanarak hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkileyen moleküllerdir. Her sitokin özgün hücre yüzey reseptörüne bağlanarak, hücre içi sinyal yollarının fonksiyonlarının değişimine sebep olur. Bu değişimler diğer moleküller için hücre yüzey reseptör sayısının artması ya da hücrenin kendi etkilerinin değişmesi şeklinde olabilir. Çoğu sitokinlere hücreSEL yanıt hedef

hücrelerde gen ifadesinde değişimler ile meydana gelir ve böylece hücreler yeni fonksiyonlar geliştirebilir ya da proliferere olabilir [28].

Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki yapısal ve fonksiyonel benzerlikler ile etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Platelet orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Basık fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Neurolökin; Amfiregulin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.)

2) Lenfokinler (interlökin-1a, IL-1a; II-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15)

3) Koloni stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF)

4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF-  $\beta$ )

5) Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ ; TNF- $\beta$ )

6) Interferonlar (IFN- $\alpha$ ; IFN-  $\beta$ ; IFN- $\gamma$ )

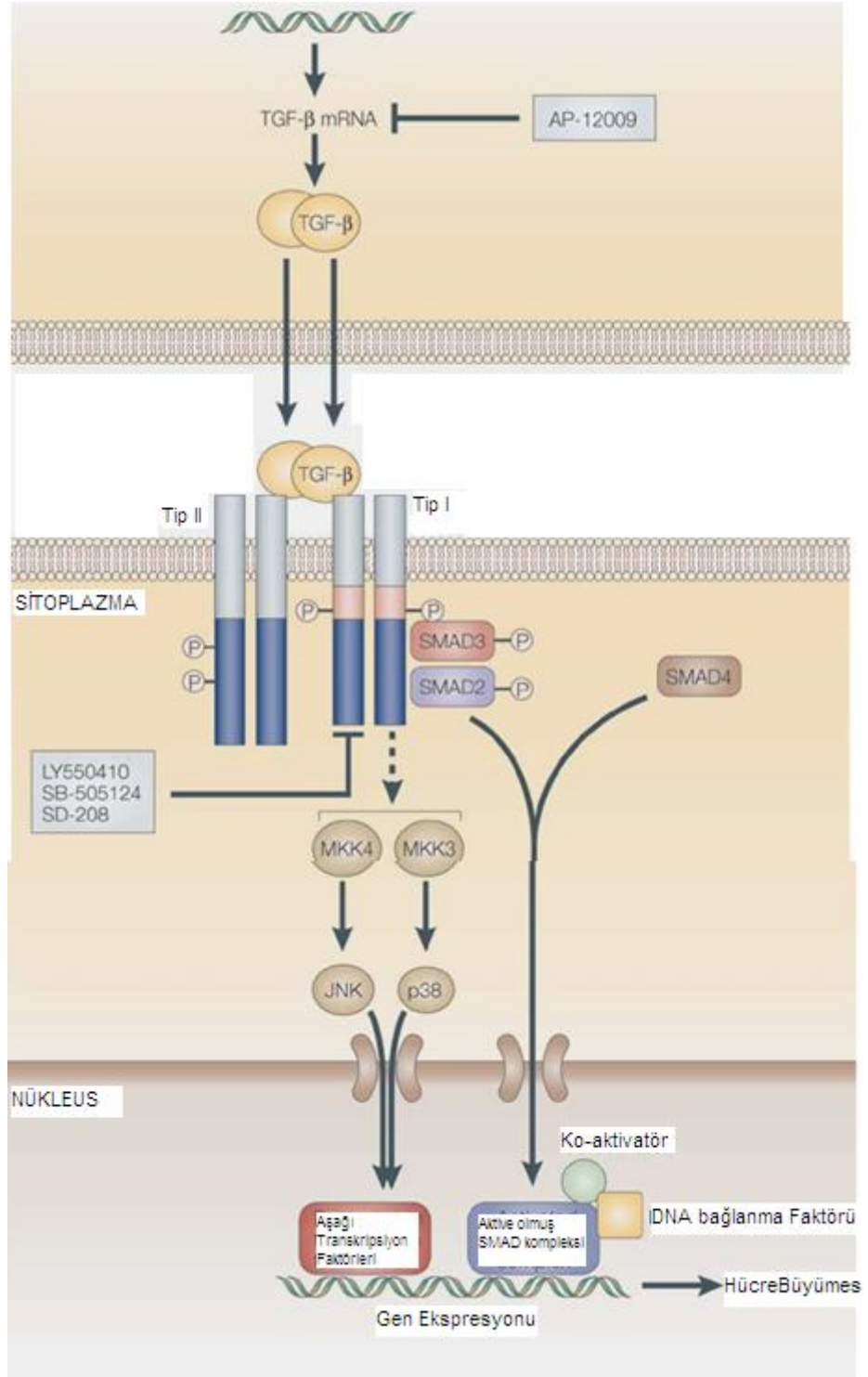
### 1.8.1 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi birçok hücresel süreçte yer alan ve gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstraselüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. İnsanlarda bulunan üç farklı TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) ilk sentezlendiklerinde öncül protein şeklindedir ve oldukça büyük yapıdadırlar. Daha sonra işlenerek olgun protein haline gelen TGF- $\beta$  ailesi, TGF- $\beta$  kendisi başta olmak üzere, BMP (Bone Morphogenetic Protein), Aktivinler ile büyüme ve farklılaşma faktörleri olmak üzere 30'dan fazla üyeye sahiptirler. TGF- $\beta$  ailesi üyeleri transmembran protein ailesinden olan serin/treonin kinaz aktivitesine sahip, TGF- $\beta$  reseptörlerine bağlanarak hücresel hareketlerini başlatırlar. TGF- $\beta$  reseptör ailesi (TBR) yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önüne

alınarak tip I (TBR-I) ve tip II (TBR-II) reseptörler olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Bu reseptörler sinyalin SMAD transkripsiyon faktörleri aracılığıyla çekirdeğe ulaşmasını sağlarlar. TGF- $\beta$  sinyal ileti yolundaki eksiklik ya da hasarlar, örneğin SMAD mutasyonları, insanlardaki birçok kanser türü ile ilişki bulunmuştur. TGF- $\beta$  aktivasyonundan önce, reseptörler tarafından regüle edilen SMAD proteinleri, SARA (SMAD Anchor Receptor Activation) aracılığıyla hücre membranına bağlı olarak bulunurlar. SARA'lar ayrıca SMAD proteinlerinin TGF reseptör kinazlarının yakınına taşınmasını sağlar. TGF- $\beta$ 'nın bağlanması ile sürekli aktif olan TGF $\beta$ \_reseptör 2 tarafından TGF $\beta$ \_reseptör 1'in aktivasyonu ve fosforilasyonu sağlanır. Aktive olan TGF $\beta$ \_reseptör 1, SMAD2 ve SMAD3'ü fosforile eder. Fosforile olan SMAD2 ve SMAD3, SMAD4'e bağlanır ve çekirdeğe hareket ederler. Çekirdekte transkripsiyonu regüle etmek için kompleks oluştururlar. SMAD transkripsiyon faktörleri transkripsiyonu farklı şekillerde regüle ederler; örneğin direkt DNA'ya bağlanabilirler veya diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanarak indirekt olarak regülasyon sağlarlar. Bunun dışında transkripsiyon represör ya da aktivatörleri ile etkileşerek (p300 ve CBP) transkripsiyonu regüle ederler (Şekil 1. 9) [115].

Çekirdek hormon reseptörünün ko-represörü olan N-CoR ile etkileşen transkripsiyonel bir represör olan SnoN onkoproteinlerinin, SMAD proteinleri ile etkileşimleri sonucunda, TGF- $\beta$  ile indüklenen genlerin baskılanmasına ve TGF- $\beta$  yolağının negatif feedback ile regülasyonunu sağladığı bulunmuştur [116].

MAP Kinaz ve ERK yolaklarının da TGF- $\beta$  tarafından aktive edildikleri ve bu yolaklar aracılığıyla, SMAD proteinlerini etkiledikleri görülmüştür. MAP Kinaz yolağının ökaryotik hücrelerdeki gen ifadesinin regülasyonunda önemli görevleri vardır. MAP Kinazlar transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen ifadesini düzenlerler. Bazı çalışmalar ERK yolağının SMAD proteinlerinin transkripsiyonel aktivitedeki pozitif etkilerini gösterirken, bazıları ise SMAD1, SMAD2 ve SMAD3'ün, ERK yolağı ile fosforilasyonunun, bu proteinlerin çekirdeğe yerleşimini engellediğini ve böylece SMAD aracılı transkripsiyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla SMAD regülasyonundaki ERK yolağının etkisi hücresel yapıya bağlı olarak değişiklik gösterir [117].

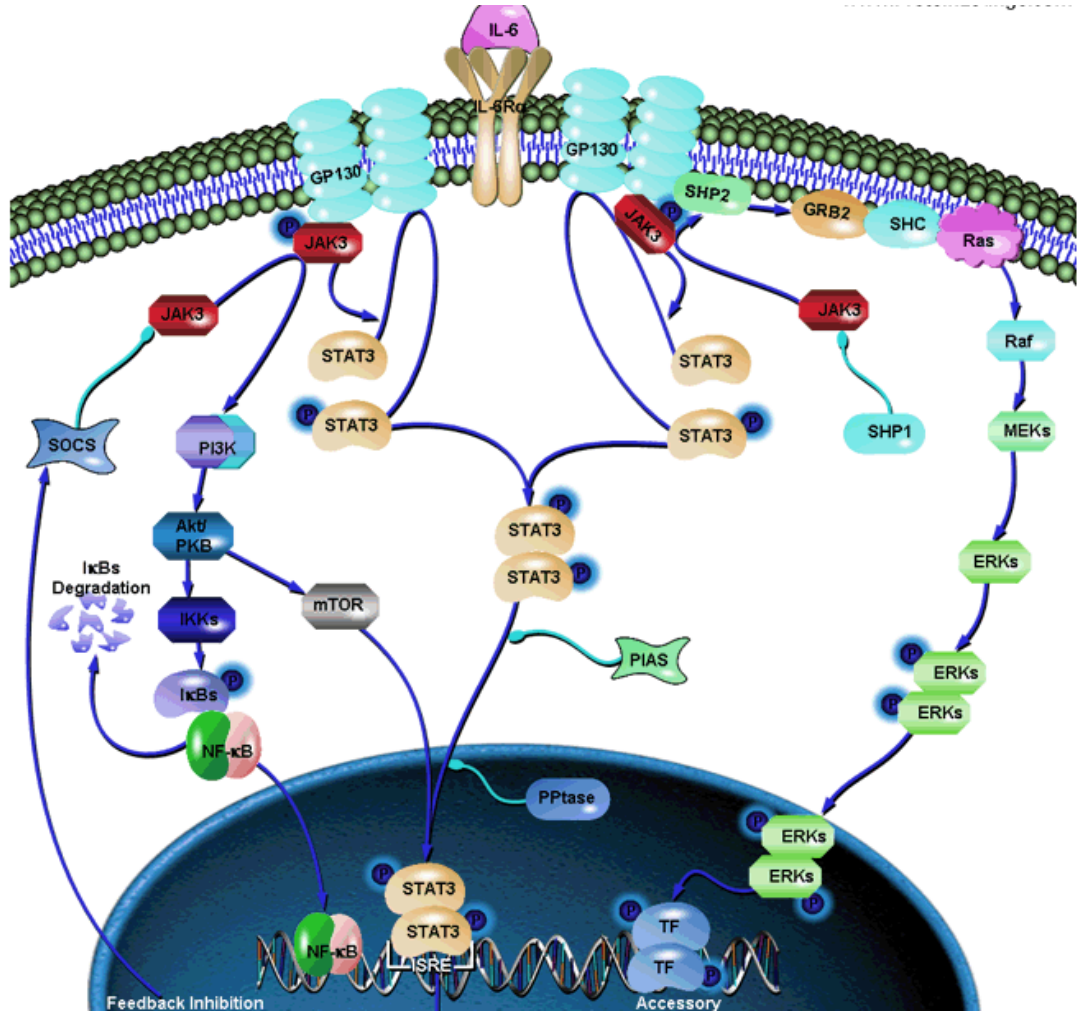


Şekil 1.9: TGF- $\beta$  aracılığı ile gen ekspresyonunun kontrolü [118].

### 1.8.2 IL-6

IL-6 hücre büyümesi, genlerin aktivasyonu, proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini regüle ederek geniş bir spektrumdaki hücresel ve fizyolojik cevaplarda, örneğin immün cevap, inflamasyon, hematopoez ve onkogeneizde önemli roller üstlenmiştir. T-hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanarak inflamasyona cevapta önemli rol oynarlar. Özellikle kaslarda ve yağ dokularında enerji metabolizmasında görev alarak vücut sıcaklığının düşmesini sağlar [119].

Birçok hücre yüzeyinde bulunan IL-6 reseptörleri iki alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 1.10). Özellikle hücre hatları ile yapılan çalışmalarda hepatoma ve ilik (myeloid) hücre hatlarında da IL-6 reseptörlerinin bulunduğu gösterilmiştir. IL 6 reseptörünün alfa alt ünitesi ligand spesifikliğini sağlarken, diğer alt ünite GP 130 (Glikoprotein) ise IL-6 ailesindeki tüm reseptörler ile ortak özellikler taşır. IL-6'in reseptörüne bağlanması ile JAK Kinazların (Janus Kinases) ve Ras-aracılı yolların aktivasyonu sağlanır (Şekil 1.10). Aktive olmuş JAK Kinazlar, STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription-3) ve SHP2 [SH2 (Src Homology-2) Domain-containing Tyrosine Phosphatase] 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 SHP2 yi fosforilleyerek, GRB2, SHC ve Ras aracılığıyla sinyalin MAPKinaz yolağına ulaşması sağlanır ve Elk1 ve NF-IL-6 (C/EBP- $\beta$ ) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır [120-122] (Şekil 1.10).



Şekil 1.10: IL-6 aracılığı ile gen ifadesinin kontrolü [122].

## 1.6 Çalışmanın Amacı

Özellikle katı tümörlerde tümör belirteci olma özelliğine sahip olan ve tümör mikro çevresinin asidifikasyonunda rol alan CAIX, karbondioksitin bikarbonat ve protona hidratasyonunu katalizlemektedir. Birçok kanser türünde ifade seviyesinin arttığı gözlenen CAIX'a spesifik çok sayıda inhibitörler sentezlenmekte ve kanserin tanı ve tedavisinde kullanılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda kanser ilişkili karbonik anhidraz IX geninin regülasyonun aydınlatılması amaçlanmıştır. Özellikle hipoksik koşullarda, CAIX geninin düşük oksijen konsantrasyonu ile önemli derecede regüle olduğu bulunmuştur CA9 promotorunun -173bc'lık bölgesinin detaylı analizleri sonucunda hipoksiya

tarafından regülasyonu kısmen aydınlatılmıştır. Ancak *CA9* geninin, normal oksijen koşullarında regülasyonu hakkında bilginin oldukça kısıtlı olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada daha geniş promotor bölgesi kullanılarak *CA9* geninin normal oksijen koşullarında regülasyonunun detaylı şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Transkripsiyonel regülasyonun haricinde, genin mRNA ve protein seviyesindeki değişikliklerinin de belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede planlanan çalışmalarını basamak basamak özetlersek;

(i) İnsan *CA9* promotor bölgesinin genomik DNA dan PCR'a dayalı strateji ile klonlanması.

(ii) DNA dizileme ile klonlanan dizinin doğrulanması ve biyoinformatik araçlarla muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin tespit edilmesi.

(iii) Kısaltılarak yapılan delesyon analizleriyle farklı uzunluklarda promotor parçalarının oluşturulması ve transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için lusiferaz belirteçli vektörlere klonlanması.

(iv) Farklı promotor parçalarının, model olarak seçilen insan hepatoma hücrelerine (Hep3B) aktarılması ve geçici ifadesinin sağlanması. Bu şekilde bazal transkripsiyonel aktivitelerin belirlenerek, promotor üzerindeki, transkripsiyonel aktivite açısından en önemli bölgelerin belirlenmesi.

(v) Sitokinlerin pek çok fizyolojik olayı belirleyen önemli regülatörler olduğu bilindiği üzere, bazı sitokinlerin (TGF- $\beta$  ve IL-6) *CA9* geninin mRNA seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için, RT-PCR analizleri yapılması

(vi) mRNA seviyesinde farklılığa neden olan sitokinlerin, fikoeritrin (PE) ile işaretli CAIX monoklonal antikor kullanılarak akış sitometri analizlerinin yapılması ve membrana bağlı bir protein olan CAIX proteinin seviyesinin belirlenmesi

(vii) Son olarak da CAIX ekspresyon seviyesinde farklılık oluşturan sitokinlerin, direkt olarak *CA9*'un transkripsiyonel aktivitesini etkileyip etkilemediklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı promotor parçaları transfekte edilmiş olan Hep3B hücrelerinde farklı konsantrasyon ve inkübasyon aralıklarında sitokin uygulanarak transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi de hedeflenmiştir. Bu sayede, etkili olan promotor bölgesinin tayininin de mümkün olabileceği düşünülmüştür.



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Klonlamada kullanılan vektör sistemleri ve enzimler ise Strategene, Fermentas MBI, Promega yada New England Biolabs firmalarından temin edildi.

Çizelge 2. 7 Çalışmada kullanılan kimyasallar

<b>Kimyasallar</b>	<b>Üretici</b>
Proteinaz K	Boehringer Mannheim
Amonyum asetat	Merck
Tris Base	Sigma
NaCl	Sigma
EDTA	Riedel
Borik Asit	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	Merck
Beta-mercaptoetanol	Sigma

Çizelge 2.1'in devamı	
ONPG	Sigma
LB	Sigma
LB agar	Sigma
Ampicillin	Sigma
Gliserol	Merck
DMSO	Merck
Hepes	Sigma
Lusiferaz Substrat	Promega
Reporter Lizis Buffer	Promega
DMEM	Sigma
FCS	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
L-Glutamine	Sigma
Penisilin-Streptomisin	Sigma
PBS	Sigma
Agaroz	Prona
Monoklonal Antikor (CAIX spesifik, fikoeritrin işaretli)	R & D System

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çizelge 2. 8 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

<b>Kullanılan Gereç</b>	<b>Modeli</b>
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör	Nuair, ABD
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
-80 °C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hırayama, Japonya
PH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1(Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya

Çizelge 2.2'nin devamı	
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Heios $\alpha$ (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazı	Sartorius, Almanya
Luminometre	Thermo, ABD
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Gel Görüntüleme	UVP, İngiltere
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
Flow sitometre	BD FACS Canto

### 2.1.3 Stok Solüsyonlar

#### 2.1.3.1 Kandan DNA İzolasyonu Solüsyonları

Çizelge 2. 9 Kandan DNA izolasyonu solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
<b>Proteinaz K</b>	Proteinaz-K son konsantrasyon 10mg/ml olacak şekilde hazırlandı (1ml dH <sub>2</sub> O'da 0,01g). -20°C'de saklandı.
<b>Sature Amonyum Asetat (NH<sub>4</sub>Ac)</b>	74g NH <sub>4</sub> Ac, dH <sub>2</sub> O ile 100ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40 °C'de çözüldü. Filtrasyon ile steril edildi. +4 °C'de saklandı.
<b>Nüklei Lizis Buffer</b>	10mM Tris Base, 400mM NaCl, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA. pH 8,2 distile H <sub>2</sub> O ile istenen miktara tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

#### 2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

Çizelge 2. 10 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

Solusyon	İçeriği
<b>5X TBE (pH 8,00)</b>	54g Tris Base, 27,5g Borik Asit tartıldı. 20ml 0,5M EDTA pH8,00 ve dH <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamlandı.
<b>0,5X TBE</b>	5X TBE stok tampondan 100ml alınarak üzeri dH <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamlandı.

### 2.1.3.3 Formaldehit Agaroz Jel Elektrofeksi Solüsyonları

Çizelge 2. 11:Formaldehit agaroz jel elektrofeksi solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
<b>10 X FA JEL TAMPONU (pH 7,00)</b>	41.9g HOPS, 6.8g Na-acetate 3H <sub>2</sub> O, 20 mL EDTA(0.5M), üzeri dH <sub>2</sub> O ile 1litreye tamamlandı. pH 7 olacak şekilde hazırlanarak oda sıcaklığında saklandı.
<b>RNA Jelde Yürütme Tamponu</b>	50mL 10XFA, 20mL Formaldehit, 450mL DEPC li H <sub>2</sub> O
<b>RNAaz içermeyen dH<sub>2</sub>O</b>	1ml DEPC, 1000ml dH <sub>2</sub> O,otokavlandı, 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. +4°C’de muhafaza edildi.

### 2.1.3.4 Transfeksiyon, Lusiferaz ve β-gal Aktivite Solüsyonları

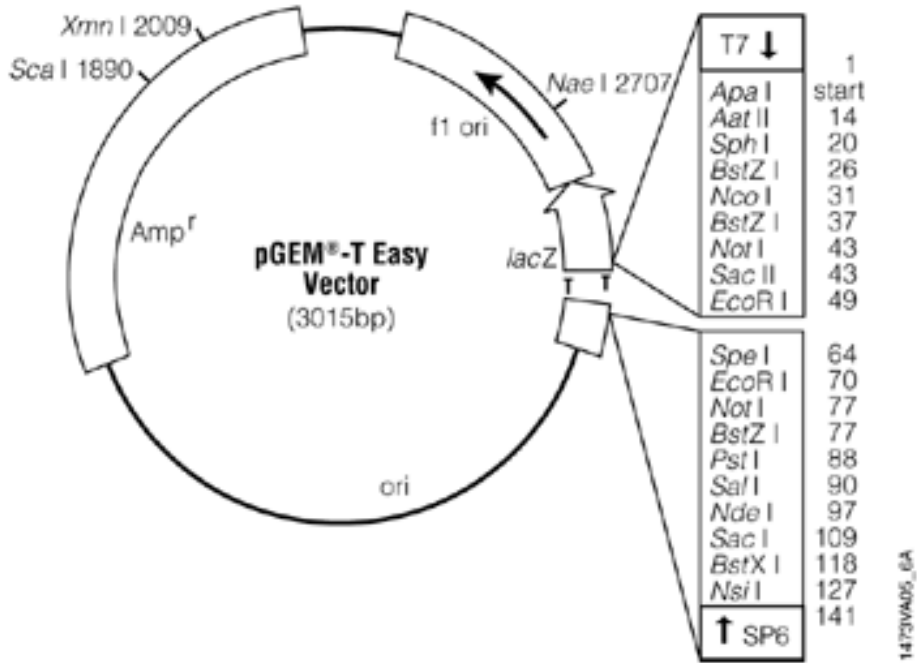
Çizelge 2. 12 Transfeksiyon, Lusiferaz ve β-gal Aktivite Solüsyonları

Solüsyon	İçeriği
<b>2X Assay Buffer</b>	120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 80 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2mM MgCl <sub>2</sub> ,100mM β-mercaptoetanol, 1,33 mg/ml ONPG
<b>2mM CaCl<sub>2</sub></b>	14,7 g CaCl <sub>2</sub> , 50ml’ye distile su ile tamamlandı. Otoklav yapıldı, filtre edildi. +4 °Cde saklandı.
<b>2X Hepes</b>	1,6 g NaCl, 0,04 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,3 g Hepes 100 ml’ye distile su ile tamamlandı. pH 7,05 – 7,12 olmalıdır. Otoklav yapıldı ve filtre edildi. -20 de saklandı.

## 2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler

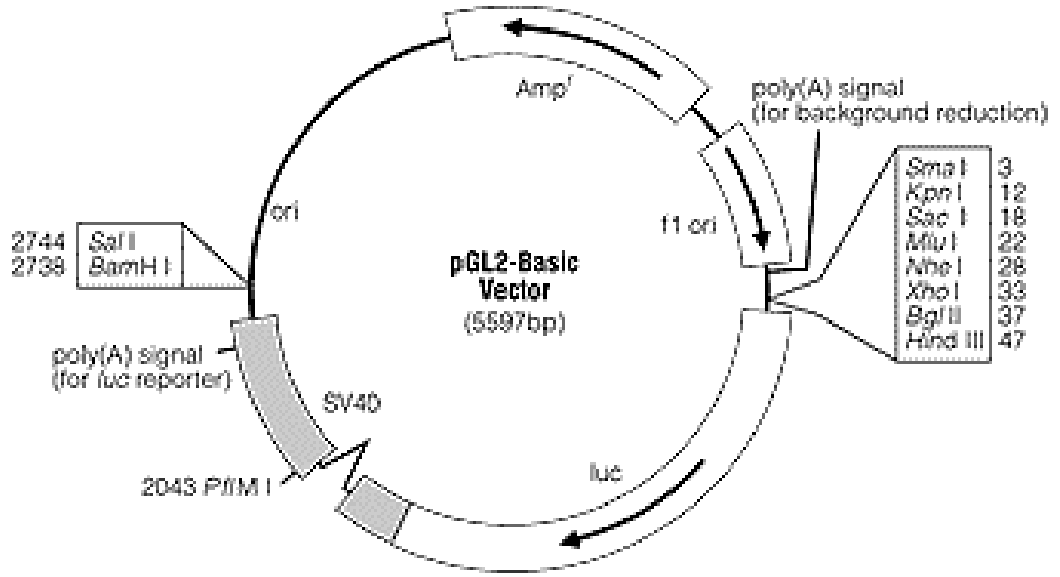
Klonlama amaçlı kullanılan pGEMT easy vektörü Promega'dan satın alındı. pGL2-basic, betagalaktozidaz ( $\beta$ -Gal) ve RSV vektörleri ise Dr. Dipak Ramji'den temin edildi.

### 2.1.4.1. pPGEM-T easy



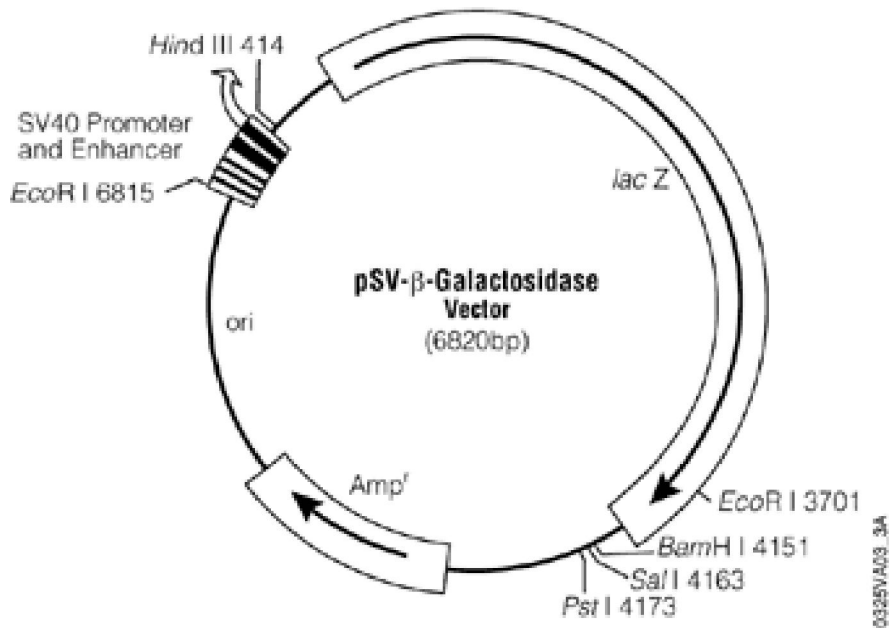
Şekil 2. 7:PGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

### 2.1.4.2 pGL2-basic



Şekil 2. 8: pGL2-Basic vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

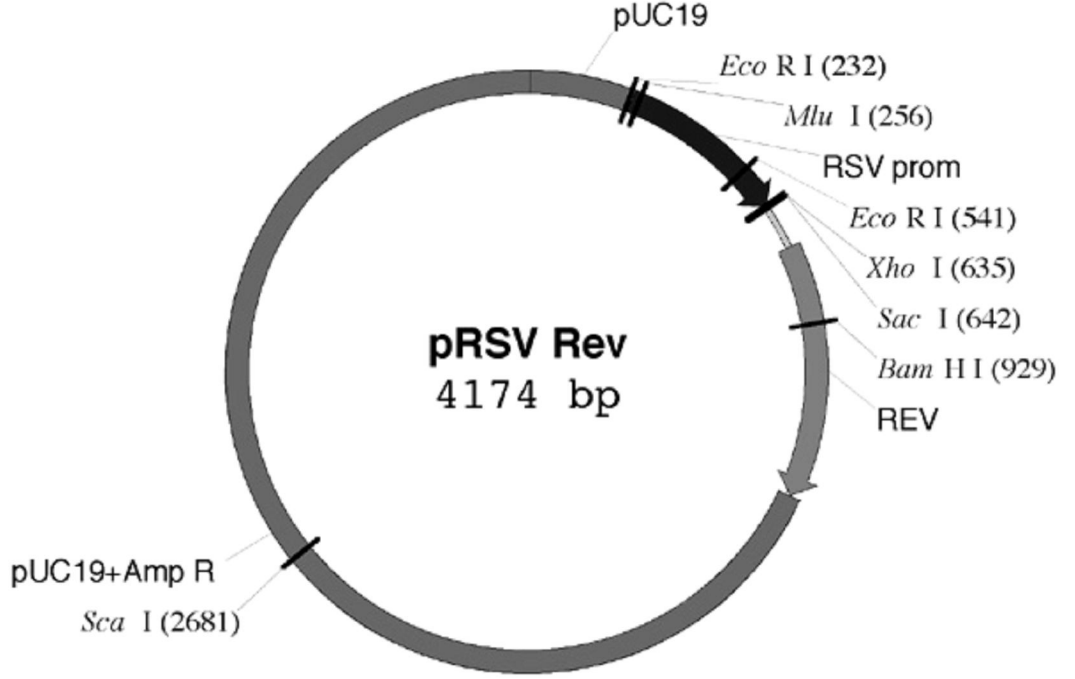
### 2.1.4.3 $\beta$ -Gal



Şekil 2. 9: pCMV  $\beta$ -Gal vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



#### 2.1.4.4 RSV



Şekil 2. 10: pRSV-Luc vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

## 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 kültür ortamları 121 °C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta ) otoklavda steril edildi.

Doku Kültürü 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 açılarak 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 rpmde 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım atıldı, üzerine yine 1 ml distile su katılarak çalkalandı ve 10 dakika 3500 rpmde 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 (PCR)**

PCR 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), 200mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu (0,5mM, 1mM, 2mM, 4mM ve 6mM) ise her bir PCR 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 PCR reaksiyonu için aynı kullanılmıştır. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

### 2.2.2.3 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org) , [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ve [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına,  $T_m$  sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences) bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan *CA9* geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

### 2.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 80 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektroferez 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 ile %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 absorbansları alındı.

### 2.2.2.6 PCR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri pGEM-T 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 PCR 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* XL1blue competent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için ampicillin içeren LB agar besiyerlerine 100µl IPTG (100mM stok) ve 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı.

#### **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 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)**

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Endo-free Maxi Prep Kit (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapılır. 37°C de 8saat 250rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilue edilir. Yüksek kopyalı plazmitler için 100ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanılır. 37°C de 12-16saat 250rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklenir. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra 4°C'de 6000rpm'de 15dakika santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirilir. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edilir.

#### **2.2.2.9 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi**

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak 50 µl toplam hacimde 37°C'de en az 2saat 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.

#### **2.2.2.10 Kompetent Hücre Hazırlanması**

Kompetent hücre hazırlanması için 50mM kalsiyum klorür kullanıldı. Öncelikle 10ml LB besiyeri içine tek koloni *E.coli XLI* blue ekim yapılarak 37°C’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra gecelik kültürden 100ml LB içine 100µl inoküle edilerek, OD<sub>600</sub> 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C’de inkübe edildi. 5000rpm’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.

#### **2.2.2.11 Transformasyon**

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

#### **2.2.2.12 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu**

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli XLI-blue* (endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F’[ ::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)) ve *E.coli DH5α* (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1) bakteri soyları kullanıldı [123].

