

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



**NonO/p54^{nrb} PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVGİ BAYSAL

BALIKESİR, MAYIS - 2016

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**



**NonO/p54^{nrb} PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVGİ BAYSAL

**Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOGAN TÜRKOĞLU
(Tez Danışmanı)**

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışmanı)

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

BALIKESİR, MAYIS - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sevgi BAYSAL tarafından hazırlanan "NonO/p54^{nr}
PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE FONKSİYONEL ANALİZİ"
adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.05.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda
verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen
Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN
TÜRKOĞLU

Eş Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Üye
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Üye
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi tarafından 2015-190 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**NonO/p54^{nrb} PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE FONKSİYONEL
ANALİZİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEVGİ BAYSAL
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, MAYIS 2016**

NonO/p54^{nrb} (Non-POU domain içeren octamer bağlanma protein), insanlarda NONO geni olarak kodlanan bir proteindir ve SFPQ, SPI1 ve androjen reseptörleri ile etkileşimi gösterilmiştir. Son zamanlarda NonO/p54^{nrb}'nin paraspeckles olarak adlandırılan yeni bir nükleer domainin bileşeni olduğu belirtilmiştir. Paraspeckles memeli hücrelerinin interkromatin bölgesinde bulunan alt nükleer gövdelerin nispeten yeni bir sınıfıdır. Böylece paraspeckles ve onun bileşenleri farklılaşma, viral enfeksiyon ve stres cevapları dahil olmak üzere birçok hücrel işlemler sırasında gen ekspresyonunun kontrolünde bir role sahiptir. Ayrıca NonO/p54^{nrb} transkripsiyonun başlamasında, RNA işlenmesinde, transkripsiyonun uzaması, sonlanması dahil olmak üzere nükleus içerisinde çeşitli işlemlere katılmaktadır. Bununla birlikte NonO/p54^{nrb}'nin transkripsiyonel regülasyonu hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Çalışmamızda prostat kanser modeli (PC3) ve normal endotel hücrelerinde bu genin hipoksik regülasyonu analiz edilmiştir. İlk olarak on farklı hücre hattında (Hela, HUVEC, HT-29, MCF-7, PC3, Du145, Hep3B, Panc, Saos, Mg63) NonO/p54^{nrb}'nin ekspresyon profili belirlenmiştir. Kimyasal olarak CoCl₂ ile uyarılmış hipoksik model kullanılmıştır. Hipoksiya sqRT-PCR kullanılarak HIF-1 α mRNA seviyeleri ile doğrulanmıştır. mRNA seviyesindeki NonO/p54^{nrb} gen ekspresyonu, protein ve transkripsiyonel aktivite seviyeleri analiz edilmiştir. NonO/p54^{nrb} farklı promotor parçaları (P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529, P4: -159/+529) pMetLuc lusiferaz vektör içerisine klonlanmıştır. Bazal promotor aktivitesi geçici tranfeksiyon deneyleri ile belirlenmiştir. Parçaların bazal aktivitesi 48 saatteki hipoksiyada artmıştır. NonO/p54^{nrb} mRNA ve protein seviyeleri 72 saatteki hipoksiya tarafından uyarılmıştır. Buna ek olarak EMSA ile promotordaki olası HIF-1 α bağlanma bölgesi (+471/+529 bç) gösterilmek için çalışılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: NonO/p54^{nrb}, Regülasyon, Hipoksi, PC3 hücre hattı, HUVEC hücre hattı.

ABSTRACT

CLONING OF THE HUMAN NonO/p54^{nrb} PROMOTOR AND FUNCTIONAL ANALYSIS
MSC THESIS
SEVGİ BAYSAL
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)
(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, MAY 2016

NonO/p54^{nrb} (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) is a protein that in humans is encoded by the NONO gene and has been shown to interact with SFPQ, SPI1 and Androgen receptor. NonO/p54^{nrb} was recently shown to be a component of a novel nuclear domain termed paraspeckle. Paraspeckles are a relatively new class of subnuclear bodies found in the interchromatin space of mammalian cells. Paraspeckles and their components may ultimately have a role in controlling gene expression during many cellular processes including differentiation, viral infection, and stress responses. Additionally, NonO/p54^{nrb} participate in numerous processes within the nucleus, including transcription initiation, RNA processing, transcription elongation, and termination. However there is limited information about the transcriptional regulation of NonO/p54^{nrb}. We analyzed the hypoxic regulation of this gene in prostate cancer model (PC3) and normal endothelial cells (HUVEC). Firstly, we determined the expression profile of NonO/p54^{nrb} in ten different cell lines (Hela, HUVEC, HT-29, MCF-7, PC3, Du145, Hep3B, Panc, Saos, Mg63). We used chemically induced hypoxic model using CoCl₂. Hypoxia was confirmed by HIF1 α mRNA level using sqRT-PCR. We analyzed NonO/p54^{nrb} gene expression at mRNA, protein and transcriptional activity level. We cloned different NonO/p54^{nrb} promoter constructs (P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529, P4: -159/+529) into pMetLuc lusiferase vector. Basal promoter activity were determined by transient transfection assays. Basal activity of constructs increased in hypoxia at 48 h. NonO/p54^{nrb} mRNA and protein levels were induced by hypoxia at 72 h. Additionally, we tried to show the possible HIF-1 α binding site (+471/+529 bp) in the promoter with EMSA.

KEYWORDS: NonO/p54^{nrb}, Regulation, Hypoxia, PC3 cell line, HUVEC cell line.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Hipoksiya.....	1
1.1.1 HIF-1 α (Hipoksiya ile İndüklenen Faktör 1).....	2
1.1.2 HIF-1 α 'nın Parçalanması.....	2
1.1.3 HIF-1 α 'nın Düzenlenmesi	3
1.1.4 Hücre Kültüründe Hipoksik Koşul Oluşturulması.....	4
1.1.4.1 Kimyasal Hipoksi	4
1.1.4.2 Fiziksel Hipoksi.....	7
1.2 Ökaryotik Çekirdek Yapısı.....	8
1.3 Paraspeckles	9
1.3.1 Paraspeckles Bileşenleri	10
1.3.2 DBHS Protein Ailesi.....	13
1.3.2.1 PSpC1 (Paraspeckle protein 1).....	14
1.3.2.2 PSF/SFPQ [PTB (Poliprimidin Bölgesine Bağlanan Protein) ile İlişkili Splicing Faktör]	15
1.3.2.3 NonO/p54 ^{nrb}	16
1.4 Multifonksiyonel NonO/p54 ^{nrb}	17
1.4.1 NonO/p54 ^{nrb} 'nin Splicing Mekanizmasındaki Görevi	17
1.4.2 Farklı Genlerin Transkripsiyonel Regülasyonunda NonO/p54 ^{nrb} 'nin Görevi	19
1.4.3 NonO/p54 ^{nrb} - HIV.....	23
1.4.4 NonO/p54 ^{nrb} –Topoizomeraz I.....	24
1.4.5 NonO/p54 ^{nrb} Kanser ile İlişkisi	24
1.5 NonO/p54 ^{nrb} Promotor Yapısı	26
1.6 Çalışmamızın Amacı	27
2. MATERYAL VE METOT	30
2.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler.....	30
2.2 Çalışma Alanının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	32
2.3 NonO/p54 ^{nrb} Ekspresyon Çalışmaları.....	33
2.3.1 NonO/p54 ^{nrb} Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Tasarımı	33
2.3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	34
2.3.2.1 Hücre Hatları	34
2.3.2.2 FCS (Fetal Sığır Serum) İnaktivasyonu ve Medyumun Hazırlanması.....	34
2.3.2.3 Hücre Hatlarının Büyütülmesi.....	35
2.3.2.4 Hücre Sayımı	35
2.3.2.5 Hücre Soylarının Deney Kaplarına Alınması ve Hipoksik Koşul Oluşturulması	36

2.3.2.6	Hücre Hatlarının Dondurulması	37
2.3.3	RNA İzolasyonu	38
2.3.3.1	RNA Miktar Tayini	38
2.3.3.2	RNA Jel Elektrofrezisi	38
2.3.3.3	cDNA Sentezi	39
2.3.3.4	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışması	39
2.3.4	Real Time PCR	40
2.3.5	MTT	41
2.4	NonO/p54 ^{nrb} Promotorunun Klonlaması	42
2.4.1	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Parçalarının Oluşturulması	42
2.4.2	Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları	44
2.4.3	Çalışmada Kullanılan Vektörler	44
2.4.4	Kandan Genomik DNA İzolasyonu	46
2.4.5	Kompetant Hücrelerinin Hazırlanması	46
2.4.6	Promotor Parçalarının Çoğaltılması.....	47
2.4.7	Agaroz Jel Elektrofrezisi ve DNA Pürifikasyonu	47
2.4.8	T:A Klonlama	48
2.4.9	Ligasyon Ürününün Kompetant Hücrelerine Transformasyonu	48
2.4.10	Küçük Ölçekli (Mini-Prep) Plazmid DNA İzolasyonu	49
2.4.11	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi.....	49
2.4.12	Dizi Analizi.....	49
2.4.13	pMet-Luc Vektörüne Alt Klonlama.....	49
2.4.14	Çok Kopyalı Plazmid DNA İzolasyonu (Maxiprep)	50
2.4.15	Lipofectamine 2000 Reagent ile Geçici Transfeksiyon.....	50
2.4.15.1	Lusiferaz Aktivitesinin Ölçümü	51
2.4.15.2	Salınan Alkalın Fosfataz Aktivitesinin Ölçümü.....	51
2.5	Western Blot.....	52
2.5.1	RIPA Buffer ile Protein Ekstraktının Hazırlanması	52
2.5.2	Protein Miktar Tayini.....	52
2.5.3	SDS PAGE.....	53
2.5.4	Proteinlerin Membrana Transferi.....	55
2.5.5	Bloklama ve Antikor Uygulaması	56
2.5.6	UVP Görüntülenme Sistemi	56
2.6	Emsa	56
2.6.1	Nükleer Ekstrakt Hazırlanışı.....	56
2.6.2	Oligoların Etiketlenmesi	58
2.6.3	Oligonükleotidlerin Bağlanması	59
2.6.4	Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması	59
2.6.5	Poliakrilamid Jel Hazırlanması	59
2.6.6	Proteinlerin Membrana Transferi.....	60
3.	BULGULAR	61
3.1	NonO/p54 ^{nrb} Farklı Kanser Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi.....	61
3.2	Hipoksik ve Normoksik Koşulda Sağlıklı Epitel Hücre (HUVEC) Hattı ve Prostat Kanseri Hücre (PC3) Hattındaki NonO/p54 ^{nrb} 'nin mRNA ve protein seviyesinin belirlenmesi	66
3.2.1	Hipoksik Koşulun Oluşturulması ve Doğrulanması	66
3.2.2	MTT Analizi ile Hipoksik Koşulun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....	69

3.2.3	NonO/p54 ^{nrb} Geninin Hipoksik ve Normoksik Koşullardaki Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi	70
3.2.4	Hipoksik ve Normoksik Koşullarda NonO/p54 ^{nrb} Protein Seviyesinin Belirlenmesi	72
3.3	NonO/p54 ^{nrb} Promotorunun Klonlanması	74
3.3.1	NonO/p54 ^{nrb} Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ..	74
3.3.2	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Delesyon Parçalarının Oluşturulması.....	79
3.3.3	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Parçalarının pMetluc Vektörüne Alt Klonlanması.....	83
3.4	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	92
3.4.1	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Parçalarının Transfeksiyonu ve Bazal Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi.....	92
3.4.2	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Parçalarının Hipoksik Koşuldaki Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi	94
3.5	Emsa	98
3.5.1	NonO/p54 ^{nrb} Promotor Dizisine Olası Transkripsiyon Faktörleri Bağlanma Bölgeleri	98
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	104
5.	KAYNAKLAR.....	111
6.	EKLER.....	119

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: Normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın degradasyonu [3].....	3
Şekil 1.2	: Hipoksik ve normoksik koşuldaki HIF-1 α [3].....	4
Şekil 1.3	: CoCl ₂ ile hipoksik koşul mekanizması [8].....	6
Şekil 1.4	: Kapalı haznede hipoksik koşul [9].....	8
Şekil 1.5	: Hela hücresindeki paraspeckles gövdeleri [14].	9
Şekil 1.6	: Paraspeckles oluşumu [13].	11
Şekil 1.7	: DBHS protein ailesi domain yapısı ve paraspeckles biyolojisinde ilişkili olan bölgeler. RRM: RNA tanıma motifi, PSPC1: Paraspeckles protein 1, PSF: poliprimidin bölgeye bağlanan splicing faktör , P54NRB: 54 kDA Nükleer RNA bağlanma protein [13].....	14
Şekil 1.8	: NonO/p54 ^{nrb} 'nin X kromozomu üzerindeki lokasyonu [18].	16
Şekil 2.1	: Hemositometri.....	36
Şekil 2.2	: MTT metodu ile oluşan kimyasal değişim.....	42
Şekil 2.3	: NonO/p54 ^{nrb} promotor parçalarının temsili diyagramı.	43
Şekil 2.4	: pGEM-T Easy vektör haritası.	45
Şekil 2.5	: pMetLuc-Reporter vektör haritası.....	45
Şekil 3.1	: Çalışmanın 1. Basamağına ait akış diyagramı.	61
Şekil 3.2	: İnsan NonO/p54 ^{nrb} mRNA transkripsiyon varyant 4 mRNA NCBI dizisinden belirlenen primer bölgeleri [18].....	62
Şekil 3.3	: Farklı kanser hücre hatlarının morfolojik görüntüsü.	63
Şekil 3.4	: 10 farklı hücre hattının (Hela: Servikal kanser, Huvec: Sağlıklı endotel hücre, Ht-29: Kolon kanseri, MCF7: Meme kanseri, PC3: Prostat kanseri, Du145: Prostat kanseri, Hep3B: Karaciğer kanseri, Panc: Pankreas kanseri, Saos: Kemik kanseri, Mg63: Kemik kanseri) RNA jel elektroforez görüntüsü.....	64
Şekil 3.5	: NonO/p54 ^{nrb} geninin densitometrik analizi, a) NonO/p54 ^{nrb} geni ve H- β -2 kontrol geninin 10 farklı (Hela: Servikal kanser, Huvec: Sağlıklı endotel hücre, Ht-29: Kolon kanseri, MCF7: Meme kanseri, PC3: Prostat kanseri, Du145: Prostat kanseri, Hep3B: Karaciğer kanseri, Panc: Pankreas kanseri, Saos: Kemik kanseri, Mg63: Kemik kanseri) hücre hattındaki agaroz jel görüntüsü, b) NonO/p54 ^{nrb} geninin farklı kanser hücre hatlarındaki densitometrik analizi.	65
Şekil 3.6	: Çalışmanın 2. basamağına ait akış diyagramı.	66
Şekil 3.7	: PC3 hücrelerinden hipoksik ve normoksik koşullar altında 24,48 ve 72 saat aralıklarında elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 3.8	: HUVEC hücrelerinden hipoksik ve normoksik koşullar altında 24,48 ve 72 saat aralıklarında elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü..	67
Şekil 3.9	: PC3 hücrelerinde HIF-1 α eksresyonu ile hipoksik koşulun doğrulanması.	68
Şekil 3.10	: HUVEC hücrelerinde HIF-1 α eksresyonu ile hipoksik koşulun doğrulanması.	68
Şekil 3.11	: PC3 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşulun hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi.	69

Şekil 3.12 : Huvec hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşulun hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi.	70
Şekil 3.13 : PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} mRNA ekspresyonu.....	71
Şekil 3.14 : Huvec hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} mRNA ekspresyonu.	71
Şekil 3.15 : PC3 hücrelerinde hipoksik ortamda NonO/p54 ^{nrb} protein ekspresyonu.	73
Şekil 3.16 : HUVEC hücrelerinde hipoksik ortamda NonO/p54 ^{nrb} protein ekspresyonu.	73
Şekil 3.17 : Çalışmanın 3. basamağına ait akış diyagramı.	74
Şekil 3.18 : Kandan genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1kb, Kandan Genomik DNA).....	75
Şekil 3.19 : NonO/p54 ^{nrb} 1259 bç'lik P1 (-730/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).....	76
Şekil 3.20 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1259 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker)....	77
Şekil 3.21 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1259 bç'lik P1 (-730/+529) bölgenin dizileme Blast N sonucu.....	78
Şekil 3.22 : NonO/p54 ^{nrb} 1045 bç'lik P2 (-516/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).....	80
Şekil 3.23 : NonO/p54 ^{nrb} 865 bç'lik P3 (-336/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).....	81
Şekil 3.24 : NonO/p54 ^{nrb} 688 bç'lik P1 (-159/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).....	81
Şekil 3.25 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 688 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker)....	82
Şekil 3.26 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 865 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker)....	82
Şekil 3.27 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1045 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker)	83
Şekil 3.28 : pMetluc reporter vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kontrol kesim agaroz jel görüntüsü.	84
Şekil 3.29 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 688 bç'lik P4 (-159/+529) promotor bölgesinin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.	84
Şekil 3.30 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 688 bç'lik P4 (-159/+529) promotor bölgesi dizileme Blast N sonucu.	85
Şekil 3.31 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 865 bç'lik P3 (-336/+529) promotor bölgesinin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.	86
Şekil 3.32 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 865 bç'lik P3 (-336/+529) promoter bölgesi dizileme Blast N sonucu.	86
Şekil 3.33 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1045 bç'lik P2 (-516/+529) promotor bölgesinin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.	87
Şekil 3.34 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1045 bç'lik P2 (-516/+529) promoter bölgesi dizileme Blast N sonucu.	88
Şekil 3.35 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1259 bç'lik P1 (-730/+529) promotor bölgesinin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.	89

Şekil 3.36	: pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1259 bç'lik P1 (-730/+529) promoter bölgesi dizileme Blast N sonucu.	90
Şekil 3.37	: Çalışmanın 4. basamağına ait akış diyagramı.	92
Şekil 3.38	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} P1 (-730/+529) promotorunun miktar optimizasyonu.	93
Şekil 3.39	: NonO/p54 ^{nrb} P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçaları temsili diyagramı.	93
Şekil 3.40	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} promotor parçalarının bazal aktivasyonu a) P1:-730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529, b) PC3 hücrelerinde pmetluc kontrol vektörünün transkripsiyonel aktivitesi, klonlama olmayan pmetluc boş vektör ve transfeksiyon yapılmamış PC3 hücresi kontrol grafiği.	94
Şekil 3.41	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} P1 promotor bölgesinin (-730/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.	96
Şekil 3.42	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} P2 promotor bölgesinin (-516/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.	96
Şekil 3.43	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} P3 promotor bölgesinin (-336/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.	97
Şekil 3.44	: PC3 hücrelerinde NonO/p54 ^{nrb} P4 promotor bölgesinin (-159/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.	97
Şekil 3.45	: Çalışmanın 5. basamağına ait akış diyagramı.	98
Şekil 3.46	: NonO/p54 ^{nrb} promotor bölgesinin Ali BABA 3.1 programı ile olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin analizi.	99
Şekil 3.47	: NonO/p54 ^{nrb} DNA protein kompleks görüntüsü. 1: Free prob, 2: Prob+ N.E (Normoksia), 3: Cold prob N.E (Normoksia) + Prob, 4: Prob+ N.E (Hipoksiya), 5: Cold prob + N.E (Hipoksiya) + Prob... ..	102
Şekil 3.48	: Emsa yarışma deneyi.	103
Şekil A.1	: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.	119
Şekil A.2	: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.	120

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : Paraspeckles Bileşenleri [13].	11
Tablo 2.1 : Çalışmada kullanılan cihazlar.	30
Tablo 2.2 : Çalışmada kullanılan kimyasallar.	31
Tablo 2.3 : Çalışmada kullanılan kitler.	32
Tablo 2.4 : NonO/p54 ^{nrb} ve H-β-2 ekspresyon primer dizisi.	33
Tablo 2.5 : Çalışmada kullanılan hücre hatları.	34
Tablo 2.6 : RNA jel elektroforezi için solüsyonlar.	39
Tablo 2.7 : Hβ2 primerleri için PCR koşulları.	40
Tablo 2.8 : NonO/p54 ^{nrb} için PCR koşulları.	40
Tablo 2.9 : HIF-1α ekspresyon primeri.	41
Tablo 2.10 : Real time PCR koşulları.	41
Tablo 2.11 : NonO/p54 ^{nrb} promotor primer bilgileri.	43
Tablo 2.12 : Çalışmada kullanılan kompetant hücreler.	44
Tablo 2.13 : pGEM-T Easy vektörü ligasyon koşulları.	48
Tablo 2.14 : pMet-Luc Vektör Ligasyon Koşulları.	50
Tablo 2.15 : RIPA Buffer Solüsyonunun İçeriği.	52
Tablo 2.16 : %10 Ayırma jeli.	53
Tablo 2.17 : %5 Yığma jeli.	54
Tablo 2.18 : Western çalışmasında kullanılan solüyonlar.	55
Tablo 2.19 : Nükleer Ekstrakt için gereken solüsyonların hazırlanışı.	57
Tablo 2.20 : EMSA çalışması için gereken malzemeler.	58
Tablo 2.21 : EMSA için Poliakrilamid jel hazırlanışı.	60
Tablo 3.1 : NonO/p54 ^{nrb} promotorunun 1259 bç'lik P1 (-730/+529) bölgesi için optimize edilmiş PCR koşulları.	75
Tablo 3.2 : NonO/p54 ^{nrb} promotor bölgesi için optimize edilmiş PCR döngü koşulları.	76
Tablo 3.3 : NonO/p54 ^{nrb} promotorunun 1045 bç'lik P2 (-516/+529), 865 bç'lik P3 (-336/+529) ve 688 bç'lik P4 (-159/+529) bölgesi için optimize edilmiş PCR koşulları.	80
Tablo 3.4 : Çalışmada kullanılan EMSA primer dizileri.	101

SEMBOL LİSTESİ

AD	: Aort diseksiyonu
AR	: Androjen reseptörü
bHLH	: Basic-helix-loop-helix
CoCl₂	: Kobalt Klorür
CTD	: Karboksil uç domain
CD-RAP	: Kıkırdak türevi olan retinoik aside duyarlı bir protein
DBHS	: Drosophila melanogaster behavior, human splicing
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
DFO	: Desferrin oksamine-Demir Şelatör Madde
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EPO	: Eritropoietin
GAPDH	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
NonO/p54^{nrb}	: non-POU domain içeren nükleer RNA bağlanma proteini
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HIF-1α	: Hipoksiya ile indüklenen faktör 1
HRE	: Hipoksiya cevap elementi
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
EDTA	: Ethylendiamin tetra Asetik Asit
LB	: Luria Broth
FCS	: Fetal Sığır Serumu
FA	: Formaldehit Agaroz
MIA	: Melanoma inhibitör aktivite proteini
NEAT1	: Protein kodlamayan RNA (ncRNA)
NE	: Nükleer ekstrakt
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel Reaksiyonu
PHD	: Protein prolin hidroksilazlar
RRM	: RNA tanıma motifi,
PSPC1	: Paraspeckles protein 1
PSF	: Poliprimidin bölgeye bağlanan splicing faktör ,
PP1	: Protein fosfotaz 1'e
PRL	: Prolaktin
PR	: Progesteron reseptörü
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı RNA
VEGF	: Vaskular endotelyal büyüme faktörü
YBX1	: Y kutu bağlanma proteini 1

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecimin deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Hücre Kültürü laboratuvarında, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖGLU yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamın her basamağında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, sonsuz sabır ve sevgisiyle her zaman yanımda hissettiğim canım hocam Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖGLU'na,

Tez çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan, engin bilgi ve tecrübesiyle yoluma ışık tutan değerli hocam eşdanışmanım Prof. Dr Feray KÖÇKAR'a,

Laboratuvar çalışmaları ve makale toplantılarında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman yanımda olan, sevgi ve içtenlikleriyle keyifli zamanlar geçirdiğim değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Meltem ALPER, Yrd. Doç. Dr. Ayla SOLMAZ, Dr. Esra TOKAY, Öğr. Gör. Derya ALTAN, Tuğşen AYDEMİR ve Merve KARAMAN'a,

Zorlu laboratuvar günlerinde sevgi ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Gizem GÜLER, Fatma POYRAZLI, Sinem GÜLTEKİN, Gamze GÜNGÖR, Muhammed DOLİYEV ve diğer grup arkadaşlarıma,

Bu zorlu süreçte bana inanan, güvenen ve her zaman destek olan tüm yakınlarıma,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de beni yalnız bırakmayıp her zaman arkamda olan canım annem Nevin BAYSAL, ablalarım Sinem BAŞAK ve Aygün ATMACA'ya,

Okumamı isteyip maddi manevi bana destek olan varlığını her zaman yanımda hissettiğim canım babam Yunus BAYSAL'ı rahmetle anıyor

Teşekkürlerimi sunuyorum.

1. GİRİŞ

1.1 Hipoksiya

Memelilerde ATP sentezi sırasında oksijenin bir elektron alıcısı olarak görev yaptığı oksidatif fosforilasyon olayı dahil olmak üzere hücresel yapının temel metabolik faaliyetleri için oksijen gereklidir [1]. Doku oksijenizasyonunun normal değerinin altına düşmesi hipoksiya olarak tanımlanır [2].

Hipoksiya özellikle katı tümörlerde oldukça karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri oksijeni yeterli miktarda alamadığında hücre ölümüne gitmeden çeşitli genetik farklılıklar meydana getirerek hipoksik koşula adapte olmaktadır [3].

Hipoksiyanın, çeşitli tümör tiplerinde radyo yada kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Pek çok klinik araştırmalar tümörün hipoksik olduğunu ve hipoksiyanın yükselmesiyle tümör çapının arttığını göstermektedir. Hipoksik tümör hücrelerinin, apoptoza ve diğer hücre ölüm sinyallerine duyarlılığının azalması ile bölgesel ve sistemik olarak agresif olabilir ve anjiyoogenez, proliferasyon ve sistemik metastaz kapasitesini destekleyen sinyalizasyonu arttırabilmektedir [2].

Programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan apoptozis zararlı hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Pek çok dokunun düzgün gelişiminde önemli rol oynar aynı zamanda yetişkinlerde organ fonksiyonunun gelişimi için kritiktir. Apoptozis çoğunlukla birçok hücre dışı ve hücre içi sinyal molekülleri yada fizyolojik ve patolojik indükleyiciler aracılığıyla başlayabilmektedir. Hücreler yoğun hipoksi yada anoksi (oksijen eksikliği) sırasında hipoksiya ile indüklenmiş ve mutasyona uğramış hücrelerin birikmesini önlemek için apoptoza başlar [4].

Hipoksiyadaki moleküler mekanizmanın genetik cevabı için eritropoez (alyuvar oluşumu) oluşumunu ve kanda oksijen taşıma kapasitesini düzenleyen bir büyüme faktörünü kodlayan (eritropoietin) EPO geni için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. EPO için yapılan çalışmalarda ve daha sonraki hipoksik araştırmalarda

hipoksiyada HIF-1 α 'nın (hipoksiya ile indüklenen faktör I) homeostatik yanıtların aktivitesinde genel bir rolünün olduğu anlaşılmıştır. Transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α 'nın DNA üzerindeki HRE (hipoksi cevap elementi) bölgesine bağlandığı ve bu şekilde hipoksiyaya cevap vererek gen ekspresyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir [1-3].

1.1.1 HIF-1 α (Hipoksiya ile İndüklenen Faktör 1)

İlk olarak 1992 yılında HIF-1 α 'nın hipoksik koşulda EPO'nun 3' hipoksi cevap elementi olan HRE bölgesine bağlanan bir transkripsiyon faktörü olduğu tanımlanmıştır. Bu şekilde eritropoietinin artmasına cevap olduğu belirtilmiştir [3].

Heterodimerik yapıda olan HIF1 iki alt üniteden meydana gelmektedir (120kDA α - alt ünitesi, 91-94 kDA β -alt ünitesi). Bu iki alt ünitesinde bHLH (basic-helix-loop-helix) ve PAS (PER-ARNT-SIM) bölgeleri bulunmaktadır [3].

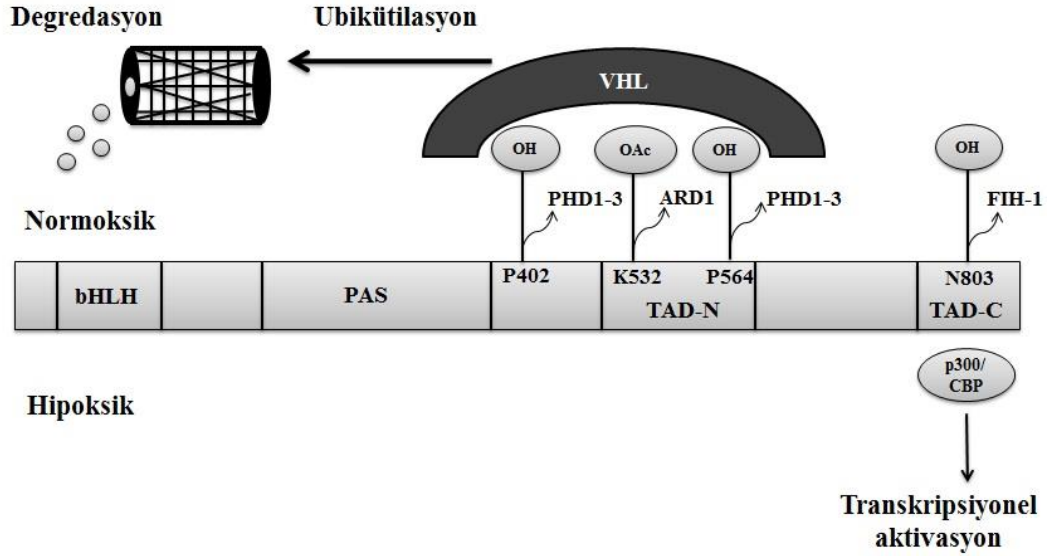
HIF-1 oksijen kaynağı yetersiz hücrelerde bir transkripsiyon faktörü olarak indüklenir. Konstitütif olarak bağlanan HIF- α (HIF-1 α , -2 α , ve -3 α) bir heterodimer oluşturan hücrelerde HIF-1 β ifadesi gerçekleşir. HIF-1 α aynı zamanda normoksik koşullar altında da üretilir. Ancak bir proteolitik enzim kompleksi 26S proteozom tarafından degrade edildiği için fonksiyonu görülmemektedir [5].

1.1.2 HIF-1 α 'nın Parçalanması

Bir tümör baskılayıcı protein olan Von Hippel Lindau (VHL) E3 ubikütin protein kompleksinin bir parçasıdır [3]. Normoksik koşullarda HIF-1 α kararsız haldedir. Kararsız yapıdaki bu protein prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından O₂, alfa-KG, Fe⁺² gibi faktörlerinde etkisiyle iki prolin P402 ve P564 rezidüsü aracılığıyla hidroksillenir. Bu hidroksillenme olayı yeterli oksijene ihtiyaç duymaktadır. Normoksik koşulda hidroksillenen HIF-1 α 'yı VHL protein yakalar [6].

Bununla beraber ARD-1 asetiltransferaz enzimi ile lizin-532'nin asetilasyonu gerçekleşir. Bu durum HIF-1 α 'nın degradasyon hızını arttırır. Ortamdaki Oksijen yeterliliği ile FIH-1 (Factor inhibiting HIF-1) asparjin-803 rezidüsünü

hidroksillemesiyle normalde transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli olan p300/CBP koaktivatörlerinin bağlanmasını engeller. Bu şekilde HIF-1 α 'nın normoksik koşullarda birikimi sağlanamaz ve VHL/ HIF-1 α kompleksi aracılığıyla proteolitik enzim kompleksinde (proteozom) parçalanır (Şekil 1.1) [3].



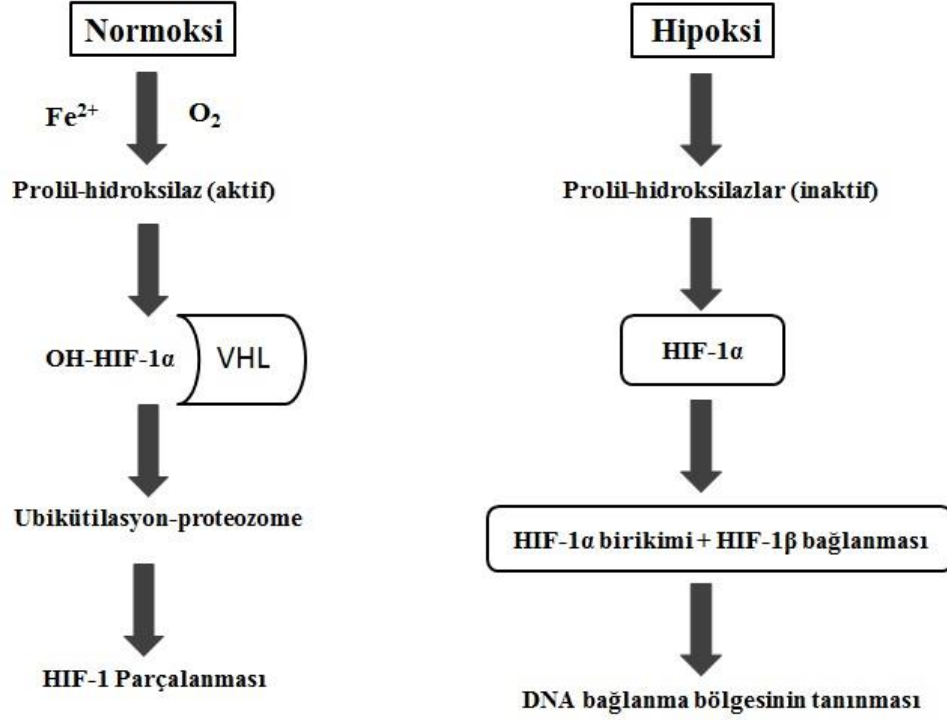
Şekil 1.1: Normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın degradasyonu [3].

1.1.3 HIF-1 α 'nın Düzenlenmesi

HIF-1 α 'nın hipoksiyada degrade olması pek mümkün değildir CBP (CREB 1- bağlayıcı protein) /p300 gibi histon asetilasyon enzimlerine bağlanırlar yada HIF-1 β ile bir heterodimer oluşturmak üzere nukleus içerisine geç ederler. Oluşan kompleksler HRE (5'-ACGTG-3') olarak adlandırılan cevap elementine bağlanırlar. HIF-1 α 'nın Asp-803 DNA üzerinde çeşitli genlerin transkripsiyonunu artırıcı HRE'ye histon asetiltransferaz aktivitesiyle moleküler kompleks CBP/p300'ün bağlanmasını kapsamaktadır. HIF-1 α , trombosit türevli büyüme faktörü VEGF'in ekspresyonunu indükler ve zamanla oksijen ortamını iyileştirir ve anjiyogenezi artırır [5].

HIF-1 α oksijen yetersizliğinden dolayı prolin hidroksilazlar tarafından hidroksilasyonu sağlanamaz kararlı halde kalarak aktifleşir ve sitozolde birikmeye başlar. Daha sonra çekirdek içine girerek heterodimerik yapı oluşturur. HIF-1 α ,

hipoksik koşulda ifade edilen genlerin promotor bölgelerindeki yaklaşık 50 baz çiftlik hipoksi cevap elementi olan HRE bölgesine bağlanır. Bu şekilde hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 1.2) [6].



Şekil 1.2: Hipoksik ve normoksik koşuldaki HIF-1 α [3].

1.1.4 Hücre Kültüründe Hipoksik Koşul Oluşturulması

1.1.4.1 Kimyasal Hipoksi

Hücre kültüründe hipoksik koşul oluşturmak için kullanılan yöntemlerden biri kimyasal kullanımıdır. Kobalt klorür ($CoCl_2$) ve demir şelatörü deforoksamin (DFO) yaygın olarak kullanılan hipoksiyayı taklit eden ajanlardır. Literatürde bu iki kimyasalın kullanımına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

1.1.4.1.1 DFO (Desferrin Oksamine-Demir Şelatör Madde) ile Hipoksik Koşul

Demir homeostazi normal hüce metabolizması için çok önemlidir ve onun eksikliği ya da fazlalığı birçok hastalık durumları ile ilişkilidir. Elde edilen sonuçlara göre demir, hayvanlarda adenokarsinoma, kolorektal tümörler, hepatomalar, meme tümörleri, mezotelyom, renal tübüler hücreli karsinom ve sarkomlar gibi kanserlerin patogeneğinde rol oynayan kanserojen yada kofaktörler olarak bilinmektedir. Hemokromatozise (demir birikimi) maruz hastalarda vücuttaki demir seviyelerinin demir emilimi ve orta derecede evelasyonunun artmasıyla karakterize edilmiştir. Çeşitli maligniteler için belirgin derecede duyarlılığı artmıştır. Kanser gelişimi yada ilerlemesinde demirin patojenik rolü önemli ölçüde bilinmemektedir. Demir şelatör maddeleri in vitro, in vivo ve klinik çalışmalarda kayda değer önemli anti tümör aktivitelere sahiptir. NB4 and U937 lösemi hücrelerinde DFO'nun 25 μM 'dan fazlası mitokondriyal $\Delta\Psi\text{m}$ çöküşü ve kaspaz-3 aktivasyonunu içermesiyle apoptazise geçmesine neden olduğu gösterilmiştir. DFO ayrıca HIF-1 α protein stabilizasyonu ile hipoksi mimetik etkisi göz önüne alındığında bu iki lösemi hücrelerinde diğer hipoksi mimetik ajan CoCl_2 etkisi araştırılmıştır. 50 μM 'dan fazla CoCl_2 konsantrasyonu Mitokondri yolağı aracılığıyla kaspaz 3 aktivasyonu aracılığıyla apoptozise maruz hücrelere neden olduğu gösterilmiştir [4].

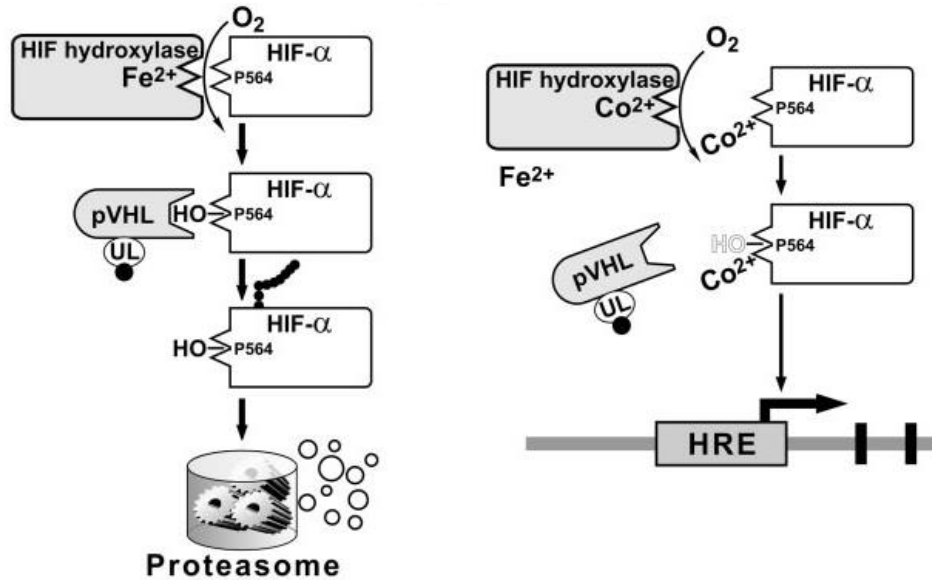
HIF-1 α 'nın proteozomal degradasyonu için hidroksillenmesi gerekmektedir, DFO prolin hidroksilazları inhibe eder. Prolin hidroksilazların inhibe olması bu süreci durdurmakta ve HIF-1 α 'nın birikimine sebep olmaktadır. DFO, HIF-1 α proteininin birikimini uyararak parçalanmasına engel olmaktadır. Deforoksamin ilacı son konsantrasyonu 100 μM olacak şekilde hesaplanarak hücrelere uygulanmaktadır. Bu ilaçların deneylerde pekçok kez açılarak kullanımı mümkün olup ekonomik ve kolaydır [7].

