



**İNSAN BAX GENİ 5' KODLAMAYAN DİZİDE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ BAĞLANMA
BÖLGELERİNİN DELESYONUNUN GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Atena GHOSİ GHAREHAGHAJİ**

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN BAX GENİ 5' KODLAMAYAN DİZİDE TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜ BAĞLANMA BÖLGELERİNİN DELESYONUNUN GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Atena GHOSİ GHAREHAGHAJİ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN BAX GENİ 5' KODLAMAYAN DİZİDE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
BAĞLANMA BÖLGELERİNİN DELESYONUNUN GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof.Dr.Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Atena GHOSİGHAREHAGHAJI tarafından hazırlanan bu çalışma, 17/11/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5./5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Ali Osman BELDÜZ

İmza :

Üye : Prof.Dr.Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof.Dr.Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç.Dr.Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 21.12./2017 tarih ve 50...../18..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN BAX GENİ 5' KODLAMAYAN DİZİDE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ BAĞLANMA BÖLGELERİNİN DELESYONUNUN GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Atena GHOSİ GHAREHAGHAJİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada, proapoptotik bir gen olan insan BAX geni 2000 bç'lik 5' kodlamayan dizisi Ensembl veri tabanı kullanılarak belirlendi. Bu bölge işlevsel özelliklerine göre PCR yöntemiyle 1400 bç, 930 bç ve 390 bç'lik parçalara ayrıldı. Çoğaltılan parçalar pGEM-T Easy vektörüne aktararak *Escherichia coli JM109* bakterisine transfer edildi. Daha sonra elde edilen bölgeler Lusiferaz vektörüne (pGL-3 basic vektör) aktarıldı. Saflaştırılan plazmitler MCF-7 hücrelerine transfekte edildi. Oluşturulan konstraktların lusiferaz aktivitesi, kontrol vektörüne göre ölçümü yapıldığında 930 bç'lik parçanın en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Genomatix veritabanı kullanılarak 930 bç'lik parça, SWI / SNF transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin yerleşimine göre 797 bç, 673 bç, 230 bç ve 185 bç'lik parçalara ayrıldı. Çoğaltılan parçaların lusiferaz aktivitesi kontrol vektörü ile kıyaslandığında en yüksek aktivitenin 673 bç'lik bölgede bulunan SWI-SNF3 ve SWI-SNF4 olarak adlandırdığımız transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinde olduğu tespit edildi. Böylece daha sonraki çalışmalarda tespit edilen transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri üzerinde site spesifik mutagenizler yapılarak 5' kodlamayan dizisi üzerindeki farklı transkripsiyon faktörleri ile etkileşimlerinin belirlenmesi mümkün olacaktır.

2017, 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: BAX geni, kanser, 5' kodlamayan dizisi, transkripsiyon faktörü

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DELETION OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES IN HUMAN BAX GENE 5' NONCODING SEQUENCE ON GENE EXPRESSION

Atena GHOSİ GHAREHAGHAJİ

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Genetic Sciences
Genetic Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, the human BAX gene, a proapoptotic gene, was identified the 2000 bp 5' noncoding sequence by using the Ensembl database. According to the functional features of this region, 1400 bp, 930 bp and 390 bp fragments were separated by PCR method. The amplified fragments were transferred to the pGEM-T Easy vector and transferred to Escherichia coli JM109 bacteria. Subsequently, the obtained regions were transferred to the luciferase vector (pGL-3 basic vector). Purified plasmids were transfected into MCF-7 cells. Oluşturulan konstraktların lusiferaz aktivitesi, kontrol vektörüne göre ölçümü yapıldığında 930 bp'lik parçanın en yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Using the Genomatix database, 930 bp fragments were divided into 797 bp, 673 bp, 230 bp and 185 bp fragments according to the location of the SWI / SNF transcription factor binding sites. Çoğaltılan parçaların lusiferaz aktivitesi kontrol vektörü ile kıyaslandığında en yüksek aktivitenin 673 bp'lik bölgede bulunan SWI-SNF3 ve SWI-SNF4 olarak adlandırdığımız transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinde olduğu tespit edildi. Thus, site-specific mutagenesis on transcription factor binding sites detected in later studies will allow interaction with different transcription factors on the 5'non-coding sequence.

2017, 82 pages

Key words: BAX gene, cancer, 5' noncoding sequence, transcription factor

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca kalbimi sımsıcak hissettiren, umudumu her zaman var eden ve sabırla zorlukları aşmamı sağlayan ve her şeye rağmen yine de gülümseyebilmeyi nasip eden ALLAHIM'a, bu çalışmanın araştırma konusunun belirlenmesi, planlanıp yürütülmesi ve tez haline getirilmesinde bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarından yararlanmamı sağlayan dekanımız Sayın Prof. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve yakın ilgiyi esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL başta olmak üzere bölümdeki tüm hocalarıma, kimya bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Tez dönemim boyunca çalışmalarına devam etmemde önemli bir katkı sağlayan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) yöneticileri Sayın Prof. Dr. Ramazan ALTUNDAŞ ve Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a,

Doktora eğitimim sürecinde beraber çalışmaktan, beraber gülmekten, beraber ağlamaktan büyük mutluluk duyduğum, çalışmalarında bana hep destek olan, tez çalışmamın sıkıştığı bir noktada benden yardımlarını esirgemeyen, arkadaşlığını hep hissettiğim canım kardeşim Arş. Gör. Emine TORAMAN'a,

Tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca engin bilgi, tecrübe ve kültürü ile bana yol gösteren, iyi bir bilim insanı olma konusunda beni yönlendiren, bilim eğitimime katkılarının yanında hayatta güçlü ve sağlam durmanın da yolunu gösteren değerli can dostum Ekrem SULUKAN'a ve bana destek olan tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarımın ve hayatımın her aşamasında maddi ve manavi desteklerini esirgemeyen sevgili babam Sayın Daryoush Ghosi Gharehaghaji'ye, canım annem Sayın Tahere FANAYİ'ye ve kardeşlerime göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı şükranlarımı sunarım.

Atena GHOSİGHAREHAGHAJİ

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.1.1. Kansere sebep olan etkenler	2
1.1.1.a. İyonize radyasyon.....	2
1.1.1.b. Viral ve bakteriyal enfeksiyonlar	2
1.1.1.c. Genetik veya kalıtsal kanserler	2
1.1.1.d. Hormonal değişimler	3
1.1.1.e. İmmün sistem bozuklukları	3
1.1.1.f. Hava kirliliği	3
1.1.1.g. Sigara.....	3
1.1.2. Kanserin moleküler biyolojisi	3
1.1.3. Hücre döngüsü ve kanser	4
1.1.4. P53 geni.....	5
1.1.4.a. P53'ün regülasyonu	5
1.2. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)	7
1.2.1. Apoptozun özellikleri	7
1.2.2. Apoptozu düzenleyen genler	8
1.2.3. Apoptoz mekanizmaları	8
1.2.4. Apoptozun ekstrinsik yolu	9
1.2.5. Apoptozun intrinsik yolu.....	11
1.3. Transkripsiyonun Moleküler Biyolojisi	12
1.3.1. Başlatma	13
1.3.2. Promotörün tanınması	14

1.3.3. Uzama.....	14
1.3.4. Sonlandırma.....	15
1.3.5. Transkripsiyonel koaktivatörler ve korepressörler	15
1.3.6. Kromatini yeniden modelleyen faktörler	16
1.3.7. SWI / SNF'nin Çalışma mekanizması: Nükleozom kayması ve parçalarına ayrılması	17
1.3.8. Kromatini yeniden modelleyen ISWI kompleksleri Histon oktomerini DNA üzerinde kaydırır	17
1.3.9. SWRI kromatini yeniden modelleyen kompleksi	17
1.4. Promotör.....	18
1.4.1. Bakterilerde promotör yapısı.....	19
1.4.2. Ökaryotlarda promotörün yapısı	19
1.4.3. Promotörlerdeki CpG adaları	20
1.4.3.a. İnaktif genlerde CpG adalarının metilasyonu.....	20
1.4.3.b. Kanserde CpG adalarının hiper-hipo metilasyonu	20
1.5. Mutagenез	21
1.6. Kanseri ve Hücre Hattı	21
1.7. MCF-7 Hücre Hattının Kökeni.....	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Kimyasallar	31
3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.....	32
3.1.3. Stok solüsyonlar	33
3.1.4. Çalışmada kullanılan vektörler.....	33
3.2. Metotlar	34
3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	34
3.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri	35
3.2.2.a. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması	35
3.2.2.b. FBS hazırlanması	35
3.2.2.c. PBS tampon çözeltisinin hazırlanması	35
3.2.2.d. Çalışmada kullanılan hücre hatları	35

3.2.2.e. Hücrelerin çözülmesi	35
3.2.2.f. Hücrelerin büyütülmesi	36
3.2.2.g. Hücrelerin pasajlanması	36
3.2.2.h. Hücrelerin sıvı azotta saklanması	36
3.3. Memeli Hücrelerinden RNA İzolasyonu	36
3.4. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi	37
3.5. Real- Time PCR	37
3.5.1. Real - Time PCR döngüsü	38
3.6. Primer Tasarımı	38
3.6.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın kesilmesi	39
3.6.2. DNA agaroz jel elektroforezi	40
3.6.3. Agaroz jelden DNA pürifikasyonu	40
3.6.4. Elde edilen promotör parçalarının lusiferaz vektörüne klonlanması	40
3.6.5. Çalışmada kullanılan bakteri izolatu	41
3.6.6. Bakteriyel kültür ortamı	41
3.6.7. Antibiyotikler	41
3.6.8. Kompetent hücre hazırlanması	41
3.6.9. Transformasyon	41
3.6.10. Koloni PCR	42
3.6.11. Plazmit DNA izolasyonu (Maxiprep)	42
3.6.12. İzole edilen plazmitlerin MCF7 hücrelerine geçici transfeksiyonu	43
3.6.13. Lusiferaz aktivitesinin ölçülmesi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. BAX Gen Promotörünün 1922 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması	46
4.1.1. İnsan BAX gen promotörünün 1922 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	47
4.2. BAX Gen Promotörünün 1400 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması	47
4.2.1. İnsan BAX gen promotörünün 1400 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	48
4.3. BAX Gen Promotörünün 930 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması	49
4.3.1. İnsan BAX gen promotörünün 930 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	49

4.4. BAX Gen Promotörünün 390 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması	50
4.4.1. İnsan BAX gen promotörünün 390 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	50
4.5. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Büyütülmesi.....	51
4.5.1. Seçilen hücre hatlarının Real-Time PCR sonuçları.....	53
4.6. İnsan BAX Gen Promotörüne Ait 1400 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy ve Lusiferaz Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	54
4.6.1. İnsan Bax gen promotörünün 1400 bp bölgesinin lusieraz vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	55
4.6.2. Koloni PCR	55
4.6.3. Plazmit DNA izolasyonu.....	56
4.7. İnsan BAX Gen Promotörüne Ait 930 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy ve Lusiferaz Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	56
4.7.1. İnsan Bax gen promotörünün 930 bp bölgesinin lusieraz vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	56
4.7.2. Koloni PCR	57
4.7.3. Plazmit DNA izolasyonu.....	57
4.8. İnsan BAX Gen Promotörüne ait 390 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	58
4.8.1. İnsan Bax gen promotörünün 390 bp bölgesinin lusieraz vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	58
4.8.2. Koloni PCR	59
4.8.3. Plazmit DNA izolasyonu.....	59
4.9. Oluşturulan Lusiferaz Konstraktlarının Hücre Kültürüne Aktarılması.....	59
4.10. Lusiferaz Aktivite Ölçümü (Luminimetre Ölçümü)	60
4.11. BAX Gen Promotörünün 930 bp'lik Bölgesinde Bulunan Transkripsiyon Faktörlerinin Tespit Edilmesi	61
4.11.1. Tespit edilen transkripsiyon faktörleri üzerinde delesyon yapılması.....	67
4.11.2. Çoğaltılan bölgelerin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu	68
4.11.3. Plazmit DNA izolasyonu.....	68
4.11.4. Delesyon bölgelerini içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün	

restriksiyon enzimleriyle kesilmesi.....	68
4.11.5. Delesyon bölgelerinin lusiferaz vektörüne klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye transformasyonu.....	69
4.11.6. Koloni PCR	69
4.11.7. Plazmit DNA izolasyonu.....	70
4.11.8. Oluşturulan lusiferaz konstraktlarının hücre kültürüne aktarılması	70
4.11.9. Lusiferaz aktivite ölçümü (Luminimetre ölçümü)	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	73
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells.
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
Apaf-1'e	Apoptotic protease activating factor 1,
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	Breast cancer type 1
Caspase-10	Cysteine-aspartic proteases
CD95	Cell Death
CHK2	Human gene Checkpoint kinase 2.
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoxyribonucleic acid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene diaminetetra acetic acid
Endo G	Endonuclease G
FADD	Fas-associated death domain
FBS	Fetal Bovine Serum
Hep3B	Hepatoma cell line
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Human papillomavirus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IAP	Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins
ING3	Inhibitor Of Growth Family Member 3 (Protein Coding)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1 protein

Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEF	Mouse embryo fibroblast
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PC3	Human prostate cancer cell lines
PCD	Primary ciliary dyskinesia
pGL3	Luciferase Reporter Vectors
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SH-SH5Y	Neuroblastoma cell line
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBP	TATA-box-binding protein
TFB	Transcription factor B
TFIID	Transcription factor II D
TNF1	Tumor necrosis factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. P53'ün Mdm2 tarafından düzenlenmesi.....	6
Şekil 1.2. Transkripsiyonun şematik gösterimi	12
Şekil 1.3. SWI/SNF kompleksinin çalışma mekanizması	18
Şekil 3.1. pGL3-Basic vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.....	34
Şekil 4.1. 1922 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	46
Şekil 4.2. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	47
Şekil 4.3. 1400 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	48
Şekil 4.4. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	48
Şekil 4.5. 930 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	49
Şekil 4.6. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	49
Şekil 4.7. 390 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması	50
Şekil 4.8. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	50
Şekil 4.9. PC3 hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi	51
Şekil 4.10. Hep3B hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi	51
Şekil 4.11. SH-SH5Y hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi	52
Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin inverted mikroskopta gözlenmesi	52
Şekil 4.13. A549 hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi	53
Şekil 4.14. Farklı hücre hatlarının BAX genine ait ekspresyon düzeyleri.....	54
Şekil 4.15. 1400 bp bölgeyi içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün kesilmesi.....	54
Şekil 4.16. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	55
Şekil 4.17. 930 bp bölgeyi içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün kesilmesi.....	56
Şekil 4.18. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	57
Şekil 4.19. Restriksiyon enzimleriyle kesilen 390 bp'lik bölgenin agaroz jelde görüntülenmesi	58
Şekil 4.20. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	59
Şekil 4.21. İnsan BAX geninin kromozom üzerindeki yerleşimi	60

Şekil 4.22. İnsan BAX geni 5' kodlamayan bölgede yapılan delesyonların lusiferaz aktivitesine etkisinin incelenmesi.....	60
Şekil 4.23. pGEM-T Easy vektörüne aktarılan delesyon bölgelerinin koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi.....	68
Şekil 4. 24. Lusiferaz vektörüne aktarılan delesyon bölgelerinin koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi	69
Şekil 4.25. SWI/SNF Transkrpsiyon faktör bağlanma bölgelerinin delesyonunun lusiferaz aktivite sonuçları	71
Şekil 4.26. İnsan BAX geninin 5' kodlamayan bölgesinde bulunan 930 bç'lik parça üzerindeki SWI/SNF transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin delesyonu	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	31
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	32
Çizelge 3.3.	Agaroz jel elektroforezi solüsyonları.....	33
Çizelge 3.4.	Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri.....	39
Çizelge 3.5.	İzole edilen lusiferaz plazmitlerinin konsantrasyonları	42
Çizelge 4.1.	Bax geninin 2000 bp‘lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler.....	44
Çizelge 4.2.	İnsan BAX gen 930 bp’lik SW1/SNF transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri.....	66

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, moleküler heterojen bir hastalıktır (Louzada *et al.* 2012) ve dünya çapındaki ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Farklı histopatolojilere, genetik ve epigenetik varyasyonlara sahip olması bu hastalığın anlaşılmasını ve yeni terapilerin oluşturulmasını zorlaştırmaktadır.

Kanser patobiyolojisi çalışmasındaki ilerlemeler, bu hastalığın çeşitli biçimlerini gözden geçiren, genetik ve epigenetik değişiklikleri ve antikanser ilaç testlerinin bilgisine izin veren farklı deneysel model sistemlerinin mevcudiyeti üzerine kurulmuştur (Vargo-Gogola and Rosen 2007).

Kanser, hücre çoğalmasını, hücre döngüsünü, hücre ölümünü kontrol eden genler ile hücrenin stabilitesini belirleyen genlerdeki mutasyon ve anormal aktivasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Abraham and Rotella 2003).

Normal hücre büyümesinde hücrenin büyümesini ve ölümünü sağlayan sinyaller arasında bir denge mevcuttur. Bir yara iyileşme süreci ve normal doku yenilenmesi gibi durumlarda bu denge hücre sayısını artırmaya sebep olur ve bu süreçte hücre farklılaşması belirli bir düzen içinde ilerlerken ihtiyaç ortadan kalktığında ise çoğalma durmaktadır. Oysa tümör hücrelerinde bu düzen ve kontrol bozulmuş olup sürekli bir hücre çoğalması meydana gelmektedir (Macdonald *et al.* 2004).

Genomdaki dinamik değişimler kansere sebep olmaktadır (Hanahan and Weinberg 2000). Genomik seviyedeki bu değişimler mutasyon ve kopya sayısındaki değişimleri içermektedir. Bu değişimler aynı zamanda genlerin transkripsiyonel seviyedeki değişimlerini de kontrol etmektedir. Kansere ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimler ilk aşamada genom seviyesindeki mutasyonlarla ortaya çıkmasına rağmen

çoğu gen ekspresyon değişim paternleri mutasyonlu gen içermemektedir (Sager 1997). Kanserdeki genlerin diferansiyel ekspresyonları DNA metilasyonu, genin kopya sayısındaki değişimler ve transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası regölasyon ile açıklanabilir.

1.1.1. Kansere sebep olan etkenler

1.1.1.a. İyonize radyasyon

Radon gazı ve güneşten gelen mor ötesi ışınlara uzun süre maruz kalma melanomaya ve diğer cilt malignitelerine neden olabilir. Bir çeşit kansere verilen radyasyon tedavisi başka bir kanser tipine de neden olabilir. Örneğin, lenfomalar için göğüs radyasyon tedavisi alanlar daha sonra meme kanserine yakalanabilirler.

1.1.1.b. Viral ve bakteriyal enfeksiyonlar

Bazı kanserler, patojenlere bağlı enfeksiyonlardan kaynaklanabilir. Bunların arasında, Hepatit B ve C enfeksiyonlarına bağlı karaciğer kanseri; İnsan Papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonlarına bağlı rahim ağzı kanseri; Epstein Barr virüsü, Helicobacter pylori enfeksiyonuna bağlı Burkitt lenfoma ve gastrik veya mide kanserine neden olur.

1.1.1.c. Genetik veya kalıtsal kanserler

Genel örnekler kalıtsal meme kanseri ve BRCA1 ve 2 dahil yumurtalık kanseri genleridir. Li-Fraumeni sendromu, p53 geninde kemik kanserleri, meme kanseri, yumuşak doku sarkomları, beyin kanseri vb. neden olan kusurları içerir.

1.1.1.d. Hormonal değişikler

Bunların arasında kadınlarda hormon düzeylerinde östrojen değişiklikleri dikkati çekmektedir. Örneğin aşırı östrojen rahim kanserini teşvik eder.

1.1.1.e. İmmün sistem bozuklukları

HIV enfeksiyonunu içeren bağışıklık bozukluğu, Kaposi sarkomu, non-Hodgkin lenfoma ve anal kanser ve rahim ağız kanseri gibi HPV ile ilişkili maligniteleri de içeren birkaç kansere yol açar (Koh *et al.* 2003).

1.1.1.f. Hava kirliliği

Hava kirliliğinin tek başına veya sigara içilmesi ile birlikte akciğer kanserlerinin etiyolojisinde rol oynar (Raaschou-Nielsen *et al.* 2013).

1.1.1.g. Sigara

Akciğer kanserinin etiyolojisindeki en önemli nedendir ve kanser riskini 10 ile 20 kat arttırır (Colditz *et al.* 2003).

1.1.2. Kanserın moleküler biyolojisi

Kanser, upregule edilmiş ve kontrol edilemeyen hücre çoğalması ile ilgili anormal bir durumdur. 71'den fazla farklı kanser türü mevcuttur ve bunların çoğu, hücre morfoloji, gen ifadesi (hücre yüzeyi belirteçleri ve büyüme faktörü ve hormonal reseptörlerin ekspresyonu dahil), metabolizma, motilite ve anjiyojenik, proliferatif, immünojenik ve metastatik potansiyel gibi tüm fenotipik özelliklerde heterojendir (Marusyk and Polyak 2010). Kanser hücrelerinde görülen bu değişikliklere hücrelerin genetik materyalinde meydana gelen bazı durumlar neden olur. Karsinogenez

sürecindeki genetik değişiklikler genel olarak; genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi veya insan kromozomlarının lokuslarına yabancı DNA dizilerinin (genellikle viral DNA dizileri) girmesi şeklinde özetlenebilir. Genlerde meydana gelen değişikliklerin bir kısmı kalıtsal olabildiği gibi önemli bir kısmı ise çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır (Fışkın 2002).

1.1.3. Hücre döngüsü ve kanser

Hücreler normalde hücre çoğalmasını sağlayan uyaranlara bağlı olarak gerekli durumlarda bölünürler. Kanserli hücrelerde ise ortaya çıkan mutasyonlar kontrollü büyüme sürecini bozmaktadır (Evan and Vousden 2001). Hücre döngüsü G2/M geçişi, S fazına girmeden önceki geç G1 fazı ve M kontrol noktasında olmak üzere üç farklı noktada denetlenir (Fışkın 2002).

Bu denetim noktalarının her birinde, döngünün ilerleyip ilerlemeyeceğine karar verilmektedir. Bu kararların verilmesinin kontrolü, protein kinazlar ve hücre döngüsünün işlerliğini kontrol eden siklin adlı proteinler tarafından yapılır (Fışkın 2002).

İlk kontrol noktası geç G1 fazıdır. Bu noktada hücrenin G1 fazını aşp S fazına geçebilmesi için DNA'nın hasarsız olması gerekmektedir. Eğer bir hasar varsa hasar onarılan kadar hücre bu kontrol noktasında durur (Cabadak 2008). Kanser hücrelerinde oluşan genetik bozukluğun önde gelen sebeplerinden biri hücre döngüsünün kontrolünün bozulmasına sebep olan mutasyonlardır. Hasarlı veya replike olmamış DNA varsa bu fazda kontrol edilir. Tam bir kromozom takımının yavru hücrelere geçmesini sağlamak üzere kromozomların mitoz sırasındaki dizilimlerini kontrol eden M kontrol noktası bir diğer önemli kontrol noktasıdır. Eğer, kromozomların tam bir takımının yavru hücrelere dağılımında bir problem olursa hata giderilinceye kadar mitoz fazının metafazında siklus durur (Fışkın 2002).