### **2.2.2.13 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 ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

### **2.2.2.14 Antibiyotikler**

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

## **2.2.3 Hücre Kùltürü Teknikleri**

### **2.2.3.1 Hücre Kùltürü Medyumunun Hazırlanması**

Hücre kùltürü medyumunu DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) içine Penicillin son konsantrasyonu 100ünite/ml, Streptomycin son konsantrasyonu 10µg/ml, L-Glutamine son konsantrasyonu 0,2mM ve FCS son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde ilave edildi. Tüm bileşenler 0,22µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

### **2.2.3.2. FCS Hazırlanması**

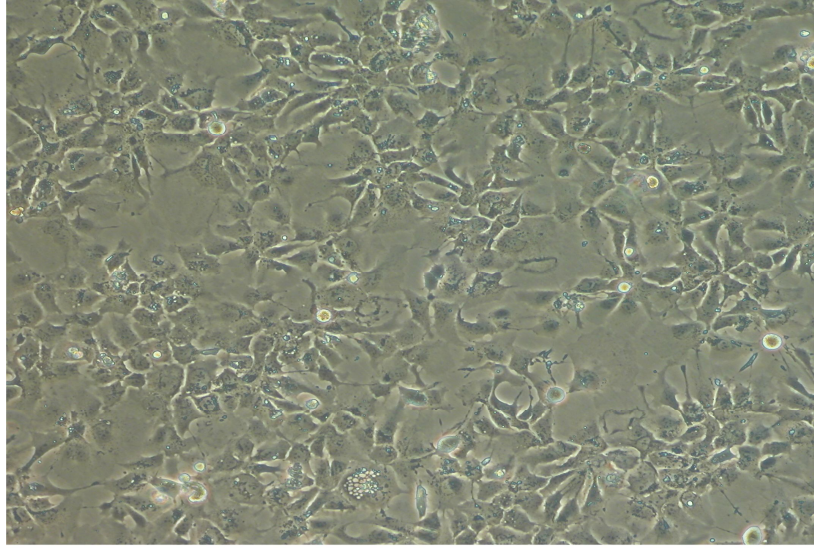
FCS (Fetal Calf Serum) –20 °C’de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce 56°C 30 dakika ısı ile inaktive edildi ve tekrar -20°C de saklandı.

### **2.2.3.3. PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması**

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

#### 2.2.3.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu

Çalışmada insan hepatoma hücre hattı Hep3B kullanıldı.



Şekil 2. 11: Hep3B hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi

#### 2.2.3.5. Hücre Soyunun Başlatılması

Uzun dönemde sıvı azot içinde saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için sıvı azot tankından 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 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.

#### 2.2.3.6 Hücrelerin Büyütülmesi

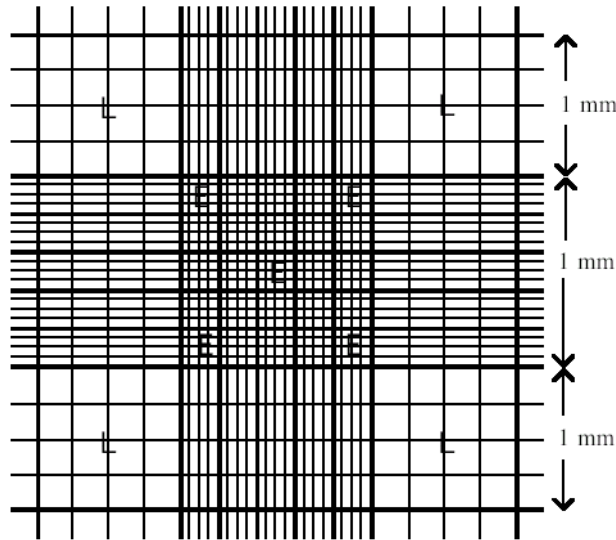
Hücreler 5ml medyumda 25 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 100ünite/ml penisillin, 10µg/ml streptomisin, 0,2mM L-Glutamine ve % 10FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

### 2.2.3.7 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25cm<sup>2</sup> flasklar için 1 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 CO<sub>2</sub> 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, 1mm<sup>2</sup> alan, 0.1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı (Şekil 2.6 ). 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. 12: Hemositometre



Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu.

Toplam canlı hücre sayısı/ml = hemositometre sayım sonucu x 2 x 10<sup>4</sup>

### **2.2.3.9 Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması**

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm<sup>2</sup> 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 sıvı azota dayanıklı cryovial tüplerine konularak, etiketlendi ve izole edilerek, öncelikle -80 °C derin dondurucuya konuldu, dereceli olarak sıcaklığın düşmesi sağlandıktan sonra sıvı azot içinde uzun dönemli saklandı.

### **2.2.3.10 Kalsiyum-Fosfat Prespitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon**

Bu metot 12 well plate ile uygulandı. Transfeksiyondan 24 saat önce hücreler 25X10<sup>4</sup> hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2X HEPES eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA: Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Plate hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. Bir gece inkübasyona bırakıldı [124]. Eğer sitokin uygulanacaksa sitokinler her bir ünite için üç tekrar olmak koşulu ile direk medyum üzerine eklendi. Sitokin muamelesinden 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında hücreler ekstrakte edildi ve elde edilen ekstraktlar (lizatlar) kullanılarak, lusiferaz ve β-galaktosidaz aktivite tayinleri ile transfeksiyon etkinliği saptandı.

### **2.2.3.11 Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması**

Kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı, 2X PBS ile yıkandı ve 150µl 1XRLB (Reporter Lysis Buffer, Promega) ilave edilerek 5dakika horizontal çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra ısı şoku için yarım saat -80 dondurucuda inkübe edildi. Süre sonunda 37°C su banyosunda hızlıca çözümleri sağlandı. Daha sonra hücre kazıyıcıları ile her bir kuyu kazınarak ependorf tüplerine alındı. 15saniye vorteks yapıldı, ardından 30saniye 13000 rpm'de santrifüj yapılarak süpernatant ayrı bir ependorfa alındı ve hemen aktivite bakıldı. Kalan lizat -80 dondurucuda saklandı.

### **2.2.3.12 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

Lusiferaz ölçümleri, thermo luminoscan kullanılarak yapıldı. 96 well platede belirlenen kuyucuklara hücre ekstraktlarından 20µl konuldu. Luminometre ayarı yapılarak 100µl substrat enjeksiyonu ile aktivite ölçüldü. (Tipik delay time: 2 saniyedir. Tipik read time: 10 saniyedir.)

### **2.2.3.13 β-Galaktosidaz Aktivite Ölçümü**

96 well platede belirlenen kuyucuklara 50µl 2XAssay Buffer (çizelge 2.5) konuldu. 2X Assay Buffer konulan kuyucuklara, hücre lizatından 50µl eklenerek pipetaj yaparak iyice karışmaları sağlandı. 37°C'de 30 dakika (sarı renk oluşumu görülene kadar, maximum 3 saat) inkübe edildi. Sarı renk oluşumu görülünce kuyucuklara 100µl 1M Sodyum Karbonat (oda sıcaklığında) eklenerek reaksiyon durduruldu. 420nm'de absorbans alındı.

## **2.2.4 RNA İlişkili Teknikler**

### **2.2.4.1 Toplam RNA İzolasyonu (QIAGEN)**

Total RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Mini kit kullanılarak yapıldı. Kısaca, ilk olarak Hep3B hücrelerinin medyumunu uzaklaştırıldı ve bir kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS içinde hücreler kazınarak santrifüj tüplerine alındı.

1000rpm de 5dakika santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 350-600µl RLT tamponu içinde (10µl/ml β-mercaptoethanol içeren) yeniden çözüldü. Lizatın tamamen homojenize olması için vorteks veya 0.9mm iğne ucu bulunan 1 ml'lik şırıngalar kullanıldı. Bu basamakta lizat ya daha sonra kullanılmak amacıyla -80°C'de saklandı ya da RNA izolasyonu için hemen kullanıldı. RNA konsantrasyonu ve saflığı O.D<sub>260</sub> ve O.D<sub>280</sub> spektrofotometrik ölçümleri alınarak belirlendi.

#### **2.2.4.2 Reverse Transkriptase Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PCR)**

RT-PCR iki ayrı basamakta yapılmıştır.

1. Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi
2. Gene spesifik primerler ve ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)

#### **2.2.4.3 cDNA Sentezi (RT)**

cDNA sentezi için 2.2.5.1. de belirtildiği şekilde izole edilen total RNA dan 1µg kullanılmıştır. Kısaca 1µg total RNA, 1µl random primer ve distile su toplam hakim 10µl olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 10dakika 70°C de inkübe edildi ve sonra buz üzerine alındı. Karışım üzerine 5×MMLV (Moloney murine leukaemia virus) tampon, dNTP mix (10mM each of dATP, dGTP, dTTP and dCTP), RNase inhibitorü (RNasin®) ve MMLV reverse transcriptase enzimi ilave edilerek 42°C'de 50dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA 5 kat distile su ile dilue edilerek -20°C'de saklandı.

#### **2.2.4.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

İnsan karbonik anhidraz 9 için PCR koşulları, 1 döngü 96°C de 5dakika; 30 döngü 93°C de 45saniye, 59°C de 45saniye, 72°C de 90saniye; 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 PCR ürünü

ve RNA kalıbı (cDNA) arasındaki direkt korelasyonu gösterecek şekilde optimize edildi.. PCR sonuçları % 2 lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, Gel Doc documentation sistem ile fotoğraflandırdı ve Syngene GeneTools programı ile densitometrik analizleri yapıldı..

### **2.2.5 Akış Sitometri Analizleri**

Bu metot 6 well plate ile uygulandı. Sitokin uygulamasından 24 saat önce hücreler  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Belirlenen konsantrasyonlarda sitokinler ile inkübasyondan sonra medyum uzaklaştırıldı ve PBS ile kuyular yıkandı. Bundan sonraki bütün basamaklar buz üzerinde yapıldı.

#### **2.2.5.1 Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması ve Analiz**

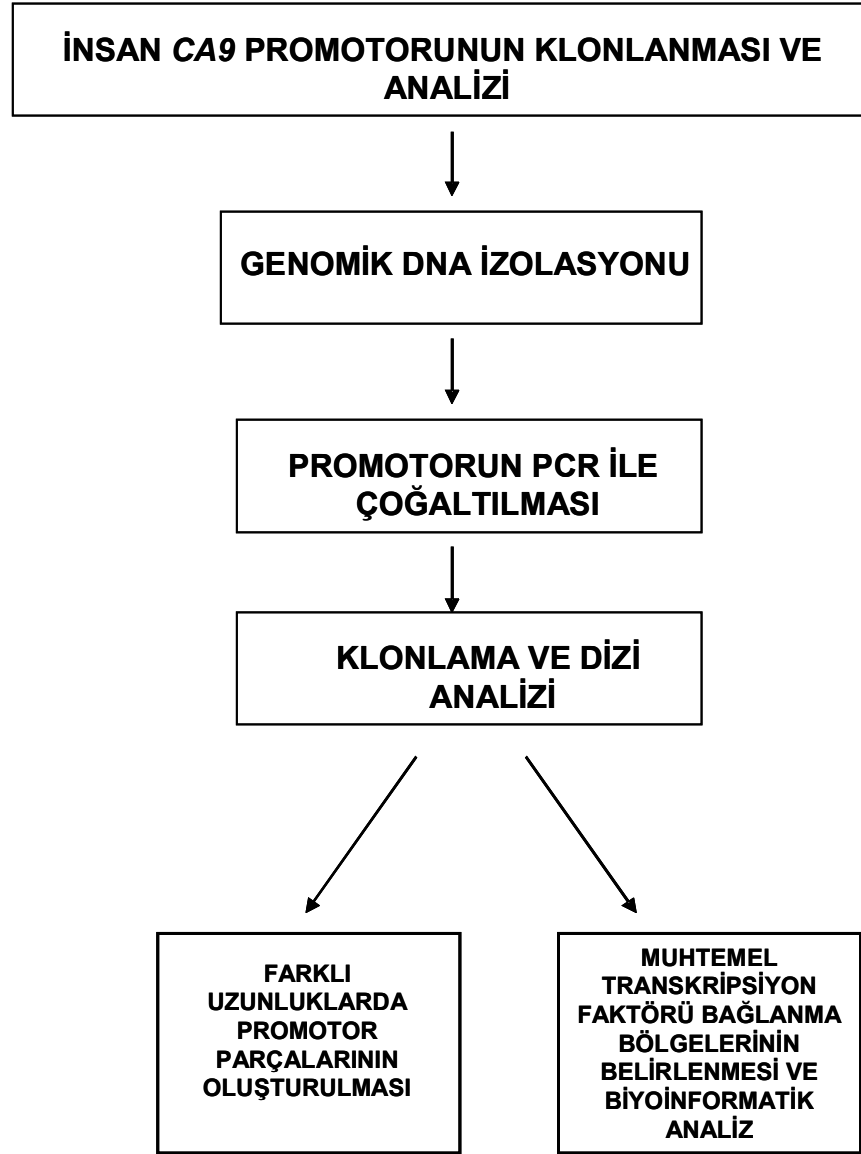
Hücreler PBS içinde kazınarak ependorflara alındı. 1000 rpm de 5dakika santrifüj yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldı ve 2 kez %1 BSA içeren PBS ile yıkandı. 1:10 oranında dilue edilmiş fikoeritrin işaretli (phcoerythrin-labeled) monoklonal CAIX antikoru (R&Dsystem) ile 40dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bağlanmamış antikorların ve kalıntıların uzaklaştırılması için 2 kez daha aynı şekilde yıkama yapıldı ve %1 Paraformaldehit solusyonu ile fiksasyon yapıldı. Fikse edilmiş örnekler analiz edilmek üzere 5ml'lik tüplere transfer edildi.

### **2.2.6 İstatistiksel Analiz**

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri tek yönlü ANOVA testi (Minitab15 versiyonu) kullanılarak gerçekleştirildi.  $P \leq 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

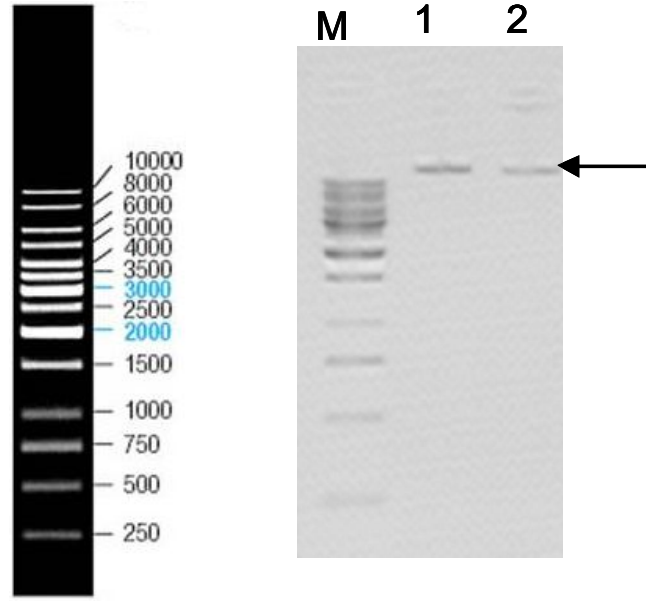
İnsan CAIX geninin regülasyonun aydınlatılması amacıyla ilk olarak kandan genomik DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra sırasıyla genin promotorunun çoğaltılması, klonlanması ve dizi analizi çalışmaları gerçekleştirildi. Farklı uzunluklarda promotor parçalarının oluşturulması ve biyoinformatik çalışmaları ile promotordaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 2: İnsan CA9 promotorunun klonlanması ve analizinin akış diyagramı

### 3.1. Genomik DNA İzolasyonu

İnsan *CA9* 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. 2: Genomik DNA jel görüntüsü M: 1 kb Marker; 1: 1 no’lu örnek; 2: 2 no’lu örnek

### 3.2 *CA9* Promotorunun Klonlanması

#### 3.2.1 Primer Tasarımı

Primer tasarımı bölüm 2.2.2.3’de belirtildiği şekilde yapıldı. Öncelikle insan *CA9* promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapılarak, promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor diziyi kesmeyen enzimlerin pGL2-basic vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi ve KpnI ve NheI enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde olduğu görüldü. Sonuç olarak KpnI ve Nhe I enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı.



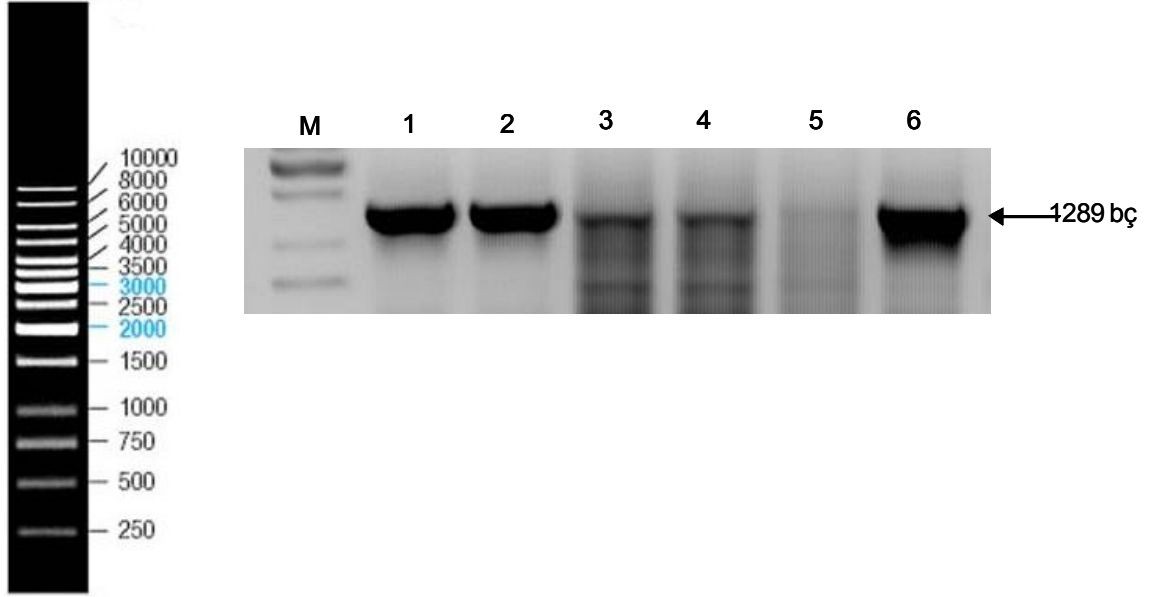
### 3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)

PCR reaksiyonları bölüm 2.2.2.2. de belirtildiği şekilde 50µl hacimde yapıldı. Buna göre *CA9* promotorunun çoğaltılması için en uygun şartların saptanabilmesi amacıyla ilk olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı değiştirilerek, tampon, distile su, dNTP karışımı, forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz miktarları sabit tutuldu. Çizelge 3.2.'de belirtilen PCR programı kullanılarak promotor dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1289 [-1251/+38] bç'lik insan *CA9* promotoruna ait bant UVP Görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.4'de gösterildiği gibi 1. ve 2. örneklerde tek bir bant şeklinde *CA9* promotoru elde edildi.

Çizelge 3.2: İnsan *CA9* promotorunun amplifikasyonu için PCR koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	2 dakika
2	35	94 °C	1 dakika
		65 °C	45 saniye
		72 °C	1 dakika
3	1	72 °C	10 dakika





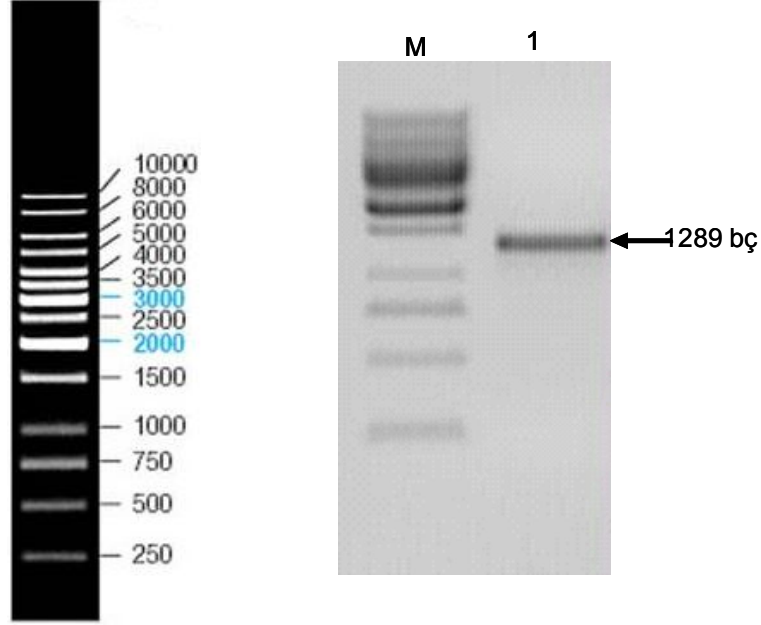
Şekil 3. 4: PCR reaksiyon sonucu jel görüntüsü

M -1 kb marker, 1 -3 µl DNA-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 -6 µl DNA-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 - 3µl DNA-4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 - 6µl DNA-4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 - 6µl DNA-6 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 -6 µl DNA-2 mM MgCl<sub>2</sub>, % 0,5 DMSO

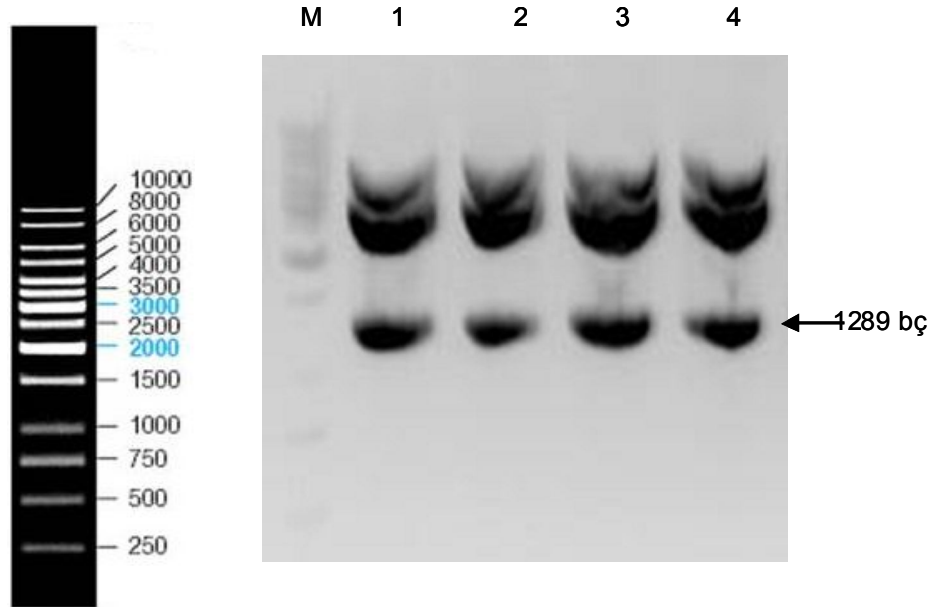
### 3.2.3 İnsan *CA9* Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

PCR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kullanıldı. Öncelikle PCR sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanılarak klonlamaya hazır hale getirildi (Şekil 3.5.). Daha sonra üretici firma protokolüne göre pGEM-T Easy vektörü ile jelden geri kazanılan insan *CA9* promotoru bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli XL1blue* 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 *CA9* genini içeren pGEM-T easy vektörüne sahip hücrelerdir. Beyaz kolonilerden 4 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 KpnI ve NheI restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz

jelde yürütüldü. Şekil 3.6.'da da görüldüğü gibi 4 kolonide bulunan vektörlerin her biri rekombinanttır ve insan *CA9* promotor dizisini içermektedir.



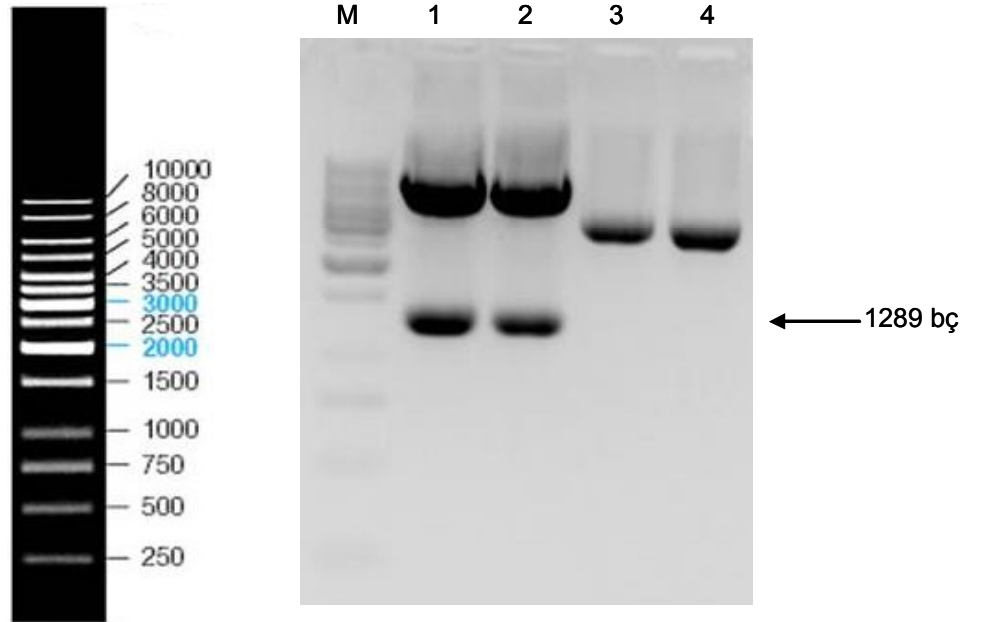
Şekil 3. 5: Jelden geri kazanılan 1289 bç'lik promotorun jel görüntüsü M: 1 kb Marker; 1: jelden geri kazanılan örnek



Şekil 3. 6: . pGEMT easy vektörüne klonlanan promotorun KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -1 kb marker, 1 -1. koloni, 2 -2. koloni, 3 - 3. koloni, 4 -4. koloni

### 3.2.4 İnsan *CA9* Promotorunun pGL2-Basic Vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan *CA9* promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pGL2-basic lusiferaz raportör vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla öncelikle şekil 3.6'da görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra aynı şekilde KpnI ve NheI enzimleriyle kesilen pGL2-basic vektörü ile jelden geri kazanılan insan *CA9* promotoru bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli XL1blue* 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 ve KpnI ve NheI restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi ekilen 4 koloniden iki tanesinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan *CA9* promotor dizisini içermektedir.



Şekil 3. 7: pGL2-basic vektörüne klonlanan promotorun KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü **M** -1 kb marker, **1** -1. koloni, **2** -2. koloni, **3** - 3. koloni, **4** -4. koloni

### 3.2.5 Otomatik Dizi Analizi

Klonlanan insan *CA9* promotorunun dizisinin kontrolü amacıyla sırasıyla LARK Technologies, İngiltere ve REFGEN Biyoteknoloji, Ankara'ya dizi analizine gönderildi. Elde edilen dizi analiz sonuçları biyoinformatik olarak NCBI'da analiz edildi ve Z54349 erişim numaralı insan *CA9* promotor dizisi ile karşılaştırıldı (Şekil 3.8.). Şekilde de görüldüğü gibi dizi analizi sonucu ile gen bankasında bulunan dizi arasında -1176 ile -1179 nükleotitleri arasında farklılık görülmüştür. Bu nedenle dizide PCR'a dayalı herhangi bir polimorfizm oluşması olasılığına karşı, promotor dizinin yeniden genomik DNA'dan klonlanmasına karar verildi. Taq polimeraza bağlı herhangi bir polimorfizmin aynı noktada aynı mutasyonu oluşturma olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle klonlanan dizinin, tekrar dizi analizine gönderilerek karşılaştırma yapılması amaçlandı.