Ancak DFO kullanımında hücreye özgü olarak dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. Literatür incelendiğinde görülmektedirki aktive edilmiş T lenfosit, HL-60 hücreleri, insan lösemi hücre hattı CCRF-CEM, Kaposi sarkoma hücreleri, nöroblastoma hücreleri ve diğer hücrelerde apoptosisi teşvik ettiği gösterilmiştir. Akut miyeloid lösemi (AML) hücreleri üzerinde hipoksiyayı taklit eden CoCl_2 ve DFO maddelerinin apoptozu başlatıcı etkisini araştırmışlardır. Her iki kimyasalında

hem mitokondriyal yolak ile bağımlı hemde HIF-1 α ile bağımsız mekanizmalar ile lösemi hücrelerinde apoptosisi teşvik ettiği anlaşılmıştır. Özellikle bu çalışmada lösemi hücrelerinde HIF-1 yolunu kullandığı gösterilmiştir. Bu yolda NO (Nitric oxide) üzerinden apoptozize götürmektedir. NO L-argininde, NO sentaz sentezlenen küçük bir moleküldür özellikle fizyolojik ve patofizyolojik yollarda farklı roller üstlenebilmektedir [4].

1.1.4.1.1 CoCl₂ ile Hipoksik Koşul

Hücelere belirli konsantrasyonda kobalt (II) klorür (CoCl₂) uygulanarak kimyasal olarak oksijen seviyesi düşürülmektedir. Şekil 1.3’de gösterildiği gibi CoCl₂ ortamdaki prolin hidroksilazlara bağlanır. Bu şekilde prolin hidroksilaz enziminin etkinliğini durdurur ve HIF-1 α ’yı hidroksillemesini engeller. Hidroksilasyon olmadığı için tümör baskılayıcı protein VHL, HIF-1 α ’ya bağlanamaz. HIF-1 α hücrede degrade olmadan aktif hale gelerek birikir ve hedef genlerin transkripsiyonu için promotorlarda bulunan HRE (hipoksi cevap elementi) bölgesine bağlanır [8].



Şekil 1.3: CoCl₂ ile hipoksik koşul mekanizması [8].

1.1.4.2 Fiziksel Hipoksi

1.1.4.2.1 İnkübatör ile Hipoksik Koşul Oluşturulması

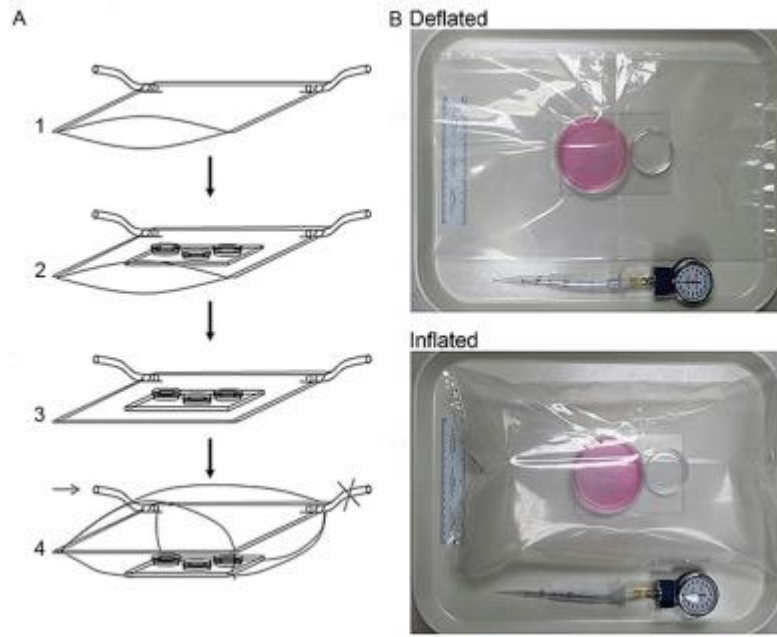
İnkübatör ile hipoksik koşul oluşturulmasında inkübatördeki oksijen ayarı değiştirilerek istenilen şartlar sağlanabilmektedir. Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler normal hücre büyüme koşulları için en altta su haznesi bulunarak içerisinde nem oranı ayarlanmakta ve sıcaklık 37°C olup ortam %5 CO₂ içermektedir. Nemin sağlanabilmesi için su haznesine steril otoklavlanmış su konularak bu koşullar hücreler için uygun hale getirilir [9].

Geliştirilen oksijene ayarlı inkübatörler kullanılarak hücelere özgü olarak istenilen oksijen koşullarını oluşturmak mümkündür. Oksijen yetersizliği yani hipoksik koşullar için oksijen seviyesi %1-5 oranında ayarlanarak hücreleri hipoksik koşula maruz bırakmak mümkündür. Ancak bu inkübatör sistemleri oldukça maliyetli olup aynı anda başka bir araştırmacının deney yapmasını da engellediğinden hipoksik çalışmaları zorlaştırmakta çoğu laboratuvarında tercih edilmemektedir [9].

Literatürde farklı hücrelerde inkübatör ile fiziksel hipoksik koşul oluşturulurken farklı uygulamalar görülebilir. Örneğin yapılan bir çalışmada insan küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizileri olan H1299, A549 ve PC14 uygun koşullarda büyütülerek fiziksel hipoksik koşul oluşturulmuştur. Bunun için modüler inkübatör chamber kullanılmış ve hücreler 7 dakika boyunca %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ gaz karışımına maruz bırakılarak hipoksik koşul oluşturulmuştur [10].

Bir diğer inkübatör bazlı hipoksik koşul ise inkübatörün içinde Şekil 1.4'de gösterildiği gibi kapalı haznede oluşturulmaktadır. Well plakalarında belirli bir miktara ulaşmış hücreler normoksik koşul için %21 hipoksik koşul için %1 O₂ olacak şekilde dengelenir. 16x16 inç boyutunda şişebilen hazneye konulmuştur. Hava geçirmez plastik torba alt köşelerine bağlanmış iki gaz bağlantı noktaları ile hazır hale getirilmiştir. Bir cam plaka kültür kaplarına desteklik sağlamak için içerisine yerleştirilir. Otoklavlanmış su ile ıslatılmış sünger haznenin içine yerleştirilir. Kılıf gaz bağlantısı aracılığıyla yavaşça vakumlanır ve yalıtılmış bir alan oluşturmak için kapatılır. Hazne maksimum kapasitenin hemen hemen %80 dolulukta olacak şekilde belirlenmiş gaz ile, A bağlantı noktasından doldurulur. Gaz çıkışı olan B bağlantı

noktası bir kelepçe ile kontrol edilir. Sızdırmayacak şekilde bağlantı noktalarına bakılarak kelepçeleri ile kapatılır ve hazne 37 C°'de inkübasyona bırakılır. Atmosfer basıncını izlemek için monometre kullanılmıştır. Hipoksik koşul için oksijenin gazı N₂ ile dengelenir ve %5 CO₂ kullanılmaktadır. Gaz doldurulması sırasında gaz akışı 2psi tek kademeli regülatör ile kontrol edilmektedir. Hazne kapasitesinin %80'i doldurulur ve iki bağlantı noktası tamamen kapatılır. Belirli zaman aralıklarında bakılmak için 37°'ye yerleştirilir [9].



Şekil 1.4: Kapalı haznede hipoksik koşul [9].

1.2 Ökaryotik Çekirdek Yapısı

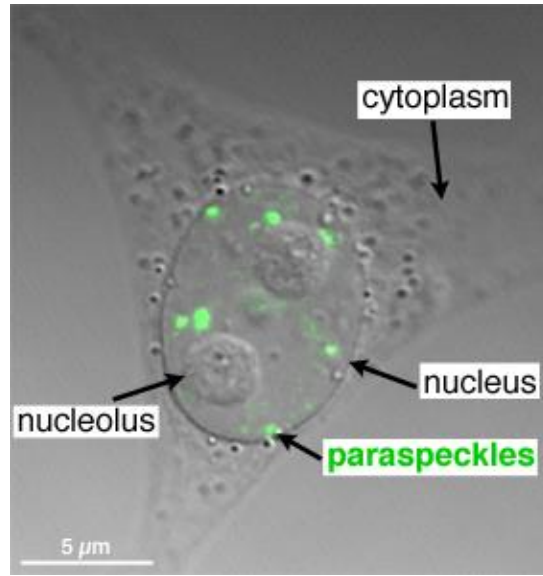
Ökaryotik hücre çekirdeği hücrenin tüm fonksiyonlarının denetlendiği merkezdir. Organizmanın yaşam şifresi çekirdekte bulunan ve genetik kodu taşıyan DNA molekülünde saklıdır. Hücre çekirdeği, özellikle kompleks ökaryotlarda yüksek derecede organize olmuş bir yapıdır. Nükleer organizasyon gen ekspresyonunun kontrolü için büyümeyi, gelişmeyi ve hücre proliferasyonunu etkileyerek genom sürerliliği ile bağlantılıdır [11-12].

Hücre çekirdeğinin büyük ve kompleks halde olan iç organizasyonu hala tam olarak karakterize edilememiştir. Ancak nükleer organizasyonun bir özelliği olarak spesifik nükleik asitler ve nükleer proteinler içeren birbirinden ayrı subnükleer

gövdelerin varlığı artık bilinmektedir. En çok interkromatin bölgede bulunan bu subnükleer gövdeler, Cajal bölge, PML gövdeleri ve paraspeckles, nükleer speckles içermekte olup splicing faktör açısından zengindir [13].

1.3 Paraspeckles

Paraspeckles nispeten yeni tanımlanmış alt nükleer gövdelerdir (Şekil 1.5). Memeli hücre çekirdeğinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoprotein gövdeleridir [12].



Şekil 1.5: HeLa hüresindeki paraspeckles gövdeleri [14].

Bugüne kadar paraspeckles sadece memeli hücre çekirdeğinde açıkça görülmüştür. Memeli doku ve hücreler içerisinde fare ve insan hücre hattı ve dokularının büyük çoğunluğu incelenmiş transforme edilmiş, primer hücre hatları, embriyonik fibroblastlar ve tümörijenik biyopside dahil olmak üzere paraspeckles içermektedir. İlginç bir şekilde şimdiye kadar memeli hücre tipi olan insan embriyonik kök hücrelerinin (hESC) paraspeckles yapısı içermediği rapor edilmiştir [13].

Paraspeckles proteinler PSPC1, P54NRB/NONO yada PSF/SFPQ 'yi içeren memeli DBHS (Drosophila melanogaster behavior, human splicing) protein ailesinin bir üyesidir. Çekirdek içi odaklarında birlikte lokalizasyonu ile tanımlanmıştır. Bu üç

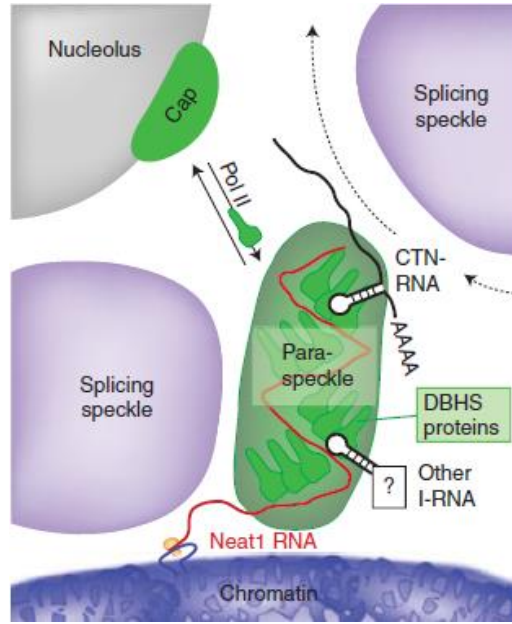
protein iki (RRM) RNA bağlanma motifi ve karboksil ucu sarılmış sarmal domain dahilinde %50 sekans benzerliğine sahiptir [12].

Çekirdek paraspeckles protein bileşenlerinin ortalogları diğer omurgalı omurgasız türlerde de bulunmaktadır. Ancak paraspeckles oluşumu için gerekli olan protein kodlamayan RNA (ncRNA) NEAT1 memelilere özgüdür. Bir paraspeckles yapısı çekirdek speckles yapısına dayanan interkromatin alan içerisinde NEAT1 gen lokusuna yakındır [13].

1.3.1 Paraspeckles Bileşenleri

Paraspeckles proteinlerinin çoğu; DBHS protein ailesinin üyeleri, çeşitli transkripsiyon faktörleri, cotranskripsiyonel splicing faktör ve 3' RNA bölme faktörü dahil olmak üzere Pol II transkripsiyonu ya da RNA işlenmesi sürecinde rollere sahiptir (Tablo 1.1) [13].

Farklı sınıflara ait iki tane spesifik paraspeckles RNA bileşeni vardır. Ctn paraspeckles içerisinde düzenlenmiştir ve RNA nükleer tutunması ile gen ekspresyonunun kontrolünde yer almaktadır. Bol olarak bulunan nükleer ncRNA, NEAT1 ise oluşum ve korunum için gerekli olan yapısal bir paraspeckles bileşenidir (2010, Archa H. Fox). Paraspeckles yapısını zenginleştiren protein ve RNA bileşenleri ile beraber paraspeckles oluşumu Şekil 1.6'da verilmiştir [13].



Şekil 1.6: Paraspeckles oluşumu [13].

Tablo 1.1: Paraspeckles Bileşenleri [13].

	İsim	Diğer İsimleri	Açıklama	Paraspeckles Lokalizasyon Referansı
PROTEİN	P54NRB	NONO, NMT55, NRB54	DBHS: Hela hücrelerinde Paraspeckles bütünlüğü için gereklidir.	Fox ve arkadaşları 2002
	PSF	SFPQ	DBHS: Hela hücrelerinde Paraspeckles bütünlüğü için gereklidir.	Prasanth ve arkadaşları 2005
	PSPC1	PSP1	DBHS	Fox ed al. 2002
	CoAA^a	PSP2, RBM14, SIP, SYTI1	Transkripsiyonel/splicing coregülatör	Fox ed al. 2002
	CFIM68	CPSF6, HRBRII-4	Bölünme faktörü. Ayrıca Nukleer specklesda bulundu.	Dettwiler ve arkadaşları 2004
	SOX9^b	SRA	Gelişimsel transkripsiyon faktörü	Hata ve arkadaşları 2008

Tablo 1.1: (Devamı).

	WTX^a	–	Wilm tümör, tümör baskılayıcı	Rivera arkadaşları 2009
	WT1(+KTS)^a	WAGR	Wilm tümör, paraspeckles ile kısmi colokalizasyonu	Dutton ve arkadaşları 2006
	BCL11A^{a,b}	CTIP1, ZNF856	Zinc finger transkripsiyon faktörü	Liu ve arkadaşları 2006
	RNA Pol II		Aynı zamanda ktomatin ve nükleer speckles ile bağlantılı olduğu bulundu.	Xie ve arkadaşları 2006
RNA	NEAT1	Men ϵ/β , VINC-1	Memelilerde paraspeckles bütünlüğü için gereken uzun kodlamayan RNA bulundu.	Clemson ve arkadaşları 2009 ; Sunwoo et al 2009 ; Sasaki ve arkadaşları 2009
	Ctn		Fare ile spesifik, mCat2 lokusundan alternatif transkript üretimiştir.	Prasanth ve arkadaşları 2005

Hela hücrelerinde yüksek derecede ifade olan iki DBHS proteininin (P54NRB/NONO ve PSF/ SFPQ) her ikisinin knockdown olması paraspeckles yapısının kaybına yol açmaktadır. Bunun aksine Hela hücrelerinde daha az bulunan ve bir DBHS protein ailesi üyesi PSpC1'in knockdown olmasının paraspeckles yapısını etkilemediği görülmüştür. Böylece yüksek derecede ifade olan DBHS protein dimerleri paraspeckle yapısal bütünlüğünün merkezini oluşturmaktadır. Bunların her ikisinin de DNA ve RNA'ya bağlandığı gösterilmiş olup ve farklı kompleksler içinde birlikte purifiye edilmiştir. DBHS protein ailesinin fonksiyonları oldukça geniştir. Bu fonksiyonlar transkripsiyon ve RNA işlenmesinin,

transkripsiyonun başlanması, koaktivasyonu, korepresyonu, konsitütif ve alternatif splicing ve transkripsiyonel sonladırmaı içeren birçok özelliği kapsamaktadır [12].

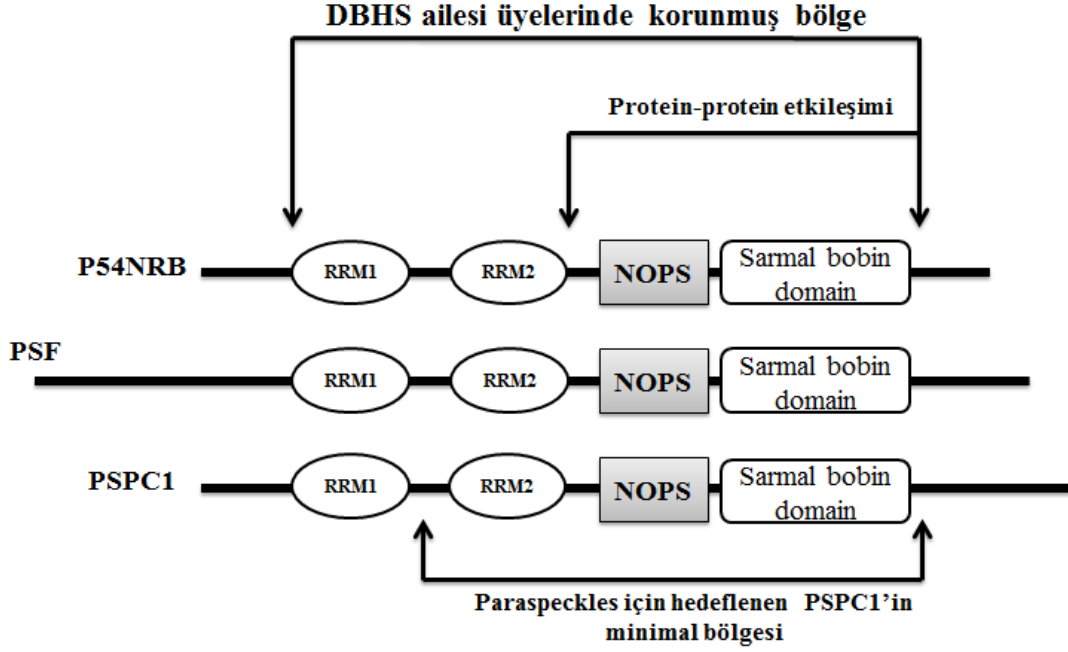
Paraspeckles, DBHS proteinleri ve NEAT1 RNA arasındaki etkileşimler aracılığıyla oluşmaktadır. Paraspeckles oluşumu NEAT1 transkript üretimi ile başlar. Daha sonra DBHS proteini ile kompleks oluştururlar. NEAT1 RNA-DBHS protein komplekslerinin birden fazla kopyası oluşur. Paraspeckles içinde DBHS paraspeckles proteinleri dinamik bir yapı iskeleti oluşturur. Nükleoplazmadaki DBHS proteinlerinin havuzu ile değişim olabilir. DBHS proteinlerinin oligomerizasyon eğilimi olduğu bilinmektedir aynı zamanda muhtemelen paraspeckles yapısal kafesi için hemde NEAT1 ncRNA'sındaki RNA-RNA intramoleküler etkileşimleri için katkı sağlamaktadır. NEAT1 RNA üretimi olmadan paraspeckles oluşmamaktadır. Tüm RNA Pol II transkripsiyonu inhibe edildiğinde yada NEAT1 ifadesi olmayan hücre tiplerinde paraspeckles yapısı gözlemlenememiştir. Paraspeckles ve bunların bileşenleri farklılaşma, viral enfeksiyon, stres yanıtları dahil olmak üzere bir çok hücrel işlem sırasında gen ekspresyonunun kontrolünde farklı rollere sahiptir [13].

1.3.2 DBHS Protein Ailesi

DBHS proteinlerinin paraspecklesın yapısal bütünlüğünde önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. DBHS aile üyesi proteinlerin çift ve tek sarmallı DNA ve RNA'ya bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca çok sayıda farklı komplekslerle etkileşime sahip olan multifonksiyonel nükleer proteinlerdir [13].

Paraspecklesın çekirdek protein bileşenleri olan DBHS protein ailesinin memelilerde üç üyesi vardır. Bunlar PSF/SFPQ, NonO/p54^{nrb} ve PSPC1'dir. Bu proteinlerin memeli hücrelerinde paraspeckles olarak nükleoplazma içerisinde lokalize olduğu gösterilmiştir [13].

Şekil 1.7'de belirtildiği gibi bu üç protein amino terminal RNA bağlayıcı motif ve bir karboksil sarmal bobin domaini içerisinde %50 sekans benzerliğine sahiptir [13].



Şekil 1.7: DBHS protein ailesi domain yapısı ve paraspeckles biyolojisinde ilişkili olan bölgeler. RRM: RNA tanıma motifi, P54NRB: Paraspeckles protein 1, PSF: poliprimidin bölgeye bağlanan splicing faktör , P54NRB: 54 kDA Nükleer RNA bağlanma protein [13].

1.3.2.1 P54NRB (Paraspeckle protein 1)

P54NRB ilk defa proteomik çalışmalarında tanımlanmış ve dinamik yapısı nükleolar bağlantısı keşfedilmiştir. Hücrelerde RNA Polimeraz II transkripsiyonunu inhibisyonu ile P54NRB perinükleer başlık yapıları sınırlanmıştır. P54NRB'in perinükleer zenginleştirici olması hücre bölünmesini takiben transkripsiyonu başlamamış olan yeni bölünmüş hücrelerde gösterilmiştir. Bu nedenle P54NRB transkripsiyonel olarak aktif hücrelerde ve aktif halde transkribe Pol II genleri olmayan hücrelerde perinükleer başlık olarak paraspeckles içinde bulunur [13].

P54NRB ve NonO/p54^{nrb}'nin sekans benzerliği ve sarmal bobin domainleri aracılığıyla etkileşimi olasıdır. Bu domainler sayesinde PSF'inde etkileşimi bulunmaktadır. Protein-protein etkileşimleri ile birlikte RNA bağlanma domainleri de paraspeckles için hedeflenecek DBHS aile üyeleri için gereklidir. P54NRB'in minimal parçası sarmal bobin domainlerine ek olarak en az bir tanıma motifi (RRM) içermektedir. RNA tanıma motifi (RRM) P54NRB için transkripsiyonun inhibisyonunda perinükleer başlık oluşumu için hedeflenmesinde gerekmektedir. DBHS aile içerisinde P54NRB'de farklı olarak paraspeckles için hedeflenecek

RRM'lerin özgünlüğü farklılık göstermektedir. Paraspeckles için hedeflenecek RRM'lerin herhangi birisi kullanılabilir. PSF'nin yalnızca ikinci RRM'si alt nükleer odaklara hedeflenmesinde yeterlidir. PSPC1 çoğunlukla paraspeckles için marker olarak kullanılmaktadır [13].

PSPC1 ve NONO DBHS proteinlerinin multidomain korunmuş bölgesinin heterodimer kristal yapısı tanımlanmıştır. Drosophila behavior/human splicing ailesinin proteinleri memelilerde NONO, SFPQ ve PSPC1, omurgasızlarda NONA ve Hrp65'dir. DBHS proteinleri baskın olarak çekirdektedir ve transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel gen regülatör fonksiyonlarının yanı sıra DNA onarımında yer almaktadır [15].

1.3.2.2 PSF/SFPQ [PTB (Poliprimidin Bölgesine Bağlanan Protein) ile İlişkili Splicing Faktör]

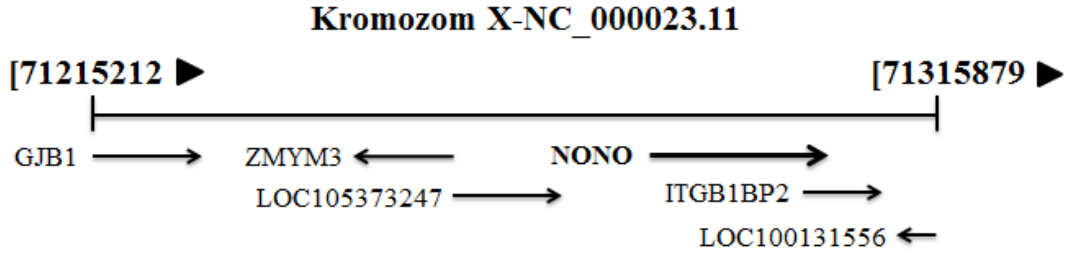
Splicing faktör prolin ve glutamin bakımından zengin (SFPQ), yaygın olarak poliprimidin bölgesine bağlanan protein ile ilişkili splicing faktör olarak bilinmektedir. PSF'nin bağlanma ortağı non-POU domain içeren oktamer bağlanma proteini (NonO/p54^{nrb}) ile oldukça fazla bulunan multifonksiyonel nükleer proteinlerdir. SFPQ/PSF N ucu glisin bakımından zengin domain, prolin/glutamin bakımından zengin iki RNA tanıma motifi (RRM) ve iki nükleer lokalizasyon sinyalleri ile C-terminal bölge içermektedir. NonO/p54^{nrb}, SFPQ/PSF'nin C terminali ile homologtur ve SFPQ/PSF ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. SFPQ ve NONO spliceosomun ve splicing ile bağlantılı komplekslerde yapılan proteomik çalışmalarda tespit edilmiştir. SFPQ / PSF'nin yokluğunda spliceosom formasyonu ciddi bir şekilde bozulmaktadır. Bunun aksine NONO spliceosom ya da splicing düzeneği için gerekli değildir. Ancak U5 snRNA ve 5'-splice bölgesi gibi spliceosomun önemli bileşenleri ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. NONO'nun *in-vitro* splicing işlevini arttırdığı gösterilmiştir. Bu kompleks transkripsiyon ve splicing birlikteliğine uyumlu olarak RNAPII'nin C-terminali ile etkileşime girer. Ayrıca NONO hem splicing hemde transkripsiyon faktörleri ile 5'splice bölgelerine bağlanır. Bununla birlikte SFPQ/NONO hatalı mRNA'ları seçimli olarak nükleer bölgede tutma yaparak çok çeşitli düzenleyici rollerde de görev almaktadır [16].

1.3.2.3 NonO/p54^{nrb}

NonO/p54^{nrb} non-POU domain içeren oktamer bağlayıcı proteidir. İlk olarak 1993 yılında Dong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; HeLa hücrelerinden saflaştırılmış NonO/p54^{nrb} proteini iki RNA tanıma motifi (RRM) içeren 54 kDa moleküler ağırlığa sahip, 471 aa'lık bir polipeptit kodladığı belirtilmiştir. Ayrıca insan splicing faktör (PSF) ile %71 sekans benzerliğine sahip olduğu belirtilmiştir [17].

Memeli hücre çekirdeğinin interkromatin bölgesinde bulunur. İki RNA tanıma motifi (RRM) içeren bir RNA bağlanma molekülüdür. Non-POU domain içeren oktamer bağlama proteini olup (C-ucu aracılığıyla) çift iplikli DNA, (N-ucu aracılığıyla) tek iplikli DNA ya da RNA'ya bağlanırlar [18].

X kromozomunun q13.1 bölgesinde bulunan NonO/p54^{nrb} geni, 13 ekzon 11 introna sahiptir (Şekil 1.8). NonO/p54^{nrb} geninin, 2. ve 16. kromozomlarda da pseudogenleri bulunmaktadır. Veri tabanında, P54; NMT55; NRB54; P54NRB; PPP1R114 olarak isimlendirilmektedir [18].



Şekil 1.8: NonO/p54^{nrb}'nin X kromozomu üzerindeki lokasyonu [18].

DBHS proteinleri aile üyesi olan NonO/p54^{nrb} ile çok fonksiyonlu olarak transkripsiyonel regülasyon, mRNA splicing, çekirdekte tutunma ve çekirdek içi gövde formasyonunu içeren çok sayıda nükleer işlemlerde yer almaktadır. Buna ek olarak NonO/p54^{nrb} intrasisternal A parçacıkları gibi DNA elementlerine bağlanarak onların cevap elementi olarak diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını teşvik ettiği bilinmektedir. Poliprimidin bölgesine bağlanan protein ile ilişkili splicing faktör PSF/ NonO/p54^{nrb} heterodimeri tiroid hormon reseptörü, androjen hormon

reseptörü dahil olmak üzere çok sayıda nükleer reseptörlerin (NR) transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir. Bu heterodimerik kompleks, nükleer matriks yapı proteini matrin 3'e bağlanarak hyperedited RNA'ların nükleer birikimini artırır ve aynı zamanda topoizomeraz I aktivitesini uyarır. NonO/p54^{nrb} ve paraspeckles protein 1'in (PSPC1) heterodimeri RNA'ya bağlı şekilde paraspeckles olarak hedeflendiği gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} cAMP cevap elementine bağlanan proteinlerin (CREB) hedef genlerinin cyclic AMP (cAMP) ile bağlı aktivasyonu için gerekli olduğu *in-vivo* olarak gösterilmiştir [19].

1.4 Multifonksiyonel NonO/p54^{nrb}

1.4.1 NonO/p54^{nrb}'nin Splicing Mekanizmasındaki Görevi

Splicing ve transkripsiyon bağlantılı protein PSF ve NonO/p54^{nrb}'nin RNA polimeraz II'ye karboksil uç domaininden (CTD) bağlandığını gösterilmiştir. Ökaryotik RNA polimeraz II' nin en büyük alt ünitesi olan karboksil uç domaini (CTD), pre-mRNA işleme basamaklarını yürütür. Pre-mRNA işlenmesinde fonksiyon gören CTD'ye bağlanan insan hücrelerindeki proteinleri tanımlamak için araştırmacılar fare CTD ekspre eden bakteri hücreleri ile afinite kromatografisi yapmışlardır. HeLa hücre ekstraktlarında splicing ve transkripsiyon bağlantılı faktör olan PSF ve NonO/p54^{nrb}, CTD matriksi içeren kolona bağlanmıştır. Hem hypo- hemde hyper- fosforillenmiş CTD matriksi bu iki proteini benzer seçicilikte bağlamıştır. PSF ve NonO/p54^{nrb}, holoenzim formu olan pol II hyper fosforile edilmiş CTD matriksinden birlikte saflaştırılmıştır. PSF ve NonO/p54^{nrb}'nin belirlenmesi pol II'ye bağlı transkripsiyonun başlama basamakları ve pol II'ye bağlı transkripsiyonun uzama evresinde her ikisinde de RNA işlenmesi olayları arasında bir bağlantı sağladığı düşünülmektedir. PSF ve NonO/p54^{nrb} transkripsiyonun başlama ve uzama fazları hemde pre-mRNA işlem komponentleri ve pol II CTD arasında doğrudan bir fiziksel bağlantı sağlayabildiği yapılan çalışmada önerilmiştir [20].

SnRNP'ler splicing işleminin iki katalitik basamağında ve spliceosom düzeneği içinde önemli rol oynarlar. Başlangıç olarak maya U5 snRNP ile bağlantılı ikinci basamak splicing factor Prp18'e karşı oluşturulmuş bir antikor ile çapraz reaksiyona giren bir protein belirlenmiştir. NonO/p54^{nrb} RRM'yi kapsayan 320 aminoasitlik bir bölge üzerinde PSF'ye %71 özdeş olduğu gösterilmiştir. PSF'de olduğu gibi NonO/p54^{nrb} ile seleksiyon yada PSF- NonO/p54^{nrb}'nin birleşimi U5 snRNA stem 1b'nin 3' tarafı ile uyumlu dizileri vermiştir. Analizler her iki proteinin spliceosom ve U4/U6.U5 üçlü-snRNP ile ilişkili olduğunu göstermiştir [21].

Pre-mRNA 3' işlenmesi ve transkripsiyon sonlanmasını kolaylaştırmak için XRN2'in güçlendirilmesinde NonO/p54^{nrb}/PSF fonksiyonlarının yer aldığı gösterilmiştir [22].

pre-mRNA splicing faktörler olarak non-POU domain içeren, octomer bağlayıcı protein NonO/p54^{nrb} ve PTB ile ilişkili splicing faktör (PSF) ve steroid reseptör koreseptörler olarak belirlenmiştir. NonO/p54^{nrb} ve PSF her ikisi protein fosfotaz 1'e (PP1) konsensus bağlanma RVxF motifleri içerir, PP1'in NonO/p54^{nrb} ve PSF'in fosforilasyon durumunu ve gen transkripsiyonundaki fonksiyonu regüle ettiği düşünülmektedir. NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin RNA splicing aktiviteleri ve transkripsiyonel eş baskılanmasındaki değişiklikler U1A ve U2AF gibi RNA splicing faktörler ile ve Sin3A ve histon deasetilaz 1 gibi transkripsiyonel eşbaskılaması tarafından NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin protein etkileşimlerindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin fosforilasyon durumu ve fonksiyonu NonO/p54^{nrb}'nin RNA tanıma domaini içindeki RVxF motifine bağlı olduğu gösterilmiştir [23].

Multifonksiyonel RNA bağlanma proteinleri NonO/p54^{nrb} ve PSF U snRNA dışarı uyarıcı faktörler olduğunu göstermektedir. Major spliceosomal U1, U2, U4 ve U5 gibi snRNA'lar m7G-cap yapısını kazandırmakta ve RNA polimeraz II ile çekirdekte transkribe edilmektedir. U snRNA dışarı aktarım kompleksi oluşturan ve m7G-cap proksimal bölgede toplanan dört faktör nuklear cap bağlanma kompleksi (CBC), RNA'nın dışarı aktarımı için fosforillenmiş adaptör (PHAX), aktarım reseptörü CRM1 ve RanGTP'dir. *E.coli* 'de üretilen rekombinant NonO/p54^{nrb} proteini sadece RNA substratları için PHAX ile güçlenmesi uyarılmıştır. HNE (Hela hücre ekstraktı) kontrol bölgesinde karşılaştırılabilir konsantrasyonlara HNE konckdown için NonO/p54^{nrb} ve PSF rekombinant proteinleri eklenerek tam olarak

PHAX ile güçlenme aktivitesi geri yüklenmiştir. Bu sonuçlar güçlü bir şekilde NonO/p54^{nrb} ve PSF' nin HNE' deki major PHAX güçlendirme aktivitesini teşvik ettiği önerilmiştir. NonO/p54^{nrb} ve PSF RNA / CBC kompleksi oluşumunu teşvik etmemiş fakat RNA/CBC kompleksi için PHAX' ın güçlenmesini teşvik etmiştir. GST pulldown deneyleri ile kanıtlandığı üzere PSF ve NonO/p54^{nrb} RNA' dan bağımsız bir şekilde PHAX ile etkileşmiştir [24].

1.4.2 Farklı Genlerin Transkripsiyonel Regülasyonunda NonO/p54^{nrb}'nin Görevi

Bir protoonkogene olan Spi-1/PU.1 Ets-bağlantılı transkripsiyon faktörleridir ve eritrolösemide miktarı oldukça artmaktadır. Afinite kromotografisinde Spi-1/PU.1 kompleksine bağlanan ve 15aa'lık (LEMEEAARHEHQVM) nuclear RNA bağlanma proteini olan NonO/p54^{nrb} ortaya çıkarılmıştır [25].

Tümör hücrelerinde IAP' lar (fare intrasisternal A parçacıkları) aktif bir şekilde ifade olur. Bu elementler ekstrakromozomal viral DNA'nın aktif bir şekilde sentezlenmesi için konakçı genomunda yeni bölgelere entegrasyon ile transpoze ve insersiyonel mutajenler olarak davranırlar. PYS-2 hücrelerinde (parietal endoderm hücre hattı) aktif ve F9 hücrelerinde (fare embriyonel karsinom hücre hattı) inaktif olan IAP proximal enhancer (IPE) elementi tanımlanmıştır. IPE PYS-2 hücrelerinde ekspre olan 60kDa'luk bir proteine etkili bir şekilde bağlanır fakat F9 hücrelerinde karşılık gelen protein etkili değildir. Bu çalışmada sığır timus bezinden 60kDa IPEB saflaştırılarak, cDNA fragmenti klonlanmış ve bu proteinin fare Nono ve human NonO/p54^{nrb}'nin bir homoloğu olduğunu gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} sırasıyla N ve C terminal yarısında DNA bağlanma ve aktivasyon domainleri ile IPE'ye bağlanan transkripsiyon aktivatörüdür. F9 hücrelerinde NonO/p54^{nrb}'nin aktivitesinin eksikliği etkisi olmayan DNA bağlanma domaininden kaynaklandığı gösterilmiştir [26].

FGF-2 ekspresyonunu arttırıcı hemde sıçan lenfoma hücrelerinde yeni FGF cevap veren NonO/p54^{nrb} olarak prolaktini önermişler. Prolaktin (PRL) osmoregulasyon, üreme, hücre çoğalması ve farklılaşması dahil omurgalılarıdaki fizyolojik proseslerin çok geniş bir spektrumunu düzenler. PRL *in-vivo* olarak normal T hücre fonksiyonunu devam ettirmekte T hücre farklılaşmasını

düzenlemekte ve T hücre çoğalması için gereklidir. PRL aynı zamanda lenfosit büyümesini uyarmak için interlökinler ile uyum içinde hareket eder. Rat Nb2 node lenfoma hücre hattında yüksek affiniteli PRL reseptörleri ifade olurlar. Yaşama ve çoğalma için laktojenik hormonları gerektirirler. PRL ve FGF-2 tarafından PNR ekspresyonunun regülasyonu RT-PCR ve Northern analizi ile doğrulanmıştır. GENBANK veritabanının BLAST araması PNR açık okuma çerçevesi tarafından kodlanan bir aminoasit sekansının ribonuclear protein (RBP) motifleri ve bir DNA bağlanma domaini ile karakterize edilmiş bir grup genler ile önemli homolojiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar Drosophila NonA/BJC, human polipirimidin bölgesine bağlanan protein (PTB) ile birleşmiş splicing faktör (PSF), non-POU-domain içeren octomer bağlanma proteini (NonO) ve human NonO homologu NonO/p54^{nrb}'yi kapsamaktadır. PRL ve FGF ile uyarılabilir RNA ve DNA bağlanma proteinlerinin yüksek derecede korunmuş PSF/NonO ailesinin yeni bir üyesi olarak bu çalışmada belirlenmiştir [27].

İnsan androjen reseptörde aktive olmuş fonksiyon 1 için NonO/p54^{nrb}'nin transkripsiyonel ko-aktivatörü olarak görev yaptığını göstermişlerdir. Androjen reseptörü (AR) N- ve C-terminal domainlerine eşleştirilmiş olan iki transaktivasyon domainine sahip ve sırasıyla aktivasyon fonksiyonu-1 (AF-1) ve AF-2 olarak belirlenmiştir. HEK293 hücrelerinden (insan embriyonik böbrek hücre hattı) AF-1 ile etkileşen proteinleri tanımayaya yönelik kütle parmak izi ile tespit analizi yapılmıştır. Safaştırılmış AF-1 bölgesi ile etkileşen proteinler, nuclear RNA bağlanma proteini NonO/p54^{nrb}, poliprimidin bölgesine bağlanma proteini ile ilişkili splicing faktör PSF, mRNA splicing işlemine katılmış olduğu varsayılan paraspeckle protein 1, PSP1 ve PSP2 içerdiği bulunmuştur. NonO/p54^{nrb} ve AR A/B domaini arasındaki fiziksel etkileşimi yansıtan AR AF-1 fonksiyonunda NonO/p54^{nrb}'yi arttırıcı fonksiyonu önerilmiştir [28].

pp32'nin androjen bağımlı transkripsiyonu arttırdığını ve retinoblastoma proteininin bu aktiviteyi regüle ettiğini bulmuşlardır. Afinite kromatografisi ve kütle spektroskopisi deneyleri ile pp32-retinoblastoma protein kompleksi üyesi proteinler olarak PSF ve NonO/p54^{nrb}'yi tespit etmişlerdir. Bu proteinler nükleer reseptör-düzenlenen transkripsiyon ve splicing işlemlerini düzenlemektedirler [29].

Parkinson hastalığında yüksek ölçüde korunan DJ-1 genini en sık mutasyona uğramış genlerden biri olarak belirlemiştir. DJ-1 ve NonO/p54^{nrb}, PSF tarafından uyarılmış apoptozu veya oksidatif stresi önler. Çekirdek proteinleri NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin dopaminerjik sinir hücrelerinde DJ-1'in major bağlanma ortakları olduğu gösterilmiştir [30].

Dong ve arkadaşları 2007 yılında, AR (androjen reseptörü) koaktivatör ve koreseptörlerin bir dinamik değişimi yoluyla gen transkripsiyonunu module etmektedir. PTB ile ilişkili splicing faktör (PSF) ve NonO/p54^{nrb}'nin sinerjik olarak ligand bağımsız yolda androjen reseptörleri ile protein kompleksleri oluşturduğu ve transkripsiyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir [31].