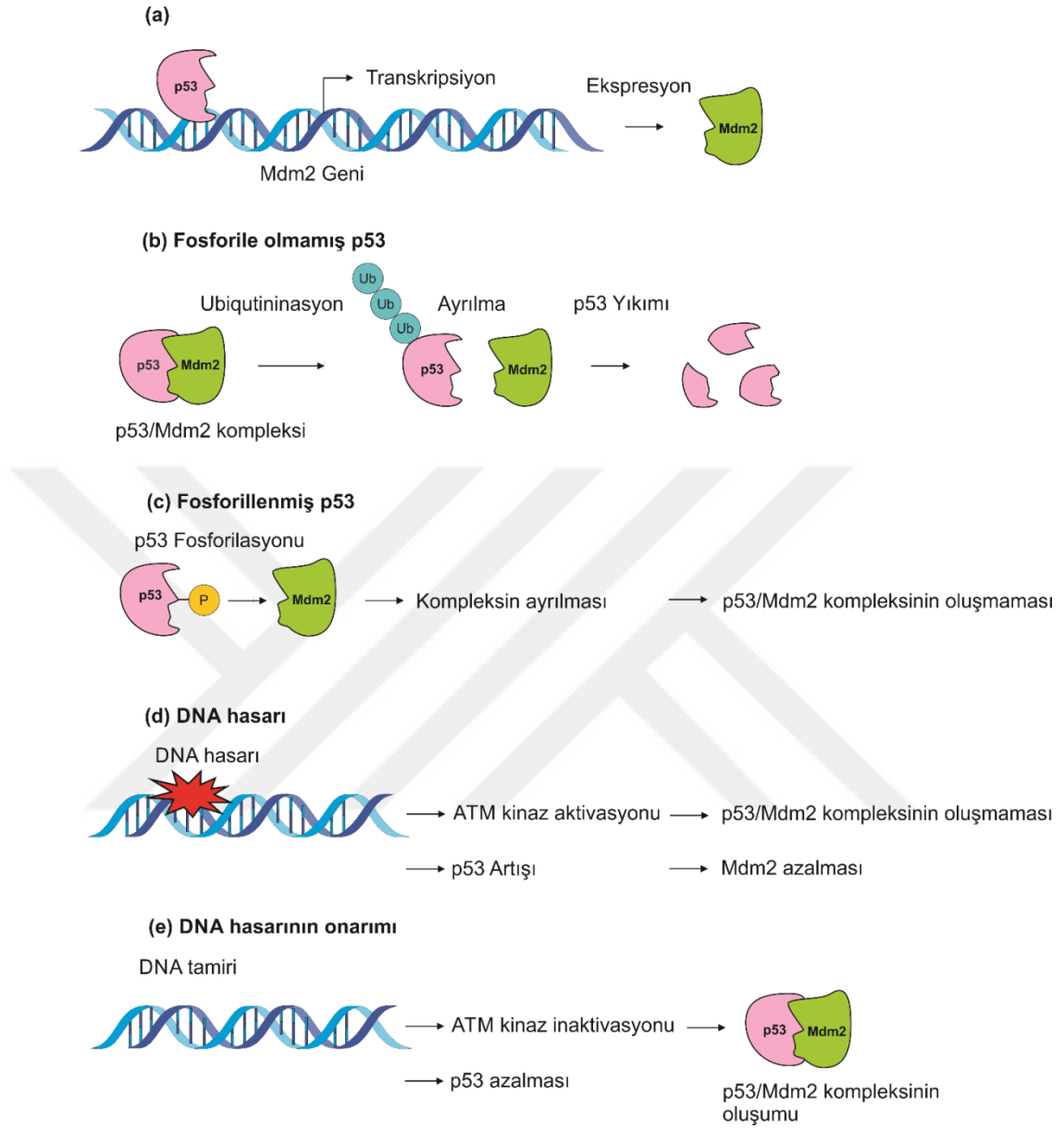
1.1.4. P53 geni

TP53 olarak da bilinen p53 veya tümör proteini, hücre döngüsünü düzenleyen ve dolayısıyla bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören bir proteini kodlayan bir gendir. P53, genom mutasyonunu önleyerek istikrarın korunmasını sağlamasından dolayı "genomun gardiyanı" olarak tanımlanmaktadır. İnsan p53 geni 17. Kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. P53 proteini, 393 amino asitten oluşan bir fosfoproteindir. Dört domainden oluşmaktadır ve bunların farklı farklı görevleri vardır. Bu domainlerin transkripsiyon faktörlerini aktive etme, spesifik DNA dizilerini tanıma, proteinlerin tetramerleşmesini sağlama ve yanlış hizalanmış baz çiftleri veya tek sarmallı DNA gibi hasarlı DNA'yı tanıma gibi görevleri vardır. Hücre döngüsü kontrolünde ve apoptozda önemli bir rol oynar. Mutasyona uğramış p53, anormal hücrelerin çoğalmasına ve kansere neden olabilir. Tüm insan tümörlerinin %50'si p53 mutantları içerir. Normal hücrelerde p53 protein seviyesi düşüktür. DNA hasarı ve diğer stres sinyalleri, büyümeyi durdurma, DNA onarımı ve apoptoz (hücre ölümü) olmak üzere üç ana fonksiyona sahip olan p53 proteinlerinin artışı tetikleyebilir.

Hasar görmüş DNA'nın çoğalmasını önleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. Büyümenin durdurulması sırasında DNA onarımında rol oynayan proteinlerin transkripsiyonunu aktive edebilir. P53'ün hücresel konsantrasyonu sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Tümörleri baskılamasının yanında, anormal p53 seviyesi aşırı apoptoz ile yaşlanmayı hızlandırabilir. P53'ün başlıca düzenleyicisi, ubiquitin sistemi ile p53'ün bozunmasını tetikleyebilen Mdm2'dir. P53, (kendi regülasyonu için) Mdm2'nin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyonel aktivatördür (Bell *et al.* 2002).

1.1.4.a. P53'ün regülasyonu

Aşağıda belirtildiği gibi, p53 esas olarak Mdm2 tarafından düzenlenir.



Şekil 1.1. P53'ün Mdm2 tarafından düzenlenmesi

- a) Mdm2'nin ekspresyonu p53 ile aktive edilir.
- b) P53'ün Mdm2 ile bağlanması p53'ün ubikitin sistemi vasıtasıyla parçalanmasını tetikleyebilir.
- c) P53'ün Ser15, Thr18 veya Ser20'deki fosforilasyonu Mdm2 ile bağlanmasını bozacaktır. Normal hücrelerde bu üç rezidü fosforile değildir ve p53 düşük seviyede Mdm2 ile korunur.

d) DNA hasarı, protein kinazı (ATM, DNA-PK veya CHK2 gibi) aktive ederek p53'ü bu üç rezidüden birinde fosforile ederek p53 seviyesini artırır. Mdm2 ekspresyonu p53 tarafından aktive edildiğinden, p53'ün artışı da Mdm2'yi artırır, ancak p53'ün fosforile olduğu sürece hiçbir etkisi yoktur. DNA hasarı onarıldıktan sonra ATM kinaz artık aktif değildir. P53, biriken Mdm2 ile hızla defosforile edilip parçalanır (Blagosklonny 2002).

1.2. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinmektedir. Her hücre doğmakta, belli bir süre (hücre tipine göre günlerden yıllara kadar değişen bir süre) yaşamakta ve sonra ölmektedir. Bu durum fizyolojik olarak her saniye yaklaşık bir milyon hücremizin ölmesiyle bir ömür boyu sürmektedir. Buradaki ölüm mekanizması apoptoz olarak tanımlanmaktadır (Kerr *et al.* 1972). Ultraviyole ışınlam, oksidatif stres ve genotoksik kimyasallar gibi dışsal ve endojen uyaranlar tarafından tetiklenen apoptoz, biyolojik sistemler içinde çok önemli bir fenomendir. DNA hasarı çekirdekte ve sitoplazmada p53'ü aktive eder ve stabilize eder ve intrinsik ve dışsal apoptotik yolları uyaran diğer proteinleri düzenler (Sinha *et al.* 2009).

1.2.1. Apoptozun özellikleri

Hücre ölümü, geniş çapta tanımlanmış en az iki mekanizma vasıtasıyla ortaya çıkabilir: nekroz veya apoptoz. Nekroz pasif, katabolik, patolojik bir hücre ölüm sürecidir ve genellikle inflamasyon, iskemik veya toksik yaralanma gibi dış toksik faktörlere yanıt olarak ortaya çıkar. Fizyolojik koşullar altında gerçekleştiği düşünülmez. Nekroz, mitokondrinin şişmesi, plazma membranının erken kopması, dağınık kromatin ve hücrenin bozulmamış yapısının erken yıkımı ile karakterizedir. Aksine, apoptoz, aktif, metabolik, genetik olarak kodlanmış ve evrimsel olarak seçilmiş bir ölüm yoludur. Fizyolojik veya patolojik koşullar altında oluşur.

Bu intihar yolu, zarın patlaması, yüksek ölçüde yoğunlaşmış kromatin görünümü ve kromozomal DNA'nın birkaç yüz kilobaza, daha sonra 50 kb'ye ve sonuçta 200 bp'ye

dizisel olarak bölünmesine yol açan bir endonükleolitik sürecin aktivasyonu ile karakterizedir. Bu oligozomal DNA fragmanları, apoptozun bir işaretini temsil eden etidyum bromid ile boyanmış agaroz jel üzerinde farklı bir merdiven deseniyle sonuçlanır. Sonuç olarak, hücreler küçülür ve fagositler için hedef olarak özel bir eğilimi gösteren çok sayıda küçük membrana bağlı "apoptotik cisimler" halinde yoğunlaşır. Bu, sitoplazmik içerikleri hücre-içi boşluğa sızdırmadan apoptotik hücreleri ortadan kaldırarak, doku iltihaplanmasını en aza indirir, komşu hücrelere zarar vermemek ve konak (veya viral) DNA'yı etkin bir şekilde parçalamaya başlar (Gültekin *et al.* 2008).

1.2.2. Apoptozu düzenleyen genler

Apoptozun kontrolünde çok sayıda gen ve protein görev almaktadır. Bunlar, apoptotik yol üzerindeki ayrı basamaklardaki faaliyetleri ve spesifik hastalık durumlarıyla olan ilişkileri ile kategorize edilebilir. Tetikleyicilerin bir çeşidi, ölüm yolunun düzenleyicileri veya modülatörleri tarafından sıkı homeostatik düzenlemeye tabi olan kaskadı etkinleştirir. Kaspazlar (apoptozun yürütücüleri) enzimatik olarak aktive olduğunda apoptozda geri dönüşü olmayan noktaya ulaşılır. Kaspaz aktivasyonunu düzenleyen faktörlerden Bcl-2 ailesi, apoptozu ya olumlu (örneğin Bax) ya da olumsuz yönde etkiler. Diğer apoptoz modülatörleri daha ileri akışta bulunur ve Bcl-2 gibi downstream faktörleri tarafından regülasyona tabi tutulan kaskadları aktive ettiği düşünülmektedir. Bu upstream modülatörleri arasında, c-myc gibi onkogenler, (görünüşte paradoksal olarak) apoptozu tümörjenez veya kanser tedavisinde önemli olabilecek bir şekilde harekete geçirir. Tümör süpresörü p53, belirli koşullar altında apoptozu indükler ve böylece tümör baskılayıcı aktivitesinin en azından bir kısmını oluşturur (Min *et al.* 2015).

1.2.3. Apoptoz mekanizmaları

Apoptozun yolları, enerjiye bağlı moleküler olay akışının gerçekleştiği yerde son derece karmaşıktır. Esas olarak intrinsik ve ekstrinsik yol olmak üzere iki yolak iyi

tanımlanmıştır. Perforin / granzim-A veya B'yi (sitotoksik T lenfositleri ve NK hücreleri tarafından salınan perforin / granzim kaynaklı apoptozis) içeren apoptozun bir başka yolu da bulunmaktadır. Granzyme A ile indüklenen apoptozun tek sarmallı DNA hasarı yoluyla bir kaspazdan bağımsız yol olduğu bulunmuştur (Martinvalet *et al.* 2003). Apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yolları ilişkilidir ve birbirlerini etkilemektedirler (Igney *et al.* 2002).

Apoptozun üç (intrinsik, ekstrinsik ve granzim B tarafından indüklenen) yolu da, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve kromozomal DNA parçalanması ve nükleusun parçalanmasını takiben caspase-3 / 7'nin aktivasyonu ile hücre ölümüne neden olan noktada bir araya gelirler (Elmore 2007). Genellikle, kaspazlar, hücrelerde aktif olmayan bir formda (yani prokaspaz) bulunurlar ve aktive olduktan sonra diğer kaspazları tetikleyerek apoptotik sinyal yolağına ve ardından proteolitik aktiviteye bağlı olarak hücre ölümüne neden olur. Kaspazlar çoğu hücrede aktif olmayan bir pro-enzim formunda yaygın şekilde ifade edilir ve aktive olduktan sonra çoğu zaman diğer prokaspazı aktive ederek bir proteaz kaskadının başlatılmasına izin verir. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar.

1.2.4. Apoptozun ekstrinsik yolu

Artmış p53 proteini seviyesi UV ışınlarına maruz kaldıktan sonra insan keratinositlerinde tespit edildi (Henseleit *et al.* 1997). Normal insan keratinositlerinin UV ışınına maruz bırakılması, TNF α reseptörü (p55 veya CD120a), Fas (CD95 / APO-1), DR3 (Apo3 veya WSL1), DR4 (TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2) gibi hücre yüzey ölüm reseptörleri tarafından başlatılan ekstrinsik apoptotik yolağı indükler (Haupt 2003). UV-B ile indüklenen apoptoz ligand bağımlı (Caricchio *et al.* 1998) veya ligandtan bağımsız (Clément *et al.* 2007) Fas kümelemesi ile tetiklenir ve sonuçta kaspaz aktivasyonu sağlanır. Ölüm reseptörünün aktivasyonu, adaptör molekülü FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) ve kaspaz-8'den oluşan ölüm indükleyici sinyal yolağı kompleksinin (DISC) oluşumuyla izlenir (Boldin *et al.* 1996). FADD, N-terminal ölüm

efektör etki alanları (DED'ler) ile homofilik ara yüz vasıtasıyla kaspaz-8 zimojenleri ile bağlantılıdır (Boatright *et al.* 2003). DISC oluşumu ile, efektör kaspazlarını direk olarak bölen ve aktive eden caspase-8 aktive edilir veya dolaylı olarak BH3-only proteini olan Bid'in bölünmesi yoluyla downstream kaspazlarını aktive ederek apoptozun intrinsik yolağının harekete geçmesine yol açar (Luo *et al.* 1998). UV radyasyonu esas olarak BH3-only protein Noxa yoluyla cilt keratinositlerinin apoptozunu tetikler (Naik *et al.* 2007).

UV irradyasyonu, ERKs, JNKs ve p38 MAPK gibi MAPK süper ailesinin birkaç üyesinin aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Peus *et al.* 1999). Prokaspaz-3 aktivasyonu takiben sitozol içine mitokondriyal sitokrom-c salınımını indükleyerek UV-B ışınlaması yoluyla p38 MAPK yolağının apoptozise aracılık ettiği gösterilmiştir (Assefa *et al.* 2000). C-Jun N-terminal kinaz1'in (JNK-1) UV ile indüklenen apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Katagiri *et al.* 2006). Serpin süperfamilisine (SCCA1 & SCCA2) ait olan skuamöz hücreli karsinoma antijeninin (SCCA), insanlarda (Schneider *et al.* 1995) UV ışınlamasından sonra cildin üst epidermisinde güçlü bir şekilde upregüle olduğu bilinmektedir (Katagiri *et al.* 2006).

Ayrıca SCCA aşırı eksprese edildiğinde UV ile indüklenen apoptoz önemli ölçüde azalır ve SCCA1'in JNK'yi baskılayarak keratinositlerde UV radyasyona karşı koruyucu bir rol oynamak için JNK-1'e kuvvetli bir şekilde bağlanır. Son zamanlarda Wang ve Li (2006), özellikle çekirdekte bulunan bir tümör baskılayıcı protein olan ING3'ün, Fas ekspresyonunu modüle ederek UV ile indüklenen apoptoziste rol aldığını göstermiştir. Caspase-10 ve FLICE benzeri inhibitör proteinin (FLIP) tutulumunun, ölümle ilgili reseptör aracılıklı apoptoza dahil olduğu bulunmuştur (Juo *et al.* 1998). FLIP, belirli anlamlı farklılıklara sahip bir caspase-8 homologudur ve düşük konsantrasyonun, muhtemelen heterodimerizasyon yoluyla DISC'de Fas'ın neden olduğu kaspaz-8 aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir; yüksek konsantrasyonlarda FLIP kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe eder (Chang *et al.* 2002).

1.2.5. Apoptozun intrinsik yolu

DNA hasarının ardından Bax düzeyinin artması ve / veya azalmış Bcl-2 seviyesi, prokaspaz-9'u müteakip aktivasyonu tetikleyen sitokrom gibi pro-apoptotik faktörleri serbest bırakmak için mitokondrasyonu permeabilize edebilir ve akabinde apoptotik efektörleri takip eder (Crompton 2000). Son zamanlarda, DNA hasarına tepki olarak, mitokondriyal permeabilizasyon ve sitokrom salınmadan önce kaspaz-2'nin gerekli olduğu bulunmuştur (Guo *et al.* 2002). Kaspaz-2'nin aktivasyonu, prekürsör molekülünün işlenmesinden sonra meydana gelebilir, ancak oligomerizasyon, EXCLIN caspase-2 aktivasyonu için önemli bir adımdır (Norbury and Zhivotovsky 2004). İnsan hücrelerinde siklin-D3 ve kaspaz-2 ekspresyonu, kaspaz-2 aktivasyonunda siklin-D3 tutulumunu gösteren, tek başına kaspaz-2'nin ekspresyonuyla karşılaştırıldığında, apoptozu uyarmaktadır (Mendelsohn *et al.* 2002).

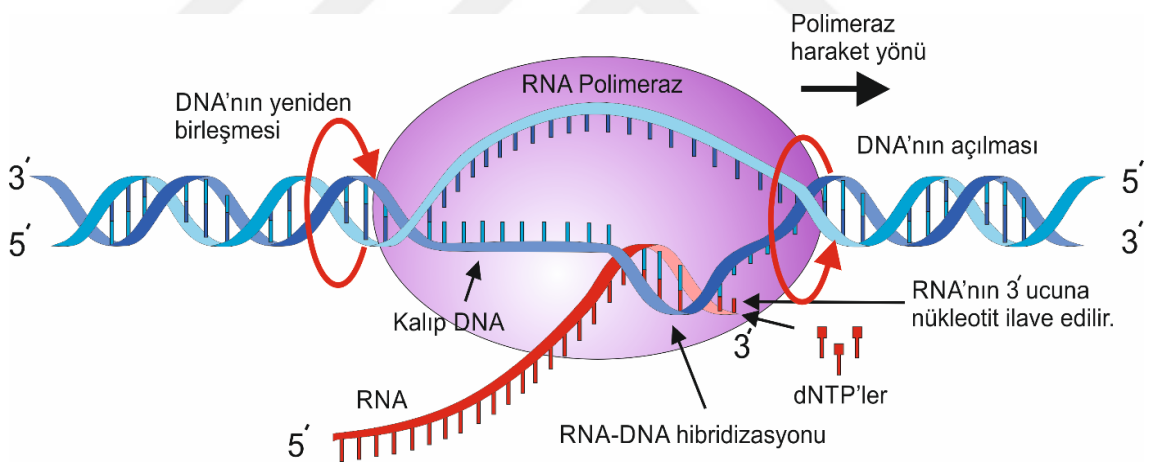
Sitokrom-c'yi serbest bıraktıktan sonra, apoptotik proteaz aktive edici faktör Apaf-1'e bağlanır ve nükleotid dATP / ATP'ye bağımlı şekilde 7-span simetrik bir aktif kompleks 'apoptozom' oluşturur (Zou *et al.* 1999). Daha sonra apoptozom, prokaspaz-9'u merkez bölgesi içine çekerek aktif bir holoenzim oluşturur; bu da, PCD'ye yol açan kaspaz-3/7 gibi downstream kaspazları harekete geçirir (Jiang and Wang 2004). Memeli hücrelerinde kaspaz aktivitesinin, apoptoz inhibitörü (IAP) familyası proteininin etkisine müdahale ederek apoptozu teşvik eden pro-apoptotik mitokondriyal protein Smac / Diablo ve Omi / HtrA2'den biri tarafından da uyarıldığı bulunmuştur (survivin gibi (Verhagen *et al.* 2000). Kaspaz aktivatör proteinlerine ilaveten, kaspaz aktivasyonu ile ilişkili olmayan AIF (apoptoz indükleyici faktör) ve Endo G (endonükleaz G) gibi bazı diğer moleküllerinde DNA parçalanması ve daha sonra kromozomal yoğunlaşma ile apoptosise neden olan mitokondriyumdan salındığı da bulunmuştur. Son kanıtlar, Bax / Bak'ın endoplazmik retikulumda (ER) lokalize olabileceğini ve ER stresine yanıt olarak aktifleştiğini ve bunun kalsiyum tükenmesine ve murin kaspaz-12 aktivasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir (Scorrano *et al.* 2003). Puma Bax / Bak'ın ER stres aktivasyonuna ek olarak, Noxa'yı ER stresıyla harekete geçiren yeni bir BH3-only protein olarak tanımlandı (Li *et al.* 2006). Ayrıca, fare embriyo fibroblastlarında

(MEF'ler), ER stresıyla Noxa ve Puma'nın indüklenmesinin büyük ölçüde p53'e bağımlı olduğu ve her iki proteininin (Puma / Noxa) ER stresinin neden olduğu apoptosise katkıda bulunduğu bulunmuştur (Franklin *et al.* 2006).

1.3. Transkripsiyonun Moleküler Biyolojisi

Transkripsiyon, DNA'nın belirli bir bölümünün RNA polimeraz enzimi tarafından RNA'ya (özellikle mRNA'ya) kopyalanacağı gen ekspresyonunun ilk adımıdır. Transkripsiyon sırasında, bir DNA sekansı, birincil transkript olarak adlandırılan tamamlayıcı, antiparalel RNA zinciri üreten bir RNA polimeraz tarafından okunur.

Transkripsiyon aşağıdaki genel adımlarda ilerlemektedir:



Şekil 1.2. Transkripsiyonun şematik gösterimi (Toraman 2017)

1. RNA polimeraz, bir veya daha fazla genel transkripsiyon faktörü ile birlikte promotör DNA'ya bağlanır.
2. RNA polimeraz, DNA helezonunun zincirlerini ayıran bir transkripsiyon balonu oluşturur. Bunu tamamlayıcı DNA nükleotidleri arasındaki hidrojen bağlarını kırarak yapar.

3. RNA polimeraz RNA nükleotidlerini (bir DNA sarmalının nükleotidlerine tamamlayıcı olan) ekler.
4. RNA şeker fosfat omurgası, bir RNA ipliği oluşturmak üzere RNA polimeraz yardımıyla oluşturulur.
5. RNA-DNA helezonunun hidrojen bağları koparılır ve yeni sentezlenen RNA ipliği serbest bırakılır.
6. Eğer hücrenin çekirdeği varsa, RNA işlenmesi gerçekleşir. Bu, poliadenilasyon, şapka takılması ve alternatif splays mekanizmalarını içerebilir.
7. RNA çekirdekte kalabilir veya nükleer gözenek kompleksi vasıtasıyla sitoplazmaya dönebilir.

Transkripsiyon, başlatma, uzama ve sonlandırma olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (Macdonald *et al.* 2004).