CA9 -1251 GCAGAATTCATCTCTCTCCCTCAATATGATGATATTGACAGGGTTTGCCTCACTCACT -1192  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2256 GCAGAATTCATCTCTCTCTCCCTCAATATGATGATATTGACAGGGTTTGCCTCACTCACT 2315

CA9 -1191 AGATTGTGAG---CTGCTCAGGGCAGGTAGCGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTT -1132  
 ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2316 AGATTGTGAGCTGCTGCTCAGGGCAGGTAGCGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTT 2375

CA9 -1131 TTTGAGACAGGGTCTTGCTCTGTCAACCAGGCCAGAGTGCAATGGTACAGTCTCAGCTCA -1072  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2376 TTTGAGACAGGGTCTTGCTCTGTCAACCAGGCCAGAGTGCAATGGTACAGTCTCAGCTCA 2435

CA9 -1071 CTGCAGCCTCAACCGCCTCGGCTCAAACCATCATCCATTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGG -1012  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2436 CTGCAGCCTCAACCGCCTCGGCTCAAACCATCATCCATTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGG 2495

CA9 -1011 GACTACAGGCACATGCCATTACACCTGGCTAATTTTTTTGTAATTTCTAGTAGAGACAGGG -952  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2496 GACTACAGGCACATGCCATTACACCTGGCTAATTTTTTTGTAATTTCTAGTAGAGACAGGG 2555

CA9 -951 TTTGGCCATGTTGCCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGGACTCAAGCAATCCACCCACCTCA -892  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2556 TTTGGCCATGTTGCCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGGACTCAAGCAATCCACCCACCTCA 2615

CA9 -891 GCCTCCCAAAATGAGGGACCGTGTCTTATTCATTTCCATGTCCCTAGTCCATAGCCCAGT -832  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2616 GCCTCCCAAAATGAGGGACCGTGTCTTATTCATTTCCATGTCCCTAGTCCATAGCCCAGT 2675

CA9 -831 GCTGGACCTATGGTAGTACTAAATAAATATTTGTTGAATGCAATAGTAAATAGCATTTCA -772  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2676 GCTGGACCTATGGTAGTACTAAATAAATATTTGTTGAATGCAATAGTAAATAGCATTTCA 2735

CA9 -771 GGGAGCAAGAACTAGATTAACAAAGTGGTAAAAGGTTTGGAGAAAAAATAATAGTTTA -712  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2736 GGGAGCAAGAACTAGATTAACAAAGTGGTAAAAGGTTTGGAGAAAAAATAATAGTTTA 2795

CA9 -711 ATTTGGCTAGAGTATGAGGGAGAGTAGTAGGAGACAAGATGGAAAGGTCTCTTGGGCAAG -652  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2796 ATTTGGCTAGAGTATGAGGGAGAGTAGTAGGAGACAAGATGGAAAGGTCTCTTGGGCAAG 2855

CA9 -651 GTTTTGAAGGAAGTTGGAAGTCAGAAGTACACAATGTGCATATCGTGGCAGGCAGTGGGG -592  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2856 GTTTTGAAGGAAGTTGGAAGTCAGAAGTACACAATGTGCATATCGTGGCAGGCAGTGGGG 2915

CA9 -591 AGCCAATGAAGGCTTTTGAGCAGGAGAGTAATGTGTTGAAAAATAAATATAGGTAAACC -532  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2916 AGCCAATGAAGGCTTTTGAGCAGGAGAGTAATGTGTTGAAAAATAAATATAGGTAAACC 2975

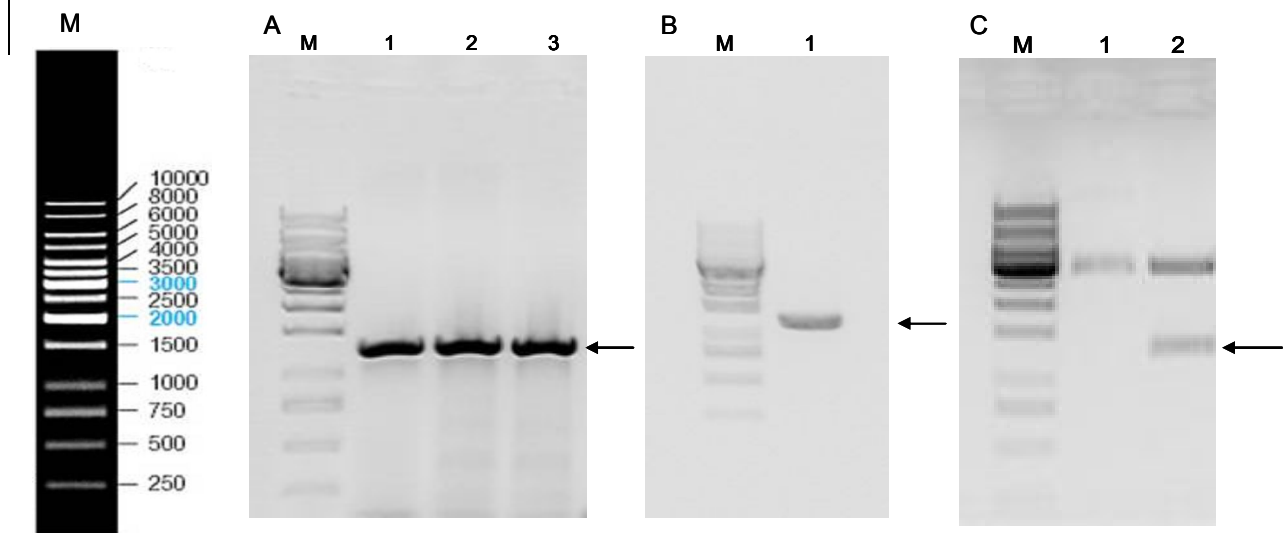
CA9 -531 TATCAGAGCCCCCTGACACATACACTTGCTTTTCATTCAAGCTCAAGTTTGTCTCCCAC -472  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 2976 TATCAGAGCCCCCTGACACATACACTTGCTTTTCATTCAAGCTCAAGTTTGTCTCCCAC 3035

CA9 -471 ATACCCATTACTTAACTCACCTCGGGCTCCCCTAGCAGCCTGCCCTACCTCTTACCTG -412  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Z54349 3036 ATACCCATTACTTAACTCACCTCGGGCTCCCCTAGCAGCCTGCCCTACCTCTTACCTG 3095



### 3.2.6 İnsan *CA9* Promotorunun Yeniden Klonlanması ve Dizi Analizi

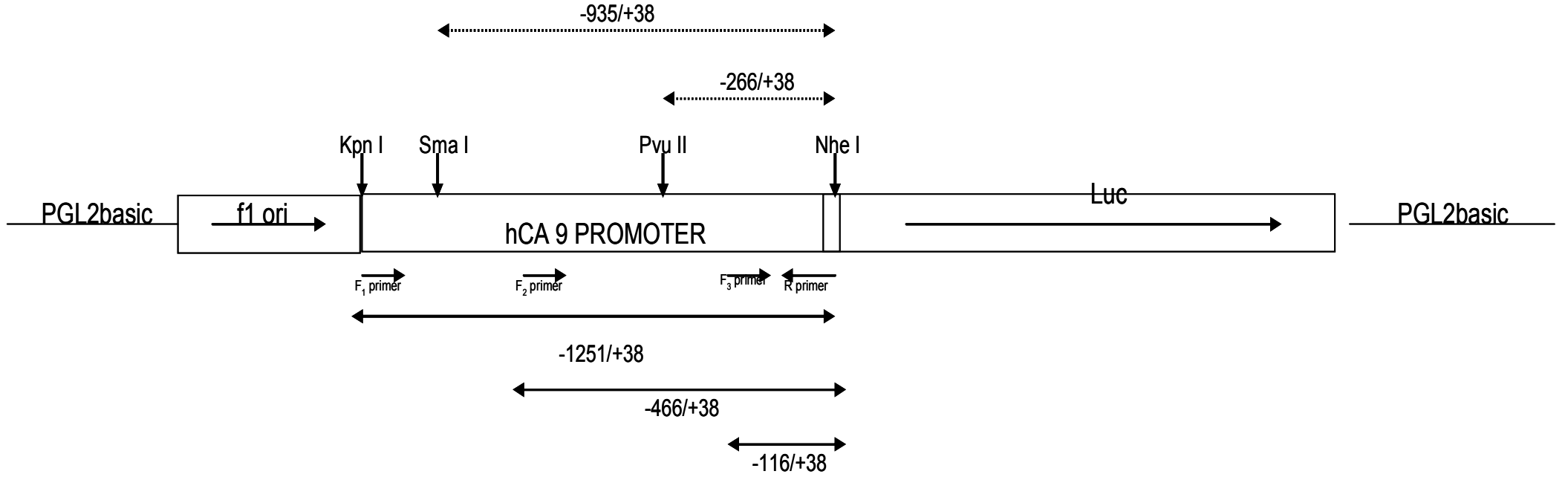
İnsan *CA9* promotorunun yeniden klonlanması için PCR reaksiyonu, jelden geri kazanma, ligasyon, transformasyon, plazmit DNA izolasyonu ve restriksiyon endonükleaz kesim basamakları bölüm 3.2.2 ve bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde yeniden yapılmıştır. PCR sonucu oluşan bantlar şekil 3.9.A’da gösterilmiştir. Yeniden pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan *CA9* promotoru dizi analizi için REFGEN Biyoteknoloji, Ankara’ya gönderildi. Elde edilen dizi analiz sonuçları, Z54349 erişim numaralı insan *CA9* promotor dizisi ile yeniden karşılaştırıldı. Ek Şekil A.2’de de belirtildiği gibi elde edilen dizi ile gen bankasında bulunan dizi arasında yine aynı noktada farklılık görüldü. Sonuç olarak, --CCT--şeklinde üç nükleotitlik kısmın, iki bağımsız çoğaltma ve klonlama sonucunda analiz edildiğinde DNA veri bankasında bulunan dizi ile eşleşmediği bulundu..



Şekil 3. 9: İnsan *CA9* promotorunun yeniden klonlanması. Ok işaretleri 1289 bp bantları göstermektedir. **A)** PCR sonucu jel görüntüsü, **1** -3µl DNA-1mM MgCl<sub>2</sub>, **2** -6µl DNA-1mM MgCl<sub>2</sub>, **3** - 3µl DNA-2mM MgCl<sub>2</sub> **B)**Jelden geri kazanılan promotorun jel görüntüsü **C)** pGEMT Easy vektörüne klonlanan promotorun KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü, **M:** Marker **1** -1. koloni , **2** -2. koloni

### 3.3 Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Oluşturulması

Farklı uzunluklarda insan *CA9* promotor parçalarının oluşturulması için iki yöntem kullanıldı. 973bp [-935/+38] ve 304bp [-266/+38] uzunluğundaki promotor parçaları restriksiyon kesimi ile oluşturulurken, 504bp [-466/+38] ve 154bp [-116/+38] uzunluğundaki promotor parçaları ise PCR temelli teknikler ile oluşturuldu (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10: Rekombinant insan-CA9 plazmiti kullanılarak farklı uzunluklarda promotor parçalarının oluşumunun şematik gösterimi

→ ve ← okları primer dizilerini göstermektedir.

←→ Kesintisiz oklar PCR temelli strateji ile hazırlanmış promotor parçalarını göstermektedir.

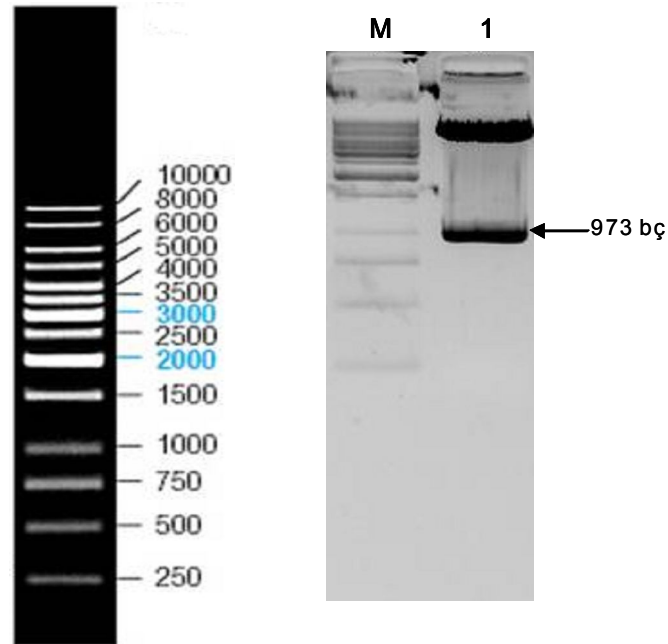
←.....→ Kesintili oklar restriksiyon kesimi ile oluşturulmuş promotor parçalarını göstermektedir.

Dikey oklar ise klonlama için kullanılan restriksiyon enzimlerini göstermektedir.

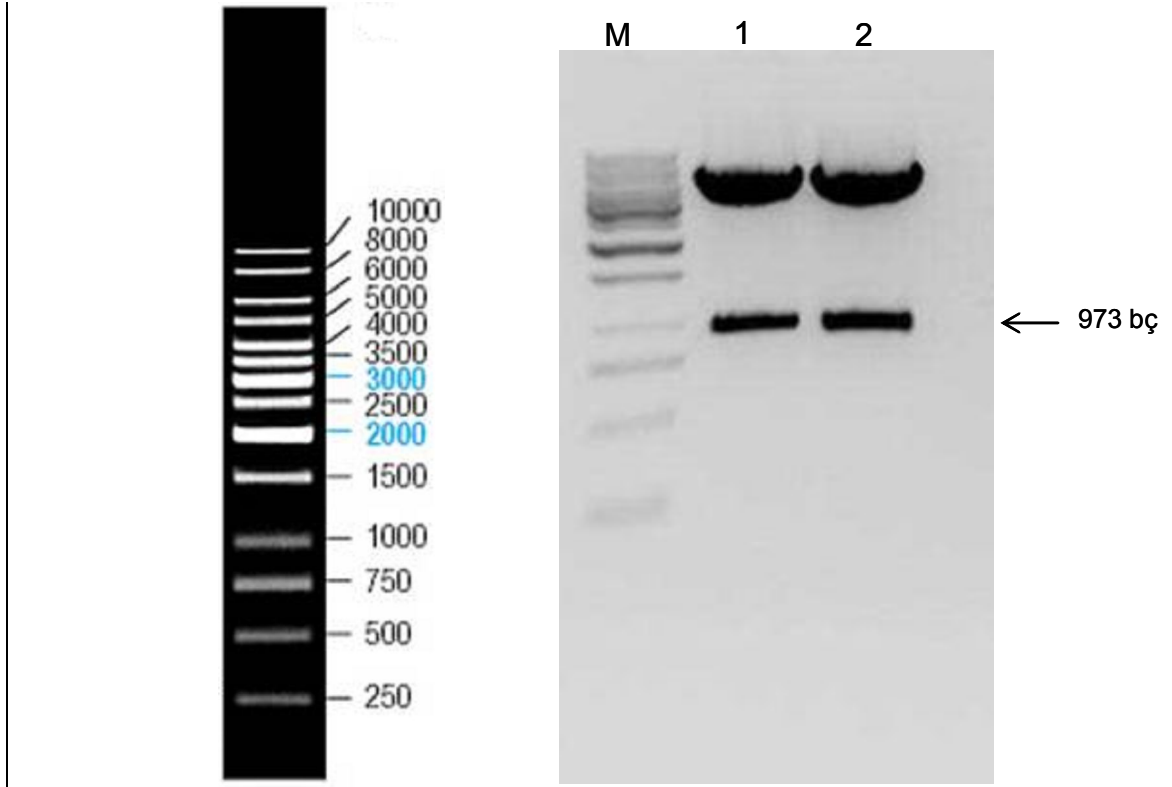


### 3.3.1 973bç [-935/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

1289bç [-1251/+38] insan-*CA9* promotor dizisini içeren rekombinant pGL2-basic plazmiti transforme edilmiş olan *E.coli XL1 blue* hücrelerinden tek koloni ekim yapıldı. Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler 1289bç uzunluğundaki promotörü 316. bazdan kesen *SmaI* enzimi ve *NheI* restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.11). Agaroz jelde kesim sonucu oluşan 973bç uzunluğundaki promotor parçası jelden geri kazanılarak, *SmaI* ve *NheI* restriksiyon enzimi ile kesilen pGL2-basic vektörü ile bir gece ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli XL1blue* ve *DH5α* hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 2 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyonu ve ardından plazmitlerin *SmaI* ve *NheI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Şekil 3.12’de görüldüğü gibi ekilen iki koloninin her ikisi de rekombinant vektörü içermektedir.



Şekil 3. 11: İnsan *CA9* promotörünü içeren rekombinant pGL2-basic vektörünün *SmaI* ve *NheI* ile restriksiyon kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb Marker, 1: 973 bç parça

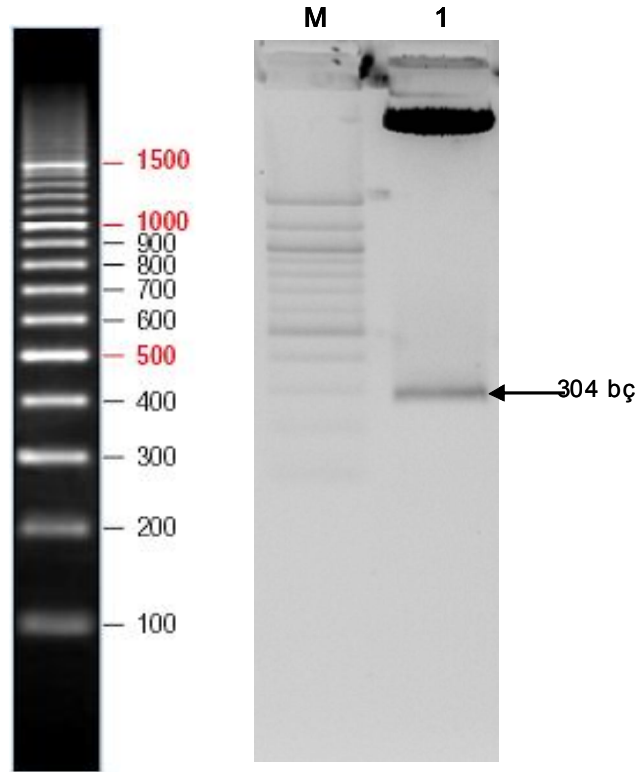


Şekil 3. 12: pGL2-Basic vektörüne klonlanan 973bç [-935/+38] promotorun SmaI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb Marker, 1: 1. koloni, 2: 2. koloni

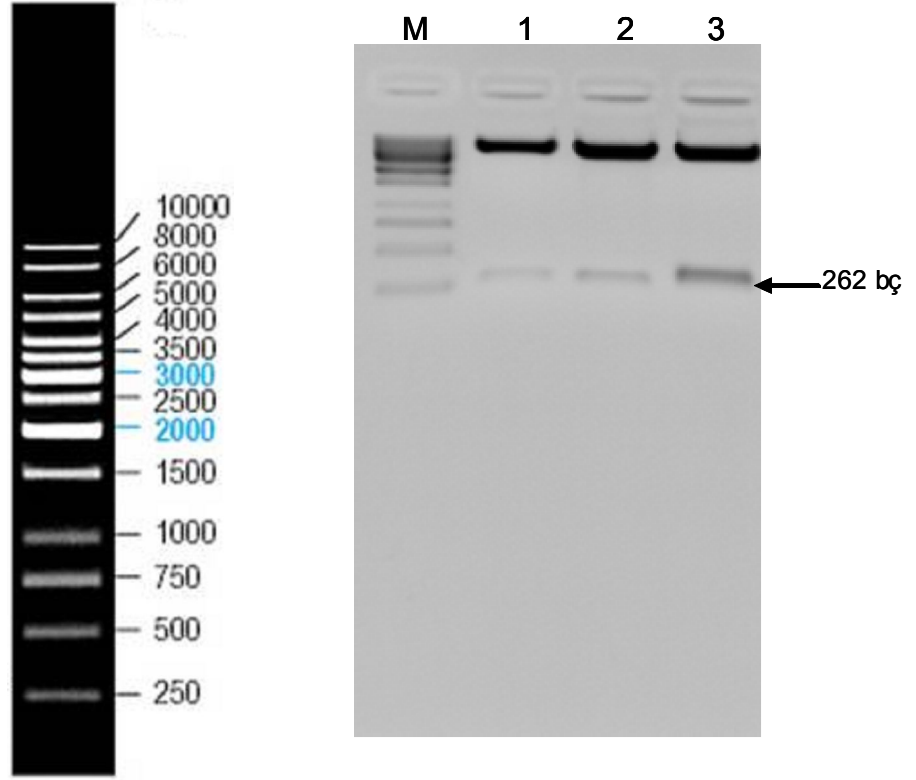
### 3.3.2 304bç [-266/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

973bç [-935/+38] insan-CA9 promotor dizisini içeren rekombinant pGL2-basic plazmiti transforme edilmiş olan *E.coli* XLI blue hücrelerinden tek koloni ekim yapılarak, plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler 973bç uzunluğundaki promotörü 669. bazdan kesen ve küt uç oluşturan PvuII ve NheI restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.13). Agaroz jelde kesim sonucu oluşan 304bç uzunluğundaki promotor parçası jelden geri kazanılarak, küt uç oluşturan SmaI enzimi ve yapışkan uç oluşturan NheI restriksiyon enzimi ile kesilen pGL2-basic vektörü ile bir gece ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli* XLIblue ve DH5a hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 3 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyonunun ardından kontrol kesimi yapıldı.

PvuII ile kesilen promotor dizi ile SmaI ile kesilen vektörün birleşmesi sonucu oluşan dizi PvuII için spesifik restriksiyon tanıma dizisi olmadığı için kontrol kesiminde PvuII kullanılmadı. Plazmitlerin 304bç'lik promotor diziyi içerip içermediğinin kontrol edilmesi için, diziyi 243. bazdan kesen NcoI enzimi ve pGL2-basic klonlama bölgesinde spesifik tanıma dizisi bulunan HindIII enzimi kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.14'de görüldüğü gibi ekilen tüm koloniler rekombinant vektörü içermektedir.



Şekil 3. 13: 973bç [-935/+38] insan *CA9* promotor parçasını içeren rekombinant pGL2-basic vektörünün PvuII –NheI restriksiyon kesim sonucu jel görüntüsü M: 100 bç marker, 1: 304 bç parça



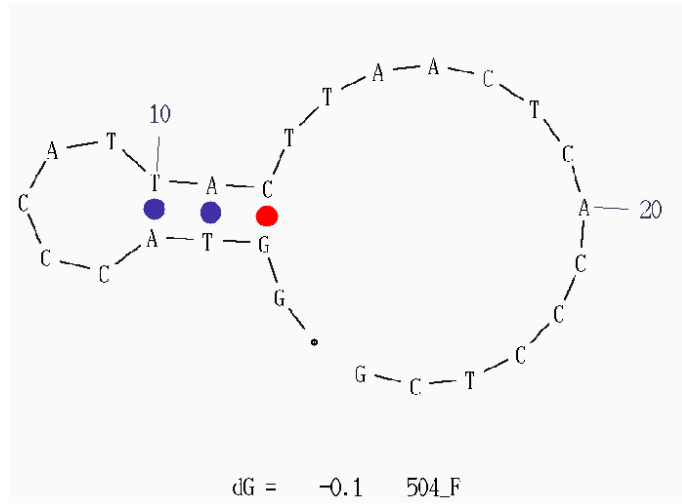
Şekil 3. 14: pGL2-basic vektörüne klonlanan 304bç [-266/+38] promotorun NcoI ve HindIII ile kontrol kesim sonucu M: 1 kb Marker, 1: 1. koloni, 2: 2. koloni,3: 3. koloni

### 3.3.3 504bç [-466/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

504bç [-466/+38] uzunluğundaki promotor parçasının oluşturulması için PCR tekniği kullanıldı. Daha önce 1289bç uzunluğundaki promotorun elde edilmesinde kullanılan reverse primer 504bç [-466/+38] uzunluğundaki promotor parçasının çoğaltılmasında kullanıldı. Yalnız forward primer için yeniden primer tasarımı yapıldı (Bölüm 3.2.1). Buna göre tasarlanan primerde pGL2-basic vektörüne klonlama için KpnI restriksiyon tanıma bölgesi kullanıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: Dizayn edilen [-466/+38] *CA9* promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, T<sub>m</sub> değeri, ve uzunluğu

Primer	Uzunluk	T <sub>m</sub> (°C)	Dizisi
[-466/+38] bölgesine spesifik forward primer	26	66,17	5'- <u>GGT ACC</u> CAT TAC TTA ACT CAC CCT CG-3' KpnI kesim bölgesi
i <i>CA9</i> -Reverse	29	68,7	5'- <u>GCT AGC</u> CTG ACT GTG GGG TGT CCC AGC AC-3' Nhe I kesim bölgesi



Şekil 3. 15: [-466/+38] *CA9* promotor bölgesine spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli

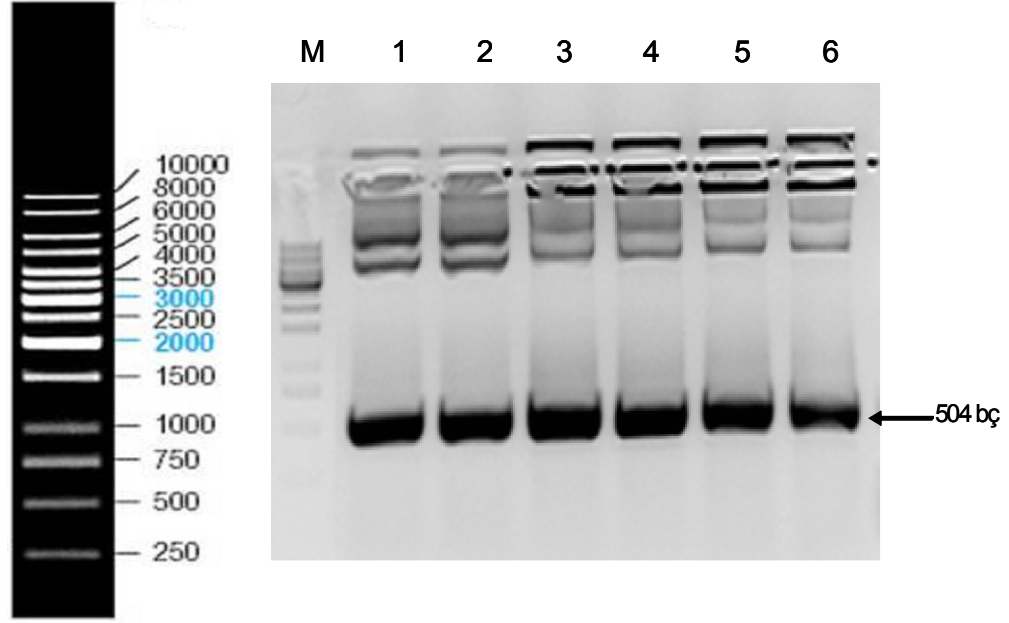
PCR reaksiyonları bölüm 2.2.2.2. de belirtildiği şekilde 50µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak 1289bç uzunluğunda insan *CA9* promotorunu içeren pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Çizelge 3.4.'de belirtilen PCR programı kullanılarak dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 504bç [-466/+38]'lik insan *CA9* promotoruna ait bant UVP görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.16'da gösterildiği gibi tüm tüplerde tek bir bant şeklinde dizi elde edildi.

Çizelge 3.4: 504bç [-466/+38] promotor parçasının çoğaltılması için kullanılan PCR koşulları

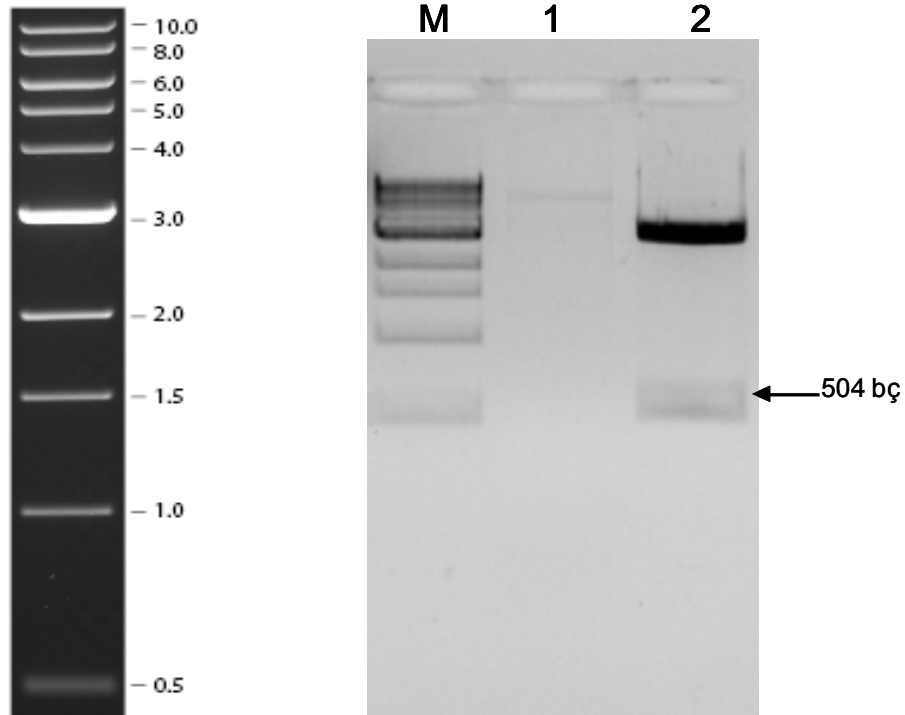
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	2 dakika
2	35	94 °C	1 dakika
		61 °C	45 saniye
		72 °C	1 dakika
3	1	72 °C	10 dakika

PCR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile pGEM-T Easy vektörüne klonlandı (Bölüm 3.2.3). Şekil 3.17’de klonlanan 504 bç uzunluğunda insan *CA9* promotor dizisini içeren rekombinant PGEM-T Easy vektörüne sahip olduğu düşünülen kolonilerden yapılan plazmit DNA izolasyonu sonuçlarının kontrol kesimleri görülmektedir. Buna göre yalnızca 2. kolonide bulunan vektör rekombinanttır ve 504bç uzunluğunda insan *CA9* promotor dizisini içermektedir

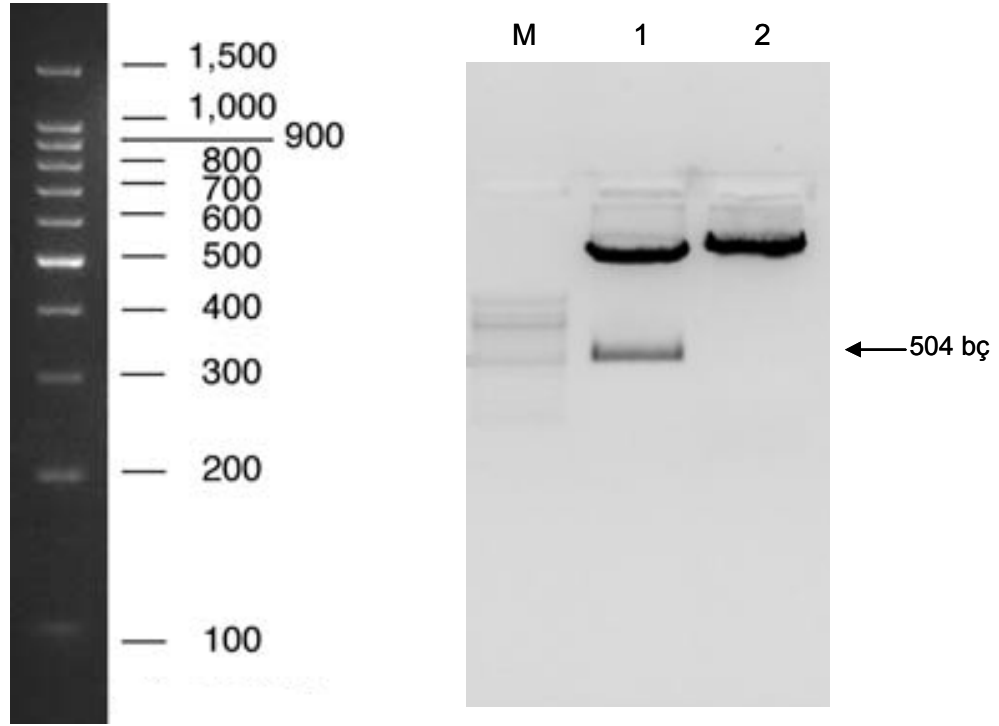
pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 504bç insan *CA9* promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pGL2-basic lusiferaz raportör vektörüne alt klonlama yapıldı (Bölüm 3.2.4.). Şekil 3.18’de pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 504 bç uzunluğunda insan *CA9* promotor dizisine sahip olduğu düşünülen kolonilerden yapılan plazmit DNA izolasyonu sonuçlarının kontrol kesimleri görülmektedir. Buna göre birinci kolonide bulunan vektör rekombinanttır ve insan 504bç *CA9* promotor dizisini içermektedir.



Şekil 3. 16: 504bç [-466/+38] uzunluğunda promotor parçası PCR sonucu jel görüntüsü M: Marker 1 ve 2: 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 ve 4: 2 mM MgCl<sub>2</sub>,5 ve 6: 4 mM MgCl<sub>2</sub>



Şekil 3. 17: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 504bç [-466/+38] promotor parçasının KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -1 kb marker, 1 - 1. koloni, 2 -2. koloni



Şekil 3. 18: pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 504bç [-466/+38] promotor parçası KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -100 bç marker(Promega), 1 -1. koloni, 2 -2.koloni

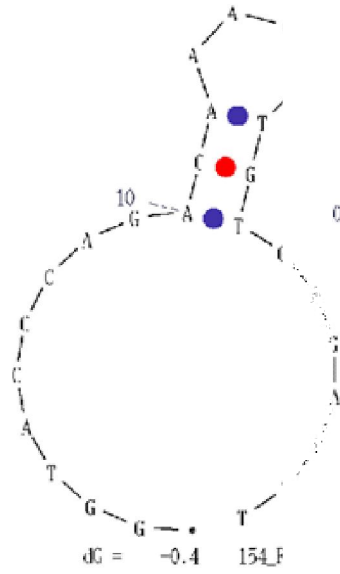
### 3.3.4 154bç [-116/+38] Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

154bç [-116/+38] uzunluğundaki promotor parçasının oluşturulması için PCR tekniği kullanıldı. 1289bç ve 504bç uzunluğundaki promotor parçalarının çoğaltılmasında kullanılan reverse primer, 154bç uzunluğundaki promotor parçasının elde edilmesinde de kullanıldı. Yalnız forward primer için yeniden primer tasarımı yapıldı (Bölüm 3.2.1). Primerde pGL2-basic vektörüne klonlama için KpnI restriksiyon tanıma bölgesi kullanıldı (Çizelge 3.5).



Çizelge 3.5. Dizayn edilen [-116/+38] *CA9* promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, T<sub>m</sub> değeri, ve uzunluğu

Primer	Uzunluk	T <sub>m</sub> (°C)	Dizisi
[-116/+38] bölgesine spesifik forward primer	26	66,17	5'-GGT ACC CAG ACA AAC CTG TGA GAC TT-3' KpnI kesim noktası
iCA9-Reverse	29	68,7	5'-GCT AGC CTG ACT GTG GGG TGT CCC AGC AC-3' Nhe I kesim bölgesi



Şekil 3.19: [-116/+38] *CA9* promotor bölgesine spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli

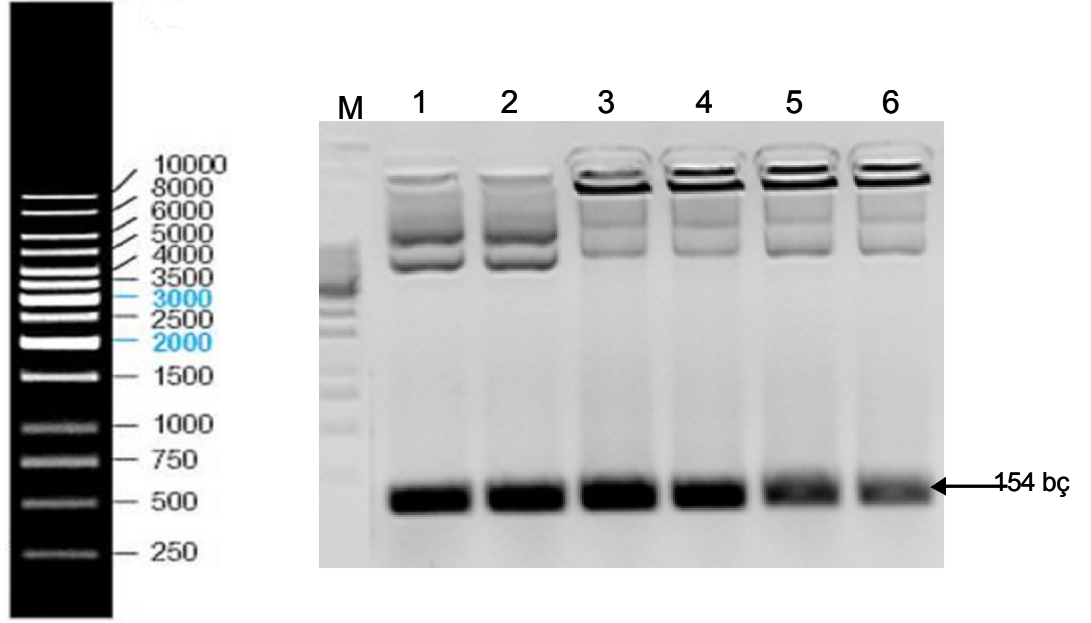
PCR reaksiyonları bölüm 2.2.2.2. de belirtildiği şekilde 50µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak 1289bp uzunluğunda insan *CA9* promotorunu içeren pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Çizelge 3.6'da belirtilen PCR programı kullanılarak dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 154bp [-116/+38]'lik insan *CA9* promotoruna ait bant UVP görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.20'de gösterildiği gibi tüm tüplerde tek bir bant şeklinde çoğalma sağlandı.