2007 yılında L. Amelio ve arkadaşları, TORC koaktivatörleri (transkripsiyonel koaktivatör) cAMP sinyal yolağının bileşenleri ile çalışmışlardır. NonO/p54^{nrb}'nin *in-vivo* CREB hedef genlerinin cAMP'ye bağlı aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir [32].

Total Jurkat T hücre lizatlarındaki (Jurkat hücreleri (insan T lenfosit hücre hattı) cisplatin ile uyarılmış apoptozisin modifiye edilmiş proteinlerini belirlemek amacıyla kantitatif proteom analizi gerçekleştirilmiştir. Apoptozis ile modifiye edilmiş proteinlerin tanımlanan 26'sının 8'i en az bir RNA bağlanma motifi içermektedir. Belirlenen 54 kDA'luk nükleer RNA bağlanma proteini NonO/p54^{nrb}'nin kaspaz (apoptaz sırasında görev alan sistein-proteaz grubu enzimler) bölünme yerleri NonO/p54^{nrb}'nin NOPS domaini içerisinde bir iki RNA bağlanma motifi ve bir (DQLD(231) 'in (downward arrow)D) C-terminalinde lokalize olduğu gösterilmiştir [33].

T hücrelerinde bir pro-enflamatuar sitokin tümör nekroz faktör (TNF) üretiminin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışma ARE'lere (AU-zengin elementler) sahip olan TNF için mRNA'lara bağlanan ve Mnk'ler için yeni bir substrat olarak PSF tanımlanır. PSF ve NonO/p54^{nrb}, sitokinlerin erken genleri yada enflamasyonda rol oynayan diğer proteinleri kodlayan ARE içeren mRNA' lara yerleşmiş bir çok oligoribonükleotitlere bağlanmaktadır. Mnk (MAP kinaz sinyali ile bütünleşen kinazlar) aracılıklı fosforilasyon canlı

hücrelerdeki mRNA' ya TNF' ye göre PSF' nin bağlanması arttığını göstermektedir. PSF' nin Mnk ile katalizlenmiş fosforilasyonu PSF NonO/p54^{nrb}'ye bağlanmasının modülasyonu ile spesifik mRNA' ların durumunu belirlediği düşünülmektedir [34].

Retinol bağlama proteini (RBP4) periferel dokulara dolaşımında retinolu taşır. İlginç bir şekilde kromatinin yapısal bileşenleri HMGA1 (insanlarda yüksek mobiliteye sahip HMG-I / HMG-Y grup proteinleridir) proteinleri için bağlama bölgesi bilinen AT açısından zengin motifin indüksiyonu için gerekli upstream elementin bir kaç kopyasını içerdiği gösterilmiştir. Çoklu bölgelere sinerjistik bağlanması üzerine HMGA1' ler kromatini ortaya çıkararak ve multiple transkripsiyon faktörlerinin işlevlerini kolaylaştırarak: Rbp4' ün cAMP ile indüksiyonunu uyarırlar. NonO/p54^{nrb}, polipirimidin yoluna bağlanan protein ile ilişkili splicing faktör PSF ve steroidojenik faktör 1 (SF1) bağlantılı ya da karaciğer reseptör homologu 1 (LRH-1) ile ilişkili olarak bu etkileşimlerde yer alan proteinler arasında tanımlanmıştır [35].

Rivera ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada Wilms tümörleri ile çalışılmıştır. Wilms tümörler, en sık görülen çocuk böbrek kanseri olup böbreğe spesifik kök hücre popülasyonundan köken alan pluripotent bir tümördür. Wilms tümöründe inaktif olan WTX bir tümör baskılayıcı gen kodlar ve sitoplazmik β -catenin (CTNNB1) degradasyonunun arttırılması yoluyla WNT sinyalinde rol oynadığı bilinmektedir. Paraspeckles olarak bilinen nuclear yapılarının bir markeri NonO/p54^{nrb} ve WTX arasında tam lokalizasyonu gözlenmiştir. WTX paraspeckle marker NonO/p54^{nrb} ile co-lokalizasyonu ve farklı subnuclear yapılarda mevcut olduğu ve transkripsiyonel regülasyonda rol oynadığı gösterilmiştir [36].

RNA splicing faktör NonO/p54^{nrb} PR (progesteron reseptörü)' nin transkripsiyonel aktivitesini baskıladığını göstermiştir. NonO/p54^{nrb}'nin baskılayıcı fonksiyonu PSF'nin varlığının bağımsızlığı ile PR için mSin3A kompleksinin güçlenmesine aracılık etmektedir. Bu çalışma doğum ile ilişkili Gjal (Gap bağlantıları alfa-1 proteini) geninin represyonu gebelik döneminde PR' yi bastırmakta miyometrial NonO/p54^{nrb} ekspresyonunda azalma olduğunu göstermektedir [37].

Eş doğrusal bir transkripsiyonu RA multilanj farklılaşması indükleyen NT2-D1 teratokarsinom hücre hattında çağaltılabilmektedir. HoxB (Homeobox gen aile üyesi transkripsiyon faktörü) regülatör Prepl ile bağlantısı olan retinoik asit (RA) ile uyarılmış HoxB transkripsiyonundaki aktin polimerizasyonunun rolü analiz edilmiştir. RA muamelesi “elongating” RNAP II, Prepl, beta-actin, ve N-WASP'nin yanısıra yardımcı NonO/p54^{nrb} ve PSF splicing bileşenlerinden oluşan bir kompleksin HOXB geni enhacerı için güçlenmesine neden olduğu gösterilmiştir [38].

NonO/p54^{nrb}'nin cAMP yolağının transkripsiyonel aktivasyonunda ve sirkadyen ritim kontrolünde yer alan multifonksiyonel bir protein olduğu da gösterilmiştir [39].

Major disk proteini Rodoksinin ekspresyonunu module eden ve RER' e bağlanan NonO/p54^{nrb} ve NonO/p54^{nrb} ile etkileşen üç protein tanımlanmıştır. Proksimal promotora NRL ve CRX'i kapsayan spesifik transkripsiyon faktörleri bağlanır, rodopsin enhacer bölgesi (RER) rodopsinin *in-vivo* olarak hassas ve yüksek seviyedeki ekspresyonu için haberci olarak katkıda bulunmaktadır [40].

1.4.3 NonO/p54^{nrb} - HIV

2003 yılında Zolotukhin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin trans-acting faktörler olarak HIV-1'in p37gag bölgesindeki INS'ye bağlandıkları gösterilmiştir. Ayrıca HIV moleküler klonları tarafından üretilen INS (inosine containing RNAs) içeren mRNA'ları spesifik olarak down regüle ettiği bulunmuştur. Bu durum gag-pol (HIV için grup spesifik antigen/ viral enzimler) ve env (zarf proteini) ekspresyonlarının kaybına yol açmıştır sonuç olarak virus üretimi olmamıştır. PSF, HIV-1 için post-transkripsiyonel regülasyonu yöneten anahtar faktördür. Bu çalışma ile HIV-1 replikasyonunda yeni bir mRNA düzenleme mekanizması olarak PSF' yi göstermiştir. HIV-1'in p37gag'daki lokalize olmuş INS (regültör element) 'ye doğrudan bağlanan NonO/p54^{nrb} ve PSF'nin trans hareketli faktörler olarak bağlandığı gösterilmiştir [41].

1.4.4 NonO/p54^{nrb} –Topoizomeraz I

2009 yılında Hwang ve arkadaşları tarafından GAPDH ve NonO/p54^{nrb} arasındaki ilişki çalışılmıştır. GAPDH çoklu fonksiyona sahip bir glikolitik enzimdir. NonO/p54^{nrb}'nin C-terminali hidrojen peroksidazın dozuna bağlı bir şekilde sitozol içinde GAPDH' e bağlanır. Bu çalışmada H₂O₂'e hücrese maruz kalma ile tetiklenen NonO/p54^{nrb}, PSF ve GAPDH' den oluşan protein kompleksinin topoizomeraz I aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir [42].

1.4.5 NonO/p54^{nrb} Kanser ile İlişkisi

Araştırmacılar 2001 yılında insan meme tümörlerinde ekspresyonu azalan yeni bir protein karakterize edilmiştir. nmt55/p54nrb olarak tanımlanan bu proteinin meme tümörlerinde azalmış ekspresyonun sebebinin ne olduğu bu çalışmada araştırılmıştır. Araştırmacılar proteinin değişmiş farklı formlarının bulunmasının mı yoksa mRNA seviyesinde farklı bir regülasyona uğramasının mı bu azalmaya sebep olduğunu ortaya çıkartmak istemişlerdir. Östrojen reseptörü pozitif (+ER) meme tümörlerinde nmt55/p54nrb mRNA transkriptlerinin değişik seviyelerde ekspre edildiği ve östrojen reseptörü negatif (ER-) meme tümörlerinde düşük ekspresyonu gösterilmiştir. Northern blot analizleri ve ribonuclease protection analizleri göstermiştir ki azalmış nmt55/p54nrb protein miktarı ER- (östrojen reseptör negatif) meme tümörlerde transkripsiyonel regülasyondan dolayı değildir. nmt55/p54nrb farklı izoformları ekspre edildiği western blot ve immunohistokimya çalışmaları ile gösterilmeye çalışılmıştır. Bu izoformların aminoterminal domainlerinde değişiklikler ve modifikasyonlar içerdiği önerilmiştir. İnsan meme tümörlerinde nmt55/p54nrb proteinin post transkripsiyonel seviyede kontrol edildiği önerilmiştir. Bu regülasyon ER- tümörlerde ekspresyonunun azalmasına ancak ER+ tümörlerde amino terminal uçları farklı izoformların ekspresyonuna sebep olmaktadır. Araştırmacılar nmt55/p54nrb'nin RNA bağlanma ve pre-mRNA işlenmesi ile potansiyel ilişkisinin normal hücre büyümesi ve fonksiyonları için gerekli olduğunu; proteinin kaybı yada değişikliğinin tümör büyümesi yada ilerlemesine katkı sağladığını önermişlerdir [43].

Miyamoto ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada; RNF43, kolorektal kanserinde overekspresyonu olan bir onkojenik RING finger proteini tanımlanmıştır. RNF43' e bağlanma partneri olarak heterodimer NonO/p54^{nrb} ve PSF tanımlanmıştır, ko-immünopresipitasyon deneyi ile *in-vivo* fiziksel etkileşimi doğrulanmıştır [44].

Normal insan melanositlerinde bulunmayan fakat kötü huylu melanomada güçlü ekspresyonu olan melanoma ilerleyişini düzenleyen en önemli anahtar moleküllerden biri melanoma inhibitör aktivitesi (MIA) proteindir. Sağlıklı melanositlerde NonO/p54^{nrb} protein ekspresyonu olmadığı saptanabilmiştir. Bunun aksine insan primer tümör hücreleri ve metastatik melanomaların doku örnekleri nükleer NonO/p54^{nrb} güçlü ekspresyon göstermektedir. Transkripsiyonel seviye üzerinde regüle edilen doku ve melanoma hücrelerinde NonO/p54^{nrb} ekspresyonunun inhibisyonunu düşündüren lusiferaz raportör gen deneyleri, normal insan melanositleri ile karşılaştırıldığında melanoma hücre hatlarında NonO/p54^{nrb} güçlü promotör aktivitesi ortaya çıkarmıştır [45].

Tümör ekstraktlarında artmış DNA bağlanma aktivitesi anlamlı olarak lenfatik hastalıklar, metastaz ve sağkalım ile korelasyonu bulunmuştur. U2AF65 (U2 snRNP'nin 65kDa'luk altünitesi olan yardımcı faktördür) ekspresyonu normal ve tümör nuklear ekstraktlarının her ikisinde de ekspresyonu NonO/p54^{nrb} ile önemli ölçüde ilişkilidir fakat tümör hücre çekirdeklerinde U2AF65 ve PSF' nin fonksiyonel açıdan eşsiz bir göstergesi olarak sadece tümör hücrelerinde PSF ile ekspresyonu olduğu gösterilmiştir [46].

Aort diseksiyonunda (AD) kolajen üretimi ile fibrozisi içeren ekstraselüler matriksteki değişiklikler karakterize edilmiştir. Son çalışmalar NonO/p54^{nrb}' nin yara onarımı, kondrogenesis ve fibröz kılıf stabilitesi gibi durumlarda kollejen oluşumu ve fibrozisde yer aldığını göstermektedir. NonO/p54^{nrb}' nin kollojen oluşumu için temel olduğu ön görülmekte bu nedenle fonksiyonel kollojenin oluşumu için temel olan doğrudan yada dolaylı olarak TNF α kaynaklı P4Ha1 (insan prolin 4 hidroksilaz alt ünitesi alfa 1) bastırılmasını kritik olarak modüle etmek için bir regülatör olarak davrandığı yapılan çalışmada önerilmektedir. Bu çalışmada AD (Aort diseksiyonu)

hasta ve kontrollerinin her ikisinin aortic duvarlarındaki NonO/p54^{nrb} ekspresyonu araştırılmış ve AD hastalarının aort duvarlarındaki dereceli fibrozis ve her ikisinde de artmış kollojen birikimi ve NonO/p54^{nrb} ekspresyonun azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir [47].

1.5 NonO/p54^{nrb} Promotor Yapısı

2013 yılında Schmid ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; sıçan, fare, köpek, inek, *Rhesus macaque*, şempanze ve insandan NonO/p54^{nrb} promotor bölgesinin yüksek derecede korunmuş sekansı için (<http://ecrbrowser.dcode.org>) ECR tarayıcı aracı kullanılarak *in silico* analizi yapılmıştır. Program ile presentalı üyeler arasında son derece korunmuş olan NonO/p54^{nrb} geninin 5' ucunun hemen yukarısında yaklaşık olarak 1600bp' lik bir bölge tespit edilmiştir. Promotor çalışmaları için pGL4.10 lusiferaz ekspresyon vektörü içerisine farede ATG protein başlangıç kodonuna yakın 9160 bç ile 7461 bç' den ve 8436 ile 6833 bç' den insandaki mesafesi korunmuş bölge alt klonlanmıştır. Fonksiyonel promotor analizleri NonO/p54^{nrb} transkripsiyonunun aktivasyonu için MIA'ya (melanoma inhibitör aktivitesi)' ya aracılık eden YBX1 (Y kutu bağlanma proteini 1) transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Sonuç olarak insan ve fare NonO/p54^{nrb} promotor kontsrahtları güçlü bir şekilde korunmuş ve bunların aktivitesi MIA tarafından modüle edildiği gösterilmiştir [48].

Melanoma inhibitör aktivitesi (MIA)/kıkırdak türevi olan retinoik aside duyarlı bir protein olan CD-RAP, kötü huylu melanoma hücrelerinin yanı sıra kondrositlerden de salgılanır. MIA/CD-RAP ekspresyonu kıkırdak spesifik tip II kollojenin ekspresyonu için ve kıkırdak gelişimi sırasında marker agrekan kondrojenik farklılaşmasının ekspresyonu ile koreledir. Bu çalışma MIA/CD-RAP moleküler sinyalizasyonu anlamak ve kondrojenizdeki hedef genleri belirlemek için bir model sistem olarak MIA/CD-RAP tarafından regülasyonu olan NonO/p54^{nrb}' nin analizi üzerinde yoğunlaşmıştır. Melanoma hücrelerinde bu çalışma ile uyumlu olarak NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesinin MIA/CD-RAP' a bağlı olarak modülasyonu korunmuş 42bç' lik bir DNA elementi tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Bu iki farklı hücre tipi çok ilginç bir şekilde ortak mekanizmayı

paylaşmaktadır. Bu MIA/CDRAP' a maruz kaldıktan sonra korunmuş regülasyonun kanıtı olarak görülebilir. NonO/p54^{nrb} promotorunun MIA/CD-RAP bağlı düzenleyici bölgesindeki YBX1' in önemi kondrosit sisteminde teyit edilmektedir. Bununla birlikte şimdiye kadar YBX1' in kıkırdak gelişmesinde yada kondrosit farklılaşmasında bir rol oynadığı bilinmemekteydi. Promotor bölgeye YBX1'in bağlanmasıyla uyumlu olarak kondrosit farklılaşması sırasında YBX1' in aktivasyonunu doğrulayan S102 fosforilasyonu ile YBX1' in MIA/CD-RAP bağlı aktivasyonu açığa kavuşmuştur. Transkripsiyon faktörü YBX1, MIA/CD-RAP tarafından aktifleştirilmiş ve kondrojenez sırasında MIA/CD-RAP' ın aktivitesinin içyüzünü anlamayı sağlayan NonO/p54^{nrb} promotorun aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir [49].

1.6 Çalışmamızın Amacı

Hücre çekirdeğinde bir paraspeckles proteini olarak görev alan NonO/p54^{nrb}'nin moleküler düzeyde çok çeşitli fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar transkripsiyonel seviye üzerindeki regülatör görevlerinin oldukça zengin olduğunu göstermektedir. Bu şekilde birçok farklı protein ve DNA bölgesiyle etkileşimi ve regüle ettiği genlerin özellikle kanserle bağlantılı genler olması oldukça ilgi çekicidir. Örneğin yakın zamanda yapılan çalışmalarda güçlü upregüle olan NonO/p54^{nrb} protein seviyeleri belirlenmiş malign melanomada NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. MIA (melanoma inhibitör aktivitesi) eksikliği bulunan HMB2 melanoma hücre sistemi analizi NonO/p54^{nrb}'nin güçlü downregülasyonu saptanmıştır. Şuanki çalışmalar sonucunda MIA aracılığı ile NonO/p54^{nrb}'nin regülasyonunun düzenlendiği saptanmıştır. Melanoma hücre hattında NonO/p54^{nrb} proteininin knockdown olması düşük proliferasyon oranlarına ve migrasyon potansiyelinde güçlü bir azalmaya yol açmaktadır. Bu bulgular tümör oluşumunun ilk basamağında yada metastazda NonO/p54^{nrb} için önemli bir rol oynamaktadır. Melanoma hücre hatlarında primer tümör, metastaz ve melanoma doku örnekleri NonO/p54^{nrb} mRNA ifadesi belirlenmiş ve NonO/p54^{nrb}'nin tüm melanom hücre hattı ve doku örneklerinde normal hücrelerle karşılaştırıldığında ekspresyon ve protein seviyesinde artışın olduğu gösterilmiştir [49-45].

Kanserleşme sürecinde transkripsiyonel olarak mRNA modifikasyon işlemlerini doğrudan yada dolaylı olarak etkilemektedir. Ancak multifonksiyonel bir protein olan NonO/p54^{nrb}'nin çeşitli kanser hücrelerindeki ifadesinin nasıl olduğu hücresel işlevde nasıl görev aldığı tam olarak bilinmemektedir. Bu bilgiler doğrultusunda kanserleşme süresince hem bu genin nasıl regüle edildiği hemde diğer genler ile etkileşiminin nasıl olduğu sorusuna cevap aranmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında bu sorulara cevap oluşturmak için ilk olarak NonO/p54^{nrb} 'nin farklı kanser hücrelerindeki üretiminin nasıl olduğu araştırılmıştır. Çoğu gen hücreye spesifik olarak regüle edilmektedir. Bu bağlamda farklı kanser hücrelerinde seviyesinin durumunun incelenmesi oldukça önemlidir.

Ayrıca kanserleşme sürecinde hipoksik mikroçevre kanserin ilerlemesi ve yayılımı için oldukça önemlidir. Seçilen hücre hatlarında hipoksik ve normoksik koşullarda bu genin ifadesinin değişip değişmediği de önemlidir. Kansere katkı sağlamakta mıdır?

Genin hipoksiyaya olan cevabı farklı basamaklarda kontrol edilmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak NonO/p54^{nrb} promotorunun klonlanması ve farklı uzunluklarda promotor delesyon mutantlarının oluşturulması hedeflenmiştir. Promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri hipoksik ortamdaki aktiviteleri ile karşılaştırılmıştır. Transkripsiyonel aktiviteden sonra NonO/p54^{nrb} mRNA ve protein seviyeside normoksik ve hipoksik koşullarda karşılaştırılmıştır.

Son olarak da elde edilen hipoksik cevabın teyidi için promotor bölgede biyoinformatik olarak yapılan analizler sonucu tespit edilen HRE (Hipoksikya response element) bölgelerine gerçekten HIF1 α 'nın bağlanıp bağlanmadığı EMSA tekniği ile test edilmiştir.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmamızın kapsamı oluşturulmuş aşağıdaki şekilde maddeler halinde sıralanmıştır.

1. İlk olarak mRNA ve protein düzeyinde NonO/p54^{nrb} geninin çeşitli kanser hücrelerindeki ifadesinin nasıl olduğu çalışılmıştır. (Farklı kanser hücre hatlarında en yüksek ifadenin tespiti)
2. Seçilen hücreler olan sağlıklı epitel hücre (HUVEC) ve Prostat kanseri (PC3) hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşuldaki mRNA ve protein seviyesinin nasıl olduğu gösterilmiştir. (Normal hücre ile kanser hücresinin hipoksiyaya cevabının gözlenmesi ve bu koşullarda NonO/p54^{nrb} seviyesinin mRNA ve protein seviyesinde tespiti)
3. NonO/p54^{nrb} geninin promotor dizisinin biyoinformatik analizi ve NonO/p54^{nrb} promotor bölgenin klonlanması (-730/+529 Bölge). Farklı uzunluklarda NonO/p54^{nrb} promotor delesyon mutantlarının klonlanması ve bazal transkripsiyonel aktivitesinin karşılaştırılması yapılmıştır. (Promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesinin normal koşullarda tespiti)
4. Klonlanan promotor parçalarının PC3 hücrelerine transfeksiyonu ve PC3 hücrelerinin hipoksik ve normoksik koşuldaki promotor aktivitesinin tespiti yapılmıştır. (Promotor parçalarının normal ve hipoksik koşullara olan cevabının tespiti)
5. NonO/p54^{nrb} promotor bölgesinde, hipoksi cevap elementi olan HRE bölgesinin olası bağlanma bölgesi analiz edildi ve bu bölgeye HIF1 α 'nın gerçekten bağlanıp bağlanmadığı EMSA (DNA-protein etkileşim tekniği) ile gösterildi. (Olası bağlanma bölgesinin fonksiyonel analizi ve gerçekten bağlanıp bağlanmadığının tespiti)

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Çalışmada Kullanılan Gereçler

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Model
+4°C ve -20°C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair, ABD
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD
DNA Elektroforezi	Minicell Primo
Etüv	WTB, Germany, Nüve, Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Jel Görüntüleme	UVP, İngiltere
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Luminometre	Thermo, ABD
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
Otoklav	Hirayama, Japonya
Otomatik pipetler	Finnpipette
PZR	Biolab, Thermo
Ph metre	WTW, Almanya
Qubit	Invitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Germany
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Spektrofotometre	Bio-Tek
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Vorteks	Elektromag, Türkiye

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Üretici
Agaroz	Prona
Amonyum Asetat	Merck
Amonyum persülfat	Merck
Ampicilin	Sigma
Beta-merkaptotanol	Sigma
Borik asit	Merck
β -actin antikor	Sigma
CoCl ₂	Sigma
CaCl ₂	Sigma
DMEM	Sigma
DMSO	Merck
EDTA	Riedel
Etidyum Bromür	Sigma
Ethanol	Sigma
FCS (Fetal Sığır Serumı)	Sigma
Gliserol	Merck
Goat-anti mouse sekonder antikor	Sigma
Goat-anti rabbit sekonder antikor	Abcam
Kanamisin	İnvitrogen
LB-Broth	Sigma
LB-Agar	Sigma
Lüsiferaz	Clontech
MTT	Clontech
MgCl ₂	Fermentas
NaCl	Sigma
NonO/p54 ^{nrb} monoklonal antikor	Thermo (Katalog No: PA5-27408)
Page ruler plus prestained protein ladder (26619)	Thermo
Pierce ECL (Western Blotting Substrat)	Thermo
Proteinaz K	Fermentas
PVDF Membran	Millipore
PBS (Fosfat tamponu tabletleri)	Sigma
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Seap	Clontech
TEMED	Sigma
Tris Base	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin	Sigma

Tablo 2.3: Çalışmada kullanılan kitler.

Kitler	Üretici
DNA Jel Ekstraksiyon Kit	Thermo
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermentas
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Thermo Scientific
Lipofectamin 2000 Reagent	İnvitrogen
Nylon Membran	Thermo Scientific
p-GEM-T Easy Vektör Sistemi	Promega
pMetluc Haberci ve Kontrol vektörü	Clontech
Plasmid Mini Prep Kit	Fermentas
Plasmid Maxi Prep Kit	Fermentas
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay Kit	Clontech
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Fermentas
T4 DNA Ligaz Enzim ve Buffer	Fermentas

2.2 Çalışma Alanının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Yüksek sıcaklığa dayanıklı pipet uçları, endorflar, bakteri kültür ortamı ve tüm cam malzemeler uygun etiketleme yapılarak 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Hücre kültürü laboratuvarı her hafta düzenli olarak virkon ve alkol içeren sıvılarla temizlendi. Çalışmaya başlamadan önce laminar flowun UV lambası açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre Kültürü ve kültür dışı laboratuvarlarda kullanılan çalışma alanı ve tüm pipetmenler %70’lik alkol ile temizlendi.

2.3 NonO/p54^{nrb} Ekspresyon Çalışmaları

2.3.1 NonO/p54^{nrb} Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Tasarımı

NonO/p54^{nrb} geninin tüm nükleotit dizisi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) sayfasından bulundu [Gen Bankası no: NC_000023]. Ekspresyon çalışmaları için NonO/p54^{nrb} geninin Homo sapiens non-POU domain containing, octamer-binding (NONO), transcript variant 4, mRNA dizisine bakılarak ileri ve geri primer dizaynı yapıldı. Hairpin oluşumu, Tm değerlerinin hesaplanması, %G-C içeriğinin bulunması gibi değişkenler Oligo Analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplandı. (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Moleküler biyolojide housekeeping genleri tipik olarak temel hücre fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gerekli olan esas genlerdir. Normal ve patofizyolojik koşullarda organizmanın tüm hücrelerinde ifade edilir. Bu amaçla human beta mikroglobulin ileri geri primerleri de çalışmalarda kullanılmıştır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: NonO/p54^{nrb} ve H- β -2 ekspresyon primer dizisi.

NonO/p54^{nrb} Ekspresyon Primeri	
İleri Primer	5'-ATATGCCACTCCGTGGAAAG-3' Tm: 54.8°C
Geri Primer	5'-GAAGGAGCCTTCACTGCATC-3' Tm: 55.9°C
H-β-2 Microglobulin Ekspresyon Primeri	
İleri Primer	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3' Tm: 60°C
Geri Primer	5'-CATGTCTCCATCCCCTTAAC-3' Tm: 60°C

2.3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.2.1 Hücre Hatları

Tablo 2.5: Çalışmada kullanılan hücre hatları.

Hücre Hatları	Temini
Hela (Servikal karsinom)	Cardiff Üniversitesi
Huvec (Endotel hücre)	Ayşe Begüm Tekinay
HT-29 (İnsan kolon karsinom)	Prof.Dr. İsmet D. Gürhan (Ege Üniversitesi)
MCF-7 (İnsan meme karsinom)	Prof.Dr. İsmet D. Gürhan (Ege Üniversitesi)
PC3 (İnsan prostat karsinom)	Doç.Dr. Kemal Korkmaz (Ege Üniversitesi)
DU-145 (İnsan prostat karsinom)	Doç.Dr. Kemal Korkmaz (Ege Üniversitesi)
Hep3B (İnsan karaciğer karsinom)	Cardiff Üniversitesi (Dr. Ramji)
Ponc (İnsan pankreas karsinom)	Doç.Dr. Kemal Ergin (Adnan Menderes Üniversitesi)
Saos-2 (İnsan kemik karsinom)	Cardiff Üniversitesi (Dr. Kenneth Brown)
Mg-63 (İnsan kemik karsinom)	Cardiff Üniversitesi (Dr. Kenneth Brown)

2.3.2.2 FCS (Fetal Sığır Serum) İnaktivasyonu ve Medyumun Hazırlanması

İnaktivasyon için soğuk zincir ile gelen stok serum ilk olarak +4°C'lik buz dolabında bir gece tutuldu. Tamamen çözünmüş olan FCS 37°C'de 15 dakika bekletildi. Daha sonra 56°C'de 35 dakika bekletildi. Bekleme süresi boyunca 10 dakika ara ile stok serum alt üst edilerek çalkalandı. İnaktivasyonu tamamlanan FCS, 0,22 µm' lık filtrelerden geçirilerek 50 ml' lik falkon tüplere alikot edildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Hücre hatlarının besi ortamını oluşturmak için ilk olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) medyumunu temin edildi. Daha sonra DMEM içerisine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FCS ilave edildi. Hücrelerin rutin büyütülmesinde ve deneyler sırasında bu medyum kullanıldı.

2.3.2.3 Hücre Hatlarının Büyütülmesi

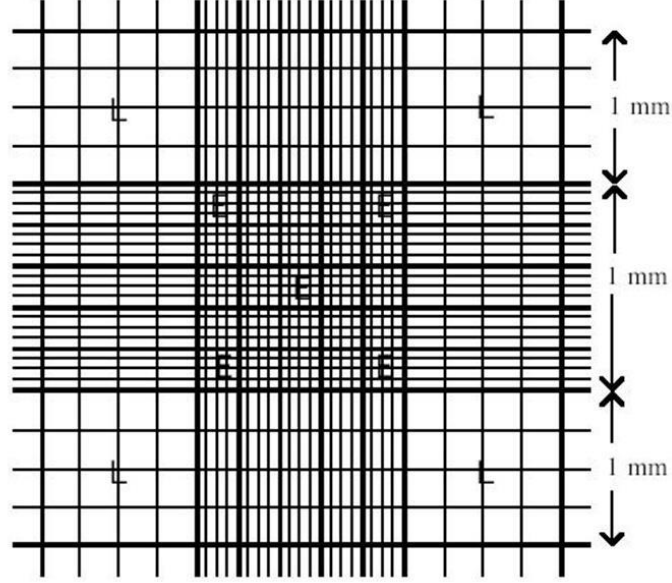
İlk olarak %10 FCS içeren medyum hazırlandı. -80°C’de saklanan ilgili hücre hattı çıkarılarak çözünmesi sağlandı. Çözünen hücre hattı 5ml %10’luk FCS’ li medyum içeren falkona alınarak karışması sağlandı. 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım dikkatlice uzaklatırıldı. Hücre pelleti 1 ml %10’luk FCS’li medyumda çözüldü. 75cm²’ lik flask içerisine 14 ml taze hazırlanmış %10 FCS içeren medyumdan koyuldu. 1ml içinde çözülmüş hücre pelletide dikkatli bir şekilde flask içerisine eklenerek 15 ml’ lik hacim sağlandı. Etiketleme yapılarak %5 CO₂ içeren 37°C’lik inkübatörde büyütüldü.

Belirli zaman aralıklarında mikroskopta bakılarak hücrelerin büyümesi takip edildi. Hücreler flask yüzeyinde yaklaşık %80-90 oranında bir doluluğa ulaştıklarında pasajlama yapıldı. Pasajlama için ilk olarak flask içindeki medyum tamamen uzaklaştırıldı. Yüzeye tutunan hücreleri kaldırmak için 3 ml Tripsin-EDTA ile muamele edilerek 2-3 dakika inkübatörün içerisinde bekletildi. Flask yüzeyinden tamamen kalkan hücreler için 5ml %10’luk FCS’ li medyum eklendi. Falcon içerisine alınarak 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 2ml %10’ luk FCS’ li medyum içerisinde tamamen çözüldü. İçerisinde 14 ml taze %10’ luk FCS’li medyum bulunan 75cm²’lik iki ayrı flaska 1ml olarak hücre pelleti bölüştürüldü. Bu şekilde ilgili hücre hatları 15ml’lik %10 FCS’li medyum içerisinde haftada 1 defa rutin pasajlama yapılarak büyütüldü.

2.3.2.4 Hücre Sayımı

RNA izolasyonu, hipoksik koşulun oluşturulması, MTT testi ve transfeksiyon çalışmaları için ilgili hücre hatlarının büyütülmesinden sonra canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Bunun için toplam hücre süspansiyonunun milimetresindeki hücre sayısını hesaplarken, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.1) lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonundan alındı. Eşit hacimde trypan blue 1:1 dilüsyon oranında karıştırıldı ve 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Pipetaj yapılarak tamamen homojen hale getirildi. Toma lamına

aktarılarak mikroskopta canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı hücrelerin boyanmadığı gözlemlendi ve bu şekilde sayım tamamlandı.



Şekil 2.1: Hemositometri.

25 küçük kareye ayrılmış alanda hücre sayımı yapıldıktan sonra aşağıdaki formüle göre toplam hücre sayısı hesaplandı.

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

2.3.2.5 Hücre Soylarının Deney Kaplarına Alınması ve Hipoksik Koşul Oluşturulması

Belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 saat) ve hipoksik normoksik koşullarda RNA ve protein hücre pelleti almak için plate out yapıldı. Bunun için 75 cm² lik flasklarda büyütülen hücreler pasaj 3'e geldiklerinde hücre sayımı yapıldı. 25cm² lik flasklara %10 FCS' li DMEM içeren ortamda her flaska 2.000.000 hücre olacak şekilde hücreler yayıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hipoksik ortam oluşturulacak flasklara son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ eklenerek kimyasal olarak hipoksik ortam oluşturuldu.

Normoksik ortam için hücelere herhangi bir kimyasal uygulanmadı. Hipoksik ve normoksik koşullar altında inkübe edilen hüceler 24, 48 ve 72 saat zaman aralıkları sonunda Tripsin EDTA ile kaldırılarak pelletler alındı. Bu şekilde RNA ve protein izolasyonu için hipoksik ve normoksik koşullarda hücre pelleti oluşturuldu ve -80°C'lik dolaba kaldırıldı.

MTT deneyi için büyütülen hüceler trypan blue uygulaması ile hücre sayımı yapıldıktan sonra belli zaman aralıklarında (24, 48, 72 saat) ve hipoksik normoksik koşul altında sonuç almak için ayrı ayrı 96 well plakalara her kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde hesaplanarak %10 FCS'li DMEM içerisinde hüceler dağıtıldı. Hipoksik için ayrılan kuyulara son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ eklendi. Belirlenen zaman dilimleri sonunda MTT testi uygulandı (MTT testi Bölüm 2.3.5 bkz).

Transfeksiyon çalışması için hücre sayımından sonra 12 well plakalara her kuyuya 250.000 hücre olacak şekilde %10 FCS' li DMEM ortamında hüceler yayıldı. 24 saat sonra transfeksiyon deneyi kuruldu. Transfeksiyondan 2 saat sonra 24, 48 ve 72 saat hipoksik plakalarına 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulandı ve plakalar inkübatöre kaldırıldı. Medyumlar toplanarak ölçümler gerçekleştirildi (Lusiferaz aktivite deneyleri bkz. Bölüm 2.4.15).

2.3.2.6 Hücre Hatlarının Dondurulması

Hücre sayımı sonucunda artan hüceler yada kullanılmayacak hüceler -80°C derin dondurucuya konuldu. Bunun için flask içindeki medyum tamamen uzaklaştırıldı. 3 ml Tripsin-EDTA eklenerek tripsinizasyon gerçekleştirildi. Hüceler yüzeyden tamamen kalkınca 5 ml %10 FCS'li medyum eklenerek falkona alındı. 1000 rpmde 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1 ml %10 DMSO içeren FCS içerisinde dikkatlice çözüldü. Daha sonra önceden etiketlenmiş cryovial tüplere konularak -80°C 'lik dolaba kaldırıldı.

2.3.3 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için daha önceden -80°C 'lık dolaba kaldırılan hücre pelletleri buz kalıbı üzerinde çözüldü. Fermentas RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar -80°C 'lık derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.3.3.1 RNA Miktar Tayini

RNA miktar tayininde kuvarz küvete kör ölçümü için $200\ \mu\text{L}$ dH_2O , RNA örnekleri için $195\ \mu\text{L}$ dH_2O ve üzerine $5\ \mu\text{L}$ örnek eklendi. RNA miktarına ve kirliliğe bakılmak için 260nm ve 280nm ' de ölçüm yapıldı. Daha sonra absorbans değeri ve kirlilik durumu hesaplandı.

RNA miktarı: $A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 40\ \text{ng}/\mu\text{l}$

Saflık: A_{260}/A_{280}

2.3.3.2 RNA Jel Elektroforezi

Kullanılacak cam malzemeler ilk olarak % 0.1 DEPC' li su içerisinde 12 saat tutuldu. Daha sonra otoklav yapıldı. Elektroforez tankı %0.5' lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi ile muamele edildi. Arkasından steril su ile yıkandı. En son saf ethanol ile muamele edildi ve peçete üzerinde kurutuldu. Kuruduktan sonra tank 1X FA jel tamponu ile dolduruldu. 100ml ' lik erlen içine $5\ \text{ml}$ 10X FA jel tamponu koyuldu ve içerisine $0.5\ \text{gr}$ agaroz ilave edildi. Depc' li su ile hacmi $50\ \text{ml}$ ' ye tamamlandı. Mikrodalgada tamamen homojen hale gelene kadar kaynatıldı ve belli bir oranda soğuması beklendi. Soğuduktan sonra üzerine $900\ \mu\text{l}$ formaldehit ve $1\ \mu\text{l}$ etidyum bromür ilave edildi, hafifçe çalkalandı. Hacmi $50\ \text{ml}$ olan kasete uygun tarak yerleştirildi. RNA jeli dikkatlice kasete döküldü. 2X yükleme boyası $3\ \mu\text{l}$ ve $5\ \mu\text{l}$ RNA örneği 65°C 'de bekletildi ve buzda soğutuldu. RNA jeli donduktan sonra tarak çıkarıldı ve RNA örnekler kuyulara yüklendi (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: RNA jel elektroforezi için solüsyonlar.

10X FA Jel Tamponu	FA Jel Yürütme Tamponu
1M MOPS (asitsiz) ph: 7, 0,2 M EDTA ph: 8, 0,05 M NaAc, 0,01 M ph: 7	100ml 10X FA jel tamponu, 20ml %37'lik (12,3M) formaldehit, 880 ml DEPC'li su ile 1 litreye tamamlandı.

2.3.3.3 cDNA Sentezi

RNA izolasyonu ve miktar tayini yapıldıktan sonra cDNA sentezi için RNA örneklerinden 1µg/mL alınacak şekilde hesaplama yapıldı. İki basamaktan oluşan cDNA sentezinin birinci basamağı 1µg/mL kalıp RNA, 1µL OligodT primeri (200 pmol) eklendi ve son hacmi 12.5µL olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. 65°C'de 5 dakika PCR cihazında inkübe edildi. İkinci basamakta örnek başına 4 µL 5X reaksiyon buffer, Ribolock inhibitörden 20 µL, dNTP 2µL ve 1 µL Revers Transkriptaz enzimi ekleneceği için örnek sayısına göre hesaplama yapılarak bir mix tüpü oluşturuldu. PCR cihazından alınan tüplerin her birine bu karışımdan 7.5 µL ilave edildi bu şekilde 20 µL toplam hacim elde edildi. Daha sonra ikinci basamağı tamamlamak için 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 10 dakika PCR cihazında inkübe edildi. RT-PCR tekniği ile cDNA sentezi yapıldıktan sonra tüpler etiketlenerek -20°C' lik buzdolabında muhafaza edildi.

2.3.3.4 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışması

Elde edilen cDNA örneklerinin kontrolü için ilk olarak Hβ2 ekspresyon primerleri ile PCR kuruldu (Tablo 2.7). Daha sonra insan NonO/p54^{nrb} geni için tasarlanan spesifik primerler ile PCR çalışması gerçekleştirildi (Tablo 2.8). Bu iki PCR çalışmasında bir tüp için: 1µL cDNA, 10X Taq Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP 1µL, 1µg ileri ve geri primer 1µL, Fermentas Taq polimeraz 1µL, 36.5µL dH₂O eklenerek 50µL' lik son hacim oluşturuldu.

Tablo 2.7: H β 2 primerleri için PCR koşulları.

1	94°C	2 dakika	1 döngü
2	94°C	60 saniye	35 döngü
	60°C	30 saniye	
	72°C	45 saniye	
3	72°C	5 dakika	1 döngü

Tablo 2.8: NonO/p54^{nrb} için PCR koşulları.