1.3.1. Başlatma

Transkripsiyon, RNA polimerazın bir veya daha fazla genel transkripsiyon faktörü ile birlikte "promotör" olarak belirtilen spesifik bir DNA sekansına bağlanması ile başlar. Daha sonra çift sarmallı DNA'nın yaklaşık 14 baz çiftlik kısmı açılır ve "Transkripsiyon baloncuğu" olarak adlandırılan, tek sarmallı bir DNA bölgesi oluşur. RNA polimeraz transkripsiyon balonunda bir transkripsiyon başlangıç bölgesini seçer, bir başlatıcı NTP'ye ve transkripsiyon başlangıç sitesinin dizisini tamamlayıcı uzanan bir NTP'ye (veya bir kısa RNA primeri ve uzayan bir NTP'ye) bağlanır. Ve bir başlangıç RNA ürünü vermek üzere bağ oluşumunu katalize eder. Bakterilerde, RNA polimeraz çekirdek enzimi 5 alt birimi içerir: 2 α altbirimi, 1 β altbirimi, 1 β' altbirimi ve 1 ω altbirimi. Bakterilerde RNA polimeraz çekirdek enzimi bakteri genel transkripsiyon faktörü sigma'ya bağlanarak RNA polimeraz holoenzim oluşturur ve daha sonra bir promotöre bağlanır. Arkea ve ökaryotlarda, RNA polimeraz, bakterilerdeki beş RNA polimeraz alt biriminin her birine homolog altbirimler içerir ve ayrıca alt birimler içerir. Arkea ve ökaryotlarda bakteriyel genel transkripsiyon faktörü sigma'nın fonksiyonları, birlikte çalışan birçok genel transkripsiyon faktörü tarafından gerçekleştirilir. Arkeada

üç genel transkripsiyon faktörü vardır: TBP, TFB ve TFE. Ökaryotlarda, RNA polimeraz II'ye bağlı transkripsiyonda, altı tane genel transkripsiyon faktörü vardır: TFIIA, TFIIB (arkeal TFB'nin bir ortologu), TFIID (anahtar altbirim olan TBP, arkeal TBP'nin bir ortologudur) TFIIE (arkeal TFE ortologu), TFIIF ve TFIIH. Arkeal ve ökaryotlarda, RNA polimeraz yükseltici kapalı kompleks genellikle "preinitiasyon kompleksi" olarak adlandırılır. Transkripsiyon inisiyasyonu, aktive ediciler ve baskılayıcılar olarak bilinen ek proteinler ve bazı durumlarda, transkripsiyon başlatma kompleksinin oluşumunu ve işlevini modüle eden ilişkili ortak aktifleştiriciler ya da çekirdek baskılayıcılar tarafından düzenlenir (Macdonald *et al.* 2004).

1.3.2. Promotörün tanınması

İlk bağ oluşturulduktan sonra, RNA polimeraz promotörden kaçmalıdır. Bu süre zarfında RNA transkriptini serbest bırakma ve kesilmiş transkriptler üretme eğilimi vardır. Buna kusurlu başlatma denir ve hem ökaryotlar hem de prokaryotlar için ortaktır (Hanahan and Weinberg 2000). Yaklaşık 10 nükleotidlik bir eşik uzunluğunda bir RNA ürünü sentezlenene kadar kısmen başlatma meydana gelir ve bu noktada promotör kaçıışı oluşur ve bir kopyalama uzatma kompleksi oluşur. Mekanik olarak, promotör kaçıışı, RNA polimeraz holoenzim ve promotör arasındaki etkileşimleri kırmak için gereken enerjiyi sağlayan DNA taramasında oluşur (Sager 1997). Bakterilerde, promotör temizlenmesinde ve sonrasında, σ faktörü stokastik modele göre serbest bırakılır (Koh *et al.* 2003). Ökaryotlarda, RNA polimeraz II'ye bağımlı bir promotörde, promotör temizlemesi üzerine, TFIIH, serin 5'i RNA polimeraz II'nin karboksi terminal alanında fosforillendirir ve kapak enziminin (CE) toplanmasına yol açar (Colditz *et al.* 2003; Raaschou-Nielsen and Weinberg 2013). Ökaryotlarda CE'nin promoter klirensini nasıl indüklediğinin tam mekanizması henüz bilinmemektedir.

1.3.3. Uzama

DNA'nın bir şeridi, şablon iplikçik (veya kodlamayan iplikçik), RNA sentezi için bir kalıp olarak kullanılır. Transkripsiyon ilerledikçe, RNA polimeraz şablon zincirini

Çaprazlar ve bir RNA kopyası oluşturmak için DNA şablonu ile baz eşleştirme tamamlayıcısı kullanır. RNA polimeraz şablon telini 3' → 5' arasında ge emesine rağmen kodlama (şablon olmayan) iplikçik ve yeni oluşturulan RNA da referans noktaları olarak kullanılabilir, bu nedenle transkripsiyon 5' → 3' olarak tanımlanabilir. Bu kodlama ipliğinin tam bir kopyası olan 5' → 3'den bir RNA molekülü üretilir.

1.3.4. Sonlandırma

Bakteriler, transkripsiyon sonlandırma için Rho'dan bağımsız terminasyon ve Rho'ya bağlı sonlandırma için iki farklı stratejiyi kullanırlar. Rho'dan bağımsız transkripsiyon terminasyonunda, yeni sentezlenen RNA molekülü bir G-C bakımından zengin sa  tokası döngüsü oluşturduğunda RNA aktarımı durur ve ardından bir koşu akışı başlar. Sa  tokası oluştuğunda, mekanik stres zayıf rU-dA bağlarını parçalayıp DNA-RNA hibritini doldurur. Bu, transkripsiyonu sona erdiren poli-U transkriptini RNA polimerazın aktif bölgesinden  eker. "Rho'ya bağlı" sonlandırma tipinde, "Rho" adı verilen bir protein faktörü şablon ve mRNA arasındaki etkileşimi bozarak yeni sentezlenen mRNA'yı uzatma kompleksinden serbest bırakır (Marusykand Polyak 2010).

Ökaryotlarda transkripsiyonun sonlanması bakterilerdekinden daha az anlaşılır, ancak yeni transkriptin bölünmesini ve ardından poliadenilasyon adı verilen bir süreçte adenin 3' ucuna şablondan bağımsız olarak katılmasını gerektirir (Fışkın 2002).

1.3.5. Transkripsiyonel koaktivatörler ve korepress rler

Koaktivat rler ve korepress rler; direk olarak DNA ya bağlanmaksızın transkripsiyonel aktiviteyi arttıran yada azaltan proteinlerdir. Bunlar direk olarak transkripsiyon faktörlerine bağlanır veya enzimatik aktivitesi olan diğer proteinlerin aktivitesini arttıırırlar ya da kromatin yapısını değiştirici enzimatik aktivite gösterirler. Koaktivat rler ve korepress rleri incelemek transkripsiyon faktörlerini ile karşılaştırıldığında daha

zordur. Genel olarak protein - protein etkileşim deneyleri yapmak protein - DNA etkileşim deneylerini yapmaktan daha zordur.

Genelde koaktivatörler iki ana sınıfa ayrılır:

- 1) **Kromatini modifiye edici kompleksler:** Post translasyonel olarak histonları modifiye eden multiprotein kompleksleri sayesinde; diğer proteinlerin DNA ya ulaşılabilirliği büyük oranda artırılır.
- 2) **Kromatini yeniden şekillendiren kompleksler:** SWI/SNF ailesinin multi protein kompleksleri ve ATP bağımlı DNA 'yı açma aktivitesi olan proteinlerdir.

1.3.6. Kromatini yeniden modelleyen faktörler

Son zamanlarda ATP bağımlı kromatin şekillendiren komplekslerin keşfi, kromatin alanındaki heyecan verici bir gelişmedir. Bu yeni sınıf moleküler motorlar ; ATP nin hidrolizinden üretilen enerjiyi histon ve DNA arasındaki etkileşimi değiştirmek için kullanılır. Ve bu sayede transkripsiyon faktörlerinin DNA daki düzenleyici elementlere bağlanmasını sağlarlar. Kromatin yeniden modelleyici kompleksler, kromatin yapısında en azından 4 farklı değişikliğin olmasına neden olurlar. Bunlar:

- 1- Nukleozom kayması: nukleozomun DNA üzerindeki pozisyonu değişmesidir.
- 2- Yeniden modellenmiş nukleozom: DNA daha ulaşılabilir olur fakat histonlar bağlı kalmaya devam eder.
- 3- Nukleozom ayrılması: DNA ve histonların tamamen ayrılmasıdır.
- 4-Nukleozomun değiştirilmesi kor histonun diğer bir çeşit histonla değişmesidir.

Karakterizasyonu yapılmış çok sayıda ve farklı ATP bağımlı yeniden şekillendirici kompleks ailesi mevcuttur. SWI/ SNF, ISWI ve SWR1 kompleks aileleri de bunlardandır. Her bir ailenin kendine has bir alt ünite kompozisyonu ve ayrı bir ATPazı vardır. Yeniden modellenmenin mekanizması, aile üyelerinden birinden diğerine farklıdır.

1.3.7. SWI / SNF'nin Çalışma mekanizması: Nükleozom kayması ve parçalarına ayrılması

Kromatini yeniden modelleyen bir kompleks olan SWI / SNF; ilk olarak tomurcuklanan bir mayadan elde edilmiştir. SWI / SNF nin insanlardaki homoloğu BAF kromatini yeniden modelleyici faktör olarak tanımlanmıştır. SWI/ SNF ve ilişkili kromatin remodelling kompleksleri; nükleozom kaymasına ve nükleozom yapısında önemli düzensizliklere neden olurlar. Yeniden modelleyici kompleksin; histon oktomerinin etrafındaki, DNA'nın şeklini değiştirmesinin ardından transkripsiyon faktörleri ve genel transkripsiyon araçları DNA ya kolay ulaşabilirler. SWI/ SNF ve histon asetil transferaz kromatinin yapısının yeniden şekillenmesinde ortaklaşa çalışırlar.

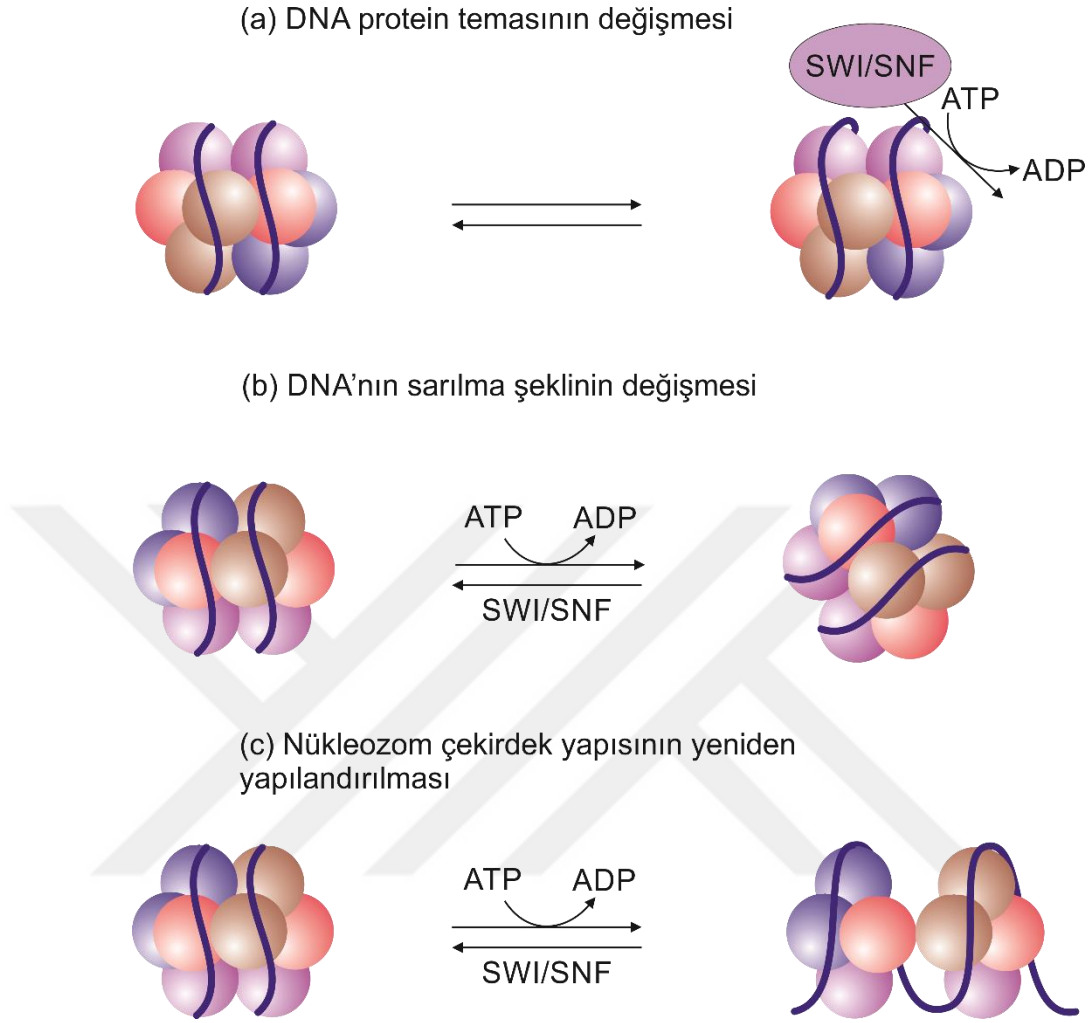
1.3.8. Kromatini yeniden modelleyen ISWI kompleksleri Histon oktomerini DNA üzerinde kaydırır

SWI/ SNF aksine ISWI ailesinin üyeleri histon oktomerinin yapılarında herhangi bir düzensizlik yapmaksızın DNA üzerinde kaydırarak nükleozomları başka bir yere yerleştirir. Bu işlemde nükleozomların yapısında bir bozulma meydana gelmez.

1.3.9. SWRI kromatini yeniden modelleyen kompleksi

Histonu bir bir histon varyantı ile yer değiştirir. SWRI kompleksi ATPaz alt ünitesi olan Swr1 den bu adı almıştır.

SWR1 Kompleksi: H2A.Z-H2B dimerlerini nükleozomdaki H2A-H2'nin yerine yerleştirebildiği; ancak kompleksin bu varyant dimerini çıplak DNA'nın yapısına sokamadığı görüldü. Histon varyantı olan H2A.Z; telomerin yakınlarda bulunan, transkripsiyonal olarak aktif olan bazı genlerin gücünü arttıırırlar (swi snf kompleks).



Şekil 1.3. SWI/SNF kompleksinin çalışma mekanizması

1.4. Promotör

Promotör belirli bir genin transkripsiyonunu başlatan bir DNA bölgesidir. Destekleyiciler genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinin yanında, aynı iplikçikte ve DNA'nın üstünde (sensör ipliğinin 5' bölgesine doğru) bulunurlar. Destekleyenler yaklaşık 100-1000 baz çifti uzunluğunda olabilir (Louzada *et al.* 2012). Transkripsiyonun gerçekleşmesi için, RNA polimeraz olarak bilinen RNA sentezleyen enzim, bir genin yakınındaki DNA'ya bağlanmalıdır. Destekleyiciler, RNA polimeraz için ve RNA polimerazı aktive eden transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan proteinler için güvenli bir başlangıç bağlanma yeri sağlayan tepki unsurları gibi spesifik

DNA dizileri içerir. Bu transkripsiyon faktörleri, spesifik promotörlere bağlanan ve gen ekspresyonunu düzenleyen ilgili nükleotidlerin spesifik aktivatör veya repressor sekanslarına sahiptir. Bakterilerde promotör, RNA polimeraz ve ilişkili bir sigma faktörü tarafından tanınır ve bu da yakınlarda kendi DNA bağlama bölgesine bağlanan bir aktivatör proteinin çoğu tarafından promotör DNA'ya getirilir. Ökaryotlarda işlem daha karmaşıktır ve bir RNA polimeraz II'nin promotöre bağlanması için en azından yedi farklı faktör gereklidir. Promotör, belirli bir genin transkripsiyon düzeyini yönlendirmek için diğer düzenleyici bölgelerle (arttırıcılar, susturucular, sınır elemanları / izolatörler) birlikte çalışabilen kritik unsurları temsil eder. Bir promotör, bir hücredeki düzenleyici proteinlerin bolluğu veya konformasyonundaki değişime tepki olarak indüklenir ve bu da transkripsiyon faktörlerinin RNA polimerazın aktive olmasını sağlar (Abraham and Rotella 2003; Vargo-Gogola and Rosen 2007).

1.4.1. Bakterilerde promotör yapısı

Bakterilerde, promotör, yaklaşık olarak 10 (Pribnow Box) olmak üzere iki kısa dizi elementi ve transkripsiyon başlangıç alanından yukarı akışta 35 nükleotid içerir. -10'daki dizilim (-10 elemanı), TATAAT uzlaşma dizisine sahiptir. -35 (-35 elementi) dizisi, TTGACA dizisine sahiptir. Ortalama olarak, her bir konsensüs sekansındaki 6 baz çiftinden yalnızca 3-4 tanesi herhangi bir promotörde korunmuş olarak bulunur.

1.4.2. Ökaryotlarda promotörün yapısı

Ökaryotik teşvikçiler çeşitlidir ve karakterize etmek zor olabilir, ancak son çalışmalar 10'dan fazla sınıfa ayrıldığını göstermektedir (Raaschou-Nielsen *et al.* 2013). Gen promotörleri tipik olarak genin üst kısmında bulunur ve transkripsiyonel başlangıç alanından birkaç kilobaz uzakta düzenleyici elemanlara sahip olabilirler (arttırıcılar). Ökaryotlarda, transkripsiyonel kompleks, DNA'nın kendi üzerine gerilmesine neden olabilir; bu da, transkripsiyonun gerçek sitesinden uzakta düzenleme dizilerinin yerleştirilmesini sağlar. Ökaryotik RNA polimeraz-II'ye bağlı promotörler, genel transkripsiyon faktörü TATA-bağlama proteini (TBP) tarafından tanınan bir TATA

elemanı (konsensüs sekansı TATAAA) içerebilirler; Ve genel transkripsiyon faktörü TFIIB tarafından tanınan bir B tanıma elemanı (BRE) bulundurlar (Hanahan and Weinberg 2000; Colditz *et al.* 2003). TATA elemanı ve BRE tipik olarak transkripsiyonel başlangıç alanının yakınında (tipik olarak 30 ila 40 baz çiftinde bulunur) bulunur. Ökaryotik hızlandırıcı düzenleyici sekanslar, tipik olarak, transkripsiyonel kompleksin oluşumunda rol oynayan transkripsiyon faktörleri adı verilen proteinleri bağlar. Bir örnek, temel helezon-döngüsel heliks (bHLH) ailesindeki transkripsiyon faktörlerini (örn., BMAL1-Clock, cMyc) bağlayan E-kutusu (sekans CACGTG)'dir (Marusyk and Polyak 2010) Birden fazla transkripsiyon faktörü tarafından hedeflenen bazı promotörler artmış transkripsiyonel aktiviteye yol açan hiperaktif bir duruma ulaşabilirler (Fışkın 2002).

1.4.3. Promotörlerdeki CpG adaları

1.4.3.a. İnaktif genlerde CpG adalarının metilasyonu

İnsanlarda, DNA metilasyonu CpG bölgeleri içindeki sitozin kalıntılarının pirimidin halkasının 5 'konumunda oluşur ve 5-metilsitozinler oluşturur. Promotörlerin CpG adalarında birden fazla metillenmiş CpG mevkisinin bulunması, genlerin stabil sessizleşmesine neden olur. Bir genin susturulması, diğer mekanizmalarla başlatılabilir, ancak bunun ardından, genin istikrarlı susturulmasına neden olması için CpG adasındaki promotörde metilasyon yapılır (Schneider *et al.* 1995).

1.4.3.b. Kanserde CpG adalarının hiper-hipo metilasyonu

Genellikle, kanserin ilerlemesinde yüzlerce gen susturulur veya etkinleştirilir. Kanserdeki bazı genlerin susturulması mutasyona bağlı olmasına rağmen, kanserojen gen susturuculuğunun büyük bir kısmı değişmiş DNA metilasyonunun bir sonucudur. Kanserde sessizleştirmeye neden olan DNA metilasyonu, tipik olarak, protein kodlayan genlerin hızlandırıcılarında bulunan CpG adalarında bulunan çoklu CpG bölgelerinde meydana gelir.

Mikro RNA'ların değişen ifadeleri aynı zamanda kansere ilerlemede birçok geni susturur veya etkinleştirir. Değiştirilmiş mikroRNA ekspresyonu, mikroRNA'ların transkripsiyonunu kontrol eden promotörlerdeki CpG adalarında CpG bölgelerinin hiper / hipo-metilasyonu ile gerçekleşir. CpG adalarının kendi hızlandırıcılarında metilasyon yoluyla DNA onarım genlerinin susturulması, kansere ilerlemede özellikle önemlidir.

1.5. Mutagenез

Mutagenез, bir organizmanın genetik bilgilerinin değiştirilerek mutasyona neden olan bir süreçtir. Doğada kendiliğinden veya mutajenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Deneysel olarak laboratuvar prosedürleri kullanılarak da elde edilebilir. Doğada mutagenез kansere ve çeşitli kalıtsal hastalıklara yol açabilir. Bir bilim olarak mutagenез, 20. yüzyılın ilk yarısında Hermann Muller, Charlotte Auerbach ve J. M. Robson tarafından yapılan çalışmaya dayanılarak geliştirildi (Louzada *et al.* 2012). DNA, doğal veya yapay olarak, bir takım fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlarla değiştirilebilir, bu da mutasyona neden olur.

1.6. Kanser ve Hücre Hattı

Kanser, moleküler heterojen bir hastalıktır (Louzada *et al.* 2012) ve dünya çapındaki ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Farklı histopatolojileri, genetik ve epigenetik varyasyonları ve klinik sonuçları olan çeşitli tümör türleri varlığı Bu hastalığın anlaşılması zor, kemoterapötiklerin etki mekanizmaları ve yeni terapilerin oluşturulması. Kanser patobiyojisi çalışmasındaki ilerlemeler, bu hastalığın çeşitli biçimlerini gözden geçiren, genetik ve epigenetik değişiklikleri ve antikanser ilaç testlerinin bilgisine izin veren farklı deneysel model sistemlerinin mevcudiyeti üzerine kurulmuştur (Vargo-Gogola and Rosen 2007).

Kanser hücre dizileri, araştırma amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır ve genetik yaklaşımda yararlı bir araç olduğu kanıtlanmıştır ve karakterizasyonu, aslında, kansere karışan biyolojik mekanizmaların incelenmesi için mükemmel bir model olduğunu

göstermektedir. Kanser hücre dizilerinin kullanımı bu hastalığın düzenlenmemiş genleri ve sinyal yolları hakkındaki bilginin artmasına izin vermiştir (Vargo-Gogola and Rosen 2007; Raaschou-Nielsen *et al.* 2013). Ayrıca, hücre modelinin kullanımı, antikanser ilaçların geliştirilmesi ve test edilmesinin kaynağındaydı (Raaschou-Nielsen *et al.* 2013) ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde (Louzada *et al.* 2012; Marusyk and polyak 2010), aynı zamanda kemoterapötik testlerde transplant edilebilir hayvan tümörlerine alternatif olarak (Fışkın 2002) kullanılmaktadır. Aslında kanser araştırmalarında uygun in vitro modeli kullanmak, genetik, epigenetik ve hücresel yolların araştırılması, çoğalma deregülasyonu, apoptoz ve kanser progresyonu çalışması, potansiyel moleküler belirteçlerin tanımlanması ve tarama ve karakterizasyon için önemlidir. Kanser hücre dizilerinde yapılan araştırmaların sonuçları genelde in vivo insan tümörleri için ekstrapole edilmiştir (Abraham and Rottela 2003) ve ilaç testi ve translasyonel çalışma için model olarak önemi birçok biyomedikal ve ilaç şirketi tarafından kabul edilmiştir (Raaschou-Nielsen *et al.* 2013).