Çizelge 3.6: 154bç [-116/+38] promotor parçasının çoğaltılması için kullanılan PCR koşulları

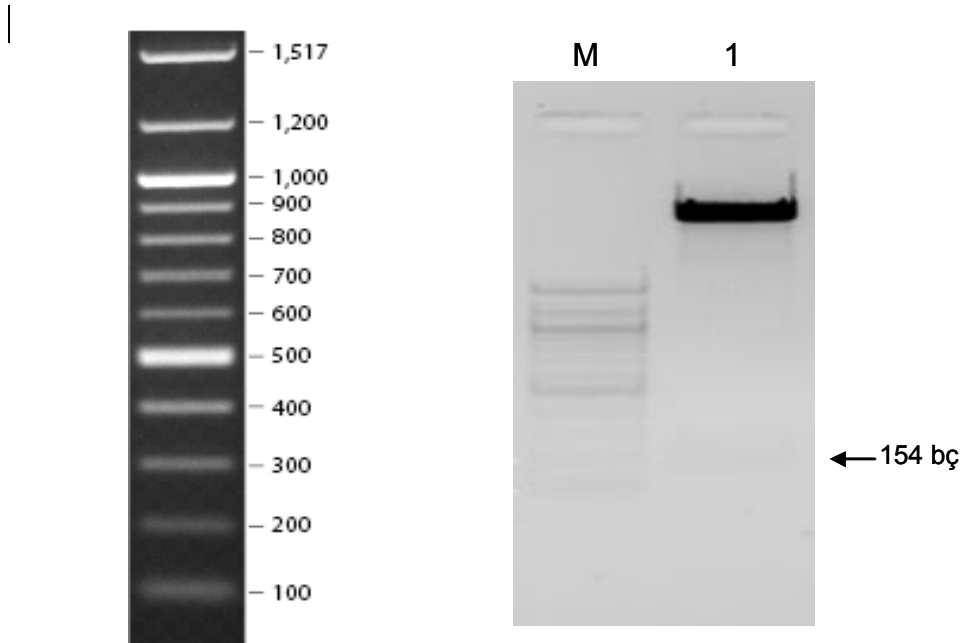
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	2 dakika
2	35	94 °C	1 dakika
		60 °C	45 saniye
		72 °C	1 dakika
3	1	72 °C	10 dakika

PCR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlandı (Bölüm 3.2.3). Şekil 3.21’de klonlanan 154 bç uzunluğunda insan *CA9* promotor dizisini içeren rekombinant PGEM-T Easy vektörüne sahip olduğu düşünülen koloniden yapılan plazmit DNA izolasyonu sonucunun kontrol kesimleri görülmektedir.

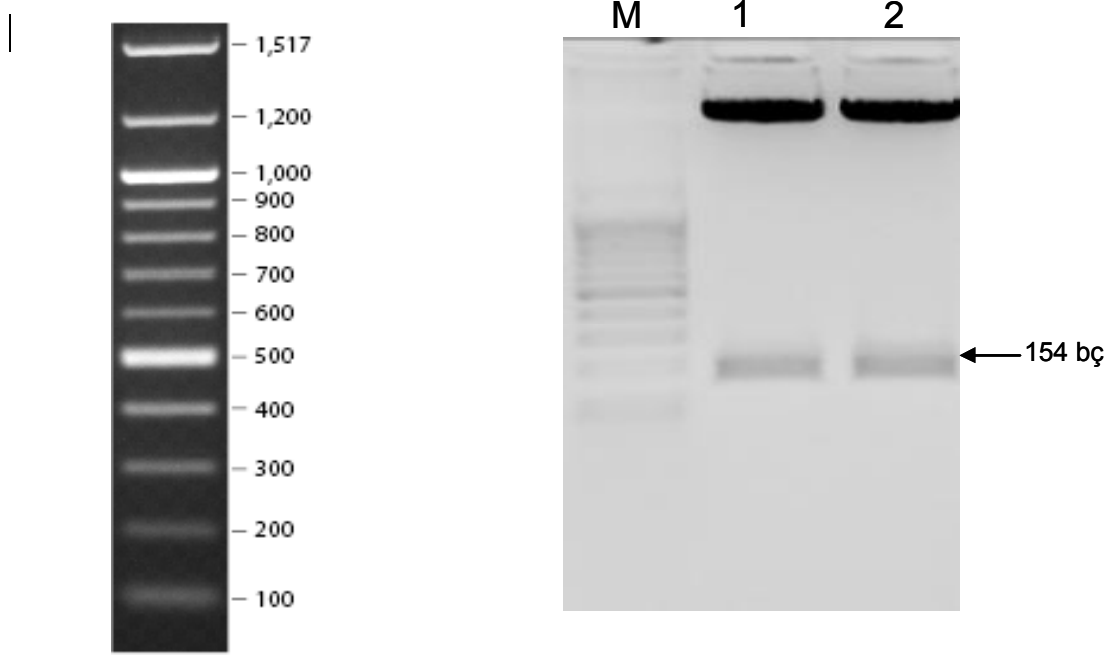
pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 154bç insan *CA9* promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pGL2-basic lusiferaz raportör vektörüne alt klonlama yapıldı (bölüm 3.2.4.). Şekil 3.22’de pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 154 bç uzunluğunda insan *CA9* promotor dizisine sahip olduğu düşünülen kolonilerden yapılan plazmit DNA izolasyonu sonuçlarının kontrol kesimleri görülmektedir. Buna göre her iki kolonide bulunan vektör rekombinanttır ve insan 154bç *CA9* promotor dizisini içermektedir.



Şekil 3.20: 154 bç [-116/+38] uzunluğunda promotor parçası PCR sonucu jel görüntüsü M : Marker 1ve 2: 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 ve 4: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 ve 6: 4 mM MgCl<sub>2</sub>



Şekil 3.21: PGEM-T Easy vektörüne klonlanan 154bç [-116/+38] promotor parçasının KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M -100bç marker (NEB), 1 -1. koloni



Şekil 3.22: pGL2-basic vektörüne alt klonlama yapılan 154bç [-116/+38] promotor parçası KpnI ve NheI ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü **M** -100 bç marker(promega), **1** -1. koloni, **2** -2.koloni

### 3.4 İnsan *CA9* Geni Promotorunun Karakterizasyonu

İnsan *CA9* promotoru üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri web tabanlı bir program olan TF SEARCH ver. 1.3. programı kullanılarak belirlendi (Şekil 3.23). Ayrıca 2000 yılında Cho ve arkadaşları tarafından belirlenen muhtemel transkripsiyonunun başlangıç dizileri ve bazı transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri de *CA9* promotoru üzerinde işaretlendi [125]. Belirlenen tüm transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ise Ek 5’de verildi. İncelenen 1289bç [-1251/+38] uzunluğundaki promotor üzerinde sayısız transkripsiyon bağlanma sinyalleri belirlenmiştir. Önemli bulunan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin promotor üzerindeki yerleşimleri ve kaç defa bağlandıkları ile ilgili bilgilere de şekil 3.23 ve çizelge 3,7’de ulaşılabilir. Unutulmamalıdır ki bu bağlanma dizilerinin işlevsel olup olmadığı promotorun fonksiyonel analizleri ile test edilecektir. İnsan *CA9* promotoru ile yapılan çalışmalar TATA kutusu içermediğini göstermiştir. Yine yaptığımız analiz sonucunda da TATA kutusu olmadığı tespit edildi. Buna karşılık genin

regülasyonunda önemli olabilecek AP1, AP2, P53, CRE-BP ve C/EBP transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri tespit edildi. Bunların dışındaki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin ise doku spesifik transkripsiyon, indüklenebilir transkripsiyon ya da baskılanabilir transkripsiyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

İnsan *CA9* promotor bölgesinin *Mus Musculus CA9* promotor bölgesi ile karşılaştırılması için BioEdit Sequence Alignment Programı kullanılmıştır. Karşılaştırma sonucunda yaklaşık 725 nükleotitlik bir bölge en yüksek homoloji gösterdi ve bu bölgedeki iki türün promotor dizileri arasında %66,1 oranında benzerlik bulundu (Şekil 3.24).

-1251 gcaga

-1246 attcatctct cttccctcaa tatgatgata ttgacagggg tt**accctcac** tcactagatt

----->  
**Forward primer**

-1186 gtgag---ct gctcagggca ggtagcgttt tttgtttttg tttttgtttt tcttttttga

-1126 gacaggggtct tgctctgtca cccaggccag agtgcaatgg tacagtctca gctcactgca

----->  
**AP4**

-1066 gcctcaaccg cctcgggtca aaccatcatc ccatttcagc ctcttgagta gctgggacta

-1006 caggcacatg ccattacacc tggctaattt ttttgtattt ctagtagaga cagggtttgg

----->  
**MyoD**

-946 ccatggtgcc cgggctggtc tcgaactcct ggactcaagc aatccacca cctcagcctc

-886 ccaaaatgag ggaccgtgtc ttattcattt ccatgtccct agtccatagc ccagtgctgg

-826 acctatggta gtactaaata aatatttggt gaatgcaata gtaaatagca tttcagggag

----->  
**C/EBPb**

-766 caagaactag attaacaaag gtggtaaaag gtttgagaaa aaaaataata gtttaatttg

-706 gctagagtat gagggagagt agtaggagac **a**agatggaaa ggtctcttgg gca**agg**tttt

-646 gaaggaagtt ggaagtcaga agtacacaat gtgcatatcg tggc**agg**cag tggggagcca

-586 atgaaggctt ttgagcagga gagtaatgtg ttgaaaaata aatatagggtt aaacctatca  
—————→  
**C/EBP $\beta$**

-526 gagcccctct gacacataca cttgcttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc  
←————  
**AP1**

-466 cattaacttaa ctcaccctcg ggctccccta gcagcctgcc ctacctctt acctgcttcc  
←————  
**CRE-BP**

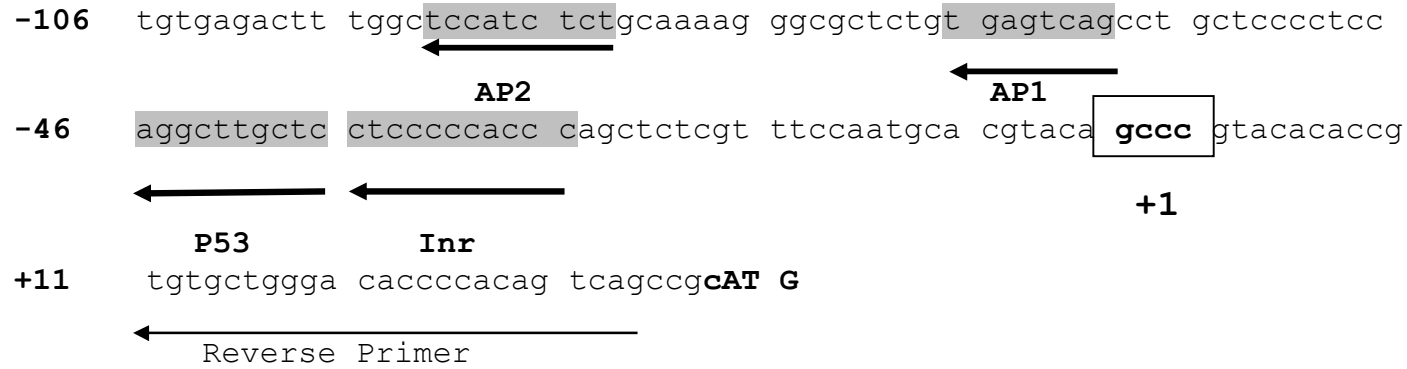
-406 tgggtggagtc agggatgtat acatgagctg ctttcctct cagccagagg acatgggggg  
←————  
**AP1**

-346 ccccagctcc cctgccttc cccttctgtg cctggagctg ggaagcaggc cagggttagc

-286 tgaggctggc tggcaagcag ctgggtgggtg ccaggagag cctgcatagt gccaggtggt  
—————→  
**AP4**

-226 gccttgggtt ccaagctagt ccatggcccc gataaccttc tgctgtgca cacacctgcc  
—————→  
**Myo D**

-166 cctcactcca cccccatcct agctttggta tgggggagag ggcacagggc cagacaaacc



Şekil 3. 23: İnsan *CA9* promotorunda yer alan muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 kutucukla gösterilmiştir.. Translasyonel başlangıç kodunu ATG ise büyük harfle ifade edilmiştir. Renkli olarak işaretlenen bölgeler Cho ve arkadaşları tarafından belirlenen dizileri göstermektedir [125].



Çizelge 3.7: İnsan *CA9* promotörü üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokasyonları

<b>TF</b>	<b>Bağlanma Dizileri</b>	<b>BÖLGE</b>
AP1	TGAGTCAG GTGGTGAGTCAGG CTGACACAT	-60, -394, -510
AP2	TCCATCTCT	-84
AP4	CTCAGCTCACT AGCAGCTGGG	-262, -1071
P53	AGGCTTGCTC	-37
MyoD	TACACCTGGC CACACCTGCC	-176, -983
CRE-BP	CATTACTTAACT	-457
C/EBP $\beta$	TATTTGTTGAATG ATGTGTTGAAAAT	-548, -792

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150  
 Human.TXI -----GCAGAAATTCATCTCTCTCCCTCAATATGATGATATTGACAGGGTTTGCCTCAGTCTAGATT---CTGAGCTCCTGCTCAGGGCAGGTAGCGTTTTTCTTTTT---GTTTTCTTT  
 Mus musculus.TX TTGTAGTACAGGTTCTCTCTTCCACCATGTCGATTTTGGGGTCCACCTCAGATCATCAGAT-TCGGTGCAAGTCTCTTACCCTAAGCCTCTGACCAGTCTCTATTCAAATGGTCCATGCTCTCTCTTCCAGAAATCCAAAT

160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 Human.TXI TTCTTTTTGAGAC-AGGGTCTTGTCTGTCAACCAGCCAGAGTCAATGGTACAG---TCTCAGCTCAGTGCAGCCTCAACCCTCGGCTCAAACCATCATCCATTTTCAGCC-TCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCACAT-GCCA  
 Mus musculus.TX CTCCTTACTGTGATTATTAACCAACCCCTCCCCGTGGGGTCTTACCCTCTCTTCAAAGATGGGAACAGATTTTACCACATCCATAGTTCCTTGAAGCAGAAAT--TATGACATCTGCTCCTCAGTCCCTGGAGCAGAGCTTTCAGATA

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450  
 Human.TXI TTACACCTGGCTAAATTTTTTGTATTTCTAGT--AGAGACAGGGTTTGGCCATGTTGCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGGACTCAAGCAATCCACCCACCTCAGCCTCCCAAAATGAGGGACCGT---GTCTTATTCAATTCATGTC  
 Mus musculus.TX GGAGCCTTCGTTTTCAATTCGGCATCCCTAGTCCACAGCCCACTGCCAACAATCCCTAGGTATTAAAC---AAATACGGGCTGCAAAACA-TGAATGCCATTCCTGGGCAACAAGCAGAGATTCAAAAGCCAGTCCAGAGTTTGAGAG

460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
 Human.TXI CCTAGTCCATAGCCCACTGCTGGACCTATGCTAGTACTAAATAAATATTTGT-TGAATGCAATAGT-----AAATAGCATTTTCAGG---GAGCAAGAACTAGATTAAACAAGGTGGTAAAAGGTTTGGAGAAAAAATA-ATAGTTTAA  
 Mus musculus.TX ACGAATGAATAGTTTACTCTGGGAGCAAGCTCAAGTGAAGAAATGCTTGCATGGCAGCCATGGCCCCCTGGAATCAGTCTCCAGCAGTGAAGAAAGAAACAACAACAAGCAAAAAATGCATGCCGCGAGGACACACACACAAA

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750  
 Human.TXI TT---TGGCTAGAGTATGAGGGAGACTAGTAGGAGACAAGATGAAAGGTCCTTTGGGCAAGGTTTGAAGAAAGTTGGAAGTCAAGTACACAATGTCATATCGTGGCAGGCAGTGGGAGCCAAATGAAGGCTTTTGGCAGGAGAG  
 Mus musculus.TX TTATCTGACCAGAACATTAGTGAAGAGCAAGAGACAAGACTG---GTTTTTGGGTGAGTGTGAGC--ACCTGGAAGTCCGGAA-ATAAAATGATCAGACTTTGCCAGGCAGTGGGGG-----GGGGGG

760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 Human.TXI TAAATGTTGAAAAATAAATATAGTTAAACCTATCAGAGCCCTCTGACACATACACTTGTCTTTTCATTCAAGCTCAAGTTTGTCTCCACATACCCATTACTTAACTCACCCCTCGGGCTCCCTAGCAGCCTGCCCTACCTCTTACC  
 Mus musculus.TX TAACCATTAGAGTCTCATATGTAGATTCAAATAATCA-----TGCTCAAATTTGCTTTTANTTAGCTGTGAGCC---CCTCCACCTAT-----TCACCCCTAGGNTCCTCCAGGGTNTTAACTGCCCCCTTACC

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
 Human.TXI TGCTTCTGGTGGAGTCAGGGATGTATACATGAGCTGCTTTCCCTCTCAGCCAGAGGACATGGGGGGCCCGAGTCCCTGCCTTTCCCTTCTGTGCTGGAGCTGGGAAGCAGGCCAGGTTAGCTGAGGCTGGCTGGCAAGCAGCTG  
 Mus musculus.TX CAAGACCTGACTGGGCCAGG-ATACATGCAATGGAATTTCTTGCCTCCTCAGCCCAACCCACGGGGG---CCAGCTCTTTT---CTTTCCCTGCCCCGCCAGG-GCCGGGAAGCAGGCCAGGCTTAGCAGAGGCC-----AGGAGNTG

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 Human.TXI GGTGGTCCAGGGAGAGCCTGCATAGTGCCAGGTGGTGCCTTGGGTTCCAAGCT-AGTCCATGGCCCCGATAACCTTCT---GCCTGTGCACACACCTGCCCTCAGTCCACCCCA-----TCCTAGCTTTGGTA  
 Mus musculus.TX GGTGGTCCAGGGAGAACNTATACAGTCCAGGTGGTGCCTTGGGTTCCAAGCTGAGTGGTATCCTGATAACCTTCTTTCTGCCTATGAACACACNTGCCCTCACCCCAACNTACCAATTACCCGACCAATGCTCCAGGCTTTGATA

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350  
 Human.TXI TGGGGGAGAGGGCACAGGGCCAGACA-AACTGTGAGACTTTGGTCCATCTCTGCAAAAGGGGCTCTGTGAGTCAAGCTGCTCCCTCCAGGCTTGTCTTCCCCACCCAGCTCTCGTTTCAAATGCACCTACAGCCCTACACACC  
 Mus musculus.TX TCGGGGAGGGGCAAGGGCCAGACAGAACCCTGTGGACTTTGGTCCATCTCTACAAAAGGGCAC--TGTGAGTCAAGCTGCTCCCTCAAGGCTTGTCTTCCCCACCCAGCTCCTATTTCCG-----

Şekil 3. 24: İnsan *CA9* promotor bölgesinin *Mus musculus CA9* promotor bölgesi ile karşılaştırılması

### 3.5 İnsan CA9 Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi

İnsan karbonik anhidraz 9 promotor parçalarının fonksiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için hepatoma (Hep3B) hücrelerine kalsiyum fosfat prespitasyon metodu kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Kalsiyum fosfat prespitasyon yöntemi, DNA'nın kalsiyum klorür ile karıştırılması ve bu karışımın fosfat içeren tampona kontrollü şekilde ilave edilerek oda sıcaklığında inkübasyonunu içerir. Böylece oluşan prespitasyonlar hücreler üzerine yayılarak fagositoz ya da endositoz yoluyla hücrelerin DNA moleküllerini almalarını sağlar. Yöntem özellikle kullanılan materyallerin ucuz olması ve kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Promotor aktivitesini belirlemek için raportör gen olarak ateşböceği lusiferaz geni içeren pGL2-basic vektör sistemi kullanılmıştır. Hem lusiferaz aktivitesini belirleme metodunun hassas, güvenilir ve hızlı olması, hem de bu enzimin hücre içinde stabil olmasından dolayı (uzun yarı ömürlü), lusiferaz raportör geni promotor aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Hep3B hücreleri geniş bir yelpazedeki hormonlar ve sitokinlere karşı duyarlıdır ve özellikle kalsiyum fosfat prespitasyon yöntemi ile kolaylıkla transfekte edilmektedir.

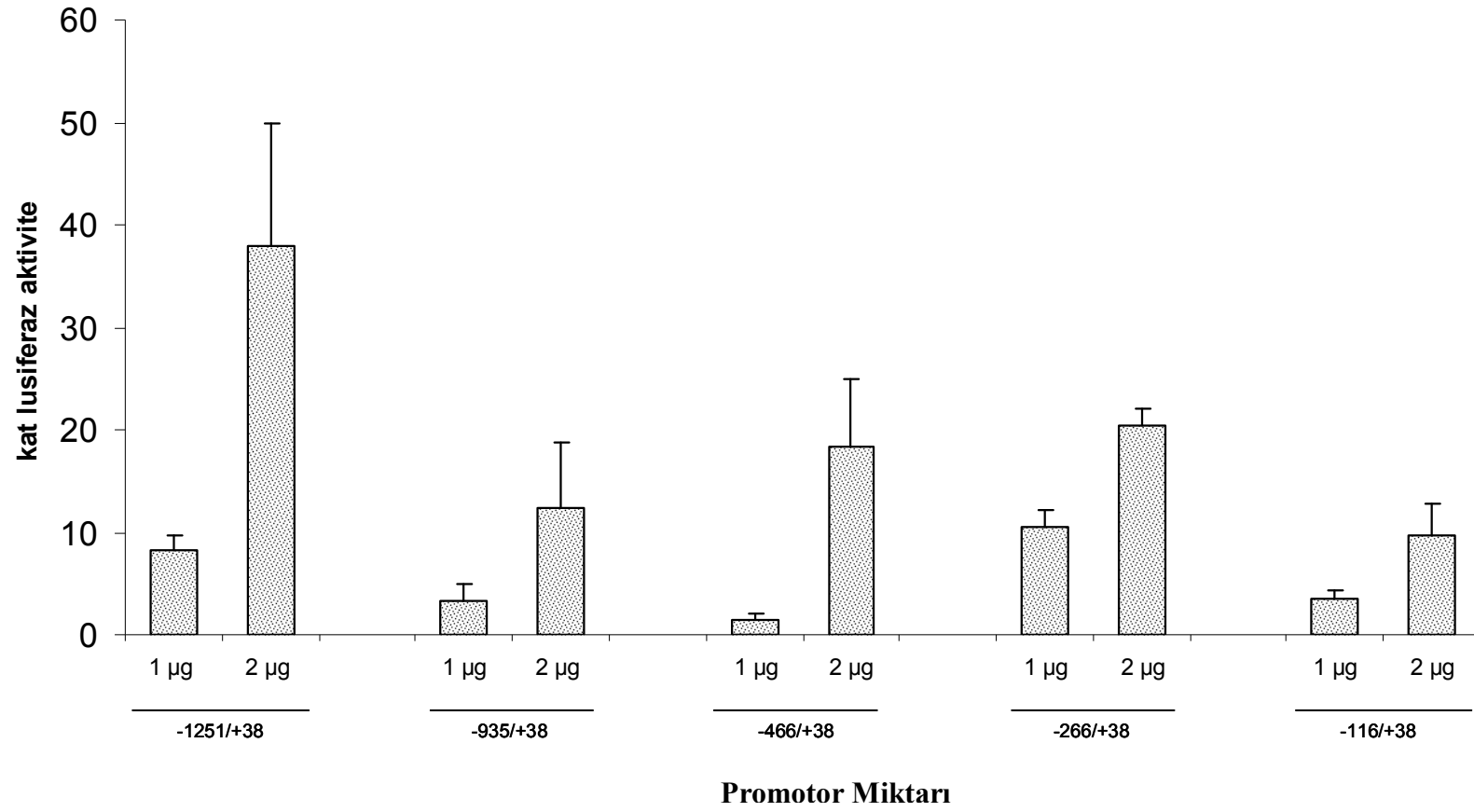
Transfeksiyon çalışmalarından önce bölüm 3.2.4 ve bölüm 3.3'de belirtildiği şekilde insan CA9 geni promotor parçaları pGL2-basic vektörü içindeki lusiferaz raportör genin üst kısmına klonlandı. Promotor parçalarının dizi analizi ile kontrolleri yapıldıktan sonra endo-free maxi prep kiti ile saflaştırılarak, transfeksiyonları yapıldı.

#### 3.5.1 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

Öncelikle beş farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan karbonik anhidraz 9 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi. Hep3B modeline aktarımda kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanıldı ve lusiferaz vektör sistemiyle aktivite belirlendi. Hücrelere 1µg ve 2µg promotor parçalarını içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5µg CMV-β-galaktosidaz vektörü de transfekte edildi. RSV-lusiferaz ve pGL2-basic vektörleri de sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak

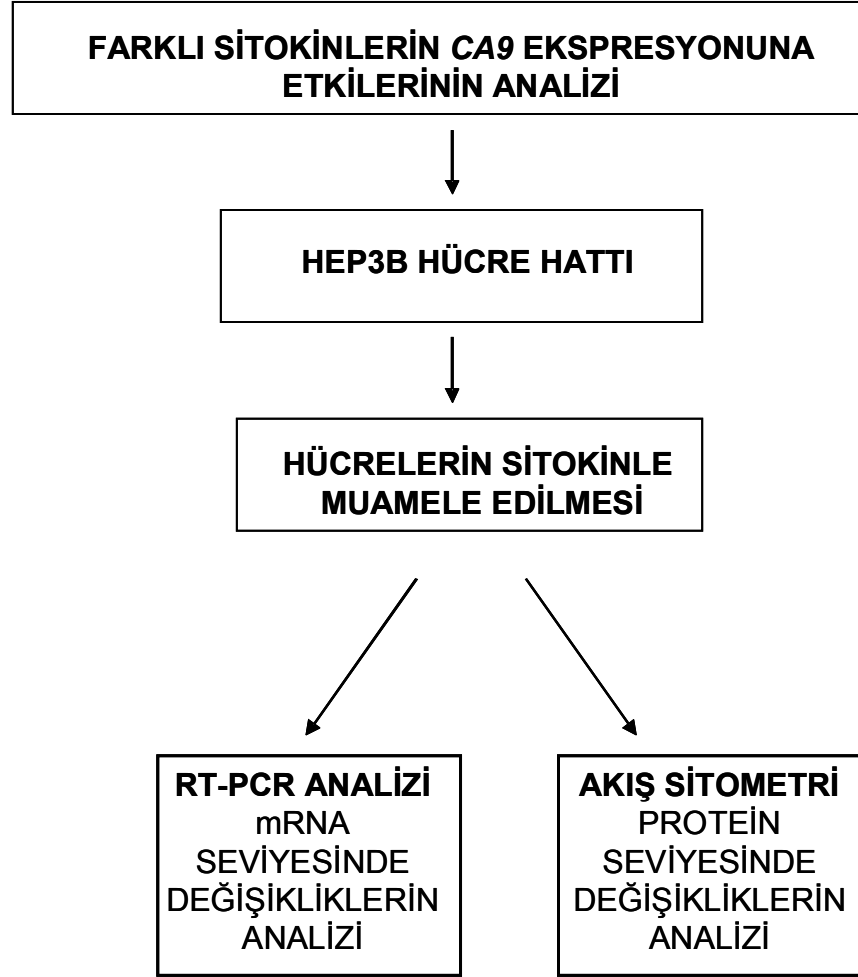
kullanıldı. Pozitif kontrol olarak RSV vektörü kullanılmasının nedeni, bu vektörün lusiferaz geninin önünde kontrol promotor olarak RSV viral promotor taşıması nedeniyle çok yüksek lusiferaz aktivitesi göstermesidir. Transfeksiyondan 48 saat sonra transfekte edilmiş hücreler ekstrakte edilerek, bölüm 2.2.4.9 ve bölüm 2.2.4.10'da belirtildiği şekilde lusiferaz ve  $\beta$ -galaktosidaz aktiviteleri ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi.

Şekil 3.25'de görüldüğü gibi, transfekte edilen DNA miktarı artışı ile lusiferaz aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Hazırlanan tüm promotor parçalarında gözlenen aktivite, en küçük parça olan 154 bç [-116/+38 ] uzunluğundaki promotor parçasının, *CA9* promotorunun bazal aktivitesi için yeterli olduğunu göstermiştir. *CA9* promotorunun en uzun parçası olan 1289 bç [-1251/+38] uzunluğundaki promotor parçası ve 304 bç [-266/38] uzunluğundaki promotor parçaları ise en yüksek aktiviteyi göstermiştir.



Şekil 3.25: *CA9* promotor parçalarının bazal aktivitelerinin karşılaştırmalı analizi

### 3.6. Karaciğer Hücrelerinde IL-6 ve TGF- $\beta$ sitokinlerinin CA9 Ekspresyonuna Etkileri



Şekil 3.26: Farklı sitokinlerin CAIX ekspresyonuna etkilerinin analizi

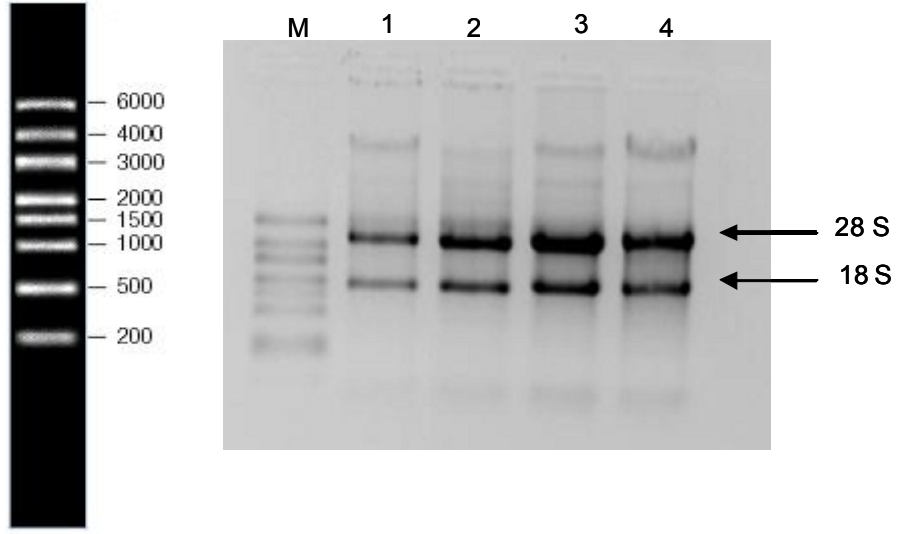
Farklı sitokinlerin insan karbonik anhidraz 9 ekspresyon seviyesine etkilerinin belirlenmesi için, hepatik akut faz gen ekspresyonu üzerinde sitokinlerin etkilerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan model olan Hep3B hücre hattı kullanılmıştır [38]. Hep3B hücrelerinde CA9 ekspresyonunun gösterildiği verilere ilave olarak, çalışmamızda farklı sitokinlerin CA9 ekspresyon seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır [126, 127]. Bu amaçla IL-6 ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin CA9 mRNA düzeyindeki etkili olup olmadığı belirlenmiştir. Özellikle

kanser sürecinde pleitropik role sahip olan TGF- $\beta$  sitokinin *CA9* ekspresyonuna etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışma sonucu elde edilen bilgilerin ışığında, sitokinlerin transkripsiyonel aktiviteye etkilerinin belirleneceği transfeksiyon çalışmaları da yapılacaktır.