1	94°C	5 dakika	1 döngü
2	94°C	30 saniye	35 döngü
	50.5°C	30 saniye	
	72°C	30 saniye	
3	72°C	5 dakika	1 döngü

2.3.4 Real Time PCR

Real time PCR çalışmasında hipoksik ve normoksik koşullar altında NonO/p54^{nrb} ve HIF-1 α ekspresyonu incelendi. Bu sebeple ilk olarak HIF-1 α ekspresyon primeri tasarlandı (Tablo 2.9). Bu çalışmada 1 μ L cDNA, 5 μ L SYBR[®] Green PCR Master mix, 0.5 μ L ileri ve geri primer ve 3 μ L dH₂O eklenerek 96 kuyulu plakalara 10 μ L son hacimde yüklendi. Bu yükleme şartlarında her cDNA örneği için üç tekrar aynı zamanda internal kontrol için H β 2 primerleriyle de iki tekrar yapıldı. Uygun koşullar altında Real time PCR çalıştırılarak sonuçlar livak metoduna göre analiz edildi (Tablo 2.10).

NonO/p54^{nrb} yada HIF-1 α için üç tekrarlı Ct değerinin ortalaması alındı. Aynı şekilde internal kontrolünde ortalaması alındı. İnternal (H β 2) kontrol geninin ortalama değerinden elde edilen ilgili genin ortalama değeri çıkarıldı. Yeni çıkan değer 2['] nin üssü olacak şekilde kuvveti alındı. Kontrol gurubu kendine bölündü ve 1 sayısı elde edildi. Daha sonra ilgili zaman aralığında çalışılan deney grubu aynı zaman aralığında çalışılan kontrol grubuna bölündü. Bunun sonucunda 1['] in katı şeklinde değerler elde edildi ve sütun grafiği oluşturuldu.

Tablo 2.9: HIF-1 α ekspresyon primeri.

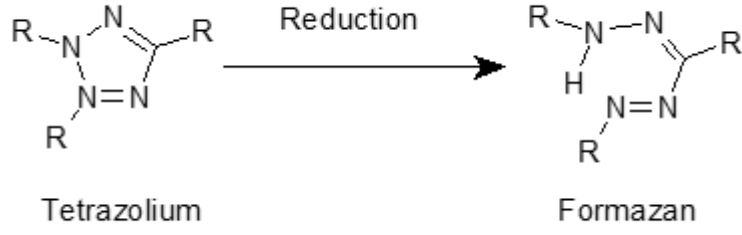
İleri Primer	5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT- 3' TM: 56.9 °C
Geri Primer	5'-TGTCCTGTGGTGACTIONGTCC- 3' TM: 56.9 °C

Tablo 2.10: Real time PCR koşulları.

Sıcaklık	Süre	
95°C	10 dakika	1 döngü
95°C	10 saniye	35 döngü
55°C	10 saniye	
72°C	15 saniye	
95°C	5 saniye	1 döngü
65°C	1 dakika	

2.3.5 MTT

MTT testi ile bir hücre popülasyonundaki canlı hücrelerin oranına bakılarak kantitatif ölçüm yapıldı. Bu testte 96 well plakalardaki hücrelere son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olan sarı renkli MTT boyasının verildi. Canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi gözlemlendi (Şekil 2.2). MTT boyasının, mitokondri yapısı bozulmayan canlı hücrelerde tetrazolium halkasının parçalanmasıyla koyu mavi renk oluşturarak formazan ürününe dönüştüğü gözlemlendi. Hücrelere MTT boyası verildikten sonra 4 saat boyunca 37 °C % 5'lik CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. 4 saatin sonunda medyum uzaklaştırıldı ve 0.004 HCL içeren izopropanol ile formazan kristalleri çözüldü. Spektrofotometride 550nm dalga boyunda absorbansı alındı. Sonuçlar kontrol grubundan elde edilen absorbans değerleri ile karşılaştırıldı.

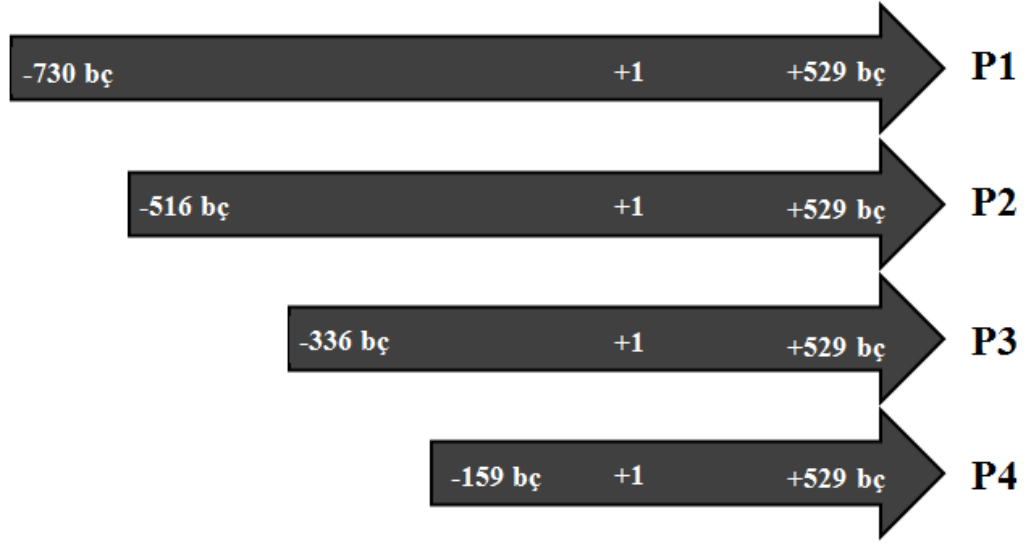


Şekil 2.2: MTT metodu ile oluşan kimyasal değişim.

2.4 NonO/p54^{nrb} Promotorunun Klonlaması

2.4.1 NonO/p54^{nrb} Promotor Parçalarının Oluşturulması

İnsan NonO/p54^{nrb} geninin promotor kısmının klonlanması amacıyla, genin tüm nükleotit dizisi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) sayfasından bulundu [Gen Bankası no: NC_000023] ve bu dizi üzerinden promotorun 1259 (-730/+529) baz çiftlik kısmından promotor parçaları oluşturuldu. Bu 1259 baz çiftlik promotor dizisi üzerinden farklı uzunluklarda ayrı promotor parçaları belirlendi (Şekil 2.3). Dört ayrı promotor parçası oluşturmak amacıyla hepsi için ortak bir reverse (Geri) primeri ve dört ayrı forward (ileri) primeri tasarlandı (Tablo 2.11). Uygun restriksiyon kesim bölgelerinin eklenmesi, Tm değeri, % G-C oranı ve hairpin oluşumu gibi değişkenler hesaplandı. Tasarlanan primerler veri tabanında bulunan DNA sekansları ile BLAST yapılarak NonO/p54^{nrb} geni ile en yüksek benzerlikte olduğu saptandı. Primer dizaynı için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov, , www.idtdna.com, adresleri kullanıldı.



Şekil 2.3: NonO/p54^{nrb} promotor parçalarının temsili diyagramı.

Tablo 2.11: NonO/p54^{nrb} promotor primer bilgileri.

	NonO/p54 ^{nrb} primer Bilgileri	Ürün Büyüklüğü	T _m
P1 İleri Primer	5'- <u>CTCGAG</u> AGGTTCTCAGTTGCATTAGT - 3' (Xho I kesim noktası)	26bç	54°C
P2 İleri Primer	5' <u>CTCGAG</u> ATCAATTGATCCTTGTAGTCCTT GG-3' (Xho I kesim noktası)	31bç	56°C
P3 İleri primer	5'- <u>CTCGAG</u> ATAGTGATGTTTGGACTGCTA- 3' (Xho I kesim noktası)	27bç	53°C
P4 İleri Primer	5'- <u>CTCGAG</u> CAGGAGAAGCATCTAGAAAT- 3' (Xho I kesim noktası)	26bç	53°C
Geri Primer	5'- <u>AAGCTT</u> TCTACCGACTGGTATCTCCT-3' (HİND III kesim noktası)	26bç	53°C

2.4.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları

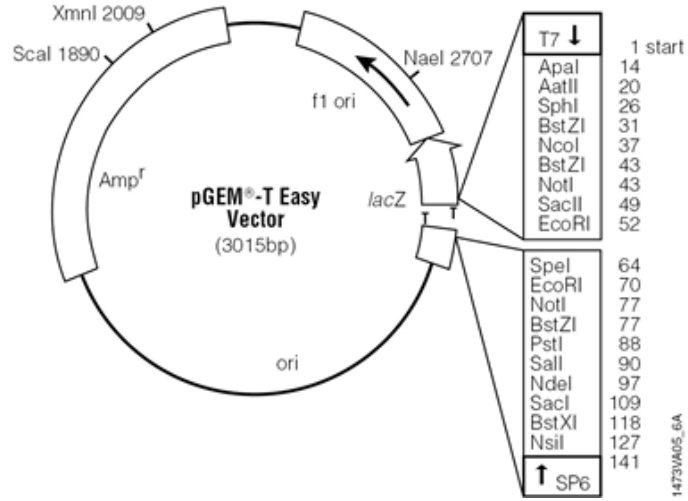
Klonlama çalışmasında transformasyon için Tablo 2.12’de belirtilen bakteri soylarına ait kompetant hücreler kullanıldı.

Tablo 2.12: Çalışmada kullanılan kompetant hücreler.

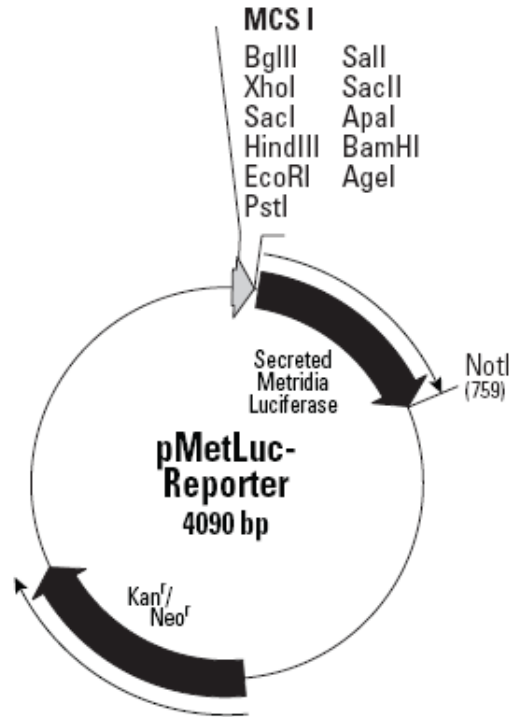
<i>E.Coli XLI-blue</i>	(endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+))
<i>E.Coli DH5a</i>	(SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1)

2.4.3 Çalışmada Kullanılan Vektörler

NonO/p54^{nrb} promotor klonlama çalışmalarında pGEM-T Easy vektörü ve pMET-Luc Reporter vektörü kullanıldı. PCR ile çoğaltılan promotor parçaları T:A klonlaması yapılarak ilk olarak pGEM-T Easy vektörüne klonlandı (Şekil 2.4). Daha sonra promotor parçaları lusiferaz geni taşıyan fakat promotor bölgesi içermeyen pMET-Luc Reporter vektörüne klonlandı (Şekil 2.5). Ökaryotik ekspresyon vektörü olan pMET-Luc Reporter vektörüne klonlanması sonucunda transfeksiyon gerçekleştirildi. Promotor parçalarının transkripsiyonel aktivasyonunun anlaşılması için lusiferaz geninin ifadesi ölçüldü. Bunun için Seap kontrol vektörü aynı zamanda pMET-Luc Reporter kontrol vektörü kullanıldı.



Şekil 2.4: pGEM-T Easy vektör haritası.



Şekil 2.5: pMetLuc-Reporter vektör haritası.

2.4.4 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpteki kan örneğinden 400 µl alınarak 1,5ml'lik eppendorflara aktarıldı. Üzerine 1ml distile su ilave edilerek 5 dakika çalkalandı. 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası sıvı kısım atıldı ve kırmızı renk gidene kadar bu işlem tekrarlandı (3 defa). Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 250 µl nükleli lizis tamponu, 20 µl %10'luk SDS ve 20 µl proteinaz K eklendi ve alt üst edildi. Bu şekilde 72°C su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra üzerine 175 µl doymuş amonyum asetat eklendi. Alt üst edilip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 2 katı oranında absolu etanol eklendi. Eppendorf alt üst edilerek bu aşamada DNA'nın belirmesi gözlemlendi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet üzerine 250 µl %75'lik etanol eklendi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp peçete üzerine eppendorf ters çevirilerek bırakıldı. Bu şekilde DNA'nın kurutulması sağlandı. Kurutulan DNA pelleti 100 µl distile suda çözüldü. Etiketlenerek -20°C dondurucuya kaldırıldı.

2.4.5 Kompetant Hücrelerinin Hazırlanması

E.coli hücreleri LB agar petrilere ekim yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün sıvı besi yerine tek koloni ekimi yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 250 ml steril erlene steril 100 ml LB besiyeri konularak ve bu besiyerine hazırlanan önkültürden 5 ml aktarıldı ve 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Belirli zaman aralıklarında absorbansına bakılarak OD₆₀₀'nin 0,5 ile 0,6 arasında olması beklendi. OD miktarı bu iki değer arasına geldiğinde kültür buza alındı. Bakteri süspansiyonu 3000 rpm de 5 dakika 4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant pipetle alınarak başlangıç hacminin yarısı 0,1 M CaCl₂ solusyonundan eklenerek, nazikçe pipetaj yapılarak pelletin çözünmesi sağlandı, 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Tekrar 3000 rpmde 4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak başlangıç hacminin 1/10'u 0,1 M CaCl₂ ile tekrar pellet çözüldü. 1-4 saat arasında buz üzerinde bekletildi. Daha sonra eşit hacimde %40 steril gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilen

ependorflara 100 µL ya da 200 µL olacak şekilde alikot yapıldı ve etiketlenerek -80°C dondurucuda saklandı.

2.4.6 Promotor Parçalarının Çoğaltılması

NonO/p54^{nrb} promotor parçaları PCR tekniği ile çoğaltıldı. Bunun için hazırlanan genomik DNA ve spesifik primerler kullanılarak her bir promotor bölgesi için Tm ve MgCl₂ optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon sonucunda 4 ayrı promotor parçasının 1mM MgCl₂ ve 54°C sıcaklıkta optimum çalıştığı gözlemlendi. Yaklaşık 200ng kalıp DNA, son konsantrasyonu 100ng/µl olacak şekilde spesifik primerler alındı. Fermentas 1X Tamponu (50mM KCL, 10mM Tris-HCL, Ph 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM dNTP, 1mM MgCl₂ ve 2,5 Unite Taq DNA polimeraz kullanıldı. Bu koşullar altında her bir promotor parçası uygun döngü koşullarında çoğaltıldı.

2.4.7 Agaroz Jel Elektroforezi ve DNA Pürifikasyonu

Agaroz jeli için 0,5 X TBE kullanıldı ve tamamen homojen hale getirildi. Daha sonra son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan etidyum bromür ilave edildi. Agaroz jelleri %0,8 ve %1'lik olarak hazırlandı. Görüntülenecek PCR ürünlerine brom fenol mavi boyası eklendi. 1kb DNA markerı kullanıldı. PCR ürünleri 90 voltluk elektrik akımında yaklaşık 30 dakika yürütüldü. Görüntüleme cihazında DNA örneklerinin fotoğrafları çekildi.

5X TBE hazırlanışı: 27,5g Borik asit, 54g Tris Baz tartıldı.20 ml 0,5 M EDTA eklendi pH 8,00'e ayarlandı ve dH₂O ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı. 0,5X TBE hazırlamak için 5X TBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanarak otoklavlandı.

Çoğaltılan DNA bantları UV transilluminator üzerinde jelden kesilerek alındı. DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo) kullanılarak jelden geri kazanıldı. Geri kazanılan DNA'nın az bir bölümü agaroz jelde tekrar yürütülerek kontrolü yapıldı. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbans alınarak DNA miktarı ve kirliliğe bakıldı.

2.4.8 T:A Klonlama

T:A klonlama prosedürün önerdiği şekilde jelden geri kazanılan NonO/p54^{nrb} promotor parçalarının Tablo 2.13’de belirtilen koşullar altında pGEM-T Easy vektörüne (Promega) ligasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 2.13: pGEM-T Easy vektörü ligasyon koşulları.

pGEM-T Easy Vektörü Ligasyon Koşulları
2X Rabip Ligasyon Buffer 10 µl
T4 DNA Ligaz 2 µl
pGem T easy vektör 2 µl
insert 6 µl
Toplam 20 µl hacimde, 1 gece boyunca 4°C’de ligasyona bırakılır

2.4.9 Ligasyon Ürününün Kompetant Hücrelerine Transformasyonu

200 µl kompetant hücresi içerisine 5 µl ligasyon ürünü eklendi. 40 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. 42°C’de iki dakika bekletilerek ısı şoku yapıldı. Daha sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Üzerine 800 µl antibiyotiksiz LB ilave edildi. Bir saat boyunca 37°C’de 200 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu yapılan plazmitler santrifüjlü ve santrifüjsüz olarak önceden hazırlanmış ve üzerine Xgal ve IPTG substratları eklenmiş ampisilinli LB agar petrilere ekimi yapıldı. Bir gece boyunca 37°C’de inkübe edilerek mavi beyaz koloni oluşumu gözlemlendi.

2.4.10 Küçük Ölçekli (Mini-Prep) Plazmit DNA İzolasyonu

PGEM-T-Easy vektörüne klonlanan NonO/p54^{nrb} promotor parçaları için seçilen beyaz kolonilerden Fermentas Miniprep DNA isolation kit protokolüne uygun olarak küçük miktarda plazmid DNA izolasyonu yapıldı.

2.4.11 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi

Promotor parçaları için primer tasarımı sırasında eklenen kesim bölgelerine uygun olarak ilgili restriksiyon endonükleaz enzimleri ile izole edilen plazmid DNA'lar kontrol kesimine bırakıldı. İki farklı restriksiyon enzimi kullanılacağına her iki enzim için uygun ortak tampon www.thermoscientificbio.com adresinden bakılarak seçildi. Bu şekilde uygun koşullar altında önerilen tamponlar ile toplam 50 µl hacimde 37°C sıcaklıkta yaklaşık 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesim ürünleri agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülendi.

2.4.12 Dizi Analizi

Her biri farklı baz büyüklüğüne sahip promotor parçalarının kontrol kesimi agaroz jel üzerinde doğru bölgede görüntülenmiş olsada klonlamanın tamamen doğrulanması dizi analizi sonucu ile gerçekleşti. Bunun için rekombinant olduğu düşünülen plazmid DNA'dan 30 ng/µl ve ilgili promotor primerleri ile dizileme için ODTÜ-TEKNOKENT-REFGEN'e gönderildi.

2.4.13 pMet-Luc Vektörüne Alt Klonlama

Dizilemesi doğrulanan pGEM-T Easy vektörü içindeki promotor parçaları uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek jelden geri kazanıldı. Aynı şekilde alt klonlama için boş pMet-Luc vektörü de uygun enzimlerle kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu şekilde pGEM-T Easy vektöründen kesilen ilgili promotor parçasıyla lineer hale gelmiş pMet-Luc vektörü ligasyona bırakıldı (Tablo 2.14). Daha sonra ligasyon ürünlerinin kompetant hücreleri içerisine transformasyonu gerçekleştirildi.

Transformasyon ürünleri kanamisinli LB agar üzerine yayılarak bir gece 37 °C’de inkübe edildi ve koloni oluşumu gözlemlendi.

Tablo 2.14: pMet-Luc Vektör Ligasyon Koşulları.

pMet-Luc Vektör Ligasyon Koşulları
12µl insert
5 µl pMet-Luc Vektör
2 µl Ligaz Buffer
1µl T4 DNA Ligaz enzimi
Toplam 20 µl hacimde, 1 gece boyunca 4°C’de ligasyona bırakılır

2.4.14 Çok Kopyalı Plazmid DNA İzolasyonu (Maxiprep)

Geçici transfeksiyon deneyleri için yüksek kopyalı plazmid DNA elde edildi. Bu amaçla her bir promotor parçası için alt klonlama yapılan ve koloni oluşumu gözlenen ürünlerden Fermentas Maxiprep Kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu sayede yüksek saflık ve yoğunlukta DNA elde edilmiş oldu.

2.4.15 Lipofectamine 2000 Reagent ile Geçici Transfeksiyon

Daha önceden bahsedildiği gibi geçici transfeksiyon deneyi kurulmadan önce ilgili hücre soyları 12 kuyulu plakalara her kuyuda 250.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı ve belirlenen kuyulara kimyasal hipoksi yapıldı. Transfeksiyonu yapılacak yüksek kopyalı plazmid DNA’dan her kuyuya 1 µg alınacak şekilde

hazırlandı. Lipofectamine özgül optimum medyumunu her kuyu için 75 µl olarak alındı ve hazırlanan DNA molekülü ile karıştırıldı.

2.4.15.1 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçümü

Transfeksiyon sonuçları için 24, 48 ve 72 saat sonunda hücre medyumları alındı. 10X lusiferaz substrat solüsyonu hazırlanarak reaksiyon tamponu ile 1X'e sulandırıldı. 384 kuyulu plakalara 9 µl hücre medyumunu eklendi. 1X substrat/reaksiyon tamponundan 1 µl kullanılarak sonuçlar luminometrede ölçüldü.

10X substrat çözeltisi: Kit içerisindeki liyofilize substrat eşit hacimdeki substrat buffer ile çözüldü.

1X substrat/reaksiyon tampon: 1/10 oranında kullanılacak kadar miktar 10X substrat çözeltisi, reaksiyon tamponu ile sulandırıldı. Her ölçüm için 5 µl kullanıldı.

2.4.15.2 Salmon Alkalın Fosfataz Aktivitesinin Ölçümü

96 kuyulu plakalara 24, 48, 72 saat sonuçlarından 25 µl hücre kültür medyumunu eklendi. 5X dilüsyon tamponu 1X'e ddH₂O ile dilüe edildi. 1X dilüsyon tamponundan 75 µL alınarak eklendi. Plaka alüminyum folyo ile sarılarak 65°C'de 30 dakika tutuldu. Daha sonra 3 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Kuyulara 40 µl SEAP substrat çözeltisinden eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Bekleme sonrası sonuçlar luminometrede ölçüldü.

1X Dilüsyon tamponu: Kit içerisindeki 5X dilüsyon tamponundan çalışmada kullanılacak hacim kadarı 1X'e ddH₂O ile sulandırıldı. Her örnek için 75 µL kullanıldı.

2.5 Western Blot

2.5.1 RIPA Buffer ile Protein Ekstraktının Hazırlanması

-80°C 'de protein ekstraksiyonu için saklanan ilgili hücre pelletleri çıkarılarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Hücre pelletleri üzerine 100 µl RIPA buffer (Tablo 2.15) ilave edildi. 40 dakika buz üzerinde bekletildi. Bekleme süresi boyunca 10 dakikada bir pipetaj yapıldı. +4°C'de soğutmalı santrifüjde 1200 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda supernatant kısımları bu üzerinde daha önceden soğutulmuş ependorflara alındı. Örnekler -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 2.15: RIPA Buffer Solüsyonunun İçeriği.

RIPA Buffer Hazırlanışı
10 mM TrisCl (ph: 8) 500 µl
%0,1 SDS 10 ml
%1 Triton X100 500 µl
%0,1 Sodyum deoxycholate 0,05 gr
140 mM NaCl 7ml
1 mM EDTA 100 µl
1 mM EGTA 500 µl
Proteaz İnhibitörü 2 tablet

2.5.2 Protein Miktar Tayini

Invitrogen Qubit kullanılarak protein miktar tayini yapıldı. Bir protein örneği için 199 µl Qubit Reagent Buffer ve 1 µl boya olacak şekilde örnek sayısı kadar hesaplanarak karışımı yapıldı. Bu çalışma reaksiyonundan 199 µl ve protein örneğinden 1 µl alınarak 10 saniye vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika

bekletildikten sonra Qubitte ölçüldü. Protein miktarının hesaplanması için ölçüm sonucu elde edilen değer 200 (seyreltme katsayısı) ile çarpıldı.

2.5.3 SDS PAGE

Gereken cam malzemeler ve elektroforez aparatları %70'lik ethanol ve saf su ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı. Ayırma jeli dikkatlice camın en üst kısmında yaklaşık 3 cm boşluk kalacak şekilde dikkatlice döküldü (Tablo 2.16). Alt jel (yığma jeli) döküldükten sonra hava kabarcığı oluşmaması için %90'lık izopropanol eklendi. Yaklaşık 45 dakika beklenerek ayırma jelinin tamamen donduğundan emin olundu. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üzerine dökülen izopropanol kurutma kağıdı ile ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra yığma jeli hazırlandı ve polimerize olan alt jelin üzerine döküldü. Üst jel döküldükten sonra hemen tarak yerleştirildi. Yığma jelinde tamamen donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve kuyu oluşumu gözlemlendi. Kuyular içinde kalan jel kalıntıları pipetaj yapılarak temizlendi.

Tablo 2.16: %10 Ayırma jeli.

%10 Ayırma Jeli
Lower Buffer 2.5 ml
Acrilamid: Bisakrilamid (37:5:1) 2.5 ml
ddH ₂ O 5 ml
%10 (w/v)APS 100 µl
TEMED 10 µl

Tablo 2.17: %5 Yığıma jeli.

%5 Yığıma Jeli
Upper Buffer 2.5 ml
Acrilamid: Bisakrilamid (37:5:1) 1,25 ml
ddH ₂ O 6,25 ml
%10 (w/v)APS 50µl
TEMED 5 µl

Miktar tayini yapılan protein lizatlarından 50 µg olacak şekilde hesaplanarak ependorfa alındı. Üzerine 2X yükleme boyasından 7,5 µl ve kalanı son hacmi 30 µl olacak şekilde Laemli buffer ile tamamlandı. Hazırlanan bu karışım 95°C’de 5 dakika tutularak denatürasyonu gerçekleştirdi. Jelin ilk kuyusuna 5 µl Prestained Protein Ladder yüklendi. Daha sonra her bir örnek sırasıyla 30 µl son hacimde kuyulara yüklendi. Örneklerin yürütülmesi için yürütme tankı %0,1 SDS (w/v) içeren 1X Running Buffer solüsyonu ile dolduruldu. Yürütme işleme için ilk olarak 90 V akımda 15 dakika daha sonra 120 V akımda yaklaşık bir buçuk saat yürütüldü.

Tablo 2.18: Western çalışmasında kullanılan solüyonlar.

SOLÜSYON	İÇERİĞİ
Laemli Buffer	0.125 M Tris-HCl(pH:6.8), %4 (w/v) SDS, % 10 (v/v) Gliserol, % 10 (v/v) β -2-Mercaptoetanol
Bromophenol Blue Solusyonu	%0.05 (w/v) bromophenol blue distile su içinde
SDS PAGE Yürütme Tamponu (Running Buffer)	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10X TBS (Tris Buffered Saline) (10X TBS otoklavlanmış)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
SDS PAGE Lower Jel	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE Upper Jel	1 M Tris-HCl (pH:6.8), % 10 (w/v) SDS

2.5.4 Proteinlerin Membrana Transferi

Transfer aşaması için PDVF membran kullanıldı. Sırasıyla sünger-kurutma kağıdı-jel-membran-kurutma kağıdı-sünger düzeneği hazırlanarak transfer sandiviç modeli oluşturuldu. Bu sırada membran ve kurutma kağıtlarının aynı boyutlarda olmasına dikkat edildi. PDVF membranı 1 dakika metanolde tutulduktan sonra transfer buffera alındıktan sonra sandiviç modeli oluşturuldu. Bu şekilde transfer tankına yerleştirildi. Transfer tankı önceden soğutulmuş olan transfer tamponu ile dolduruldu. Bir gece boyunca 15 V akımda +4°C’de bırakılarak transfer edildi.

2.5.5 Bloklama ve Antikor Uygulaması

Transferden alınan membranlar 20 ml bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu %0,1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS'ye %5 süt tozu karıştırılarak hazırlandı. Membran üzerine bloklama solüsyonu dökülerek oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bloklama solüsyonu alınarak membran 3 kere %0,1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile 5 dakika arayla yıkandı. Membrana 1/500 NonO/p54^{nrb} ve normalizasyon için 1/5000 beta actin olarak iki farklı antikor uygulandı. Bunun için membran primer antikor ile yaklaşık bir buçuk saat muamele edildi. Üç defa yıkandıktan sonra sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi.

2.5.6 UVP Görüntülenme Sistemi

Membranlar Pierce ECL substratı hazırlanarak (Reagent A ve B) ile 2 dakika muamele edildi. UVP sisteminde görüntüleme yapıldı.

2.6 EMSA

2.6.1 Nükleer Ekstrakt Hazırlanışı

Hücre kültüründe 75 cm²'lik flasklarda büyütülen ilgili hücre hattı %95 doluluğa eriştikten sonra 10 ml PBS ile 2 kere yıkandı. Hücreler buz üzerinde 3 ml Ten buffer ile muamele edildi. Flasktaki hücreler kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı ve iki ependorfa eşit olarak paylaştırıldı. +4°C soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı pellet 1,5 ml soğuk PBS ile yıkandı ve +4°C soğuk santrifüjde 5 dakika santrifüj edildi. İnsülin iğnesi yardımıyla 50 µl A tamponu içerisinde pellet lizis edildi. +4°C soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı.

Oluşan pellet 60 µl C tampon içerisinde süspansiyon haline getirildi. Buz üzerinde 30 dakika bekletildi. +4°C soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Qubit kullanılarak protein miktar tayini yapıldı. Elde edilen nükleer ekstraktlar ependorflara 10 µl alikot edildi ve -80°C’de saklandı (Tablo 2.20).

Tablo 2.19: Nükleer Ekstrakt için gereken solüsyonların hazırlanışı.

TEN Buffer	40mM Tris-HCl (ph: 7,5) 1mM EDTA 150mM NaCl
A Tamponu	10mM HEPES (PH: 7,9), 10mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche)
C Tamponu	20mM HEPES (PH: 7,9), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, %25 gliserol, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche)

Tablo 2.20: EMSA çalışması için gereken malzemeler.

LightShift® Kemiluminesans EMSA Kit (Thermo Scientific)	10X Bağlanma Solüsyonu, %50 Gliserol, Poli dIdC, 100mM MgCl ₂ , 200mM EDTA (Ph: 8) , 1 M KCL, 5X Yükleme Tamponu
Pierce Biotin 3' Ucu DNA Etiketleme Kiti™ (Pierce)	5X TdT Reaksiyon tamponu, Terminal Deoksiniükleotidil Transferase (TdT), Biotin-11-UTP
Nükleik asit tanıma kiti Kemiluminesans (Thermo Scientific)	Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroksidaz Konjugat, Kemiluminesans Substrat, Luminol/Enhancer Solüsyon, Stable Peroksit Solüsyonu, Bloklama Tamponu, 4X Yıkama tamponu, Substrat Dengeleme Tamponu

2.6.2 Oligoların Etiketlenmesi

Etiketleme için ilk olarak kitin prosedürüne uygun olarak Tdt enzimi 2 Ü/ml olacak şekilde reaksiyon tamponu ile sulandırıldı. Reaksiyon son hacmi 50uL; 5X reaksiyon tamponundan son konsantrasyonları 1X, 1µM oligo 100nM, 5µM Biotin 11-UTP 0.5µM, 2U/µL dilüe edilmiş TdT enzimi 0,2U/µL olacak şekilde kuruldu. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda (ph:8) 0,2 M EDTA eklendi. 50µL kloroform-izoamil alkol (24:1) tamponu reaksiyondan TdT enzimini uzaklaştırmak için eklendi. 2 dk santrifüj yapıldı ve üst faz yeni ependorfa alındı. Etiketlenmiş prob -20°C'de muhafaza edildi.

2.6.3 Oligonükleotidlerin Bağlanması

Bu aşamada etiketlenmiş İleri ve geri oligolar (1pmol/ µl) eşit miktarda alınıp çift zincirli DNA oluşturuldu. Oligolar birleştirilerek çift zincirli hale getirildi. Bu amaçla biyotinli primerlerden son konsantrasyonu 80 fmol/µl olacak şekilde eşit miktarda alınarak 50 µl' lik hacim oluşturuldu. Daha sonra 95⁰C' de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda primerler oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilerek soğuması sağlandı. Biyotinsiz problarda bu aşama biyotinli probların 1000 kat fazlası yani 80.000 fmol/µl olacak şekilde hazırlanarak inkübasyona bırakıldı. Tüm oligolar -20°C'de saklandı.

2.6.4 Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması

Bağlanma reaksiyonları için 4 µg nükleer ekstrakt, son konsantrasyonu 1X olacak koşullarda bağlanma tamponu, son konsantrasyonu 50 ng/µl poly dI.dC, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 20fmol biotin etiketli primer ilave edilerek 10 dk buzda bekletildi. Bağlanma reaksiyonlarının tamamlanması için oda sıcaklığında 20 dk bekletildi.

2.6.5 Poliakrilamid Jel Hazırlanması

EMSA deneyi için Tablo 2.21'de belirtilen solüsyonlar kullanılarak poliakrilamid jel döküldü. Jel hazırlanmadan bir gece önce kullanılacak cam malzemeler saf su içinde bekletildi ve ethanol ile temizlenerek steril hale getirildi. Tablo 2.22'de belirtilen şekilde poliakrilamid jel hazırlandı ve yürütme tamponu ile 90 V'luk akımda 1 saat boyunca ön yürütme yapıldı.

Tablo 2.21: EMSA için Poliakrilamid jel hazırlanışı.

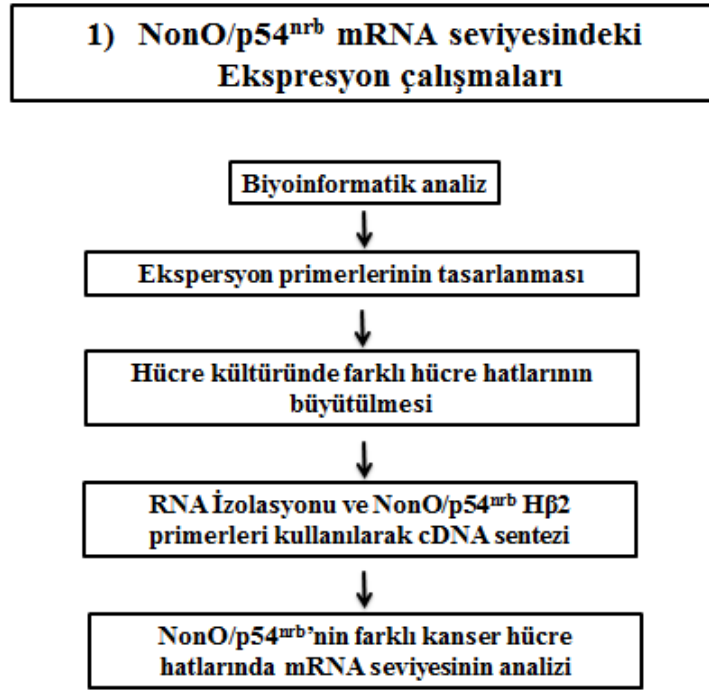
5X TBE (0,5X TBE son konsantrasyonu)	600 µl
%50 Gliserol	50 µl
%40 Poliakrilamid Solüsyonu (%6 son konsantrasyon)	0,9 ml
TEMED	6 µl
%10 APS (% 0,25 son konsantrasyonu)	60 µl
ddH ₂ O	4,3 ml eklenerek 6ml son hacim oluşturularak jel döküldü.

2.6.6 Proteinlerin Membrana Transferi

Transfer işlemi için naylon membran jel büyüklüğünde kesildi. 0,5 X TBE transfer tamponu içerisinde naylon membran, jel, Whatman 3 MM kağıt, sünger pedler 10 dk bekletildi. Daha sonra sırasıyla Whatman kağıdı-jel-membran-Whatma kağıdı-sünger konularak hava kabarcığı oluşumu engellendi. Bu şekilde kaset içerisinde sandviç modeli oluşturuldu. Önceden soğutulmuş olan transfer tamponu blot tankına alındı ve hazırlanan kaset tanka eksi yükü kutup yönünde yerleştirildi. Bu şekilde 90 V'luk akımda yaklaşık 1,5- 2 saat transfere bırakıldı. Transfer işleminden sonra membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde streç film ile sarılarak kross-link reaksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için 15 dk UV transilimünatörde bekletildi. Bu aşamadan sonra membran bloklama tamponu içerisine alınarak oda sıcaklığında 15 dk çalkalandı. Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate taze bloklama tamponu ilave edildi ve 15 dk boyunca çalkalandı. Membran 1X yıkama tamponu ile üç defa yıkandı. Yıkama aşamasından sonra 15 ml substrat dengeleme tamponu eklenerek 5 dk boyunca çalkalandı. Membran ECL substratı ile muamele edilerek Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1 NonO/p54^{nrB} Farklı Kanser Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi



Şekil 3.1: Çalışmanın 1. Basamağına ait akış diyagramı.