1.7. MCF-7 Hücre Hattının Kökeni

MCF-7, 69 yaşında bir Kafkas kadınının göğüs dokusundan 1970 yılında ilk izole edilen bir hücre dizisidir. Alınan iki mastektomiden birincisi, alınan dokunun iyi huylu olduğunu ortaya koydu. Beş yıl sonra yapılan ikinci ameliyatta plevral efüzyonda habis bir adenokarsinoma görüldü ve doku alındı ve sonuçta MCF-7 hücre dizisi ortaya çıkacaktı. Verici meme kanseri tedavisinde radyoterapi ve hormon tedavisi uygulandı. Göğüs adenokarsinomasından türetilmiş, geniş çapta incelenen bir epitel kanseri hücre hattı olan MCF-7, farklı meme epitelinin özelliklerine sahiptir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri vasıtasıyla, bu hücreler östradiolü işleme yeteneğine sahiptir. MCF-7 hücreleri, meme epiteline özgü birçok ideal özelliği barındıran hücre hattının bir sonucu olarak in vitro meme kanseri çalışmalarında yararlıdır. Bunlara MCF-7 hücreleri östrojeni östradiol formunda östrojen reseptörleri yoluyla hücre sitoplazmasında işleyebilir. Bu MCF-7 hücre hattının bir östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre hattı olmasına neden olur. MCF-7 aynı zamanda progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir. Desmin, endotelin, GAP ve vimentin için kabul edilmezler. İn vitro

yetişirken, hücre hattı kubbeler oluşturabilir ve epitel benzeri hücreler tek katmanlı tabakalarda büyür. Büyüme, tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) kullanılarak engellenebilir ve MCF-7 kanser hücrelerinin anti-östrojenlerle tedavisi, eninde sonunda hücre büyümesinde bir azalmanın etkisine sahip olan insülin benzeri büyüme faktörü proteinlerini modüle edebilir. Bilim adamları, MCF-7 hücrelerinin yayılımı kolay olmasına rağmen genellikle yavaş büyüyen bir popülasyon olduğunu keşfettiler. MCF-7 katlanma süresi genellikle 30-40 saattir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser genel bir terim olarak vücutta herhangi bir organ veya dokuyu etkileyebilen bir grup hastalığı ifade eder. Kanser belirli bir doku veya organdaki hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir biçimde üreyerek bir kitle veya tümör oluşturmalarıdır. Bu çoğalma sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere göre yapısal farklılıklar ortaya çıktığı gibi, işlevleri açısından da farklılıklar meydana gelmektedir. Bazen hücre normalde yaptığı işlevlerini yapamazken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri yapmaya başlayabilmektedir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki doku ve organları hatta daha uzaktaki organları işgal etmekte ve işgal ettiği bu bölümlerin görevlerini engellemektedir.

Hücre kontrolünün bozulup kanser tablosunun ortaya çıkması kanser türüne göre farklılık gösterir. Kanser, büyük bölümü edinsel olarak kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan DNA mutasyonları sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. DNA’da ister kendiliğinden ister çevresel faktörlere bağlı oluşan bu mutasyonlar sonucu hücrelerin büyüme, bölünme ve yaşlanma gibi faaliyetlerini düzenleyen genlerde değişiklikler oluşur. Oluşan bu değişiklikler bölünme ile yavru hücrelere aktarılır (Hanahan and Weinberg 2000).

Canlı yaşamının devamlılığı için hücrelerin sürekli kendini yenilemesi gerekir. Ölen hücreler vücuttan atılırken yerlerine yenileri gelir. Bu denge belli genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmalarını sağlarken, bazıları da aşırı hücre çoğalmalarını önlerler (Kumar *et al.* 1992). Bunlar; proto-onkogenler ve anti-onkogenler (tümör supresör genler)’dir. Bu genlerin ekspresyonunun bozulması hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına sebep olur (Sutherland 1999).

Apoptozis, morfogenez, doku homeostasisi, yaşlanma ve istenmeyen zararlı hücrelerin çıkarılmasını içeren çeşitli biyolojik olaylarda rol oynayan ve spesifik reseptör molekülleri-CD95, tümör nekroz faktör, büyüme faktörleri, ultraviyole ışınlar,

irradiasyon, ısı şoku, sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres ve bakteriler gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik indükleyiciler ile indüklenebilen programlı hücre ölümüdür (Janssen *et al.* 2003; Lancellotti *et al.* 2009). Ayrıca, sinyal apoptotik mekanizmasında çalışan bir endonükleaz olan ‘kaspaz’ diye adlandırılan sistein proteinlerinin sıralı proteolitik aktivasyonunu içeren bir metabolik yol olarak da tanımlanır. Çekirdek yoğunlaşması, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması, karışık membran segmentlerinin oluşumu, hücresel büzüşme ve mitokondrinin bütünlüğünü kaybetmesi tipik apoptozis değişimleridir (Saikumar *et al.* 1999; Gulbins *et al.* 2000).

Kanser biyolojisinde programlı hücre ölümü önemli bir süreçtir. Çünkü fazla ve arzu edilmeyen hücreler bu mekanizma ile çıkarılır. Bu programlı ölüm yollarının ilki ilk kez 1990’larda *Caenorhabditis elegans*’da bulunan apoptozistir (Kerr *et al.* 1972). Ancak çok sayıda non-apoptotik hücre ölüm yolağı da tanımlanmıştır. Bunlar; otofaji, nekroz, senesens ve mitotik yıkımdır. Apoptozis inhibe olduğunda hücreler ölümü mümkün kılmak için otofaji gibi non-apoptotik yollara çevrilebilir.

Otofajik yolak çevreye bağlı olarak hücre yaşamını ya da programlı hücre ölümünü teşvik edebilir. Nekrozun morfolojik özellikleri mitokondriyal işleyiş bozukluğu, organel büyümesi, plazma membran permeabilizasyonu ve oksidatif stresi içerir (Wei *et al.* 2001). Nekrozda, apoptozisin aksine çekirdek fragmentasyonu olmaz. Çok sayıda ajan ve yolak, belli hücreler arası araçlar, DNA hasarı, ATP tüketimi, kalsiyum iyon konsantrasyonları, reaktif oksijen türleri (ROS), belli protein kinazlar, Poly (ADP-Riboz) polimeraz (PARP), mitokondriyon, Bcl-2 proteinleri, ısı-şok proteinleri, proteazlar, nükleazlar ve fosfolipazları içeren nekrozla bağlantılıdır (Proskuryakov *et al.* 2003).

Pro-apoptotik proteinleri gereğinden fazla salma yeteneğinde olan mitokondri, tüm programlı hücre ölüm tiplerindeki geniş regülasyonun gerekli bir bölümüdür. Bcl-2 familyası, özellikle dış mitokondriyal membranın permeabilitesini değiştirerek mitokondriden apoptotik proteinlerin salınmasını düzenleyen önemli bir protein grubudur. Bu yolla Bcl-2 protein ailesi kaspazlar ile ilişkili apoptotik sinyalin upstream

aktivatörlerinden meydana gelirler. Bcl 2 benzeri protein ailesi iki gruba ayrılabilir: Anti-apoptotik Bcl 2 grubu ve pro-apoptotik BH-3-only proteinleri.

Pro-apoptotik BH-3-only proteinleri mitokondriyal dış membrana yerleşen gerekli apoptoz inhibitörleri olan Bax ve Bak'ı aktive eder. Anti-apoptotik grup Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 gibi proteinleri içerir ve BH3-only proteinlerini engelleyerek çoğunlukla apoptozisi inhibe ederler.

Böylece Bak/Bax proteinlerinin aktivasyonunu engellerler. Son yıllardaki çalışmalar, özellikle Bcl-2 olmak üzere bu proteinlerin sadece apoptozis değil, aynı zamanda otofaji ve programlı nekrozisin de aracısı olduğunu göstermiştir.

Bcl-2 ailesi iki pro-apoptotik grup içerir. Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-xs ve Bcl-Gl 2 ya da 3 Bh bölgesine sahiptir ve onların pro-survival ilişkilerle geniş yapısal benzerlikler paylaşır (Suzuki *et al.* 2000). Bunların aksine memeli Bik/Blk/Nbk, Bad, Hrk/DP5, Bid, Bim/Bod, Noxa, Puma/Bb3 ve Bmf birbirleri ve diğer Bcl-2 ailesi üyeleri ile kısa BH3 domainlerini paylaşır ve böylece onlar BH-3-only proteinleri diye adlandırılırlar (Huang *et al.* 2000).

Bax; Bcl-2 associated x protein anlamında kullanılmaktadır. Proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 ile yapısı %43 aynıdır ve Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilir. Bax predominant olduğunda apoptosis artmaktadır (Tunç *et al.* 2004). Bax fonksiyon kaybının bazı lösemi ve kolon kanserlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Servikte Bax sentezini inceleyen az çalışma olmasına karşın bu çalışmaların çoğunda normal ve neoplastik dokuda Bax sentezinin farklı olmadığı gösterilmiştir (Mozeti *et al.* 2000). Literatürde Bax proteininin serviks kanserinde prognoza etkisine baktığımızda hemen hemen bütün çalışmalarda Bax pozitifliğinin iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca Bax eksikliğinde serviks kanseri gelişiminin arttığı görülmüştür (Maijernik *et al.* 1998).

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin her biri programlı hücre ölümü ve stres-indükleyici apoptozis için gereklidir ve Bax/Bak benzeri proteinler downstream fonksiyon görürken (Lindsten *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2001) BH3 only proteinleri hücre ölüm sinyalini başlatıcı fonksiyon görür (Huang *et al.* 2000).

Bcl-2 protein ailesi üyeleri, apoptozun mitokondriyal yolağının esaslı kontrolörleri olarak bilinmektedir. Bax, apoptoz kontrolü için çok önemli roller oynadığı bilinen Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik bir üyesidir. Bax, göğüs ve kolorektal karsinom gibi bazı katı tümörlerde potansiyel tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Promotöre bağlı CpG adalarının DNA metilasyonu, tümör hücrelerinde gen inaktivasyonu için ortak bir mekanizma olarak bilinir. Alipour vd 2013 yaptıkları bir çalışmada Metilasyon Spesifik PCR (MSP) yöntemini kullanarak kolorektal ve göğüs kanseri hücre hatlarında BAX gen promotöründeki CpG adalarının metilasyon profilini bulmaya çalışmışlardır. T47D, MCF7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 gibi meme karsinoma türevli hücre hatları ve kolorektal kanser hücre hatları olan H29 ve Caco II hücre hatlarının hiçbirinde BAX geninin promotör bölgesinde CpG adalarında hipermetilasyon gözlenmemiştir. Sonuçta CpG adası metilasyonunun meme ve kolon kanserlerinde BAX geninin down regülasyonunda bir öneme sahip olmadığı görülmüştür (Alipour *et al.* 2013).

Igata *et al.* 1999 yaptıkları bir çalışmada BAX geninin transkripsiyonel düzenlenmesinin mekanizmasını araştırmak için, fare BAX geninin 5' flanking bölgesinin genomik DNA'sını izole edip dizi analizi yapmışlardır ve promotör bölgesini bir lusiferaz vektörüne sub- klonlama yapmışlardır. Fare Bax promotörü, TATA kutusu içermez ve sekansı insan BAX promotörü ile kısmen homologtur. Tek yönlü olarak silinen promotör ve Sp1 bölgelerinin mutantları NIH3T3 hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarılmıştır. Bu çalışma iki Sp1 bölgesinin bazal aktiviteden kısmen sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Fare Bax promotörü, eksojen p53'e cevap vermedi; bu da, yapılan çalışmada kullanılan bölgede p53'e duyarlı elemanın mevcut olmayabileceğini gösterdi (Igata *et al.* 1999).

BCL-2 proteini, nöronal ve diğer hücre tiplerini apoptotik programlanmış hücre ölümünden koruyabilir ve sinir sisteminin gelişimi sırasında apoptoz oranını düzenlemede önemli bir rol oynar. Smith *et al.* 1998 yaptıkları bir çalışmada, Brn-3a POU transkripsiyon faktörünün duyuşal nöronlarını, sinir büyüme faktörünün geri çekilmesiyle indüklenen apoptotik programlanmış hücre ölümünden koruduğunu göstermişlerdir. Hem ND7 nöronal hücre çizgisi hem de primer dorsal kök ganglion nöronlarında, diğer hücre tiplerinde Bcl-2 P1 promotörü baskın bir şekilde aktivite gösterirken Bcl-2 transkripsiyonu çoğunlukla Bcl-2 P2 promotörü ile başlatılmaktadır. P2 bölgesinden başlatılan Bcl-2 transkripsiyonu, Brn-3a'yı stabil şekilde aşırı ifade eden ND7 hücrelerinde artar ve BCL-2 protein seviyelerinde artışa neden olur. Benzer şekilde, Bcl-2 P2 promotörü hem ND7 hücrelerinde hem de dorsal kök ganglion nöronlarında ortak transfeksiyon deneylerinde Brn-3a ile doğrudan aktive edilir. Bu veriler, Brn-3a'yı, nöronal hücrelerde Bcl-2 aktivitesini düzenleyen ilk transkripsiyon faktörü olarak tanımlar (Smith *et al.* 1998).

Jiang *et al.* 2014 yaptıkları bir çalışmada bir C₂H₂ tipi çinko parmak transkripsiyon faktörü olan ZNF667 / Mipul'in, oksidatif stresde önemli bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, hedef genlerin hiçbirisi veya kardiyomiyositlerde ZNF667'nin potansiyel rollerinin hiçbirisi aydınlatılamamıştır. Burada, ZNF667'nin H9c2 hücre dizilerindeki fonksiyonel rolü, hücrelerin apoptozdan korunduğu moleküler mekanizmasına odaklanarak incelendi. ZNF667 transkripsiyon faktörünün, sıçan proapoptotik geni olan Bax geninin ekspresyonunu ve promotör aktivitesini inhibe ettiği ve aynı zamanda H₂O₂ ve Dox tarafından indüklenen H9c2 hücrelerinin apoptozunu engellediği bulunmuştur. Yapılan bu çalışma, sitoproteksiyonu sağlayan ZNF667'nin sıçan Bax geninin yeni bir regülatörü olduğunu ve H₂O₂ muamelesine yanıt olarak H9c2 kardiyomiyositlerde Bax mRNA ve protein ifadesinin inhibisyonuna aracılık ettiğini göstermektedir (Jiang *et al.* 2014).

P53, tümör hücrelerinin kemosenesitivitesinin bir belirleyicisi olabilir; bununla birlikte, sisplatin'e karşı hücrel dirençteki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Doğal tip veya mutant p53 ekspresyon plazmidleri ile birlikte transfeksiyon denemeleri ve

kloramfenikol asetiltransferazın transkripsiyonunu teşvik etmek için Bax gen promotörünü kullanan bir raportör gen plazmidi, bu hücrelerde Bax ekspresyonunun düzenlenmesinde p53'ün rol oynadığı tespit edilmiştir (Perego *et al.* 1996).

Yapılan çalışmalar insan kanserlerinde apoptozun deregülasyonu ve apoptoz ile ilgili genlerin somatik mutasyonlarının kanser gelişim mekanizmalarına katıldığını göstermektedir. Bcl-2 ailesinin bir proapoptotik üyesi olan Bcl-XL / Bcl-2'ye bağlı ölüm promotörü (Bad), intrinsik apoptoz yolağında önemli bir rol oynamaktadır. Bad'in genetik değişikliklerinin insan kanserlerinin gelişiminde etkisini araştırmak için, 47 kolon adenokarsinomasında insan Bad geninin tüm kodlama bölgesi analiz edilmiştir. Genel olarak, Bad geninde iki somatik missense mutasyonu (%4.3) tespit edildi. İlginç bir şekilde, Bad'ın mutasyonların her ikisi de, Bad'ın, hücre ölümünü indüklemeye önemli bir role sahip olan Bcl-2 homoloji3 alanını kodlayan gen sekanslarında tespit edildi. Transfeksiyon çalışması, tümör kaynaklı Bad mutantların her ikisinin de vahşi tip Bad ile karşılaştırıldığında apoptoz aktivitelerini azalttığını göstermiştir; bu da Bad mutasyonların Bad'in hücre ölüm fonksiyonunu azalttığını göstermektedir (Lee *et al.* 2004).

Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik protein Bcl-2 gibi, memeli hücrelerinde apoptozun korunan düzenleyicileri olan bir protein paneli içerir. Apoptoza duyarlılığın değiştirilmesindeki belirgin rolüne göre Bcl-2 ekspresyon modülasyon mekanizmasının şifresinin çözülmesi, kanser için terapötik stratejilerin belirlenmesi için çok önemli olabilir. M2-A ve R16 da dahil olmak üzere naftalimid bazlı DNA interkalatörleri ile tedavi genelde Bcl-2 hücre içi miktarlarda bir azalmaya yol açar. p53'ün, yeni bir naftalimid esaslı DNA interkalasyon ajanı olan B1 tarafından indüklenen Bcl-2'nin down regülasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmektedir.

Aslında, B1 kaynaklı apoptoz sırasında gözlemlenen Bcl-2 protein seviyelerindeki azalma, Bcl-2 transkripsiyonunun ve promotör aktivitesinin inhibisyonunun bir sonucu olarak mRNA seviyelerindeki azalma ile korelasyon göstermiştir. Bu bağlamda, Bcl-2 transkripsiyonel down regülasyonunda p53'ün rolü araştırılmıştır. Kromatin

immünopresipitasyonu ile MCF7 hücrelerindeki P2 promoter TATA kutusu için p53 bağlanmasında belirgin bir artış bulunmuştur. Bu veriler, MCF-7 hücrelerinde B1'in neden olduğu kaspazdan bağımsız apoptozun, p53'ün aktivasyonu ve Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Bu çalışmada naftalimid esaslı DNA interkalatör tedavisi üzerine transkripsiyonel düzeyde p53 ve Bcl-2 arasındaki bağlantıları güçlendirmektedir (Liang *et al.* 2011).

Literatürlerde BCL-2 ailesi üyelerinin transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatmak amacıyla çeşitli bakış açılarıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Rastgele seçilen bazı transkripsiyon faktörlerinin genlerin ekspresyonu nasıl etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır. BAX geni promotör bölgesindeki CpG adalarının metilasyon profili tespit edilmiş ve sonuçta CpG adası metilasyonunun meme ve kolon kanserlerinde BAX geninin down regülasyonunda bir öneme sahip olmadığı görülmüştür. Fare BAX geni promotör bölgesinde p53 proteinin gen ekspresyonundaki rolü araştırılmıştır. Bcl-2 geninin regülasyonunda bir çinko parmak proteininin rolü araştırılmıştır. Yukarıda literatürlerde de belirtildiği gibi birkaç çalışmada belli kimyasalların gen ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Fakat literatürlerde insan BAX gen promotörünün fonksiyonel analizi ile alakalı detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Biz bu çalışmamızda insan promotör bölgesini parçalara ayırdık. Bu bölge üzerindeki transkripsiyon faktörlerini ve bağlanma dizilerini tespit ettik. Yaptığımız bu çalışmayla ayırdığımız bu parçaları bir lusiferaz vektörüne klonlayıp hücre kültürüne aktararak lusiferaz aktivite ölçümü yaptık ve hangi promotör parçasının genin aktivasyonu için en fazla öneme sahip olduğunu tespit ederek bu bölge üzerinde mevcut olan transkripsiyon faktörlerini belirledik.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Klonlamada kullanılan vektör sistemleri ve enzimler ise Promega, Sigma, Thermo Scientific firmalarından temin edildi.

Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Üretici
Proteinaz K	Sigma
Beta-mercaptoetanol	Sigma
LB Agar	Sigma
LB Broth	Sigma
Ampicillin	Sigma
Gliserol	Sigma
DMSO	Sigma
Lusiferaz Substrat	Sigma
Reporter Lizis Buffer	Sigma
DMEM	Sigma
FBS	Sigma
Tripsin	Sigma
Penisilin-Streptomisin	Sigma
PBS	Sigma
Agaroz	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

Trizol	Sigma
Kloroform	Sigma
İzoamilalkol	Sigma
X-gal	Sigma
IPTG	Sigma
D(+) glukoz	Sigma
Tris Base	Sigma
Glasiyal asetik asit	Sigma
EDTA	Sigma
SYBR-Green Master Mix	Qiagene

3.1.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri**Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri**

Kullanılan Gereç	Modeli
CO ₂ 'li inkübatör	Nuaire
Laminar Air Flow	Biophlox
İnverted Mikroskop	Zeiss
-80 °C ultralow freezer	Sanyo Ultra Low
Buz Makinası	Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolabı	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	Ika ks 4000i çalkalayıcılı inkübatör
Etüv	Nuaire
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Otoklav	Hirayama
PH Metre	Schott pH-Meter CG840
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Santrifüj	Hermle Z 323 K(Germany)

Çizelge 3.2. (devam)

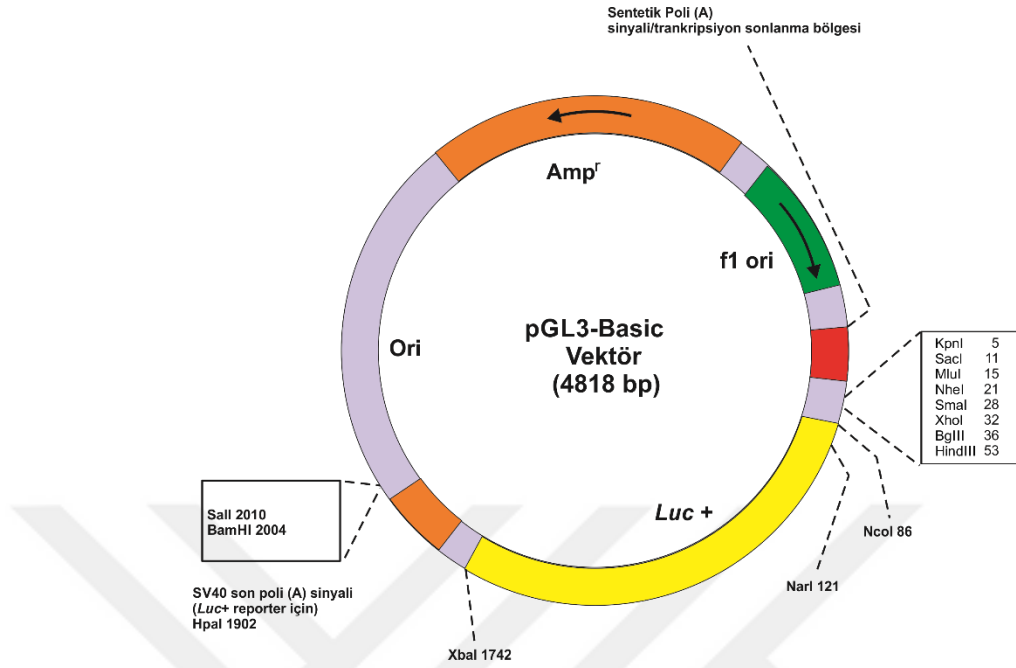
Sıcak su banyosu	Memmert WNB14
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	Biobase
Spektrofotometre	Shimadzu UV-3600 Plus
Steril Kabin	WCS Class II Type Biosafety Cabinet
NanoDrop	Epoch
Vorteks	Fisons whırlı-mixer
Hassas Terazı	Gecavery (UK)
Luminometre	Promega
Agaroz jel elektroforezi	BIO RAD
Jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad
PCR	ProFlex™ 3x32-Well PCR
Mikro santrifüj	Hettich
Real Time PCR	Bio-Rad

3.1.3. Stok solüsyonlar**Çizelge 3.3. Agaroz jel elektroforezi solüsyonları**

Solüsyon	İçeriği
50X TAE	2 M Tris : 242 gram 1 M Asetat : 57,1 mL 100 mM EDTA : 0,5 M EDTA (pH: 8)

3.1.4. Çalışmada kullanılan vektörler

Klonlama amaçlı kullanılan pGL3-basic vektörü Promega'dan satın alındı.



Şekil 3.1. pGL3-Basic vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

3.2. Metotlar

3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak çamaşır suyuyla temizlendi. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

3.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.2.a. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması

Hücrelerin türüne göre hücre kültürü çalışmalarında DMEM ve RPMI-1640 kullanıldı. Mediumların içerisine kullanmadan önce %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) eklenerek bir mix hazırlandı. Mediumlar +4°C'de saklandı.