### 3.6.1 RT-PCR analizlerinin optimizasyonu

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 (Şekil 3.27). RT reaksiyonlarında aynı miktarda RNA kullanılmaya dikkat edilerek cDNA elde edilmiştir. RT-PCR şartlarının normalizasyonu için insan- $\beta$ -2-mikroglobilin primerleri kullanılmıştır.  $\beta$ -2-mikroglobilin geni insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan bir genidir ve RT-PCR şartlarının normalizasyonu için kullanılmıştır. Tüm deney ve kontrol gruplarında  $\beta$ -2-mikroglobilin PCR reaksiyonları da yapılmıştır.

Çalışmamızda *CA9* ekspresyon paternini belirlemek amacıyla *CA9* genine spesifik olarak dizayn edilen ve *CA9* geninin ORF (NM 001216 erişim numaralı *CA9* mRNA dizisi) bölgesinde 1001-1350 nükleotitleri arasındaki bölgenin çoğaltılmasını sağlayan primerlerin tasarımı bölüm 2.2.2.3 de belirtildiği şekilde yapıldı. Ayrıca elde edilen PCR sonuçlarının normalize edilmesi amacıyla kullanılacak olan insan- $\beta$ -2-mikroglobilin primerleri de Dr. Dipak P.Ramji’den temin edildi. Çalışmamızda kullanılan primer dizilerine ait bilgiler Çizelge 3.8 ve Şekil 3.28’de verilmiştir.

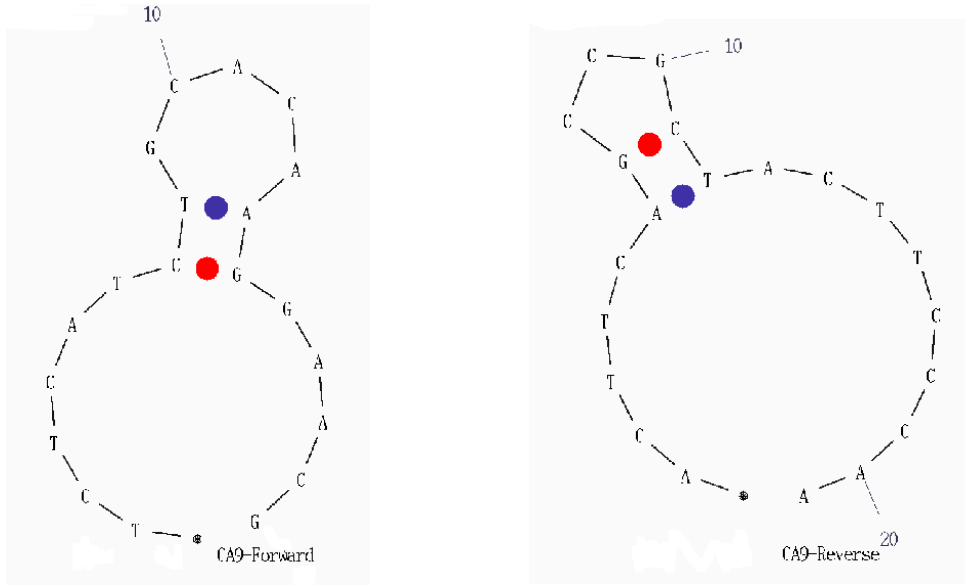


Şekil 3.27: RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: RNA marker 1,2,3 ve 4 numaralar farklı RNA örneklerini göstermektedir

Çizelge 3.8: Dizayn edilen spesifik primerlerin dizisi ve uzunlukları

Primer	Uzunluk (bç)	Dizi	Ürün (bç)
ORF-CA9 – Forward	20	TCTCATCTGCACAAGGAACG	349
ORF-CA9 – Reverse	20	ACTTCAGCCGCTACTTCCAA	
h-β-2micro –F	20	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC	314
h-β-2micro–R	22	CATGTCTCGATCCCACTTAACT	





Şekil 3.28: ORF-CA9 Primerlerin saç tokası oluşturma potansiyelleri. A) ORF-CA9-Forward primer B) ORF-CA9-Reverse primer

### 3.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları ve Optimizasyonu

PCR reaksiyonları bölüm 2.2.2.2. de belirtildiği şekilde 50µl hacimde yapıldı. İnsan CA9 ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için öncelikle PCR şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. PCR sonuçlarının normalize edilmesi amacıyla kullanılacak olan insan-β-2-mikroglobulin PCR koşulları daha önceden belirlendiği için optimizasyon yapılmamıştır (Çizelge 3.9). Buna göre CA9 PCR reaksiyonları için, farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları (1mM, 0,5mM) ve DMSO ilave edildiği durumlardaki PCR sonuçları elde edilmiştir. DMSO özellikle ikincil yapıların oluşumunun azaltılması amacıyla PCR deneylerinde kullanılmaktadır.

Optimizasyon çalışması sonucunda en uygun MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve PCR ürününün doygunluğa ulaşmadığı en uygun döngü sayısının belirlenmesi sağlanmıştır. Buna göre en uygun şartların saptanabilmesi için ilk olarak MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu değiştirilerek ve DMSO varlığı yada yokluğuna bağlı olarak Çizelge 3.10'da belirtilen 30 döngülük PCR programı kullanılarak insan CA9 ORF bölgesine spesifik dizi çoğaltıldı. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde

yürütüldü ve UVP görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.29’da görüldüğü CA9 ORF bölgesine spesifik diziler elde edildi.

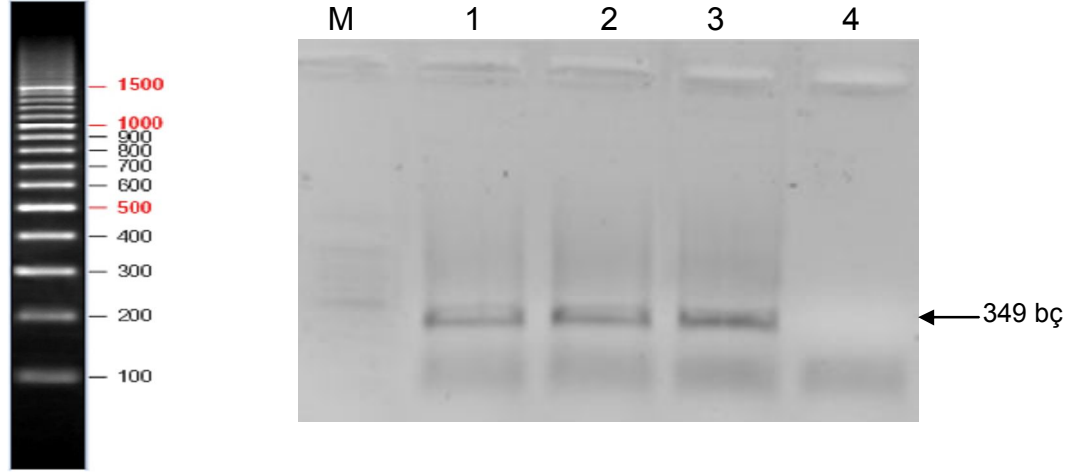
Daha sonra ise aynı PCR koşulları değiştirilmeden yalnızca döngü sayısı 20’ye indirilerek reaksiyonlar tekrar edildi. Amaç doygunluğun olmadığı en uygun döngü sayısının tespit edilmesidir. Şekil 3.30’de görüldüğü gibi 20 döngü sonucunda hiç bant gözlenmemiştir. 25 döngü ile yapılan diğer reaksiyonlarda elde edilen bantlar çok zayıf olduğu için, deneylerde 30 döngü olacak şekilde PCR programının kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.31).

Çizelge 3.9: İnsan- $\beta$ -2 mikroglobulin genlerinin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları

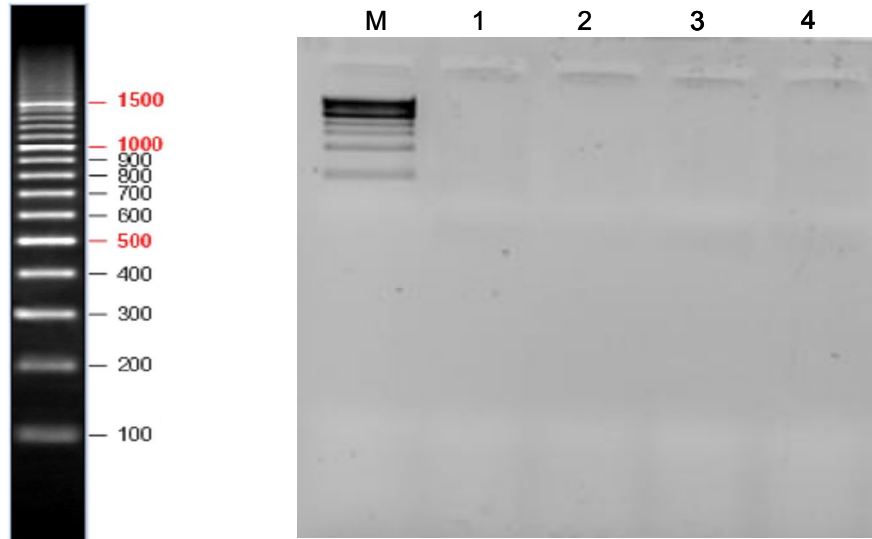
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	5 dakika
2	19	95 °C	30 saniye
		60 °C	1 dakika
		72 °C	2 dakika
3	1	72 °C	8 dakika

Çizelge 3.10: CA9 dizisinin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları

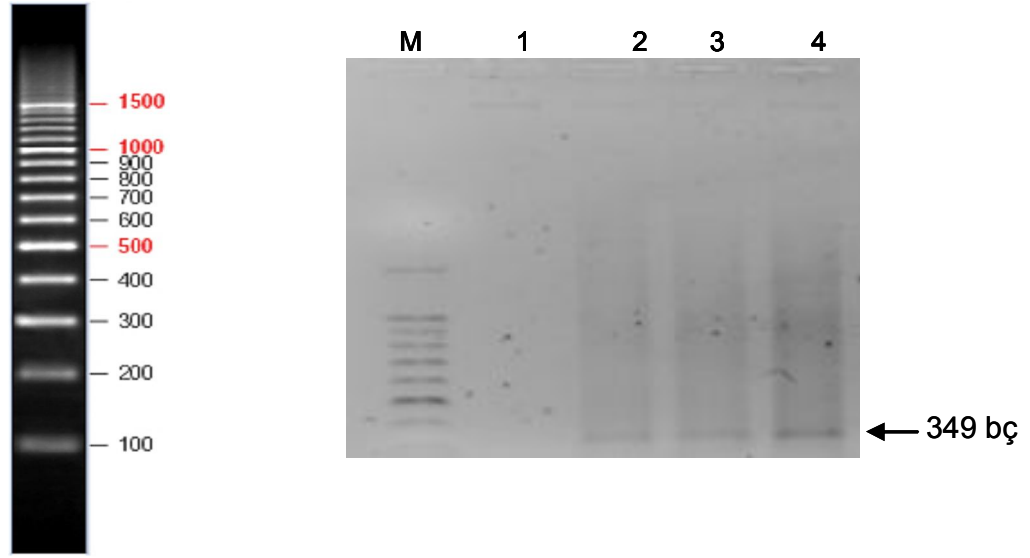
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	96 °C	5 dakika
2	30	93 °C	45 saniye
		59 °C	45 saniye
		72 °C	90 saniye
3	1	72 °C	10 dakika



Şekil 3.29: *CA9* ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 30 döngümlük PCR sonucu jel görüntüsü M: Marker 1: 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO, 2: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO, 3: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w DMSO, 4: Negatif Kontrol



Şekil 3.30: *CA9* ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 20 döngümlük PCR sonucu jel görüntüsü M: Marker 1: 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO, 2: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO, 3: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w DMSO, 4: Negatif Kontrol



Şekil 3.31: *CA9* ORF bölgesine spesifik dizinin çoğaltılması için kullanılan 25 döngülük PCR sonucu jel görüntüsü M: Marker 1: Negatif Kontrol, 2: 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO, 3: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w DMSO, 4: 1 mM MgCl<sub>2</sub> w/o DMSO

### 3.6.3 Hep3B Hücre Hattında TGF- $\beta$ 'nin *CA9* Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

İmmun yanıtta, kanserde, kalp hastalıkları ve şeker hastalığı gibi birçok hastalıkta önemli görevleri bulunan TGF- $\beta$  sitokinin Hep3B hücrelerindeki *CA9* ekspresyon seviyesine etkileri RT-PCR analizi kullanılarak belirlendi (Bölüm 2.2.5).

Hep3B hücreleri 25cm<sup>2</sup>'lik flaslara yayıldıktan bir gün sonra, 1000Ü/ml ve 500Ü/ml TGF- $\beta$  ile 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi için izole edilen RNA'dan 1µg kullanıldı.

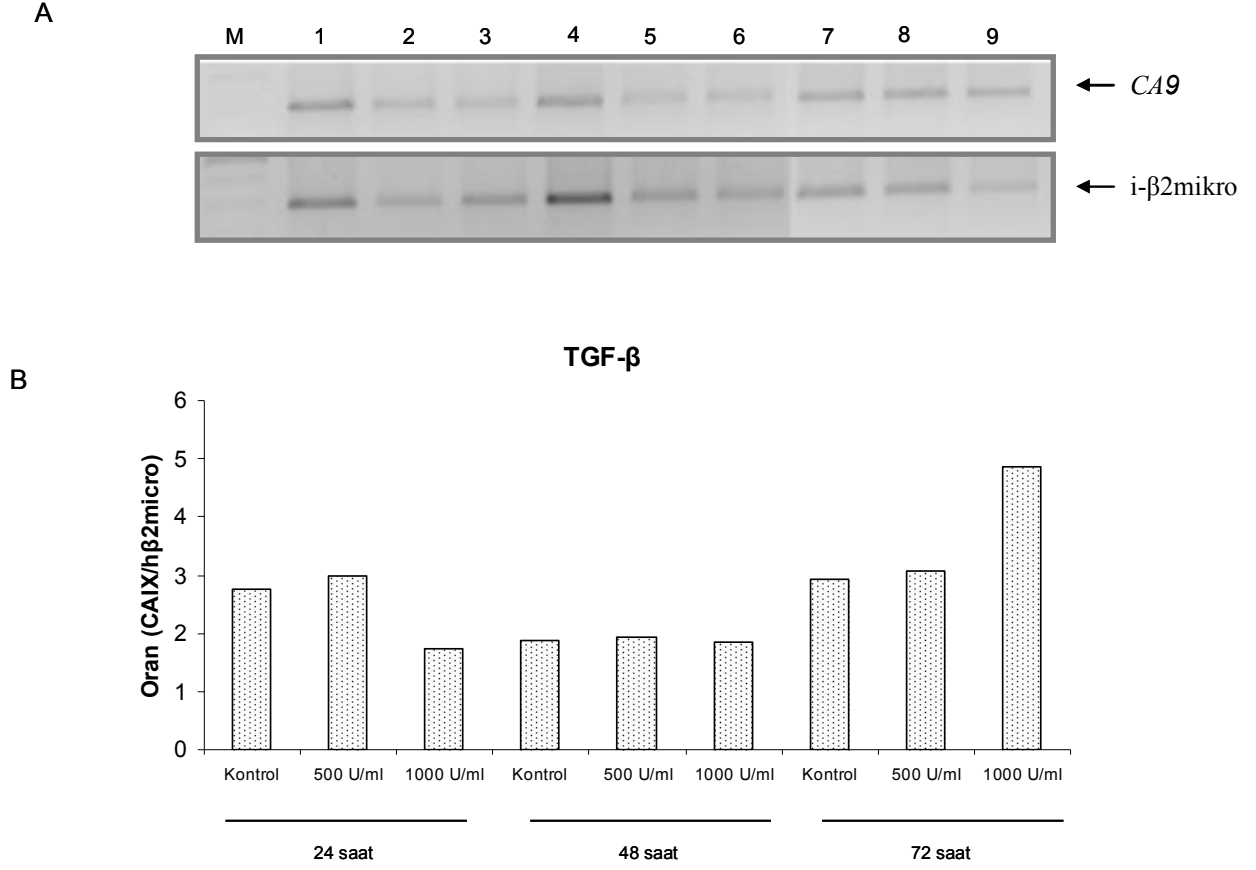
*CA9* ve insan- $\beta$ -2mikroglobulin genlerinin çoğaltılması için kullanılan PCR koşulları ve primer dizileri çizelge 3.8, çizelge 3.9 ve çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Bu koşullar PCR ürünü ve RNA kalıbı (cDNA) arasındaki direkt korelasyonu gösterecek şekilde optimize edilmiştir. PCR sonuçları %2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, Gel Doc documentation sistem ile fotoğraflandırılmış ve Syngene

GeneTools software ile dansitometrik analizleri yapılmıştır. Şekil 3.32’de TGF- $\beta$  uygulaması sonucunda elde edilen *CA9* ve insan- $\beta$ -2mikroglobulin PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile ayrımları görülmektedir. Verilerin dansitometrik analizi *CA9* PCR sonucunun aynı zaman aralığı ve konsantrasyon için elde edilen insan- $\beta$ -2mikroglobulin PCR sonucuna oranlanması ile yapılmıştır. Sonuçlar sitokin uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir.

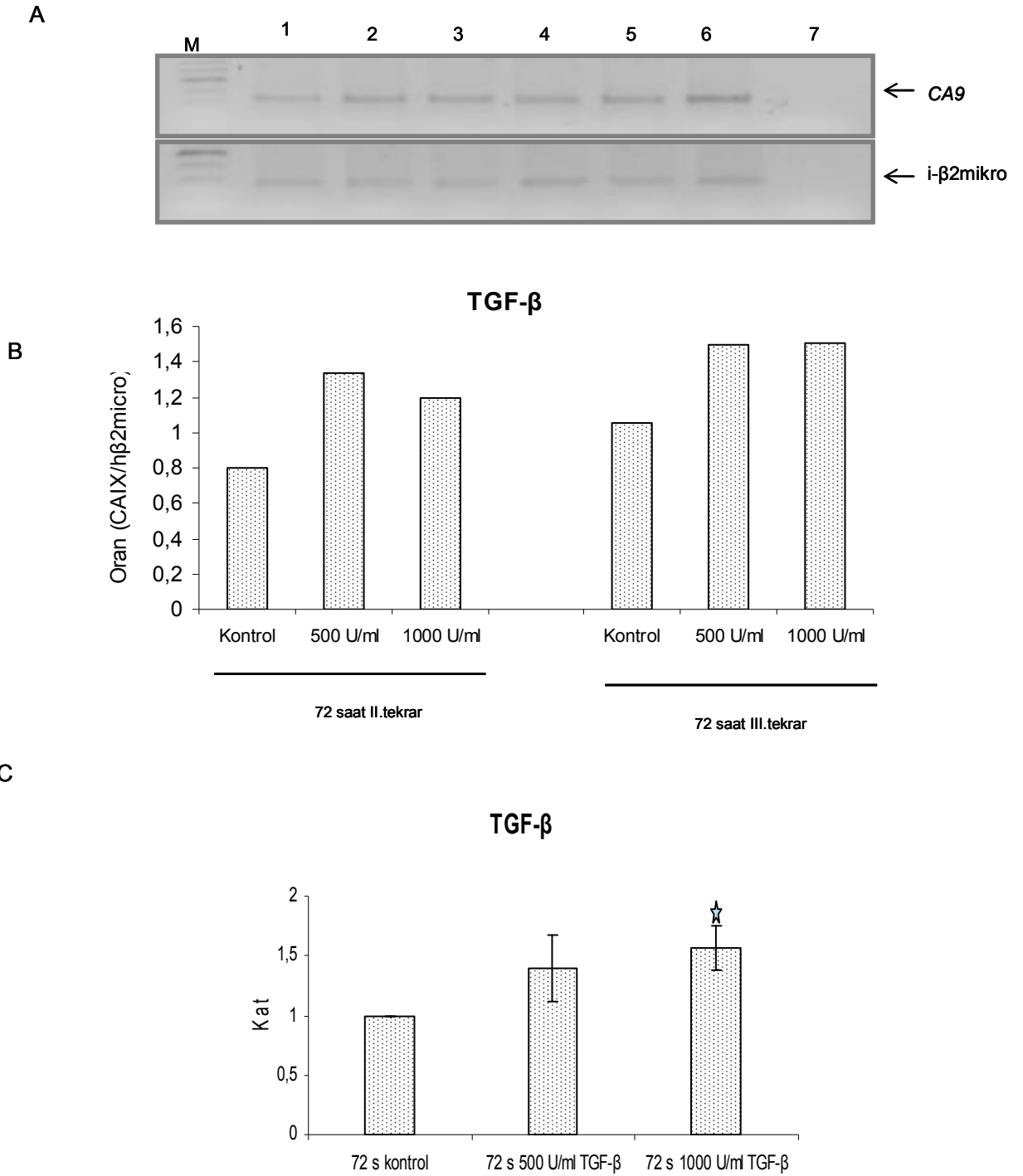
Bu ilk çalışma sonucunda 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle TGF- $\beta$  uygulamasının yalnızca 72 saat süre sonunda *CA9* ekspresyon seviyesinde artışa sebep olduğu gözlemlendi. 24 ve 48 saatte ise sitokin uygulanmamış kontrol grubu ile TGF- $\beta$  uygulanmış gruplar arasında *CA9* ekspresyonu açısından farklılık ihmal edilebilir seviyede olduğu görülmektedir. Bu nedenle 72 saat 1000Ü/ml ve 500Ü/ml TGF- $\beta$  uygulaması 3 kez tekrar edilerek, *CA9* ekspresyon seviyesinde gözlenen farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlendi (Şekil 3.33 A ve B).

Buna göre 72 saat 1000Ü/ml TGF- $\beta$  uygulaması Hep3B hücrelerinde *CA9* mRNA seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi. (Şekil 3.33.C).

## TGF $\beta$



Şekil 3.32. Hep3B hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat TGF- $\beta$  uygulamasının *CA9* mRNA seviyesindeki etkileri **A**. 1:24 s kontrol, 2: 24 s 500Ü/ml TGF- $\beta$  3: 24s 1000Ü/ml TGF- $\beta$  4: 48 s kontrol, 5: 48 s 500Ü/ml TGF- $\beta$  6: 48 s 1000Ü/ml TGF- $\beta$  7:72 s kontrol 8: 72 s 500Ü/ml TGF- $\beta$  9:72 s 1000Ü/ml TGF- $\beta$  M: Marker **B**. Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$  uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi. *CA9* PCR sonuçları insan- $\beta$ -2-mikroglobulin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmiştir.



Şekil 3.33. Hep3B hücrelerinde 72 saat TGF- $\beta$  uygulamasının *CA9* mRNA seviyesindeki etkileri **A.** M: Marker 1:72 s kontrol (II. Tekrar) 2: 72 s 500Ü/ml TGF- $\beta$ (II. Tekrar) 3:72 s 1000Ü/ml TGF- $\beta$  (II. Tekrar) 4: 72 s kontrol (III. Tekrar) 5: 72 s 500Ü/ml TGF- $\beta$ (III. Tekrar) 6:72 s 1000Ü/ml TGF- $\beta$ (III. Tekrar) 7: Negatif kontrol **B.** Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$  uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi. *CA9* PCR sonuçlarının insan- $\beta$ -2-mikroglobulin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmiştir. **C.**Üç tekrarlı sonuçların analizinin gösterilmesi. İstatistiksel olarak anlamlı değer \* işareti ile gösterilmiştir. (P<0,05)

### 3.6.4 Hep3B Hücre Hattında IL-6'in CA9 Ekspresyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Hep3B hücrelerinde IL-6'in CA9 mRNA ekspresyon seviyesine olan etkileri de belirlendi. Bu amaçla, bölüm 2.2.5.1'de belirtildiği gibi, hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. RT-PCR analizi kullanılarak IL-6'in CA9 ekspresyon paternine etkileri belirlendi (Bölüm 2.2.5.2). Şekil 3.34'de, IL-6 uygulaması sonucunda elde edilen CA9 ve insan- $\beta$ -2mikroglobulin PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile ayrımları görülmektedir.

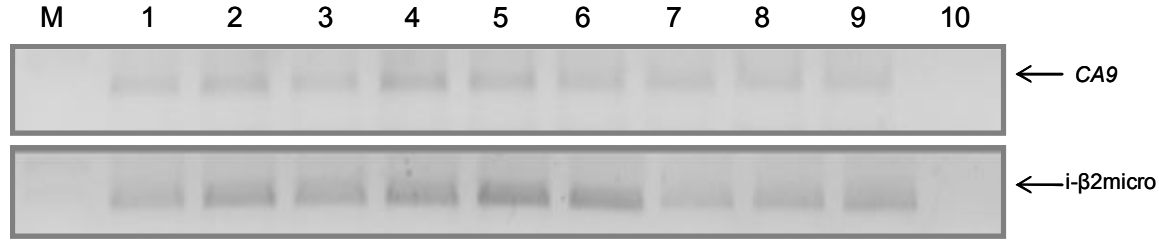
Çalışma sonucunda 72 saat IL-6 uygulamasının CA9 ekspresyon seviyesinde sitokin uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma ya da artışa sebep olmadığı görüldü. 24 ve 48 saatte ise ile IL-6 uygulanmış gruplarda CA9 mRNA seviyesinde azalma olduğu belirlendi (Şekil 3.34). Bu nedenle 24 ve 48 saat 1000Ü/ml ve 500Ü/ml IL-6 uygulaması 3 kez tekrar edilerek, CA9 ekspresyon seviyesinde gözlenen farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlendi (Şekil 3.35.A, Şekil 3.35 B, Şekil 3.36.A ve Şekil 3.36.B).

24 ve 48 saat sonucunda elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, CA9 mRNA seviyesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.36.C).

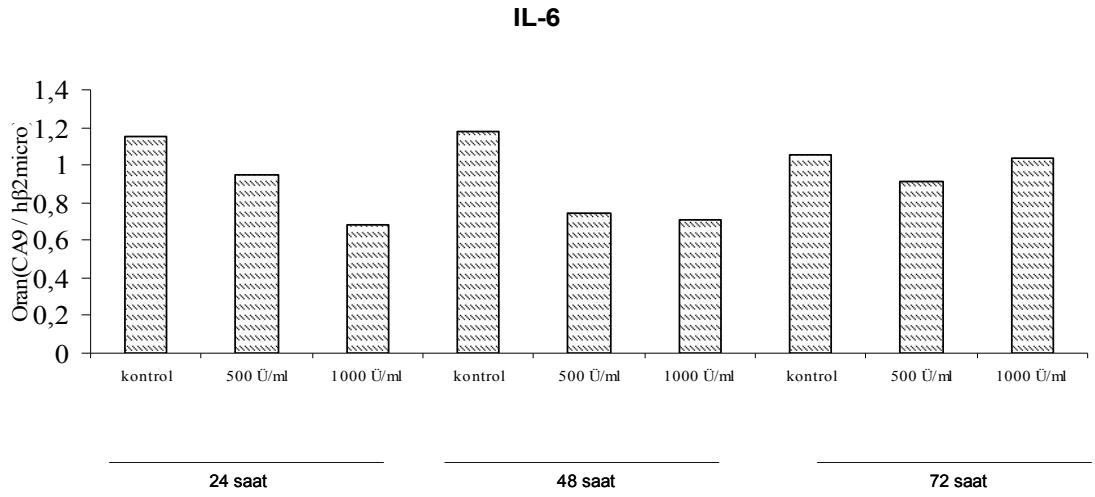


## IL-6

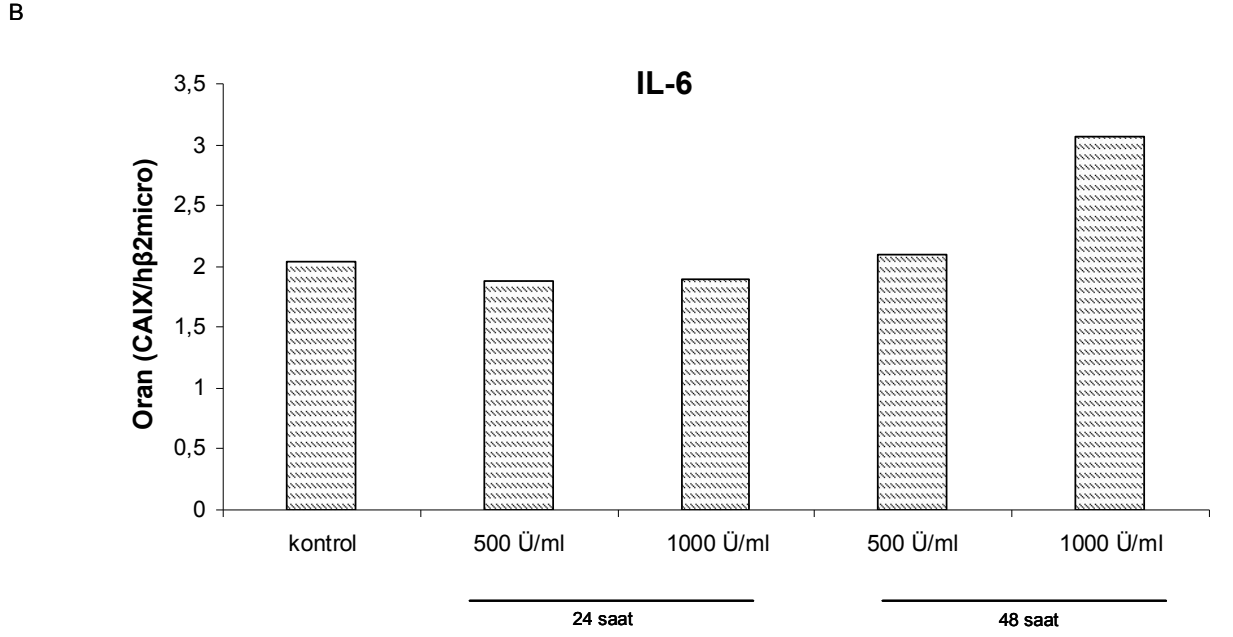
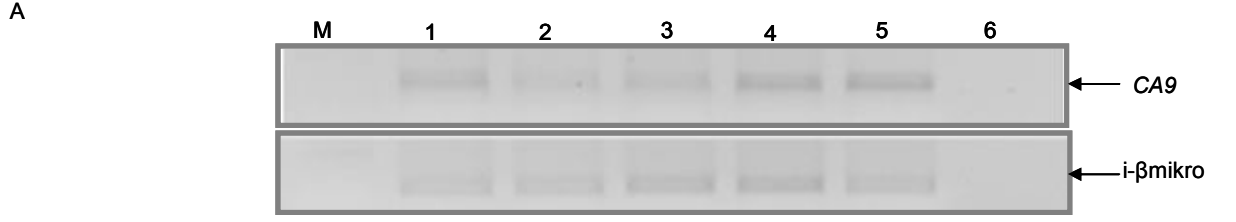
A