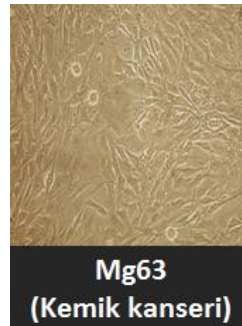
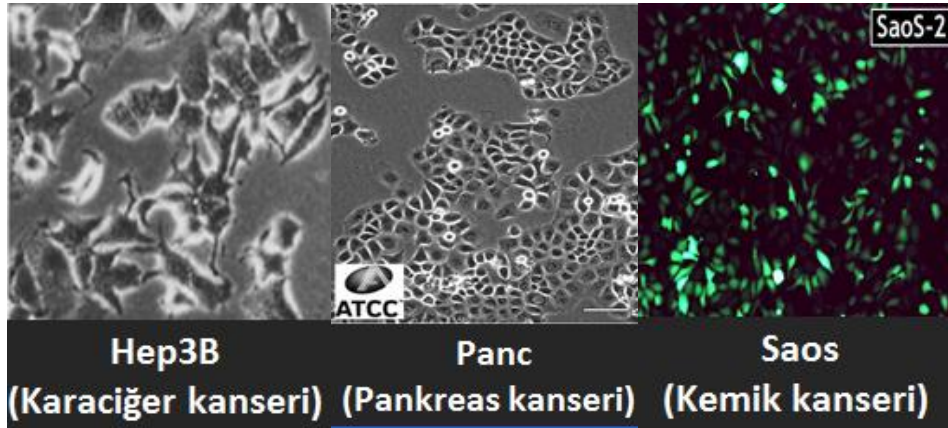
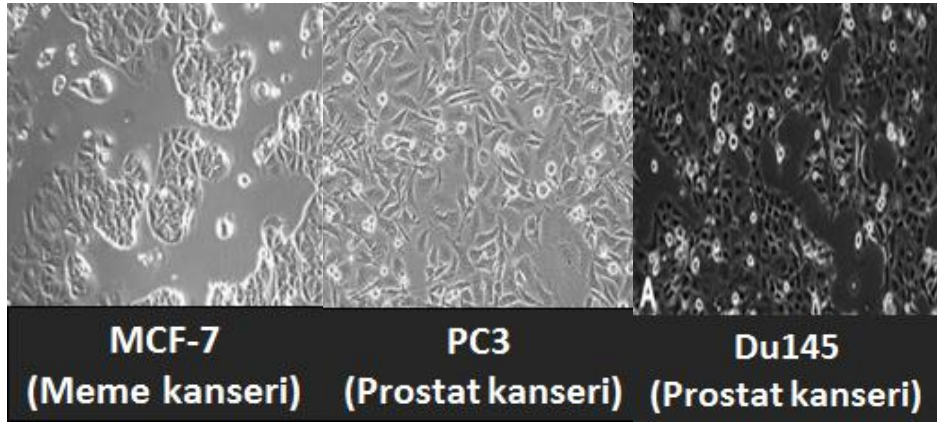
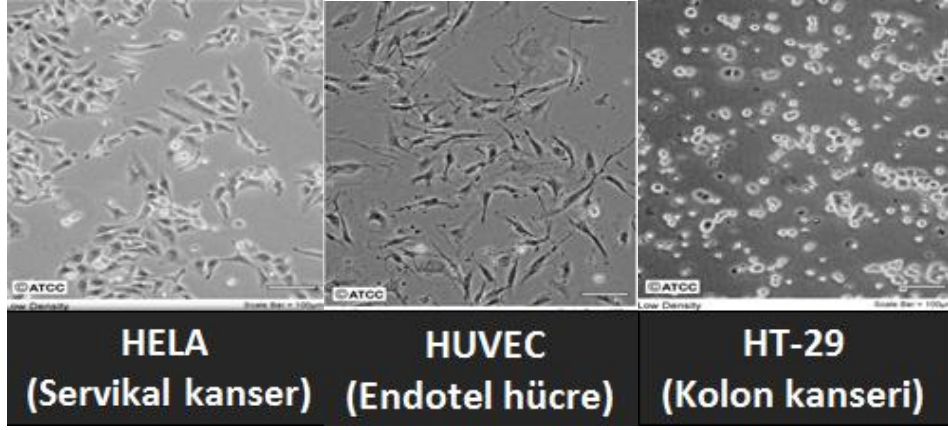
Ekspresyon çalışmaları için ilk olarak Bölüm 2.3.1’de belirtilen şekilde NonO/p54^{nrB} geninin biyoinformatik analizi yapılmıştır. Şekil 3.2’de gösterilen Homo sapiens non-POU domain containing, octamer-binding (NONO), transcript variant 4, mRNA dizisi 3. Exon üzerinden belirtilen şartlara uygun olarak ileri ve geri primer dizaynı yapılmıştır. Tablo 2-4’de NonO/p54^{nrB} ve H-β-2 Microglobulin ekspresyon primerleri gösterilmiştir.

```

1 CAGGCGCAGT GCAGGACTGC TCCGAGCAGG CCTACGCGCG CATTCTCTCC CCTTCCTCTC
61 CCTCTTTCCA CTTTCCTCTC CCTTTTTCTC CTCTCCTTTC CCCCTCCCAC CACTTGGTCT
121 TTCAGTCTTT CAGTCAGTTC GTTTAGGTCT CTCCTTCCGA CCCCCACCCC CAGTCCTCTC
181 CCCTTTCCTT TTCCCCCTCC CCCTTTCCTT TCCCGTCTCA CGCGCCAGGC CGCTTGACAC
241 TCGGCATTAG GTACAAAGCC TCGCTCTTTG TCCCCATCTG TCGTTCACAC GAACTCAAGC
301 CTTTGGCATT CGGCAGCCAA TAGAATCTAA GAAATGGCGG AAAAAATGATT CCGCCTCGGG
361 AGCTAAACCT TGATTGGCAG TTTAGCTAAC CAATCGAGAA CGCCATTTTG TACCCTTGG
421 CAGGCACCGA GCTCCGTCGT CTCGTTTCCG GCGGTCCGCG GCTCTTTTCT CGGGACGGGA
481 GAGGCCGTGT AGCGTCGCCG TTAGTCCGAG GAGATACCAG TCGGTAGAGG ATGAAGGCTT
541 GACTATTGAC CTGAAGAATT TTAGAAAACC AGGAGAGAAG ACCTTCACCC AACGAAGCCG
601 TCTTTTTGTG GGAATCTTC CTCCGACAT CACTGAGGAA GAAATGAGGA AACTATTGTA
661 GAAATATGGA AAGGCAGGCG AAGTCTTCAT TCATAAGGAT AAAGGATTTG GCTTTATCCG
721 CTTGGAAACC CGAACCTAG CGGAGATTGC CAAAGTGGAG CTGGACAATA TGCCACTCCG
                                     İleri primer
781 TGGAAAGCAG CTGCGTGTGC GCTTGCCTG CCATAGTGCA TCCCTTACAG TTCGAAACCT
841 TCCTCAGTAT GTGTCCAACG AACTGCTGGA AGAAGCCTTT TCTGTGTTTG GCCAGGTAGA
901 GAGGGCTGTA GTCATTGTGG ATGATCGAGG AAGGCCCTCA GAAAAGGCA TTGTGAGTT
961 CTCAGGGAAG CCAGCTGCTC GAAAGCTCT GGACAGATGC AGTGAAGGCT CCTCCTGTCT
                                     Geri primer
1021 AACACATTT CCTCGTCTG TACTGTGGA GCCCATGGAC CAGTTAGATG ATGAAGAGGG
1081 ACTTCCAGAG AAGCTGGTTA TAAAAACCA GCAATTCAC AAGGAACGAG AGCAGCCACC
1141 CAGATTGCA CAGCCTGGCT CCTTTGAGTA TGAATATGCC ATGCGCTGGA AGGCACTCAT
1201 TGAGATGGAG AAGCAGCAGC AGGACCAAGT GGACCGCAAC ATCAAGGAGG CTCGTGAGAA
1261 GCTGGAGATG GAGATGGAAG CTGCACGCCA TGAGCACCCAG GTCATGCTAA TGAGACAGGA
1321 TTTGATGAGG CGCCAAGAAG AACTTCGGAG GATGGAAGAG CTGCACAACC AAGAGGTGCA
1381 AAAACGAAAG CAACTGGAGC TCAGGCAGGA GGAAGAGCGC AGGCGCCGTG AAGAAGAGAT
1441 GCGGCGGCAG CAAGAAGAAA TGATGCGGCG ACAGCAGGAA GGATTCAAGG GAACCTTCCC
1501 TGATGCGAGA GAGCAGGAGA TTCGGATGGG TCAGATGGCT ATGGGAGGTG CTATGGGCAT
1561 AAACAACAGA GGTGCCATGC CCCCTGCTCC TGTGCCAGCT GGTACCCAGC CTCCTCCAGG
1621 ACCTGCCACT ATGATGCCGG ATGGAACCTT GGGATTGACC CCACCAACA CTGAACGCTT
1681 TGGTCAGGCT GCTACAATGG AAGGAATTGG GGCAATTGGT GGAATCCTC CTGCATTCAA
1741 CCGTGCAGCT CCTGGAGCTG AATTGCCCC AAACAAACGT CGCCGATACT AATAAGTTGC
1801 AGTGTCTAGT TTCTCAAAAC CCTTAAAAGA AGGACCCTTT TTGGACTAGC CAGAATTCTA
1861 CCCTGGAAAA GTGTTAGGGA TTCCTTCCAA TAGTTAGATC TACCCTGCC TACTACTCT
1921 AGGGAGTATG CTGGAGGCAG AGGGCAAGGG AGGGGTGGTA TTAACAAGT CAATTCTGTG
1981 TGGTATATTG TTTAATCAGT TCTGTGTGGT GCATTCCTGA AGTCTCTAAT GTGACTGTTG
2041 AGGGCCTGGG GAAACCATGG CAAAGTGGAT CCAGTTAGAG CCCATTAATC TTGATCATT
2101 CGGTTTTTTT TTTTTTGTG CATCTTGTG CATTGCTTG CCCCGCCCC GAGACGGAGT
2161 CTTACTCTGT CGCCAGGCT GGAGTGTAGT GGCATGATCT CGGCTCACTG CAATCTCTGC
2221 CTCCCGGTT CAAGCTTGT CAGTTGATC TTGAACTCCT GACCTCGTGA TCTACCACC
2281 TCGGCCTCCC AAAATGCTGG GATTACAGG GTGAGCCACC GTGCCAACC TCACTTGTCT
2341 CTTATCCTTA CACTCCCCA GCCCAGAGA AACTGCCACA TACACCACA AAACCAACA
2401 TCCCCAATG ACCTTAGCCC CATTGCTCCA TCACTCCA GGTGAGAATT CAGGCAAACG
2461 TCCACAAAG TCACAGGCAG CGTACATAC GTTCTGTAT ACCCATATA TTACCCTTC
2521 ATGTCCTAAA GAAGACATT TCTCTAGAG ATTTTCATT TAGTGTATCT TAAAAAAA
2581 ATCTTGTGTT AACTTGCTC CATCTTTTC TTGGGTGAGG ACACCCAGGA ATGACCCTT
2641 TGTGTCTATG ATGTTGCTGT TCACAGCTT TCTTGATAG CCTAGTACAA TCTTGGGAAC
2701 AGGGTTACTG TATACTGAAG GTCTGACAGT AGCTCTTAGA CTCGCCTATC TTAGGTAGTC
2761 ATGCTGIGCA TTTTTTTTT CATTGGTGT CTGTGTTTGA TTTGTCTCAT ATATTGGAG
2821 TTTTCTGAA AAATGGAGCA GTAATGCAGC ATCAACCTAT TAAAATACAT TTTAAGCCTT
2881 TAAAAAAA AAAA

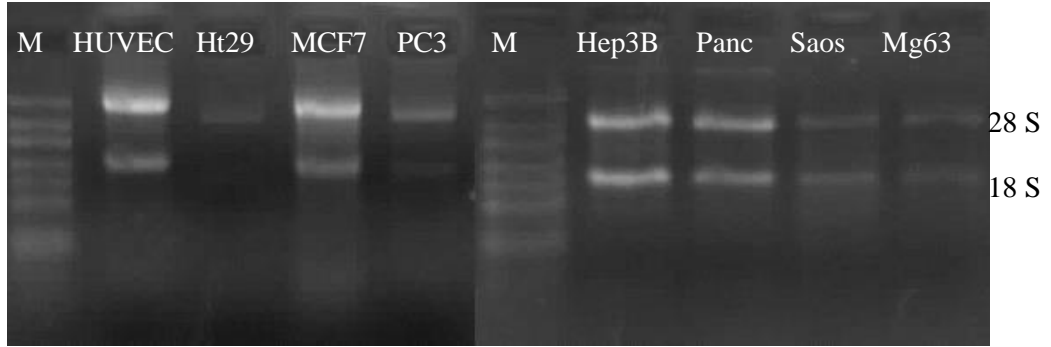
```

Şekil 3.2: İnsan NonO/p54^{nrb} mRNA transkripsiyon varyant 4 mRNA NCBI dizisinden belirlenen primer bölgeleri [18].



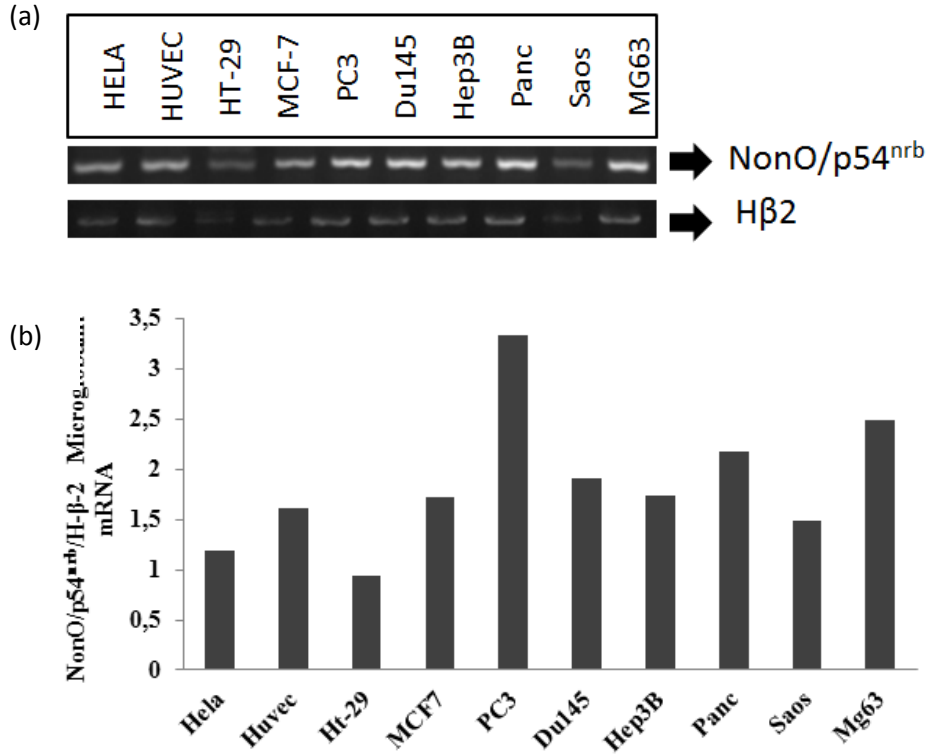
Şekil 3.3: Farklı kanser hücre hatlarının morfolojik görüntüsü.

Hücre kültürü ortamında Tablo 2-5’de belirtilmiş olan HELA, HUVEC, HT-29, MCF7, PC3, Du145, Hep3B, Panc, Saos ve MG63 hücre hatlarının Şekil 3.3’de elektron mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. Bu hücre hatları uygun koşullar altında hücre kültüründe büyütülmüştür (Bölüm 2.3.2 bkz). Flask yüzeyini %80-90 oranında kapladığında en az haftada bir rutin olarak pasajlama yapılmıştır. Daha sonra hücrelerden RNA pelletleri elde edilmiştir. RNA izolasyonu Fermentas RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Farklı hücre hatlarına ait RNA’ların miktar tayini yapılmış ve RNA’lar -80’de muhafaza edilmiştir (Bölüm 2.3.3 bkz).



Şekil 3.4: 10 farklı hücre hattının (Hela: Servikal kanser, Huvec: Sağlıklı endotel hücre, Ht-29: Kolon kanseri, MCF7: Meme kanseri, PC3: Prostat kanseri, Du145: Prostat kanseri, Hep3B: Karaciğer kanseri, Panc: Pankreas kanseri, Saos: Kemik kanseri, Mg63: Kemik kanseri) RNA jel elektroforez görüntüsü.

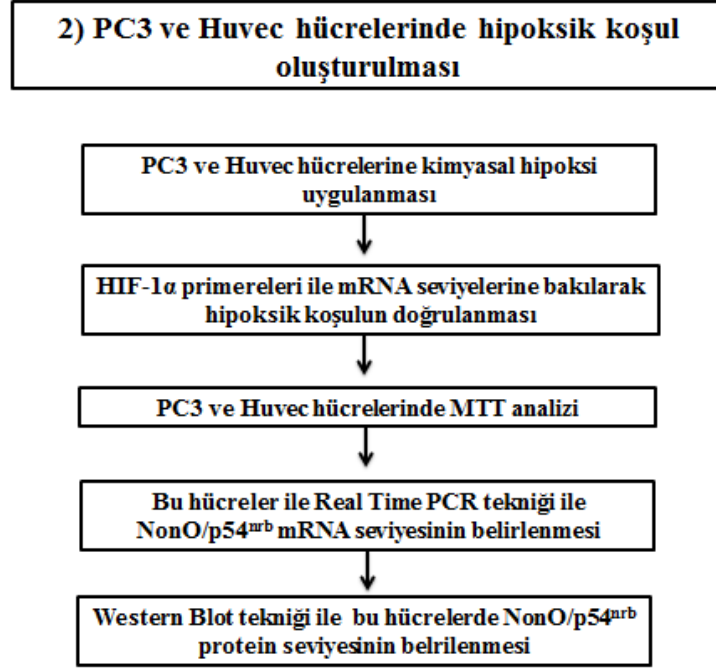
HELA, HUVEC, HT-29, MCF7, PC3, Du145, Hep3B, Panc, Saos ve MG63 hücre hatlarından izole edilen RNA’lar 1000ng olarak kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Spesifik NonO/p54^{nrb} ve H- β -2 Mikroglobulin ekspresyon primerleri kullanılarak farklı hücre hatlarından PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 2.3.3.3). Çoğaltılan bölgelere ait ürünler %1’lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Sonuçlar densitometrik olarak analiz edildi.



Şekil 3.5: NonO/p54^{nrb} geninin densitometrik analizi, a) NonO/p54^{nrb} geni ve H-β-2 kontrol geninin 10 farklı (Hela: Servikal kanser, Huvec: Sağlıklı endotel hücre, Ht-29: Kolon kanseri, MCF7: Meme kanseri, PC3: Prostat kanseri, Du145: Prostat kanseri, Hep3B: Karaciğer kanseri, Panc: Pankreas kanseri, Saos: Kemik kanseri, Mg63: Kemik kanseri) hücre hattındaki agaroz jel görüntüsü, b) NonO/p54^{nrb} geninin farklı kanser hücre hatlarındaki densitometrik analizi.

Densitometrik analiz yapılarak NonO/p54^{nrb} geninin farklı kanser hücre hatlarındaki ekspresyon seviyeleri belirlendi. Şekil 3.5’de gösterildiği gibi her bir kanser hücre hattında NonO/p54^{nrb} geninin ekspresyon seviyeleri farklılık göstermektedir. NonO/p54^{nrb} için gösterilen bu ekspresyon değişim farklılıkları çeşitli kanser hücrelerinde NonO/p54^{nrb} regülasyonunun farklı şekilde olduğunu düşündürmüştür. NonO/p54^{nrb} ekspersyon seviyesi için seçilen hücre hatlarından en yüksek PC3 hücrelerinde ifade olmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda NonO/p54^{nrb} için yapılacak diğer çalışmalarda PC3 hücre hattı kullanılmasına karar verilmiştir.

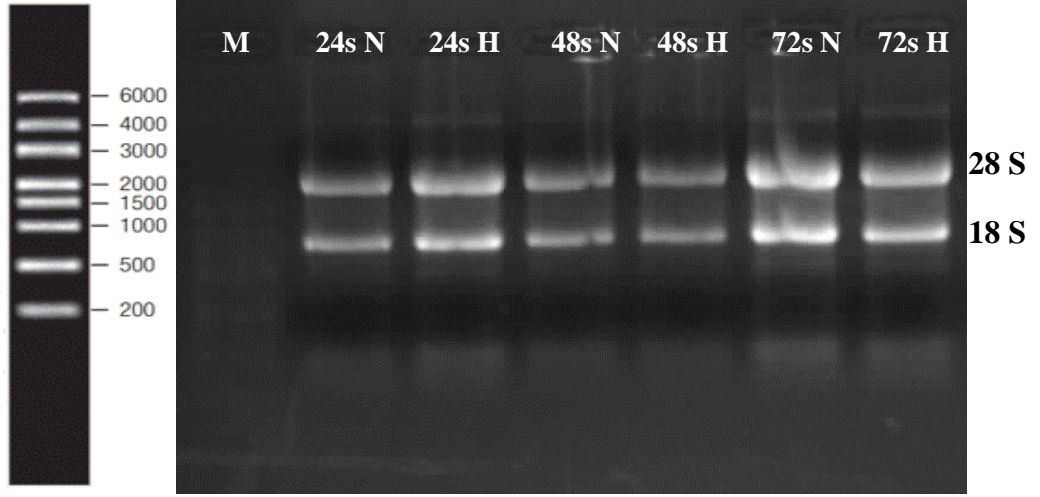
3.2 Hipoksik ve Normoksik Koşulda Sağlıklı Epitel Hücre (HUVEC) Hattı ve Prostat Kanseri Hücre (PC3) Hattındaki NonO/p54^{nrB}'nin mRNA ve protein seviyesinin belirlenmesi



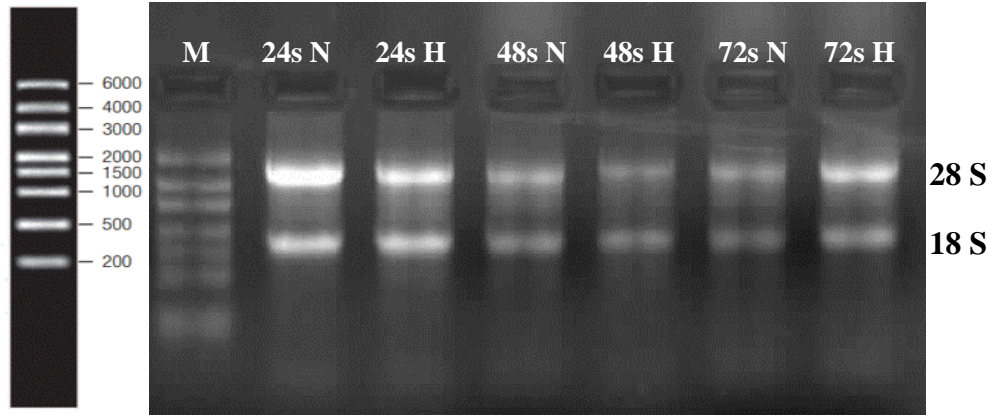
Şekil 3.6: Çalışmanın 2. basamağına ait akış diyagramı.

3.2.1 Hipoksik Koşulun Oluşturulması ve Doğrulanması

PC3 ve HUVEC hücreleri kültür ortamında büyütülerek 25cm² 'lik flasklar içerisine alınmıştır. Son konsantrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl₂ eklenerek kimyasal şartlarda hipoksik koşul oluşturulmuştur (Bölüm 2.3.25 bkz). Normal koşullar için ayrılan hücrelere herhangi bir kimyasal uygulanmamıştır. Bu şekilde hipoksik ve normoksik koşuldaki hücrelerden 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hücre pelletleri alınmış ve RNA izolasyonu yapılarak RNA miktarları ölçülmüştür. PC3 ve HUVEC hücrelerinin RNA jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Her bir örnek için 1 μ g/mL kalıp RNA kullanılarak RT-PCR tekniği ile cDNA sentezi yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.3.3.3).

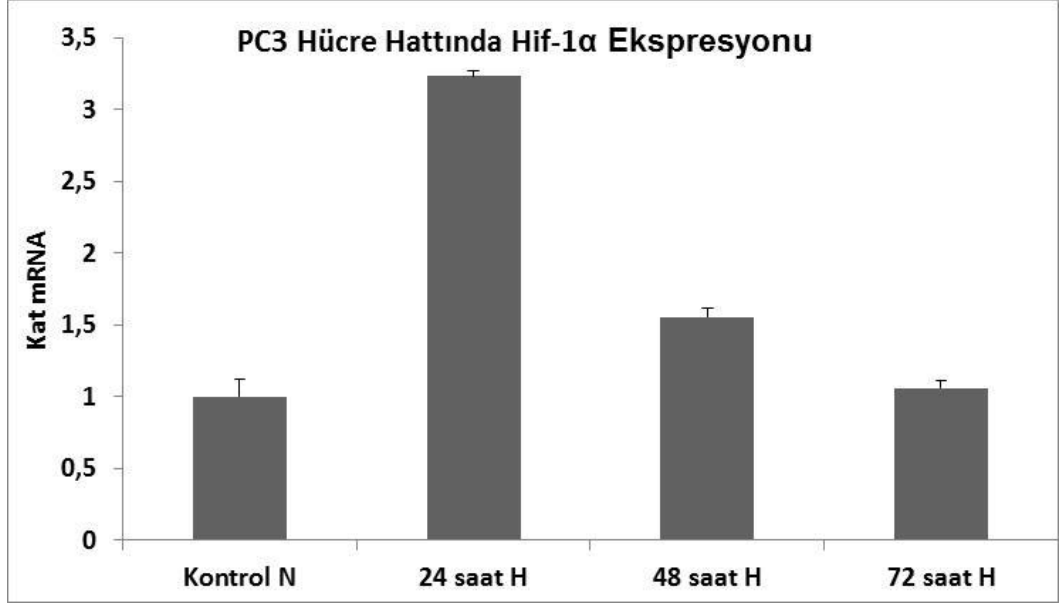


Şekil 3.7: PC3 hücrelerinden hipoksik ve normoksik koşullar altında 24,48 ve 72 saat aralıklarında elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü.

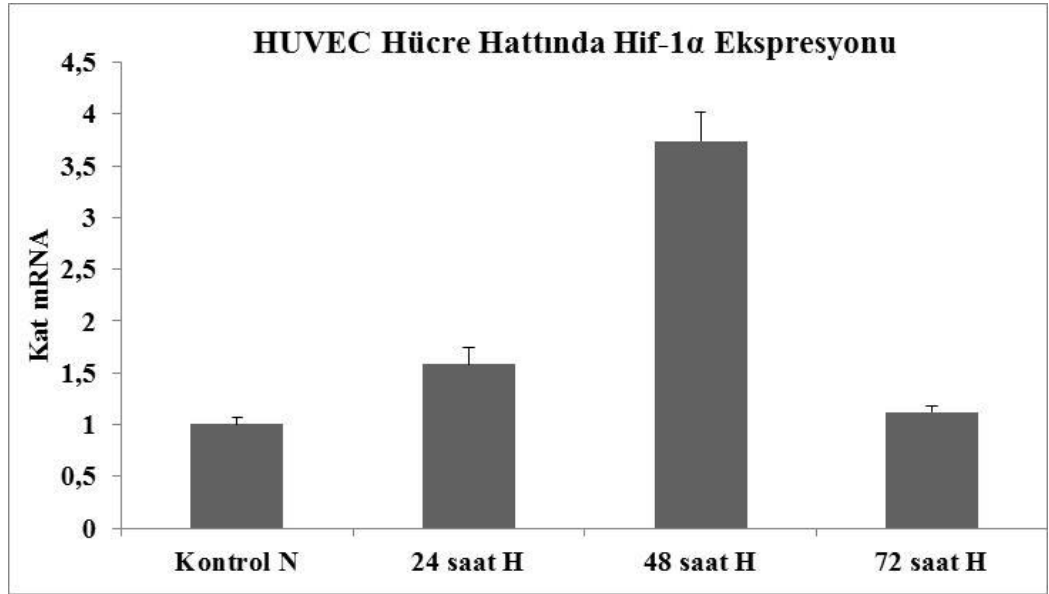


Şekil 3.8: HUVEC hücrelerinden hipoksik ve normoksik koşullar altında 24,48 ve 72 saat aralıklarında elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü.

Hipoksiya ile indüklenebilen faktör 1 (HIF-1 α) anjiyogenez, hormon sentezi, glikoliz ve hücre canlılığı ile ilgili genlerin hipoksik aktivasyonu için temel bir regülatördür. Bu amaçla ilk olarak HIF-1 α mRNA seviyelerine bakılarak hipoksik koşulun oluştuğuna emin olunmuştur. Bunun için Tablo 2-9'da gösterilen HIF-1 α spesifik primerler kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'lar ile HIF-1 α ileri ve geri primerleri kullanılarak Real Time PCR kurulmuştur (Bölüm 2.3.4 bkz). Elde edilen sonuçlar ct değeri Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. Bu şekilde PC3 (Şekil 3.9) ve HUVEC (Şekil 3.10) hücreleri için hipoksik koşulun oluşumu HIF-1 α 'nın ekspresyon profiline bakılarak doğrulanmıştır.



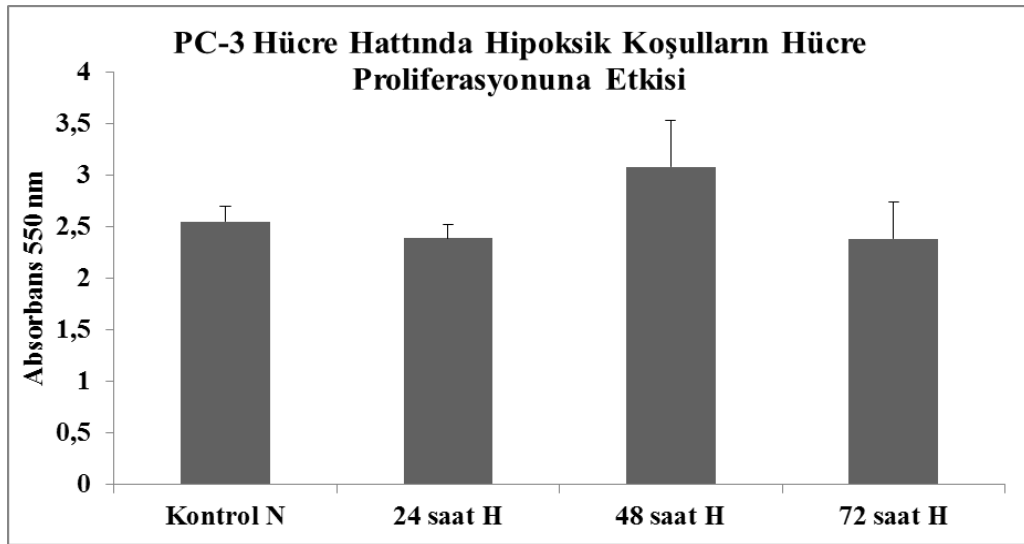
Şekil 3.9: PC3 hücrelerinde HİF-1 α ekspresyonu ile hipoksik koşulun doğrulanması.



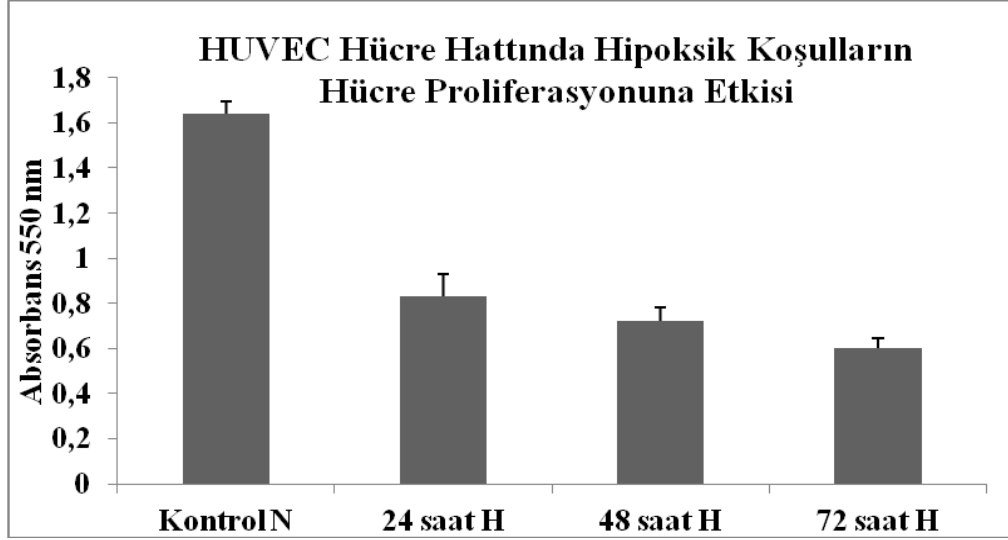
Şekil 3.10: HUVEC hücrelerinde HİF-1 α ekspresyonu ile hipoksik koşulun doğrulanması.

3.2.2 MTT Analizi ile Hipoksik Koşulun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Model olarak kullandığımız hücreler olan PC3 ve HUVEC hücrelerinde hipoksik ve normoksik ortamın hücre proliferasyonuna etkisinin nasıl olduğu MTT testi ile belirlenmiştir. Hücreler kültür ortamında büyütülüp deney kaplarına alınmıştır (bkz. Bölüm 2.3.2.5). Birgün sonra 96 kuyulu plakaların hipoksik kuyularına hipoksik koşul için son konsantrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl_2 uygulanmıştır. Normoksik için ayrılan kuyulara hiçbirşey uygulanmamıştır. 96 kuyulu plakadaki PC3 ve HUVEC hücre hatları için 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücrelere MTT testi uygulanmıştır (bkz. Bölüm 2.3.5). Spektrofotometride 550 nm dalga boyunda absorbansı alınarak sonuçlar excelde değerlendirilmiştir. Hipoksik koşulların hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir. PC3 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlenmemiştir. Ancak HUVEC hücrelerinin hipoksik koşullar duyarlı olduğu gözlenmiştir.



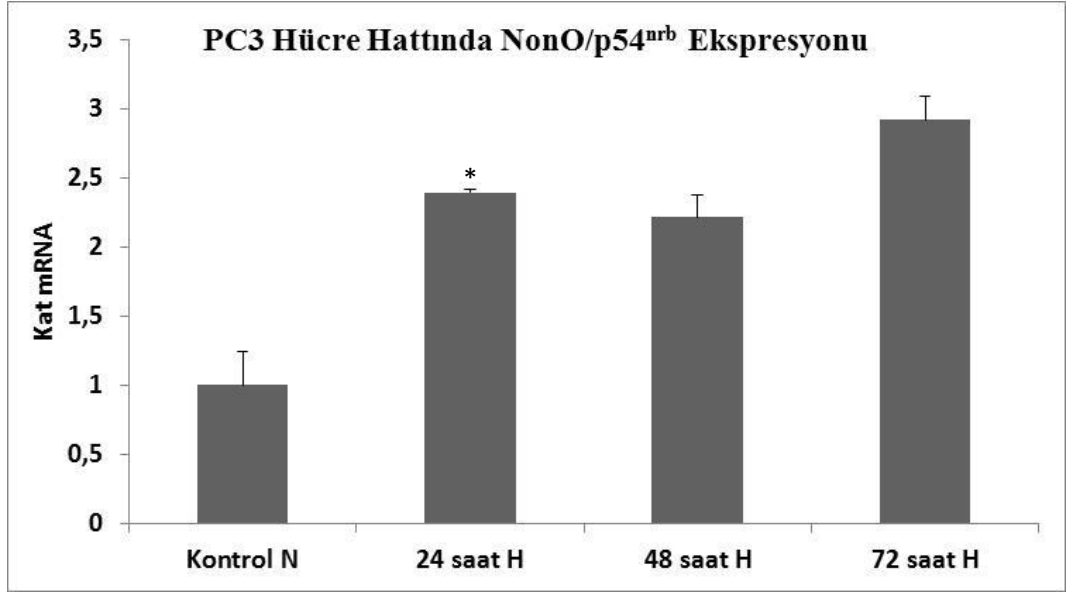
Şekil 3.11: PC3 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşulun hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi.



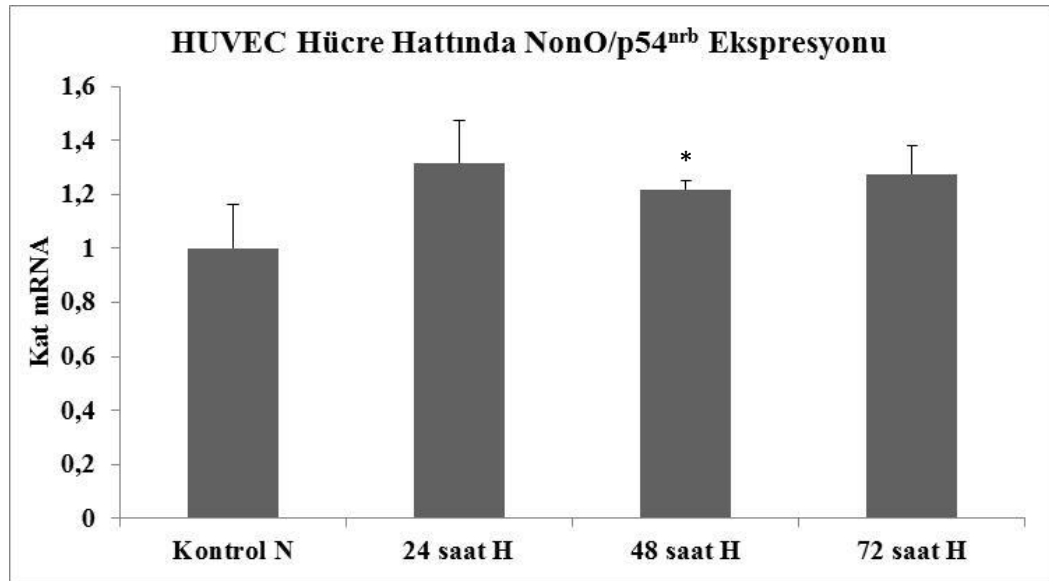
Şekil 3.12: Huvec hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşulun hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi.

3.2.3 NonO/p54^{nrb} Geninin Hipoksik ve Normoksik Koşullardaki Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi

Şekil 3-5’de gösterildiği gibi PC3 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hipoksik koşulun olduğu HIF-1 α ifadesine bakılarak doğrulanmasında sonra PC3 ve HUVEC hücreleri ile RNA izolasyonu yapmak için belirli zaman aralıklarında hücre pelletleri alınmıştır. Hücreler uygun ortamda hafta bir rutin pasaj yapılarak büyütülmüş, daha sonra deney kaplarına alınarak hipoksik için ayrılan flasklara son konsantrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulanmış ve hipoksik koşul oluşturulmuştur (bkz. Bölüm 2.3.2 ve 2.3.3). Belirli zaman aralıklarında (24,48 ve 72 saat) hücre pelletleri alınarak RNA izolasyonu yapıldı, RNA miktarları belirlendi ve örnekler RNA jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UV görüntüleme cihazında görüntülendi. Belirlenen zaman aralıklarında hipoksik ve normoksik olarak elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı (bkz. Bölüm 2.3.3.3). Elde edilen cDNA’lar ile insan NonO/p54^{nrb} ve H- β -2 Mikroglobulin için Tablo 2.4’de belirtilen spesifik primerler kullanılarak Real Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 2.3.4). H- β -2 Mikroglobulin normalizasyon amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen cT değerleri Livak metoduna göre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.13 : PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} mRNA ekspresyonu.



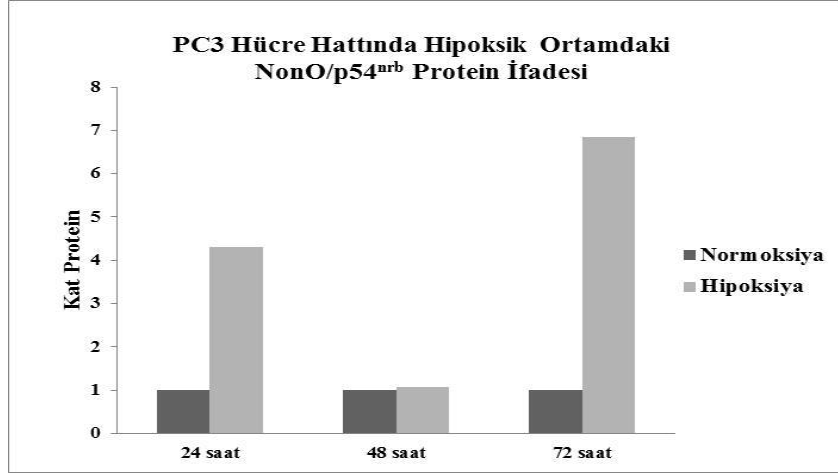
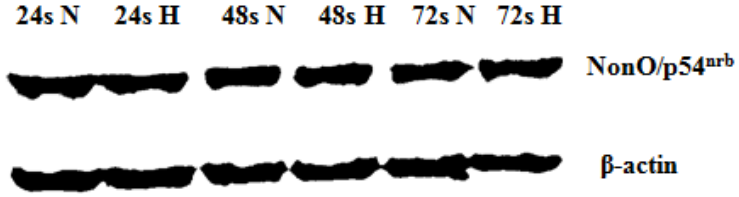
Şekil 3.14: Huvec hücrelerinde NonO/p54^{nrb} mRNA ekspresyonu.