3.2.2.b. FBS hazırlanması

FBS -20°C'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı.

3.2.2.c. PBS tampon çözeltisinin hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml ddH₂O ile hazırlandı ve otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklandı.

3.2.2.d. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada HUVEC, MCF-7, Hep3B, A549, PC3 ve SH-SH5Y hücre hatları kullanıldı.

3.2.2.e. Hücrelerin çözülmesi

Uzun dönemde sıvı azot içinde saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözünmeleri sağlandı. Çözünen hücreler %10'luk FBS içeren medyuma alındı, alt üst edildi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar 37°C, %5CO₂, %90 nem içeren inkübatöre konuldu.

3.2.2.f. Hücrelerin büyütülmesi

Hücreler 5 ml medyumda 25 cm² flasklarda, haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

3.2.2.g. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler bulundukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm² flasklar için 1 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Ve Flasklar 37°C, %5 CO₂, %90 nem içeren inkübatöre konuldu.

3.2.2.h. Hücrelerin sıvı azotta saklanması

Hücreler bulundukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm² flasklar için 1 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 DMSO içeren FBS 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.

3.3. Memeli Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Yüksek konsantrasyonda ve temiz bir RNA elde etmek amacıyla RNA izolasyonu için trizol kullanıldı.

Öncelikle kültür flasklarında büyütülen hücreler tripsinle muamele edildi ve hücreler kaldırıldı. Daha sonra 15'lik falkonların içerisine konularak santrifüj edildi. Süpernantant pastör pipetiyle alındı. Dipte kalan hücre pelleti üzerine 500 µl trizol konularak homojenizasyon yapılarak, 4°C'de 12000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 5 dk buzda bekletildi. 100 µl kloroform eklendi ve kuvvetli bir şekilde vortekslenerek 2 dk buzda bekletildi. 4°C'de 12000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant 1,5 'lik tüpe alındı. 250 µl izopropanol eklendi ve mix yapıldı. 10 dk buzda bekletildi ve alt - üst yapıldı. 4°C'de 12000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Dip kısım kaldı ve üst kısım atıldı. 1 ml %100'lük alkol eklendi ve vorteks yapıldı. 4°C 'de 9000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım alındı. 500 µl %100'lük alkol eklendi. 4°C 'de 9000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım alındı. 40 µl DEPEC'li su ile çözüldü. Elde edilen RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

3.4. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Bunun için kitin protokolüne göre 2 tane mix hazırlandı. Mix 1'in içerisine oligo dT, RNA örnekleri ve gerekli oranlarda su konuldu. Mix 1'in son hacmi 12 µl oldu. Daha sonra 65°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 5-10 dk buz içerisinde soğutuldu. Bu arada mix 2 hazırlandı. Mix 2'nin içerisine protokole göre belli oranlarda reaksiyon buffer, RNaz inhibitör, dNTP mix, kontrol RNA ve reverse transkriptaz enzimi eklendi. Daha sonra 8 µl olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Son karışım 55°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk bekletildi. Elde edilen cDNA örneklerinin bir kısmı Real Time PCR'da kullanılmak üzere 1/10 oranında seyreltildi ve -20°C'de saklandı.

3.5. Real- Time PCR

Real Time PCR için SYBR Green master mix kullanıldı. Hedef gen olarak BAX, referans gen olarak da beta-actin kullanıldı. Reaksiyon karışımı 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 12,5 µl master mix , 9,5 µl su, 0,25 µl forward ve reverse primer ve son olarak 2,5 µl cDNA örneği kullanıldı.

3.5.1. Real - Time PCR döngüsü

Sıcaklık	Süre
50°C	2 dk
95°C	10 dk

Bu kısım 1 döngü olacak şekilde tamamlandı.

Sıcaklık	Süre
95°C	10 sn
60°C	1 dk
70°C	10 sn

Bu kısım ise 45 döngü olacak şekilde tamamlandı.

3.6. Primer Tasarımı

Primer tasarımı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/ adreslerinden yararlanıldı. Öncelikle insan BAX promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapılarak, promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor diziyi kesmeyen enzimlerin pGL3-basic vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi ve KpnI ve HindIII enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde olduğu görüldü. Sonuç olarak KpnI ve HindIII enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Promotor dizinin doğru yönde klonlanabilmesi için, KpnI kesim bölgesi forward primerde, HindIII kesim bölgesi ise reverse primerde kullanıldı. Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm 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 farklı genlerle en az homoloji gösteren primerler seçilmeye çalışıldı.

Çizelge 3.4. Dizayn edilen primerlerin uzunlukları, sıcaklıkları ve dizileri.

Primer	Uzunluk	Tm	Dizi
Bax Forward-1	26 bç	65°C	KpnI: 5'-TGGTACCAACCCTTTATCATCTGATC-3'
Bax Reverse-1	22 bç	60°C	HindIII :5'-TAAGCTTAACGTGCGTCCTTCA-3'
Bax Forward-2	23 bç	63°C	KpnI: 5'-CCGGTACCTAAACACCATTCAGA-3'
Bax Forward-3	22 bç	64°C	KpnI: 5'-TGGTACCGGTTATCTCTTGGGC-3'
Bax Reverse-2	22 bç	64°C	HindIII: 5'-TAAGCTTGTATGGAGGGGAGGG-3'
RV-primer3	20 bç	60°C	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GL-primer2	23 bç	60°C	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA

3.6.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın kesilmesi

İnsan genomik DNA'sından yapılan PCR'la çoğaltılıp pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış olan insan BAX gen promotörüne ait olan 1400 bp, 930 bp ve 390 bp'lik bölgeler tek tek lusiferaz vektörüne konlandı. Bunun için hem istenilen gen bölgesini içeren pGEM-T Easy vektörü hemde lusiferaz vektörü aynı restriksiyon enzimleriyle (KpnI ve HindIII) kesildi.

Kesim Protokolü:

Su	15 µl
RE Kesim Tamponu	2 µl
Plazmit DNA	2 µl
Kesim Enzimleri (KpnI ve HindIII)	1 µl
Toplam	20 µl

Her iki vektör de 37°C'de 40 dk boyunca kesildi. Daha sonra 80°C'de 10 dk enzim inhibisyonu için bekletildi. Sonra kesilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Kesim sonunda gene ait olan küçük parça ve vektöre ait olan küçük parça jelden saflaştırılarak pGL-3 lusiferaz vektörüne klonlandı.

3.6.2. DNA agaroz jel elektroforezi

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 60 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 1X TAE tercih edildi. Çalışmada genellikle %1 konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 100 bp DNA ladder kullanıldı. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.6.3. Agaroz jelden DNA pürifikasyonu

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

3.6.4. Elde edilen promotör parçalarının lusiferaz vektörüne klonlanması

Elde edilen BAX gen promotörüne ait olan parçalar (1400, 930 ve 390 bp'lik bölgeler) lusiferaz vektörüne tek tek klonlandı. Bunun için 10 µl toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGL- Basic vektör, 3 µl insert DNA, 1 µl 10 x T4 ligaz tamponu (Promega) ve 1 µl T4 DNA ligaz (Promega) +4°C'de bir gece veya oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli* JM109 kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi için koloni PCR yapıldı.

3.6.5. Çalışmada kullanılan bakteri izolatu

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli JM109* bakteri suşu kullanıldı.

3.6.6. Bakteriyel kültür ortamı

E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB - Broth ve LB-agar kullanıldı. Toz halinde satın alınan besi ortamları üretici firmanın belirttiği şekilde saf su ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

3.6.7. Antibiyotikler

Ampisilin 50 mg/ml stok solüsyon şeklinde hazırlandı ve 20°C’de saklandı.

3.6.8. Kompetent hücre hazırlanması

Kompetent hücre hazırlanması için 100 mM kalsiyum klorür kullanıldı. Öncelikle 10 mL LB besiyeri içine tek koloni *E.coli JM109* suşundan ekim yapılarak 37°C’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra bir gecelik kültürden 100 mL LB içine 100 µL inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C’de inkübe edildi. 4444 rpm’de 7-10 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. 2500 µL 100 mM soğuk kalsiyum klorür ile pellet yeniden çözüldü ve buz üzerinde yarım saat bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 500 µL soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek buz içerisinde +4°C’de saklandı.

3.6.9. Transformasyon

Transformasyon için, 100 µL kompetent hücreye 10 µL ligasyon ürünü ilave edilerek buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C’de 30 saniye ısı şoku uygulandı. Hemen ardından buz üzerinde 3-5 dakika bekletildi. Daha sonra 900 µL LB ilave edildi

ve 37°C'de çalkalamalı etüvde bir buçuk saat inkübe edildi. Süre sonunda kültür örneği 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 100 µL örnek uygun antibiyotiği içeren LB agar besiyerine yayılarak bir gece inkübe edildi.

3.6.10. Koloni PCR

PCR reaksiyonları 12 µl hacimde yapıldı. Her bir primerin son konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde seyreltilti. 10X PCR buffer (sigma), 10 mM dNTP (sigma) ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (sigma), 25 mM MgCl₂ (sigma) kullanıldı. Kalıp DNA olarak klonlama sonucu elde edilen bakteri kolonileri kullanıldı. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve istenilen gen bölgesini alan pozitif koloniler belirlendi. Elde edilen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı.

3.6.11. Plazmit DNA izolasyonu (Maxiprep)

Plazmit DNA izolasyonu için Endotoxin Free Plazmit DNA izolasyon kiti (sigma) kullanıldı. Öncelikle 150 ml steril LB broth besiyerine 150 µl ampicilin eklendi. Besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Bir gecenin sonunda kitin protokolüne uygun olarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. NanoDrop'ta konsantrasyon ölçümü yapılarak saflığı kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi yapılarak da sonucun doğruluğundan emin olundu.

Çizelge 3.5. İzole edilen lusiferaz plazmitlerinin konsantrasyonları

Plazmit	Konsantrasyon
Kontrol (boş lusiferaz vektörü)	4 ng/ µl
1400 bp bölge	33 ng/ µl
930 bp bölge	43 ng/ µl
390 bp bölge	40 ng/ µl

3.6.12. İzole edilen plazmitlerin MCF7 hücrelerine geçici transfeksiyonu

Hücrelere transfeksiyon için Transfection reagent (promega) kullanıldı. Her bölge lusiferaz aktivite ölçümü için teker teker hücrelere aktarıldı. Bunun için 6 well platelere MCF7 hücreleri ekildi. Optimizasyonu sağlamak maksadıyla 0,25 µg DNA/kuyucuk ve 0,5 µg DNA/ kuyucuk olacak şekilde iki tekrar halinde yapıldı deneyler. Transfeksiyondan 2 gün önce hücreler wellere ekildi ve büyümeleri sağlandı. Transfekte edilecek DNA ve TransFast Reagent ayrı bir tüp içerisinde hazırlandı. Vortekslendi ve 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücrelerden büyüme mediumu kaldırıldı ve transfeksiyon karışımı hücrelere eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda büyüme mediumu wellere eklenerek son hacim 2 ml'ye tamamlandı. Analiz için 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda lusiferaz aktivite ölçümü yapıldı.

3.6.13. Lusiferaz aktivitesinin ölçülmesi

Lusiferaz aktivite ölçümü için Dual-Luciferase Reporter Assay System kullanıldı. Duol-Glo Lusiferaz aktivite tayin yöntemi iki vektör plazmid kullanımına dayanan ve floresan ışık yayılım esasına göre çalışan bir tekniktir. pGL-3 plazmidi içerisine klonlanan gen dizisinin önünde yer alan firefly ışık veren floresan ışığa yapan proteine ait dizi bulunmaktadır. Dolayısıyla kantitatif olarak ışık miktarına göre genin ekspresyonu veya promotör bölge çalışmalarında gen aktivasyonu tayini bu yöntem ile yapılabilmektedir.

Hücre ekstraktının hazırlanması için kuyucuklardan hücre mediumu uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 500 µl PLB eklendi ve hücreler cell scraper ile kazınarak toplandı. Başka bir tüpe 100 µl LAR II solüsyonu konuldu üzerine PLB- hücre karışımından 20 µl eklenerek Firefly lusiferaz aktivitesi (ilk ölçüm) ölçüldü. Daha sonra 100 µl Stop-glo reagent eklenerek Renilla lusiferaz aktivitesi (ikinci ölçüm) ölçüldü.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

İnsan BAX geninin regülasyonunun aydınlatılması amacıyla ilk olarak kandan genomik DNA temin edildi. Daha sonra sırasıyla genin promotörünün çoğaltılması ve klonlanması çalışmaları gerçekleştirildi. Farklı uzunluklarda promotör parçalarının oluşturulması ve biyoinformatik çalışmaları ile promotördeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Bax geninin 2000 bp'lik promotör parçasının dizisi ve dizi üzerindeki fonksiyonel bölgeler (Toraman 2017)

>5' Flanking sequence chromosome:GRCh38:19:48952929:48954928:1						
GAGAAGCATT	ACACATCCTG	GGTGCTATGC	GAGCTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTG	-2000
AGTTGGAGTT	TCCCTCTTGT	TACTGAGGCT	GGAGTGCAAG	GTCACGATCT	CAGCTCACTG	-1940
CAACCTCTGC	CTCCAGATTC	AAACGATTCC	CCTGCCTCAG	CTCCCAGTA	GCTGGGACTA	-1880
CAGGTGCCTG	CCACCACACC	TGGCTAATTT	AGAATTTTTA	GTAGGGATAG	GGTTTCACCG	-1820
TGTTGGCCAG	GCTGGTCTCA	AACTCCTGAC	CTCAGGTGAT	CTACCCATCT	CGGCCTCCCA	-1760
AAGTGCTGGG	ATTACAGAAG	TGAGCCACTG	AGCCCAACCA	GGAGCTTTTT	CGAGAAAGAA	-1700
GGAAGTCCAA	GAGATCTTCC	TGACACCCTA	GTCTGACTCT	GCCCTTTGCC	TGCTCAAAAT	-1640
TTCCCCATGC	TTCCAGCGG	CCTTCTGGAC	ATAGATCAAG	TCCCTTCTCT	GACAGGCCCA	-1580
AACCCTTTAT	CATCTGATCC	TAGCTCATTT	TTCTGAGTTT	TCCTTAGTTG	CTATTATTTT	-1520
CTGTCTAAAG	TGACATGTCA	TAATATTCAT	AAAGCACACA	AGTCTTATGT	GTACAGCTCA	-1460
ATGAATTGTA	AATATGTGTA	TACCCGGCCG	GGCACAGTGG	CTCACGCCTG	TAATCCCAGC	-1400
ACTTTGGGAG	GCCGAGGCAG	GTGGATCACT	TGAGGTCAGG	AGCTTGAGAC	CAGCCTGACC	-1340
AACATAGTGA	AACCCCATCT	TTACTAAAAA	TACAAAATTA	GCTGGGCGTG	GTGTGCGCATG	-1280
CCTGCAATTC	CAGCTACTTG	GGAGGCTGAG	GCAGGAGAAT	TGCTTGAACC	CGGAGGCAGA	-1220
GGTTGCAGTA	AGCCGAGATC	GTGCCATTGC	ACTCCATCCT	GGGCAACAAG	AGCAAACTC	-1160
CGTCTCAAAA	TAATAATAAT	AATAATAATA	ATAATAATAA	TAATAATGTG	TATACCCATG	-1100
TAAACACCAT	TCAGATAAAA	ATATGGCATA	TTTGGGGCAC	CCGGGGAGTG	TCTCTTGTGG	-1040
CCCCTCCCCT	CCATACCCTG	CTGATCTATC	AGCACAGATT	AGTTTCTGCC	ACTTTTAAAA	-980
CTTCATATTC	CTTTTCTTTT	TACACAAACA	CAAACATTCG	AGTCATGACT	GGGTGGGGTG	-920
GCTCAAGCCT	GTAATCTCAG	CACTTTGGGA	GGCCAAGGTG	CGAGGATCGC	TTGAGTCTGG	-860

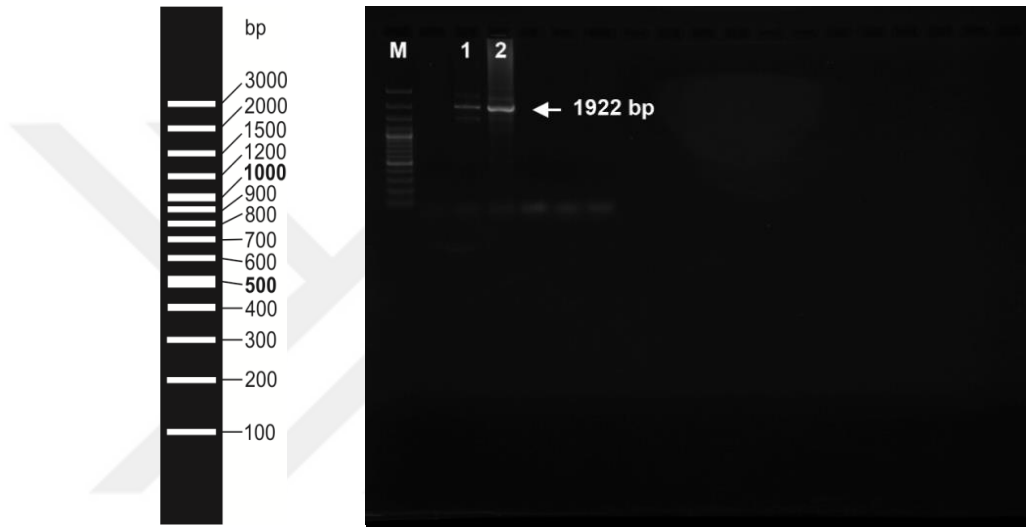
Çizelge 4.1. (devam)

GAGTTCAGAG ACCAGCCTGG GCAACATAGA GAGACCTCAT CTCCACATAA AAAGTTTAA	-800
AAATTAACCA GGGGCGGTGT AGTCCCAGCT ACTCAGGAGG CTGAGGTGGG AGGCTTCAGC	-740
CCGGAATTC CAGACTGCAG TGAGCCATGA TTGGGCCACT GCACTCCAGC CTGGGCAACA	-680
SRV IRF/IRF1_Q6 STAT1/4/5A	
CAGTGAGACC CTGTCTCAA AAAAAAAAAA AAAAAACAG GAAAAACAA ACAAACAGAA	-620
MYCMAX_B/ CRX_Q4/CDXA_Q2 P53DECAMER_Q2_GFI1_Q6/PITX2_Q2 IK2_Q1/CAP_Q1	
AAGCAGGCCT GGCAGCGTAG CTCATGCCTG TAATCCCAGC GCTTTGGAAG GCTGAGACGG	-560
GGTTATCTCT TGGGC TCACA AGTTAG AGAC AAGCCT GGGC GTGGGCTATA TTGCTAGATC	-500
SRV/IRF/IRF1	
CAGGTCTCTG CAAAAACAA AACCACTCAG TTTTATAGTCA TC TATAACGT CCTGCCTGGA	-440
AGCATGCTAT TTTGGGCTC TGAGCTTTTG CACTTGCTAA TTCCTTCTGC GCTGGGGAGA	-380
GCTCAAACCC TGCCCGAAAC TTCTAAAAAT GGTGCCTGGA TAAATGAAGG CATTAGAGCT	-320
GCGATTGGAC GGACGGCTGT TGGACGGCGC CACTGCTGGC ACTTATCGGG AGATGCTCAT	-260
TGGACAGTCA CGTGACGGGA CCAAACCTCC CGAGGGAGCG AGGCAGGTGC GGTACAGTGA	-200
CCCGCGGCG CTGCGGGGCA GCGGCCATTT TCGGGGCGG CCACGTGAAG GACGCACGTT	-140
CAGCGGGGCT CTCACGTGAC CCGGGCGCGC TCGGGCGGCC CGCGCGGACC CGGCGAGAGG	-80
+1	
CGCGGGCGG AGCGGCGGTG ATG	-1

●	Muhtemel P53 bağlanma bölgesi
●	Muhtemel P53 bağlanma bölgeleri
●	Ortak baz
●	TATA kutusu
▼	Transkripsiyon başlama sitesi
+1	Start Kodonu
●	Transkripsiyon faktörleri ve altlarındaki diziler bağlanma motiflerini göstermektedir

4.1. BAX Gen Promotörünün 1922 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması

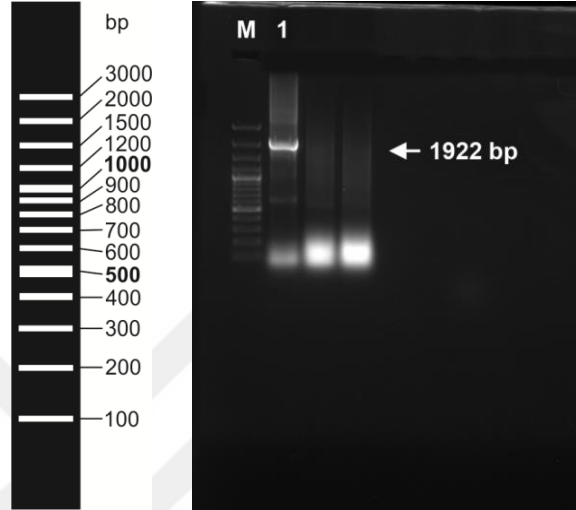
BAX gen promötörüne ait olan ve belirlenen dört farklı bölgeyi kolay bir şekilde çoğaltabilmek amacıyla kalıp olarak kullanılacak olan 1922 bp'lik bölge PCR'da çoğaltıldı.



Şekil 4.1. 1922 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması (Toraman 2017)

M: Markır; 1,2:1922 bp gen bölgesi

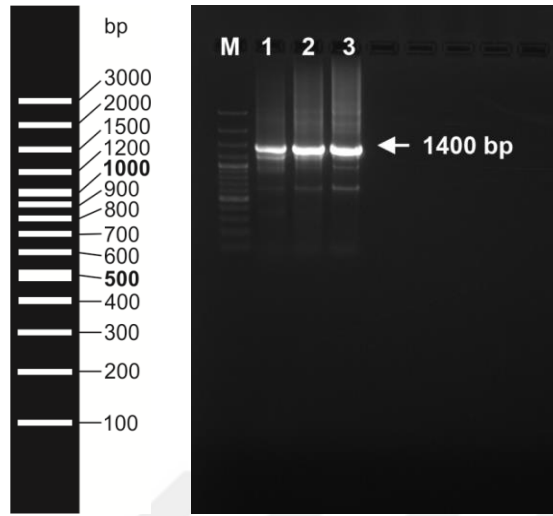
4.1.1. İnsan BAX gen promotörünün 1922 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu



Şekil 4.2. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi (Toraman 2017)
M: Markır; 1: 1922 bp gen bölgesi

4.2. BAX Gen Promotörünün 1400 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması

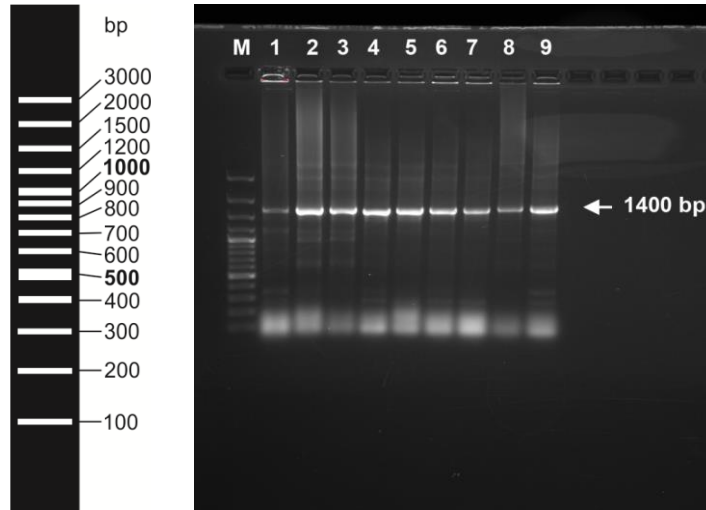
Bu bölgenin çoğaltılması için 1922 bp'lik bölge kalıp olarak kullanıldı. Fakat nonspesifik bağlanmaları engellemek için PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan DNA 1/3 oranında sulandırılarak kullanıldı.



Şekil 4.3. 1400 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması (Toraman 2017)

M: Markır; : 1, 2, 3: 1400 bp'lik bölge

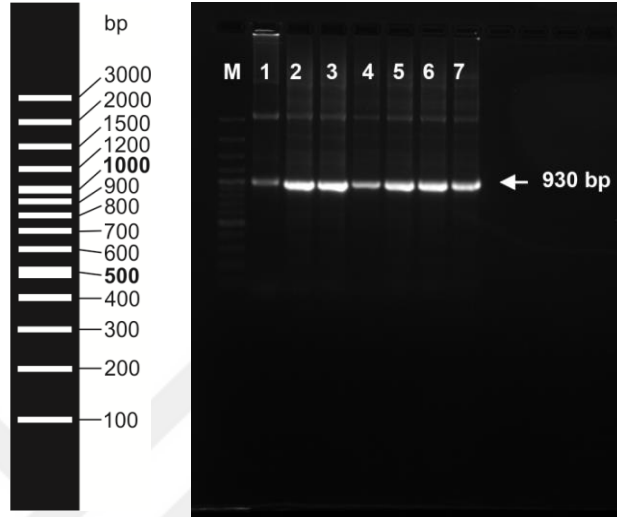
4.2.1. İnsan BAX gen promotörünün 1400 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu



Şekil 4.4. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi (Toraman 2017)

M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

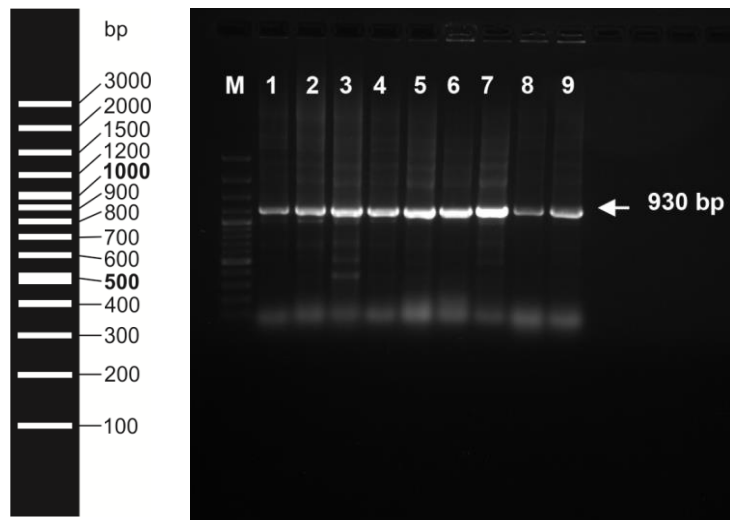
4.3. BAX Gen Promotörünün 930 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması



Şekil 4.5. 930 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması (Toraman 2017)

M : Markır; 930 bp bölge: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

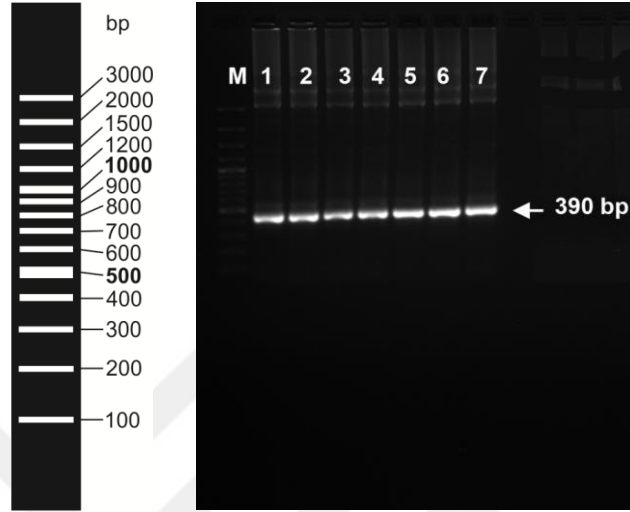
4.3.1. İnsan BAX gen promotörünün 930 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu



Şekil 4.6. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi (Toraman 2017)

M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

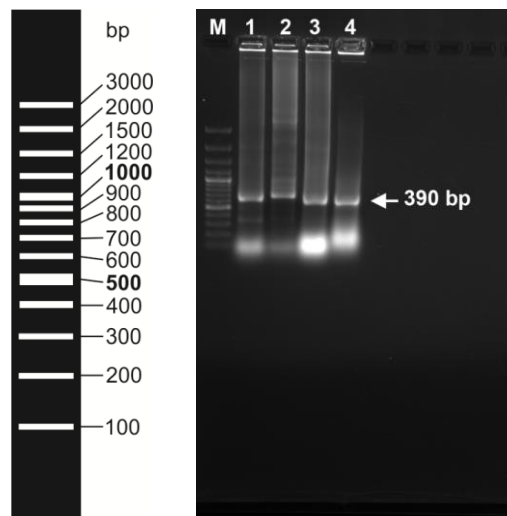
4.4. BAX Gen Promotörünün 390 bp'lik Bölgesinin Çoğaltılması



Şekil 4.7. 390 bp bölgenin PCR ile çoğaltılması (Toraman 2017)

M : Markır; 390 bp bölge: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

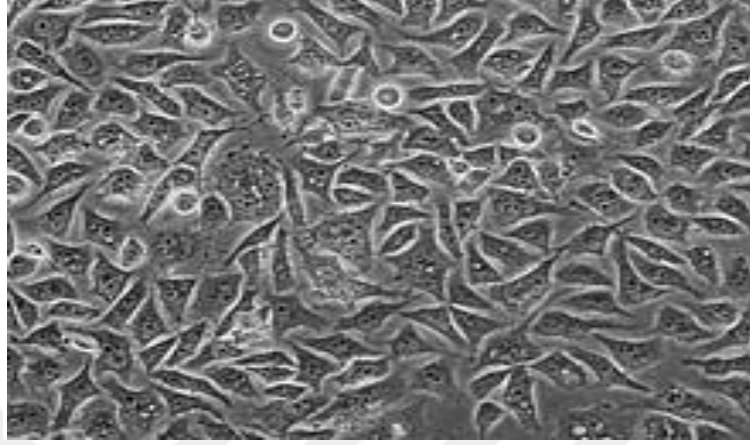
4.4.1. İnsan BAX gen promotörünün 390 bp bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu



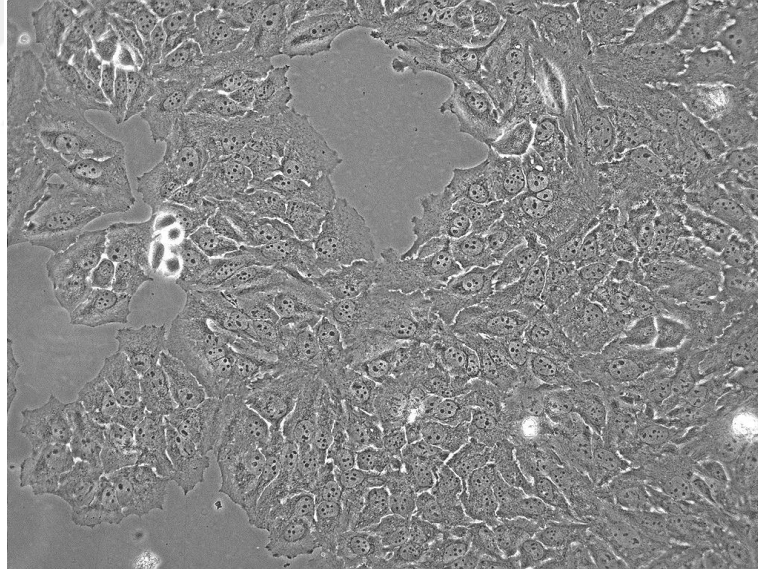
Şekil 4.8. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi (Toraman 2017)

M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4

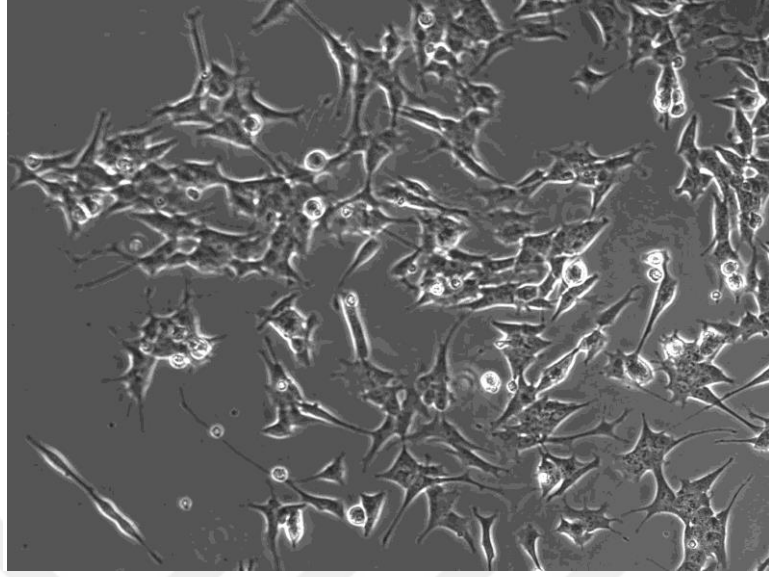
4.5. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Büyütülmesi



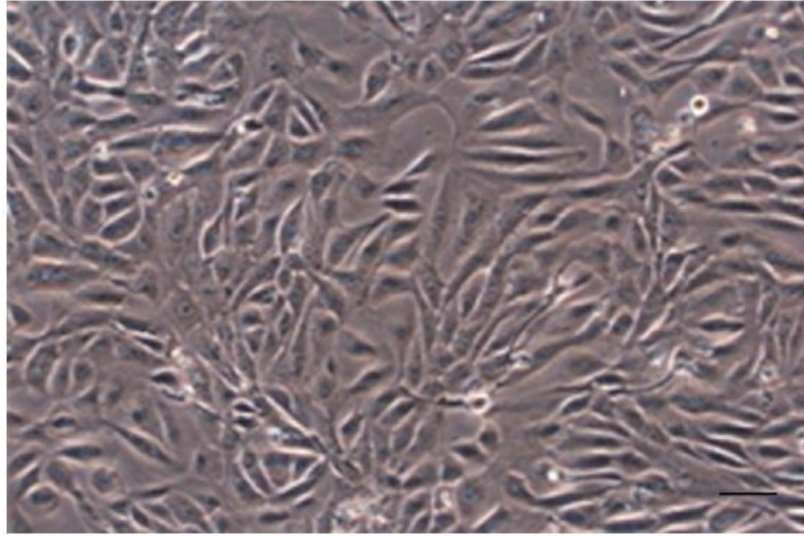
Şekil 4.9. PC3 hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi



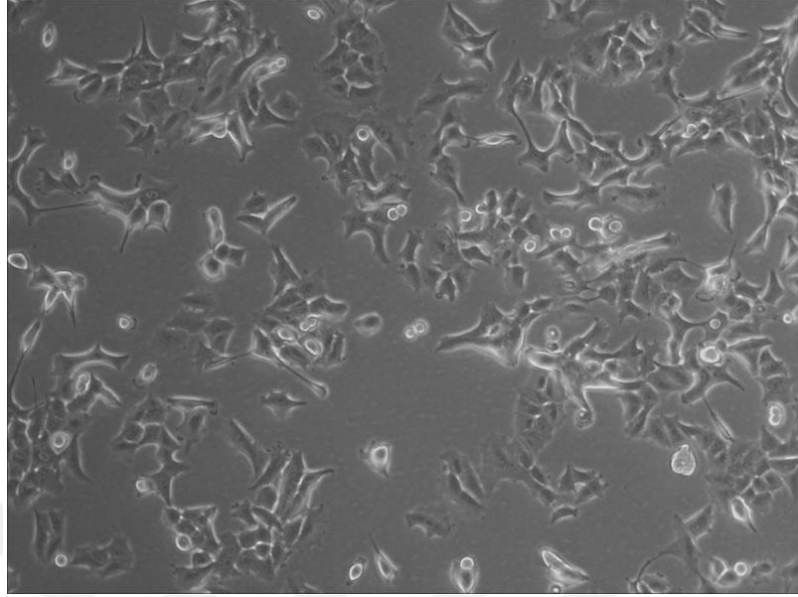
Şekil 4.10. Hep3B hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi



Şekil 4.11. SH-SH5Y hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi



Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin inverted mikroskopta gözlenmesi

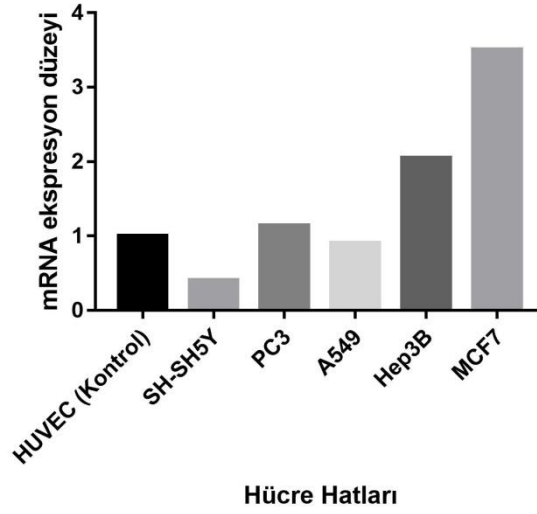


Şekil 4.13. A549 hücre hattının inverted mikroskopta gözlenmesi

4.5.1. Seçilen hücre hatlarının Real-Time PCR sonuçları

Lusiferaz aktivite ölçümünde aktivite değişikliğini en iyi şekilde gözlemlemek amacıyla transfeksiyon için BAX ekspresyonunun en yüksek olduğu hücre hatı seçildi. Bu amaçla seçilen hücre hatlarından RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezlendi. BAX gen ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla da Real-Time PCR yapıldı.

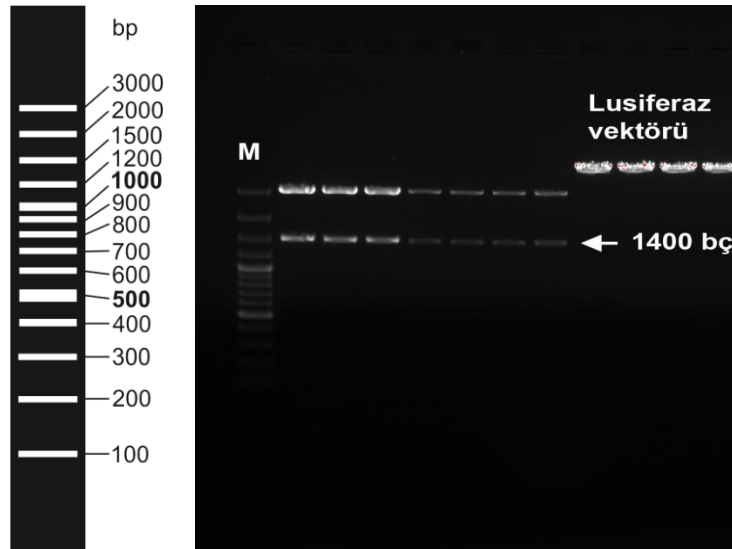
Yaptığımız ön deneyler neticesinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmada insan MCF7 hücre hattının daha yüksek BAX ekspresyonuna sahip olduğu gözlemlendi. Bu nedenle çalışmada bu hattın kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.14. Farklı hücre hatlarının BAX genine ait ekspresyon düzeyleri

4.6. İnsan BAX Gen Promotörüne Ait 1400 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy ve Lusiferaz Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Her iki vektörde KpnI ve HindIII kesim enzimleriyle 37°C'de 40 dk boyunca kesildi.



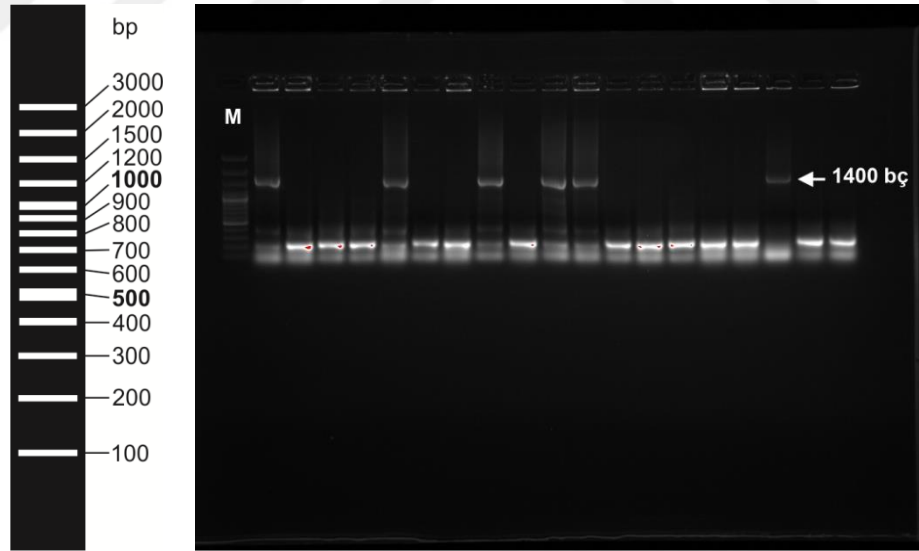
Şekil 4.15. 1400 bp bölgeyi içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün kesilmesi

4.6.1. İnsan Bax gen promotörünün 1400 bp bölgesinin lusiferaz vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

Kesilen ürünlerin saf bir şekilde elde edilmesi için gen bölgesine ait olan küçük parça lusiferaz vektörüne ait olan büyük parça agaroz jelden saf olarak elde edildi. Daha sonra insert DNA lusiferaz vektörüne klonlanarak *E.coli*'ye transforme edildi. Oluşan kolonilerden istenilen gen bölgesini alan koloniyi doğrulamak için koloni PCR yapıldı.

4.6.2. Koloni PCR

Seçilen on dokuz tane koloni PCR'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan RV-primer3 ve GL-primer2 primerleri kullanıldı. 17. koloni seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı.



Şekil 4.16. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

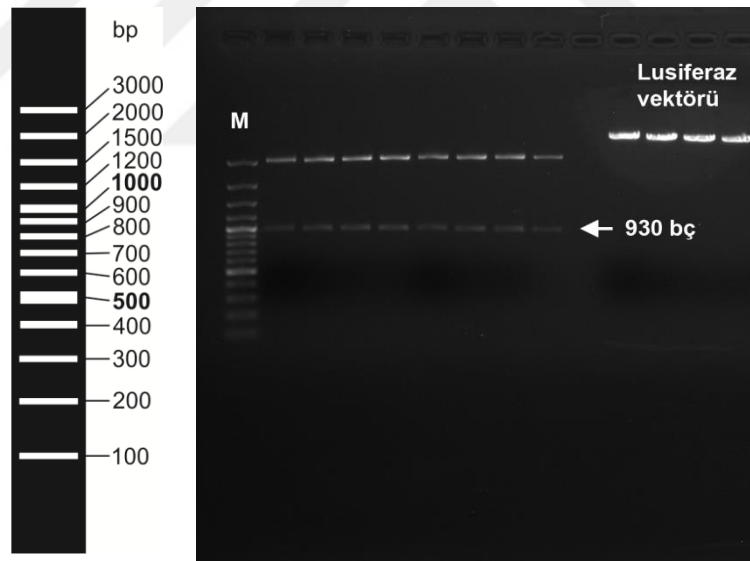
M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

4.6.3. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu 17.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Endotoxin Free Maxiprep Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.7. İnsan BAX Gen Promotörüne Ait 930 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy ve Lusiferaz Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Her iki vektörde KpnI ve HindIII kesim enzimleriyle 37°C'de 40 dk boyunca kesildi.



Şekil 4.17. 930 bp bölgeyi içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün kesilmesi

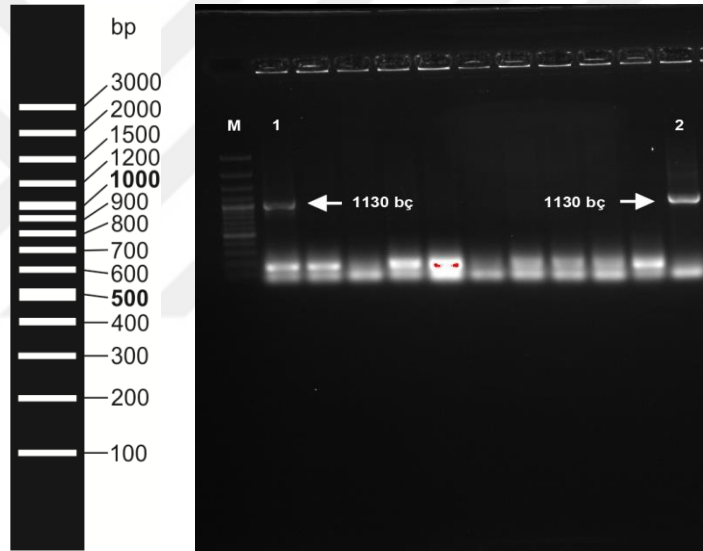
4.7.1. İnsan Bax gen promotörünün 930 bp bölgesinin lusieraz vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

Kesilen ürünlerin saf bir şekilde elde edilmesi için gen bölgesine ait olan küçük parça lusiferaz vektörüne ait olan büyük parça agaroz jelden saf olarak elde edildi. Daha sonra

insert DNA lusiferaz vektörüne klonlanarak *E.coli*'ye transforme edildi. Oluşan kolonilerden istenilen gen bölgesini alan koloniye doğrulamak için koloni PCR yapıldı.

4.7.2. Koloni PCR

Seçilen on iki tane koloni PCR'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan RV-primer3 ve GL-primer2 primerleri kullanıldı. 11. koloni seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı.



Şekil 4.18. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

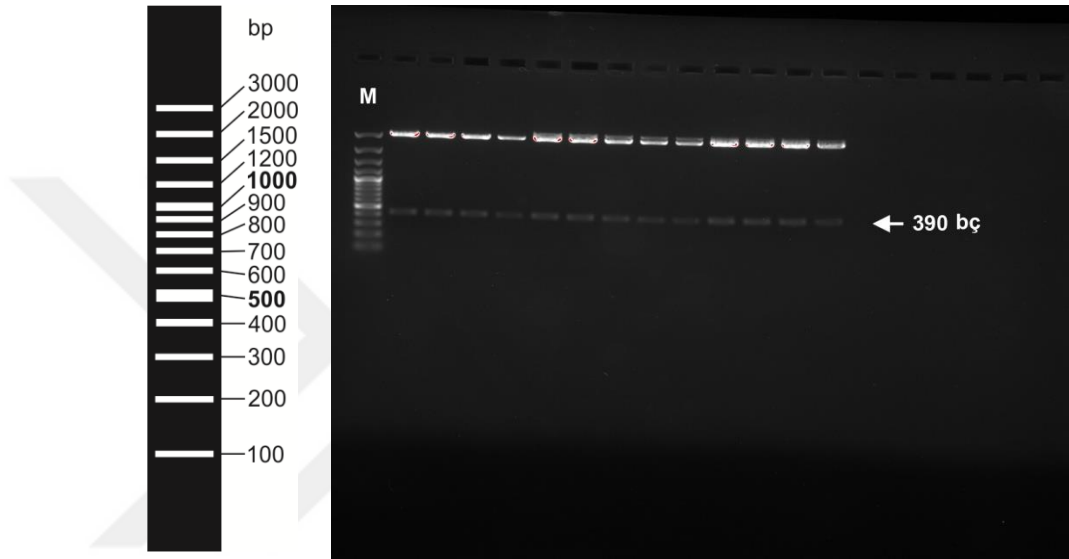
M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

4.7.3. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu 11.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Endotoxin Free Maxiprep Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.8. İnsan BAX Gen Promotörüne ait 390 bp'lik Bölgeyi İçeren pGEM-T Easy Vektörünün Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Her iki vektörde KpnI ve HindIII kesim enzimleriyle 37°C'de 40 dk boyunca kesildi.



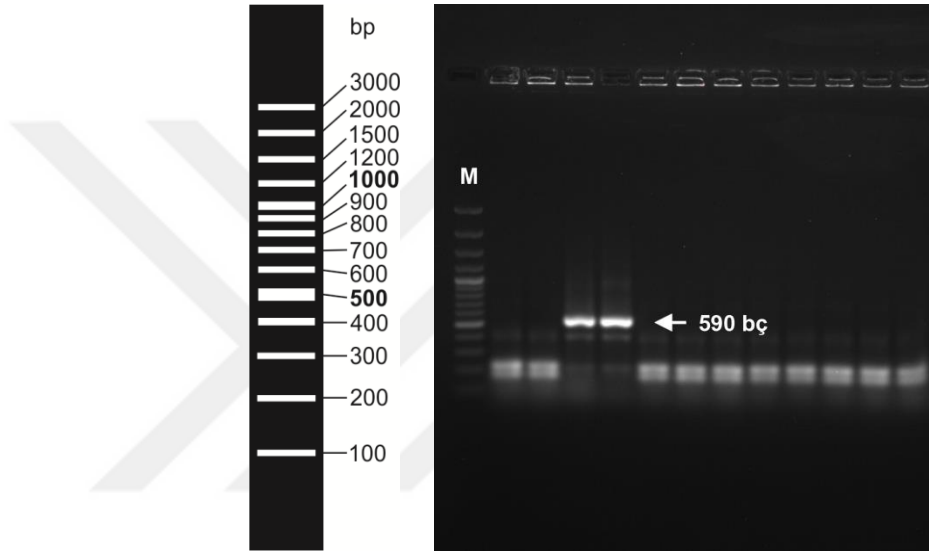
Şekil 4.19. Restriksiyon enzimleriyle kesilen 390 bç'lik bölgenin agaroz jelde görüntülenmesi

4.8.1. İnsan Bax gen promotörünün 390 bp bölgesinin lusiferaz vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

Kesilen ürünlerin saf bir şekilde elde edilmesi için gen bölgesine ait olan küçük parça lusiferaz vektörüne ait olan büyük parça agaroz jelden saf olarak elde edildi. Daha sonra insert DNA lusiferaz vektörüne klonlanarak *E.coli*'ye transforme edildi. Oluşan kolonilerden istenilen gen bölgesini alan koloniyi doğrulamak için koloni PCR yapıldı.

4.8.2. Koloni PCR

Seçilen on iki tane koloni PCR'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan RV-primer3 ve GL-primer2 primerleri kullanıldı. 11. koloni seilelerek plazmit izolasyonu yapıldı.



Şekil 4.20. Koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

M: Markır; Koloniler: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ,10

4.8.3. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu 3.koloni seçilerek LB broth besiyerine ekildi ve hücreler çoğaltıldı. Endotoxin Free Maxiprep Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.9. Oluşturulan Lusiferaz Konstraktlarının Hücre Kültürüne Aktarılması

MCF-7 (meme kanseri) hücreleri 6 well platelere ekildi. Her bir örnek 0,5 ve 0,75 µg DNA olmak üzere iki farklı miktar halinde aktarıldı. Lusiferaz aktivite ölçümünü analiz

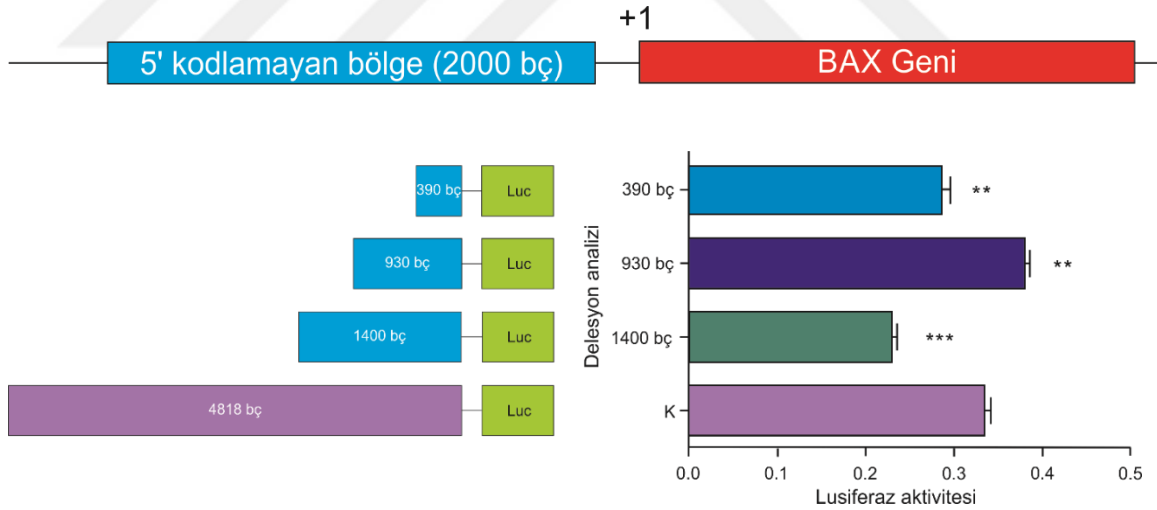
edip karşılaştırma yapabilmek için bir tane de içerisinde gen bulundurmeyen boş lusiferaz vektörü aktarıldı hücrelere. Lusiferaz vektörüne aktarılan 1400 bp, 930 bp ve 390 bp'lik bölgelerin hepsi hücrelere transfekte edildi.

4.10. Lusiferaz Aktivite Ölçümü (Luminimetre Ölçümü)

Luminimetre kullanılarak hücrelere aktarılan her bir konstraktın lusiferaz aktivitesi ölçüldü.



Şekil 4.21. İnsan BAX geninin kromozom üzerindeki yerleşimi



Şekil 4.22. İnsan BAX geni 5' kodlamayan bölgede yapılan delesyonların lusiferaz aktivitesine etkisinin incelenmesi

One-way ANOVA Test analiziyle BAX geni 5' kodlamayan bölgedeki 930 bp'lik parçanın kontrole göre lusiferaz aktivitesinin en fazla olduğunu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Lusiferaz aktivite ölçümü sonucunda boş vektörle kıyaslanınca en fazla aktivitenin 930 bp'lık bölgeden geldiği tespit edildi. Yani bu bölge BAX geninin aktivasyonunu en fazla bölge olarak belirlendi. Daha sonar bu bölge üzerinde bulunan transkripsiyon faktörleri üzerinde yoğunlaşıldı.

4.11. BAX Gen Promotörünün 930 bp'lık Bölgesinde Bulunan Transkripsiyon Faktörlerinin Tespit Edilmesi

Genomatix programıyla tespit edilen transkripsiyon faktörleri dikkate alınarak 930 bp bölge üzerinde bulunan transkripsiyon faktörleri belirlendi. Kromatinin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyonun başlamasındaki önemli rolünden dolayı SWI/SNF transkripsiyon faktörleri üzerinde yoğunlaşıldı. Bu bölge üzerinde bulunan dört tane SWI/SNF transkripsiyon faktörü belirlendi.

Transkripsiyon faktörü adı	Ayrıntılı Aile Bilgileri	Matris	Ayrıntılı Matris Bilgisi	Sekans
RUSH	SWI / SNF'ye bağlı nükleofosfoproteinler ile RING parmak DNA bağlama motifi.	SMARCA3.02	SWI / SNF ile ilişkili, matris ilişkili, kromatin aktine bağımlı regülatör, altfamily	cagcACTTtgg
IKRS	İkaros çinko parmak ailesi	LYF1.01	B ve T lenfositleri bakımından zenginleştirilmiş LyF-1 (İkaros 1)	cttTGGGaggcca
PURA	Pur-alfa hem tek zincir hem de çift zincir DNA'yı diziye özgü bir şekilde bağlar.	PURALPHA.01	Purin açısından zengin element bağlama proteini A	ggAGGCcaaggtg
SF1F	Omurgalı steroidojenik	FTF.01	Alfa (1) - fetoprotein	aggcCAAGgtgcg ag

	faktör.		transkripsiyon faktörü (FTF), karaciğer reseptörü homolog-1 (LRH-1)	
CEBP	Ccaat / Enhancer Bağlayıcı Protein	CEBPE.02	CCAAT / arttırıcı bağlama proteini (C / EBP), epsilon	cagcctggGCAAc at
BEDF	Çinko parmak proteinlerinin BED alt sınıfı	ZBED4.01	Çinko parmak, 4'ü içeren BED tipi; Kutu bağlama alanları	cagGGGCggtgtag t
IKZF	Ikaros ailesi çinko parmak 5	PEGASUS.01	IKAROS ailesi çinko parmak 5 (Pegasus)	aggggcGGTGtag
HAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	TH1E47.01	1 / E47 heterodimeri, çeşitli embriyonik dokulardaki TH1 bHLH üyesine spesifik ekspresyon.	ccgggaattCCAGa ctgcagt
FKHD	Çatal kafa etki alanı faktörleri.	FOXP1_ES.01	ESC'lerde aktive edilen, FOXP1'in alternatif ekleme varyantı.	aaaaaaAACAgg aaaa
ZFX	Zfx ve Zfy - transkripsiyon faktörleri memeli seks belirlenmesinde rol oynar.	ZFX.01	X bağlantılı çinko parmak proteini	caGGCctggcg
BCDF	Bikoid benzeri homeodomain	GSC.01	Omurgalı bicoid tipi	gcctgTAATcccag cgc

	kopyalama faktörleri		homeodomain protein Goosecoid.	
SIX3	Sine oculis homeobox homolog 3	SIX3.03	SIX3 / SIXdomain (SD) ve Homeodomain (HD) transkripsiyon faktörü	atgcctgTAATccc agcgctt
AHRR	AHR-olmayan heterodimerler ve AHR'ye bağlı faktörler.	AHRARNT.03	DRE (dioksin yanıt elementleri), XRE (xenobiyotik yanıt elementleri) AHR / ARNT heterodimerleri ile bağlanır.	acaagcctggGCGT gggctatattg
KLFS	Kruppel, transkripsiyon faktörleri gibi.	GKLF.03	Bağırsağa zenginleştirilmiş Krueppel-benzeri faktör / KLF4	agcctgggcGTGG gctata
CEBP	Ccaat / Enhancer Bağlayıcı Protein	CEBPE.02	CCAAT / arttırıcı bağlama proteini (C / EBP), epsilon	aggctctctGCAAAa a
CIZF	CAS geçmeli çinko parmak proteini	NMP4.01	NMP4 (nükleer matriks proteini 4) / CIZ (Cas ile etkileşen çinko parmak proteini)	gcAAAAaaciaa

BPTF	Bromodomain ve	FAC1.01	Fetal Alz-50	caaaaAACAAa
------	----------------	---------	--------------	-------------

	PHD domain transkripsiyon faktörleri		clone 1 (FAC1)	
VFKHD	Fork head domain factors	VFOXP1_ES.01	FOXP1'in alternatif bağlantı varyantı, aktive edildi	tgcaaaaAACAAAA cca
VTCFF	TCF11 transcription factor	VTCF11.01	TCF11/LCR- F1/Nrf1 homodimers	GTCAtct
VRUSH	RING parmak DNA bağlama motifi ile SWI / SNF'ye bağlı nükleofosfoproteinl er	VSMARCA3.02	SWI / SNF ile ilişkili, matriks ilişkili, kromatinin aktine bağımlı regülatörü	ttgcACTTgct
VHOMF	Homeodomain transkripsiyon faktörleri	VMSX2.01	as segmenti homeo kutusu 2, Drosophila homologu (HOX 8)	cacttgCTAATcctt ctg
VHBOX	Homeobox kopyalama faktörleri.	VGSH2.01	Homeodomain transkripsiyon faktörü Gsh-2.	acttgCTAATccttc tgc
VSIX3	Sine oculis homeobox homolog 3	VSIX3.03	SIX3 / SIXdomain (SD) ve Homeodomain (HD) transkripsiyon faktörü	cacttgCTAATcctt ctgctg
VCART	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VS8.01	Binding site for S8 type homeodomains	cttgCTAATccttct gcgct
OTF2B	RNA polymerase II	OBRE.01	Transcription	cggCGCC

	transcription factor II B		factor II B (TFIIB) recognition element	
VE2FF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VE2F3.02	E2F transcription factor 3 (secondary DNA binding preference)	ggacgGCGCact gctg
VRUSH	SWI/SNF related nucleophosphoprot eins with a RING finger DNA binding motif	VSMARCA3.02	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	tggcACTTatc
VHIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktör, bHLH / PAS protein ailesi.	VARNTL.01	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri homodimer	gacagtcaCGTGac ggg
VMITF	Mikrofalemi transkripsiyon faktörü	VCLEAR.01	Eşgüdümlü Lizozomal İfade ve Düzenleme (CLEAR) unsurları TFEB'ye bağlı	acagTCACgtgacg g
VEBOX	E-box binding factors	VUSF.03	Yukarı akım uyarıcı faktör	acagtcaCGTGacg gga
VHESF	Bölünmüş	VBHLHB2.01	Temel helezon-	cagtcACGTgacgg

	kompleks geliştiricisinin omurgalı hayvan homologları		döngü-helis alan içeren, sınıf B, 2	g
VCARE	Kalsiyum cevap elementleri.	VCARF.01	Kalsiyum cevap elementleri.	ggagcGAGGca
VHAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	VTAL1_E2A.01	Tal-1, E2A proteinlerine ve GATA-1'e bağlı Lmo2 kompleksi, yarı alan 1	agcgaggCAGGtg cggtcacg
VYY1F	Aktivatör / baskılayıcı, transkripsiyon başlatma bölgesine bağlama	VYY2.01	Transkripsiyon faktörü yin yang 2	cagcggCCATtttg cggggcggc

Çizelge 4.2. İnsan BAX gen 930 bp'lik SW1/SNF transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri

AACCCTTTATCATCTGATCCTAGCTCATTTTTCTGAGTTTTCTTAGTTGCTATTATTTT
 CTGTCTAAAGTGACATGTCATAATATTCATAAAGCACACAAGTCTTATGTGTACAGCTCA
 ATGAATTGTAAATATGTGTATACCCGGCCGGGCACAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGC
 ACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACTTGAGGTGAGGAGCTTGAGACCAGCCTGACC
 AACATAGTGAAACCCCATCTTTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGTGCGATG
 CCTGCAATTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCGGAGGCAGA
 GGTTGCAGTAAGCCGAGATCGTGCCATTGCACTCCATCCTGGGCAACAAGAGCAAACTC
 CGTCTCAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATGTGTATACCCATG
 TAAACACCATTTCAGATAAAAATATGGCATATTTGGGGCACCCGGGGAGTGTCTCTTGTGG
 CCCCTCCCCTCCATACCCTGCTGATCTATCAGCACAGATTAGTTTC**TGCCACTTTTT**TAAA
 CTTCATATTCCTTTT**CTTTTACACAAA**CACAAACATTCGAGTCATGACTGGGTGGGGTG
 GCTCAAGCCTGTAATCT**cagcACTTtgg**GAGGCCAAGGTGCGAGGATCGCTTGAGTCTGG
 GAGTTCAGAGACCAGCC**TGGGCAACATAGAG**AGACCTCATCTCCACATAAAAAGTTTTAA
 AAATTAACCAGGGGCGGTGTAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTGGGAGGCTTCAGC

CCGGGAATTCCAGACTGCAGTGAGCCATGATTGGGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACA
 CAGTGAGACCCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGGAAAAACAAACAAACAGAA
 AAGCAGGCCTGGCGCGGTAGCTCATGCCTGTAATCCCAGCGCTTTGGAAGGCTGAGACGG
 GGTTATCTCTTGGGCTCACAAGTTAGAGACAAGCCTGGGCGTGGGCTATATTGCTAGATC
 CAGGTCTCTGCAAAAAACAAACCACTCAGTTTTTTAGTCATCTATAACGTCCTGCCTGGA
 AGCATGCTATTTTGGGCCTCTGAGCTTttgcACTTgctAATTCCTTCTGCGCTGGGGAGA
 GCTCAAACCCTGCCCGAAACTTCTAAAAATGGTGCCTGGATAAATGAAGGCATTAGAGCT
 GCGATTGGACGGACGGCTGTTGGACGGCGCCACTGC TGGCACTTATCGGGAGATGCTCAT
 TGGACAGTCACGTGACGGGACCAAACCTCCCGAGGGAGCGAGGCAGGTGCGGTCACGTGA
 CCCGGCGGCGCTGCGGGGACGCGCCATTTTGCGGGGCGGCCACGTGAAGGACGCACGTT
 CAGCGGGGCTCTACGTGACCCGGGCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCGGACCCGGCGAGAGG
 CGGCGGCGGGAGCGGCGGTG (-1) (5'UTR BÖLGESİ)
 >19 DNA:CHROMOSOME CHROMOSOME:GRCH38:19:48954929:48961798:1
 (+1)
 ATGGACGGGTCCGGGGAGCAGCCCAGAGGCGGGG

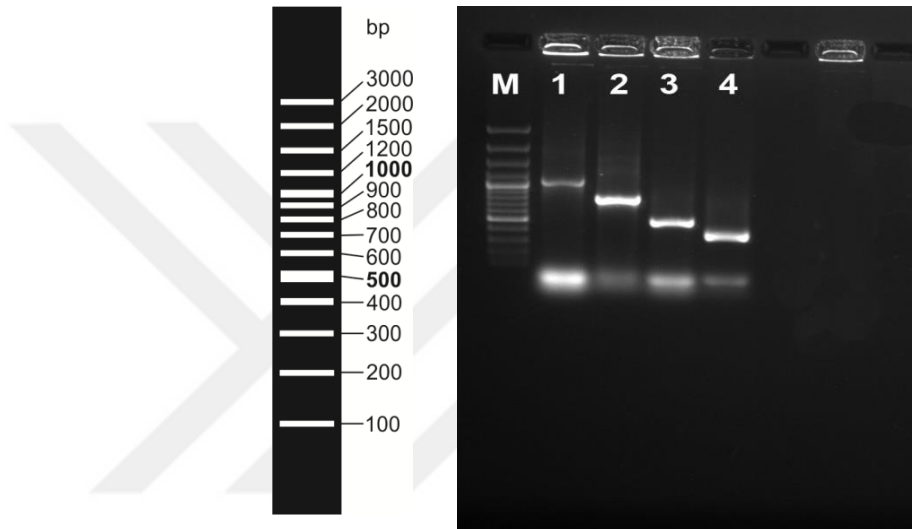
TGCCACTTTTT	SW1/SNF
F1-CTTTTACACAAA	797 bp
CagcACTTtgg	SW1/SNF
F2-TGGGCAACATAGAG	673 bp
ttgcACTTgct	SW1/SNF
F3 CTTCTGCGCTG	230bp
CGAAACTTCTA	SW1/SNF
F 4- ATGGTGCCTGGAT	

4.11.1. Tespit edilen transkripsiyon faktörleri üzerinde delesyon yapılması

Belirlenen bölgelerde delesyon yapmak amacıyla KpnI ve HindIII restriksiyon enzim kesim bölgelerini bulunduran primerler dizayn edildi. 930 bp bölge kalıp olarak kullanılarak bu bölgeler PCR ile çoğaltıldı.

4.11.2. Çoğaltılan bölgelerin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

Çoğaltılan her bir bölge jelden ektrakte edilerek pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve *E.coli*'ye transformasyonu yapıldı.



Şekil 4.23. pGEM-T Easy vektörüne aktarılan delesyon bölgelerinin koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

M: Markır; 1. P1 delesyon bölgesi (797 bp), 2. P2 delesyon bölgesi (673 bp), 3. P3 delesyon bölgesi (230 bp), 4. P4 delesyon bölgesi (185 bp)

4.11.3. Plazmit DNA izolasyonu

Koloni PCR sonucu istenen bölgeyi aldığı doğrulanan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı.

4.11.4. Delesyon bölgelerini içeren pGEM-T Easy ve lusiferaz vektörünün restriksiyon enzimleriyle kesilmesi

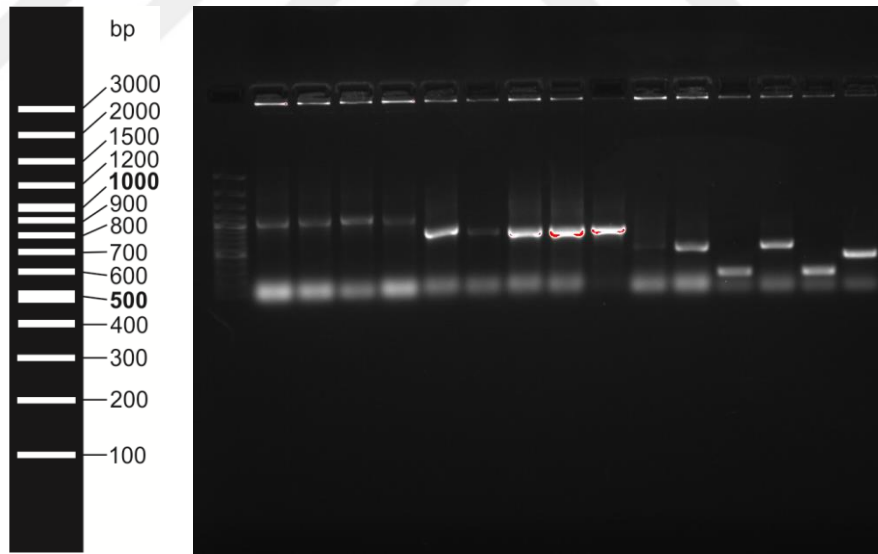
Her iki vektörde KpnI ve HindIII kesim enzimleriyle 37°C'de 20 dk boyunca kesildi.

4.11.5. Delesyon bölgelerinin lusiferaz vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

Kesilen ürünlerin saf bir şekilde elde edilmesi için gen bölgesine ait olan küçük parça lusiferaz vektörüne ait olan büyük parça agaroz jelden saf olarak elde edildi. Daha sonra insert DNA lusiferaz vektörüne klonlanarak *E.coli*'ye transforme edildi. Oluşan kolonilerden istenilen gen bölgesini alan koloniyi doğrulamak için koloni PCR yapıldı.

4.11.6. Koloni PCR

Seçilen koloniler PCR'da kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. Primer olarak vektöre ait olan RV-primer3 ve GL-primer2 primerleri kullanıldı.



Şekil 4. 24. Lusiferaz vektörüne aktarılan delesyon bölgelerinin koloni PCR sonucunun agaroz jelde görüntülenmesi

M: Markır; 1. F1 delesyon bölgesi (797 bp), 2. F2 delesyon bölgesi (673 bp), 3. F3 delesyon bölgesi (230 bp), 4. F4 delesyon bölgesi (185 bp)

4.11.7. Plazmit DNA izolasyonu

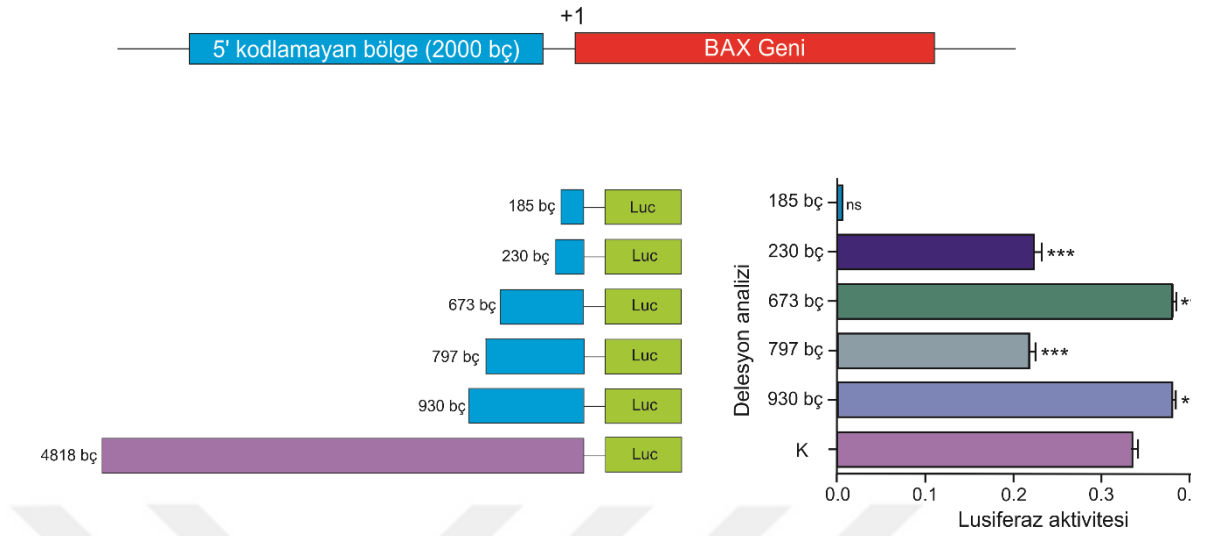
Koloni PCR sonucu istenen gen bölgesini aldığı doğrulanan kolonilerden Endotoxin Free Maxiprep Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop'ta ölçüldü. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

4.11.8. Oluşturulan lusiferaz konstraktlarının hücre kültürüne aktarılması

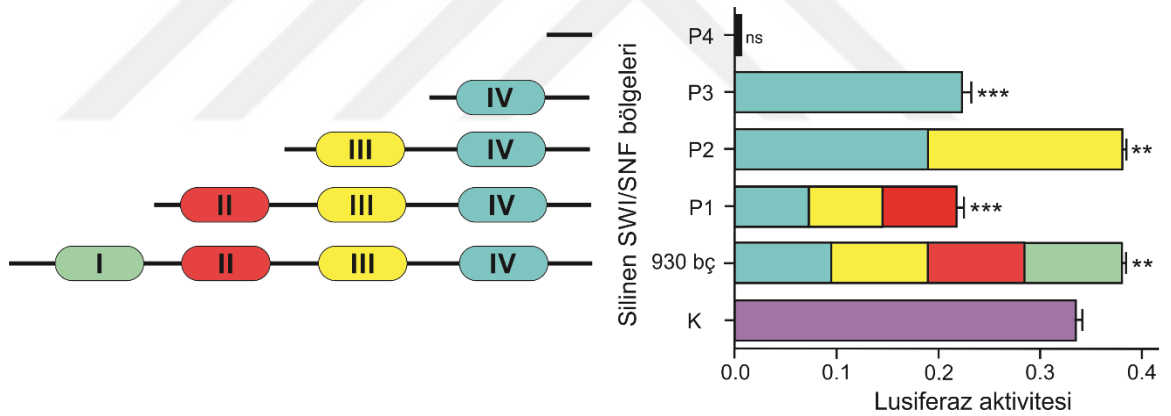
MCF-7 (meme kanseri) hücreleri 6 well platelere ekildi. Her bir örnek 0,5 ve 0,75 µg DNA olmak üzere iki farklı miktar halinde aktarıldı. Lusiferaz aktivite ölçümünü analiz edip karşılaştırma yapabilmek için bir tane de içerisinde gen bulundurmayan boş lusiferaz vektörü aktarıldı hücrelere. Lusiferaz vektörüne aktarılan delesyon bölgelerin hepsi hücrelere transfekte edildi.

4.11.9. Lusiferaz aktivite ölçümü (Luminimetre ölçümü)

Luminimetre kullanılarak hücrelere aktarılan her bir konstraktın lusiferaz aktivitesi ölçüldü. Boş lusiferaz vektörüyle kıyaslandığında en fazla aktivitenin TF 2 delesyonunda olduğu görüldü. Sonuç olarak bu transkripsiyon faktörünün BAX gen ekspresyonunu en fazla etkilediği tespit edildi.



Şekil 4.25. SWI/SNF Transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin delesyonunun lusiferaz aktivite sonuçları



Şekil 4.26. İnsan BAX geninin 5' kodlamayan bölgesinde bulunan 930 bç'lik parça üzerindeki SWI/SNF transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin delesyonu

SWI/SNF transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin lusiferaz aktivite sonuçları

One-way ANOVA Test analiziyle BAX geninin 5' kodlamayan bölgesinde bulunan P2 parçasındaki III numaralı SWI/SNF transkripsiyon faktörünün, kontrole göre lusiferaz aktivitesinin en fazla olduğu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Silinen transkripsiyon faktörlerinin lusiferaz aktivite sonuçları

(P2 parçasının kontrole göre en fazla lusiferaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.)



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptozis, proapoptotik BCL-2 ailesi proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Adams and Cory 1998). Bir hücrenin apoptoza meyilli olup olmayışı BCL-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Örneğin; BCL-2 proteinin BAX proteini ile olan etkileşiminde BCL-2 proteininin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, BAX proteinin daha fazla olması durumunda ise hücre ölüme gitmektedir (İnci *et al.* 2009).

Bu nedenle de bugüne kadar üzerinde çeşitli yaklaşımlarla sayısız çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. BCL-2 protein ailesi üyeleri, apoptozun mitokondriyal yolağının esaslı kontrolörleri olarak bilinmektedir.

BAX geni hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayan BCL-2'ye bağlı proapoptotik bir proteindir (Oltvai *et al.* 1993). Ekspresyonu p53 aracılı apoptozla paralellik göstermektedir (Miyashita *et al.* 1994). Bu gen doğrudan p53 tarafından aktive edilmektedir (Miyashita and Reed, 1995). Bu nedenle, BAX geninin p53 aracılı apoptoz için gerekli olduğu düşünülmektedir (Yin *et al.* 1997). BAX, göğüs ve kolorektal karsinom gibi bazı katı tümörlerde potansiyel tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Promotöre bağlı CpG adalarının DNA metilasyonu, tümör hücrelerinde gen inaktivasyonu için ortak bir mekanizma olarak bilinir (Alipour *et al.* 2013). Promotördeki CpG adacıkları, P53 proteini ve transkripsiyon bağlanma proteinleri, BAX geninin regülasyonundaki önemini yanı sıra, genin ekspresyonunu kontrol etmede de oldukça önemlidir (Igata *et al.* 1999). Biz bu çalışmamızda BAX geninin kontrolünden sorulu olan muhtemel transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerini ve transkripsiyondaki fonksiyonunu bulmayı amaçladık. Hedeflenen çalışmaya paralel olarak, Semaan ve ark., fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında BAX geni promotöründe P53 bağlanma bölgesindeki tek nükeotit polimorfizminin genin ekspresyonunu değiştirdiğini bildirmektedirler (Semaan *et al.* 2010).

Diğer taraftan, Ang *et al.* yapmış oldukları bir çalışmada, GPR43 geninin kontrolünden sorumlu olan XBP1 transkripsiyon faktörünü bulmaları ve genin kontrolünden birinci derecede sorumlu olduğu motifi ortaya koymaları ile promotör bölgelerindeki transkripsiyon faktörleri ve bağlanma motiflerinin önemini daha iyi anlamamızı sağlamıştır (Ang *et al.* 2015).

Jiang *et al.* yaptıkları bir çalışmada bir C₂H₂ tipi çinko parmak transkripsiyon faktörü olan ZNF667 / Mipul'in, oksidatif stresde önemli bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, hedef genler ve kardiyomiyositlerde ZNF667'nin potansiyel rollerinin hiçbirini aydınlatılamamıştır. Burada, ZNF667'nin H9c2 hücre hatlarındaki fonksiyonel rolü, hücrelerin apoptozdan korunduğu moleküler mekanizmasına odaklanarak incelenmiştir. ZNF667 transkripsiyon faktörünün, sıçan proapoptotik geni olan Bax geninin ekspresyonunu ve promotör aktivitesini inhibe ettiği ve aynı zamanda H₂O₂ ve Dox tarafından indüklenen H9c2 hücrelerinin apoptozunu engellediği bulunmuştur. Yapılan bu çalışma, sitoproteksiyonu sağlayan ZNF667'nin sıçan Bax geninin yeni bir regülatörü olduğunu ve H₂O₂ muamelesine yanıt olarak H9c2 kardiyomiyositlerde Bax mRNA ve protein ifadesinin inhibisyonuna aracılık ettiğini göstermektedir (Jiang *et al.* 2014). P53'ün BAX proteinin ekspresyonu üzerindeki rolünü ortaya koymak amacıyla yapılan bir çalışmada ise P53 proteinin bir transkripsiyon faktörü olarak Bax ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Perego *et al.* 1996).

Başka bir çalışmada ise, Mitchell *et. al.* 2000, yapmış oldukları bir çalışmada, c-Myc onkoproteininin, hücresel transformasyonda ve apoptotik hücre ölümünde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olduğunu bildirmiştir. Bütün bu çalışmalar gen regülasyonlarında transkripsiyon faktörlerinin önemini açıkça ortaya koymaktadır (Mitchell *et al.* 2000).

Literatürlerde insanda BAX geni, kanser ve apoptoz ile ilgili yüzlerce çalışma bulunmaktadır. Fakat, BAX geni promotörü ve transkripsiyon faktörleri üzerine detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda şimdiye kadar literatürlerde var olan araştırmalardan farklı olarak insan BAX geni 5' kodlamayan bölge üzerinde genin

aktivasyonundan birinci derecede sorumlu olabilecek transkripsiyon faktörlerinin analizi gerçekleştirildi. Yapılan biyoinformatik çalışmalarla insan BAX geni 5' kodlamayan bölgenin detaylı analizi yapıldı ve bu bölge üzerindeki muhtemel SWI-SNF (BAF ve PBAF) transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerlerini tespit edildi.

Bu amaçla apoptozdaki önemli rolünden dolayı çalışmamızda BAX geni 5' kodlamayan bölge üzerinde delesyon bölgeleri seçilirken genin p53 bağlanma bölgesi ve TATA bağlanma bölgesi dikkate alındı.

Çalışmamızda, BAX geni 2000 bç'lik 5' kodlamayan bölgesi PCR yardımıyla elde edildi. Elde edilen bu parçadan, 930 bç'lik parça lusiferaz vektörüne aktarıldı ve lusiferaz aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Bu parçanın kontrol lusiferaz vektörüne göre oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görüldü. 930 bç'lik parçanın bu genin ekspresyonunda önemli bölgeleri içerebileceği düşünülmektedir. Bu bölge üzerinde yapılan biyoinformatik çalışmalar neticesinde SWI / SNF kompleksinin bölgede muhtemel bağlanma noktalarının yoğun bir şekilde lokalize olduğu anlaşıldı. SWI / SNF kompleksinin 5' kodlanmayan bölgede genin regülasyonunda ve kromatin yeniden şekillenmesinden sorumlu proteinler olduğu bildirilmektedir (Oike *et al.* 2014). Çalışmadan elde edilen (Şekil 4.24) bulgulardan 930 bç'lik bölgenin biyoinformatik çalışmalar sonucu SWI / SNF bağlanma motifleri bakımından dört motif içeren bir bölge olduğu belirlendi (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda lusiferaz gen ekspresyonun yüksek görüldüğü 930 bç'lik bölgenin daha da iyi analiz edilmesi amacıyla bölge SWI / SNF yerleşimine göre 797 bç, 673 bç, 230 bç ve 185 bç'lik parçalara ayrıldı. Çalışmamızda, 797 bç'lik parça TF1 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde II, III ve IV nolu SWI/ SNF bağlanma motifleri motiflerinin bulunduğu görüldü. Ayrıca, 673 bç'lik parça TF2 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde III ve IV diye isimlendirilen, iki, SWI / SNF bağlanma bölgeleri tespit edildi. 230 bç'lik parça TF3 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde IV olarak isimlendirilen bir bağlanma bölgesine sahip olduğu görüldü. TF4 olarak isimlendirilen

185 bç 'lik parçanın ise herhangi bir SWI / SNF bağlanma bölgesine sahip olmadığı anlaşıldı.

Çalışmamızda lusiferaz gen ekspresyonun yüksek görüldüğü 930 bç'lik bölgenin daha da iyi analiz edilmesi maksadıyla bölge SWI / SNF yerleşimine göre 797 bç, 673 bç, 230 bç ve 185 bç'lik parçalara ayrıldı. Çalışmamızda, 797 bç'lik parça TF1 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde II, III ve IV nolu SWI/ SNF bağlanma motifleri motiflerinin bulunduğu görüldü. Ayrıca, 673 bç'lik parça TF2 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde III ve IV diye isimlendirilen, iki, SWI / SNF bağlanma bölgeleri tespit edildi. 230 bç'lik parça TF3 olarak adlandırıldı ve kalıbın içerisinde IV olarak isimlendirilen bir bağlanma bölgesine sahip olduğu görüldü. TF4 olarak isimlendirilen 185 bç'lik parçanın ise herhangi bir SWI / SNF bağlanma bölgesine sahip olmadığı anlaşıldı.

KAYNAKLAR

- Abraham D.J. & Rotella, D.P., Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6th Ed. Hoboken, NJ: Wiley; c2003. 1156p.
- Adams, J. M. & Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Alipour, M., Zargar, S. J., Safarian, S., Fouladdel, S. H., Azizi, E., and Jafargholizadeh, N., 2013. The Study of DNA Methylation of bax Gene Promoter in Breast and Colorectal Carcinoma Cell Lines 2013. 2014 Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Iran *J Cancer Prev*; 6(2): 59–64.
- Alnemri, E. S., Fernandes-Alnemri, T. & Litwack, G., 1995. Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities. *J Biol Chem* 270, 4312-4317.
- Ang, Z., Er, J. Z. & Ding, J. L., 2015. "The short-chain fatty acid receptor GPR43 is transcriptionally regulated by XBP1 in human monocytes", *Sci Rep* 5, 8134. doi:10.1038/srep08134.
- Anonymus. 2012. <http://www.cancer.org/Cancer/ShowAllCancerTypes/index>. Cancer types.
- Assefa, Z., Vantieghem, A., Garmyn, M., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., Bouillon, R., Merlevede, W., Agostinis, P., 2000. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*;275:21416-21.
- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., and Buchner, J., 2002. p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol*, 322:917-927.
- Blagosklonny, M. V. 2002. P53: An ubiquitous target of anticancer drugs. *International Journal of Cancer*, 98:161-166.
- Boatright, K. M., Salvesen, G. S., 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*;15:725-31.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D., 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor- induced cell death. *Cell*;85:803-15.
- Cabadak, H., 2008. Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 9 (3): 51-61.
- Caricchio, R., Reap, E. A, Cohen, P. L., 1998. Fas/Fas ligand interactions are involved in Ultraviolet-B-induced human lymphocyte apoptosis. *J Immunol*;161: 241-51.
- Chang, D. W., Xing, Z., and Pan, Y., 2002. Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c- FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J*;21:3704-14.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S. J., 2001. "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis", *Mol Cell* 8, 705-711.
- Clément, V., Dunand-Sauthier, I., Wiznerowicz, M., Clarkson, S. G., 2007. UV-induced apoptosis in XPG dependent fibroblasts involves activation of CD95 and caspase but not p53. *DNA Repair*;6:602- 14.

- Colditz, G., Ryan, C. T., Dart, C. H., 2003. Lifestyle Behaviors Contributing to the Burden of Cancer. Bookshelf ID: NBK223925.
- Crompton, M., 2000. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*;12:414-9.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*;35:495-516.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342.
- Fışkın, K., 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.
- Franklin, D. J., Brussaard, C. P. D., Berges, J. A., 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *Eur J Phycol*;41:1-14.
- González-Cabo P1, Vázquez-Manrique RP, García-Gimeno MA, Sanz P, Palau F., 2005. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet.* Aug 1;14(15):2091-8. Epub Jun 16.
- Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H. and Lang, F., 2000. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F605-615.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes- Alnemri, T., Alnemri, E. S., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem*;277:13430-7.
- Gültekin, N.; Karaoğlu, K., and Küçükateş, E., 2008, Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 36(2):120-130.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A., 2000. "The hallmarks of cancer", *Cell* 100, 57-70.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y., 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*;116:4077-85.
- Henseleit, U., Zhang, J., Wanner, R., Haase, I., Kolde, G., Rosenbach, T., 1997. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*;109:722-7.
- Huang, D. C. and Strasser, A., 2000. "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death", *Cell* 103, 839-842.
- Igata, E., and Inoue, T., 1999. Ohtani-Fujita N , Sowa Y , Tsujimoto Y , Sakai T . Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene promoter Non-U.S. Gov't, *Journal Article Gene* [01 Oct 1999, 238(2):407-415.
- Igney, F. H., Krammer, P. H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*;2:277-88.
- İnci, A., Yıldırım, A., Yavuz, A. and Düzlü, Ö., 2009. Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg* 6, 121-133.
- Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A. and Kabelitz, D., 2003. "CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule?", *Cell Death Differ* 10, 1215-1225. doi:10.1038/sj.cdd.4401305.
- Jiang, X., and Wang, X., 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*;73:87-106.
- Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., and Blenis, J., 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*;8: 1001-8.

- Katagiri, C., Nakanishi, J., Kadoya, K., Hibino, T., 2006. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UVinduced apoptosis via suppression of C-JUN NH2- terminal kinase. *J Cell Biol* b;172:983-90.
- Katagiri, C., Negishi, K., and Hibino, T., 2006. C-JUN N-terminal kinase-1 (JNK1) but not JNK2 or JNK3 is involved in UV signal transduction in human epidermis. *J Dermatol Sci* a;43:171-9.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. And Currie, A. R., 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Koh, D., Wang, H., Lee, J., *et al.* 2003. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97. *Br J Dermatol* 148:1161.
- Kumar, V., Abbas, A. & Robbins, S. L., 1992. *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company.
- Kumar, V., Abbas, A. and Aster, J., 2010. Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease. Elsevier Health Sciences.doi.ork7/10.1016/b978-1-4377-0792-2.500005-5.
- Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Nam, S. W., Kim, C. J., Cho, Y. G., Lee, J. H., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, N. J., Lee, S.H., 2004. Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers . *Carcinogenesis*. Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea. Aug;25(8):1371-6. Epub 2004 Mar 19.
- Lei, J., Hao, W., Chunli, Sh., Ke, L., Meidong, L., Nian, W., Kangkai, W., Huali, Zh., Guiliang ,W.,and Xianzhong, X., 2014. ZNF667/Mipu1 Is a Novel Anti-Apoptotic Factor That Directly Regulates the Expression of the Rat Bax Gene in H9c2 Cells. November 14, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111653>.
- Li, J., Lee, B., Lee, A. S., 2006. Endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. Multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 281:7260-70.
- Liang, X., Xu, K., Xu,Y., Liu, J, Qian, X., 2011. B1-induced caspase-independent apoptosis in MCF-7 cells is mediated by down-regulation of Bcl-2 via p53 binding to P2 promoter TATA box Epub 2011 Jul 23.State Key Laboratory of Bioreactor Engineering & Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, #268, 130 Meilong Road, Shanghai 200237, People's Republic of China. 1;256(1):52-61. doi: 10.1016/j.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B., 2000. "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues", *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Louzada, S., Adega, F., Chaves, R., 2012. Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an in vitro cell model for Erbb2. *PloS one*, 7(1) e29923.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*;94:481-90.
- Macdonald, F., Ford, C. H. J., Casson, A. G., 2004. Molecular biology of cancer. 2nd ed. New York: BIOS Scientific; c269p.
- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J., and Granzyme, A., 2005. induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*;22:355-70.
- Marusyk, A., and Polyak, k., 2010. "Tumor heterogeneity: Causes and consequences." *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1805**(1): 105-117.
- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak, T. W., Sloetjes, A. W., de Witte, T., Waksman, G. & Korsmeyer, S. J. 1998. "Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX", *Blood* 91, 2991-2997
- Mendelsohn, A. R., Hamer, J. D., Wang, Z. B., and Brent, R., 2002. Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*;99:6871-6.
- Min, Wu., Han-Fei, Ding., 2015. Apoptosis: Molecular Mechanisms.
- Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C. and El-Deiry, W. S., 2000. "Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis", *Cancer Res* 60, 6318-6325.
- Miyashita, T. & Reed, J. C., 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Reed, J. C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Naik, E., Michalak, E. M., and Villunger, A., Adams, J. M., Strasser, A., 2007 Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol*;176:415- 24.
- Norbury, C. J., and Zhivotovsky, B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*;23:2797-808.
- Oike, T., Ogiwara, H., Amornwachet, N., Nakano, T. and Kohno, T., 2014 Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *J Radiat Res*;55(4):613-28. doi: 10.1093/jrr/rrt227.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C., Zunino, F., 1996. Association between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems .Division of Experimental Oncology, Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy. Feb 1;56(3):556-62.
- Peus, D., Vasa, R. A., Beyerle, A., Meves, A., Krautmacher, C., and Pittelkow, M. R., 1999. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*;112:751-6.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., and Gabai, V. L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*. Feb 1;283(1):1-16.

- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., *et al.* 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*; 14:813
- Rajesh P. Rastogi, R., and Rajeshwar P. S., 2009. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity.
- Sager, R. 1997. Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. (PNAS), 94:952–955.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. & Venkatachalam, M. A. 1999. "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease", *Am J Med* 107, 489-506.
- Schneider, S. S., Schick, C., Fish, K. E., Miller, E., Pena, J. C., Treter, S. D., Hui, S. M., and Silverman, G. A. 1995. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 3147-51.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S. J., 2003. Bax and Bak regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*; 300:135-9.
- Semaan, S. J., Li, Y. & Nickells, R. W. (2010) A single nucleotide polymorphism in the Bax gene promoter affects transcription and influences retinal ganglion cell death. *ASN Neuro* 2, e00032. doi:10.1042/AN20100003.
- Smith, M. D., Ensor, E. A., Coffin, R. S, Boxer, L. M., and Latchman, D. S. 1998. Bcl-2 Transcription from the Proximal P2 Promoter Is Activated in Neuronal Cells by the Brn-3a POU Family Transcription Factor. *J Biol Chem.* Jul 3;273(27):16715-22.
- Sutherland, R. L. 1999. *Molecular basis of carcinogenesis*. In: Bishop JF, ed. *Cancer Facts: A Concise Oncology Text*. London, UK: CRC Press.
- Suzuki, C., Kawano, M., Kashiwagi, T., Arata, Y., Kawasumi, T., and Kashiwagi, Y., 2000. Lethal effect of the expression of a killer gene SMK1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Eng.* Feb;13(2):73-6.
- Toraman, E., 2017. İnsan BAX geni promotör bölgesinin fonksiyonel analizi. (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tunç, İ., Zergeroğlu, S. & Daylan, B. H., 2004. "Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonları ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu", *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* 7, 140-148.
- Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M., 2007. Modelling breast cancer one size does not fit all. *Nature reviews Cancer*; 7(9) 659-672.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L., 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; 102:43-53.
- Wei, M. C., Cheng, E. H., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S. J. 2001. "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis", *Mol Cell* 8, 705-711.

- Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. & Van Dyke, T., 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* **385**, 637-640. doi:10.1038/385637a0.
- Zou, H., Li, Y. C., Liu, H. S., Wang, X. D., 1999. An APAF-1 center dot cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*;274:11549-56.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İran’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Tahran’da tamamladım. 2006-2010 yılları arasında Tahran Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik bölümünde lisans öğrenimimi tamamlayarak Moleküler Biyoloji ve Genetik uzmanı ünvanı ile mezun oldum. Yüksek lisans öğrenimimi 2011-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda tamamladım. Doktora öğrenimimi 2013-2017 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda tamamladım.