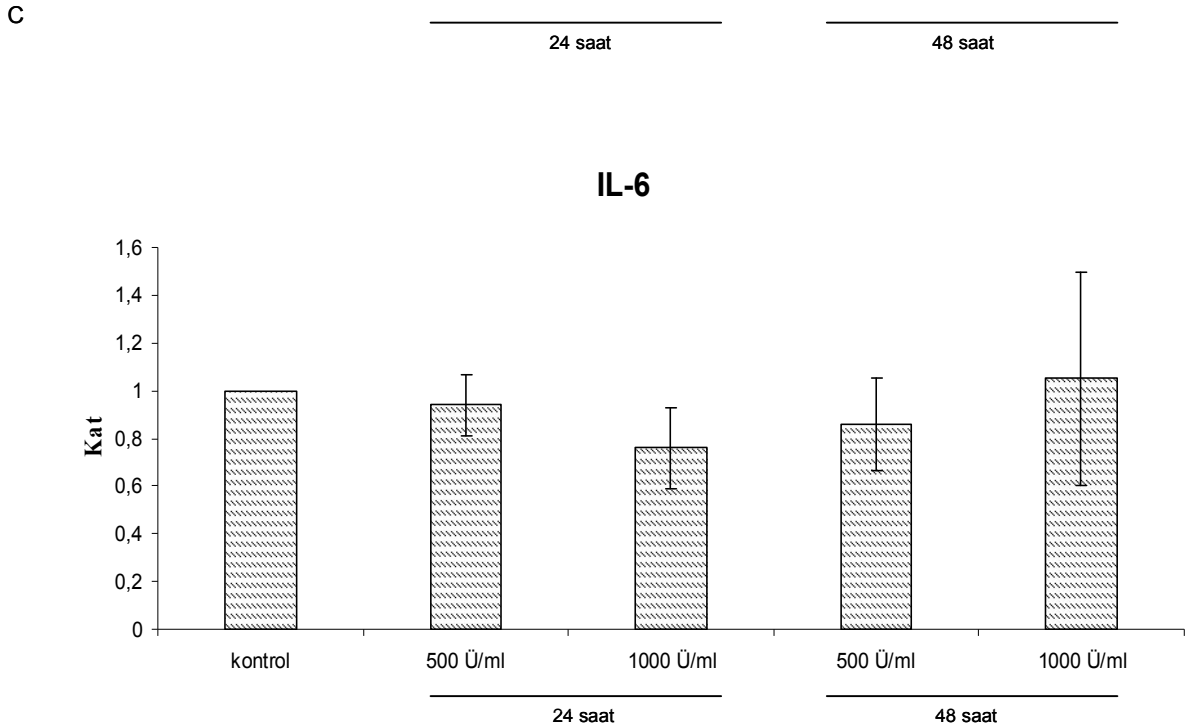
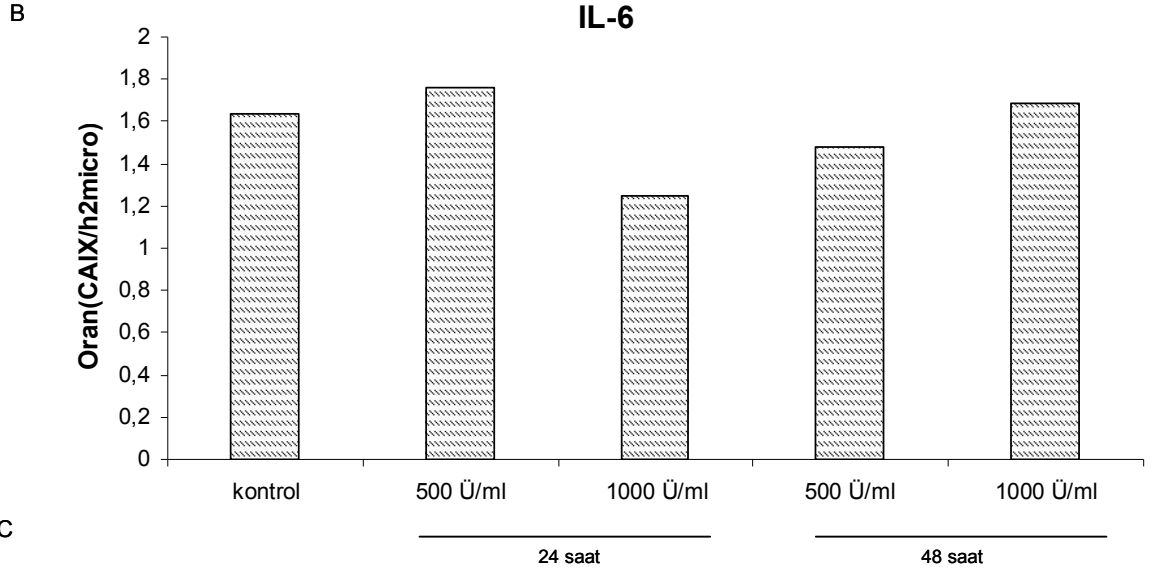
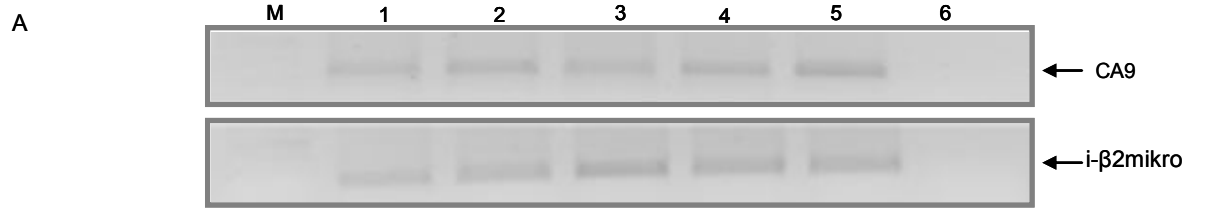
B



Şekil 3.34. Hep3B hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat IL-6 uygulamasının *CA9* mRNA seviyesindeki etkileri **A**. M: Marker 1:24 s kontrol, 2: 24 s 500Ü/ml IL-6 3: 24s 1000Ü/ml IL-6 4: 48 s kontrol, 5: 48 s 500Ü/ml IL-6 6: 48 s 1000Ü/ml IL-6 7:72 s kontrol 8: 72 s 500Ü/ml IL-6 9:72 s 1000Ü/ml IL-6 10: Negatif Kontrol **B**. Hep3B hücrelerinde IL-6 uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi. *CA9* PCR sonuçları insan-β-2-mikroglobilin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmiştir.



Şekil 3.35: Hep3B hücrelerinde 24 ve 48 saat IL-6 uygulamasının *CA9* mRNA seviyesindeki etkileri (I) **A.** 1:kontrol, 2: 24 s 500Ü/ml IL-6 3: 24s 1000Ü/ml IL-6 4: 48 s 500Ü/ml IL-6, 5: 48 s 1000Ü/ml IL-6, 6: Negatif Kontrol **B.** Hep3B hücrelerinde IL-6 uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi. *CA9* PCR sonuçları insan-β-2-mikroglobilin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmiştir.



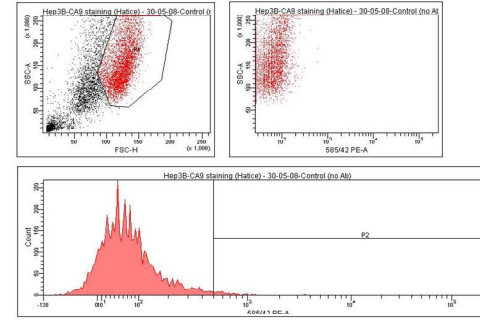
Şekil 3.36. Hep3B hücrelerinde 24 ve 48 saat IL-6 uygulamasının *CA9* mRNA seviyesindeki etkileri (II). **A.** 1: Kontrol, 2: 24s 500Ü/ml IL-6 3: 24s 1000Ü/ml IL-6 4: 48s 500Ü/ml IL-6, 5: 48s 1000Ü/ml IL-6, 6: Negatif Kontrol **B.** Hep3B hücrelerinde IL-6 uygulaması sonucunda elde edilen PCR sonuçlarının dansitometrik analizi. *CA9* PCR sonuçları insan-β-2-mikroglobulin PCR sonuçlarına oranlanarak normalize edilmiştir. **C.** Üç tekrarlı sonuçların analizinin gösterilmesi.

### **3.6.5 Hep3B Hücre Hattında TGF- $\beta$ 'nin CAIX Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi (Akış Sitometri Analizi)**

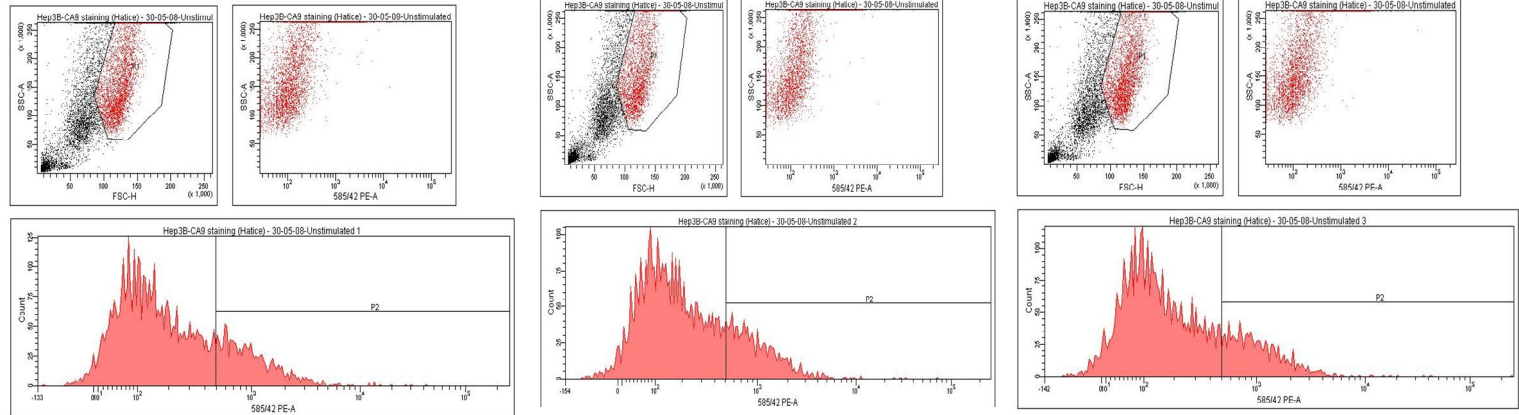
Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$ 'nin etkisiyle karbonik anhidraz 9, mRNA düzeyinde artış meydana geldiği, bölüm 3.6.3'de belirtilmiştir. CA9 mRNA seviyesinde görülen artışın protein seviyesinde de korele olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, akış (flow) sitometri analizi yapıldı. Akış sitometri kısa sürede kantitatif sonuç verebilen hızlı ve çok duyarlı bir hücre sayma yöntemidir. Membrana bağlı bir protein olan CAIX proteininin ifadesi bu metotla değerlendirilebilir.

Çalışmamızda 72 saat 500Ü/ml ve 1000Ü/ml TGF-  $\beta$  uygulaması yapılmış Hep3B hücreleri, fikoeritrin-etiketli monoklonal CAIX antikoru (R&D system) ile işaretlenerek CAIX protein seviyesindeki değişim akış sitometri ile analiz edildi (Bölüm 2.2.6).

Buna göre sitokin uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu (%100) ile 500Ü/ml ve 1000Ü/ml TGF- $\beta$  uygulanmış hücrelerdeki CAIX protein seviyesi sırasıyla %166,087 ve %135,072 olarak bulunmuştur. Şekil 3.37 ve 3.38'de görüldüğü gibi her iki konsantrasyon CAIX protein seviyesinde artışa sebep olurken, özellikle 500 Ü/ml TGF- $\beta$ 'nin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, RT-PCR analizi ile belirlenen mRNA seviyesinde meydana gelen artış verileri ile korelasyon göstermektedir (şekil 3.39).



Background kontrol

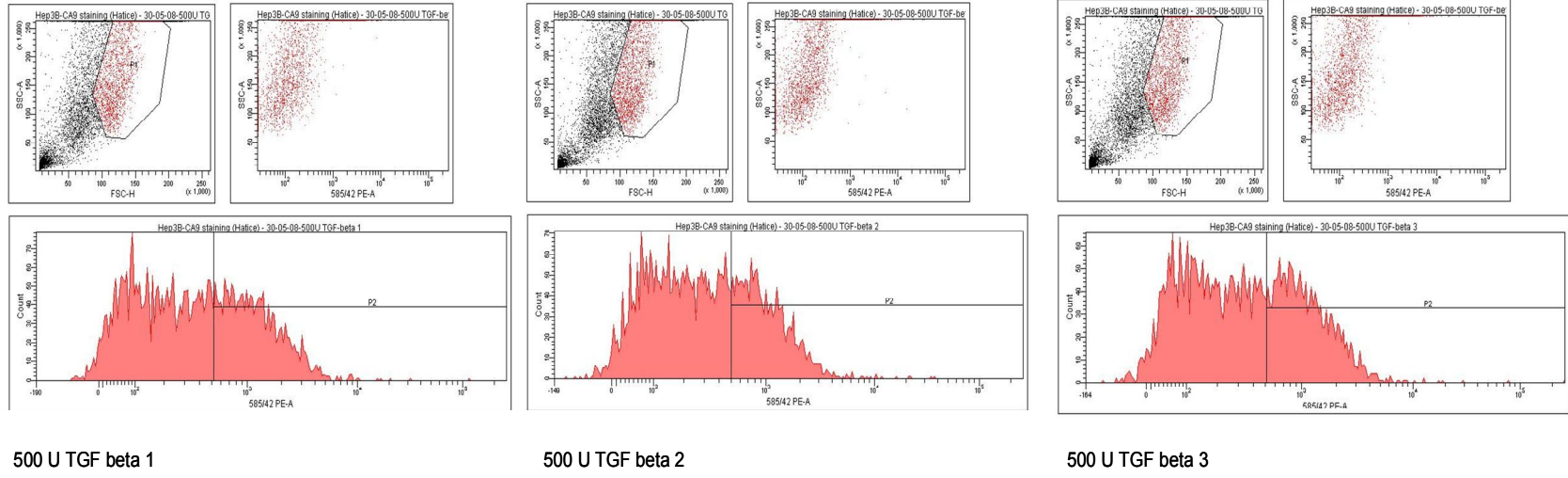
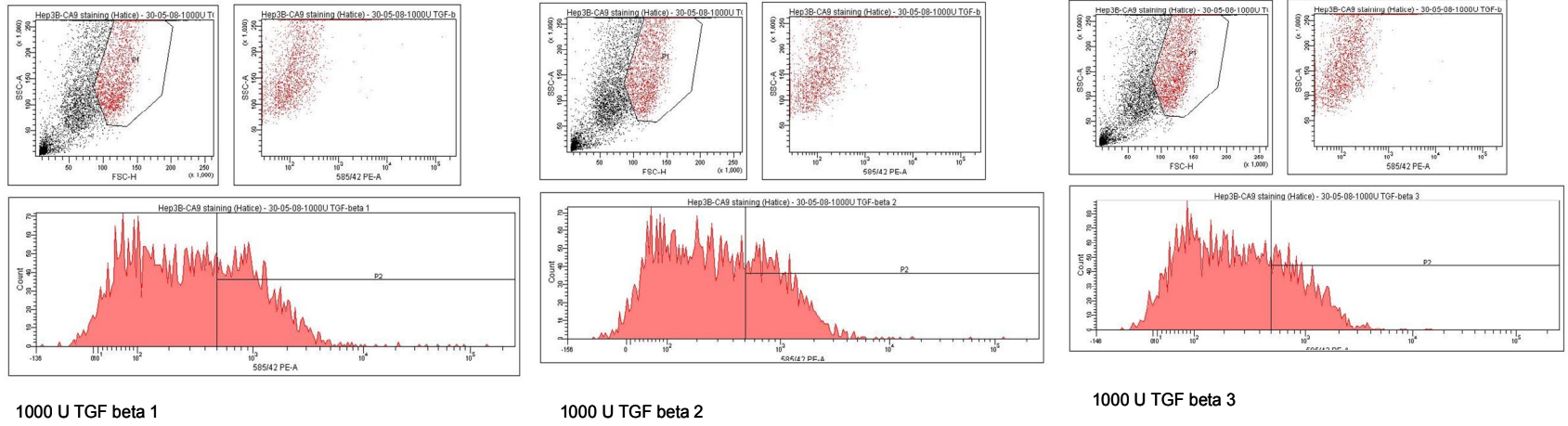


TGF uygulanmamış kontrol1

TGF uygulanmamış kontrol2

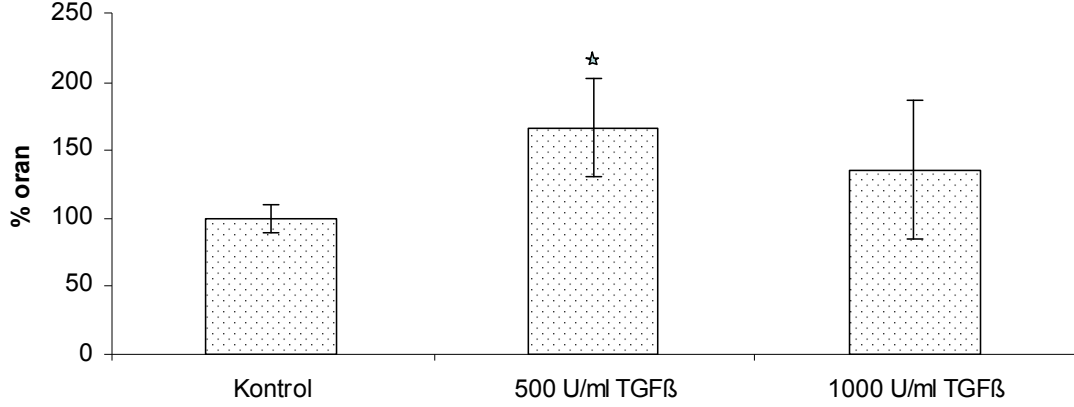
TGF uygulanmamış kontrol3

Şekil3.37: Hep3B hücrelerinde kontrol gruplarının CAIX akış sitometri analizi (background kontrol: PE işaretlenmemiş grup ve PE ile işaretlenmiş ancak sitokin uygulanmamış grup)

**A****B**

Şekil 3.38: Hep3B hücrelerinde sitokin uygulanmış grupların CAIX akış sitometri analizi. **A)** 72 saat 500Ü/ml TGF- $\beta$  **B)** 72 saat 1000Ü/ml TGF- $\beta$

### CAIX Akış Sitometri



Şekil 3.39: Hep3B hücrelerinde 72 saat TGF- $\beta$  uygulamasının CAIX protein seviyesindeki etkileri (akış sitometri sonuçları). \* istatistiksel anlamlı olan değerleri göstermektedir. ( $p < 0,05$ )

### 3.7 TGF- $\beta$ 'nin Karbonik Anhidraz 9 Transkripsiyonel Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi ve Sorumlu Promotor Bölgesinin Aydınlatılması

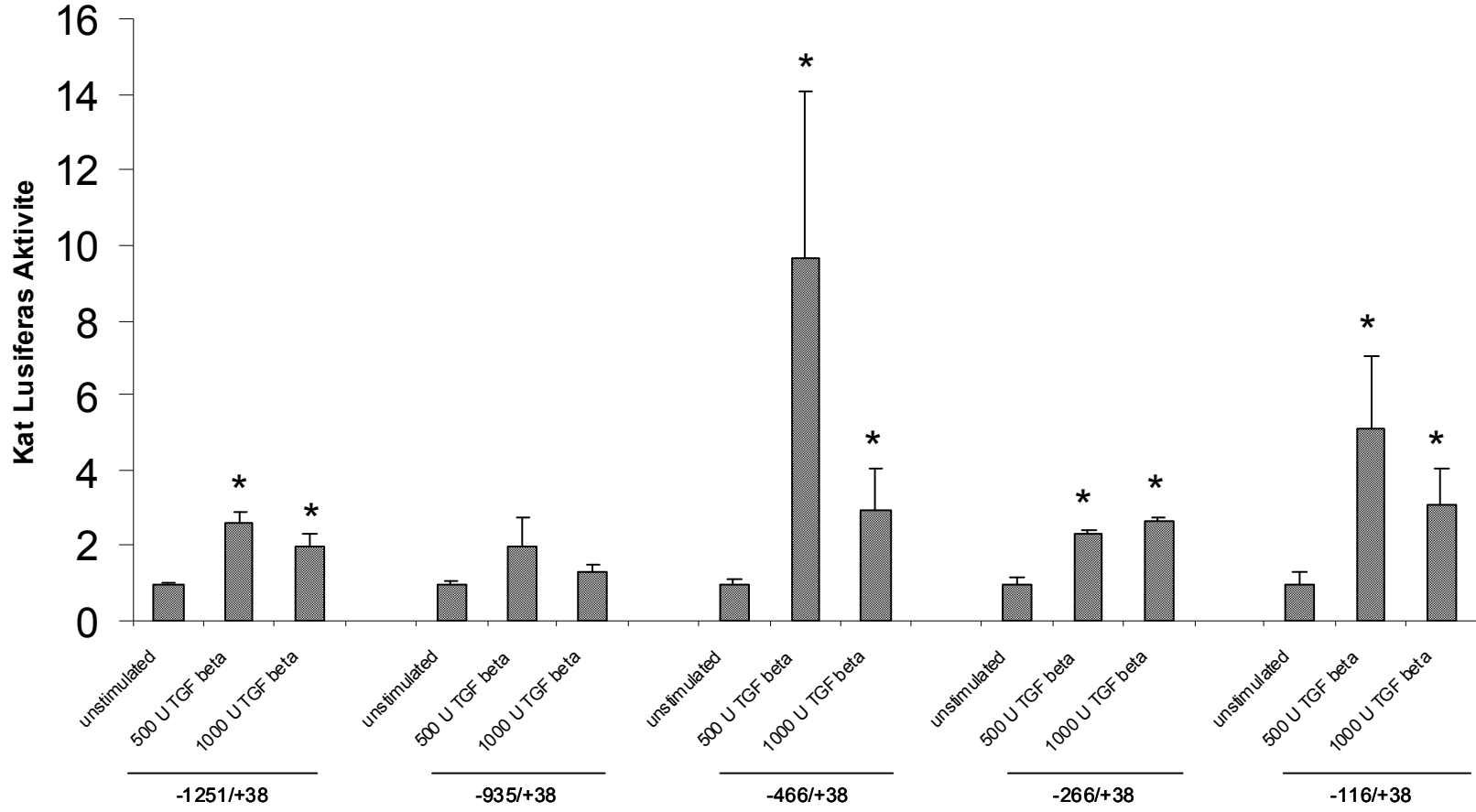
İmmun sistem hücreleri arasındaki etkileşmeleri düzenleyerek aktivitelerini yönlendiren polipeptit yapısındaki sitokinler konusunda bilgiler sürekli yenilenerek her geçen gün farklı bir boyut kazanmaktadır. Özellikle çok sayıda hastalığın patogenez veya tedavisinde sitokinlerin önemli rolleri bulunduğunu yapılan çalışmalar göstermektedir. Örneğin TNF inhibisyonu ile kontrollü klinik denemelerde romatoid artrit ve Crohn hastalığı tedavisinde olumlu gelişmeler sağlandığı bildirilmektedir [128,129,130].

Bölüm 3.6.3'de elde edilen veriler, TGF- $\beta$ 'nin Hep3B hücrelerinde *CA9* mRNA seviyesinde artışa neden olduğunu göstermektedir. Akış sitometri analizi sonuçlarında da benzer şekilde CAIX protein seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla Hep3B hücrelerinde TGF- $\beta$  uygulamasına bağlı olarak CAIX protein seviyesindeki artışın, transkripsiyonel seviyede hangi promotor bölgesi tarafından ve

hangi mekanizmayla yapıldığının aydınlatılması amacıyla, transfeksiyon çalışmaları yapılmıştır.

Buna göre transfeksiyonlar bölüm 2.2.4.7’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Kısaca 5 farklı uzunluktaki promotor parçası [-1251//+38, -935/+38, -466/+38, -266/+38 ve -116/+38] kalsiyum fosfat yöntemi ile Hep3B hücrelerine transfekte edilmiş ve 24, 48 ve 72 saat süreyle 500Ü/ml ile 1000Ü/ml TGF- $\beta$  uygulanmıştır. Süre sonunda hücreler ekstrakte edilerek promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesini sağlayan lusiferaz aktiviteleri bölüm 2.2.4.9’da belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesinin normalizasyonunu sağlamak için aynı zamanda hücre ekstraktlarından  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesi de belirlenmiştir (Bölüm 2.2.4.10). Buna göre hazırlanan bütün promotor parçalarında 72 saat 1000Ünite/ml ve 500Ünite/ml TGF- $\beta$  uygulaması transkripsiyonel aktivitede artışa neden olmuştur. Özellikle -466/+38 promotor parçasında bu aktivite artışı en yüksek seviyede olmuştur (şekil 3.41). 24 ve 48 saat TGF- $\beta$  uygulaması ise tüm promotor parçalarında anlamlı bir etkiye neden olmamıştır.





Şekil 3.40: TGF- $\beta$  uygulamasının farklı uzunluklardaki insan *CA9* promotor parçaları üzerindeki etkisinin karşılaştırılması  
 \* istatistiksel anlamlı olan değerleri göstermektedir. ( $p < 0,05$ )

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz enzimleri karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlemeleri aracılığıyla metabolizmada birçok alanda önemli görevlerde bulunmaktadır.

Transmembran karbonik anhidraz enzimlerinden olan CAIX, tümör metabolizması ile ilişkili olarak bilinen en önemli enzimlerdendir. Özellikle katı tümörlerdeki CAIX ekspresyonu, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu enzimin biyobelirteç olarak kullanılmasına izin vermektedir. Literatürde CAIX'un tümör/hipoksi biyobelirteci olması ve potansiyel tümör terapötik hedef olması ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Transkripsiyonel regülasyon genel olarak spesifik sinyaller tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörlerinin DNA'daki tanıma dizilerine (cis-acting elements) bağlanması ve transkripsiyonel mekanizmayı arttırması ya da azaltması şeklinde bütünlüyci bir proses olarak düşünülebilir [95].

Özellikle farklı tümör tiplerinde pH regülasyonunda önemi ortaya konulan karbonik anhidraz 9'un regülasyonu halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Tümör ilişkili *CA9* geninin ekspresyonunun regülasyonun aydınlatılması ile ilgili ilk çalışmalar, 1996 yılında Opavsky ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak *CA9* geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir, ayrıca genin üst bölgesindeki 3,5 kb'lik bölge analiz edilmiştir. Genin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili ilk bilgilerin edinildiği bu çalışmada, transkripsiyonun başlangıcında görevli olan TATA kutusunun olmadığı ve TATA-less bir promotor olduğu gösterilmiştir

[94]. Ökaryotik hücrelerde protein kodlayan genlerin promotorları geniş farklılık göstermesine rağmen, TATA kutusu içeren ya da içermeyen promotorlar olarak sınıflandırılabilirler. TATA kutusu genellikle transkripsiyon başlangıç noktasının 25-30 nükleotit yukarı kısmında bulunur ve transkripsiyonun başlangıcında çok önemli fonksiyonları vardır.

1999 yılında Kaluz ve arkadaşları tarafından *CA9* promotorunun -173/+31 baz çiftlik kısmı detaylı olarak analiz edilmiştir. Buna göre -173/+31 bç'lik promotor kısmı 5 bölgeye ayrılmaktadır. Bunlardan 4 tanesi promotor aktivitesinde pozitif bir etkiye sahipken, bir bölgenin ise negatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca -3/-10 bç arasında bulunan HRE (hypoxia response element) bölgesi ve HRE bölgesine bağlanan HIF1 (hipoxia inducible factor) aracılığı ile transkripsiyonun kontrolü incelenmiştir [114]. AP1 ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin *CA9* gen ekspresyonundaki öneminin ve promotordaki bağlanma bölgelerinin tespit edildiği diğer bir çalışmada, özellikle AP1'in (aktivatör protein) genin ekspresyonu için promotora bağlanmasının esansiyel olduğu, SP1'in (spesifik protein) ise transkripsiyonel aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir [cxxx]. SP1 birçok hücrel ve viral genlerin promotorlarına bağlanan diziye spesifik DNA bağlanma proteini olup çok iyi karakterize edilmiştir. Farklı dokulardaki SP1 ekspresyonları farklılık gösterir ve SP1'in DNA'ya bağlanma afinitesi büyüme faktörleri (TGF $\beta$ , ganüosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör) tarafından değiştirilebilir.

Buna rağmen *CA9* geninin hipoksiya haricinde diğer hücrel düzenleyicilerle regüle edilip edilmediği ile ilgili oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Özellikle *CA9* promotorunun -173 baz çiftlik bölgesi hipoksiya açısından karakterize edilmesine rağmen, normal oksijen koşullarına ve diğer hücrel uyarılara nasıl cevap verdiği konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca *CA9* geninin promotorunun daha geniş bölgelerinin detaylı analizinin eksikliği yine göze çarpmaktadır.

Bu yüzden bu çalışmanın amacı, *CA9* promotorunun klonlanması ve promotor bölgesinin detaylı analizi ile sitokinler gibi, farklı hücrel belirteçlere karşı cevabının belirlenmesi ve hem mRNA hem de protein düzeyinde CAIX ifadelerinin saptanmasıdır. *CA9* geninin transkripsiyonel regülasyonunun

aydınlatılması amacıyla yönelik olarak çalışmamızda öncelikle *CA9* promotorunun biyoinformatik analizi yapılmıştır. GenBank Accession numarası Z54349 olan *CA9* geninin promotor bölgedeki translasyon başlangıç bölgesi ve transkripsiyonel başlangıç bölgesi (+1) belirlendikten sonra, NCBI ve IDTDNA sitelerinden faydalanarak promotorun -1251/+38 bölgesine spesifik primerler dizayn edildi. Promotor bölgenin klonlanması için kalıp olarak kullanılacak olan DNA, kandan izole edildi. Bu amaçla kullanılan manüel yöntem, hem iyi sonuç vermesi hem de basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilmiştir.

-1251/+38 baz çiftlik *CA9* promotor bölgesi PCR ile çoğaltılarak, pGL2-basic lusiferaz raportör plazmitine klonlandı. Klonlanan bölgenin dizi analiz sonuçları gen bankasında bulunan daha önceden aydınlatılmış dizi ile karşılaştırıldığında, data bankta bulunan dizide -1176 ile -1179 bazları arasında üç nükleotitlik insersiyon olduğu görüldü. Bu nedenle tekrar klonlanma yapılarak dizi analizi yapıldı. Ancak yeni analiz sonucunda da aynı noktada farklılık gözlemlendi. Buna göre klonlanan dizinin yeniden databanka gönderilmesine karar verilmiştir.

BioEdit Alignment Programı kullanılarak insan *CA9* promotor dizisinin *Mus musculus CA9* promotor dizisi ile karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre iki türün promotor dizileri arasında transkripsiyonel başlangıç noktasına yakın olan 725 nükleotitlik bölgede homoloji gözlemlendi ve yaklaşık %66.1 oranında iki türün promotor dizilerinin benzerlik gösterdiği tespit edildi.