24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında NonO/p54^{nrb} gen ifadesinin PC3 (Şekil 3.13) ve HUVEC (Şekil 3.14) hücrelerinde mRNA düzeyinde hipoksik koşullardaki ifadesi gösterilmiştir. PC3 hücre hattında hipoksik koşullarda istatistiksel olarak anlamlı

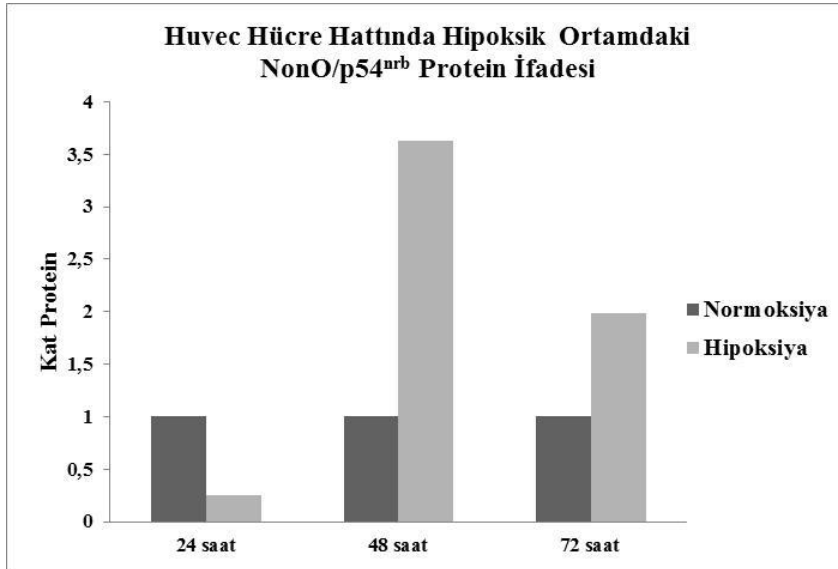
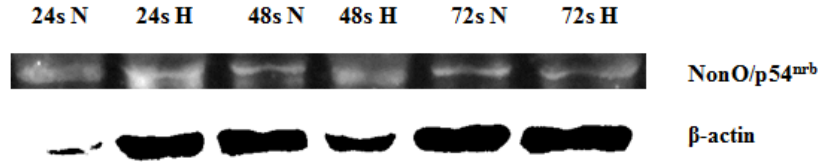
artış tespit edilmiştir. HUVEC hücre hattında ise 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında belirlenen hipoksik koşulun kontrol grubuna göre NonO/p54^{nrb} mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

3.2.4 Hipoksik ve Normoksik Koşullarda NonO/p54^{nrb} Protein Seviyesinin Belirlenmesi

PC3 ve HUVEC hücreleri uygun koşullarda büyütülüp 25 cm²'lik flasklara alınmıştır. Hipoksik için ayrılan flasklara son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hücre pelletleri alınmıştır (bkz. Bölüm 2.3.2 ve 2.3.3). Tablo 2.15'de belirtilen RIPA prosedürüne uygun olarak protein ekstraktları hazırlanmıştır. Oubit kullanılarak elde edilen proteinlerin miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra SDS PAGE jeli hazırlanmıştır (bkz. Bölüm 2.5.3). Protein ekstraktlarından 50 µg alınacak şekilde hesaplanarak jele yüklenmiştir. Proteinler jelde yürütüldükten sonra transfer aşaması için sandviç modeli oluşturulmuştur (bkz. Bölüm 2.5.4). Bir gece boyunca +4°C'de proteinlerin PDVF membranına transferi gerçekleşmiştir. Bloklama solüsyonu hazırlanarak bloklama ve yıkama aşaması yapılmıştır. Membrana 1: 500 NonO/p54^{nrb} antikor ve 1:5000 sekonder antikor uygulanmıştır. Daha sonra aynı membrana üzerine 1:10.000 β-aktin antikor ve sekonder antikor 1: 5000 uygulanarak membran üzerinde proteinler işaretlenmiştir. UVP görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekilmiş ve densitometrik olarak analiz edilmiştir (bkz. Bölüm 2.5.5 ve 2.5.6). PC3 (Şekil 3.15) ve HUVEC (Şekil 3.16) hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hipoksik ve normoksik koşullardaki protein seviyeleri belirlenmiştir. PC3 hücrelerinde 24 saatte protein seviyesinde (Şekil 3.15) NonO/p54^{nrb} artışı gözlenirken, HUVEC (Şekil 3.16) hücrelerinde ise 48 saatte artış gözlenmiştir.

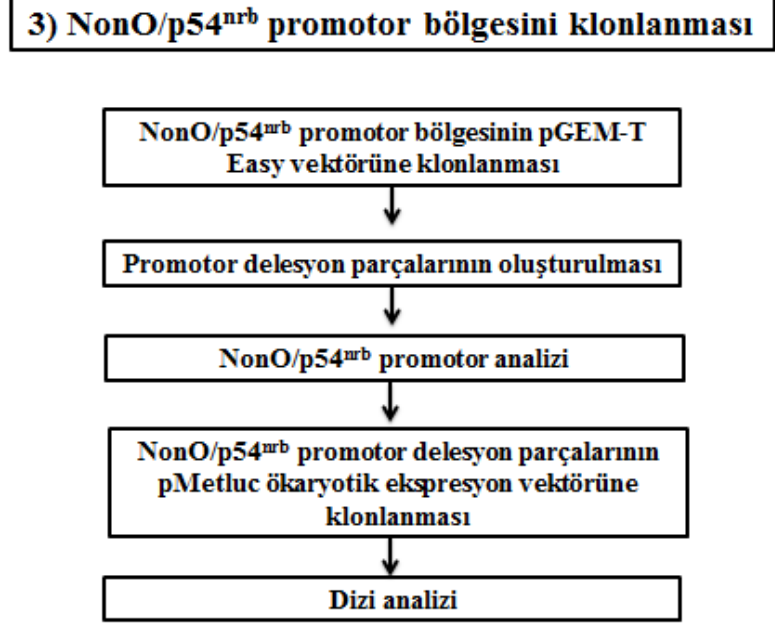


Şekil 3.15: PC3 hücrelerinde hipoksik ortamda NonO/p54^{nr^b} protein ekspresyonu.



Şekil 3.16 : HUVEC hücrelerinde hipoksik ortamda NonO/p54^{nr^b} protein ekspresyonu.

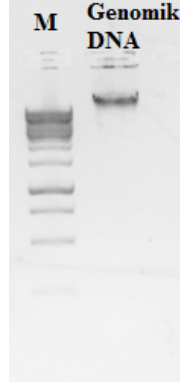
3.3 NonO/p54^{nrb} Promotorunun Klonlanması



Şekil 3.17: Çalışmanın 3. basamağına ait akış diyagramı.

3.3.1 NonO/p54^{nrb} Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

NonO/p54^{nrb} geni NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) sayfasından [Gen Bankası no: NC_000023] bulundu. Bu genin 1259 bç'lik (-730/+529) promotor bölgesi belirlenerek ileri ve geri primer tasarımı yapıldı. Primerler belirtilen özelliklere bakılarak tasarlandı (bkz. Bölüm 2.4.1). Tasarlanan primerler NCBI sayfasından Blast yapılarak insan NonO/p54^{nrb} genine yüksek benzerlikte olduğu saptandı. Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı (bkz. Bölüm 2.4.4) agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 : Kandan genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1kb, Kandan Genomik DNA).

P1 (-730/+529) bölgesinin çoğaltılması için uygun PCR koşulları oluşturuldu NonO/p54^{nrb}'nin Şekil 2.3'de gösterilen 1259 bç'lik P1 (-730/+529) promotor bölgesi çoğaltıldı. P1 (-730/+529) bölgesinin çoğaltılması için Tablo 2.11'de belirtilen spesifik primer dizi kullanılarak 4 tüp hazırlanmıştır. Pozitif ve negatif kontroller için Tablo 2.4'de belirtilen spesifik H-β-2 forward ve reverse primerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.1: NonO/p54^{nrb} promotorunun 1259 bç'lik P1 (-730/+529) bölgesi için optimize edilmiş PCR koşulları.

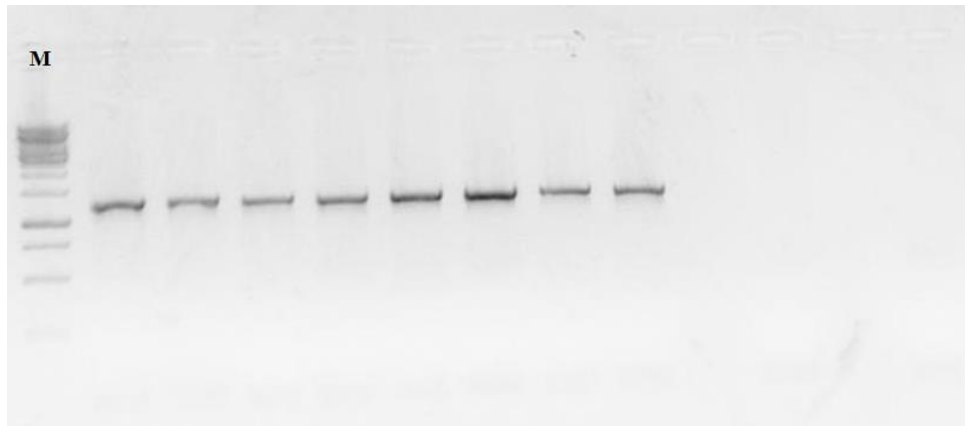
	1	2	3	4	(+)	(-)
DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-
MgCl₂	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dntp	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
NonO/p54^{nrb} P1 Forward	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl H-β-2 F	1 µl H-β-2 F
NonO/p54^{nrb} Reverse	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl H-β-2 R	1 µl H-β-2 R
dH₂O	34 µl	34 µl	34 µl	34 µl	34 µl	39 µl
Taq Pol	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

P1 (-730/+529) promotor bölgesi için PCR optimizasyonu yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.6). Buna göre 1mM MgCl₂ ve 54°C sıcaklıkta Tablo 3.1’de belirtilen koşullarda PCR kurulmuştur. Bu şekilde Tablo 3.2’de belirtilen döngü koşullarında P1 promotor bölgesi (-730/+529) çoğaltılmıştır.

Tablo 3.2: NonO/p54^{nrb} promotor bölgesi için optimize edilmiş PCR döngü koşulları.

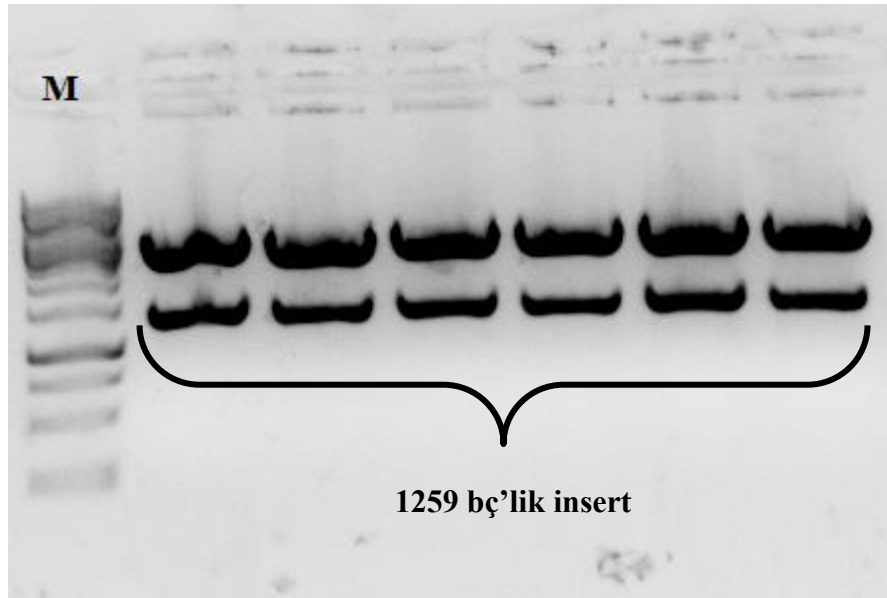
NonO/p54 ^{nrb} Promotor PCR döngü koşulları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94°C	3 dk	1
Denatürasyon	94°C	1dk	35
Bağlanma	54°C	1dk	
Uzama	72°C	1.5 dk	
Final Uzama	72°C	10dk	1

PCR ürünleri için agaroz jel hazırlanmıştır (bkz. Bölüm 2.4.7). Çoğaltılan her tüp iki kuyuya yüklenerek agaroz jel elektroforezinde 90 V’da 35 dakika yürütülmüştür. P1 (-730/+529) bölgesi için çoğaltılmış DNA bantları Şekil 3.19’da gösterilmiştir.



Şekil 3.19: NonO/p54^{nrb} 1259 bp’lik P1 (-730/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

Daha sonra bu bantlar jel pürifikasyon kiti ile geri kazanıldı. Tablo 2.13’de gösterilen ligasyon koşullarına uygun olarak çoğaltılan 1259 bp’lik P1 (-730/+529) promotor bölgesi (insert) pGEM-T Easy vektörü ile bir gece ligasyona bırakıldı. Transformasyon için kompetant hücreler hazırlanmıştır (bkz. Bölüm 2.4.5). Ligasyon ürününün transformasyonu gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 2.4.9). Bir gece inkübasyondan sonra mavi beyaz koloni oluşumu gözlenmiştir. Beyaz koloni seçimi yapılarak Fermentas DNA izolasyon kiti kullanılarak küçük miktarlı plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.10). İzole edilen plazmid DNA’ların (Şekil 3.20) restriksiyon endonükleaz enzimleri XhoI ve HindIII kullanılarak kontrol kesimi yapılmış ve agaroz jelde görüntülenmiştir (bkz. Bölüm 2.4.11).



Şekil 3.20: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1259 bp’lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

```

NCBI Dizi 31 TGGCCACTTATAGTTAGTAGCTGCCATATTGAACACAGCAGACATAGGAACCTTTCCATCA 90
|||||
NonO/P54ncb 4 TGGCC-CCTTATAGTTAGTAGCTGCCATATTGAACACAGCAGACATAGGAACCTTTCCATCA 62
NCBI Dizi 91 TTGCACACAGTCTCTATGAACAGCCCAAGTCTAGATCATTTGTGTCCACATAGGTGGT 150
|||||
NonO/P54ncb 63 TTGCACACAGTCTCTATGAACAGCCCAAGTCTAGATCATTTGTGTCCACATAGGTGGT 122
NCBI Dizi 151 GCOCA-TTGGGATACCCTGCAACCOCTGAGTGTGAATTAATTAAT-GGSAATTAACAACAC 208
|||||
NonO/P54ncb 123 GCOCATTTGGGATACCCTGCAACCOCTGAGTGTGAATTAATTAATGGGAATTAACAACAC 182
NCBI Dizi 209 ATACTTATCAATTGATCCTTGTAGTCTTGGTTAACCAOGGGGGGGGGAGTTAGGCA 268
|||||
NonO/P54ncb 183 ATACTTATCAATTGATCCTTGTAGTCTTGGTTAACCAOGGGGGGGGGAGTTAGGCA 242
NCBI Dizi 269 TTACTGAAACAATGAAGTTAGTTACTGATAGGCOCTCTATGGAATATACAGTCTGATCT 328
|||||
NonO/P54ncb 243 TTACTGAAACAATGAAGTTAGTTACTGATAGGCOCTCTATGGAATATACAGTCTGATCT 302
NCBI Dizi 329 AGAGGCCTACAATATATCCATGGCAATGATGACACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATA 388
|||||
NonO/P54ncb 303 AGAGGCCTACAATATATCCATGGCAATGATGACACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATA 362
NCBI Dizi 389 GGAACAATAGTGAAGTTGGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCATGGAATGAGGGTGCCTG 448
|||||
NonO/P54ncb 363 GGAACAATAGTGAAGTTGGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCATGGAATGAGGGTGCCTG 422
NCBI Dizi 449 GTTACAATCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAAGGTATGATGCAACCCCTCTCCCCACC 508
|||||
NonO/P54ncb 423 GTTACAATCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAAGGTATGATGCAACCCCTCTCCCCACC 482
NCBI Dizi 509 CCGTCTGTAAACATGACCAAGAGTTGACTATTTCAAGTGCCTTTCCCGAGTAGCCCCAG 568
|||||
NonO/P54ncb 483 CCGTCTGTAAACATGACCAAGAGTTGACTATTTCAAGTGCCTTTCCCGAGTAGCCCCAG 542
NCBI Dizi 569 CAACAGGAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGGGGTGCAGGATGCAAGCCCTAAC 628
|||||
NonO/P54ncb 543 CAACAGGAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGGGGTGCAGGATGCAAGCCCTAAC 602
NCBI Dizi 629 AAGGAAGTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATC 688
|||||
NonO/P54ncb 603 AAGGAAGTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATC 662
NCBI Dizi 689 TATCCATTGAATACAATGACATTGTTACTCTTGTCTCTTGACAGGGCCAGTGCAGGAC 748
|||||
NonO/P54ncb 663 TATCCATTGAATACAATGACATTGTTACTCTTGTCTCTTGACAGGGCCAGTGCAGGAC 722
NCBI Dizi 749 TGCTCCGAGCAGCOCTACGGCGCATTTTCTCCCTCTCTCTCCCTCTTTCCACTTTCCCT 808
|||||
NonO/P54ncb 723 TGCTCCGAGCAGCOCTACGGCGCATTTTCTCCCTCTCTCTCCCTCTTTCCACTTTCCCT 782
NCBI Dizi 809 CTCCTTTTCTCTCTCTCTTTCCCTCTCCCTCTCCCTCTTTCCACTTTCCCT 867
|||||
NonO/P54ncb 783 CTCCTTTTCTCTCTCTCTTTCCCTCTCCCTCTCCCTCTTTCCACTTTCCCT 842
NCBI Dizi 868 GTTCGTTAGGTTCTCTCTCTCCGACCCACCCAGCTCCCTCTCCCTTTCTCTTTCCCT 926
|||||
NonO/P54ncb 843 GTTCGTTAGGTTCTCTCTTTCCGACCCACCCAGCTCCCTCTCCCTTTCTCTTTCCCT 902
NCBI Dizi 927 CCTCCCTTTTCC-TTTCCTCTCAAGC-GCCAGGCGCTTGACAT-GCGCAAT-AGG 982
|||||
NonO/P54ncb 903 CCTCCCTTTTCTTTTCCGCTCACGGGCGAGCCGCTTGACATTGCGCAATTAAGG 962
NCBI Dizi 983 TACAAAGCCTC 993
|||||
NonO/P54ncb 963 TACAAAGCCTC 973

```

Şekil 3.21 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1259 bp'lik P1 (-730/+529) bölgenin dizileme Blast N sonucu.

1259 bç'lik promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasından tamamen emin olmak için dizi analizine gönderilmiştir (bkz. Bölüm 2.4.12). P1 (-730/+529) bölgesinin büyük bir bölümü bu dizilemede okunmuştur (Şekil 3.21). NonO/p54^{nrb} promotorunun klonlaması ile sonuçlanacak olan bu çalışmanın son basamağını oluşturan dizi analizi sonuçları Bölüm 3.3.3'de belirtilmiştir.

3.3.2 NonO/p54^{nrb} Promotor Delesyon Parçalarının Oluşturulması

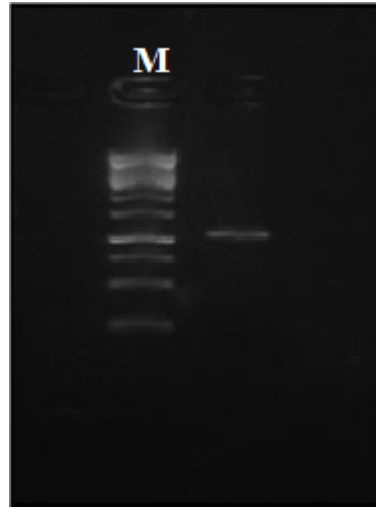
NonO/p54^{nrb}'nin 1259 bç'lik promotor bölgesinden dört ayrı promotor parçasının oluşturulması amaçlandı. Bu dizi üzerinden en büyük bölge P1 (-730/+529) olacak şekilde belirli uzunluklarda 3 farklı bölge belirlendi.

Şekil 2.3'de gösterildiği gibi P1 (-730/+529), P2 (-516/+529), P3 (-336/+529) ve P4 (-159/+529) olarak dört ayrı promotor parçası oluşturuldu. Bütün promotor parçaları için ortak olarak tasarlanan geri primer kullanıldı. İleri primer ise her promotor parçası için ayrı olarak tasarlandı (bkz. Bölüm 2.4.1). NonO/p54^{nrb}'nin oluşturulan promotor parçaları için tasarlanan spesifik primerler Tablo 2.11'de gösterilmiştir.

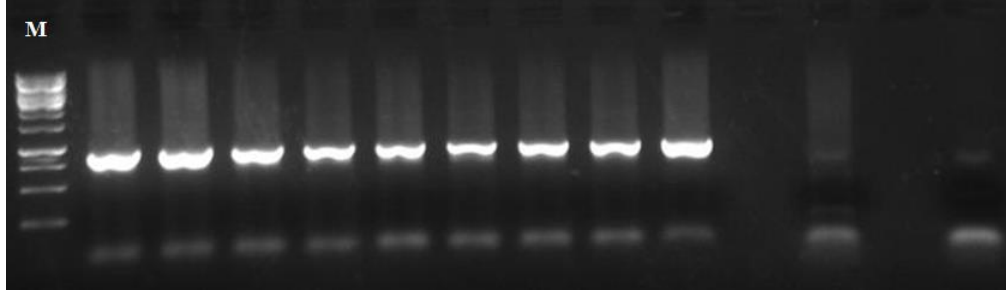
Bu dört ayrı pomotor parçaları spesifik primerler ve kalıp olarak genomik DNA kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltıldı (bkz. Bölüm 2.4.6 ve 2.4.7). Tablo 3.3'de belirtilen koşullar altında her bir promotor bölgesinin PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

Tablo 3.3: NonO/p54^{nrb} promotorunun 1045 bç'lik P2 (-516/+529) , 865 bç'lik P3 (-336/+529) ve 688 bç'lik P4 (-159/+529) bölgesi için optimize edilmiş PCR koşulları.

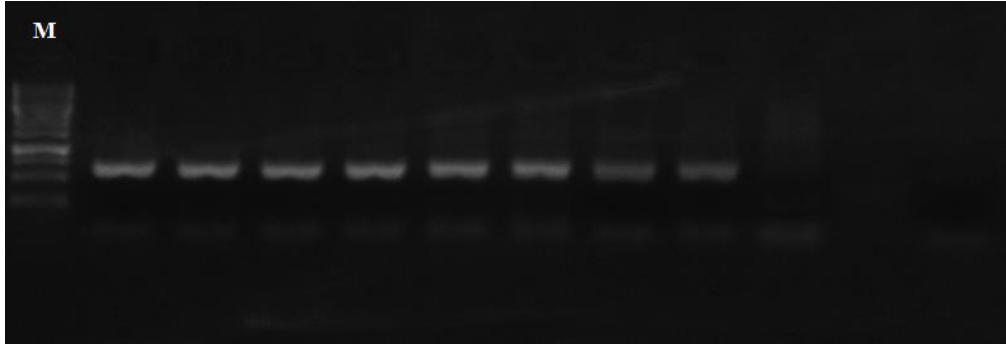
	1	2	3	4	(+)	(-)
DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-
MgCl₂ (1mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dntp	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Forward	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl H-β-2 F	1 µl H-β-2 F
Reverse	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl H-β-2 R	1 µl H-β-2 R
dH₂O	34 µl	34 µl	34 µl	34 µl	34 µl	39 µl
Taq Pol	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl



Şekil 3.22 : NonO/p54^{nrb} 1045 bç'lik P2 (-516/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

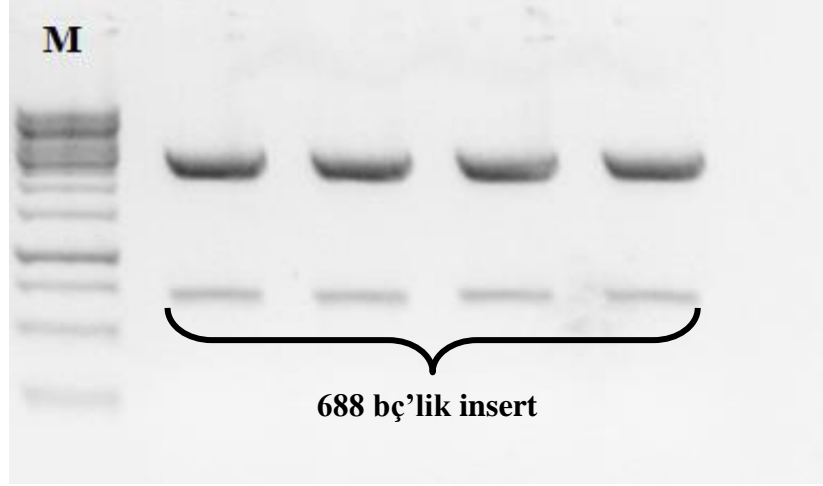


Şekil 3.23: NonO/p54^{nrb} 865 bç'lik P3 (-336/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

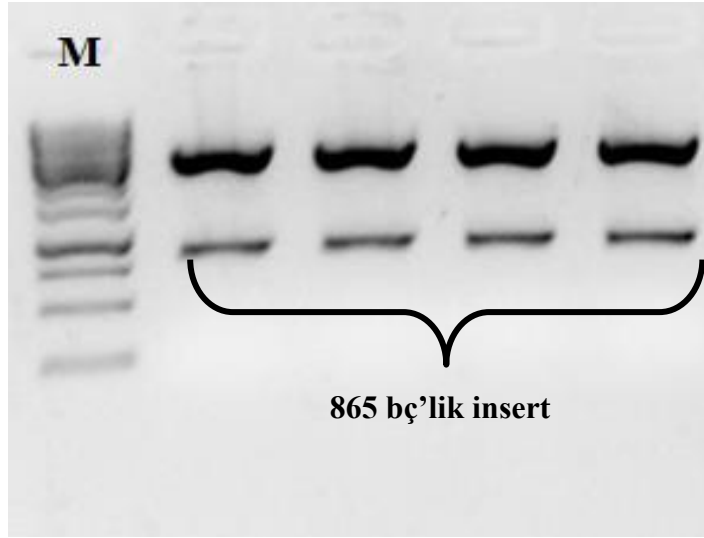


Şekil 3.24: NonO/p54^{nrb} 688 bç'lik P4 (-159/+529) promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

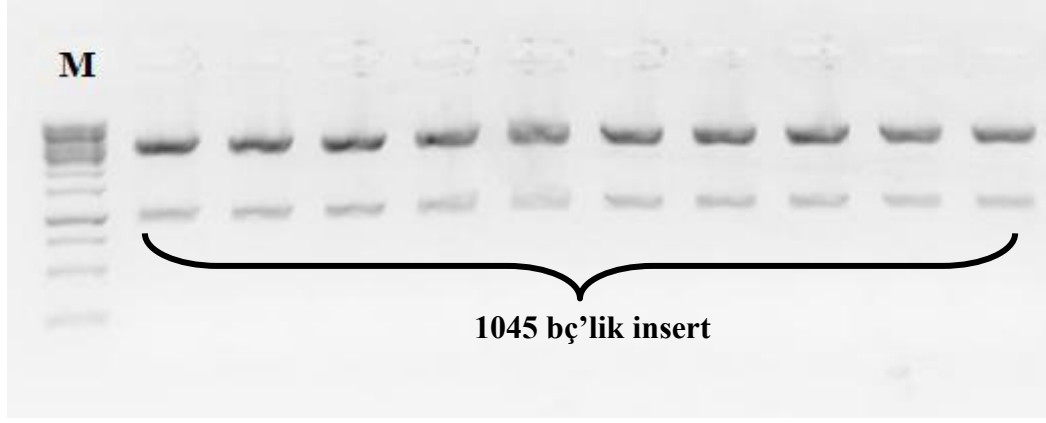
Ayrı ayrı çoğaltılan promotor parçaları P1 (Şekil 3.19), P2 (Şekil 3.22), P3 (Şekil 3.23), P4 (Şekil 3.24) jel pürifikasyon kiti kullanılarak jelden geri kazanılmıştır. Tablo 2.13'de belirtilen koşullar altında diğer üç ayrı promotor parçası için pGEM-T Easy vektörü ile ligasyon koşulları oluşturularak bir gece ligasyona bırakılmıştır. Ampisilin, X-Gal ve IPTG'li petrilerde mavi beyaz koloni oluşumu gözlenerek rekombinant beyaz koloni taranması yapılmıştır. Seçilen beyaz kolonilerden küçük miktarda plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.10). Klonlamanın doğrulanması için restriksiyon endonükleaz enzimleri XhoI ve HindIII kullanılarak kontrol kesime bırakılıp agaroz jelde kesim ürünleri yürütülmüştür (bkz. Bölüm 2.4.11). Her bir promotor parçasının kontrol kesimi P1 (-730/+529) Şekil 3.20, P2 (-516/+529) Şekil 3.27, P3 (-336/+529) Şekil 3.26 ve P4 (-159/+529) Şekil 3.25'de gösterilmiştir. İnsertler jel pürifikasyon kiti ile jelden geri kazanılmıştır.



Şekil 3.25 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 688 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).



Şekil 3.26 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 865 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

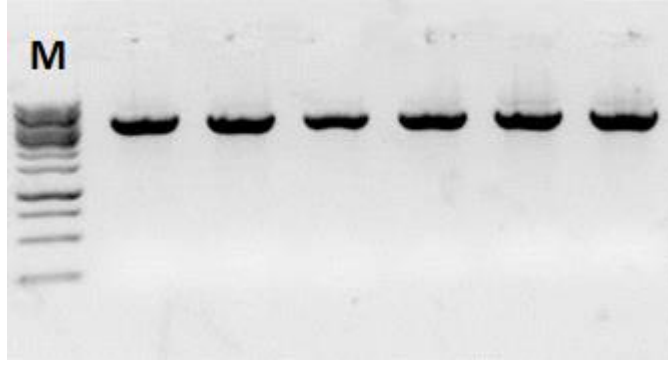


Şekil 3.27 : pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1045 bç'lik bölgenin XhoI ve HindIII kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü (M: 1kb DNA marker).

Dört ayrı promotor parçası için yapılan T:A klonlamanın tamamen doğrulanması için dizi analizine gönderilmiştir (bkz Bölüm 2.4.12).

3.3.3 NonO/p54^{nrb} Promotor Parçalarının pMetluc Vektörüne Alt Klonlanması

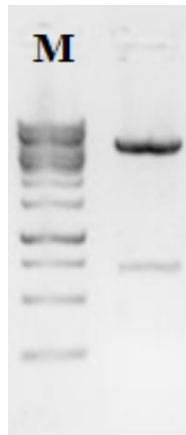
Alt klonlamanın doğru oryantasyonda olabilmesi için promotor parçaları için spesifik primer dizaynı yapılırken belirlenen XhoI ve HindIII restriksiyon kesim bölgelerinin pMetluc vektörü içinde geni kesmediği belirlenmiştir. Aynı zamanda T:A klonlamanın doğrulanmasıyla kontrol kesimi yapılan dört ayrı promotor parçası jelden geri kazanımı yapılmıştır. Küçük ölçekli üç tüp pMetluc reporter vektör izolasyonu yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.10) . XhoI ve HindIII enzimleriyle kesimi yapılarak her tüp iki kuyuya yüklenerek agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 3.28). Daha sonra kesilmiş pMetluc reporter vektör jelden geri kazanılmıştır.



Şekil 3.28: pMetluc reporter vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kontrol kesim agaroz jel görüntüsü.

XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleriyle kesilmiş dört ayrı promotor parçası (insert) ile kesilmiş pMetluc reporter vektörü Tablo 2.14’de belirtildiği şekilde bir gece ligasyona bırakılmıştır.

Dört ayrı ligasyon ürünü için transformasyon yapılmış bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kanamisinli petrilere gözlenen kolonilerden sıvı besiyerine ekim yapılarak küçük miktarlı plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.13 ve 2.4.10). Alt klonlamanın doğrulanması için tekrar XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi yapılmıştır. Promotor parçalarının kontrol kesimleri P4 (-159/+529) Şekil 3.29, P3 (-336/+529) Şekil 3.31, P2 (-516/+529) Şekil 3.33, P1 (-730/+529) Şekil 3.35’de gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş farklı baz çifti uzunluktaki promotor parçaları jelde görüntülenmiştir.



Şekil 3.29 : pMetluc reporter vektörüne klonlanan 688 bp’lik P4 (-159/+529) promotor bölgesinin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.

NCBI DİZİ	572	CAGGAGAAGCATCTAGAAAATAGTAAAGTATGGGGTGT CAGGATGCAAGCCCTAACAAAG	631
NonO/p54 ^{n2b}	1	CAGGAGAAGCATCTAGAAAATAGTAAAGTATGGGGTGT CAGGATGCAAGCCCTAACAAAG	60
NCBI DİZİ	632	GAAGTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAAGCCAAATCTAT	691
NonO/p54 ^{n2b}	61	GAAGTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAAGCCAAATCTAT	120
NCBI DİZİ	692	TCCATTGAATACAAATGACATTGTTACTCTTGCTTCTTGACAGGCGCAGTGCAAGGACTGC	751
NonO/p54 ^{n2b}	121	TCCATTGAATACAAATGACATTGTTACTCTTGCTTCTTGACAGGCGCAGTGCAAGGACTGC	180
NCBI DİZİ	752	TCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTCCCTTCTCTCCCTCTTTCCTTTCCCTCTC	811
NonO/p54 ^{n2b}	181	TCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTCCCTTCTCTCCCTCTTTCCTTTCCCTCTC	240
NCBI DİZİ	812	CCTTTTCTCTCTCTCTCTTTCCCCCCTCCACCCTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCTC	871
NonO/p54 ^{n2b}	241	CCTTTTCTCTCTCTCTCTTTCCCCCCTCCACCCTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCTC	300
NCBI DİZİ	872	GTTTAGGTCCTCTCCCTCCGACCCCAACCCAGCTCCTCTCCCTTTCCCTTTCCCTCC	931
NonO/p54 ^{n2b}	301	GTTTAGGTCCTCTCCCTCCGACCCCAACCCAGCTCCTCTCCCTTTCCCTTTCCCTCC	360
NCBI DİZİ	932	CCCTTTCTCTCTCTCTCTCCGCGCCAGGCGGCTTGACATGCGCATTAGGTACAAAGCC	991
NonO/p54 ^{n2b}	361	CCCTTTCTCTCTCTCTCTCCGCGCCAGGCGGCTTGACATGCGCATTAGGTACAAAGCC	420
NCBI DİZİ	992	TCGCTCTTTGTCCTCATCTGTCGTTACACGAACTCAAGCCTTTGGCATTGGGAGCCAA	1051
NonO/p54 ^{n2b}	421	TCGCTCTTTGTCCTCATCTGTCGTTACACGAACTCAAGCCTTTGGCATTGGGAGCCAA	480
NCBI DİZİ	1052	TAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGATTCGCGCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAG	1111
NonO/p54 ^{n2b}	481	TAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGATTCGCGCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAG	540
NCBI DİZİ	1112	TTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTACCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGT	1171
NonO/p54 ^{n2b}	541	TTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTACCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGT	600
NCBI DİZİ	1172	CTCGTTTCCGGCGGTGCGCGCTCTTTTCTCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGCGTCGCG	1231
NonO/p54 ^{n2b}	601	CTCGTTTCCGGCGGTGCGCGCTCTTTTCTCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGCGTCGCG	660
NCBI DİZİ	1232	TTACTCCGAGGAGATACCAATCGGTAGA	1259
NonO/p54 ^{n2b}	661	TTACTCCGAGGAGATACCAATCGGTAGA	688

Şekil 3.30: pMetluc reporter vektörüne klonlanan 688 bç'lik P4 (-159/+529) promotor bölgesi dizileme Blast N sonucu.

NCBI DİZİ	215	ATCAATTGATCCTTGTAGTCCTTGGTTAACACGGGGGGGGGGCAGTTAGGCATTACTG	274
NonO/p54 ^{nz}	1	ATCAATTGATCCTTGTAGTCCTTGGTTAACACGGGGGGGGGGCAGTTAGGCATTACTG	60
NCBI DİZİ	275	AAACAATGAAGGTTAGTTACTGATAGGCCCTCTATGGAAATACAGTCTGATCTAGAGGC	334
NonO/p54 ^{nz}	61	AAACAATGAAGGTTAGTTACTGATAGGCCCTCTATGGAAATACAGTCTGATCTAGAGGC	120
NCBI DİZİ	335	CTACAATATATCCATGGCAATGATGACACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATAGGAACA	394
NonO/p54 ^{nz}	121	CTACAATATATCATGGCAATGATGACACCTGTTGAACTCTCTCAGTAAATCATAGGAACA	180
NCBI DİZİ	395	ATAGTGATGTTTGGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCATGGAAATGAGGGTGCTGGTTACA	454
NonO/p54 ^{nz}	181	ATAGTGATGTTTGGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCATGGAAATGAGGGTGCTGGTTACA	240
NCBI DİZİ	455	ATTCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAAGGTATGATGCACCCCTCTCCCCACCCCGTCT	514
NonO/p54 ^{nz}	241	ATTCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAAGGTATGATGCACCCCTCTCCCCACCCCGTCT	300
NCBI DİZİ	515	GTAACCATGACCAAAGAGTTGACTATTTTCAGTTGCGTTTCCCAGTAGCCCCAGCAACAG	574
NonO/p54 ^{nz}	301	GTAACCATGACCAAAGAGTTGACTATTTTCAGTTGCGTTTCCCAGTAGCCCCAGCAACAG	360
NCBI DİZİ	575	GAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGGGGTGCAGGATGCAAGCCCTAACAGGAA	634
NonO/p54 ^{nz}	361	GAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGGGGTGCAGGATGCAAGCCCTAACAGGAA	420
NCBI DİZİ	635	GTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCC	694
NonO/p54 ^{nz}	421	GTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCC	480
NCBI DİZİ	695	ATTGAATACAATGACATTGTTACTCTTGCCTTTCACAGGCGCAGTGCAGGACTGCTCC	754
NonO/p54 ^{nz}	481	ATTGAATACAATGACATTGTTACTCTTGCCTTTCACAGGCGCAGTGCAGGACTGCTCC	540
NCBI DİZİ	755	GAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTCCCTCTCTCCCTCTTCCACTTCTCTCCCT	814
NonO/p54 ^{nz}	541	GAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTCCCTCTCTCCCTCTTCCACTTCTCTCCCT	600
NCBI DİZİ	815	TTTTCTCCTCTCCTTCCCTCCCTCCCACTTTGGTCTTTTCAGTCTTTCAGTCAAGTTCGTT	874
NonO/p54 ^{nz}	601	TTTTCTCCTCTCCTTCCCTCCCTCCCACTTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCAAGTTCGTT	660

Şekil 3.34: pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1045 bç'lik P2 (-516/+529) promoter bölgesi dizileme Blast N sonucu.

```

NCBI DİZİ 875 TAGGTCTCTCCTTCGACC CCCACCCCCAGCTCCTCTCCCTTTCCTTTTCCCCCTCCCC 934
|||||
NonO/p5 4nzb 661 TAGGTCTCTCCTTCGACC CCCACCCCCAGCTCCTCTCCCTTTCCTTTTCCCCCTCCCC 720

NCBI DİZİ 935 TTTCCTTTC CCGTCTCAGCGCCAGGCCGCTTGACATGCGCAT TAGGTACAAAGCCTCG 994
|||||
NonO/p5 4nzb 721 TTTCCTTTC CCGTCTCAGCGCCAGGCCGCTTGACATGCGCAT TAGGTACAAAGCCTCG 780

NCBI DİZİ 995 CTCTTTGTC CCCATCTGTC GTTCA CACGAACTCAAGCCTTTGGCATT CCGCAGCCAATAG 1054
|||||
NonO/p5 4nzb 781 CTCTTTGTC CCCATCTGTC GTTCA CACGAACTCAAGCCTTTGGCATT CCGCAGCCAATAG 840

NCBI DİZİ 1055 AATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGATTCCGCCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTT 1114
|||||
NonO/p5 4nzb 841 AATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGATTCCGCCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTT 900

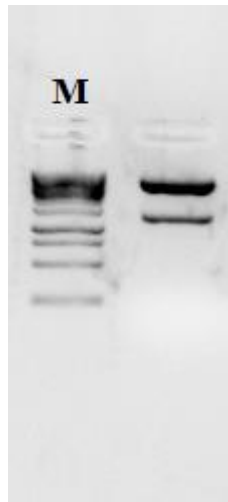
NCBI DİZİ 1115 AGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTA CCCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGTC 1174
|||||
NonO/p5 4nzb 901 AGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTA CCCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGTC 960

NCBI DİZİ 1175 GTTTCGGCGGTGCGCGCTCTTTCTCGGGACGGGAGGCCGTGTAGCGTCGCCGTTA 1234
|||||
NonO/p5 4nzb 961 GTTTCGGCGGTGCGCGCTCTTTCTCGGGACGGGAGGCCGTGTAGCGTCGCCGTTA 1020

NCBI DİZİ 1235 CTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA 1259
|||||
NonO/p5 4nzb 1021 CTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA 1045

```

Şekil 3.34: (Devamı).



Şekil 3.35: pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1259 bp'lık P1 (-730/+529) promotor bölgenin XhoI ve HindIII ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.