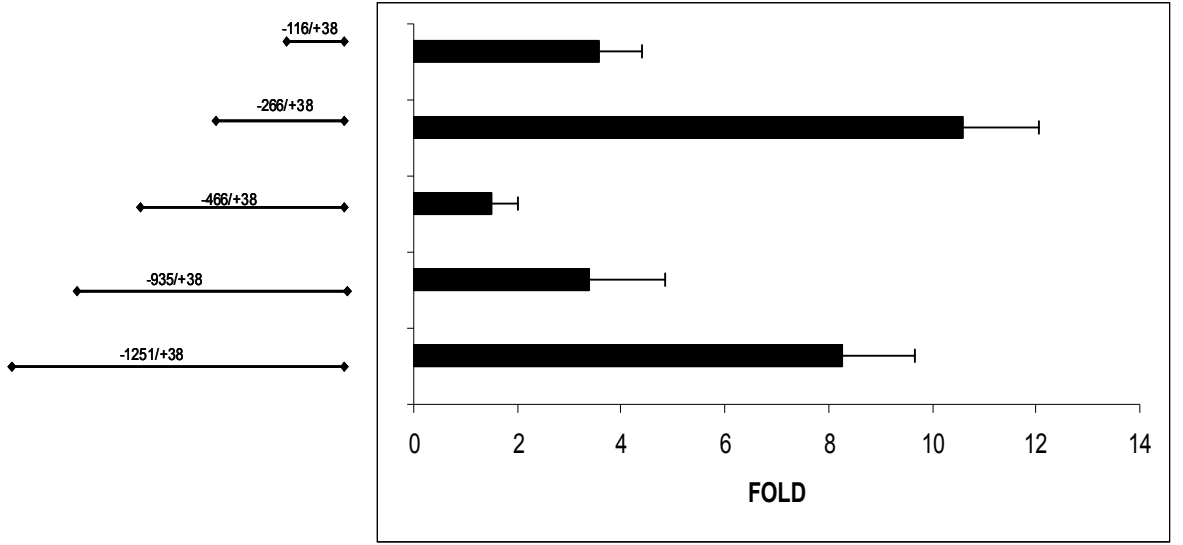
Muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ise TRANSFAC TF SEARCH ver. 1.3. programı kullanılarak belirlenmiştir. *CA9* promotorunda TATA kutusu bulunmadığı ve AP1 ile SP1 transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasının transaktivasyon için önemli olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [114.]. AP1, SP1, p53 transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, MyoD, CREB, C/EBP ve C/EBP- $\beta$  muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri çalışmamızda tespit edilmiştir. Myo D Kas hücrelerinin farklılaşmasında anahtar öneme sahip faktörlerden biridir. Gelişim sırasında kas hücrelerinin farklılaşmasındaki rolünün yanı sıra, kasların onarımında da görevlidir. Myo D'nin en önemli fonksiyonu p21'in transkripsiyonunu indükleyerek hücrelerin hücre

siklusundan çıkmalarını sağlar [cxxxii]. C/EBP proteinleri ise ilk olarak Steve McKnight'ın laboratuvarında sıçan karaciğer hücre nükleusunda ısıya dayanıklı bir çekirdek trans aktivatör proteini olarak tanımlanmış ve ilk olarak C/EBP geni 1988 yılında klonlanmıştır [cxxxiii,cxxxiv]. C/EBP proteinlerinin tanımlanmış temel fonksiyonları; hücreyel farklılaşma, bağışıklık ve enfeksiyon sürecinde çeşitli hastalıklara karşı verilen hücreyel cevabın oluşturulması karaciğer yenilenmesi, hücreyel metabolizma, hücreler arası iletişim gibi önemli yaşamsal fonksiyonlardır [cxxxv].

Çalışmamızda, tümör ilişkili Karbonik Anhidraz 9 geninin transkripsiyonel regülasyonu hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücreleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Hep3B hücrelerine yapılan transfeksiyon çalışmaları sonucu genin regülasyonundan sorumlu bölgeler belirlenmiştir. Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan Hep3B hücreleri ilk olarak 1979 yılında Aden ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiştir ve bu hücreler karaciğer hücrelerine spesifik fenotipe büyük oranda sahiptirler [cxxxvi]. Örneğin hepatit B yüzey antijeni ya da albümin gibi karaciğere spesifik proteinlere sahip olmaları bu hücrelerin en önemli karakteristiklerindedir [cxxxvii]. Ayrıca bu hücrelerin enfeksiyona cevabı, insan karaciğer hücrelerinin *in vivo* cevabına yakın olmasından dolayı özellikle tercih edilmektedirler. Bilindiği gibi primer hücre kültürü ya da *in vivo* çalışmaların güçlüklerine karşı, hücre hattı kullanımı çok daha avantajlıdır. Primer hücre kültürlerinin elde edilmesi zordur ve laboratuvarında uzun süreli kültüre edilmezler. Hayvan modelli *in vivo* çalışmalarda karşılaşılan en önemli zorluk ise etik problemlerdir. Literatürde özellikle inflamasyon (yangı) durumlarına verilen cevabın aydınlatılmasını amaçlayan çalışmalarda Hep3B hücrelerinin yaygın olarak kullanıldığı gözlenmektedir. Özellikle Dr. Dipak Ramji'nin laboratuvarında bu hücrelerle yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu amaçla hem transfeksiyonun başarılı şekilde çalıştığı hem de CAIX ekspresyonunun gözlendiği Hep3B hücreleri çalışmamızda kullanılmıştır [13-140].

İnsan *CA9* geninin fonksiyonel karakterizasyonu kalsiyum fosfat geçici transfeksiyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Kalsiyum fosfat presipitasyon metodu ilk olarak 1973 yılında Graham ve van der Eb tarafından non-viral bir metot olarak

karakterize edilmiştir [cxli]. Günümüzde transfeksiyon için kullanılan çok sayıda yöntem ve kit olmasına rağmen, bu metot özellikle kullanılan materyallerin ucuz olması ve kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca transfeksiyon protokolünün kolay olması ve birçok farklı hücre hattında başarılı sonuçlar vermesi yöntemin diğer avantajlarıdır. 1289 bç [-1251/+38] uzunluğundaki *CA9* promotor parçası ve diğer 4 farklı uzunluktaki promotor parçaları [-935/+38, -466/+38, -266/+38, -116/+38] lusiferaz geni içeren pGL2-basic vektörü içine klonlanarak Hep3B hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonuçlarına göre, [-116/+38] promotor bölgesi bazal seviyede transkripsiyon için yeterli olmuştur. Bu bölgede gözlenen aktivite [-935/+38] promotor bölgesinin transfeksiyonu sonucu elde edilen aktivite ile yaklaşık aynı seviyededir. -466/+38 promotor bölgesinin transkripsiyonel aktivitesi ise oldukça düşüktür. Bu bölgede muhtemel silens elementlerin varlığı, daha önce Kaluz ve arkadaşları tarafından tartışılmıştır [114]. MaTu hücrelerinde, *CA9* promotorunun yaklaşık 3500 bç'lik yukarı bölgesinin analiz edildiği çalışmada, (-173/+31) bölgesinin minimum transkripsiyonel aktivite için yeterli olduğu ve en yüksek aktivitenin gözlemlendiği bölge ise -1706/+31 olarak bulunmuştur. (-466/+31) bölgesindeki aktivitenin çok düşük olması muhtemel silencer dizinin varlığına işaret etmektedir. Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi insan *CA9* promotorunun [-1251/+38] ile [-466/+38] bölgeleri arasında dereceli bir aktivite kaybı vardır. En düşük aktivite ise -466/+38 promotor bölgesinde görülmektedir. -266/+38 bölgesinde transkripsiyonel aktivite yeniden yükseliyor olması, -266 ve -466 muhtemel silencer bölgenin ya da negatif kontrolü sağlayan bölgenin delesyona uğramasıdır.



Şekil4.1: Farklı uzunluklardaki insan CA9 promotor parçalarının aktivitelerinin Hep3B hücrelerinde karşılaştırılması.

Çalışmamızda farklı sitokinlerin insan hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde CAIX mRNA seviyesindeki etkileri belirlenmiştir. Hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dayanıklı böbrek kanserli ve CAIX ekspresyonunun yüksek olduğu bireylerde IL-2 sitokin terapisine olumlu cevap alınmış olması sitokinler ile ilgili çalışmalarında artmasına sebep olmuştur [cxlii]. Farklı sitokinler kullanarak Blok ve ark. tarafından yapılan çalışmada, böbrek kanseri hücre hatlarında IL-1- $\beta$  ve IL-4'ün CAIX ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [cxliii]. Çalışmamızda Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve İnterlökin-6 (IL-6)'in farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında Hep3B hücrelerinde CA9 mRNA seviyesindeki etkileri RT-PCR tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1.: Sitokinlerin farklı zaman aralıklarında CAIX mRNA seviyesine etkileri

Sitokin	24 saat	48 saat	72 saat
<b>500 Ü/ml TGF-β</b>	↔	↔	↑
<b>1000 Ü/ml TGF-β</b>	↓	↔	↑*
<b>500 Ü/ml IL-6</b>	↓	↓	↔
<b>1000 Ü/ml IL-6</b>	↓	↓	↔

↓ Azalma      ↑ Artış      ↔ Değişim yok

Hep3B hücre hattı kullanılarak 24, 48 ve 72 saat süresince 500 Ü/ml ve 1000 Ü/ml TGF-β uygulaması, 24 ve 48 saatte *CA9* mRNA seviyesinde etkili bir değişikliğe sebep olmazken, 72 saatte 1000Ü/ml TGF-β uygulamasının *CA9* mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olduğu bulunmuştur. TGF-β uygulamasının mRNA seviyesindeki artışın yanı sıra protein seviyesinde de artışa sebep olup olmadığının belirlenmesi amacıyla akış sitometri analizi yapılmıştır. Akış sitometri süspansiyon haldeki hücrelerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilmesi ve hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesi esasına dayanır. Bu analiz ile başta DNA içeriği olmak üzere, hücrenin çekirdek, membran ve sitoplazmasına ait birçok fiziksel ve biyolojik özellik saptanabilmektedir. Önceleri hematoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan akış sitometri, hematoloji, immunoloji, onkoloji başta olmak üzere, mikrobiyoloji, organ nakil birimleri, araştırma laboratuvarları, patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarlarda hem tanı koydurucu hem de araştırma yöntemi olarak yerini almıştır [cxliv].



Hücrelerde doğal olarak güçlü floresan veren moleküller bulunmamaktadır. Bu nedenle hücresel proteinlerin monoklonal floresan özellikteki antikorlar kullanılarak belirlenmesi akış sitometri ile mümkündür. Akış sitometri hücre yüzeyinde veya içindeki spesifik kimyasalların varlığına çok duyarlıdır. Böylece hücreler etkili floresan yayan kimyasal boyalarla etiketlenerek analizleri yapılmaktadır. CAIX membran proteini olması nedeniyle akış sitometrisinde protein düzeyindeki varlığı kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Akış sitometri analizi sonucunda Hep3B hücrelerinde 72 saatte 1000Ü/ml TGF- $\beta$  uygulaması CAIX protein seviyesinde artışa sebep olurken, 500Ü/ml TGF  $\beta$  uygulaması sonucunda protein seviyesinde gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

Hep3B hücrelerinde IL-6 uygulamasının ise CAIX mRNA seviyesinde 24 ve 48 saatte azalmaya sebep olduğu belirlenmiş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.. Sitokinlerin hücrelerin immun cevabın oluşmasındaki etkileri ve özellikle interlökinlerin hücre büyümesi üzerindeki etkileri dikkate alındığında, CAIX ifadesinde azalmaya neden olan sitokinler kanserin sitokinlerle kombine terapileri için çok önem taşımaktadırlar.

mRNA ve protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı etki gösteren ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi birçok hücresel süreçte önemli rolü olan, gelişimi çok yönlü kontrol eden büyüme faktörlerinden olan TGF- $\beta$  sitokininin transkripsiyonel regülasyondaki etkisi araştırılmıştır.

TGF- $\beta$ 'nın hazırlanan 5 farklı uzunluktaki *CA9* promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı transfeksiyon çalışmalarında, tüm bölgelerde 500Ü/ml ve 1000Ü/ml TGF- $\beta$  uygulamasının transkripsiyonel aktiviteyi artırdığı gözlenmiştir. Özellikle [-466/+31] bölgesindeki aktivasyon sitokin uygulanmamış transfeksiyon yapılmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 9 kat olarak bulunmuştur. [-466/+31] promotor bölgesinin muhtemel baskılayıcı dizi içerdiği daha önceki transfeksiyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Benzer olarak Kaluz ve arkadaşlarının çalışmalarında da bu

bölgedeki transkripsiyonel aktivite en düşük seviyede bulunmuştur [114]. Hücre tümör biyolojisinde önemli bir fonksiyonu olan TGF- $\beta$  sitokinin birçok tümör tipinde seviyesinin artış gösterdiği bilinmektedir. TGF $\beta$ , tümör oluşumu sürecinde çift etkili rol oynar ve malignitede multifonksiyonel rolleri vardır. Tümör oluşumunun ilk safhalarında bir tümör süpresör gibi davranırken; ileri safhalarında tümör aktivatörü gibi davranır [cxlv]. Kolorektal kanserde yapılan çalışmalarda, primer tümörde yüksek seviyede TGF- $\beta$  ekspresyonu ileri safhalarla ilişkilidir. TGF- $\beta$  iyi diferensiyeye olmuş primer kolon karsinomalarında büyümeyi inhibe edici bir etki gösterirken zayıf diferensiyeye olmuş hücrelerin invazyonunu ve proliferasyonunu teşvik eder [cxlvi]. TGF- $\beta$  bazı epitel ve kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonuna neden olurken, bazı kanser türlerinde ise TGF- $\beta$  reseptörleri ya da SMAD proteinleri tamamen inaktive olmuştur. Tam tersine, TGF- $\beta$  bazı durumlarda ise kanser hücrelerinin metastaz ve invazyon özelliklerinin artmasına da neden olmaktadır. 2004 yılında Selvemurugan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, fare hücre hatlarında TGF- $\beta$  uygulamasının bir çeşit matriks metaloproteinaz olan kollojenaz 3'ün ekspresyonunu stimüle ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada TGF- $\beta$ 'nın etkisini göstermesinde, SMAD yolağının yanı sıra ERK1/2 ve p38MAPK yolaklarının etkili olduğu, kullanılan inhibitörlerle gösterilmiştir [cxlvii]. Benzer şekilde, meme kanserlerinin kemiğe metastaz yapmasının araştırıldığı çalışmada, kemik hücrelerinin yetiştirildiği medyum meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak, kemik hücrelerinden kaynaklanan ve medyuma bulunan TGF- $\beta$  nedeniyle, memeli hücrelerinde bulunan major adezyon moleküllerinden  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 3 integrinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı ve buna bağlı olarak meme hücrelerinin göç etme özelliklerinin de arttığı gösterilmiştir.  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 3 siRNA kullanılması hücrelerin göç etme özelliklerinin azalmasına neden olmuştur. Bu çalışmada ayrıca kemik hücreleri kaynaklı TGF- $\beta$ 'nın SMAD yolağından bağımsız olarak Akt ve ERK yolaklarını kullanarak etkisini gösterdiği inhibitörler kullanılarak gösterilmiştir [cxlviii]. Meme kanserlerinde kemik metastazları en sık görülen komplikasyonlardan olduğu için bu konuda oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Özellikle hipoksik koşulların metastaz ile ilişkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, hipoksiya ile indüklenen genlerden olan VEGF ve CXCR4'ün transkripsiyonlarının TGF- $\beta$  yolağı aracılığıyla indüklendiği, SMAD7 ve SnoN represör proteinlerinin ise indüksiyonunun bloke edildiği

gösterilmiştir. Böylece TGF- $\beta$  ve hipoksiyanın birlikte etkisi ile, meme kanseri hücrelerinin metastazlarının etkili şekilde önlenebileceği ileri sürülmüştür [cxlix].

TGF- $\beta$  genellikle etkisini SMAD yolağı üzerinden göstermesine rağmen, çalışmamızda *CA9* promotor bölgesinin muhtemel transkripsiyon faktörlerinin belirlendiği aşamada herhangi bir spesifik SMAD bağlanma bölgesi bulunmadığından, buradaki aktivasyonunun indirekt olarak gerçekleştiği ve kompleks olduğu düşünülmektedir [cl, cli]. MAPkinaz yolağı kullanılarak gerçekleştirilecek bir düzenlemenin yanı sıra, McMahon ve grubunun yaptığı çalışmada, normal oksijen koşullarında, TGF- $\beta$ 'nın HIF-1 stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir [cli]. Buna göre *CA9* promotorunda da HRE bölgesi bulunduğundan transkripsiyonel aktivitedeki artışın HIF-1 stabilizasyonu aracılığıyla gerçekleşmesi muhtemeldir. Sonuç olarak TGF- $\beta$  stimülasyonu, Hep3B hücrelerinde 72 saatte hem *CA9* mRNA seviyesinde hem de CAIX protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olurken, farklı uzunluklardaki *CA9* promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinde de artışa sebep olmaktadır [cliii].

Sonuç olarak, bu çalışma literatürde sınırlı bilgi bulunan insan karbonik anhidraz 9 geninin transkripsiyonel regülasyonu konusunda daha geniş bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Sitokinlerin hücrelerde birçok fizyolojik olayda önemli etkileri dikkate alındığında, tümör ilişkili karbonik anhidraz 9 ile sitokinlerin etkileşimlerinin belirlendiği bu çalışma sonucu elde edilen bilgiler *CA9* geninin regülasyonu konusunda gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

## 5. EKLER

AatII, AclI, AclI, AcyI, AflII, AflIII, AgeI, AhoI, AlwNI, AscI, AsuII, AvrII, BaeI, BamHI, BcgI, BciVI, BclI, BglI, BglII, BplI, BsaBI, BsePI, BsgI, Bsp1407I, BspHI, BspLU11I, BsrBI, BstEII, BstXI, BtrI, Cfr10I, ClaI, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRV, Esp3I, Fall, FauI, FseI, FspAI, HgaI, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MfeI, MluI, NaeI, NarI, NdeI, NheI, NotI, NruI, OliI, PI-PspI, PI-SceI, PacI, PflMI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PstI, PvuI, RsrII, SacII, Sall, SanDI, SapI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SnaBI, SpeI, SphI, Sse8387I, StuI, SwaI, TaqII, Taul, TfiI, TspGWI, VspI, XbaI, XhoI, XhoII, XmnI

Şekil A.1 İnsan *CA9* promotorunu kesmeyen enzimler

CA9	-1251	GCAGAATTCATCTCTCTTCCCTCAATATGATGATATTGACAGGGTTTGCCCTCACTCACT	-1192
Z54349	2256	GCAGAATTCATCTCTCTTCCCTCAATATGATGATATTGACAGGGTTTGCCCTCACTCACT	2315
CA9	-1191	AGATTGTGAG---CTGCTCAGGGCAGGTAGCGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTT	-1132
Z54349	2316	AGATTGTGAGCTGCTCAGGGCAGGTAGCGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTT	2375
CA9	-1131	TTTGAGACAGGGTCTTGCTCTGTCACCCAGGCCAGAGTGCAATGGTACAGTCTCAGCTCA	-1072
Z54349	2376	TTTGAGACAGGGTCTTGCTCTGTCACCCAGGCCAGAGTGCAATGGTACAGTCTCAGCTCA	2435
CA9	-1071	CTGCAGCCTCAACCGCCTCGGCTCAAACCATCATCCCATTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGG	-1012
Z54349	2436	CTGCAGCCTCAACCGCCTCGGCTCAAACCATCATCCCATTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGG	2495
CA9	-1011	GACTACAGGCACATGCCATTACACCTGGCTAATTTTTTTGTATTTCTAGTAGAGACAGGG	-952
Z54349	2496	GACTACAGGCACATGCCATTACACCTGGCTAATTTTTTTGTATTTCTAGTAGAGACAGGG	2555
CA9	-951	TTTGGCCATGTTGCCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGGACTCAAGCAATCCACCCACCTCA	-892
Z54349	2556	TTTGGCCATGTTGCCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGGACTCAAGCAATCCACCCACCTCA	2615
CA9	-891	GCCTCCAAAATGAGGGACCGTGTCTTATTCATTTCCATGTCCCTAGTCCATAGCCCAGT	-832
Z54349	2616	GCCTCCAAAATGAGGGACCGTGTCTTATTCATTTCCATGTCCCTAGTCCATAGCCCAGT	2675
CA9	-831	GCTGGACCTATGGTAGTACTAAATAAATATTTGTTGAATGCAATAGTAAATAGCATTTCA	-772
Z54349	2676	GCTGGACCTATGGTAGTACTAAATAAATATTTGTTGAATGCAATAGTAAATAGCATTTCA	2735
CA9	-771	GGGAGCAAGAACTAGATTAACAAAGGTGGTAAAAGGTTTGGAGAAAAAATAATAGTTTA	-712
Z54349	2736	GGGAGCAAGAACTAGATTAACAAAGGTGGTAAAAGGTTTGGAGAAAAAATAATAGTTTA	2795
CA9	-711	ATTTGGCTAGAGTATGAGGGAGAGTAGTAGGAGACAAGATGGAAAGGTCTCTTGGGCAAG	-652
Z54349	2796	ATTTGGCTAGAGTATGAGGGAGAGTAGTAGGAGACAAGATGGAAAGGTCTCTTGGGCAAG	2855
CA9	-651	GTTTTGAAGGAAGTTGGAAGTCAGAAGTACACAATGTGCATATCGTGGCAGGCAGTGGGG	-592
Z54349	2856	GTTTTGAAGGAAGTTGGAAGTCAGAAGTACACAATGTGCATATCGTGGCAGGCAGTGGGG	2915
CA9	-591	AGCCAATGAAGGCTTTTGAGCAGGAGAGTAATGTGTTGAAAAATAAATATAGGTTAAACC	-532
Z54349	2916	AGCCAATGAAGGCTTTTGAGCAGGAGAGTAATGTGTTGAAAAATAAATATAGGTTAAACC	2975

CA9	-531	TATCAGAGCCCCTCTGACACATACACTTGCTTTTCATTCAAGCTCAAGTTTGTCTCCCAC	-472
Z54349	2976	TATCAGAGCCCCTCTGACACATACACTTGCTTTTCATTCAAGCTCAAGTTTGTCTCCCAC	3035
CA9	-471	ATACCCATTACTTAACTCACCCCTCGGGCTCCCCTAGCAGCCTGCCCTACCTCTTTACCTG	-412
Z54349	3036	ATACCCATTACTTAACTCACCCCTCGGGCTCCCCTAGCAGCCTGCCCTACCTCTTTACCTG	3095
CA9	-411	CTTCCTGGTGGAGTCAGGGATGTATACATGAGCTGCTTTCCTCTCAGCCAGAGGACATG	-352
Z54349	3096	CTTCCTGGTGGAGTCAGGGATGTATACATGAGCTGCTTTCCTCTCAGCCAGAGGACATG	3155
CA9	-351	GGGGGCCCCAGCTCCCCTGCCTTTCCCCTTCTGTGCCTGGAGCTGGGAAGCAGGCCAGGG	-292
Z54349	3156	GGGGGCCCCAGCTCCCCTGCCTTTCCCCTTCTGTGCCTGGAGCTGGGAAGCAGGCCAGGG	3215
CA9	-291	TTAGCTGAGGCTGGCTGGCAAGCAGCTGGGTGGTGCCAGGGAGAGCCTGCATAGTGCCAG	-232
Z54349	3216	TTAGCTGAGGCTGGCTGGCAAGCAGCTGGGTGGTGCCAGGGAGAGCCTGCATAGTGCCAG	3275
CA9	-231	GTGGTGCCTTGGGTTCCAAGCTAGTCCATGGCCCCGATAACCTTCTGCCTGTGCACACAC	-172
Z54349	3276	GTGGTGCCTTGGGTTCCAAGCTAGTCCATGGCCCCGATAACCTTCTGCCTGTGCACACAC	3335
CA9	-171	CTGCCCTCACTCCACCCCATCCTAGCTTTGGTATGGGGGAGAGGGCACAGGGCCAGAC	-112
Z54349	3336	CTGCCCTCACTCCACCCCATCCTAGCTTTGGTATGGGGGAGAGGGCACAGGGCCAGAC	3395
CA9	-111	AAACCTGTGAGACTTTGGCTCCATCTCTGCAAAGGGCGCTCTGTGAGTCAGCCTGCTCC	-52
Z54349	3396	AAACCTGTGAGACTTTGGCTCCATCTCTGCAAAGGGCGCTCTGTGAGTCAGCCTGCTCC	3455
CA9	-51	CCTCCAGGCTTGCTCCTCCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAATGCACGTACAGCCCGTACA	8
Z54349	3456	CCTCCAGGCTTGCTCCTCCCCACCCAGCTCTCGTTTCCAATGCACGTACAGCCCGTACA	3515
CA9	9	CACCGTGTGCTGGGACACCCACAGTCAG	38
Z54349	3516	CACCGTGTGCTGGGACACCCACAGTCAG	3544

Şekil A.2 II. kez klonlanan insan *CA9* promotor dizisinin dizi analiz sonuçları ile databankta bulunan insan *CA9* klonunun karşılaştırılması

1	GCAGAATTCA TCTCTCTTCC CTCAATATGA TGATATTGAC AGGGTTTACC	entry	score
		<u>M00230</u>	Skn-1 99.2
	----->	<u>M00029</u>	HSF 95.4
	----->	<u>M00028</u>	HSF 94.3
	<-----	<u>M00101</u>	CdxA 92.1
		<u>M00142</u>	NIT2 88.8
		<u>M00075</u>	GATA-1 87.8
		<u>M00076</u>	GATA-2 87.7
	----->	<u>M00253</u>	cap 87.7
		<u>M00021</u>	Kr 87.0
		<u>M00253</u>	cap 86.5
		<u>M00230</u>	Skn-1 85.2
		<u>M00229</u>	Skn-1 85.2
51	CTCACTCACT AGATTFORWA RDPRIMERGT GAGCTGCTCA GGGCAGGTAG	entry	score
	----->	<u>M00253</u>	cap 91.2
	<-----	<u>M00199</u>	AP-1 85.0
101	CGTTTTTTTGT TTTTGTTTTT GTTTTTCITT TTTGAGACAG GGTCTTGCTC	entry	score
	<-----	<u>M00148</u>	SRY 100.0
		<u>M00148</u>	SRY 100.0
		<u>M00148</u>	SRY 100.0
		<u>M00028</u>	HSF 100.0
		<u>M00029</u>	HSF 96.0
		<u>M00160</u>	SRY 90.3
		<u>M00148</u>	SRY 90.0
		<u>M00022</u>	Hb 87.5
		<u>M00094</u>	BR-C Z 86.8
		<u>M00094</u>	BR-C Z 86.8
		<u>M00172</u>	AP-1 86.7
		<u>M00009</u>	Ttk 69 86.7
		<u>M00120</u>	d1 86.0
		<u>M00160</u>	SRY 85.9
		<u>M00160</u>	SRY 85.9
		<u>M00093</u>	BR-C Z 85.1
151	TGTCACCCAG GCCAGAGTGC AATGGTACAG TCTCAGCTCA CTGCAGCCTC	entry	score
		<u>M00253</u>	cap 91.4
		<u>M00183</u>	c-Myb 90.7
		<u>M00253</u>	cap 89.9
		<u>M00172</u>	AP-1 86.7
		<u>M00253</u>	cap 86.3
		<u>M00253</u>	cap 86.3
		<u>M00175</u>	AP-4 85.4
		<u>M00253</u>	cap 85.4
201	AACCGCCTCG GCTCAAACCA TCATCCCATTT TCAGCCTCCT GAGTAGCTGG	entry	score
		<u>M00253</u>	cap 96.2
		<u>M00075</u>	GATA-1 92.2
		<u>M00183</u>	c-Myb 90.7
		<u>M00048</u>	ADR1 87.7
		<u>M00253</u>	cap 87.2
		<u>M00087</u>	Ik-2 86.0
		<u>M00076</u>	GATA-2 85.8
		<u>M00072</u>	CP2 85.4
		<u>M00253</u>	cap 85.4
		<u>M00230</u>	Skn-1 85.2
251	GACTACAGGC ACATGCCATT ACACCTGGCT AATTTTTTTTG TATTTCTAGT	entry	score
		<u>M00028</u>	HSF 100.0
		<u>M00029</u>	HSF 96.0
		<u>M00101</u>	CdxA 94.3
		<u>M00184</u>	MyoD 92.6
		<u>M00073</u>	deltaE 86.8
		<u>M00099</u>	S8 86.5
		<u>M00060</u>	Sn 86.4
		<u>M00087</u>	Ik-2 86.0
		<u>M00100</u>	CdxA 85.9
		<u>M00217</u>	USF 85.7
		<u>M00137</u>	Oct-1 85.5
301	AGAGACAGGG TTTGGCCATG TTGCCCGGGC TGGTCTCGAA CTCCTGGACT	entry	score
		<u>M00048</u>	ADR1 89.2

		<----->	<u>M00033</u> p300	88.1
		----->	<u>M00029</u> HSF	87.4
351	CAAGCAATCC ACCCACCTCA GCCTCSMAIC CAAATGAGG GACCGTGTCT	entry	score	
		----->	<u>M00253</u> cap	96.2
		----->	<u>M00073</u> deltaE	89.7
		<----->	<u>M00271</u> AML-1a	88.7
		<----->	<u>M00253</u> cap	88.2
		----->	<u>M00226</u> P	86.9
401	TATTCATTTC CATGTCCCTA GTCCATAGCC CAGTGCTGGA CCTATGGTAG	entry	score	
		----->	<u>M00253</u> cap	90.5
		<----->	<u>M00029</u> HSF	86.9
		<----->	<u>M00009</u> Ttk 69	86.7
		<----->	<u>M00028</u> HSF	85.9
451	TACTAAATAA ATATTTGTTG AATGCAATAG TAAATAGCAT TTCAGGGAGC	entry	score	
		<----->	<u>M00130</u> HFH-2	92.4
		<----->	<u>M00131</u> HNF-3b	90.8
		----->	<u>M00266</u> Croc	90.0
		<----->	<u>M00101</u> CdxA	90.0
		<----->	<u>M00100</u> CdxA	89.7
		----->	<u>M00131</u> HNF-3b	87.9
		----->	<u>M00101</u> CdxA	87.1
		<----->	<u>M00101</u> CdxA	87.1
		----->	<u>M00130</u> HFH-2	85.5
		----->	<u>M00159</u> C/EBP	85.4
		----->	<u>M00267</u> XFD-1	85.0
		----->	<u>M00266</u> Croc	85.0
501	AAGAACTAGA TTAACAAAGG TGGTAAAAGG TTTGGAGAAA AAAATAATAG	entry	score	
		----->	<u>M00029</u> HSF	100.0
		----->	<u>M00028</u> HSF	100.0
		----->	<u>M00101</u> CdxA	98.6
		----->	<u>M00029</u> HSF	96.0
		----->	<u>M00022</u> Hb	90.2
		<----->	<u>M00130</u> HFH-2	90.1
		----->	<u>M00028</u> HSF	88.5
		----->	<u>M00022</u> Hb	88.4
		----->	<u>M00101</u> CdxA	87.9
		----->	<u>M00048</u> ADR1	87.7
		----->	<u>M00019</u> Dfd	86.8
		----->	<u>M00148</u> SRY	86.4
		<----->	<u>M00019</u> Dfd	86.2
		----->	<u>M00101</u> CdxA	85.7
		<----->	<u>M00131</u> HNF-3b	85.5
		<----->	<u>M00099</u> S8	85.3
551	TTTAATTTGG CTAGAGTATG AGGGAGAGTA GTAGGAGACA AGATGGAAAG	entry	score	
		<----->	<u>M00253</u> cap	91.2
		----->	<u>M00029</u> HSF	86.9
		----->	<u>M00019</u> Dfd	86.2
		----->	<u>M00028</u> HSF	85.9
		<----->	<u>M00072</u> CP2	85.4
		----->	<u>M00099</u> S8	85.3
		----->	<u>M00147</u> HSF2	85.3
601	GTCTCTTGGG CAAGGTTTGG AAGGAAGTTG GAAGTCAGAA GTACACAATG	entry	score	
		----->	<u>M00028</u> HSF	95.3
		----->	<u>M00029</u> HSF	93.7
		----->	<u>M00253</u> cap	87.8
		<----->	<u>M00183</u> c-Myb	86.6
		<----->	<u>M00046</u> GCR1	86.4
		<----->	<u>M00192</u> GR	86.4
		----->	<u>M00110</u> Elf-1	86.0
		----->	<u>M00147</u> HSF2	85.3
651	TGCATATCGT GGCAGGCAGT GGGGAGCCAA TGAGGCTTTT GAGCAGGAGA	entry	score	
		----->	<u>M00083</u> MZF1	100.0
		----->	<u>M00048</u> ADR1	93.8
		----->	<u>M00185</u> NF-Y	89.6
		----->	<u>M00254</u> CCAAT	89.2
		<----->	<u>M00019</u> Dfd	89.2
		----->	<u>M00101</u> CdxA	87.9
		----->	<u>M00142</u> NIT2	87.5



		<-----	<u>M00253</u> cap 87.0				
-----			<u>M00192</u> GR 86.4				
<-----			<u>M00076</u> GATA-2 86.2				
<-----			<u>M00075</u> GATA-1 86.1				
701	GTAATGTGTT	GAAAAATAAA	TATAGGTAA	ACCTATCAGA	GCCCCCTGA	entry	score
		----->				<u>M00266</u> Croc 95.0	
			<-----			<u>M00076</u> GATA-2 90.9	
				<-----		<u>M00048</u> ADR1 90.8	
				<-----		<u>M00075</u> GATA-1 90.6	
			<-----			<u>M00101</u> CdxA 90.0	
			<-----			<u>M00100</u> CdxA 89.7	
		-----				<u>M00019</u> Dfd 89.2	
			<-----			<u>M00131</u> HNF-3b 89.0	
			<-----			<u>M00012</u> CF2-II 88.3	
		----->				<u>M00101</u> CdxA 87.9	
			----->			<u>M00268</u> XFD-2 87.5	
					<---	<u>M00199</u> AP-1 87.4	
						<u>M00101</u> CdxA 87.1	
			----->			<u>M00109</u> C/EBPb 86.8	
					----->	<u>M00253</u> cap 86.5	
					<-----	<u>M00154</u> STRE 85.8	
			----->			<u>M00101</u> CdxA 85.7	
						<u>M00101</u> CdxA 85.7	
			<-----			<u>M00130</u> HFH-2 85.5	
			----->			<u>M00267</u> XFD-1 85.0	
					<-----	<u>M00077</u> GATA-3 85.0	
					----->	<u>M00142</u> NIT2 85.0	
751	CACATACACT	TGCTTTTCAT	TCAAGCTCAA	GTTTGCTCC	CACATACCCA	entry	score
		<-----				<u>M00019</u> Dfd 92.5	
						<u>M00240</u> Nkx-2. 90.7	
					<-	<u>M00045</u> E4BP4 89.7	
					<	<u>M00260</u> HLF 89.7	
					<--	<u>M00109</u> C/EBPb 89.3	
					<-----	<u>M00141</u> Lyf-1 88.3	
					<	<u>M00228</u> VBP 88.1	
					<-	<u>M00101</u> CdxA 87.9	
						<u>M00199</u> AP-1 87.4	
			----->			<u>M00253</u> cap 86.8	
					----->	<u>M00240</u> Nkx-2. 86.0	
801	TTACTTAACT	CACCCTCGGG	CTCCCCTAGC	AGCCTGCCCT	ACCTCTTTAC	entry	score
		----->				<u>M00253</u> cap 93.0	
		----->				<u>M00019</u> Dfd 92.5	
		-----				<u>M00045</u> E4BP4 89.7	
		-----				<u>M00260</u> HLF 89.7	
		-----				<u>M00109</u> C/EBPb 89.3	
			<-----			<u>M00048</u> ADR1 89.2	
						<u>M00228</u> VBP 88.1	
						<u>M00101</u> CdxA 87.9	
			----->			<u>M00040</u> CRE-BP 87.9	
			<-----			<u>M00154</u> STRE 86.8	
		<-----				<u>M00040</u> CRE-BP 86.7	
					----->	<u>M00253</u> cap 86.2	
		<-----				<u>M00240</u> Nkx-2. 86.0	
					<-----	<u>M00137</u> Oct-1 85.8	
					----->	<u>M00226</u> P 85.6	
851	CTGCTTCCTG	GTGGAGTCAG	GGATGTATAC	ATGAGCTGCT	TTCCCTCTCA	entry	score
		----->				<u>M00048</u> ADR1 93.8	
			<-----			<u>M00031</u> MATalp 91.1	
		<-----				<u>M00032</u> c-Ets- 89.2	
					---	<u>M00253</u> cap 87.4	
					<-----	<u>M00029</u> HSF 86.9	
					<-----	<u>M00087</u> Ik-2 86.0	
					<-----	<u>M00028</u> HSF 85.9	
						<u>M00137</u> Oct-1 85.8	
					<-----	<u>M00175</u> AP-4 85.4	
			<-----			<u>M00174</u> AP-1 85.2	
901	GCCAGAGGAC	ATGGGGGGCC	CCAGCTCCCC	TGCCTTTCCC	CTTCTGTGCC	entry	score
		----->				<u>M00048</u> ADR1 98.5	
		<-----				<u>M00048</u> ADR1 95.4	
					<---	<u>M00028</u> HSF 95.3	

				<----	<u>M00029</u>	HSF	93.7
	----->				<u>M00048</u>	ADR1	92.3
	----->				<u>M00048</u>	ADR1	89.2
		<-----			<u>M00048</u>	ADR1	89.2
			<-----		<u>M00048</u>	ADR1	89.2
		<-----			<u>M00154</u>	STRE	88.7
			<-----		<u>M00154</u>	STRE	87.7
----->					<u>M00253</u>	cap	87.4
				<-----	<u>M00083</u>	MZF1	87.0
				<----	<u>M00029</u>	HSF	86.9
				<----	<u>M00028</u>	HSF	85.9
		<-----			<u>M00083</u>	MZF1	85.2
951	TGGAGCTGGG AAGCAGGCCA GGGTTAGCTG AGGCTGGCTG GCAAGCAGCT	entry	score				
		-----	<u>M00175</u>	AP-4	93.8		
		<-----	<u>M00175</u>	AP-4	89.6		
----->			<u>M00048</u>	ADR1	89.2		
		-----	<u>M00176</u>	AP-4	89.2		
			<-----	<u>M00176</u>	AP-4	89.2	
		<-----	<u>M00253</u>	cap	88.0		
			<-----	<u>M00184</u>	MyoD	86.2	
1001	GGTGGTGCC AGGGAGAGCC TGCATAGTGC CAGGTGGTPV TIIGCCTTGG	entry	score				
		<-----	<u>M00184</u>	MyoD	95.7		
-->			<u>M00175</u>	AP-4	93.8		
---			<u>M00175</u>	AP-4	89.6		
-->			<u>M00176</u>	AP-4	89.2		
---			<u>M00176</u>	AP-4	89.2		
---			<u>M00184</u>	MyoD	86.2		
1051	GTTCCAAGCT AGTCCATGGC CCCGATAACC TTCTGCCTGT GCACACACCT	entry	score				
		<-----	<u>M00028</u>	HSF	95.3		
	<-----		<u>M00048</u>	ADR1	93.8		
		<-----	<u>M00029</u>	HSF	93.7		
			<-----	<u>M00002</u>	E47	93.3	
			-----	<u>M00184</u>	MyoD	92.6	
<----			<u>M00029</u>	HSF	90.9		
		----->	<u>M00076</u>	GATA-2	88.1		
			<-	<u>M00084</u>	MZF1	87.9	
			-----	<u>M00073</u>	deltaE	86.1	
		----->	<u>M00075</u>	GATA-1	85.7		
			-----	<u>M00217</u>	USF	85.5	
1101	GCCCTCACT CCACCCCAT CCTAGCTTTG GTATGGGGA GAGGGCACAG	entry	score				
		<-----	<u>M00048</u>	ADR1	98.5		
			----->	<u>M00048</u>	ADR1	98.5	
	<-----		<u>M00048</u>	ADR1	93.8		
	<-----		<u>M00048</u>	ADR1	93.8		
-----			<u>M00002</u>	E47	93.3		
-->			<u>M00184</u>	MyoD	92.6		
<-----			<u>M00154</u>	STRE	92.5		
<-----			<u>M00048</u>	ADR1	90.8		
----->			<u>M00253</u>	cap	90.6		
	<-----		<u>M00076</u>	GATA-2	89.7		
		----->	<u>M00083</u>	MZF1	89.6		
-----			<u>M00084</u>	MZF1	87.9		
		----->	<u>M00048</u>	ADR1	87.7		
<-----			<u>M00033</u>	p300	87.1		
	<-----		<u>M00075</u>	GATA-1	86.9		
-->			<u>M00073</u>	deltaE	86.1		
->			<u>M00217</u>	USF	85.5		
1151	GGCCAGACAA ACCTGTGAGA CTTTGGCTCC ATCTCTGCAA AAGGGCGCTC	entry	score				
		<-----	<u>M00048</u>	ADR1	89.2		
		<-----	<u>M00077</u>	GATA-3	87.2		
	----->		<u>M00050</u>	E2F	86.2		
		<-----	<u>M00075</u>	GATA-1	85.7		
		----->	<u>M00085</u>	ZID	85.5		
1201	TGTGAGTCAG CCTGCTCCCC TCCAPAPAGG CTTGCTCCTC CCCACCCAG	entry	score				
		<-----	<u>M00048</u>	ADR1	98.5		
----->			<u>M00199</u>	AP-1	97.9		
<-----			<u>M00174</u>	AP-1	95.7		
<-----			<u>M00173</u>	AP-1	93.8		
	<-----		<u>M00083</u>	MZF1	93.0		

	----->		<u>M00253</u> cap	92.5
		<-----	<u>M00048</u> ADR1	92.3
<-----			<u>M00172</u> AP-1	92.0
<-----			<u>M00188</u> AP-1	91.3
<-----			<u>M00037</u> NF-E2	90.1
<-----			<u>M00199</u> AP-1	89.6
		<-----	<u>M00048</u> ADR1	89.2
			<u>M00083</u> MZF1	87.8
		<-----	<u>M00048</u> ADR1	87.7
<-----			<u>M00204</u> GCN4	86.7
		----->	<u>M00046</u> GCR1	86.4
		<-----	<u>M00048</u> ADR1	86.2
		<-----	<u>M00084</u> MZF1	85.5
1251	CTCTCGTTTC CAATGCACGT ACAGCCCGTA CACACCGPIN RTGTGCTGGG	entry	score	
	<-----	<u>M00029</u> HSF	86.9	
	<-----	<u>M00028</u> HSF	85.9	
		-- <u>M00221</u> SREBP-	85.9	
1301	ACACCCCA CA GTCAGCCGCA TG	entry	score	
	<-----	<u>M00048</u> ADR1	100.0	
		<u>M00253</u> cap	93.7	
	<-----	<u>M00271</u> AML-1a	87.4	
	----->	<u>M00221</u> SREBP-	85.9	

Şekil A.3 İnsan *CA9* promotorunun transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin TRANSFAC 1.3 kullanılarak belirlenmesi

## KAYNAKLAR

- 
- [1] Bozkurt, B., Selçuk, Z.T., Fırat, P., Kalyoncu, A.F., Artvinli, M, ‘1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi’, *Toraks Dergisi*, (2004) **5**, 148.
- [2] Özensoy, Ö., Kanser İlişkili Karbonik anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) Ekspresyonu, Saflastırılması ve Bazı Bilesiklere Karşı İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006)
- [3] İlaç sözlüğü, Dr. Oğuz Canay 2001/2002, Nobel Tıp Kitabevi
- [4] Hanahan, D., Weinberg, R.A., “The Hallmarks of Cancer “, *Cell.*, 100, (2000) 57.
- [5] Uçar, F., Ovalı, E., Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kitabı-I, Isparta, 2003, 1-9
- [6] <http://www.turkkanservakfi.org.tr> (15.05.2009)
- [7] Engin ,K., Özyardımcı N., ‘Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar’, Ulukaya, E., Bölüm 3, Avrupa Tıp Kitapevi, İstanbul (2001).
- [8] Price, P.M., Megyesi, J., Safirstein, R.L., “ Cell Cycle Regulation: Repair and Regeneration in acute Renal Failure” *Seminars in Nephrology*, (2003). **23**, 449.
- [9] Dehay, C. and Kennedy, H., “Cell-cycle control and cortical development”, *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 7, (2007) 568.

- 
- [10] Klug W. S. ve Cummings, M. R., Genetik Kavramlar, Öner, C., 6. baskı, Palme yayıncılık, Ankara (2002).
- [11] Latchman, D. S. Eukaryotic Transcription Factors. London, Academic Press., (1998).
- [12] Tura Kockar F., ‘Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene’, PH. D. Thesis Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (1999).
- [13] <http://www.albany.edu/cancergenomics/faculty/stenenbaum/research.shtml>  
(15.05.2009)
- [14] Uğraş, S., C/EBPδ Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2007) .
- [15] Wolffe, A., In Chromatin: Structure And Function (2nd Edn.), Academic Pres London. (1995)
- [16] Roeder, R.G. “The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II” *Trends Biochem. Sci.*, (1996) **21**,327.
- [17] Ham, J., Steger, G And Yaniv. M.” How do eukaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by RNA polymerase II? “ *Febs Lett.* (1992) **307**, 81.
- [18] Maniatis,T., Fritsch, E.F. And Sambrook, J. In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York (1982)
- [19] Klamut, H.J., Bosnoyan-Collins, L.O., Worton, R.G., Ray, P.N., Davis, H.L., ‘Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene’, *Human Molecular Genetics*, (1996) **5**, 1599.
- [20] Bjorklund, S. And Kim, Y.J.” Mediator of transcriptional regulation.” *Trends Biochem. Sci.* (1996) **21**,335-337
- [21] Ogbourne, S. ve Antalis, T.M.” Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes” *Biochem J.* (1998) **331**,1-14
- [22] Kamakaka, R. T. “Silencers and locus control regions: opposite sides of the same coin” *Trends Biol. Sci.* (1997) **22**, 124.

- 
- [23] Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D. "The general transcription factors of RNA polymerase II." *Genes Dev* (1996) **10**, 2657.
- [24] Kadonaga, J. T. "The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II." *Exp Mol Med* (2002) **34**, 259.
- [25] Smale, S. T. and Kadonaga, J. T. "The RNA polymerase II core promoter." *Annu Rev Biochem* (2003) **72**, 449.
- [26] Li, Y., Bjorklund, S., Kim, Y. J., Kornberg, R. D. "Yeast RNA polymerase II holoenzyme." *Methods Enzymol* (1996) **273**, 172.
- [27] Malik, S. ve Roeder, R. G. "Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex". *Trends Biochem Sci* (2005) **30**, 256.
- [28] Koleske, A. J. ve Young, R. A. "An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators." *Nature* (1994) **368**, 466.
- [29] Koleske, A. J. ve Young, R. A. "The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation." *Trends Biochem Sci* (1995) **20**, 113.
- [30] Tansey, W. P. ve Herr, W. "TAFs: guilt by association?" *Cell* (1997) **88**, 729.
- [31] Dikstein, R., Ruppert, S., Tjian, R. "TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74." *Cell* (1996) **84**, 781.
- [32] Solow, S., Salunek, M., Ryan, R. and Lieberman, P. M. "Taf(II) 250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity." *J Biol Chem* (2001) **276**, 15886.
- [33] Wassarman, D. A. ve Sauer, F. "TAF(II)250: a transcription toolbox." *J Cell Sci* (2001) **114**, 2895.
- [34] Reese, J. C. "Basal transcription factors." *Curr Opin Genet Dev* (2003) **13**, 114.
- [35] Shilatifard, A. "Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II." *Faseb J* (1998) **12**, 1437.
- [36] Sims, R. J. III., Belotserkovskaya, R., Reinberg, D. "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." *Genes Dev* (2004) **18**, 2437.

- 
- [37] Hirose, Y. ve Ohkuma, Y. "Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression." *J Biochem (Tokyo)* (2007) **141**, 601.
- [38] Ali, S., 'Studies into the Regulation of CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\delta$  Expression (C/EBP $\delta$ ) by cytokines', PH. D. Thesis Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (2007).
- [39] Hochheimer, A. ve Tjian, R. "Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression." *Genes Dev* (2003) **17**, 1309.
- [40] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Essential Cell Biology, Garland Science/Taylor & Francis Group; 2 edition, 2003.
- [41] Khoury, G. ve Gruss, P. "Enhancer elements." *Cell* (1983) **33**, 313.
- [42] Jackson, M. E. "Negative regulation of eukaryotic transcription." *J Cell Sci* (1991) **100**, 1.
- [43] Thiel, G., Lietz, M. and Hohl, M. "How mammalian transcriptional repressors work." *Eur J Biochem* (2004) **271**, 2855.
- [44] Kovacs, K. A., Steinmann, M., Magistretti, P. J., Halfon, O., Cardinaux, J. R. "CCAAT/Enhancer-binding Protein Family Members Recruit the Coactivator CREB-binding Protein and Trigger Its Phosphorylation." *J Biol Chem* (2003) **278**, 36959.
- [45] Burke, L. J. and Baniahmad, A. "Co-repressors 2000." *Faseb J* (2000) **14**, 1876.
- [46] Levine, M., ve Robert Tjian, R., "[Transcription regulation and animal diversity](#)" *Nature* (2003) **424**, 147.
- [47] Saarnio, J., "Distribution Of Carbonic Anhydrase IX, MN/CA IX, In Normal And Neoplastic Gastrointestinal And Hepatobiliary Tissues", PH. D. Thesis Departments of Surgery, Anatomy and Cell Biology and Pathology, Oulu University (2000)

- 
- [48] Lindskog S (1982) Carbonic anhydrase. In: Eichhorn GL & Marzilli L (eds) *Advances in Inorganic Biochemistry*, Vol. 4. Elsevier/North Holland, New York: 115-170.[Lindskog, S. 1982. Carbonic anhydrase, p. 115-170. In G. L. Eichhorn, and L. G. Marzilli (ed.), *Advances in inorganic chemistry*, vol. 4. Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands.]
- [49] Coleman, J.E., "Zinc enzymes." *Curr Opin Chem Biol* (1998) **2**, 222.
- [50] Supuran, C. T., ve Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med.Chem.*, (2001) **1**, 61.
- [51] Maren, T. H., "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", *Physiol. Rev.*, (1967) **47**, 595.
- [52] 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* (2005) **1729**, 41– 49
- [53] 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)
- [54] Maren, T.H., "The kinetics of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO<sub>2</sub> elimination". *Annu Rev Physiol* (1988) **50**, 695.
- [55] 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* (1992) **89**, 7786.
- [56] Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatovilovaa, 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* (1994) **9**, 2877.
- [57] Parkkila, S. ve Parkkila, A.K., "Carbonic anhydrase in the alimentary tract. Roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal." *Scand J Gastroenterol* (1996) **31**,305.
- [58] Lindskog, S., "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacol ther* (1997) **71**, 1.



---

[59] 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* (1998) **95**, 12596.

[60] Chegwiddden, W. R., Dodgson, S. J., Spencer, I. M., “In the Carbonic Anhydrase New horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 343-363.

[61] Keha, E. E., “Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).

[62] Wistrand, P. J., “The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO<sub>2</sub> by the human erythrocyte”, *Acta Physiol. Scand.*, (1981), 343-363

[63] Sly, W.S., ve Hu, P.Y. “Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies.”. *Annu Rev Biochem*, (1995) **64**, 375.

[64] Hewett-Emmett, D., ve Tashian, R.E., “Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families.” *Mol Phylogenet Evol* (1996) **5**, 50.

[65] 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* (1996) **24**, 1104.

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

[67] 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 anhydrase. “ *Biochem J* (2005) **392**, 83.

[68] Karhumaa, 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* (2000) **275**, 16044.

[69] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Carter, N.D., Bergenheim, N.C.H., (2000) 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. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 105-120.

[70] Lönnerholm, G., Selking, O., Wistrand, P.J., "Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract", *Gastroenterology* (1985) **88**, 1151.

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

[72] 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 the equine and bovine digestive tract." *Histochem J* (1993), **25**, 304.

[73] 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* (1994) **101**, 91.

[74] Tashian, R.E., "The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function" *Bioessays* (1989) **10**, 186.

[75] Kelly, C.D., Carter, N.D., de Boer, P., Jeffery, S., Moorman, A.F., Smith, A., "Detection of CAIII mRNA in rat skeletal muscle and liver by in situ hybridization." *J Histochem Cytochem* (1991) **39**, 1243.

[76] Jeffery, S., Edwards, Y., Carter, N., "Distribution of CA III in fetal and adult human tissue." *Biochem Genet* (1980) **18**, 843.

[77] Fleming, R.E., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Waheed, A., Sly, W.S., "Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract: Regional, cellular and subcellular localization." *J Clin Invest* (1995) **96**, 2907.

[78] Whitney, P.L., Briggler, T.V., "Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung." *J Biol Chem* (1982) **257**, 12056.

[79] Wistrand, P.J., Knuutila, K.G., "Renal membrane-bound carbonic anhydrase. Purification and properties." *Kidney Int* (1989) **35**, 851.

[80] Zhu, X.L., Sly, W.S., Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. *J Biol Chem* (1990) 265,8795.

[81] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Onishi, S., "Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression,

---

subcellular localization, and mapping to chromosome X.” *J Biol Chem* (1999) **274**, 21228.

[82] 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: differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles.” *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 1677.

[83] Kivelä, J., Parkkila, S., Metteri, J., Parkkila, A.K., Toivanen, A., Rajaniemi, H., “Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men.” *Acta Physiol Scand* (1997) **161**, 221.

[84] Leinonen, J., Kivelä, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H. “Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle.” *Caries Res* (1999) **33**, 185.

[85] Kivelä, J., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Sly, W.S., Rajaniemi, H., “Secretory carbonic anhydrase isoenzyme (CA VI) in human serum.” *Clin Chem* (1997) **43**, 2318.

[86] Ogawa, Y., Toyosawa, S., Inagaki, T., Hong, S.S., Ijuhin, N., “Carbonic anhydrase isozyme VI in rat lacrimal gland.” *Histochem Cell Biol* (1995) **103**, 387.

[87] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Sakamoto, S., Morita, M., Onishi, S., Yonezawa, S., Hollingsworth, M.A., “Identification of carbonic anhydrase IV and VI mRNA expression in human pancreas and salivary glands.” *Pancreas* (1999) **18**, 329.

[88] Montgomery, J.C., Venta, P.J., Eddy, R.L., Fukushima, Y.S., Shows, T.B., Tashian, R.E., “Characterization of human gene for newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16.” *Genomics* (1991) **11**, 835.

[89] Lehtonen, J.M., Parkkila, S., Vullo, D., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. ‘Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozyme XIII with aromatic and heterocyclic sulfonamides: a novel target for the drug design.’ *Bioorg Med Chem Lett* (2004) **14**, 3757.

[90] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Onishi, S., “Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1.” *Genomics* (1999) **61**, 74.

[91] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Shah, G.N., Grubb, J.H., Waheed, A., Sly, W.S., “Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on

---

neurons and axons in Mouse and human brain.” *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) **98**, 1918.

[92] Pastoreková, S., Závadová, Z., Kotsal, M., Babusikova, O., Závada, J., “A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system” *Virology* (1992) **187**, 620.

[93] Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavský, R., Zat'ovicova, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E.J., Závada, J., Burny, A., Kettmann, 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* (1994) **9**, 2877.

[94] Opavský, R., Pastoreková, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, E.J., Závada, J., Kettmann, R., Pastorek, J., “Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family:structure and exon to protein domain relationships.” *Genomics* (1996) **33**, 480.

[95] Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S.Y., Lerman, M., Stanbridge, E.J., “Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show?” *Biochim Biophys Acta* (2009) doi:10.1016

[96] Nakagawa, Y., Uemura, H., Hirao, Y., Yoshida, K., Saga, S., Yoshikawa, K., “Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p12–p13,” *Genomics*. (1998,) **53**, 118.

[97] Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelník, V., Opavský, R., Zat'ovicová, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E.J., “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*, (1994) **9**, 2877.

[98] [Pastoreková, S.](#), [Parkkila, S.](#), [Parkkila, A.K.](#), [Opavský, R.](#), [Zelník, V.](#), [Saarnio, J.](#), [Pastorek, J.](#), “Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts,” *Gastroenterology* (1997) **112** , 398.

[99] [Barathova, M.](#), [Takacova, M.](#), [Holotnakova, T.](#), [Gibadulinova, A.](#), [Ohradanova, A.](#), [Zatovicova, M.](#), [Hulikova, A.](#), [Kopacek, J.](#), [Parkkila, S.](#), [Supuran, C.T.](#), [Pastorekova, S.](#), [Pastorek, J.](#), “Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype,” *British J. Cancer* (2008) **98**, 129.

[100] Pastorekova,S and Pastorek,J. Cancer related Carbonic anhydrase Isozymes and Their Inhibition Chapter 9 , CRC Pres, 2004

---

[101] Pastoreková, S., Závadová, Z., Kotsal, M., Babusikova, O., Závada, J., “A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system” *Virology* (1992) **187**, 620.

[102] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Waheed, A., Casey, M.C., Zhou, Z.Y., Pastoreková, S., Pastorek, J., Karttunen, T., Haukipuro, K., Kairaluoma, M.I., Sly, W.S., “Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity” *J Histochem Cytochem* (1998) **46**, 497.

[103] Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastoreková, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M.I., Karttunen, T.J., “Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation.” *Am J Pathol* (1998) **153**, 279.

[104] Liao, S., Lerman, M., Stanbridge, E., “Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development.” *BMC Dev Biol* (2009) **9**.

[105] Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L., “Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases,” *Cancer Res.* (2000) **60**, 7075.

[106] Kivelä, A.J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivelä, J., Parkkila, A.K., Pastoreková, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Rajaniemi, H., “Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours” *Histochem Cell Biol* (2000) **114**, 197.

[107] Karhumaa, P., Kaunisto, K., Parkkila, S., Waheed, A., Pastoreková, S., Pastorek, J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., “Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts.” *Mol Hum Reprod* (2001) **7**, 611.

[108] Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M.J., Proescholdt, M.A., Oldfield, E.H., Lee, J., Závada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., “Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer.” *Am J Pathol* (2001) **158**, 905.

[109] 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* (2005) **1729**, 41.

- 
- [110] Robertson, N., Potter, C., Haris, A.L., "The role of carbonic anhydrase IX, in human tumor cell growth, survival and invasion." *Cancer Research* (2004) **64**, 6160.
- [111] Pastoreková, S., ve Závada, J., "Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy." *Cancer Therapy* (2004) **2**, 245.
- [112] Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastoreková, S., Supuran, C.T., "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides: a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs?" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2005) **15**, 963.
- [113] Turner, K.J., Crew, J.P., Wykoff, C.C., Watson, P.H., Poulsom, R., Pastorek, J., Ratcliffe, P.J., Cranston, D., Haris, A.L., "The hypoxia-inducible genes VEGF and CAIX are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer" *British Journal of Cancer* (2002) **86**, 1276.
- [114] Kaluz, S., Kaluzova, M., Opavsky, R., Pastorekova, S., Gibadulinova, A., Dequiedti, F., Kettmann, R., Pastorek, J., "Transcriptional Regulation of the MN/CAIX Gene Coding for the Tumor-associated Carbonic Anhydrase." *The Journal of Biological Chemistry* (1999) **274**, 32588.
- [115] Sağkan İlkçı R., Bazı sitokinlerin insan kolon kanseri hücrelerinde CAIX ifade düzeylerine etkilerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009)
- [116] Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., Luo, K., "Negative Feedback Regulation of TGF- $\beta$  Signaling by the SnoN Oncoprotein" *Science* (1999) 286, 771.
- [117] Yang, S.H., Sharrocks, A.D., Whitmarsh, A.J., "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades" *Gene* (2003) **320**, 3.
- [118] Yingling, J.M., Blanchard, K.L., Sawyer, J.S., "Development of TGF- $\beta$  signalling inhibitors for cancer therapy" *Nature Reviews Drug Discovery* (2004) **3**, 1011.
- [119] [http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin\\_6](http://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_6)
- [120] 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* (1998) **334**, 297.

---

[121] Hirano, 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* (2000) **19**, 2548.

[122] [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6\\_Pathway](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway)

[123] [http://www.ecoliwiki.net/colipedia/index.php/XL-1\\_Blue](http://www.ecoliwiki.net/colipedia/index.php/XL-1_Blue)

[124] <http://www.protocol-online.org>

[125] Cho, M., Grabmaier, K., Kitahori, Y., Hiasa, Y., Nakagawa, Y., Uemura, H., Hirao, Y., Ohnishi, T., Yoshikawa, K., Ooesterwijk, E., ‘Activation of the MN/CA9 gene is associated with Hypomethylation in Human Renal Cell Carcinoma Cell Lines’, *Molecular Carcinogenesis*. (2000) **27**, 184.

[126] Willam, C., Warnecke, C., Schefold, J.C., ‘Inconsistent effects of acidosis on HIF-a protein and its target genes’ *Pflugers Arch – Eur J Physiol* (2006) **451**,534.

[127] Stolze, I.P., Tian, Y.M., Appelhoff, R.J., Turley, H., Wykoff, C.C., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., ‘Genetic Analysis of the Role of the Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) in Regulating HIF Transcriptional Target Genes’ *The Journal Of Biological Chemistry*, (2004) **279**, 42719.

[128] Moreland, L.W., Baumgartner, S.W., Schiff, M.H., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Weaver, A.L., Ettlinger, R.E., Cohen, S., Koopman, W.J., Mohler, K., Widmer, M.B., Blosch, C.M., ‘Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein’, *N Engl J Med*. (1997) **337**, 141.

[129] Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., Rutgeerts, P.J., ‘A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group’, *N Engl J Med*. (1997) **337**, 1029.

[130] Yeğin, O., Coşkun, M., Ertuğ, H., ‘Cytokines in acute rheumatic fever’ *Eur J Pediatr*. (1997) **156**, 25.

[cxxxii] Kaluzova, M., Pastorekova, S., Svastova, E., Pastorek, J., Standbridge, E.J., Kaluz, S., ‘Characterization of the MN/CA9 promoter proximal region: a role for specificity protein (SP) and activator protein 1(AP) factors’ *Biochem. J.* (2001) 669-677.

---

[cxxxii] <http://en.wikipedia.org/wiki/MyoD> (15.05.2009)

[cxxxiii] Johnson, P. F. Ve McKnight, S. L., 'Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins.' *Annu. Rev. Biochem.* (1989) **58**, 799.

[cxxxiv] Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J., McKnight, S. L. 'Isolation of a Recombinant Copy of the Gene Encoding C/EBP'. *Genes Dev.* (1988) **2**, 786.

[cxxxv] Poli, V., Mancini, F. P. and Cortese, R. 'IL-6DBP, a Nuclear Protein Involved in Interleukin-6 Signal Transduction, Defines a New Family of Leucine Zipper Proteins Related to C/EBP.' *Cell* (1990) **63**, 643-653

[cxxxvi] Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. B. (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." *Nature* **282**(5739): 615-6.

[cxxxvii] Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P. (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen." *Science* **209**(4455): 497-9.

[cxxxviii] Foka, P., Kousteni, S. and Ramji, D. P. "Molecular characterization of the Xenopus CCAAT-enhancer binding protein beta gene promoter." *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **285**, 430..

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

[cxl] Poli, V. "The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions." *J Biol Chem*(1998) **273**, 29279.

[cxli] Graham, F.L., van der Eb, A.J., 'A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.' *Virology.* (1973) **52**, 456.

[cxlii] Atkins, M., Regan, M., McDermott, D., Mier, J., Stanbridge, E., Youmans, A., Febbo, P., Upton, M., Lechpammer, M., Signoretti, S., 'Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer', *Clin Cancer Res.*(2005) **11**, 3714.

[cxliii] Blok, V.T., Gelderman, K.A., Tijmsa, O.H., Daha, M.R., Gorter, A., 'Cytokines affect resistance of human renal tumour cells to complement-mediated injury', *Scand J Immunol.* (2003) **57**, 591.

[cxliv] Taneli. F., 'Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı' *Türk Klinik Biyokimya Derg* (2007) **5**, 75.



- 
- [cxlv] Akhurst, R.J., Derynck, R., "TGF- $\beta$  signaling in cancer a double-edged sword", *Trends Cell Biol*, (2001), **11**,44..
- [cxlvi] Roman, C., Saha, D., Beauchamp, D., "TGF- $\beta$  and colorectal carcinogenesis", *Microscopy Research and Technique*, (2001) **52**, 450.
- [cxlvii] Selvamurugan, N., Kwok, S., Alliston, T., Reiss, M., Partridge, N.C., 'Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2'. *J Biol Chem*. (2004) **279**, 19327.
- [cxlviii] Wei, Y.Y., Chen, Y.J., Hsiao, Y.C., Huang, Y.C., Lai, T.H., Tang, C.H., 'Osteoblasts-derived TGF-beta1 enhance motility and integrin upregulation through Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human breast cancer cells' *Mol Carcinog*. (2008) **47**, 526.
- [cxlix] Kingsley, L.A., Fournier, P.G.J., Chirgwin, J.M., Guise, T.A., 'Molecular Biology of Bone Metastasis' *Mol Cancer Ther* (2007) **6**, 2609
- [cl] Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H., Matsuzawa Y., 'Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma'. *Cancer Lett* (1995)89,45.
- [cli] Pardali, K., Moustakas, A., 'Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer'. *Biochim Biophys Acta* (2007) **1775**, 21.
- [clii] McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D.E., Dubois, C.M., 'Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression'. *J Biol Chem* (2006) **281**, 24171.
- [cliii] Yildırım, H., Kockar, F., 'TGF-b upregulates tumor-associated carbonic anhydrase IX gene expression in Hep3B cells' *Cell Biology International* (2009) **33**, 1002.