NCBI DİZİ	1	AGGTTCTCAGTTGCATTAGTCATAATTTCAATGGCCACTTATAGTTAGTAGCTGCCATATT	60
NonO/p54 ^{nz}	1	AGGTTCTCAGTTGCATTAGTCATAATTTCAATGGCCACTTATAGTTAGTAGCTGCCATATT	60
NCBI DİZİ	61	GAACACAGCAGACATAGGACCTTTCCATCATTGCACACAGTTCTATTGAACAGCCCAAGT	120
NonO/p54 ^{nz}	61	GAACACAGCAGACATAGGACCTTTCCATCATTGCACACAGTTCTATTGAACAGCCCAAGT	120
NCBI DİZİ	121	CTAGATCATTTGTGTCCCCACATAAGGTGGTGGCCATTGGGATACCCTGCAACCCCTGAGTG	180
NonO/p54 ^{nz}	121	CTAGATCATTTGTGTCCCCACATAAGGTGGTGGCCATTGGGATACCCTGCAACCCCTGAGTG	180
NCBI DİZİ	181	TGAATTAATTAATGGGAATTAACAACACATACTTATCAATTGATCCTTGATGCTTGGT	240
NonO/p54 ^{nz}	181	TGAATTAATTAATGGGAATTAACAACACATACTTATCAATTGATCCTTGATGCTTGGT	240
NCBI DİZİ	241	TAACACGGGGCGGGCGAGTTAGGCATTACTGAAACAATGAAGTTAGTTACTGATAG	300
NonO/p54 ^{nz}	241	TAACACGGGGCGGGCGAGTTAGGCATTACTGAAACAATGAAGTTAGTTACTGATAG	300
NCBI DİZİ	301	GCCTCCTATGGAATATACAGTCTGATCTAGAGGCCACAAATATATCCATGGCAATGATGA	360
NonO/p54 ^{nz}	301	GCCTCCTATGGAATATACAGTCTGATCTAGAGGCCACAAATATATCCATGGCAATGATGA	360
NCBI DİZİ	361	CACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATAGGAACAATAGTGATGTTGGACTGCTAGGTTT	420
NonO/p54 ^{nz}	361	CACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATAGGAACAATAGTGATGTTGGACTGCTAGGTTT	420
NCBI DİZİ	421	TCTGGTTACCATGGAAATGAGGGTGCTGGTTACAATTCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAA	480
NonO/p54 ^{nz}	421	TCTGGTTACCATGGAAATGAGGGTGCTGGTTACAATTCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAA	480
NCBI DİZİ	481	GGTATGATGCACCCCTCCTCCCCCACCCCGTCTGTAACCATGACCAAAGAGTTGACTAT	540
NonO/p54 ^{nz}	481	GGTATGATGCACCCCTCCTCCCCCACCCCGTCTGTAACCATGACCAAAGAGTTGACTAT	540
NCBI DİZİ	541	TTCAGTTGCGTTTC CCGAGTAGCC C CAGCAACAGGAGAA GCATC TAGAAATAT GATTAAG	600
NonO/p54 ^{nz}	541	TTCAGTTGCGTTTC CCGAGTAGCC C CAGCAACAGGAGAA GCATC TAGAAATAT GATTAAG	600

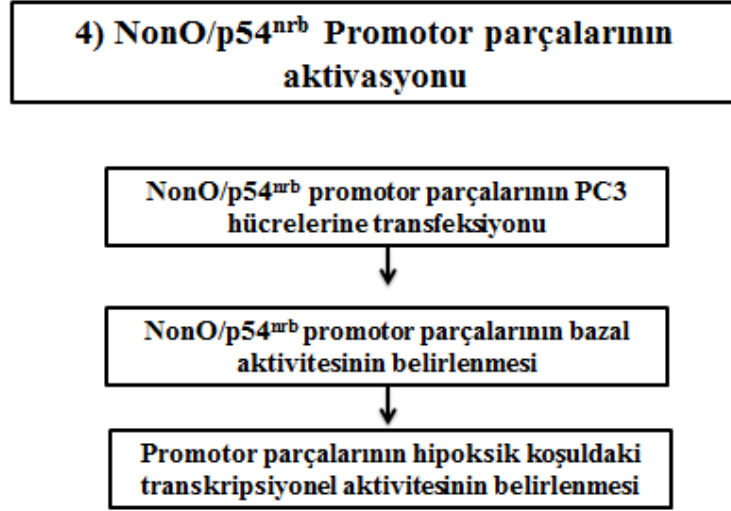
Şekil 3.36: pMetluc reporter vektörüne klonlanan 1259 bç'lik P1 (-730/+529) promoter bölgesi dizileme Blast N sonucu.

NCBI DİZİ	601	TATGGGGTGT CAGGATGCAAGCCC TAACAAGGAA GTGTGAAAAAGAAACATGCGGGGC	660
NonO/p54 ^{nrb}	601	TATGGGGTGT CAGGATGCAAGCCC TAACAAGGAA GTGTGAAAAAGAAACATGCGGGGC	660
NCBI DİZİ	661	ATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCCATTGAATACAATGACATTGTTACTCT	720
NonO/p54 ^{nrb}	661	ATTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCCATTGAATACAATGACATTGTTACTCT	720
NCBI DİZİ	721	TGCTTCTTGACAGGCGCAGTGCAGGACTGCTCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTC	780
NonO/p54 ^{nrb}	721	TGCTTCTTGACAGGCGCAGTGCAGGACTGCTCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTC	780
NCBI DİZİ	781	CCCTTCCTCTCCCTCTTTC CACTTTCCTCTCCCTTTTCTCCTCTCCTTTCCCCTCCCA	840
NonO/p54 ^{nrb}	781	CCCTTCCTCTCCCTCTTTC CACTTTCCTCTCCCTTTTCTCCTCTCCTTTCCCCTCCCA	840
NCBI DİZİ	841	CCACTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCAGTTCGTTTAGGTCTCTCTTCCGACCCCCACCC	900
NonO/p54 ^{nrb}	841	CCACTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCAGTTCGTTTAGGTCTCTCTTCCGACCCCCACCC	900
NCBI DİZİ	901	CCAGCTCCTCTCCC TTTCC TTTTC CCCCTCCCC TTTCC TTTCC CGTCTCACGCGCCAGG	960
NonO/p54 ^{nrb}	901	CCAGCTCCTCTCCC TTTCC TTTTC CCCCTCCCC TTTCC TTTCC CGTCTCACGCGCCAGG	960
NCBI DİZİ	961	CCGCTTGACATGCGCATTAGGTACAAAGCCTCGCTCTTGTGCCCATCTGTCTGTTTACA	1020
NonO/p54 ^{nrb}	961	CCGCTTGACATGCGCATTAGGTACAAAGCCTCGCTCTTGTGCCCATCTGTCTGTTTACA	1020
NCBI DİZİ	1021	CGAACTCAAGCCTTGGCATTCGGCAGCCAATAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGAT	1080
NonO/p54 ^{nrb}	1021	CGAACTCAAGCCTTGGCATTCGGCAGCCAATAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGAT	1080
NCBI DİZİ	1081	TCCGCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTT	1140
NonO/p54 ^{nrb}	1081	TCCGCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTT	1140
NCBI DİZİ	1141	GTACCCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGTCTCTGTTTC CGGCGGTGCGCGCTCTTTTC	1200
NonO/p54 ^{nrb}	1141	GTACCCCTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCGTCTCTGTTTC CGGCGGTGCGCGCTCTTTTC	1200
NCBI DİZİ	1201	TCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGCTCGCGTTACTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA	1259
NonO/p54 ^{nrb}	1201	TCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGCTCGCGTTACTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA	1259

Şekil 3.36 : (Devamı).

Alt klonlamanın tamamen doğrulanması için dizi analizine gönderilmiştir (bkz. Bölüm 2.4.12). Dizi analizi sonuçları Bioedit ve NCBI veritabanlarında kontrol edilerek doğrulanmıştır. pMetluc reporter vektörüne klonlanan NonO/p54^{nrb} promotor parçalarının dizileme sonuçları P1 (-730/+529) Şekil 3.36, P2 (-516/+529) Şekil 3.34, P3 (-336/+529) Şekil 3.32, P4 (-159/+529) Şekil 3.30 'da gösterilmiştir.

3.4 NonO/p54^{nrb} Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitelerinin Belirlenmesi

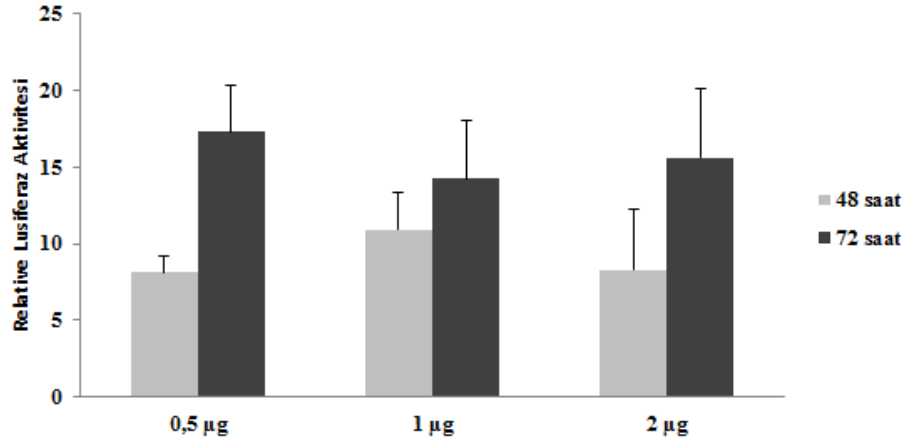


Şekil 3.37: Çalışmanın 4. basamağına ait akış diyagramı.

3.4.1 NonO/p54^{nrb} Promotor Parçalarının Transfeksiyonu ve Bazal Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi

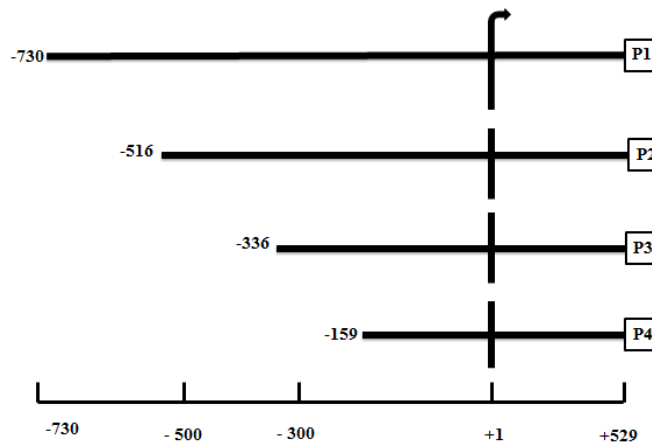
Hücre kültürü ortamında PC3 hücre hattı uygun koşullarda büyütülmüştür (bkz. Bölüm 2.3.2.3). Transfeksiyon deneyinin kurulması için büyütülen hücrelere hücre sayımı yapılarak 12 well plakalara her kuyuya 250000 hücre gelecek şekilde hücreler hazırlandı ve bir gece inkübe edildi (bkz. Bölüm 2.3.2.4 ve 2.3.2.5). Promotor parçalarının miktar optimizasyonunu belirlemek için ilk olarak pMetLuc vektörüne klonlanmış en büyük parça P1 (-730/+529) bölgesini içeren çok kopyalı plazmid DNA'dan 0,5 µg, 1 µg ve 2 µg olacak şekilde alınarak Lipofectamin 2000 Reagent kullanılarak promotor parçaları için miktar optimizasyonu yapıldı (bkz. Bölüm 2.4.15). 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarındaki sonuçlar lusiferaz aktivitesine bakılarak analiz edildi. Analiz sonucunda üç ayrı konsantrasyonda da transfeksiyonun değerlendirilebileceği belirlendi. Promotor parçaları için en düşük 0,5 µg konsantrasyonun yeterli olacağı tespit edildi (Şekil 3.38).

NonO/p54^{nrb} P1 1259 bç Promotor Konstrağının Aktivitesi

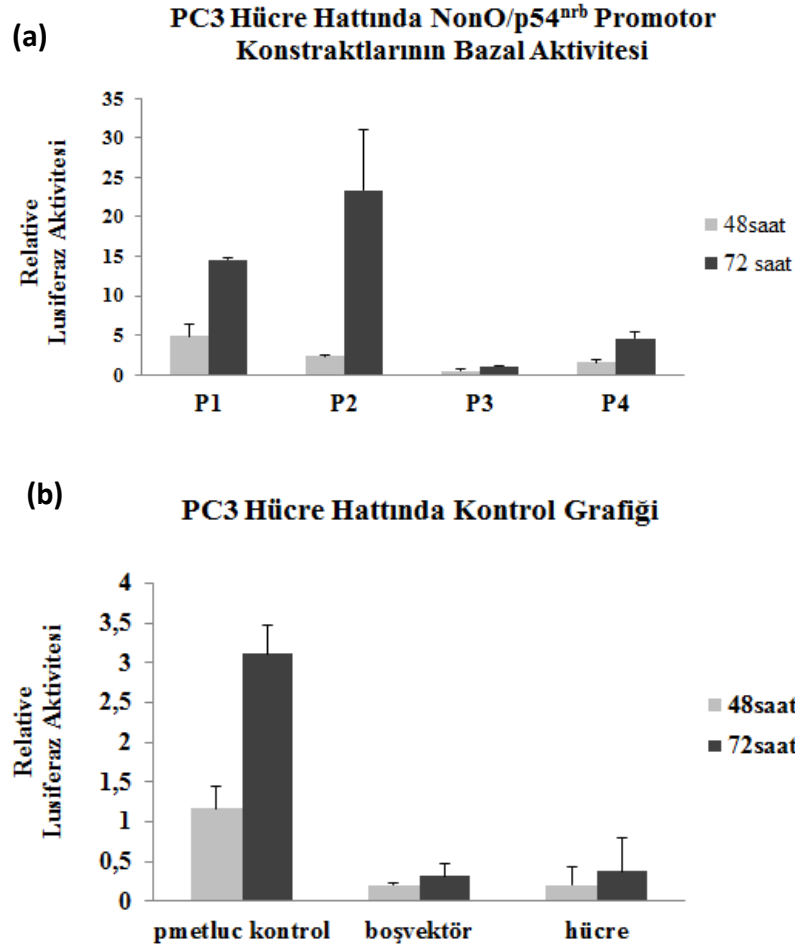


Şekil 3.38: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} P1 (-730/+529) promotorunun miktar optimizasyonu.

Transfeksiyon için optimizasyon yapıldıktan sonra uygun koşullar altında PC3 hücreleri büyütölmüş hücre sayımı yapılmış ve 12 well plakalara her kuyuya 250000 hücre gelecek şekilde %10 FCS'li medyum içeren ortamda bir gece inkübe edilmiştir (bkz. Bölüm 2.3.2). 24 saat sonunda P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 bç (Şekil 3.39) uzunluğundaki promotor parçaları için 0,5 µg alınacak şekilde hesaplanmış ve Lipofectamin 2000 Reagent ile transfeksiyonu gerçekleşmiştir (bkz. Bölüm 2.4.15). 48 ve 72 saat sonunda kuyulardan medyum örnekleri alındı. Lusiferaz gen aktivitelerine bakılarak promotor parçalarının aktiviteleri belirlendi (Şekil 3.40). Normalizasyon SEAP aktivitesi kullanıldı.



Şekil 3.39: NonO/p54^{nrb} P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçaları temsili diyagramı.



Şekil 3.40: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} promotor parçalarının bazal aktivasyonu a) P1:-730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529, b) PC3 hücrelerinde pmetluc kontrol vektörünün transkripsiyonel aktivitesi, klonlama olmayan pmetluc boş vektör ve transfeksiyon yapılmamış PC3 hücresi kontrol grafiği.

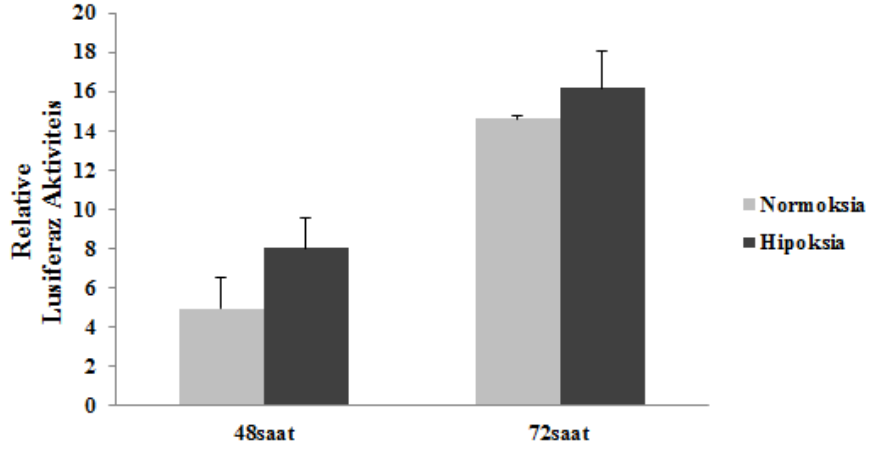
3.4.2 NonO/p54^{nrb} Promotor Parçalarının Hipoksik Koşuldaki Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi

PC3 hücreleri -80°C'den çıkarılarak kültür ortamında 75 cm² 'lik flasklarda uygun koşullar altında büyütüldü. flask alanını dolduran hücreler hafta 1 yada 2 defa pasajlama yapılarak büyütüldü. Transfeksiyon için pasaj 3'e gelen hücreler kullanıldı. 75 cm² 'lik flasklardaki PC3 hücreleri 25 cm²'lik flasklara alınarak deney grubu oluşturuldu (bkz. Bölüm 2.3.2). Bunun için Toma lamında PC3 hücre sayımı yapıldı. 12 well plakalara her kuyuya 250000 hücre gelecek şekilde hesaplama yapılarak hücreler %10 FCS içeren DMEM içerisinde kuyulara paylaştırıldı (bkz.

Bölüm 2.3.2.5). Transfeksiyon için 12 well plakalara eşit miktarda paylaştırılan PC3 hücreleri bir gece boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C'lik ortamda bir gece inkübe edilmiştir. Promotor parçalarını transfeksiyonu bir önceki bölümde bahsedilen miktar optimizasyonuna göre yapılmıştır (bkz. Bölüm 3.4.1). Bu sebeple 24 saat sonunda 12 well plakalarda 24, 48 ve 72 saat aralıkları aynı zamandada hipoksik ve normoksik oluşturulacak kuyular belirlenerek transfeksiyon deneyi kurulmuştur. Transfeksiyon için P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 bç uzunluğundaki promotor parçalarından 0,5 µg alınacak şekilde hesaplanarak Lipofectamin 2000 Reagent kullanılarak transfeksiyon yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.4.15).

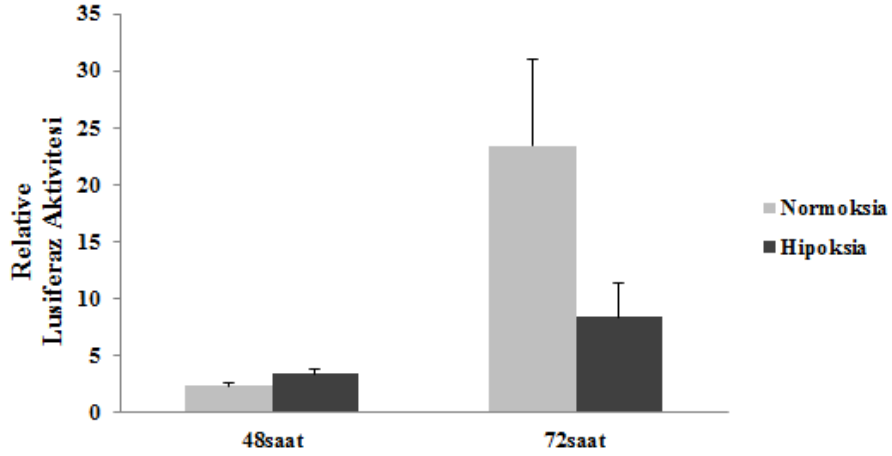
Transfeksiyon deneyi kurulduktan 2 saat sonra Bölüm 2.3.2.5'de belirtilen hipoksik koşul için ayrılan kuyulara son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ eklenerek kimyasal koşullarda hipoksiya oluşturuldu ve inkübasyona bırakıldı. Normoksiya için ayrılan kuyulara herhangi bir kimyasal uygulanmamıştır. Böylece Dört ayrı promotor parçasını içeren pMetluc lusiferaz vektörünün PC3 hücrelerine geçici transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Promotor parçalarının aktivitesini analiz etmek için PC3 hücrelerinde lusiferaz geninin ifadesine bakılmak üzere salınan lusifeaz sistemi için belirlenen 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hipoksiya ve normoksiya kuyularından medyum örnekleri alınmıştır ve luminometride ölçülmüştür (bkz. Bölüm 2.4.15). PC3 hücre hattında hipoksik normoksik koşuldaki promotor parçalarının transkripsiyonel aktivasyonu P1: -730/+529 (Şekil 3.41), P2: -516/+529 (Şekil 3.42), P3: -336/+529 (Şekil 3.42) ve P4: -159/+529 bç (Şekil 3.41)'de gösterilmiştir. P4 promotor parçasının en yüksek hipoksik cevap oluşturduğu tespit edilmiştir.

**PC3 Hücresinde Normoksik ve Hipoksik Koşulun
NonO/p54^{nrb}
P1 Promotorundaki Etkisi**



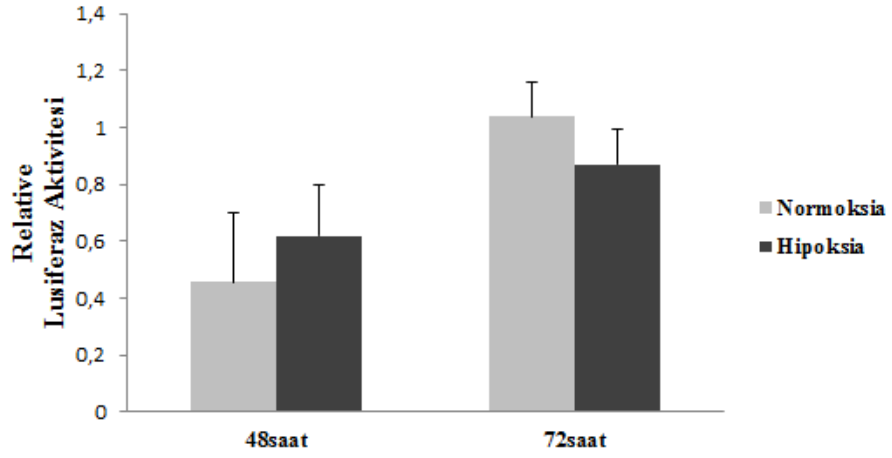
Şekil 3.41: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} P1 promotor bölgesinin (-730/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.

**PC3 Hücresinde Normoksik ve Hipoksik Koşulun
NonO/p54^{nrb}
P2 Promotorundaki Etkisi**



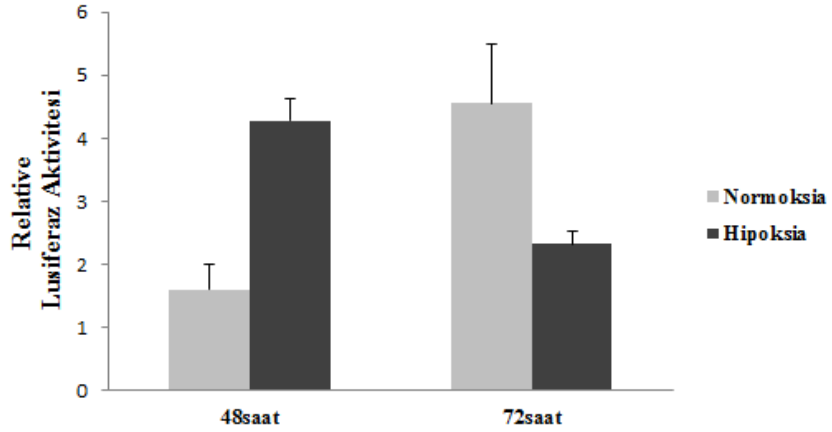
Şekil 3.42: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} P2 promotor bölgesinin (-516/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.

**PC3 Hücrelerinde Normoksik ve Hipoksik Koşulun
NonO/p54^{nrb}
P3 Promotorundaki Etkisi**



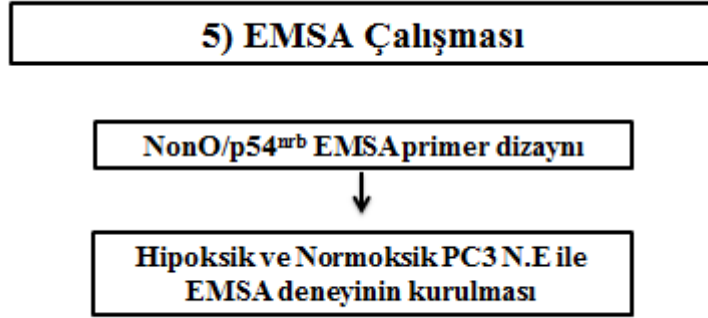
Şekil 3.43: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} P3 promotor bölgesinin (-336/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.

**PC3 Hücrelerinde Normoksik ve Hipoksik Koşulun
NonO/p54^{nrb}
P4 Promotorundaki Etkisi**



Şekil 3.44: PC3 hücrelerinde NonO/p54^{nrb} P4 promotor bölgesinin (-159/+529) transkripsiyonel aktivasyonu.

3.5 EMSA

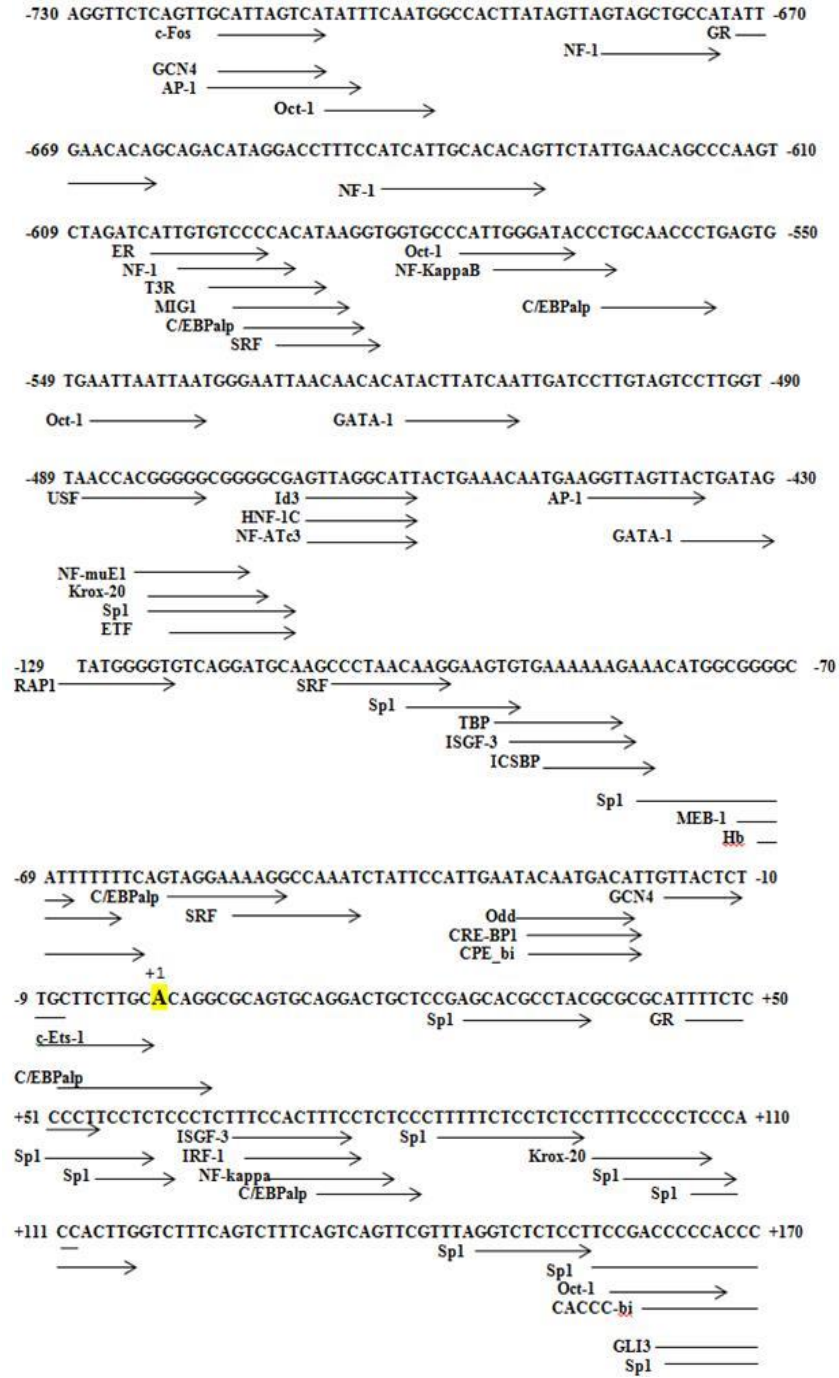


Şekil 3.45: Çalışmanın 5. basamağına ait akış diyagramı.

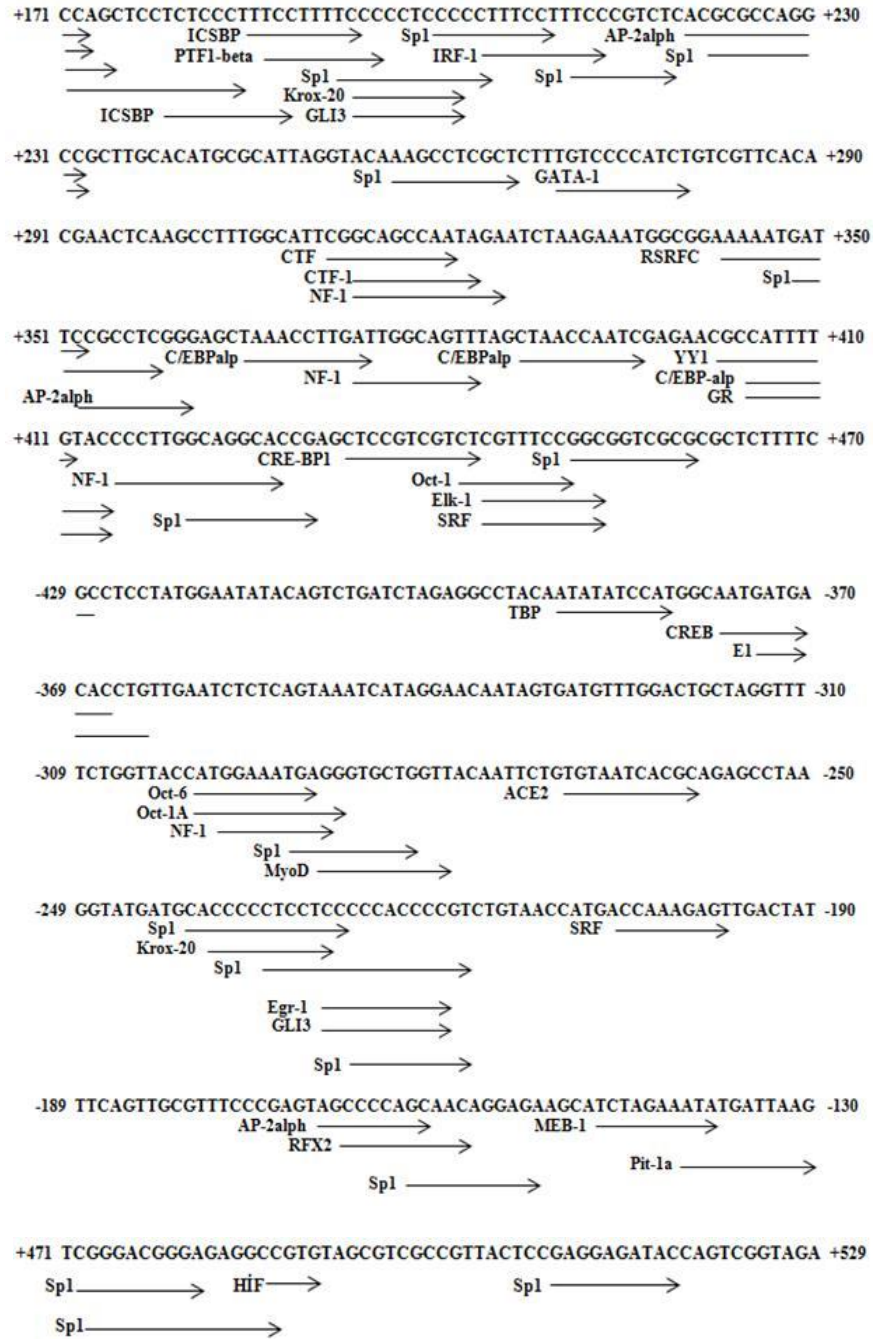
3.5.1 NonO/p54^{nrb} Promotor Dizisine Olası Transkripsiyon Faktörleri Bağlanma Bölgeleri

Ali Baba 3.1 programı kullanılarak 1259 bç'lik (-730/+529 bç) NonO/p54^{nrb} promotor bölgesine bağlanan olası transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri analiz edilmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri en büyük promotor parçası üzerinde analiz edilmiş olup +471/+529 bç'lik bölge arasında olan HIF-1 α transkripsiyon faktörünün delesyonlu 4 ayrı promotor parçası içinde ortak bölgeyi kapsadığı belirlenmiştir.

NonO/p54^{nrb} en büyük P1 (+730/-529) promotor bölgesi üzerinde transkripsiyon faktörlerinin olası bağlanma bölgeleri biyoinformatik olarak analiz edilmiştir (Şekil 3.21). Bölüm 3.3.2'de belirtildiği şekilde en büyük P1 promotor bölgesinden üç ayrı promotor parçası oluşturulmuştur. Bu şekilde P1 (-730/+529), P2 (-516/+529), P3 (-336/+529), P4 (-159/+529) oluşturularak temsili diyagramı şekil 3.39'de gösterilmiştir (bkz. Bölüm 3.4.1). Aynı zamanda hipoksiya ile indüklenen transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'nın NonO/p54^{nrb} promotoruna olası bağlanma bölgesi +471/+529 bç aralığında olup dört promotor parçasını da kapsadığı belirlenmiştir (Şekil 3.46).



Şekil 3.46: NonO/p54^{nrb} promotor bölgesinin Ali BABA 3.1 programı ile olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin analizi.



Şekil 3.46: (Devamı).

NonO/p54^{nnp} promotor bölgesi çalışmalarımızın önemli bir basamağını hipoksiya oluşturduğu için HIF bağlanma bölgesinin DNA-protein etkileşim düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda EMSA (Electromobility Shift Assay) deneyi kurulmuştur. İlk olarak NonO/p54^{nnp} promotorunun +471/+529 bç'lik bölgesi üzerinden EMSA deneyi için Tablo 3.4'de belirtilen forward (ileri) ve reverse (geri) primerleri dizayn edilmiştir.

Tablo 3.4 : Çalışmada kullanılan EMSA primer dizileri.

NonO/p54^{nrb} +471/+529 bç'lik bölge EMSA primerleri
Forward (ileri) primer (59 bç) 5'TCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGCGTCGCCGTTACTCCGAGGAGATAC CAGTCGGTAGA '3
Reverse (geri) primer (59 bç) 3'AGCCCTGCCCTCTCCGGCACATCGCAGCGGCAATGAGGCTCCTCTATGG TCAGCCATCT '3

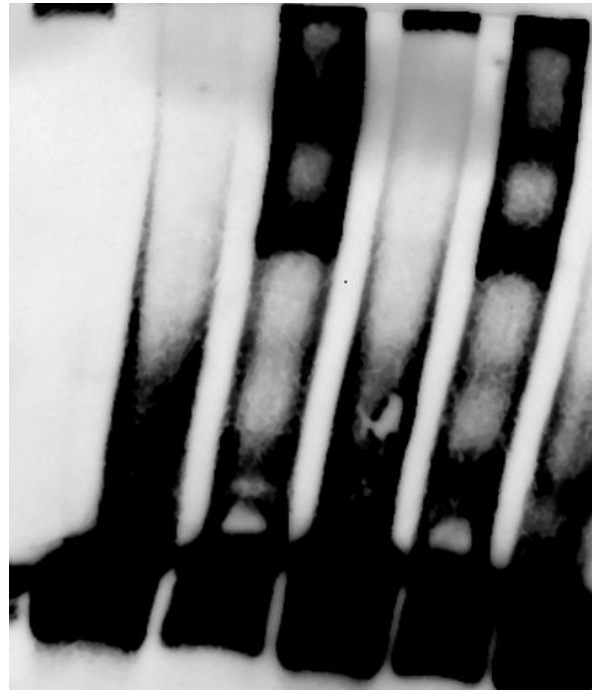
Bölüm 2.3.2'de belirtildiği gibi hücre kültür çalışmaları kapsamında PC3 hücreleri büyütülmüştür. 75 cm²'lik flasklardaki hipoksik (son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulanmıştır) ve normoksik koşuldaki PC3 hücrelerinden Tablo 2.20'de belirtilen solüsyonlar kullanılarak nükleer ekstraktlar hazırlanmıştır (bkz. Bölüm 2.6.1). Oligonükleotitlerin etiketlenmesi aşaması belirtilen koşullar altında Tablo 3.6' daki forward ve reverse EMSA primerleri kullanılarak yapılmıştır (bkz. Bölüm 2.6.2). Bölüm 2.6.3'de belirtildiği gibi etiketlenen oligolar uygun koşullarda inkübasyona bırakılarak çift zincirli hale getirilmiştir. Tablo 2-21'de belirtilen solüsyonlar kullanılarak EMSA jeli hazırlanmıştır.

Gerekli solüsyonlar hazırlanarak PC3 hipoksik ve normoksik nükleer ekstraktlar ile bağlanma reaksiyonu kurulmuştur (bkz. Bölüm 2.6.4). Poliakrilamid jele yüklenerek 90 V ve 400 mA'lık akımda yürütülmüştür.

Jel büyüklüğünde naylon membran kesilerek proteinlerin membrana transferi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 90 V'luk akımda 1,5-2 saat transfere bırakılmıştır (bkz. Bölüm 2.6.6). Transfer işleminden proteinlerin sabitlenmesi için (kross-link) membran streç film ile sarılarak 15 dk UV transilimünatörde bekletilmiştir. Daha sonra bloklayıcı ve yıkama işlemleri yapılarak ECL ile muamele edilip, Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında görüntülenmiştir.

DNA protein kompleksi Şekil 3.47'de gösterilmiştir. Şekil 3.47 'de incelendiği gibi hipoksik ve normoksik ekstrakta iki kompleks oluşmuştur (K1 ve K2). Normoksik nükleer ekstrakta beklenenin aksine kompleksler daha güçlüdür. Bu durum bize normal koşullarda seçilen olası HIF-1 α bölgesine farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlandığını düşündürmüştür. Gerçekten bu bölge incelendiğinde çok sayıda SP1 transkripsiyon faktörü olası bağlanma bölgesi görülmüştür. Komplekslerin spesifik olup olmadığı 1000 kat biyotinsiz prob kullanılarak test edildiğine (kuyu 2 ve kuyu 4) kompleksler kaybolmuştur.

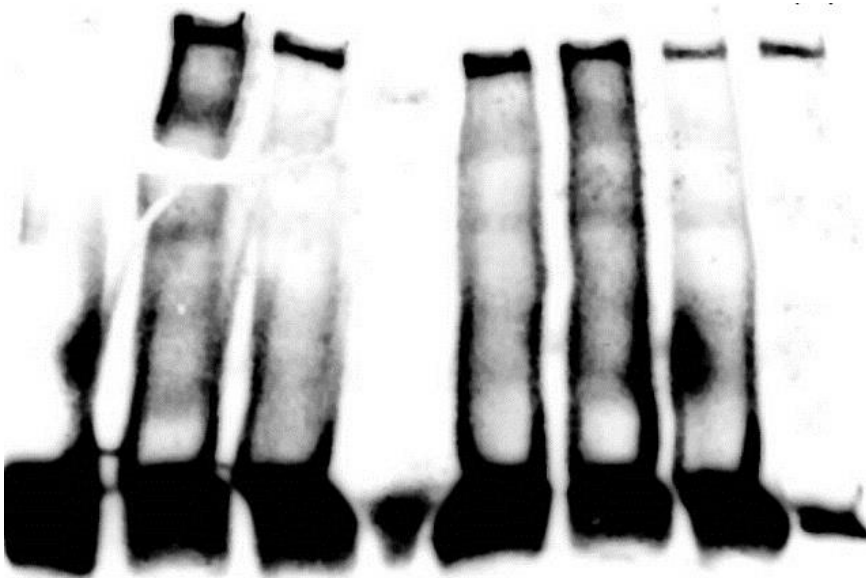
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	
+	-	+	-	+	prob
-	+	+	-	-	(+471/+529)
-	-	-	+	+	Normoksiya NE
-	+	-	+	-	Hipoksiya NE
					Biyotinsiz (cold)
					prob (1000 kat)



Şekil 3.47 : NonO/p54^{nrb} DNA protein kompleks görüntüsü. 1: Free prob, 2: Prob+ N.E (Normoksia), 3: Cold prob + N.E (Normoksia) + Prob, 4: Prob+ N.E (Hipoksiya), 5: Cold prob + N.E (Hipoksiya) + Prob.

Gerçekten bağlanmanın teyidi için HIF-1 α konsensus probları ile yarışma deneyleri de yapılmıştır. Şekil 3.48 incelendiğinde yine benzer kompleksler oluşmuştur. 1000 kat biyotinsiz prob kullanıldığında yine kompleksler kaybolmuştur. HIF-1 α konsensus probu kullanılarak yapılan yarışma deneyinde özellikle hipoksik nükleer ekstrakta kompleksler tamamen ortadan kaybolmuştur (8.kuyu). Bu da bize bu bölgeye gerçekten HIF-1 α bağlandığını göstermiştir.

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	
+	+	-	Boş kuyu	+	+	-	+	prob (+471/+529)
-	+	+		+	-	-	-	Normoksiya NE
-	-	-		-	+	+	+	Hipoksiya NE
-	-	-		+	-	-	+	HIF-1α Konsensus
-	-	+		-	-	+	-	Biyotinsiz (cold) prob (1000 kat)



Şekil 3.48: HIF-1 α konsensus kullanılarak yapılan EMSA yarışma deneyi. 1: Free prob, 2: prob+ N.E (Normoksiya), 3 : prob+ N.E (Normoksiya)+ cold pob, 4: Boş kuyu, 5: prob+ N.E (Normoksiya)+ HIF-1 α konsensus, 6: prob+ N.E (Hipoksiya), 7: prob+ N.E (Hipoksiya)+ cold prob, 8 : prob+ N.E (Hipoksiya)+ HIF-1 α konsensus.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücre, doku yada organların oksijen seviyelerindeki değişimlere uyum sağlamaları gerekmektedir. Oksijen seviyesinin azalması olarak tanımlanan hipoksiyanın meydana gelmesi oksijensiz solunumun, hücre bölünmesinin, alyuvar hücre üretiminin ve hücre sel sağ kalımın artışına sebebiyet vermektedir. Aynı zamanda oksijen seviyesini ayarlamak için anjiyogenezi desteklemektedir. Moleküler mekanizmalarla oluşan bu gibi durumlarda ifade edilecek çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için HIF-1 proteinleri hipoksiyanın anahtar regülatörüdür [6].

Hipoksi ile yapılan çeşitli in vitro çalışmalar birçok hücre hattının hipoksik koşulu algılayarak spesifik bir şekilde cevap oluşturduğunu göstermektedir. Hipoksi ile uyarılmış up-regülasyonunda EPO (eritropoietin) proteinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hipoksiya da Epo üretmeyen çeşitli hücre hatlarında HIF-1'in varlığı da gösterilmiştir [50].

HIF-1 gen ailesinin nükleer HIF-1 α alt ünitesi hipoksik koşulda sitozolde yıkılmadan kararlı hale gelerek fosforillenir ve çekirdek içine geçerek heterodimer bir kompleks oluşturur. Bu şekilde hipoksik koşulda ifade edilen genlerin transkripsiyonu için promotorlarındaki HRE (hipoksi cevap elemanı) bölgelerine bağlanır. Normoksik koşullarda ise kararsız haldedir ve VHL proteininin hedefinde olup proteozomal yıkımı gerçekleşir. HRE bölgesine bağlanamaz. Çeşitli insan kanserlerinde (meme, kolon, akciğer, prostat, deri vs.) yapılan immünohistokimyasal çalışmalar HIF-1 α protein seviyesinin iyi huylu tümörlerde belirli bir miktarda olup, kötü huylu tümörlerde miktarının arttığını ve metastazda çok daha yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir [6].

Prostat kanser oluşumu ve ilerlemesi androjenlerin, çoğunlukla testesteron hormonu ve yüksek potent metabolitleri, 5 α -dihidrotestesteronun (DHT) etkisi altında gerçekleşmektedir. Androjen reseptörü (AR) androjenlere bağlanır ve aktive eder. Androjene bağlı AR'nin çekirdekteki hareketiyle ve androjene yanıt veren genlerin promotor bölgesinde spesifik androjen cevap elementine (ARE) bağlanarak sonuçlanan transkripsiyonel aktivasyonlardır. Tıbbi ve cerrahi olarak kısırlaştırma

androjen ablasyonu (uzaklaştırılması) androjen seviyelerinin azalmasına ve beraberinde tümör büyümesini engellemektedir. Bununla beraber androjene dayanıklı ya da androjen bağımsız prostat kanseri olarak ifade edilen kısırlığa dirençli prostat kanseri (CRPC) sonuçları androjen deprivasyon tedavisine rağmen hastaların çoğunda görülür. Prostat kanseri ile ilgili ölüm oranlarındaki CRPC sonuçları kaçınılmazdır. Hatta düşük androjen ortamında CRPC hücreleri AR üretir ve AR bağımlı bir şekilde büyür. Prostat dokusunda kan akımının tıkanmasından dolayı hipoksiyadaki kısırlaşma sonuçları ile androjen azalmaktadır. Hipoksiyoda hipoksiya ile uyarılabilir faktör (HIF-1 α) sabit bir şekilde ifade edilmektedir. HIF-1 α normal prostat dokularından daha yüksek bir seviyede CRPC hücrelerinde ifade edilmektedir [51].

PC-3ML (kemiği hedef alan istilacı metastatik prostat kanseri) hücrelerinde COX-2 (siklooksijenaz-2) aktivitesinin inhibisyonu ile CoCl₂ kimyasal hipoksi ile uyarılabilir (vaskular endotelial büyüme faktörü) VEGF üretimini anlamlı olarak baskıladığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar hipoksi ile uyarılmış VEGF ifadesinin potansiyel arabolucusu olarak COX-2 ile ilişkisini göstermiştir [52].

Yapılan bir çalışmada spesifik CX3C kemokin CX3CL1 ve aynı kökenden gelen reseptör CX3CR1 tümörlerin çeşitli tiplerinin organ metastazında rol oynamaktadır. DU145, PC3 ve PC-3M dahil olmak üzere androjen bağımsız prostat kanseri hücrelerinin hipoksiyaya maruz bırakılmasıyla CX3CR1 ekspresyonunun anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur. Prostat kanseri hücrelerinin artan migrasyon ve invaziv potansiyali ile bağlantısı olan ve hipoksiya ile regüle edilmiş CX3CR1 ekspresyonu için HIF-1 ve NF- κ B proteinlerinin gerekliliği ispat edilmiştir. CX3CR1 sinyali prostat kanserinin adjuvan tedavisinde potansiyel tedavi edici bir hedef olduğu gösterilmiştir [53].

Paraspeckles memeli hücrelerinin interkromatin boşluğunda bulunan çekirdek içi gövdelerin yeni bir sınıfıdır. Paraspeckles uzun protein kodlamayan RNA türleri NEAT1/Men ϵ / β ve DBHS (Drosophila Behavior İnsan Splicing) ailesinin proteinleri (NonO/p54^{nrb}, PSPC1 ve PSF/SFPQ) arasındaki etkileşimler ile oluşan RNA-protein yapılarıdır. Paraspeckles adenosin ile inosin düzenlenmesine tabi tutulmuş olan çift iplikli RNA bölgeleri içeren RNA'nın nükleer tutunması aracılığıyla gen ekspresyonunun kontrolü için kritiktir. Bu mekanizma paraspeckles

ve onların bileşenleri aracılığıyla farklılaşma, viral enfeksiyon ve stres cevapları içeren birçok hücresel işlemler sırasında gen ekspresyonunun kontrolünde rol oynamaktadır [13].

Literatür çalışmalarına bakıldığında H295R adenokortikal hücrelerde CYP17A1 gen transkripsiyonunu düzenleyen SF1 (steroidojenik faktör 1), PSF (poliprimidine zengin bölgeye bağlanma faktör 1) ve mSin3A içeren bir komplekste NonO/p54^{nrb} bileşeni tanımlanmıştır. cAMP sinyalindeki rolü ile uyumlu olarak NonO/p54^{nrb}, düzenlenmiş cAMP cevap elementine bağlanan protein 2 (TORC2) ve RNA polimeraz II'nin cAMP cevap elementine bağlanma proteini (CREB) / Transdüser ilişkisi ile gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} cAMP ile uyarılmış retinol bağlayıcı protein transkripsiyonunu düzenleyen SF1, PSF, LRH 1 (karaciğer reseptör homologu 1) ve yüksek mobilite grubu proteinleri ile bir multiprotein kompleksine dahil olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak NonO/p54^{nrb} cAMP sinyal akışını düzenleyen Ras1'e bağlanabilmektedir. Seçilmiş PDE (cyclic nükleotit fosfodiesterazlar) izoformlarının degradasyonunun kontrol edilmesiyle PDE ekspresyonunun yeni regülatörü olarak NonO/p54^{nrb} tanımlanmıştır. PDE'ler cAMP'lerin hücre içi sinyal seviyelerinin kontrol edilmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Böylece cAMP bağımlı sinyalizasyonu, NonO/p54^{nrb} kortizol biyosentezini etkinleştiren ACTH'nin (adrenokortikotropik hormon) ifadesini düzenlemek için hareket ederler [19].

NonO/p54^{nrb} DBHS protein ailesinin bir üyesidir. RNA bağlanma proteinlerinin bu aile üyeleri transkripsiyonel aktivasyon/baskılama RNA tutunması RNA splicingden dolayı transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel regülasyonun her ikisinde rol oynamaktadır. Önceki çalışmalar NonO/p54^{nrb}'nin β -globin mRNA ve B-tropomiyosin pre-mRNA'daki intronic primidine zengin sekansına bağlandığı gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} pre-mRNA splicingi kolaylaştırmak için Pol II'nin aktifleştirilmiş karboksil uç domaini (CTD) ile ilişkilidir. Diğer çalışmalar NonO/p54^{nrb}'nin hem 5' hem 3' splice bölgelerinin her ikisinin dahil edildiği ve pre-mRNA splicing sırasında intronların çıkarılmasını arttırdığı açıklığa kavuşmuştur. Buna ek olarak NonO/p54^{nrb} alternatif RNA splicingi düzenleyen splicing susturucu sekanslar ile etkileşime girebilir, böylece izoform ve splice varyant ekspresyonunu kontrol edebilir [19].

NonO/p54^{nrb} her yerde bulunan ifade edilen 55 kD'luk bir proteindir. Orijinal olarak non-Pou domain içeren oktamer bağlanma proteini olarak tanımlanmıştır. Memelilerin interkromatin bölgesinde bulunan çekirdek içi gövdeler olarak bilinen paraspeckles oluşumunun bir bileşenidir. NonO/p54^{nrb} transkripsiyonel kontrolü, splicing düzenlenmesi, mRNA 3'ucu formasyonu gibi nükleer süreçlerde yer alan çok fonksiyonlu bir proteindir. Çeşitli insan hücre hatlarında DNA tamiri, rekombinasyon ve aşırı düzenlenmiş RNA'ların nükleer tutulumunu sağlamaktadır. Bazı çalışmalar sonucunda NonO/p54^{nrb}'nin farklı dokularda kollojen oluşumu ve fibrozda gerçekten yer aldığı gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb} kondrogenesis sırasında Sox9'un (kampomelik displazi) önemli bir transkripsiyonel ortağıdır. Col2a1 (kollojen tip 2 alfa 1) mRNA'sının işlenmesini NonO/p54^{nrb}'nin aşırı ekspresyonu uyarır. Bu sebeple NonO/p54^{nrb}'nin knock-down olması Col2A1 geninin promotor aktivitesi üzerinde NonO/p54^{nrb}'nin uyarıcı etkisini önemli ölçüde baskılamaktadır. NonO/p54^{nrb} geni knock-out olan farelerde bir yaralanmada kollejen salgılayan fibroblastlar aşırı çoğalmıştır fakat kollojen salgısı önemli ölçüde azalma göstermiştir. Bununla birlikte son çalışmalar NonO/p54^{nrb}'nin cAMP bağımlı yolağın hedef genlerini düzenleyen CREB-TORC kompleksi ile etkileşimi aracılığıyla bir koaktivatör olarak görev yaptığı gösterilmiştir. NonO/p54^{nrb}'nin eksikliği kollajen üretimini cAMP bağımlı baskılanması zayıflatır. NonO/p54^{nrb} androjen reseptörü ile regüle edilen gen transkripsiyonunun bir baskılayıcısı olarak görev yapmaktadır. NonO/p54^{nrb}'nin aşırı ekspresyonu doza bağlı bir şekilde AR aktivitesini baskılamaktadır. Böylece androjen AR aracılıklı kollajen depolanması NonO/p54^{nrb}'nin neden olduğu inhibisyonun kaybı ile arttırılmıştır [47].

Melanoma inhibitör aktivitesi (MIA) melanom ilerlemesinin önemli bir regülatörü olarak bilinmektedir. NonO/p54^{nrb} promotorunun MIA ile transkripsiyonel regülasyonunu analiz etmek için insan ve fare promotorunun yüksek korunmuş bir bölgesi çalışılmıştır. NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesinin modülasyonu ve insan, fare promotorunun korunmuş bölgesi doğrulanmıştır. İnsan ve fare hücre sistemlerinde insan promotor parçalarının iç içe geçmiş delesyonu NonO/p54^{nrb} promotorunun aktivasyonu üzerinde MIA'nın major etkisine aracılık eden -7079 ile -7036 bç arasında korunmuş 42 bç'lik bölgenin neden olduğu saptanmıştır. -7079 ile -7062 arasında lokalize olan 42 bç'lik elementin 5' bölgesi için iki protein kompleksinin doğrudan bağlandığı EMSA tekniği ile gösterilmiştir. Bununla beraber MIA negatif

hücrelerde DNA bağlanma yeteneği azalmıştır. MatInspector programı kullanılarak bu bölgedeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri için arama yapılarak spesifik iki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi saptanmıştır. Nitekim -7075 ile -7070 bç'lik bölgelerin mutasyonunu kapsayan protein bağlanma yeteneği kalkmış ve MIA bağımlı NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesinin neredeyse tamamen kaybına yol açmıştır. Bununla birlikte NFI, PBX1, MEIS1, CEBP/G ve HOXC5 transkripsiyon faktörleri için mRNA ekspresyon analizi ile ortadan kaldırılabileceği saptanmıştır. MatInspector analizi NonO/p54^{nrb} promotorunun MIA bağımlı regülatör bölgesinde YBX1 için varsayılan bir bağlanma bölgesi ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda S102 fosforilasyonu aracılığıyla YBX1'in MIA bağımlı aktivasyonu açığa kavuşmuştur. CHIP deneyleri kullanarak, MIA'nın bağımlılığında NonO/p54^{nrb} promotoruna transkripsiyon faktörü YBX1'in direkt bağlandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak NonO/p54^{nrb} transkripsiyonunun MIA aktivasyonunun aracısı olarak YBX1 tanımlanmıştır [49].

Litaretürde gösterilen çeşitli çalışmalar bir paraspeckles proteini olan NonO/p54^{nrb}'nin birçok hücrel prosede görev aldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda farklı kanser hücrelerindeki hedef genlerin transkripsiyonel aktivatörü olarak görev alması bizi hipoksik çalışmalara yöneltmiştir. Düşük oksijen koşullarında NonO/p54^{nrb}'nin nasıl bir etkisi olduğu bilinmemektedir. Bu amaçla ilk olarak seçilen 10 farklı hücre hattında (Hela: Servikal kanser, Huvec: Sağlıklı endotel hücre, Ht-29: Kolon kanseri, MCF7: Meme kanseri, PC3: Prostat kanseri, Du145: Prostat kanseri, Hep3B: Karaciğer kanseri, Panc: Pankreas kanseri, Saos: Kemik kanseri, Mg63: Kemik kanseri) NonO/p54^{nrb}'nin ekspresyon profili denstometrik analiz yapılarak gösterilmiştir (Şekil 3.4). Ekspresyon profili çıkartılan NonO/p54^{nrb}'nin farklı hücre hatlarında ifadesinin değişim göstermesi farklı kanser hücre hatlarında regülasyonunun farklı şekilde olduğunu anlamamızı sağlamaktadır. Bu tez kapsamında yapılan diğer çalışmalarda NonO/p54^{nrb} gen ifadesinin en yüksek olduğu androjen bağımsız prostat kanseri olan agresif yapıdaki PC3 hücre hattıyla devam edilmiştir. Bununla beraber sağlıklı HUVEC (İnsan umbilikal epitelyum hücresi) hücre hattında protein ve mRNA ekspresyon çalışmalarında kullanılmıştır.

PC3 ve HUVEC hücrelerinde CoCl₂ ile kimyasal hipoksi oluşturulmuş aynı zamanda herhangi bir kimyasal kullanılmayan normoksik koşul deney düzeneği hazırlanmıştır. NonO/p54^{nrb} etkisine bakılmadan önce hipoksik koşulda ifade edilen

hipoksiya ile indüklenebilen faktör 1 (HIF-1 α)'in Real Time PCR ile mRNA seviyelerine bakılmıştır. PC3 (Şekil 3.9) ve HUVEC (Şekil 3.10) hücreleri excelde analiz edilerek 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hipoksik koşulda yüksek HIF-1 α ekspresyon profili gözlenmiş ve bu şekilde hipoksik koşul doğrulanmıştır (bkz. Bölüm 3.2.1).

Bunun yanında hipoksik ve normoksik koşulun PC3 (Şekil 3.11) ve HUVEC (Şekil 3.11) hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi için MTT analizi yapılmıştır. 24, 48 ve 72 zaman aralıklarında HUVEC hücrelerinin hipoksik ortamdaki etkilenerek proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Bunun yanında PC3 hücre hattında kontrol grubuna göre hipoksik koşulun farklı zaman aralıklarına bakıldığında hücre proliferasyonunu anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir.

PC3 ve HUVEC hücreleri için Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi H β 2 ve NonO/p54^{nr}b spesifik primerleri (Tablo 2.4) kullanılarak Real time PCR kurulmuştur çıkan ct değerleri analiz edilmiştir. PC3 (Şekil 3.13) hücrelerinde Real time analiz sonuçları 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında kontrol grubuna (normoksiya) göre hipoksik koşulların NonO/p54^{nr}b ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış göstermiştir. HUVEC (Şekil 3.14) hücrelerinde hipoksik koşulun zaman aralıklarındaki NonO/p54^{nr}b ekspresyon seviyesinin artışı olmasına rağmen kontrol grubuna bakıldığında PC3 hücre hattındaki gibi belirgin bir artış farkı göstermemektedir. NonO/p54^{nr}b protein seviyesinin hipoksik koşullarda analizi için Western blot deneyleri yapılmıştır. Şekil 3.15'de PC3 hücrelerinde hipoksik ve normoksik koşuldaki protein seviyeleri analiz edilmiştir. PC3 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlerdeki hipoksik koşulunda NonO/p54^{nr}b protein ifadesinin mRNA seviyesinde olduğu gibi yüksek bir artış gösterdiği analiz edilmiştir. HUVEC hücrelerinde Şekil 3.14 hipoksik koşulda özellikle son saat aralıklarında NonO/p54^{nr}b protein seviyelerinin yüksek olduğu analiz edilmiştir.

Litaratürde NonO/p54^{nr}b promotörü için yapılan çalışmalar doğrultusunda Alibaba 3.1 programı kullanılarak promotör analizi yapılmıştır. NonO/p54^{nr}b promotörünün 1259 bp'lik bölgesi (-730/+529 bp) üzerinden promotör delesyonları oluşturulmuştur (Şekil 3.39). Klonlama ve alt klonlama çalışmaları yapılarak dizi analizine gönderilmiştir. Dizileme sonuçlarına göre P2 (Şekil 3.31 üzerinde belirtilmiştir) ve P3 (Şekil 3.29 üzerinde belirtilmiştir) promotör delesyon

parçalarında tek baz bölgesinde mutasyonu belirlenmiştir. Ancak Alibaba 3.1 programı ile olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine bakıldığında HIF-1 α bağlanma bölgesini etkilemediği için transfeksiyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bu şekilde her bir promotor parçasının PC3 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Promotor parçalarının bazal aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak NonO/p54^{nrb} P1: -730/+529 ve P2: -516/+529 promotor parçalarının bazal aktivitesinin yüksek olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.40). Aynı zamanda PC3 hücrelerine yapılan geçici transfeksiyonda hipoksik ve normoksik koşul için her bir promotor parçasının aktivitesine bakılmıştır. Özellikle 48 saat zaman aralığında her bir promotor parçasının normoksik koşullara göre hipoksiyadaki lusiferaz gen aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (bkz. Bölüm 3.4.2). Bu sonuçlar bizi hipoksiyada ifadesi olan HIF-1 α transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} promotoruyla ilişkisi olabileceğine yöneltmiştir. Aynı zamanda en büyük P1: -730/+529 promotor bölgesi için yapılan promotor analizinde olası transkripsiyon bağlanma bölgelerine bakıldığında NonO/p54^{nrb} promotorunun +471/+529 bç'lik bölgesinde HIF-1 α transkripsiyon faktörünün olası bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge dört ayrı promotor parçasında bulunmaktadır (Şekil 3.46). Bu amaçla HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi analizi için spesifik primer dizaynı yapılarak EMSA yarışma deneyi kurulmuştur. EMSA sonuçları incelendiğinde hipoksik koşullardaki yarışma deneyleri ve özellikle HIF-1 α konsensus probunun kullanıldığı deneyler bize HIF-1 α transkripsiyon faktörünün gerçekten bu bölgeye bağlandığını söylemektedir.

Bu çalışma kapsamında ilk kez NonO/p54^{nrb} geninin HIF-1 α transkripsiyon faktörünce regülasyonu çalışılmıştır. Paraspeckles ve bileşenlerinin farklılaşma, viral enfeksiyon ve stress cevabı olarak çok sayıda hücresel prosesinde gen ekspresyonunu kontrol ederek fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Ayrıca, NonO/p54^{nrb} çekirdekte transkripsiyonun başlaması, RNA prosesi, transkripsiyonun uzaması ve sonlanmasında görev aldığı gösterilmiştir. Ancak bu genin transkripsiyonel regülasyonuna ait literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır. NonO/p54^{nrb} geninin HIF-1 α transkripsiyon faktörünce regülasyonunun aydınlatılması sonraki çalışmalar için temel teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Wang, G. L., Jiang, B. H., RUE, E. A. and Semenza, G. L., “Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, pp. 5510-5514, (1995).
- [2] Selvendiran, K., Bratasz, A., Kuppusamy, M. L., Tazi, M. F., Rivera, B. K. and Kuppusamy P., “Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3”, *Int J Cancer*, November 1; 125(9): 2198–2204., doi:10.1002/ijc.24601, (2009).
- [3] Çekin, N., “HIF-1 Proteininin Kanser İlaçlarına Karşı Direnç Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara, (2007).
- [4] Guo, M., Song, L. P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y. and Chen, G. Q., “Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms”, *Springer Science Business Media, Inc. Manufactured in The United States*, 11, 67–77, (2006).
- [5] Kakudo, N., Morimoto, N., Ogawa, T., Taketani, S. and Kusumoto, K., “Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 α Activation”, *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0139890, (2015).
- [6] Demirel, S. H. ve Çetinkaya S., “Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1: Hücrenin Hipoksiye Fizyolojik ve Patolojik Cevabı”, doi: 10.5505/sakaryamj, 4(4), 171-177, (2014).
- [7] Wu, D. and Yotnda, P., “Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture”, *Journal of Visualized Experiments*, (54), e2899, DOI : 10.3791/2899, (2011).
- [8] Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. and Millhorn, D. E., “Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- and von Hippel-Lindau

- Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- α ”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 18, Issue of May 2, pp. 15911–15916, (2003).
- [9] Wang, R., Jin, F. and Zhong, H., “A novel experimental hypoxia chamber for cell culture”, *Am J Cancer Res*, 4(1), 53-60, (2014).
- [10] Karageç, N., Meydancı, D. ve Küçüksayan, H., “Akciğer kanseri hücre dizilerinde hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ve paraoksonaz enzim ilişkisinin araştırılması”, *Dicle Tıp Dergisi*, 42 (3), 361-367, (2015).
- [11] Boyunağa, H., “Hücre”, *Bilim Teknik*, Haziran, (2002).
- [12] Bond, C. S. and Fox, A. H., “Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA”, *J. Cell Biol.*, 186, 5, 637–644, (2009).
- [13] Fox, A. H. and Lamond, A. I., “Paraspeckles”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000687, (2010).
- [14] <https://en.wikipedia.org/wiki/Paraspeckle>, (21.04.2016).
- [15] Passon, D. M., Lee, M., Rackham, O., Stanley, W. A., Sadowska, A., Filipovska, A., Fox, A. H. and Bond, C. S., “Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation”, *PNAS*, 109, 13, (2012).
- [16] Snijders, A. P., Hautbergue, G. M., Bloom, A., Williamson, J. C., Minshull, T. C., Phillips, H. L., Mihaylov, S. R., Gjerde, D. T., Hornby, D. P., Wilson, S. A., Hurd, P. J. and Dickman, M. J., “Arginine methylation and citrullination of splicing factor proline- and glutamine-rich (SFPQ/PSF) regulates its association with mRNA” , *Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the RNA Society*, *RNA*, 21, 3, (2015).
- [17] Dong, B., Horowitz, D. S., Kobayashi, R. and Krainer, A. R., “Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONABJ6”, *Nucleic Acids Research*, 21, 17, (1993).
- [18] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4841>, (23.04.2016).

- [19] Lu, J. Y. and Sewer, M. B., “p54nrb/NONO Regulates Cyclic AMP-Dependent Glucocorticoid Production by Modulating Phosphodiesterase mRNA Splicing and Degradation” , *Molecular and Cellular Biology*, 35, 7, (2015).
- [20] Emili, A., Shales, M., Mccracken, S., Xie, W., Tucker, P. W., Kobayashi, R., Blencowe, B. J. and Ingles, C. J., “Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/NonO bind to the RNA polymerase II CTD” , *Cambridge University Press Printed in the USA*, 8, 1102–1111, (2002).
- [21] Peng, R., Dye, B. T., Pérez, I., Barnard, D. C., Thompson, A. B. and Patton, J. G., “PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA”, *Cambridge University Press- Printed in the USA*, 8, 1334–1347, (2002).
- [22] Kaneko, S., Rosen, O. R., Meyerson, M. and Manley, J. L., “The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination”, *Genes & Development*, 21, 1779–1789, (2007).
- [23] Liu, L., Xie, N., Rennie, P., Challis, J. R. G., Gleave, M., Lye, S. J. and Dong, X., “Consensus PP1 Binding Motifs Regulate Transcriptional Corepression and Alternative RNA Splicing Activities of the Steroid Receptor Coregulators, p54nrb and PSF”, *Mol Endocrinol*, 25 (7), 1197–1210, (2011).
- [24] Izumi, H., McCloskey, A., Shinmyozu, K. and Ohno, M., “p54nrb/NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly”, *Nucleic Acids Research*, 42, 6, (2014).
- [25] Hallier, M., Tavitian, A. and Gachelin, F. M., “The Transcription Factor Spi-1/PU.1 Binds RNA and Interferes with the RNA-binding Protein p54nrb”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 19, (1996).
- [26] Basu, A., Dong, B., Kramer, A. R. and Howe, C. C., “The Intracisternal A-Particle Proximal Enhancer-Binding Protein Activates Transcription and Is Identical to the RNA and DNA-Binding Protein p54nrb/NonO”, *Molecular and Cellular Biology*, 17, 2, (1997).

- [27] Too, C. K. L., Knee, R., Pinette, A. L., Li, A. W. and Murphy, P. R., “Prolactin induces expression of FGF-2 and a novel FGF-responsive NonO/p54nrb-related mRNA in rat lymphoma cells”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 137, 187–195, (1998).
- [28] Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta, H., Nozawa, S. and Kato, S., “p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor”, *Biochem Biophys Res Commun*, 4, 306(3) : 660-5, (2003).
- [29] Adegbola, O. and Pasternack, G. R., “A pp32-retinoblastoma protein complex modulates androgen receptor-mediated transcription and associates with components of the splicing machinery”, *Biochem Biophys Res Commun*, 26,334(2):702-8, (2005).
- [30] Xu, J., Zhong, N., Wang, H., Elias, J. E. , Kim, C. Y., Woldman, I., Pif, C., Gygi, S. P., Geula, C. ve Yankner, B. A. , “The Parkinson’s disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis”, *Human Molecular Genetics*, 14, 9, (2005).
- [31] Dong, X., Sweet, J., Challis, J. R. G., Brown, T. and Lye, S. J., “Transcriptional Activity of Androgen Receptor Is Modulated by Two RNA Splicing Factors, PSF and p54nrb”, *Molecular and Cellular Biology*, 27, 13, (2007).
- [32] Amelio, A. L., Miraglia, L. J., Conkright, J. J., Mercer, B. A., Batalov, S., Cavett, V., Orth, A. P., Busby, J., Hogenesch, J. B. and Conkright, M. D., “A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway”, *PNAS*, 104, 51, (2007).
- [33] Schmidt, F., Hustoft, H. K., Strozynski, M., Dimmler, C., Rudel, T. And Thiede, B., “Quantitative proteome analysis of cisplatin-induced apoptotic Jurkat T cells by stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SDS-PAGE, and LC-MALDI-TOF/TOF MS”, *Electrophoresis*, 28(23), 4359-68, (2007).

- [34] Buxade, M., Morrice, N., Krebs, D. L. and Proud, C. G., “The PSF·p54^{nrb} Complex Is a Novel Mnk Substrate That Binds the mRNA for Tumor Necrosis Factor α “R, *J. Biol. Chem*, VOL. 283, NO. 1, pp.57–65, (2008).
- [35] Bianconcini, A., Lupo, A., Capone, S., Quadro, L., Monti, M. , Zurlo, D., Fucci, A. , Sabatino, L., Brunetti, A., Chiefari, E., Gottesman, M. E., Blaner, W. S. and Colantuoni, V., “Transcriptional activity of the murine retinol binding protein gene is regulated by a multiprotein complex containing HMGA1, p54^{nrb}/NonO, protein-associated splicing factor (PSF) and steroidogenic factor 1 (SF1)/liver receptor homologue 1 (LRH-1)”, *Int J Biochem Cell Biol*, 41(11), 2189–2203, (2009).
- [36] Rivera, M. N., Kim, W. J., Wells, J., Stone, A. , Burger, A., Coffman, E. J., Zhang, J. and Haber, D. A., “The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity” , *PNAS*, 106, 20, (2009).
- [37] Dong, X., Yu, C., Shynlova, O., Challis, J. R. G., Rennie, P. S. and Lye, S. J., “p54^{nrb} Is a Transcriptional Corepressor of the Progesterone Receptor that Modulates Transcription of the Labor-Associated Gene, Connexin 43 (Gja1)”, *Mol Endocrinol*, 23(8), 1147–1160, (2009).
- [38] Ferrai, C., Onganía, G. N., Longobardi, E., Palazzolo, M., Disanza, A., Diaz, V. M., Crippa, M. P., Scita, G. and Blasi, F., “Induction of HoxB Transcription by Retinoic Acid Requires Actin Polymerization” , *Molecular Biology of the Cell*, 20, 3543–3551, (2009).
- [39] Ong, S. A., Tan, J. J., Tew, W. L. and Chen, K. S., “Rasd1 Modulates the Coactivator Function of NonO in the Cyclic AMP Pathway”, *PLoS ONE*, 6, Issue 9, (2011).
- [40] Yadav, S. P., Hao, H., Yang, H. J., Kautzmann, M. A. I., Brooks, M., Nellissery, J., Klocke, B., Seifert, M. and Swaroop, A., “The transcription-splicing protein NonO/p54^{nrb} and three NonO-interacting proteins bind to distal enhancer region and augment rhodopsin expression”, *Human Molecular Genetics*, 23, 8, (2014).

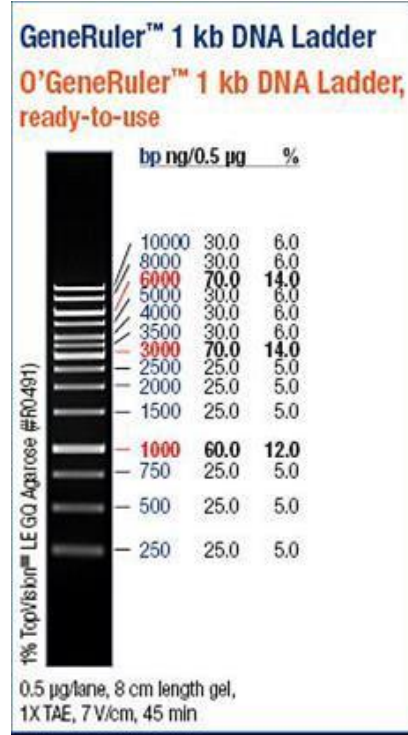
- [41] Zolotukhin, A. S., Michalowski, D., Bear, J., Smulevitch, S. V., Traish, A. M., Peng, R., Patton, J., Shatsky, I. N. and Felber, B. K., “PSF Acts through the Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNA Instability Elements To Regulate Virus Expression”, *Molecular and Cellular Biology*, 23, 18, (2003).
- [42] Hwang, N. R., Yim, S. H., Kim, Y. M., Jeong, J., Song, E. J., Lee, Y., Lee, J. H., Choi, S. and Lee, K. J., “Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions”, *Biochem. J.*, 423, 253–264, (2009).
- [43] Pavao, M., Huang, Y. H., Hafer, L. J., Moreland, R. B. and Traish, A. M., “Immunodetection of nmt55/p54nrb isoforms in human breast cancer”, *BMC Cancer*, 1:15, (2001).
- [44] Miyamoto, K., Sakurai, H. and Sugiura, T., “Proteomic identification of a PSF/p54nrb heterodimer as RNF43 oncoprotein-interacting proteins”, *Proteomics*, 8(14), 2907-10, (2008).
- [45] Schiffnery, S., Zimaray, N., Schmidy, R. and Bosserhoff, A. K., “p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma”, *Carcinogenesis*, 32, 8, pp.1176–1182, (2011).
- [46] Laura D Nelson, L. D., Bender, C., Mannsperger, H., Buergy, D., Kambakamba, P., Mudduluru, G., Korf, U., Hughes, D., Dyke, M. W. V. and Allgayer, H., “Triplex DNA-binding proteins are associated with clinical outcomes revealed by proteomic measurements in patients with colorectal cancer”, *Nelson et al. Molecular Cancer*, 11:38, (2012).
- [47] Ren, Z., Wang, Z., Hu, Z., Hu, X., Zhang, H., Wu, H., Hu, R. and Liu, H., “Decreased expression of P54^{nrb}/NonO correlates with collagen deposition and fibrosis in human aortic dissection”, *Histopathology*, 65, 570–580, DOI: 10.1111/his.12434,(2014).

- [48] Schmid, R., Meyer, K., Spang, R., Schitteck, B. and Bosserhoff A. K., “Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1”, *Pigment Cell Melanoma, Res.* 26; 685–696, (2013).
- [49] Schmid, R., Meyer, K., Spang, R., Schitteck, B., Bosserhoff, A. K.,” YBX1 Is a Modulator of MIA/CD-RAP-Dependent Chondrogenesis”, *PLOS ONE*, 8, Issue 12, e82166, (2013).
- [50] Goldberg, M. A. and Schneider, T. J., “Similarities between the Oxygen-sensing Mechanisms Regulating the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Erythropoietin”, *The Journal of Biological Chemist*, 269, 6, (1993).
- [51] Mitani, T., Harada, N., Tanimori, S., Nakano, Y., Inui, H. and Yamaji, R., “Resveratrol Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1 α -Mediated Androgen Receptor Signaling and Represses Tumor Progression in Castration-Resistant Prostate Cancer”, *J Nutr Sci Vitaminol*, 60, 276-282, (2014).
- [52] Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Stearns, M. E., Holland, J. F., Claffey, K. and Levine, A. C.,” Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line”, *Clinical & Experimental Metastasis*, 17, 687–694, (1999).
- [53] Xiao, L. J., Chen, Y. Y., Lin, P., Zou, H. F., Lin, F., Zhao, L. N., Li, D., Guo, L., Tang, J. B., Zheng, X. L. and Yu, X. G., “Hypoxia increases CX3CR1 expression via HIF-1 and NF- κ B in androgen-independent prostate cancer cells”, *International Journal of Oncology*, 41: 1827-1836, (2012).

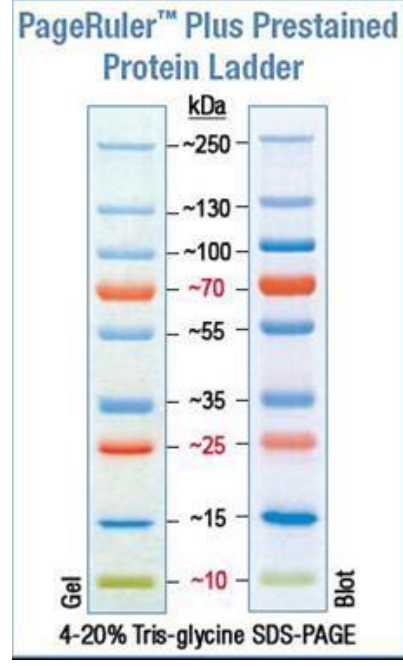
EKLER

6. EKLER

EK A Kullanılan Büyük Belirteçleri



Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.



Şekil A.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.

EK A İnsan NonO/p54^{nrb} Promotor Bölgesi

İnsan NonO/p54^{nrb} Promotor Bölgesini P1 (-730/+529) Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, Acyl, AflIII, AgeI, AjuI, AlfI, Alol, Apal, ApaLI, Arsl, AscI, AsuII, BaeI, BamHI, BbvCI, Bcgl, BclI, BdaI, BglI, BglII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrBI, BstXI, BtgZI, Btrl, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Fall, FseI, HaeII, HaeIV, HindIII, HphI, KpnI, MauBI, MbolI, MluI, NaeI, NarI, NdeI, NheI, NotI, Nrul, OsiI, PaeI, PfoI, PflI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacII, Sall, SanDI, SapI, PI-Scel, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, Smal, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, SwaI, TaqII, Tth111I, XcmI, XhoI, XhoII, XmnI

İnsan NonO/p54^{nrb} Promotor Bölgesi P1 (730/+529)

AGGTTCTCAGTTGCATTAGTCATATTTCAATGGCCACTTATAGTTAGTAGCTGCCATATTGAACACAG
 CAGACATAGGACCTTCCATCATTGCACACAGTTCTATTGAACAGCCCAAGTCTAGATCATTGTGTCC
 CCACATAAGGTGGTGCCATTGGGATACCCTGCAACCCTGAGTGTGAATTAATTAATGGGAATTAA
 CACATACTTATCAATTGATCCTTGTAGTCCTTGGTTAACCACGGGGGCGGGGCGAGTTAGGCATTAC
 TGAACAATGAAGGTTAGTACTGATAGGCCTCTATGGAATATACAGTCTGATCTAGAGGCCTACA
 ATATATCCATGGCAATGATGACACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATAGGAACAATAGTGATGTTT
 GGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCATGGAATGAGGGTGCTGGTTACAATTCTGTGTAATCACGCA
 GAGCCTAAGGTATGATGCACCCCTCCTCCCCACCCCGTCTGTAACCATGACCAAAGAGTTGACTA
 TTTCAGTTGCGTTTCCCAGTAGCCCCAGCAACAGGAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGG

GGTGCAGGATGCAAGCCCTAACAAAGGAAGTGTGAAAAAAGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTCA
GTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCCATTGAATACAATGACATTGTTACTCTTGCTTCTTGCACAGGCG
CAGTGCAGGACTGCTCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTCTCCCCTTCTCTCCCTCTTCCACTTTC
CTCTCCCTTTTTCTCTCTCCTTCCCCCTCCACCACTTGGTCTTTCAGTCTTTCAGTCAGTTCGTTA
GGTCTCTCCTTCCGACCCCCACCCCCAGCTCCTCTCCCTTTCCTTTCCCCCTCCCCCTTTCCTTCCCG
TCTCACGCGCCAGGCCGCTTGACATGCGCATTAGGTACAAAGCCTCGCTCTTGTCCCCATCTGTC
GTTACACGAACTCAAGCCTTGGCATTCCGGCAGCCAATAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGA
TTCCGCCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTACCC
CTTGGCAGGCACCGAGCTCCGTCTCGTTTCCGGCGGTGCGCGCTCTTTCTCGGGACGGGAG
AGGCCGTGTAGCGTCGCCGTTACTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA