

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



**HEPATOSELLÜLER KANSERDE MIR100HG'NİN SP1  
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU**

**ŞEVİN AVŞAR KOÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. FERAY KÖÇKAR (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. ŞERİF ŞENTÜRK  
Doç. Dr. ESRA TOKAY**

**BALIKESİR, ARALIK - 2024**

## **ETİK BEYAN**

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Hepatosellüler Kanserde MIR100HG’nin SP1 Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Şevin AVŞAR KOÇ**

**Bu tez alışması TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (121Z950) nolu proje ile desteklenmiştir.**

**şevin AVşAR KOÇ 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir**

## ÖZET

**HEPATOSELLÜLER KANSERDE MİR100HG’NİN SP1 TRANSKRİPSİYON  
FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ŞEVİN AVŞAR KOÇ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

**BALIKESİR, ARALIK - 2024**

MİR100HG, kanser biyolojisinde önemli etkileri olan uzun kodlamayan bir RNA (lncRNA) olup, çeşitli kanser türlerinde yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu tez kapsamında, MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullardaki hüresel etkileri, MIR100HG'nin SP1 tarafından transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi ve MIR100HG promotorunda SP1 bağlanma bölgelerinin ChIP deneyi ile doğrulanması, SP1'in normoksik ve hipoksik koşullarda hüresel ve moleküler etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Hep3B hücrelerinde MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu ve kalıcı baskılanması mRNA seviyesinde doğrulanmıştır. Normoksik ve hipoksik koşullarda, MIR100HG'nin aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, koloni oluşturma yeteneğini ve invazyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde korele olarak MIR100HG shRNA ile lentiviral tabanlı kalıcı olarak ifadesinin baskılanması normoksik ve hipoksik koşullarda, hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, koloni oluşturma yeteneğini ve invazyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. MIR100HG promotorunda biyoinformatik olarak çok sayıda bağlanma bölgeleri bulunan SP1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG transkripsiyonel regülasyonuna etkileri de incelenmiştir. SP1 aşırı ifadesinin 5' kısaltılarak oluşturulmuş MIR100HG promotor parçalarının aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Aynı artış mRNA düzeyinde qRT-PCR ile doğrulanmıştır. DNA-protein etkileşim deneyi olan ChIP ile SP1 transkripsiyon faktörünün -260/+56 bölgelerine bağlandığı belirlenmiştir. Hep3B hücrelerinde SP1'in aşırı ekspresyonu ve kalıcı baskılanması, normoksik ve hipoksik koşullarda moleküler ve hüresel düzeyde analiz edilmiştir. SP1'in aşırı ekspresyonu ve baskılanması mRNA ve protein düzeyinde doğrulanmıştır. SP1 aşırı ifadesinde ve kalıcı baskılanmasında metastik genlerin ekspresyon seviyelerine etkileri mRNA düzeyinde belirlenmiştir. SP1 aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, koloni oluşturma yeteneğini azalttığı bulunmuştur. Bu sonuçlara korele olarak SP1 shRNA ile lentiviral tabanlı kalıcı olarak ifadesinin baskılanması normoksik ve hipoksik koşullarda, hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, koloni oluşturma yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** MIR100HG, SP1, Hep3B, lncRNA

## **ABSTRACT**

### **REGULATION OF MIR100HG BY SP1 TRANSCRIPTION FACTOR IN HEPATOCELLULAR CANCER**

**MSC THESIS**

**ŞEVİN AVŞAR KOÇ**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR )**

**BALIKESİR, DECEMBER - 2024**

MIR100HG is a long non-coding RNA (lncRNA) with significant effects in cancer biology, shown to be highly expressed in various cancer types. This thesis investigates the cellular effects of MIR100HG overexpression and suppression under normoxic and hypoxic conditions, the transcriptional activation of MIR100HG by SP1, and SP1 binding sites within the MIR100HG promoter using ChIP assays. The cellular and molecular effects of SP1 under normoxic and hypoxic conditions were also examined. In Hep3B cells, overexpression and stable suppression of MIR100HG were confirmed at the mRNA level. Under normoxic and hypoxic conditions, MIR100HG overexpression enhanced cell proliferation, migration, colony formation, and invasion potential. Conversely, lentiviral-based suppression of MIR100HG via shRNA reduced these capabilities under both conditions. SP1, a transcription factor with multiple binding sites in the MIR100HG promoter, was shown to regulate MIR100HG transcription. SP1 overexpression increased the activity of truncated promoter fragments, confirmed at the mRNA level via qRT-PCR. ChIP assays demonstrated SP1 binding to the -260/+56 promoter region. In Hep3B cells, SP1 overexpression and suppression were analyzed under normoxic and hypoxic conditions. Both were confirmed at mRNA and protein levels. SP1 overexpression decreased cell proliferation, migration, and colony formation, while stable suppression via shRNA increased these activities. SP1's effects on metastatic gene expression were assessed at the mRNA level.

**KEYWORDS:** MIR100HG, SP1, Hep3B, lncRNA

Science Code / Codes : 20603, 20606, 20610

Page Number : 133

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Hepatosellüler Kanser.....	1
1.2 Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA).....	2
1.3 Uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA).....	3
1.4 MIR100HG Geni ve Kanselerdeki Rolü.....	5
1.5 MIR100HG ve HCC.....	7
1.6 SP1 Trankripsiyon Faktörü.....	9
1.7 SP1 Trankripsiyon Faktörü ve Hepatosellüler Kanser (HCC) .....	11
1.8 Hipoksi .....	13
<b>2. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI VE KAPSAMI</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERYAL-YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materyaller .....	19
3.1.1 Kullanılan Materyaller.....	19
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	22
3.1.3 Kullanılan Vektör Sistemleri .....	23
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu .....	27
3.2.2 Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Teknikler.....	27
3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Oluşturulması .....	27
3.2.2.2 DH5α Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi ve Kontrolü.....	28
3.2.2.3 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Belirlenmesi .....	28
3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması.....	29
3.2.3 DNA Çalışmaları ile İlgili Metotlar.....	29
3.2.3.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA İzole Edilmesi .....	29
3.2.3.2 DNA Miktar Tayini .....	30
3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	30
3.2.3.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi .....	30
3.2.3.5 Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanımı .....	31
3.2.3.6 Restriksiyon Endonükleaz Reaksiyonu .....	32
3.2.3.7 Ligasyon .....	32
3.2.3.8 Transformasyon.....	32
3.2.3.9 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu .....	33
3.2.3.10 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu .....	33
3.2.3.11 shRNA Klonlama Tekniği .....	33
3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler.....	34
3.2.4.1 Besiyeri Serumunun Hazırlanması .....	34
3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması .....	34
3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	35
3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması .....	35
3.2.4.5 Hücrelerin Pasajlanması .....	35

3.2.4.6 Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi .....	36
3.2.4.7 Hücrelerin Dondurulması .....	36
3.2.4.8 Kimyasal İndüklenmiş Hipoksi Oluşturulması .....	37
3.2.4.9 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları .....	37
3.2.4.9.1 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon .....	37
3.2.4.9.2 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü .....	38
3.2.4.10 Lentiviral tabanlı Susturma Çalışmaları .....	39
3.2.4.10.1 HEK293-T .....	39
3.2.4.10.2 Ticari Transfeksiyon Reaktifi ile Lentiviral Plazmitlerin Transfeksiyonu.....	40
3.2.4.10.3 Hep3B Hücrelerine Lentiviral Transdüksiyon .....	41
3.2.4.10.4 Promisin Uygulanması .....	41
3.2.4.10.5 Tek Koloni Seçilmesi ve Büyütülmesi .....	41
3.2.4.11 Overekspresyon Çalışmaları.....	41
3.2.4.11.1 Ticari Transfeksiyon Reaktifi ile Geçici Transfeksiyon.....	42
3.2.4.12 MIR100HG ve SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hücrel Karakterizasyonu İçin Yapılan Hücrel Çalışmalar .....	42
3.2.4.12.1 Sitotoksosite Deneyi (MTT).....	42
3.2.4.12.2 Çizik Testi .....	43
3.2.4.12.4 Matrijel .....	44
3.2.4.12.5 Flow Sitometri .....	46
3.2.5 RNA Tabanlı Teknikler .....	46
3.2.5.1 RNA İzolasyonu .....	46
3.2.5.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi .....	46
3.2.5.3 cDNA sentezi.....	47
3.2.5.4 Real Time PCR.....	47
3.2.6 Protein Tabanlı Teknikler.....	49
3.2.6.1 Western Blot Tekniği Kullanılarak Protein Seviyesinin Belirlenmesi.....	49
3.2.6.2 RIPA Tamponu Kullanılarak Hücrelerin Lizisi ve Proteinlerin Ekstraksiyonu .....	50
3.2.6.3 Bradford Tekniği Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi .....	50
3.2.6.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	51
3.2.6.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi .....	52
3.2.6.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmünoblot Tekniği ile Tespiti.....	53
3.2.6.7 Görüntüleme ve Analiz.....	53
3.2.6.8 İmmüno Floresan (IFC) Deneyi .....	54
3.2.7 DNA-Protein Etkileşim Tekniği (ChIP).....	55
3.2.7.1 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Fiksasyon.....	55
3.2.7.2 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Çapraz Bağlı DNA/Protein İmmunopresipitasyonu .....	55
3.2.7.3 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu....	56
3.2.7.4 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi.....	57
3.2.7.5 Kromatin İmmunopresipitasyonunda DNA'nın Saflaştırılması.....	57
3.2.7.6 Sonuçların Analiz Edilmesi .....	58
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>59</b>
4.1 Hep3B Hücrelerinde MIR100HG'nin Normoksik ve Hipoksik koşullarda Hücrel ve Moleküler Analizi.....	59
4.1.1. MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanması Çalışmaları.....	59
4.1.1.1 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Ekspresyon Seviyesinin Doğrulanması.....	61

4.1.1.2 MIR100HG Geninin İfadesinin Baskılandığı Hep3B Hücrelerinde Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi .....	62
4.1.1.2.1 MTT .....	62
4.1.1.2.2 Koloni Formasyon .....	62
4.1.1.2.3 Çizik Testi .....	64
4.1.1.2.4 Matrijel .....	65
4.1.1.2.5 Flow Sitometri .....	67
4.1.2 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları .....	69
4.1.2.1 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Ekspresyon Seviyesinin Doğrulanması .....	69
4.1.2.2 MIR100HG Geninin Aşırı İfade Edildiği Hep3B Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi .....	70
4.1.2.2.1 MTT .....	70
4.1.2.2.2 Koloni Formasyon .....	71
4.1.2.2.3 Çizik Testi .....	72
4.1.2.2.4 Matrijel .....	74
4.1.2.2.5 MIR100HG Aşırı İfade Edilmiş ve Baskılanmış Hücrelerde Hücre İçi Yolakların Western Blot Tekniğiyle Belirlenmesi .....	76
4.2 MIR100HG Geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü Tarafından Transkripsiyonel Regülasyonu .....	77
4.2.1 Genomik DNA İzolasyonu .....	77
4.2.2 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlanması .....	78
4.2.3 MIR100HG Promotorunun PCR ile Çoğaltılması .....	79
4.2.4 MIR100HG Geninin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması .....	80
4.2.5 MIR100HG Promotor Parçalarının pMETluc Haberci Vektör Sistemine Alt Klonlanması .....	81
4.2.6 Sanger Dizileme .....	83
4.2.7 Klonlanan Promotor Parçalarının Midiprep ile Büyük Ölçekte İzolasyonu Kontrol Kesimi 85	
4.2.8 MIR100HG Promotor Parçaları ile Birlikte SP1 Transkripsiyon Faktörünün Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi .....	86
4.2.9 MIR100HG Promotorunda Bulunan SP1 Bağlanma Bölgelerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi ve Doğrulanması .....	88
4.3 Hep3B Hücrelerinde SP1 Transkripsiyon Faktörünün Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel ve Moleküler Analizi .....	89
4.3.1 Hep3B Hücrelerinde SP1 İfadesinin Baskılanması .....	90
4.3.1.1 SP1 shRNA Oligolarının Tasarlanması .....	90
4.3.1.2 SP1 sh-RNA Oligolarının pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması .....	90
4.3.1.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması ....	92
4.3.1.4 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında MIR100HG İfadesinin Belirlenmesi ..	93
4.3.1.5 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin Western Blot ile Belirlenmesi .....	94
4.3.1.6 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin IFC Deneyi ile Belirlenmesi .....	96
4.3.1.7 SP1 Transkripsiyon Faktörünün İfadesinin Baskılandığı Hep3B Hücrelerinde Normoksik, Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi ...	97

4.3.1.7.1 MTT.....	97
4.3.1.7.2 Koloni Formasyon .....	98
4.3.1.7.3 Çizik Testi .....	99
4.3.1.8 SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde baskılanmasının, normoksik ve hipoksik koşullar altında metastatik genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi .....	101
4.3.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları .....	103
4.3.2.1 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması .....	103
4.3.2.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında MIR100HG İfadesinin Belirlenmesi.....	104
4.3.2.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin Western Blot ile Belirlenmesi.....	105
4.3.2.4 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin IFC Deneyi ile Belirlenmesi ....	106
4.3.2.5 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Aşırı İfade Edildiği Hep3B Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi .....	107
4.3.2.5.1 MTT Testi.....	107
4.3.2.5.2 Koloni Formasyon .....	108
4.3.2.5.3 Çizik Testi .....	109
4.3.2.6 SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde Aşırı İfade Edilmesinin, normoksik ve hipoksik koşullar altında metastatik genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	111
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>113</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>120</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>132</b>
EK A: Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri.....	132
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>133</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1:	11. Kromozom üzerinde bulunan MIR100HG'nin genomik bağlamı (NCBI).....	5
Şekil 1.2:	MIR100HG'nin temel işlevlerinin şematik gösterimi [27]. .....	5
Şekil 1.3:	SP1'in yapısı [54]. .....	9
Şekil 1.4:	Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$ aktivitesinin düzenlenmesi [110]..	15
Şekil 2.1:	Tez iş akış diyagramı .....	18
Şekil 3.1:	pGEM-T®Easy vektör haritasının şematik gösterimi. ....	23
Şekil 3.2:	pMetLuc Reporter vektör haritasının şematik gösterimi. ....	23
Şekil 3.3:	pMetLuc Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.....	24
Şekil 3.4:	pSEAP2-Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi. ....	24
Şekil 3.5:	pLKO.1 vektör haritasının şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.6:	pMD2.G vektör haritasının şematik gösterimi. ....	25
Şekil 3.7:	pEGFP-C1 vektör haritasının şematik gösterimi. ....	26
Şekil 3.8:	psPAX2 vektör haritasının şematik gösterimi .....	26
Şekil 3.9:	pcDNA3.1 vektör haritasının şematik gösterimi .....	27
Şekil 3.10:	HEK293-T hücrelerinin mikroskop görüntüleri. ....	40
Şekil 3.11:	Bradford eğrisi ve denklemi. ....	51
Şekil 4.1:	Hep3B hücrelerinde MIR100HG'nin normoksik ve hipoksik koşullarda hücreSEL ve moleküler analizi akış diyagramı. ....	59
Şekil 4.2:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesi baskılanan kolonilerin Real-Time PCR ile belirlenmesi. ....	61
Şekil 4.3:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin doğrulanması. ....	61
Şekil 4.4:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.....	62
Şekil 4.5:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni Formasyon analizi. ....	63
Şekil 4.6:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi.....	64
Şekil 4.7:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi.....	65
Şekil 4.8:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda matrijel analizi. ....	66
Şekil 4.9:	Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda matrijel analizi.....	66
Şekil 4.10:	MIR100HG ifadesi baskılanmış Hep3B, SNU 398 ve Clone-9 hücrelerinde annexin 5 boyamasının flow sitometre analizi. ....	67
Şekil 4.11:	Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin doğrulanması.....	70
Şekil 4.12:	Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi. ....	71
Şekil 4.13:	Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi. ....	72
Şekil 4.14:	Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Çizik testi analizi. ....	73

<b>Şekil 4.15:</b> Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Çizik testi analizi. ....	74
<b>Şekil 4.16:</b> Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik matrijel analizi. ....	75
<b>Şekil 4.17:</b> Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik matrijel analizi. .	75
<b>Şekil 4.18:</b> Hep3B hücre hattında, MIR100HG aşırı ifade edilmiş ve baskılanmış hücrelerde hücre içi sinyal iletim yolunda görev yapması muhtemel moleküllerin ve fosforillenmemiş ve fosforillenmiş protein ifadelerine ait western blot görüntüsü. ....	76
<b>Şekil 4.19:</b> MIR100HG Geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü Tarafından Transkripsiyonel Regülasyonunun akış diyagramı. ....	77
<b>Şekil 4.20:</b> Hep3B hücrelerinden izole edilen genomik DNA'nın %0.8'lik Agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	78
<b>Şekil 4.21:</b> MIR100HG -188+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-2: 419 bp büyüklüğündeki promotor parçası, 3: Pozitif kontrol 4: Negatif kontrol M: 250 bp Marker. ....	80
<b>Şekil 4.22:</b> MIR100HG -188/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. M: 1kb (250 bç) Büyüklük Belirteci, 1: Koloni 1 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 2: Koloni 2 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi. ....	81
<b>Şekil 4.23:</b> MIR100HG -188/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. M: 1kb (100 bç) Büyüklük Belirteci, 1: Koloni 1 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 2: Koloni 2 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi, 3: Koloni 3 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 4: Koloni 4 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi. ....	83
<b>Şekil 4.24:</b> 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotörü ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması. ....	84
<b>Şekil 4.25:</b> pMetLuc vektöre klonlanmış MIR100HG promotor parçalarının midiprep kontrol kesim jel görüntüsü. ....	86
<b>Şekil 4.26:</b> Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz aktiviteleri. ....	87
<b>Şekil 4.27:</b> MIR100HG promotor parçalarıyla birlikte SP1 transkripsiyon faktörü kontransfekte edildiğinde Lusiferaz/SEAP değerleri. ....	87
<b>Şekil 4.28:</b> MIR100HG promotörü üzerinde olası SP1 ve SP3 bağlanma bölgeleri. ....	88
<b>Şekil 4.29:</b> Hep3B hücrelerinde SP1 antikoru kullanılarak gerçekleştirilen CHIP deneyinin analizi. ....	89
<b>Şekil 4.30:</b> Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün normoksik ve hipoksik koşullarda hücresel ve moleküler analizi akış diyagramı. ....	90
<b>Şekil 4.31:</b> pLKO.1-TRC klonlama vektörünün AgeI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile hazırlanması. ....	91
<b>Şekil 4.32:</b> Rekombinant S1, S2 ve S3 SP1-shRNA vektörlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: 100bp Marker. ....	92
<b>Şekil 4.33:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması. ....	93
<b>Şekil 4.34:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının MIR100HG ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin belirlenmesi. ....	94
<b>Şekil 4.35:</b> SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin normoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi. ....	95

<b>Şekil 4.36:</b> SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin hipoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi. ....	95
<b>Şekil 4.37:</b> Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile normoksik koşullarda SP1 baskılanmasının protein seviyesinde doğrulanması. ....	96
<b>Şekil 4.38:</b> Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile hipoksik koşullarda SP1 baskılanmasının protein seviyesinde doğrulanması. ....	97
<b>Şekil 4.39:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi. ....	98
<b>Şekil 4.40:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni Formasyon analizi. ....	99
<b>Şekil 4.41:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi. ....	100
<b>Şekil 4.42:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi. ....	101
<b>Şekil 4.43:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının e-kaderin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi. ....	102
<b>Şekil 4.44:</b> Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının vimentin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi. ....	102
<b>Şekil 4.45:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması. ....	103
<b>Şekil 4.46:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda MIR100HG ekspresyon seviyesinin belirlenmesi. ....	104
<b>Şekil 4.47:</b> SP1 aşırı ifade edilen Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi. ....	105
<b>Şekil 4.48:</b> Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile normoksik koşullarda SP1 aşırı ifadesinin protein seviyesinde doğrulanması. ....	106
<b>Şekil 4.49:</b> Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile hipoksik koşullarda SP1 aşırı ifadesinin protein seviyesinde doğrulanması. ....	107
<b>Şekil 4.50:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi. ....	108
<b>Şekil 4.51:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi. ....	109
<b>Şekil 4.52:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin normoksik koşullarda çizik testi analizi. ....	110
<b>Şekil 4.53:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda çizik testi analizi. ....	111
<b>Şekil 4.54:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin e-kaderin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi. ....	112
<b>Şekil 4.55:</b> Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin vimentin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi. ....	112

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1:</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar. ....	19
<b>Tablo 3.2:</b> RNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar. ....	20
<b>Tablo 3.3:</b> DNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar. ....	20
<b>Tablo 3.4:</b> Protein tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar. ....	21
<b>Tablo 3.5:</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve üretici firmaları.....	22
<b>Tablo 3.6:</b> PCR döngü şartları. ....	30
<b>Tablo 3.7:</b> DNA Agaroz Jel Elektrofrezisi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler. ....	31
<b>Tablo 3.8:</b> Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
<b>Tablo 3.9:</b> Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan vektörler ve kullanım amaçları. ....	37
<b>Tablo 3.10:</b> Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yönteminde kullanılan çözeltilerin bileşenleri ve miktarları. ....	38
<b>Tablo 3.11:</b> TurboFect Reagent™ ile gerçekleştirilen geçici transfeksiyon bileşenlerinin 6 kuyucuklu plaka için kuyu başına gereken miktarları. ....	40
<b>Tablo 3.12:</b> TurboFect™ ile gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmaları için gerekli bileşenlerin miktarları. ....	42
<b>Tablo 3.13:</b> MTT’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	43
<b>Tablo 3.14:</b> cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.....	47
<b>Tablo 3.15:</b> Real Time PCR Döngü Şartları.....	48
<b>Tablo 3.16:</b> Tüm PCR’larda ve Real-Time PCR’da kullanılan primerler ve dizileri. ....	48
<b>Tablo 3.17:</b> Western Blot çözeltileri ve hazırlanma yöntemleri. ....	49
<b>Tablo 3.18:</b> SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve miktarları. ....	52
<b>Tablo 3.19:</b> CHIP prosedüründe kullanım amacına göre antikorlar ve miktarları. ....	56
<b>Tablo 3.20:</b> CHIP prosedüründe kullanılan yıkama tamponları ve yıkama sayıları. ....	56
<b>Tablo 3.21:</b> CHIP Real Time PCR’ında kullanılan primerlerin lokasyonları, dizileri ve büyüklükleri. ....	58
<b>Tablo 3.22:</b> CHIP Real Time PCR döngü şartları. ....	58
<b>Tablo 4.1:</b> MIR100HG genine özgü tasarlanan sh-RNA oligoları ve dizileri. ....	60
<b>Tablo 4.2:</b> MIR100HG genine ait tasarlanan ve restriksiyon enzim bölgeleri eklenen promotor klonlama primerleri. ....	78
<b>Tablo 4.3:</b> -188/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR reaksiyon bileşenleri.....	79
<b>Tablo 4.4:</b> -188/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR döngü şartları. ....	79
<b>Tablo 4.5:</b> Promotor parçası ile pGem-T Easy vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	80
<b>Tablo 4.6:</b> Rekombinant kolonilerin tespiti için kurulan kesim reaksiyon bileşenleri. ....	81
<b>Tablo 4.7:</b> PmetLuc vektörü ve MIR100HG promotor parçasının ligasyon bileşenleri.....	82
<b>Tablo 4.8:</b> Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla kurulan kesim reaksiyonu bileşenleri.....	82

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>Bp</b>	: Base pair
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>ChIP</b>	: Kromatin İmmüno Presipitasyonu
<b>Ct</b>	: Cycle Threshold
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	: Kobalt klorür
<b>DEPC</b>	: Diethyl Pyrocarbonate
<b>DNA</b>	: Deoksi ribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiniükleoid trifosfat
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetraasetik asit
<b>Et-Br</b>	: Etidyum Bromür
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>Hβ-2</b>	: Human-beta-2 microglobulin
<b>HCC</b>	: Hepatosellüler karsinom
<b>Hep3B</b>	: İnsan hepatosellüler kanser hücresi
<b>HIF-1α</b>	: Hipoksiyle indüklenen faktör – I
<b>Kb</b>	: Kilo baz
<b>lncRNA</b>	: Uzun kodlanmayan RNA
<b>M</b>	: Molar
<b>Ma</b>	: Moleküler ağırlık
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>Rpm</b>	: Revolution Per Minutes
<b>SEAP</b>	: Secreted Alkaline Phosphatase
<b>TE</b>	: Tripsin EDTA
<b>UV</b>	: Ultra Viyole
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µM</b>	: Mikromolar

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında bana rehberlik eden, yalnızca akademik değil aynı zamanda manevi desteğiyle de yanımda olan, bu sürecin en zorlu anlarında bana güç ve ilham kaynağı olan bana hedeflerime ulaşmak için gereken cesareti veren hayran olduğum canım hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a sonsuz teşekkür ediyorum. Zaman zaman umutsuzluğa düştüğümde, güven veren sözlerinizle yeniden motive olduğum, bilimsel düşünceye yaklaşımınız ve hayata dair duruşunuzla, benim için eşsiz bir örnek taşıyan bu süreçte desteğini her zaman hissettiğim canım hocam Doç. Dr. Esra TOKAY'a sonsuz teşekkür ediyorum. Koşulsuz destekleriyle her zaman yanımda olan, bu çalışma sırasında rehberlik eden sevgili hocalarım; Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Serhat ONAT'a teşekkür ediyorum. Desteği ve iş birliğiyle süreci kolaylaştıran, zorlukların üstesinden birlikte geldiğimiz, paylaştığımız her anın, sadece bir ekip çalışması olmadığı aynı zamanda güzel bir dostluk hikayesine dönüştüğü sevgili ekip arkadaşım Aylin TÜRKOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Her yardıma ihtiyaç duyduğumda desteklerini hiç esirgemeyen beraber daha çok deneyler yapmayı hevesle beklediğim Hasan ÇAPRAZ'a, Yasemin KELEŞ'e ve Feyza Nur SAV'a teşekkür ediyorum. Umutsuzluğa kapıldığım her an yanımda olan tezimi yazarken her zaman yükümü hafifletmeye çalışan desteğini hep hissettiğim mutlu anlarda benimle birlikte sevinen canım arkadaşım Rümeyisa GENEZ'e teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmasını tamamlarken, her adımda yanımda olan, sevgisi, desteği ve dualarıyla beni güçlü kılan canım annem Özlem YURDACAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Hayatım boyunca bana verdiği emekler, gösterdiği sabır ve verdiği cesaret sayesinde bugünlere ulaşabildim. Onun şefkati ve fedakarlığı, bu başarıdaki en büyük ilham kaynağım oldu. Canım kardeşim Hazal Şevval AVŞAR, her zaman beni destekleyen, güldüren ve motivasyonumu korumama yardımcı olan zor zamanlarımda verdiği güç, varlığıyla hissettirdiğin sevgi ve arkadaşlığın için teşekkür ediyorum. Hayallerimi hayal eden, hedeflerime benim kadar inanan ve bu süreçte hem sevginle hem de varlığıyla beni hiç yalnız bırakmayan canım eşim Atakan Koç'a teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2024**

**Şevin AVŞAR KOÇ**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Hepatosellüler Kanser

Hepatosellüler karsinom (HCC), karaciğer kanserinin en yaygın biçimi olması ve tüm karaciğer kanseri vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturması nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunudur. HCC ile ilişkili insidans ve ölüm oranları endişe vericidir; HCC dünya çapında altıncı en yaygın kanser ve kanserle ilişkili ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir [1] [2].

Hepatosit karsinomu (HCC), hem genetik hem de çevresel faktörleri içeren çok faktörlü bir etiyooloji ile karakterize karmaşık bir malignitedir. HCC gelişiminin altında yatan mekanizmalar karmaşıktır ve kronik inflamasyon, genetik mutasyonlar ve sinyal yollarındaki değişiklikler dahil olmak üzere bir dizi biyolojik süreci içerir. Kronik viral enfeksiyonlar, özellikle hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV), HCC için en önemli risk faktörleri arasındadır ve karaciğer sirozuna ve ardından gelen karsinogeneze yol açar [3].

Genellikle bu viral enfeksiyonlar tarafından daha da kötüleştirilen karaciğerdeki kronik inflamasyonun rolü, onkojenik yolların aktivasyonu ve anjiyogenezin teşviki gibi mekanizmalar yoluyla tümör gelişimine elverişli bir mikro ortama katkıda bulunur [4].

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) da HCC'deki tümör mikroçevresine önemli ölçüde katkıda bulunur. Polarizasyonları tümör büyümesini ve metastazı etkileyebilir ve HCC'deki bağışıklık ortamının önemini vurgular [5]. HCC hücreleri ile bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim karmaşıktır ve çeşitli sitokinler ve bağışıklık hücreleri tümör ilerlemesinde ve tedaviye yanıtta önemli roller oynar [6]. Bu etkileşimleri anlamak, etkili immünoterapötik stratejiler geliştirmek için çok önemlidir. Dahası, son yıllarda HCC'de uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) rolü dikkat çekmiştir. Bu moleküller gen ekspresyonunu düzenleyebilir ve HCC'de tümör oluşumu, metastaz ve kemoterapi direnci ile bağlantılıdır. Örneğin, lncRNA MKLN1-AS'nin miR-654-3p için moleküler bir sünger görevi görerek HCC ilerlemesini desteklediği ve böylece hepatoma kaynaklı büyüme faktörünün ifadesini artırdığı gösterilmiştir [7].

HCC'nin yönetimi, özellikle yüksek tekrarlama oranları ve geleneksel tedavilere karşı direnci nedeniyle zorlu olmaya devam etmektedir. Cerrahi müdahale ve karaciğer nakli,

erken evre HCC için birincil seçeneklerdir; ancak, hastaların yalnızca az bir kısmı bu müdahaleler için uygundur [8].

Son araştırmalar giderek artan bir şekilde HCC patogenezinde uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) rolüne odaklanmıştır ve HCC'nin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığı ileri sürülmüştür ve bu da onları potansiyel biyobelirteçler ve terapötik hedefler haline getirir. LncRNA'ların HCC'ye katkıda bulunduğu temel mekanizmalardan biri, mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve diğer düzenleyici moleküllerle etkileşimleridir. Örneğin, lncRNA CRNDE'nin miR-217/MAPK1 eksenini üzerinden HCC hücre çoğalmasını ve invazyonunu desteklediği gösterilmiştir ve bu, tümör oluşumunda lncRNA-miRNA etkileşimlerinin önemini vurgulamaktadır [9]. Tümör biyolojisindeki rollerine ek olarak, lncRNA'lar HCC'de geleneksel tedavilere karşı direnç gelişiminde de rol oynamıştır. Örneğin, lncRNA-POIR'nin miR-182-5p'yi süngerleştirerek sorafenib duyarlılığını baskıladığı, böylece EMT'yi teşvik ettiği ve tümör agresifliğinin artırdığı gösterilmiştir [10].

Genel olarak, ortaya çıkan kanıtlar lncRNA'ların HCC'nin patogenezinde, ilerlemesinde ve tedavi direncinde önemli roller oynadığını göstermektedir. Gen ekspresyonunu düzenleme, miRNA'larla etkileşime girme ve tümör mikro çevresini etkileme yetenekleri, onları HCC biyolojisinde önemli mekanizmalar olarak konumlandırılmaktadır.

## **1.2 Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA)**

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), proteinlere dönüşmeyen ancak gen düzenlemesi, hücrel sinyalleme ve hastalık ilerlemesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan önemli ve çeşitli bir RNA molekülü sınıfını temsil eder. ncRNA'ların sınıflandırması, uzunluklarına ve işlevsel özelliklerine göre genel olarak kategorize edilebilir. Uzunluklarına göre, küçük kodlamayan RNA'lar (sncRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lardır (lncRNA'lar) [11] [12].

Küçük kodlamayan RNA'lar tipik olarak 18 ila 200 nükleotid uzunluğundadır ve birkaç iyi çalışılmış alt sınıfı içerir. Bunlar arasında, mikroRNA'lar (miRNA'lar) belki de en tanınmış olanlardır. miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundadır ve öncelikle hedef haberci RNA'lar (mRNA'lar) üzerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak mRNA bozunumuna veya translasyonel baskılamaya yol açarak işlev görür [13] [14] [15].

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200 nükleotidden daha uzun ncRNA'lar olarak tanımlanır. Kromatin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyon sonrası işleme dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip oldukları bilinmektedir [16].

ncRNA'lar ile tümör mikro çevresi arasındaki etkileşim, yeni tedavi stratejilerine dair öngörüler sağlayabileceğinden aktif bir araştırma alanıdır. Kanseri ilerletmesindeki rollerine ek olarak, ncRNA'lar ilaç direncinde de rol oynarlar. Belirli lncRNA'ların ve miRNA'ların ifadesi kemoterapiye ve hedefli tedavilere karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmiştir.

Kodlamayan RNA'ların sınıflandırması, uzunluklarına, yapılarına ve işlevsel rollerine göre kategorize edilebilen çok çeşitli RNA moleküllerini kapsar. ncRNA'ların çeşitli işlevlerine yönelik devam eden araştırmalar, özellikle kanserde gen düzenlemesinde, hücresel süreçlerde ve hastalık mekanizmalarında kritik rollerini ortaya koymaya devam etmektedir. Bu sınıflandırmaları ve bunların etkilerini anlamak, çeşitli hastalıklarda ncRNA'ları hedef alan yeni terapötik stratejiler geliştirmek için önemli olacaktır.

### **1.3 Uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA)**

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), uzunluğu 200 nükleotidi aşan ve protein kodlamayan bir RNA molekülü sınıfıdır. Son yıllarda, özellikle kanser biyolojisinde olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerdeki önemli rolleri nedeniyle önemli ilgi görmüştür. lncRNA'lar, kromatin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlar dahil olmak üzere birden fazla düzeyde gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. Düzensizlikleri, çeşitli kanserlerin başlatılması ve ilerlemesinde rol oynamıştır ve bu da onları araştırma ve potansiyel terapötik müdahaleler için önemli hedefler haline getirmiştir. lncRNA'ların kanserdeki birincil işlevlerinden biri, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gen ifadesini modüle etme yetenekleridir. Örneğin, lncRNA'lar, kromatin değiştiren kompleksleri belirli genomik bölgelere çeken ve böylece yakındaki genlerin transkripsiyonel aktivitesini etkileyerek hareket edebilir [17] [18].

Ek olarak, lncRNA'lar tuzak görevi görebilir, transkripsiyon faktörlerini veya mikroRNA'ları bloke edebilir, bu da bunların bulunabilirliğini ve aktivitesini değiştirerek gen ifadesini daha da etkiler [19]. lncRNA UCA1'in miR-204 ile rekabet ederek kolorektal kanserde hücre çoğalmasını ve kemoterapiye direnci teşvik ettiği ve böylece onkojenik faktörlerin ifadesini artırdığı gösterilmiştir [20]. Benzer şekilde, lncRNA GAS5 lenfatik

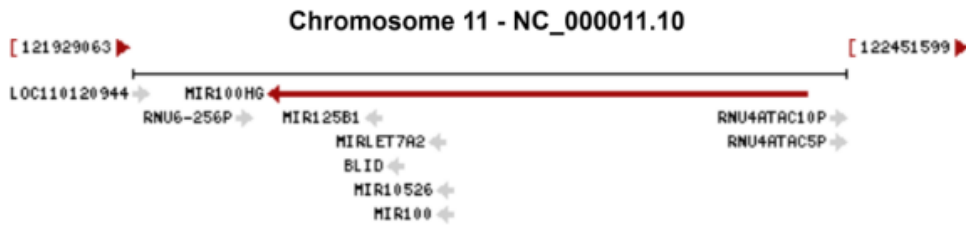
metastazda rol oynamıştır ve kolon kanserinin duyarlılığı ve ilerlemesi ile ilişkilidir [21]. Bu bulgular lncRNA'ların kanser teşhisi ve prognozu için biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır, çünkü ifade profilleri tümör gelişimini yönlendiren altta yatan moleküler mekanizmaları yansıtabilir. Dahası, lncRNA'lar kanser metastazında kritik bir süreç olan epitel-mezenkimal geçişte (EMT) yer alır. Örneğin, lncRNA ATB'nin bir tümör baskılayıcı gen olan E-kadherini baskıladığı ve böylece hepatosellüler karsinomun ilerlemesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir [22].

LncRNA'ların kanserdeki klinik önemi, hasta sonuçlarıyla olan ilişkileriyle daha da desteklenmektedir. Örneğin, lncRNA NEAT1'in yüksek ifade düzeyleri kolorektal kanser hastalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve bu da prognostik bir biyobelirteç olarak potansiyelini göstermektedir [23]. Bu ilişkiler, lncRNA'ların yalnızca kanser biyolojisinde işlevsel roller oynamadığını, aynı zamanda hastalık ilerlemesi ve tedavi yanıtının değerli göstergeleri olarak da hizmet ettiğini göstermektedir. Tümör oluşumundaki rollerine ek olarak, lncRNA'lar kanser metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynarlar. Önemli metabolik enzimlerin ve taşıyıcıların ifadesini düzenleyerek metabolik yolları etkileyebilirler. Örneğin, lncRNA MORT'un prostat karsinomunda glikoz alımını baskıladığı gösterilmiştir ve bu, lncRNA'lar ile kanser hücrelerindeki metabolik yeniden programlama arasındaki etkileşimi vurgulamaktadır [24]. Bu metabolik düzenleme, hızla çoğalan tümör hücrelerinin artan enerji taleplerini desteklemek için çok önemlidir. Kanserde lncRNA'ları hedeflemenin terapötik potansiyeli aktif araştırma alanıdır. Spesifik ifade kalıpları ve işlevsel rolleri göz önüne alındığında, lncRNA'lar kişiselleştirilmiş kanser tedavisi için yeni terapötik hedefler veya biyobelirteçler olarak hizmet edebilir. RNA interferansı, antisens oligonükleotidler ve lncRNA işlevini engelleyen küçük moleküller gibi stratejiler, lncRNA aktivitesini modüle etmek ve kanser ilerlemesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için araştırılmaktadır [25].

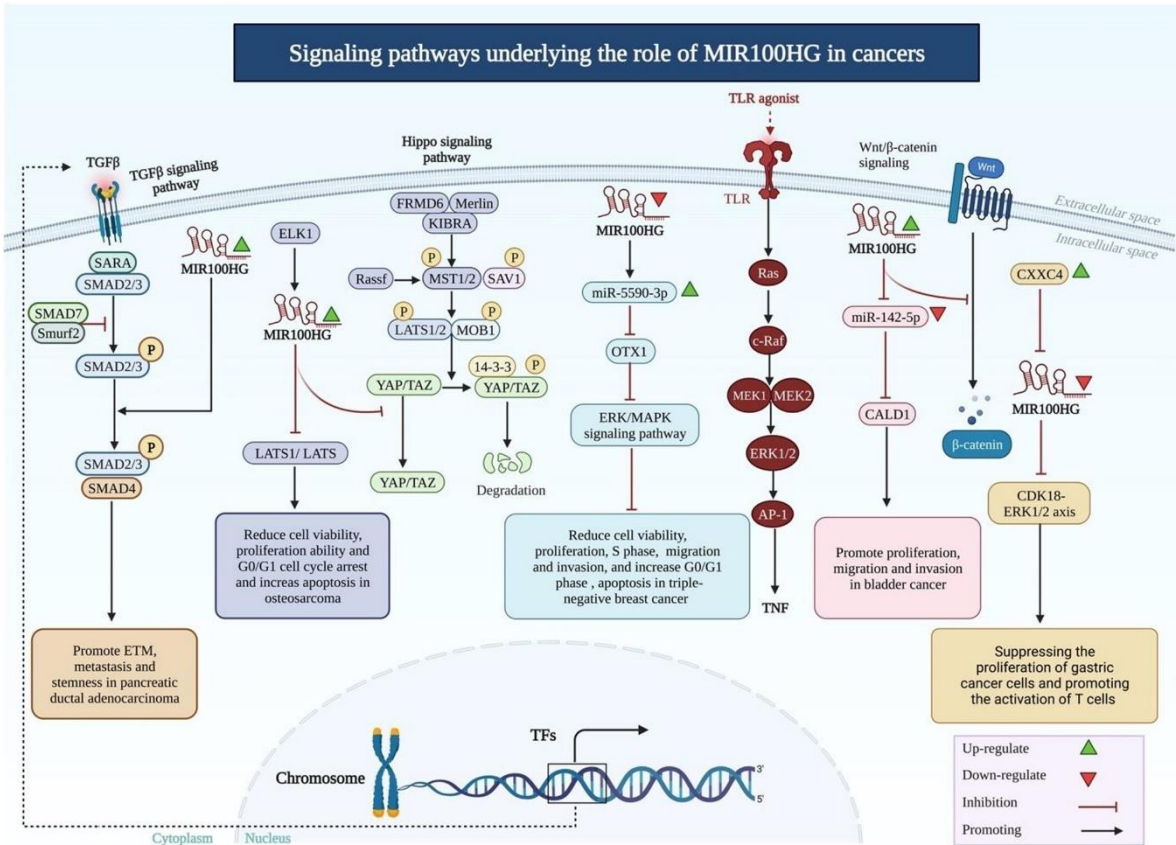
Sonuç olarak, lncRNA'lar kanser biyolojisi için önemli etkileri olan çeşitli ve dinamik bir düzenleyici molekül sınıfını temsil eder. Gen ifadesini modüle etme, hücresel süreçleri etkileme ve klinik sonuçlarla ilişki kurma yetenekleri, kanser mekanizmalarını anlama ve yeni terapötik stratejiler geliştirmedeki önemlerini vurgular. LncRNA'ların işlevsel rollerine yönelik devam eden araştırmalar, tümör oluşumuna katkılarını ve kanser tedavisi için hedef olarak potansiyellerini anlamamızı artıracaktır.

## 1.4 MIR100HG Geni ve Kanserlerdeki Rolü

Kromozom 11q24.1'de bulunan uzun kodlamayan bir RNA (lncRNA) olan MIR100HG, tümör oluşumu, metastaz ve ilaç direncindeki çok yönlü rolleri nedeniyle kanser araştırmalarında önemli ilgi görmüştür. Başlangıçta bir polisistronik miRNA konak geni olarak tanımlanan MIR100HG, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücrel süreçlerde kritik roller oynayan miR-100, let-7a-2 ve miR-125b-1 dahil olmak üzere 3 mikroRNA kodlar [26].



Şekil 1.1: 11. Kromozom üzerinde bulunan MIR100HG'nin genomik bağlamı (NCBI).



Şekil 1.2: MIR100HG'nin temel işlevlerinin şematik gösterimi [27].

MIR100HG'nin ekspresyonu, akut megakaryoblastik lösemi (AMKL), üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ve kolorektal kanser (CRC) dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde belirgin şekilde yukarı düzenlenir ve bu da onkojenik faktör olarak potansiyelini gösterir [28] [29] [30].

Çalışmalar MIR100HG'nin baskılanmasının AMKL hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini ve hücre sağkalımı ve çoğalmasındaki rolünü vurguladığını göstermiştir [31]. Akut megakaryoblastik lösemide, MIR100HG ekspresyonu önemli ölçüde yükselir ve baskılanması lösemik hücre büyümesini bozar, bu da terapötik müdahale için bir hedef olarak potansiyelini gösterir [32] [33].

TNBC'de MIR100HG, önemli onkogenlerin ve sinyal yollarının ekspresyonunu düzenleyerek hücre çoğalmasını ve göçünü teşvik eder. Örneğin, artan tümör agresifliği ile ilişkili olan OTX1'in yukarı regülasyonunda rol oynamıştır [34]. TNBC'de bu lncRNA'nın düzensizliği, MIR100HG'yi hedeflemenin tümör büyümesini ve metastazı engellemek için uygulanabilir bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmektedir [35] [36].

MIR100HG'nin tümör oluşumunu, göçü ve invazyonu aynı anda baskılarken EMT'yi teşvik etmedeki rolü çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır. Örneğin, Chen ve arkadaşları miR-100'ün meme epitel hücrelerinde EMT'yi indüklediğini göstererek, ifadesinin kanser hücrelerinin invaziv potansiyeliyle karmaşık bir şekilde bağlantılı olduğunu öne sürmüştür [37]. EMT'nin altında yatan mekanizmalar, TGF- $\beta$  ve Wnt sinyallemesi dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını içeren çok faktörlüdür. TGF- $\beta$  yolu, CRC dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde EMT'yi indüklemedeki rolü nedeniyle özellikle dikkat çekicidir. Örneğin, Yuan ve arkadaşları, TGF- $\beta$ 'nin Smad2/3, Wnt veya Src yollarını modüle eden 1 (CTHRC1) içeren kolajen üçlü sarmal tekrarını uyarabileceğini ve böylece EMT'yi güçlendirip kanser metastazını kolaylaştırabileceğini bildirmiştir [38].

MIR100HG, onkojenik özelliklerine ek olarak çeşitli kanserlerde ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, kolorektal kanserde setuksimab direnci bağlamında, MIR100HG, terapötik dirence katkıda bulunduğu bilinen Wnt/ $\beta$ -katenin sinyallemesinin modülasyonunda rol oynamıştır [39]. Bu, MIR100HG'nin ilaç yanıtını etkilediği mekanizmaların daha fazla araştırılması ihtiyacını vurgulamaktadır, çünkü bu lncRNA'yı hedeflemek mevcut tedavilerin etkinliğini artırabilir. MIR100HG'nin ifadesi farklı kanser

tiplerinde tekdüze değildir; tümör mikroçevresine ve spesifik maligniteye bağlı olarak değişen ifade seviyeleri sergiler. Örneğin, TNBC ve AMKL'de aşırı ifade edilirken, ifadesi diğer bağlamlarda aşağı düzenlenebilir ve bu da karmaşık bir düzenleyici durum olduğunu düşündürmektedir [40] [41] [42].

MIR100HG'nin etkilerini gösterdiği diğer bir mekanizma, genellikle rekabet eden bir endojen RNA (ceRNA) olarak işlevini içerir. miRNA'ları süngerleştirerek hedef mRNA'ların baskılanmasını hafifletebilir ve böylece onkojenik yolları teşvik edebilir. Örneğin, mide kanserinde, MIR100HG'nin hnRNPA2B1 proteini ile etkileşime girdiği, TCF7L2 mRNA'sını stabilize ettiği ve bağışıklık kaçış mekanizmalarını kolaylaştırdığı gösterilmiştir [43]. Bu ceRNA aktivitesi, tümör ilerlemesi için kritik olan gen ekspresyon ağlarını düzenlemede MIR100HG'nin önemini vurgular. Dahası, MIR100HG'nin düzensizliği çeşitli kanserlerde zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir. Örneğin mesane kanserinde, yüksek MIR100HG ekspresyon seviyeleri agresif tümör davranışı ve azalmış hasta sağkalımı ile ilişkilidir [44].

LncRNA'nın hem transkripsiyonel hem de transkripsiyonel sonrası mekanizmaları düzenleme yeteneği, kanser biyolojisinde düzenleyici bir molekül olarak çok yönlülüğünü vurgular. Onkojenik işlevlerine ek olarak, MIR100HG belirli bağlamlarda potansiyel tümör baskılayıcı rolleri için de incelenmiştir. MIR100HG de dahil olmak üzere lncRNA'ların ikili doğası, etkileri hücrel bağlama ve belirli miRNA ortaklarının varlığına bağlı olarak değişebildiğinden, bunların kesinlikle onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmasını karmaşıklaştırır [30]. Bu karmaşıklık, özellikle bu düzenleyici ağları kullanan hedefli tedavilerin geliştirilmesinde lncRNA biyolojisinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını gerektirir. Araştırma ayrıca kanser tedavisinde MIR100HG'yi hedeflemenin terapötik etkilerine odaklanmıştır. İlaç direncini aracılık etmedeki rolü göz önüne alındığında, MIR100HG'yi veya ilişkili miRNA'larını inhibe etmeyi amaçlayan stratejiler, kolorektal kanserde setuksimab gibi mevcut tedavilerin etkinliğini artırabilir [45] [46].

### **1.5 MIR100HG ve HCC**

MIR100HG, yaygın bir karaciğer kanseri türü olan hepatosellüler karsinomun (HCC) ilerlemesinde önemli bir gen olarak ortaya çıkmıştır. MIR100HG ekspresyonu, komşu tümör dışı dokulara kıyasla HCC dokularında belirgin şekilde yüksektir ve bu da bu malignitede onkogen olarak potansiyel rolünü göstermektedir [47] [48]. MIR100HG'nin genellikle HCC

dokularında yukarı düzenlendiğini ve bunun kötü prognoz ve ileri tümör evreleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Örneğin, çalışmalar yüksek MIR100HG ekspresyon seviyelerinin HCC hücrelerinde artan hücre çoğalması ve invazyon yetenekleriyle ilişkili olduğunu ve bunun bir onkogen olarak rolünü öne sürdüğünü göstermiştir [49].

MIR100HG'nin özellikle miR-146b-5p olmak üzere mikroRNA'larla etkileşimi yoluyla HCC ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. MIR100HG'nin aşağı regülasyonunun HCC hücre proliferasyonunu zayıflattığı ve apoptozu desteklediği gösterilmiştir ve bu da kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sürdürmede önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [47] [48].

LncRNA bunu tümör baskılayıcı miRNA'ları süngerleştirerek ve böylece onkojenik yollardaki inhibe edici etkilerini hafifleterek başarır. Özellikle, MIR100HG, aşağı düzenlendiğinde HCC hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını artıran iyi bilinen bir tümör baskılayıcı olan miR-34a'nın düzenlenmesinde rol oynar [50]. MIR100HG ve miRNA'lar arasındaki ilişki, HCC ilerlemesinde yer alan temel sinyal yollarının modülasyonuna kadar uzanır. Örneğin, MIR100HG ve miR-122 arasındaki etkileşim, miR-122'nin karaciğer metabolizmasında ve tümör baskılanmasında kritik bir rol oynadığı bilinen çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır [51].

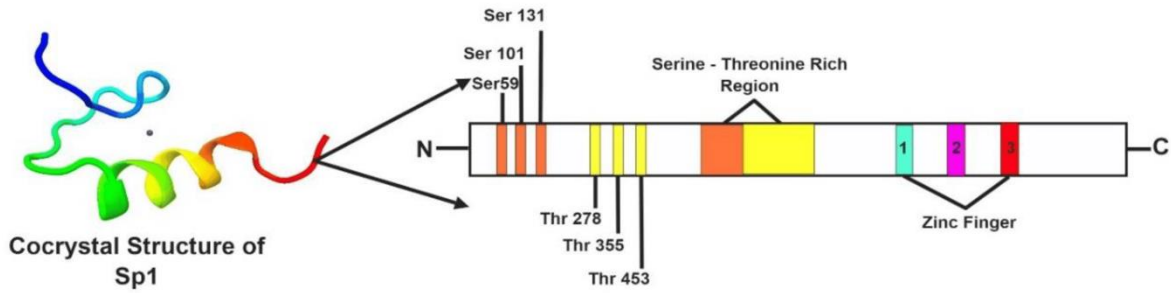
HCC'de miR-122'nin aşağı düzenlenmesi, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyen hedef genlerin yukarı düzenlenmesine izin vererek tümör gelişimini kolaylaştırır. Bu dinamik, HCC yönetiminde terapötik bir strateji olarak MIR100HG ve ilişkili miRNA'larını hedeflemenin potansiyelini göstermektedir. MIR100HG'nin HCC'deki rolü, miRNA'larla etkileşimleriyle sınırlı değildir; ayrıca çeşitli onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların ifadesini de etkiler. Örneğin, çalışmalar MIR100HG'nin, HCC hücre saldırganlığını teşvik etmede rol oynayan FGF16 ifadesini modüle edebileceğini göstermiştir [49].

Sonuç olarak, MIR100HG, kanser biyolojisi alanında kritik bir genidir ve birden fazla malignitede onkogen olarak işlev görür. Hücre çoğalmasını, göçünü ve ilaç direncini teşvik etmedeki rolleri ve prognostik bir biyobelirteç olarak potansiyeli, onu gelecekteki araştırmalar için odak noktası haline getirir. MIR100HG ve ilişkili miRNA'larını içeren karmaşık düzenleyici ağları anlamak, çeşitli kanserlerde hasta sonuçlarını iyileştirmeyi

amaçlayan yeni tedavi stratejilerinin önünü açabilir. MIR100HG, hepatosellüler karsinom bağlamında kritik bir lncRNA'dır ve proliferasyon, invazyon ve ilaç direnci dahil olmak üzere tümör biyolojisinin çeşitli yönlerini etkiler. HCC dokularındaki yüksek ifadesi ve zayıf prognozla ilişkisi, terapötik bir hedef ve prognostik biyobelirteç olarak potansiyelini vurgular.

### 1.6 SP1 Transkripsiyon Faktörü

Spesifiklik Proteini 1 olarak bilinen SP1 transkripsiyon faktörü, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan gen ifadesinin kritik bir düzenleyicisidir. SP1, hedef genlerin promotor bölgelerindeki GC açısından zengin motiflere bağlanma ve böylece bunların transkripsiyonel aktivitesini etkileme yeteneği ile karakterize edilir. Bu transkripsiyon faktörü insan dokularında yaygın olarak ifade edilir ve akciğer, meme, mide ve pankreas kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda kanserin patogeneğinde önemli bir rol oynar [52] [53] [54] [55].



Şekil 1.3: SP1'in yapısı [54].

Araştırmalar, SP1'in çeşitli malignitelerde genellikle aşırı ifade edildiğini ve tümör ilerlemesi ve kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Örneğin, SP1'in yüksek seviyeleri, vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ifadesini düzenlediği mide kanserinde artan anjiyogenez, invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir [55] [56]. Gliomada SP1'in aşırı ekspresyonu, tümör hücresi istilasını kolaylaştıran gelişmiş matris metalloproteinaz (MMP) aktivitesiyle de ilişkilendirilmiştir [57] [58]. Çalışmalar SP1'in pankreas kanseri hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi (EMT) desteklemek için TGF- $\beta$  sinyal yolu gibi diğer onkogenik yollarla etkileşime girebileceğini ve böylece göç kabiliyetlerini artırabileceğini göstermektedir [59] [60].

SP1'in kanser ilerlemesine katkıda bulunduğu önemli mekanizmalardan biri, epitelden mezenkimalle geçiş (EMT) ile ilişkili genlerin düzenlenmesidir. Örneğin, akciğer kanserinde SP1'in vimentin ve diğer EMT belirteçlerinin ifadesini artırarak hücre göçünü ve invazyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir [60]. Bu geçiş kanser metastazı için çok önemlidir, çünkü epitel hücrelerinin mezenkimal özellikler edinmesine izin vererek birincil tümörden ayrılmalarını ve ardından çevre dokulara yayılmalarını kolaylaştırır [61]. SP1'in NF- $\kappa$ B ve HIF-1 $\alpha$  gibi diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi, agresif kanser fenotiplerini teşvik etmedeki rolünü daha da güçlendirir [62] [63].

SP1'in kanserdeki rolü çok yönlüdür, çünkü yalnızca onkogenlerin ekspresyonunu düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu da modüle eder. Örneğin, SP1'in normalde kanser ilerlemesini engelleyen belirli mikroRNA'ların ekspresyonunu baskıladığı ve böylece tümör büyümesini ve metastazı kolaylaştırdığı gösterilmiştir [64].

Ek olarak, SP1'in çeşitli yardımcı faktörler ve c-Myc ve E1AF gibi diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi, düzenleyici ağını daha da karmaşık hale getirerek kanser hücrelerinin transkripsiyonel durumunu etkiler [65] [66].

Akciğer kanserinde, SP1, CD44 ve çeşitli matris metalloproteinazlar dahil olmak üzere hücre sağkalımı ve çoğalmasıyla ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol oynamıştır [67] [68]. Transkripsiyon faktörünün aktivitesi, transkripsiyonel yeteneklerini artırabilen veya engelleyebilen fosforilasyon ve asetilasyon dahil olmak üzere translasyon sonrası modifikasyonlar tarafından modüle edilir [69] [70].

SP1'in epigenetik düzenlenmesi de kanser biyolojisinde kritik bir faktördür. SP1 hedef genlerinin promotör bölgelerindeki CpG bölgelerinin metilasyonu, bağlanma ve transkripsiyonel aktivitesini inhibe edebilir ve tümör oluşumunu destekleyen değişmiş gen ifadesi profillerine yol açabilir [71].

SP1'in kanserdeki rolü, mikroRNA'larla geri bildirim döngülerindeki katılımıyla daha da karmaşık hale gelir. Örneğin, SP1, sırayla kendi ifadesini modüle eden belirli mikroRNA'ların ifadesini düzenleyerek, tümör büyümesini teşvik edebilen veya engelleyebilen bir düzenleyici ağ oluşturabilir [72]. Bu etkileşim, SP1'in kanserdeki işlevinin

karmaşıklığını vurgular ve terapötik stratejilerde SP1'i ve düzenleyici ağlarını hedefleme potansiyelini vurgular. Terapötik olarak, SP1 kanser tedavisi için umut verici bir hedef olarak ortaya çıkmıştır. Mitramisin A gibi inhibitörlerin SP1 aktivitesini etkili bir şekilde azalttığı, klinik öncesi modellerde tümör büyümesinin azalmasına ve kemoterapiye karşı duyarlılığın artmasına yol açtığı gösterilmiştir [73]. Bu yaklaşım, SP1'in pankreas ve yumurtalık kanserleri gibi agresif fenotipleri yönlendirdiği bilinen kanserlerde özellikle önemlidir [74].

SP1 transkripsiyon faktörü, tümör oluşumuna ve metastaza katkıda bulunan çok çeşitli süreçleri etkileyen kanser biyolojisinde önemli bir gendir. Diğer proteinler ve sinyal yollarıyla karmaşık etkileşimler yoluyla gen ifadesini düzenleme yeteneği, çeşitli malignitelere hem bir biyobelirteç hem de terapötik bir hedef olarak önemini vurgular. SP1'in aktivitesini ve tümör mikroçevresindeki etkileşimlerini yöneten mekanizmalar üzerine devam eden araştırmalar, işlevini düzenlemeyi amaçlayan etkili kanser tedavileri geliştirmek için oldukça önemlidir.

### **1.7 SP1 Transkripsiyon Faktörü ve Hepatosellüler Kanser (HCC)**

SP1 transkripsiyon faktörü, en yaygın birincil karaciğer kanseri türü olan hepatosellüler karsinomun (HCC) gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. SP1, çeşitli genlerin promotörlerindeki GC açısından zengin motiflere bağlanma ve böylece ifadelerini düzenleme yeteneği ile bilinir. HCC bağlamında, SP1 genellikle aşırı ifade edilir ve bu, agresif tümör davranışı ve zayıf hasta prognozu ile ilişkilendirilmiştir [75] [76].

SP1'in HCC'yi etkilediği kritik mekanizmalardan biri, hücre çoğalması ve sağ kalımında rol oynayan genlerin düzenlenmesidir. Örneğin, çalışmalar SP1'in anjiyogenez için çok önemli olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere çeşitli onkogenlerin ve büyüme faktörlerinin ifadesini artırabildiğini göstermiştir [77]. SP1 tarafından VEGF'nin yukarı düzenlenmesi, yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik ederek tümör büyümesini kolaylaştırır ve böylece tümöre gerekli besinleri ve oksijeni sağlar [75] [76].

SP1'in, hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan ve tümör invazyonunu ve metastazını teşvik eden enzimler olan matris metalloproteinazların (MMP'ler) düzenlenmesinde rol oynar [78].

SP1, HCC ilerlemesi için gerekli olan çeşitli sinyal yollarıyla etkileşime girer. Örneğin, hepatit B virüsü X proteininin SP1 aktivitesini artırabileceği ve bunun da hepatoma hücrelerini bağışıklık saldırılarından koruyan genlerin ekspresyonunun artmasına yol açabileceği gösterilmiştir [79]. Bu etkileşim, viral faktörlerin tümör gelişimini desteklemek için konak transkripsiyonel programlarını düzenlemedeki rolünü vurgular. SP1'in PI3K/Akt sinyal yolundaki katılımı, HCC'de tümör oluşumuna ve kemoterapiye dirence katkıda bulunduğu bir mekanizma olarak tanımlanmıştır [80].

Son araştırmalar, SP1'in HCC'de kritik roller oynayan spesifik lncRNA'ların ifadesini modüle edebileceğini göstermiştir. Örneğin, lncRNA CRNDE'nin SP1 tarafından düzenlendiği ve PDK1 sinyal yolunun modülasyonu yoluyla HCC'nin ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [81]. Bu etkileşim, SP1'in lncRNA ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak nasıl davrandığını ve bunun da HCC'deki önemli onkojenik yolları nasıl etkilediğini göstermektedir. Dahası, onkojenik özellikleriyle bilinen lncRNA HULC de SP1 tarafından düzenlenir ve bu da SP1'in etkisinin HCC'de yer alan birden fazla lncRNA'ya kadar uzandığını göstermektedir [82].

Rekabet eden endojen RNA (ceRNA) hipotezi, HCC'deki SP1-lncRNA etkileşimlerinin işlevsel çıkarımlarını daha da açıklığa kavuşturmaktadır. lncRNA'lar, mikroRNA'lar (miRNA'lar) için sünger görevi görerek hedef mRNA'ların ekspresyonunu düzenleyebilir. Örneğin, lncRNA UCA1, HCC hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü etkileyen miRNA-124'ün düzenlenmesinde rol oynamaktadır [83]. Bu ceRNA ağı, SP1 aracılı lncRNA ekspresyonunun dolaylı olarak miRNA'ların ve hedef mRNA'larının bulunabilirliğini etkileyebileceği ve dolayısıyla tümör davranışını etkileyebileceği karmaşık düzenleyici mekanizmaları vurgulamaktadır. Ek olarak, MALAT1 ve NEAT1 gibi lncRNA'lar, ifadeleri SP1 tarafından düzenlenerek HCC ilerlemesinde önemli oyuncular olarak tanımlanmıştır. MALAT1'in HCC hücrelerinin invaziv yeteneklerini artırdığı gösterilirken, NEAT1 hipoksik bir mikroçevrede hücre büyümesini sürdürmede rol oynar [84] [85]. Bu lncRNA'ların SP1 tarafından düzenlenmesi, yalnızca transkripsiyon faktörünün HCC'deki rolünü vurgulamakla kalmaz, aynı zamanda tümör büyümesini ve metastazı engellemek için kullanılabilir potansiyel terapötik hedeflere de işaret eder. SP1 ve lncRNA'lar arasındaki etkileşim, HCC gelişimi için kritik olan sinyal yollarının modülasyonuna da uzanır. Örneğin, lncRNA DGCR5'in Wnt sinyal yolunu inaktive ederek HCC ilerlemesini baskıladığı bildirilmiştir ve SP1 bu lncRNA'nın temel düzenleyicisidir [86]. Bu bulgu, HCC'de

onkojenik sinyal yollarını bozmak için SP1-lncRNA etkileşimlerini hedeflemenin potansiyelini vurgular [87].

SP1'in HCC'deki ekspresyonu, aktivitesini teşvik edebilen veya inhibe edebilen mikroRNA'lar tarafından da düzenlenir. Örneğin, miR-138'in SP1'i hedef alarak HCC hücrelerinin çoğalmasını ve istila etmesini azalttığı gösterilmiştir [88]. Benzer şekilde, miR-363-3p, HCC'de SP1'in negatif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır ve bu düzenleyici ağların dengesinin normal hücresel işlevleri sürdürmek ve tümör oluşumunu önlemek için çok önemli olduğunu göstermektedir [89]. SP1, tümör büyümesini ve istilasını teşvik etmedeki rolüne ek olarak, HCC'de kanser kök hücre özelliklerinin düzenlenmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Araştırmalar, SP1'in HCC hücrelerinin kök hücreliğini sürdürmede rol oynadığını göstermektedir; bu, geleneksel tedavilere karşı artan direnç ve daha yüksek tekrarlama olasılığı ile ilişkilidir [90]. Bu ilişki, HCC için etkili terapötik stratejiler geliştirmede SP1 ve onun alt yollarını hedeflemenin önemini vurgular. Terapötik olarak, SP1'i hedeflemek HCC tedavisi için ümit verici bir yaklaşım sunar. SP1 inhibitörlerinin tümör büyümesini azaltma ve mevcut terapilerin etkinliğini artırma potansiyeli gösterilmiştir. Örneğin, kuersetin'in SP1 aktivitesini baskıladığı ve HCC hücrelerinin çoğalmasının azalmasına yol açtığı gösterilmiştir [91]. SP1 inhibitörlerinin geliştirilmesi, özellikle ileri hastalığı olan HCC'li hastalarda tedavi sonuçlarını iyileştirmek için yeni bir yol sağlayabilir. SP1 transkripsiyon faktörünün hepatosellüler karsinomun patogeneğinde önemli bir rolü vardır. Aşırı ekspresyonu, gelişmiş tümör büyümesi, invazyon ve tedaviye direnç ile ilişkilidir. SP1'i içeren karmaşık düzenleyici ağları, mikroRNA'lar ve sinyal yollarıyla etkileşimlerini anlamak, HCC ile etkili bir şekilde mücadele edebilen hedefli terapiler geliştirmek için önemlidir.

## **1.8 Hipoksi**

Azalmış oksijen bulunabilirliği ile karakterize bir durum olan hipoksi, kanser ilerlemesinde ve metastazında önemli bir rol oynar. Hipoksik tümör mikroçevresi (TME), birçok katı tümörün ortak bir özelliğidir ve tümör malignitesine katkıda bulunan çeşitli hücresel süreçleri etkiler. Bu mikroçevre yalnızca pasif bir zemin değildir, aynı zamanda büyüme, invazyon ve tedavilere direnç dahil olmak üzere tümör davranışını aktif olarak şekillendirir. Hipoksi ve kanser hücreleri arasındaki etkileşim karmaşıktır ve tümörün hayatta kalmasını ve ilerlemesini kolaylaştıran çok sayıda sinyal yolu ve hücresel adaptasyonu içerir. Hipoksinin kanseri etkilediği birincil mekanizmalardan biri, özellikle HIF-1 $\alpha$  olmak üzere

hipoksiye bağlı faktörlerin (HIF'ler) aktivasyonudur. Bu transkripsiyon faktörü düşük oksijen koşulları altında stabilize edilir ve anjiyogenez, metabolizma ve hücre hayatta kalmasında yer alan genlerin ifadesini düzenler [92] [93]. Örneğin, HIF-1 $\alpha$ , anjiyogenez için çok önemli olan vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunu teşvik ederek tümörün kan tedarikini artırır ve hipoksik koşullarda büyümesini kolaylaştırır [94].

HIF-1 $\alpha$  ayrıca metabolik yolları düzenleyerek, oksijen varlığında bile kanser hücrelerini glikolize doğru kaydırır; bu fenomene *Warburg etkisi* denir [95] [96]. Bu metabolik yeniden programlama yalnızca hızlı tümör büyümesini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere geleneksel tedavilere karşı direnç gelişimine de katkıda bulunur [96].

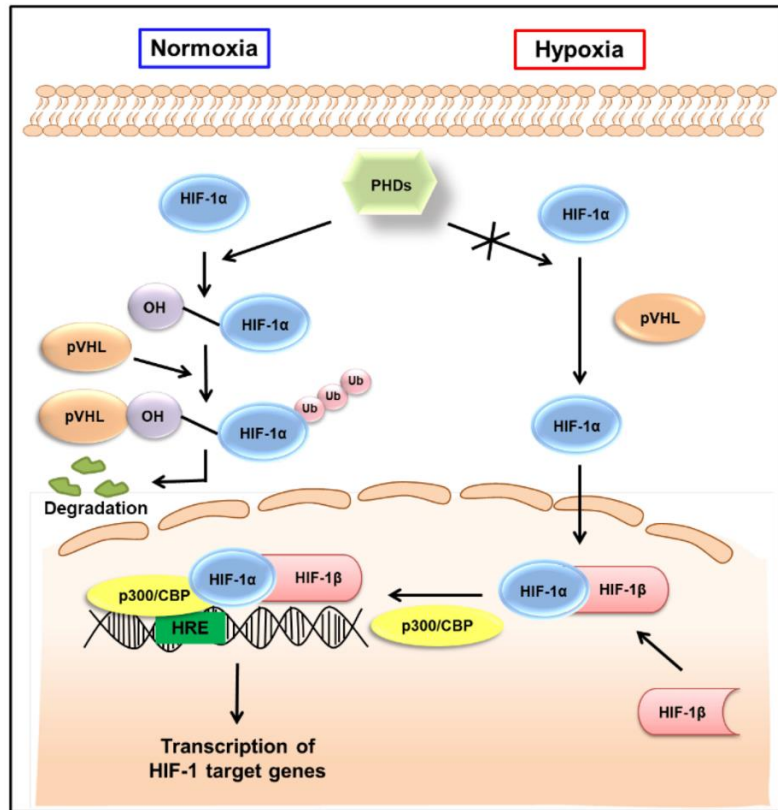
Hipoksik TME ayrıca, tümörler içinde kendi kendini yenileme yeteneğine sahip ve sıklıkla metastaz ve tekrarlama ile ilişkili olan bir hücre alt popülasyonu olan kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) ortaya çıkmasını da teşvik eder [97]. Hipoksinin, CSC özelliklerini destekleyen spesifik sinyal yollarını aktive ederek meme ve kolorektal kanserler de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinin kök hücre özelliklerini artırdığı gösterilmiştir [97] [98]. Örneğin, meme kanserinde hipoksi kaynaklı sinyalleme, kök hücre belirteçlerinin yukarı regülasyonuna yol açabilir ve bu hücrelerin invaziv potansiyelini artırabilir [99]. Bu fenomen, etkili kanser tedavilerinin geliştirilmesinde hipoksik koşulları hedeflemenin önemini vurgular. Tümör büyümesini ve kök hücreliğini desteklemeye ek olarak, hipoksik mikroçevre tümörlerin bağışıklık ortamını önemli ölçüde etkiler. Hipoksinin, tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştıran immünoşüpresif koşulları artırdığı bilinmektedir [100] [101]. Örneğin, hipoksik tümör hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücrelerin ve T lenfositlerin işlevini inhibe eden faktörler salgılayabilir ve böylece tümör karşıtı bağışıklık tepkisini azaltabilir [102].

Hipoksi, tümörlerin bağışıklık tarafından kaçmasına daha fazla katkıda bulunan miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) gibi immünoşüpresif hücrelerin toplanmasını artırabilir [103] [104]. Bu immünoşüpresif mikroçevre, yalnızca immünoterapilerin etkinliğini karmaşıklaştırmakla kalmaz, aynı zamanda hipoksik tümörlerin tedavisinde önemli zorluklar da oluşturur. Hipoksinin kanser ilerlemesindeki rolü, hücre dışı matris (ECM) ve tümör-stromal etkileşimler üzerindeki etkisine de yansır. Hipoksi, ECM'nin bileşimini ve mekanik özelliklerini değiştirerek tümör

büyümesi ve metastaz için destekleyici bir niş oluşturabilir [98] [105]. Örneğin, hipoksik koşullar, ECM'yi yeniden şekillendirerek tümör invazyonunu kolaylaştıran matris metalloproteinazların (MMP'ler) ekspresyonunu artırabilir [106].

HCC'de hipoksi kaynaklı etkileri aracılık eden uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) rolü dikkat çekmiştir. LncRNA'lar, gen ifadesinin düzenlenmesi, sinyal yollarının modülasyonu ve hipoksik koşullar altında EMT ve metastazın teşviki dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde rol oynamıştır [107] [108]. Örneğin, lncRNA NEAT1'in miR-199a-3p/UCK2 eksenini düzenleyerek HCC büyümesini sürdürdüğü ve hipoksik TME'de çalışan karmaşık düzenleyici ağları vurguladığı gösterilmiştir [109].

Hipoksik tümör mikroçevresi, tümör büyümesini, metastazı ve tedavi direncini etkileyen kanser biyolojisinin kritik bir belirleyicisidir. Hipoksinin kanser ilerlemesindeki çok yönlü rollerini anlamak, tümör biyolojisinin bu zorlu yönünü etkili bir şekilde hedefleyebilen yenilikçi terapötik stratejiler geliştirmek için önemlidir. Gelecekteki araştırmalar, hipoksik TME içindeki karmaşık etkileşimleri aydınlatmaya ve bu koşulları terapötik fayda için manipüle etmeye yönelik yeni yaklaşımları keşfetmeye devam etmelidir.



**Şekil 1.4:** Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  aktivitesinin düzenlenmesi [110].

## 2. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI VE KAPSAMI

LncRNA'lar son yıllarda, özellikle kanser biyolojisinde olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerdeki önemli rolleri nedeniyle ilgi görmüştür. LncRNA'ların düzensizlikleri, çeşitli kanserlerin başlatılması ve ilerlemesinde rol oynamıştır ve bu da onları araştırma ve potansiyel terapötik müdahaleler için önemli hedefler haline getirmiştir. LncRNA'ların kanserdeki birincil işlevlerinden biri, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gen ifadesini modüle etme yetenekleridir. MIR100HG, şimdiye kadar yapılan araştırmalarda farklı kanser türlerinde incelenmiş ve tümör oluşumunda promotörünün rolü , ekspresyon analizleri ve biyoinformatik çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak hepatosellüler kanserle ilgili mevcut literatür oldukça sınırlıdır. Bu tez kapsamında, son dönemde önemli bir lncRNA olan MIR100HG'nin hepatosellüler kanserde SP1 transkripsiyon faktörü ile regülasyonun araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar üç genel basamak altında toplanabilir. Bu basamakları özetleyen akış diyagramı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

**Birinci basamakta,** Hep3B hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullar altında MIR100HG geninin aşırı ifadesi ve kalıcı susturulması ile moleküler ve hücresel analizi gerçekleştirilmiştir.

- ▶ Öncelikle MIR100HG aşırı ifadesi için MIR100HG-pcDNA3.1 plazmiti transfekte edilmiştir.
- ▶ Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda aşırı ifade mRNA seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin etkilerini tespit etmek için hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre proliferasyonuna etkisi için MTT, göç etme yeteneğini tespit etmek için çizik testi, koloni oluşturma kapasitesini belirlemek için koloni formasyon ve migrasyon-invazyon tespiti için matrijel deneyleri yapılmıştır.
- ▶ Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda MIR100HG geni Hep3B hücrelerinde kalıcı olarak susturulmuştur ve mRNA seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hep3B hücrelerinde MIR100HG susturulmasının etkilerini tespit etmek için hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre proliferasyonuna etkisi için MTT, göç etme yeteneğini tespit etmek için çizik testi, koloni oluşturma kapasitesini belirlemek

için koloni formasyon ve migrasyon-invazyon tespiti için matrijel deneyleri yapılmıştır.

- ▶ Flow sitometre deneylerinde susturulmuş hücrelerde apoptoz gösterilmesi için Annexin V deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde ana modelimiz Hep3B yanında, sağlıklı karaciğer epitel modeli Clone-9 ve mezenşimal benzeri karaciğer kanser modeli SNU-398 de gerçekleştirilmiştir.

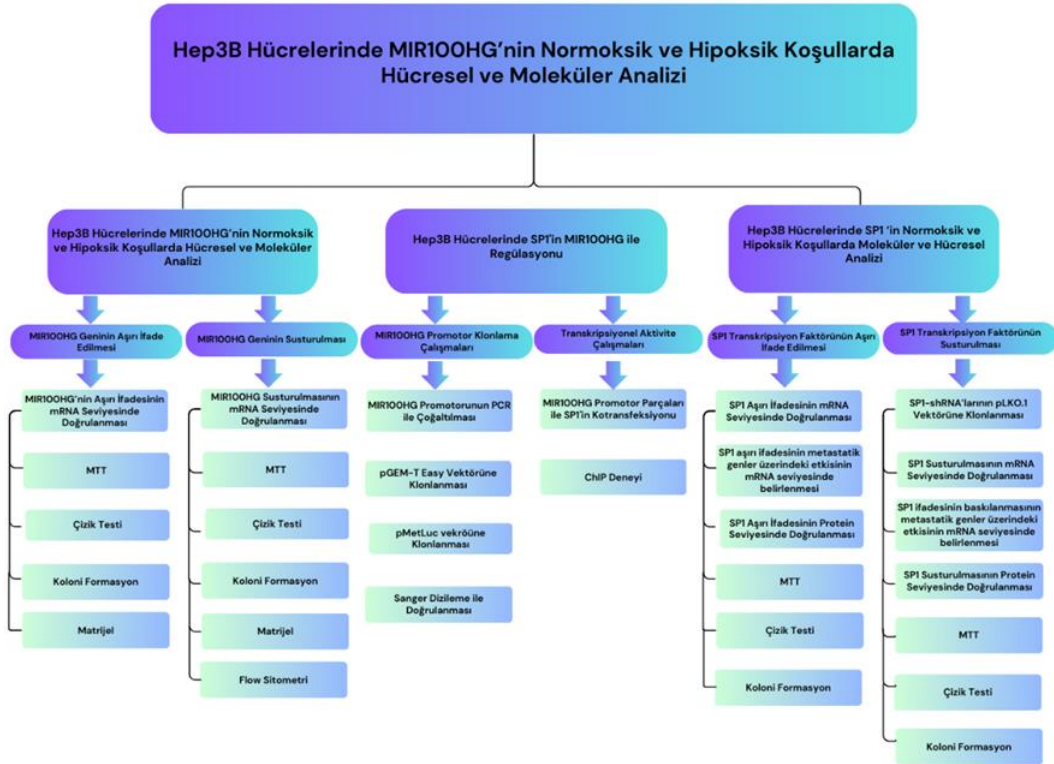
**İkinci basamakta,** MIR100HG geninin promotor parçalarının pMetLuc vektörüne klonlanması ve SP1 transkripsiyon faktörü ile Hep3B hücrelerine transfekte edilerek transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

- ▶ MIR100HG promotor parçaları PCR ile çoğaltılmıştır ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır.
- ▶ pGEM-T Easy vektörüne klonlu promotor parçaları pMetLuc vektörüne alt klonlanmıştır.
- ▶ pMetLuc vektörüne klonlanan MIR100HG promotor parçaları ile ekspresyon vektörüne klonlu olan SP1 transkripsiyon faktörü Hep3B hücrelerine kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yöntemi ile transfekte edilmiştir ve lusiferaz aktiveleri ölçülmüştür.
- ▶ SP1 Transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotoruna bağlandığını doğrulamak CHIP deneyi yapılmıştır.

**Üçüncü basamakta,** Hep3B hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullar altında SP1 transkripsiyon faktörünün aşırı ifadesi ve kalıcı susturulması ile moleküler ve hücrel analizi gerçekleştirilmiştir.

- ▶ Öncelikle SP1 aşırı ifadesi için SP1 ekspresyon plazmiti transfekte edilmiştir.
- ▶ Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda aşırı ifade mRNA seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifadesi protein seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifade edildiğinde metastatik genlerinde mRNA seviyesinde etkilerini belirlemek için e-kaderin ve vimentin seviyeleri tespit edilmiştir.

- ▶ Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifadesinin etkilerini tespit etmek için hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre proliferasyonuna etkisi için MTT, göç etme yeteneğini tespit etmek için çizik testi, koloni oluşturma kapasitesini belirlemek için koloni formasyon deneyleri yapılmıştır.
- ▶ SP1 transkripsiyon faktörünün susturma çalışmaları için öncelikle SP1 shRNA'larının pLKO.1 vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir.
- ▶ Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün kalıcı olarak susturulması hem normoksik hem de mRNA seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinde SP1 susturulması protein seviyesinde doğrulanmıştır.
- ▶ Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesi kalıcı olarak baskılandığında metastatik genlerde mRNA seviyesinde etkilerini belirlemek için e-kaderin ve vimentin seviyeleri tespit edilmiştir.
- ▶ Hep3B hücrelerinde SP1 susturulmasının etkilerini tespit etmek için hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre proliferasyonuna etkisi için MTT, göç etme yeteneğini tespit etmek için çizik testi, koloni oluşturma kapasitesini belirlemek için koloni formasyon deneyleri yapılmıştır.



Şekil 2.1: Tez iş akış diyagramı.

### 3. MATERYAL-YÖNTEM

#### 3.1 Materyaller

##### 3.1.1 Kullanılan Materyaller

**Tablo 3.1:** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.

<b>Kullanılan Madde</b>	<b>Tedarik Edilen Firma</b>
<b>Fetal Bovine Serum</b>	Gibco
<b>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</b>	EuroClone
<b>RPMI 1640 Medium</b>	EuroClone
<b>PBS (Phosphate Buffer Saline)</b>	VWE Life Science
<b>Penisilin-Streptomisin Solüsyon</b>	HyQ
<b>Antibiyotik-Antimiyotik Solüsyon</b>	Gibco
<b>Puromycin</b>	Sigma Aldrich
<b>Protamine Sülfat</b>	Sigma Aldrich
<b>Tripan Mavisi</b>	Sigma Aldrich
<b>Tris Base</b>	Sigma Aldrich
<b>CaCl<sub>2</sub> (Kalsiyum Klorür)</b>	Sigma Aldrich
<b>DMSO (Dimetil Sülfoksit)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Turbofect™ Transfection Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>0.22 µm, 0.45 µm Filtre</b>	Sartorius
<b>15 mL ve 50 mL Santrifüj Tüpü</b>	IsoLab
<b>100 mm'lik Kültür Petrisi</b>	EuroClone
<b>6, 12, 24, 48 ve 96 Kuyulu Hücre Plakası</b>	Jetbiofil
<b>1,5 mL/2 mL Ependorf</b>	IsoLab
<b>Tripsin EDTA</b>	Sigma Aldrich
<b>Serolojik Pipet</b>	Sarstedt
<b>Pastör Pipeti</b>	IsoLab
<b>Kristal Viyole</b>	Carlo Erba
<b>CoCl<sub>2</sub> (Kobalt Klorür)</b>	Fluka
<b>HEPES</b>	Sigma Aldrich
<b>Matrijel</b>	Geltrex
<b>SEAP ve Lusiferaz Substratları</b>	Takara Clontech

**Tablo 3.2:** RNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.

<b>Kullanılan Madde</b>	<b>Tedarik Edilen Firma</b>
<b>innuPREP RNA Mini Kit 2.0</b>	Anlytik-jena
<b>DEPC (Diethylpyrocarbonate)</b>	Sigma Aldrich
<b>Formaldehit (%99)</b>	Sigma Aldrich
<b>Formaldehit (%37)</b>	Fluka
<b>Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)</b>	Sigma Aldrich
<b>Real-Q Plus 2X Master Mix</b>	Ampliqon
<b>96 Kuyucuklu Plaka Seal</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Reverse Transkriptaz (RevertAid)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Ribolock İnhibitörü</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>5X Reaksiyon Tamponu</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>OligodT</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Deoksinükleotid (dNTPmix) Karışımı</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>2X RNA Yükleme Boyası</b>	Thermo Fisher Scientific

**Tablo 3.3:** DNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.

<b>Kullanılan Madde</b>	<b>Tedarik Edilen Firma</b>
<b>Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/mL)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>10X Taq DNA Polimeraz Tamponu</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Agaroz</b>	Sigma Aldrich
<b>Etidyum Bromür (Et-Br)</b>	Sigma Aldrich
<b>1 kb DNA Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>6X Yükleme Boyası</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Tris Base, Borik Asit, EDTA</b>	Sigma Aldrich
<b>NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit</b>	Macharey-Nagel
<b>NucleoBond Xtra Midi Plus Kit</b>	Macharey-Nagel
<b>Jelden Geri Kazanım Kiti</b>	Thermo Scientific

**Tablo 3.4:** Protein tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.

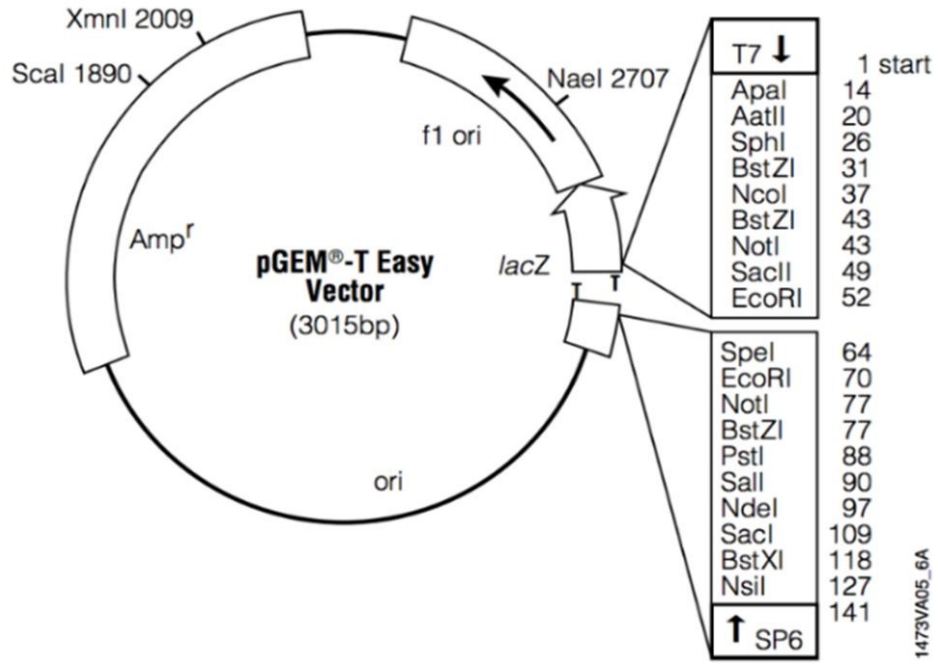
<b>Kullanılan Madde</b>	<b>Tedarik Edilen Firma</b>
<b>Tris, Borik Asit, EDTA</b>	Sigma Aldrich
<b>Amonyum Persülfat</b>	Merck
<b>Tetrametiletildiamin (TEMED)</b>	Sigma Aldrich
<b>Beta-Actin Mouse mAb</b>	Santa Cruz
<b>m-IgGk BP-HRP (Sekonder Antikor)</b>	Santa Cruz
<b>Coomassie Brillant Blue G-250</b>	Sigma Aldrich
<b>Proteaz İnhibitör Tabletleri</b>	Roche
<b>Akrilamid/Bisakrilamid (%40)</b>	Merck
<b>APS (Amonyum Persülfat)</b>	Merck
<b>4X Laemli Örnek Tamponu</b>	BoRad
<b>EDTA, SDS, Glisin, Nacl</b>	Sigma Aldrich
<b>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>PVDF Membranı</b>	Millipore
<b>Pierce™ ECL</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Hif-1a Mouse Monoklonal Antikor</b>	Biointech
<b>Etanol</b>	Merck
<b>Metanol</b>	Merck
<b>Yağsız Süt Tozu</b>	Santa Cruz
<b>Tween-20</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>İzopropanol</b>	Merck

### 3.1.2 Kullanılan Cihazlar

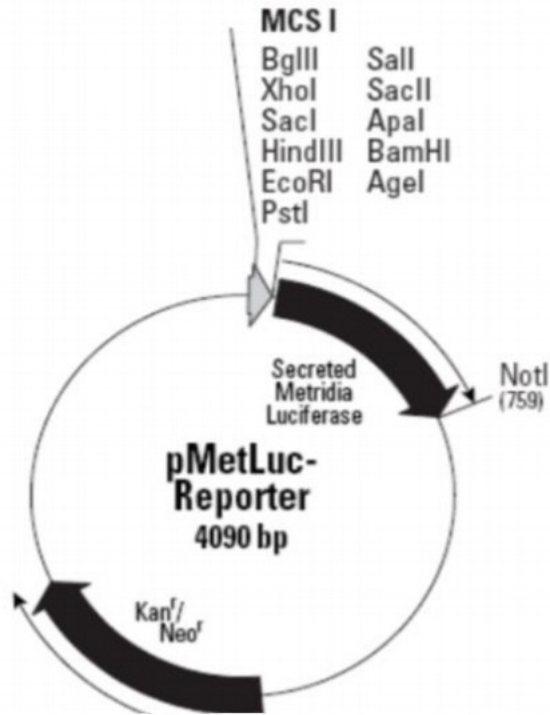
**Tablo 3.5:** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve üretici firmaları.

<b>Kullanılan Cihaz</b>	<b>Üretici Firma</b>
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya
CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör	Bioair
İnverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80 °C Buzdolabı	Nikon / Japonya
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Vorteks	Velp Scientifica / İtalya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica / İtalya
Hassas Terazi	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
UV Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS Page Aparatları	BioRad
Tank- Blot Sistemi	BioRad
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific / ABD
Luminometre (Luminoskan TM Microplate)	Thermo Scientific / ABD
Spektrofotometre	Multiskango
µDrop™ Plate	Thermo Scientific / ABD

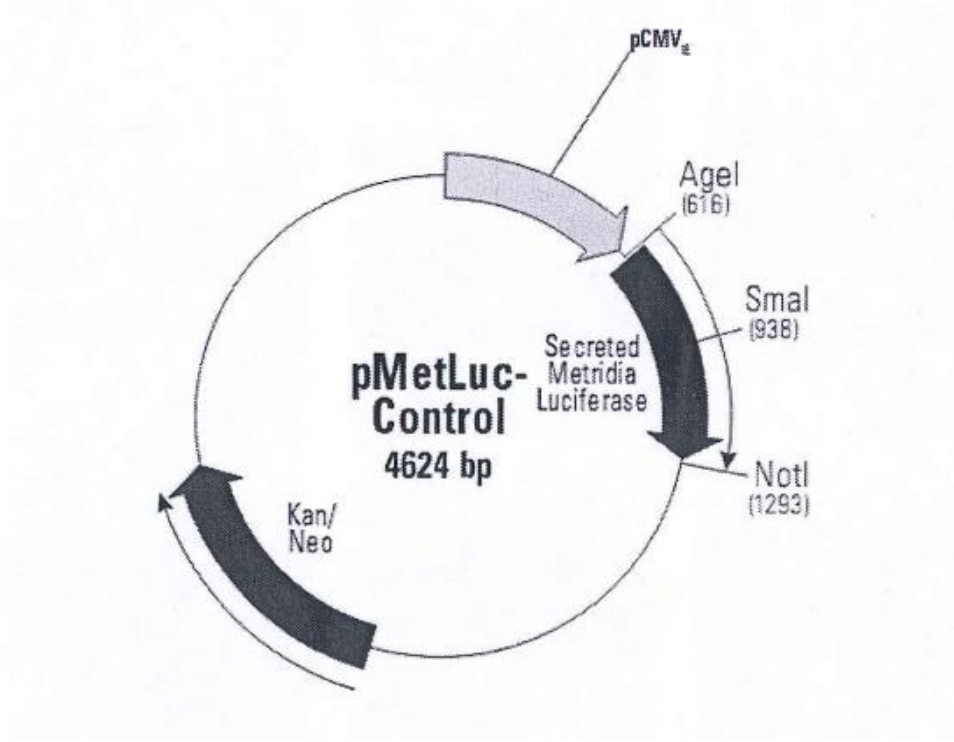
### 3.1.3 Kullanılan Vektör Sistemleri



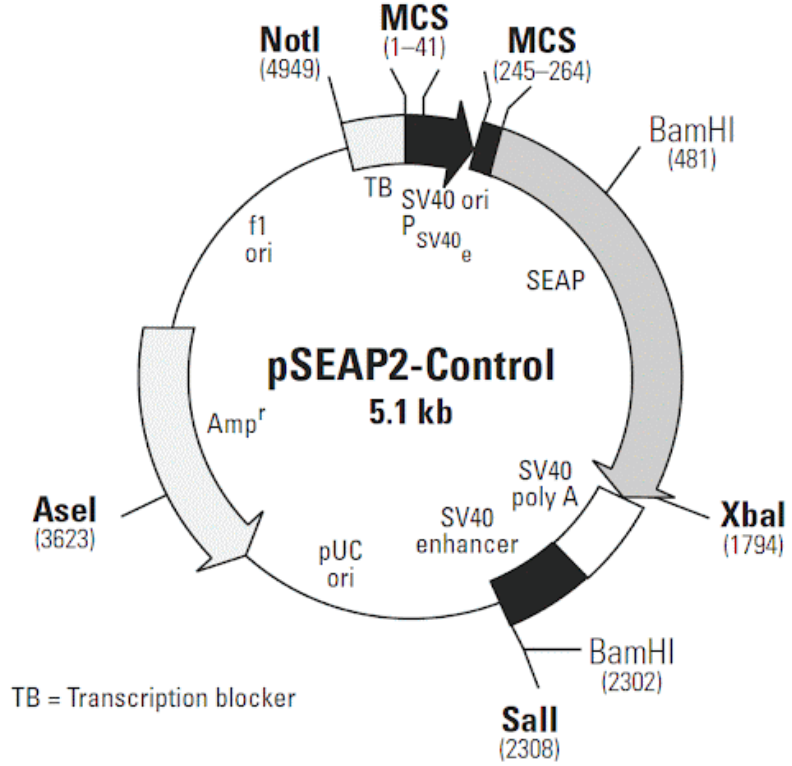
Şekil 3.1: pGEM-T®Easy vektör haritasının şematik gösterimi.



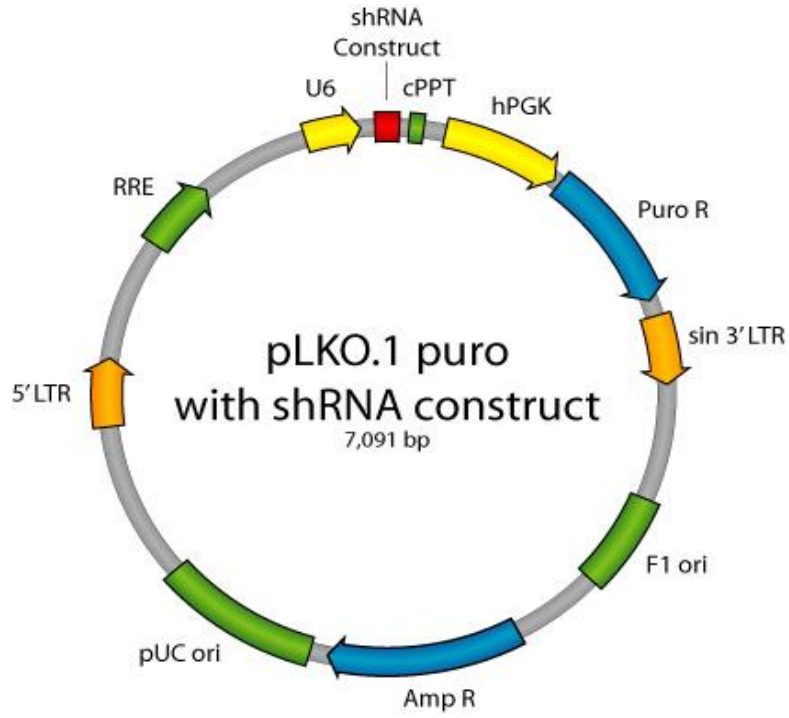
Şekil 3.2: pMetLuc Reporter vektör haritasının şematik gösterimi.



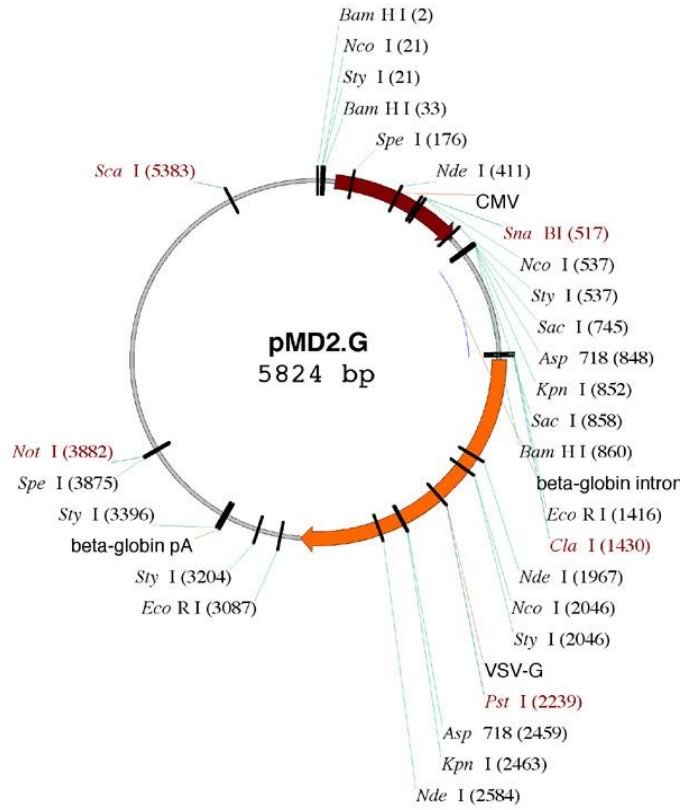
Şekil 3.3: pMetLuc Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.



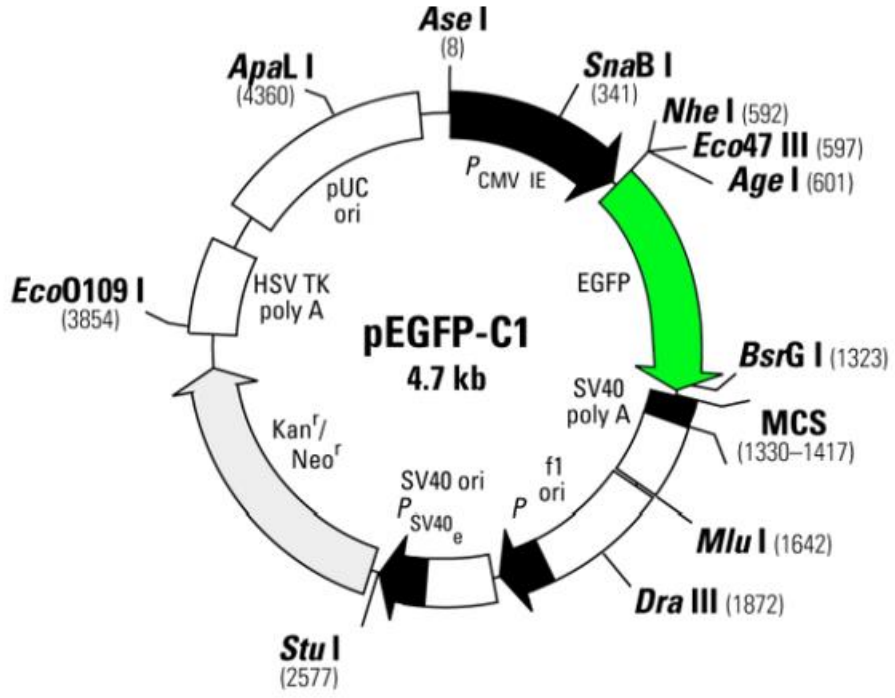
Şekil 3.4: pSEAP2-Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.



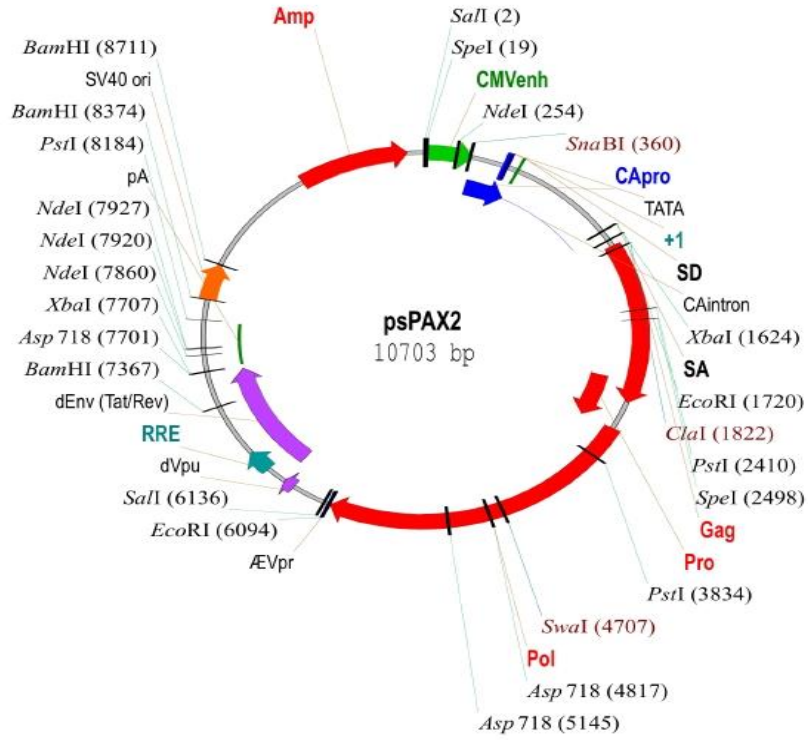
**Şekil 3.5:** pLKO.1 vektör haritasının şematik gösterimi.



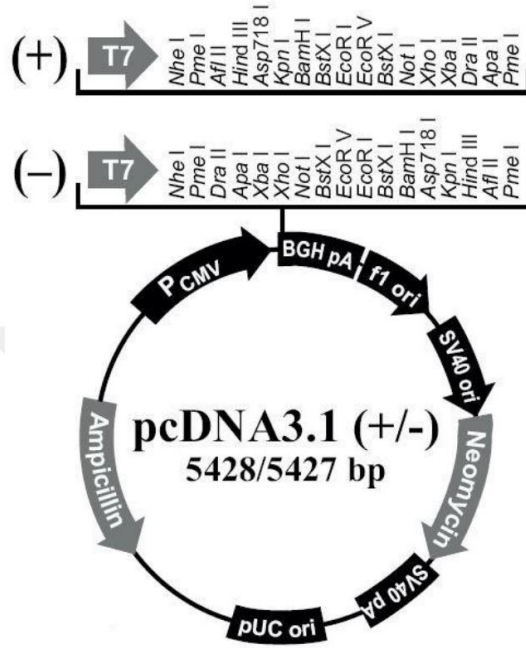
**Şekil 3.6:** pMD2.G vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.7: pEGFP-C1 vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.8: psPAX2 vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.9: pcDNA3.1 vektör haritasının şematik gösterimi.

### 3.1 Yöntem

#### 3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu

Deneyde kullanılan malzemeler, uygun sterilizasyon koşullarına titizlikle dikkat edilerek hazırlanmıştır. Isıya dayanıklı pipet uçları, ependorf tüpleri ve diğer laboratuvar gereçleri, otoklav cihazında 121 °C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak sterilize edildi. Otoklavlanması mümkün olmayan çözeltiler ise 0.22 µm'lik filtre ile sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücre kültürü laboratuvarı ise %70 etil alkol ve çamaşır suyu ve kapsamlı bir şekilde temizlendi. Çalışmaya başlamadan önce, laboratuvar ve laminar akış kabini yaklaşık 30 dakika boyunca UV ışığı ile sterilize edildi. Laminar akış kabine alınan tüm malzemeler, %70 etil alkol ile silinerek kabine yerleştirildi. Ayrıca, RNA çalışmaları sırasında RNaz kontaminasyonunu önlemek amacıyla, ortam ve malzemeler %0,1 DEPC'li su ile steril edildi.

#### 3.2.2 Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Teknikler

##### 3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Oluşturulması

Katı besiyeri için LB (Luria Broth) agar kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği miktardaki LB agar dH<sub>2</sub> O'da çözüldü ve sterilizasyon amacıyla 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlandı.

Besiyerinin yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra, bek alevi yanında son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde ampisilin veya 30 µg/mL olacak şekilde kanamisin ilave edilerek karıştırıldı. LB agar karışımı steril petri kaplarına döküldü ve polimerleşip katılaşması beklendi. Son olarak, petri ler parafilm ile sarıldı, ters çevrildi ve +4 °C'de ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

Sıvı besiyeri olarak LB (Luria Broth) kullanıldı. Üretici firmanın 1 litre için önerdiği miktardaki LB, dH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlandı. Sterilizasyonun ardından, hazırlanan sıvı besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi. Kullanım öncesinde, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde ampisilin veya 30 µg/mL olacak şekilde kanamisin ilave edildi.

### **3.2.2.2 DH5α Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi ve Kontrolü**

Kompetan hücre hazırlığı için, -80°C'de saklanan gliserol stokundan alınan DH5α suşu, katı besiyerine ekilerek 37°C'de yaklaşık 16 saat inkübe edildi. Buradan seçilen tek bir koloni, 10 mL LB sıvı besiyerine inoküle edilip gece boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Ertesi gün, bu ön kültür, hacminin en az üç katı olan 100 mL LB sıvı besiyerine transfer edilerek 37°C'de çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi. Büyüme süresince periyodik olarak OD<sub>600</sub> ölçümleri yapıldı ve hücrelerin optik yoğunluğunun 0.6-0.8 aralığına ulaşması beklendi. Bu aşamada, hücre süspansiyonu steril koşullarda 50 mL'lik Falcon tüplerine bölünerek, 4°C'de 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete, başlangıç hacminin yarısı kadar 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenerek çözüldü ve süspansiyon buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete, başlangıç hacminin 1/10'u kadar 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenerek çözüldü ve bu süspansiyon buz üzerinde 4 saat bekletildi. Ardından, süspansiyona eşit hacimde %40'luk soğuk gliserol eklenerek iyice karıştırıldı. Elde edilen karışım, 1.5 mL'lik tüplere 200 µL olacak şekilde bölünerek -80°C'de saklandı. Bu yöntem, hücrelerin yüksek transformasyon verimliliği için uygun hale getirilmesini sağlamaktadır.

### **3.2.2.3 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Belirlenmesi**

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan kompetan hücreler, transformasyon etkinliği bilinen çok kopyalı halkasal plazmitler ile, sırasıyla 10 ng, 1 ng ve 0,1 ng dilüsyonlarda transforme edildi. Transformasyon sonrası, seçici antibiyotik içeren petri

kaplarında oluşan koloniler sayıldı. Transformasyon etkinliği  $10^6$  - $10^8$  cfu/ $\mu$ g olan kompetan hücreler bu çalışmalarda kullanıldı.

#### **3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması**

İlgili antibiyotiğe dirençli kolonilerden seçilen bakteriler, aynı antibiyotiği içeren 10 mL LB besiyerine ekildi ve 37 °C'deki çalkalamalı etüvde bir gece boyunca inkübe edildi. Hazırlanan ön kültür, belirtilen koşullarda çoğaltıldıktan sonra bek alevi yanında etiketlenmiş eppendorf tüplerine eşit hacimlerde paylaştırıldı. Tüplere %30'luk steril gliserol eklenerek oluşturulan bakteri süspansiyonları, uzun vadeli muhafaza amacıyla -80 °C'de saklandı.

### **3.2.3 DNA Çalışmaları ile İlgili Metotlar**

#### **3.2.3.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA İzole Edilmesi**

%80-90 doluluğa ulaşan 100 mm'lik kültür kabındaki Hep3B hücreleri, Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak kültür kabının yüzeyinden dikkatlice kaldırıldı. Tripsin-EDTA'nın iki katı hacminde %10 FBS içeren büyüme medyumuna eklendi ve hücreler 1.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürüldü. Üstteki medyum dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine 250  $\mu$ L nüklei lizis tamponu, 20  $\mu$ L %10 SDS ve 20  $\mu$ L proteinaz K eklenmiş ve homojenizasyonu sağlamak amacıyla yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı. Bu karışım, 72 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 10 dakika süreyle inkübe edildi. Ardından, 175  $\mu$ L amonyum asetat çözeltisi eklendi ve 30 saniye boyunca çalkalanarak karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra, 13.500 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, eppendorf tüpüne alınıp ve üzerine süpernatant hacminin iki katı %100 etanol eklendi. Tüp, yavaşça alt-üst edilerek alkol ile örneğin iyice karışması sağlandı. Karışım, 13.500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Pelet üzerine 250  $\mu$ L %75'lik etanol eklenerek DNA yıkama işlemi gerçekleştirildi, ardından 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA peleti, temiz bir peçete üzerine yerleştirildi ve etanolün tamamen buharlaşması için oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine 100  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O eklendi ve DNA çözdürülerek pipetaj yapıldı. DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik analizle belirlendi ve elde edilen genomik DNA, -20 °C'de saklanarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edildi.

### 3.2.3.2 DNA Miktar Tayini

İzole edilmiş DNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek amacıyla, DNA örneklerinden 2 µL'lik alındı ve ayrıca kontrol (kör) ölçümü için 2 µL deiyonize su (dH<sub>2</sub>O) µDrop™ plakaya eklendi. Spektrofotometrik analizler, 260-280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri, DNA miktarı ve saflığı belirlemek için kullanıldı.

### 3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çoğaltılacak bölgeye özgü olarak tasarlanmış ve 100 pmol/µL konsantrasyona sahip ileri ve geri primerler, her biri 1 µL olacak şekilde eklendi; 2 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µL 10X Taq Buffer (KCl), 1 µL dNTP mix (10 mM), 0.5 µL 5 U/µL Taq Polimeraz Enzimi (Thermo) ve 1 µL DNA (250-500 ng) PCR tüpüne eklendi. Bu bileşenler, miktarı fazla olan bileşenden daha az olan bileşene doğru sırayla eklendi ve karışım hazırlandı. Son hacim, dH<sub>2</sub>O ile 50 µL'ye tamamlandı.

**Tablo 3.6:** PCR döngü şartları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon	1	94	4 Dakika
		94	45 Saniye
Bağlanma	35	55	45 Saniye
		72	45 Saniye
Uzama	1	72	10 Dakika

### 3.2.3.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın jel üzerinde görselleştirilmesi amacıyla %1'lik bir agaroz jel hazırlandı. %1'lik jel hazırlığı için, 100 mL 0.5X TBE tamponunda 1 g agaroz tartıldı, tamponda çözüldü ve kaynatıldı. Agaroz jel, yaklaşık 45-50 °C'ye soğutuldu ve sonrasında etidyum bromür (Et-Br) eklenerek final konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde homojen bir karışım elde edildi. Tarakların önceden yerleştirildiği elektroforez kasetine jel döküldü, jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı ve kaset, 0.5X TBE tamponu ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 1 kb DNA büyüklük belirteci (marker) eklendi, sonraki kuyulara ise 6X yükleme boyası ile karıştırılmış örnekler yüklendi. Elektroforez, 90 volt akımında 45 dakika süreyle gerçekleştirildi. Jel, UV görüntüleme sistemi kullanılarak

görselleştirildi ve fotoğraflandı. DNA agaroz jel elektroforezi çalışmasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.8'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.7:** DNA Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.

<b>Çözelti</b>	<b>Hazırlanışı</b>
<b>5X TBE Tamponu</b>	54.51 g Tris-base (Ma: 121.14), 27.82 g Borik Asit (Ma: 61.83) ve 3.72 g Na-EDTA (Ma:372.24) tartılır. (pH: 8) Otoklavlanır. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.
<b>1 kb DNA Ladder (BioLabs, N3200L)</b>	50 µL 1 kb DNA Ladder, 50 µL DNA yükleme boyası ve 200 µL dH <sub>2</sub> O ile hazırlanır. -20 °C'de muhafaza edilir.
<b>%1'lik Agaroz Jel</b>	1 g Agaroz tartılır. 100 mL 0.5X TBE içerisinde çözülür. Mikrodalgada kaynatılıp 40-45 °C'ye soğutulur. 2.5 µL Et-Br eklenir. Kasete taraklar yerleştirildikten sonra dökülür.
<b>%0,8'lik Agaroz Jel</b>	0.8 g Agaroz tartılır. 100 mL 0.5X TBE içerisinde çözülür. Mikrodalgada kaynatılıp 40-45 °C'ye soğutulur. 2.5 µL Et-Br eklenir. Kasete taraklar yerleştirildikten sonra dökülür.
<b>Etidyum Bromür Stok Solüsyonu (10 mg/mL)</b>	10 mg/mL olacak şekilde steril dH <sub>2</sub> O ile hazırlanır. Işık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklanır.

### 3.2.3.5 Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanımı

PCR ürünlerinden DNA'nın agaroz jel elektroforezi sonrası geri kazanımı, GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Jel bantları, önceden tartılmış steril 2 mL ependorf tüplerine alındı ve ağırlıkları hassas terazide belirlendi. Her 100 mg jel için 100 µL bağlanma tamponu eklenerek tüpler 55-60 °C sıcaklıktaki su banyosunda tamamen eriyene kadar inkübe edildi. Eriyen jel çözeltisinin 700 µL'lik hacmi, santrifüj kolonuna yüklendi ve 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem, tüm karışım kolondan geçirilene kadar tekrarlandı. Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak, kolona 500 µL yıkama tamponu eklendi ve aynı hızda tekrar santrifüj edildi. Yıkama işlemi sonrasında, kolon membranında kalan etanolü uzaklaştırmak için son bir kez, ek sıvı eklenmeden santrifüj işlemi uygulandı. DNA'nın elüsyonu için kolon, temiz bir 1.5 mL ependorf tüpüne yerleştirildi. Kolona, önceden ısıtılmış 50 µL steril dH<sub>2</sub>O eklendi. Ardından

13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen DNA içeren elüant, etiketlenerek -20 °C'de saklandı.

### **3.2.3.6 Restriksiyon Endonükleaz Reaksiyonu**

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin hedef bölgelerini taşıyan plazmidler üzerinde restriksiyon endonükleaz kesimleri gerçekleştirildi. Kullanılan enzim miktarının, reaksiyonun toplam hacminin %10'unu aşmamasına özen gösterildi. Kesim reaksiyonları, üretici firmalar tarafından belirtilen optimum sıcaklık ve inkübasyon sürelerine göre gerçekleştirildi. Ayrıca, iki farklı endonükleaz ile aynı anda kesim yapılması gerekiyorsa, bu enzimlerin optimum çalışabileceği ortak tamponlar tercih edildi. Kesim ürünleri agaroz UV ışık altında görüntülendi.

### **3.2.3.7 Ligasyon**

Klonlanacak istenen DNA (insert) ile lineer vektörün birbirine bağlanmasını sağlamak amacıyla ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon 16°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ligasyon ürünleri daha sonra kompetent hücelere transforme edilerek rekombinant koloniler tespit edildi.

### **3.2.3.8 Transformasyon**

-80 °C'de muhafaza edilen DH5 $\alpha$  kompetan hüceler, çıkarılıp buz üzerinde eriyene kadar inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 5  $\mu$ L ligasyon ürünü eklendi ve 40 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Sürenin sonunda, önceden 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika, ardından buz üzerinde 2 dakika olacak şekilde kompetan hücelere ısı şoku uygulandı. Bek alevi yanında, 800  $\mu$ L LB Broth içeren 15 mL'lik Falcon tüplerine kompetan hüceler eklendi. Tüpler, 45°C lik bir açıyla, ağzı hafif açık bırakılarak çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi; bu açı, oksijen girişi ve yüzey temasını arttırmak amacıyla önemlidir. Hücreler, 1-4 saat süreyle 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Transformasyon kültürü, 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine alındı ve 5 dakika boyunca 5.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet, 100  $\mu$ L LB broth ile çözüldü, ardından petri kaplarına damla damla eklendi ve steril öze yardımıyla yayıldı. Petriler ters çevrilerek 37 °C'deki inkübatöre yerleştirildi ve gece boyu inkübe edildi.

### **3.2.3.9 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu**

Plazmit izolasyonu için bakteri stoklarından 10 mL'lik bir ön kültür hazırlandı ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Elde edilen bakteri pelletinden plazmitin izole edilmesi, Miniprep Kit (NucleoSpin Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel) protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi için pellet, kitin sağladığı 250 µL resüspanسیون tamponunda homojenize edildi. Ardından 250 µL lizis tamponu eklendi, karışımın viskoz ve jelimsi bir yapı alması sağlandı. Lizisin ardından, 350 µL nötralizasyon tamponu eklenip, 13.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre kalıntıları ayrıştırıldı. Elde edilen berrak süpernatant, kolon içerisine aktarılıp, 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem, tüm süpernatantın kolondan geçmesi için tekrarlandı. Kolon, sırasıyla 500 µL yıkama tamponuyla iki kez yıkanarak her defasında 1 dakika boyunca 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Etanol kalıntılarını uzaklaştırmak için kolon boş bir şekilde tekrar santrifüj edildi. Son olarak, kolon temiz bir ependorf tüpüne transfer edilip, 50 µL önceden ısıtılmış dH<sub>2</sub>O eklendi. 1 dakika bekletildikten sonra, 13.500 rpm'de santrifüj edilerek plazmit DNA'sı elüe edildi. İzole edilen plazmidin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle ölçülerek belirlendi.

### **3.2.3.10 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu**

Transfeksiyon deneylerinde, endotoksinlerin uzaklaştırıldığı ve yüksek konsantrasyonlu plazmit DNA elde etmek için büyük ölçekli plazmit izolasyon yöntemi kullanıldı. İzolasyon işlemi, Midi Prep Kit (NucleoBond® Xtra Midi Plus, Macherey-Nagel) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Plazmid DNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve agaroz jel elektroforezinde görüntüledi. Elde edilen büyük ölçekli plazmit örnekleri, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak için -20 °C'de saklandı.

### **3.2.3.11 shRNA Klonlama Tekniği**

Genlerin susturulması amacıyla hedef genlere özgü shRNA oligomeri tasarlandı. Bu tasarım, Whitehead Biyomedikal Araştırma Enstitüsü'nün (<http://sirna.wi.mit.edu/>) siRNA seçim programı kullanılarak gerçekleştirildi. Oligomerler, klonlanacak vektör olan pLKO.1-TRC'ye uygun olarak, üretici firma tarafından önerilen (Addgene) şekilde tasarlanmıştır. Temin edilen ileri ve geri oligomerler, annealing reaksiyonu ile birleştirildi. Oligomerlerin klonlanacağı pLKO.1-TRC vektörüne EcoRI ve AgeI restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak ayrıştırıldı ve elde edildi.

Klonlamaya hazır hale gelen shRNA oligomerleri ve lineer pLKO.1-TRC vektörü ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri ile kompetent hücelere transformasyon yapıldı ve seçici besiyerinde koloni oluşumu gözlemlendi. Oluşan kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak EcoRI ve NcoI restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi gerçekleştirildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelenerek klonlamanın doğruluğu tespit edildi ve dizi analizi ile doğrulandı.

### **3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler**

#### **3.2.4.1 Besiyeri Serumunun Hazırlanması**

Hücre kültüründe hücre büyümesini desteklemek amacıyla Fetal Calf Serum (FCS) kullanıldı. Ticari olarak temin edilen FCS, soğuk zincirle taşınıp -20°Cde muhafaza edildi. Stok FCS, ilk kullanım öncesinde +4°Cde bir gece boyunca çözüldü ve 55°Cde 30 dakika süreyle ısıtılarak inaktive edildi. İnaktive edilen FCS, steril 50 mL'lik falkonlara bölünerek -20°Cde saklandı ve kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri ortamı olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilen DMEM, +4°Cde saklanmıştır. Çalışmada kullanılan Hep3B hücre hattı için, besiyeri olarak hacimce %10 FCS içeren DMEM tercih edilmiştir. Antibiyotik kullanımına ihtiyaç duyulduğunda, 100X penisilin-streptomisin solüsyonundan, son konsantrasyonu 1X olacak şekilde ekleme yapılmıştır.

### 3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Tablo 3.8:** Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.

Çözelti	Hazırlanışı
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu için, Sigma üretici firmasından ticari olarak temin edilen PBS tabletleri kullanılarak üreticinin önerdiği şekilde hazırlandı. PBS tabletlerin her biri prosedüre uygun olacak şekilde 100 mL dH <sub>2</sub> O (deiyonize su) içerisinde çözüldü. Çözelti daha sonra 121 °C'de otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen steril PBS çözeltisi +4 °C'de saklandı.
<b>Tripsin EDTA</b>	X PBS içerisine 0,53 mM EDTA ve %0,25 (w/v) Tripsin (Sigma) eklenerek çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti, steril laminar flow kabini içinde, 0,22 µm'lik filtre kullanılarak sterilize edildi. Sterilize edilen çözelti steril 50 mL'lik falkonlara paylaştırıldı ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı. Kullanım öncesinde çözünmesi için +4 °C'ye çıkarıldı.
<b>%1 Kristal Viyole</b>	0,5 g kristal viyole (Carlo Erba) tartıldı. 10 mL saf metanol içerisine aktarıldı. dH <sub>2</sub> O ile 50 mL son hacime tamamlandı. Çalkalanarak çözüldü. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

### 3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması

-80 °C'de saklanan Hep3B hücreleri, 37 °C su banyosunda kontrollü bir şekilde çözüldü ve %10 FCS ile hazırlanmış medyum içerisine aktarıldı. Hücre-medyum karışımı, 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi, böylece canlı hücreler pellet halinde toplanırken, dondurma işlemi sırasında kullanılan DMSO kalıntıları ve ölü hücreler süpernatantta kaldı ve uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri 2 mL taze medyum ile çözüldü, içerisinde 8 mL %10 FCS içeren medyum bulunan 100 mm'lik steril petri kaplarına ekildi. Petri kapları, hücre soyunun adı, pasaj numarası ve tarih bilgileriyle etiketlendi. Hücrelerin tutunup büyümesi için petri kapları %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.

### 3.2.4.5 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler inverted mikroskop altında düzenli aralıklarla incelendi ve petri yüzeyinin %80-90 oranında kaplanması durumunda pasajlama işlemine geçildi. Öncelikle petrideki besiyeri

uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez IX PBS ile yıkandı. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla petriye uygun miktarda Tripsin-EDTA (TE) eklendi ve petri inkübatöre kondu. Hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılmasıyla birlikte kullanılan TE'nin iki katı hacminde besiyeri eklendi ve tripsin inaktive edildi. Hücre süspansiyonu steril falkona aktarıldı ve 1.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan hücre pelleti besiyerinde süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonu 3-4 petri arasında eşit olarak dağıtıldı ve petri tam besiyeri ile son hacme tamamlandı. Ardından petriler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'deki inkübatöre yerleştirildi.

#### **3.2.4.6 Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi**

Hücre kültürü deneylerinde, optimize şartlarda çalışabilmek ve yeterli miktarda hücre elde edebilmek amacıyla sağlıklı ve yeterli doluluğa ulaşmış hücreler tripan mavisi ile boyandı ve hücre sayım lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı, ardından hücrelerin eşit olarak bölünmesi sağlandı. Bu süreçte canlı ve ölü hücrelerin ayırımı yapmak ve hücre sayısını belirlemek amacıyla tripan mavi boyama yöntemi tercih edildi. Tripsin-Edta ile yüzeyden ayrılan hücreler, 5 dakika boyunca 1.000 rpm'de santrifüjlenip pelet haline getirildi. Pelet, 5 mL taze %10 FBS'li medyum ile homojenleştirilerek, bu homojen hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla 1 mL örnek alındı. Steril ependorf içerisinde bulunan bu 1 mL hücre süspansiyonundaki hücre miktarı hesaplandı. Bu hesaplama sırasında, hücre süspansiyonu tripan mavi boyası ile 1:1 oranında karıştırıldı. Ölü hücreler, membranlarındaki seçici geçirgenlik kaybı nedeniyle boyayı absorbe ederek mavi renge dönerken, canlı hücreler boyasız kaldı. Elde edilen hücre süspansiyonu-boya karışımından 10 µL'lik bir örnek alınıp Thoma lamına yerleştirildi. Beyaz hücreler inverted mikroskop altında sayılarak mL başına düşen canlı hücre miktarı hesaplandı. Belirlenen hücre sayısı ile deneyler oluşturuldu.

#### **3.2.4.7 Hücrelerin Dondurulması**

Daha sonraki çalışmalarda tekrar kullanılabilmesi için hücre soyları dondurularak saklandı. Bölüm 3.2.4.5'te hücrelerin pasajlanma süreci detaylandırıldığı üzere, sağlıklı şekilde büyüyüp petri yüzeyinin %80-90 oranında kaplanmış olan hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler iki kez 1 X PBS ile yıkanarak, TE eklenerek yüzeyden ayrıldılar. Tripsinin inaktive edilmesinin ardından, hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan pellet 1 mL %10 (v/v) DMSO içeren FCS ile süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu etiketlenmiş cryovial tüpe aktarıldı ve -80°C'de dondurularak muhafaza edildi.

### 3.2.4.8 Kimyasal İndüklenmiş Hipoksi Oluşturulması

Deneyleerde kimyasal hipoksi oluşturmak için kullanılan kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ , Cobalt (II) Chloride Hexahydrate, Ma: 237.93 g/mol, Fluka™), 25 mM ana stok çözeltisi hazırlanacak şekilde hesaplanarak tartıldı ve  $\text{dH}_2\text{O}$  ile çözüldü. Çözeltinin steril olması sağlanmak amacıyla 0.22  $\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirildi. Ependorf tüplerine bölünerek oda sıcaklığında saklandı. Hep3B hücrelerinde, 300  $\mu\text{M}$  konsantrasyonun da kullanıldı.

### 3.2.4.9 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları

#### 3.2.4.9.1 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon

MIR100HG genine ait 5' ucu kısaltılarak oluşturulmuş promotör parçaları SP1 transkripsiyon faktörü ile transfekte edildi. Tripsinizasyon yöntemiyle süspansiyona alınan Hep3B hücrelerinin canlı hücre sayıları mL başına hesaplandı. Hücreler 48 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 60.000 hücre olacak şekilde dağıtıldı ve %5  $\text{CO}_2$  içeren 37 °C'lik bir inkübatörde gece boyunca bekletildi. MIR100HG promotör parçalarıyla birlikte pSEAP-Control vektörü normalizasyon amacıyla transfekte edildi. pMetLuc-Control Vektörü (Pozitif Kontrol) ve pMetLuc2-Reporter Vektörü (Negatif Kontrol) transfeksiyonunun verimliliğini ölçmek için transfekte edildi.

**Tablo 3.9:** Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.

Vektör	Kullanım Amacı
pSEAP-Control Vektörü (5.1 kb)	Normalizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Elde edilen Luciferaz/SEAP değerleri oranlanarak bağıl lusiferaz aktivitesi hesaplanır.
pMetLuc-Control (4624 bp) Vektör	Hücrelerde transfeksiyon etkinliğinin genel durumunu değerlendirmek için pozitif kontrol olarak kullanılır ve güçlü bir viral promotör aracılığıyla ifade edilir.
pMetLuc2-Reporter Vektör (4250 bp)	Promotör bölgesi içermediğinden negatif kontrol amaçlı kullanılır.

48 kuyucuklu plakadaki her kuyucuk için, DNA ve CaCl<sub>2</sub> karışımı içeren çözelti A pastör pipeti yardımıyla yavaşça damlatılarak çözelti B'ye eklendi; karışımın son hacmi her kuyucuk için 257.5 µL olarak ayarlandı. Çözeltilerin bu karışımı, çökeltmenin gerçekleşmesi için oda sıcaklığında ve laminar akış kabininde 40 dakika bekletildi. Hazırlanan DNA-kalsiyum çökelteleri, transfekte edilecek hücrelerin bulunduğu her bir kuyucuğa, toplam hacmi 257.5 µL olacak şekilde hafifçe pipetajlanarak yavaşça eklendi. Karışımın plakada eşit şekilde dağılması amacıyla plaka hafifçe sallandı.

**Tablo 3.10:** Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yönteminde kullanılan çözeltilerin bileşenleri ve miktarları.

	Malzemeler	6 Kuyucuklu Plaka	48 Kuyucuklu Plaka
<b>Çözelti A</b>	DNA	2 µg	0.5 µg
	2M CaCl <sub>2</sub>	60 µL	15 µL
	SEAP	0.5 µg	0.125 µg
	dH <sub>2</sub> O	515 µL'ye tamamlanır.	128.75 µL'ye tamamlanır.
<b>Çözelti B</b>	2X HEPES	500 µL	125 µL
	100X PO <sub>4</sub>	15 µL	3,75 µL

6 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'deki inkübatörde bekletilen plakalardan, bu süre sonunda transfeksiyon medyumunu uzaklaştırıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkanıp transfeksiyon medyumundan temizlendi, ardından %10 FBS içeren taze medyum eklendi. Transfekte edilen hücrelerden 48 ve 72. saatlerde medyumlar toplandı. Promotor aktivitesi, lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçümleri ile belirlendi.

#### 3.2.4.9.2 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü

MIR100HG genine ait 5' ucu kısaltılmış promotor konstraktlarının normoksik koşullarda ve SP1 transkripsiyon faktörüyle birlikte transfekte edilmesinden sonra transkripsiyonel aktiviteyi belirlemek için Dual-Core Luciferase Reporter Assay Kit™ (Clontech) kullanıldı. Bu işlemde kit içerisinde sunulan 10X substrat tamponu, 1:10 oranında reaksiyon tamponu ile seyreltilerek hazırlandı. Elde edilen transfeksiyon medyumundan 9 µL, ardından 1 µL 1X Substrat/Reaksiyon tamponu ilave edilerek sonuçlar hızla luminometrede ölçüldü. SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesi ölçümleri için, 96 kuyucuklu plakaların her bir

kuyucuğuna 5 µL transfeksiyon medyumu eklendi. 5X dilüsyon tamponu, dH<sub>2</sub> O ile 1X'e seyreltilip 15 µL örneklerin üzerine eklendi. Plakanın sıvı kaybını önlemek için parafilm ile kapatıldı ve karanlık koşullar sağlanması amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak 65°C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, 5 dakika buzda bekletilen plaka oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi. Oda sıcaklığına ulaşan örneklere 20 µL SEAP substrat solüsyonu ilave edilerek 30 dakika daha inkübe edildi. Sürenin sonunda plaka Luminometre cihazında okunarak ölçümler alındı. Elde edilen veriler GraphPad Prism programında analiz edildi.

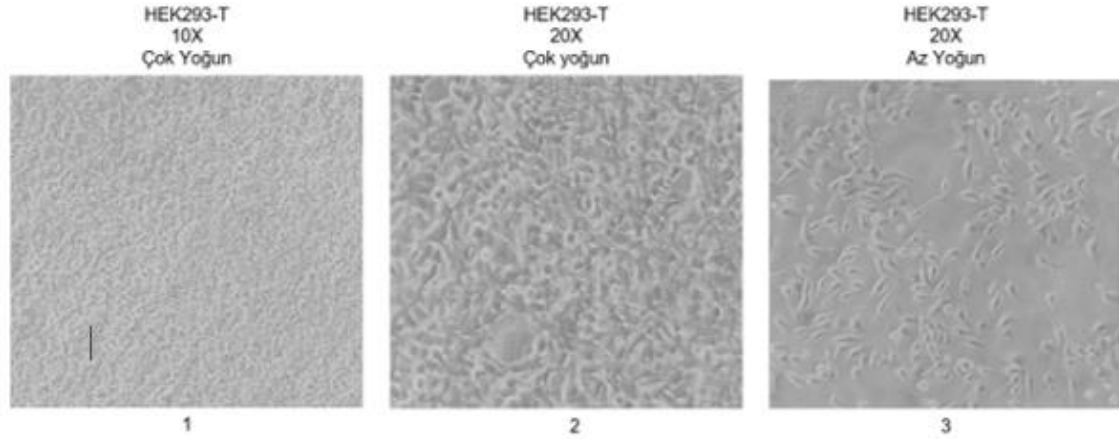
#### **3.2.4.10 Lentiviral tabanlı Susturma Çalışmaları**

Tez çalışması kapsamında SP1 ve MIR100HG geni stabil shRNA sistemi ile kalıcı olarak susturuldu.

##### **3.2.4.10.1 HEK293-T**

HEK293-T hücreleri, insan embriyonik böbrek hücrelerinden dönüştürülerek elde edilmiştir. Dönüşüm, fetüs kaynaklı hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Lentiviral vektör üretiminde en yaygın kullanılan HEK293 hücre türü HEK293-T'dir. Bu hücreler, büyük T-antijenini taşıyan SV40 ile modifiye edilmiştir ve bu antijen, hücrelerin amplifikasyonunu kolaylaştırır. Sistem, geçici transfeksiyon ile ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırır. Transfeksiyon kolaylığı, bu hücrelerin en belirgin özelliklerinden biridir.

HEK293-T hücreleri, Prof. Dr. Dilek Balık Yıldız Teknik Üniversitesi'nden temin edilmiştir. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi ile ayrılarak sayılmış ve 6 kuyucuklu plakalar üzerine 4 x 10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde dağıtılmıştır. Son hacmi 2 mL olacak biçimde, antibiyotik içermeyen %10 FBS'li besiyeri ile tamamlanmıştır. Hücreler, yapışmalarını sağlamak amacıyla, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> oranına sahip inkübatörde gece boyunca inkübe edilerek kültüre alınmıştır.



**Şekil 3.10:** HEK293-T hücrelerinin mikroskop görüntüleri.

#### 3.2.4.10.2 Ticari Transfeksiyon Reaktifi ile Lentiviral Plazmitlerin Transfeksiyonu

Transfeksiyondan önce ticari transfeksiyon reaktifleri, plazmitler ve DMEM oda sıcaklığına getirildi. Uygun oranlarda plazmit (Tablo 3.12) ve DMEM eklenip en son Transfeksiyon Reaktifi (TurboFect™) eklenerek hafifçe karıştırıldı. Transfeksiyon reaktifi ve DNA karışımı 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücrelerin üzerine damla damla eklendi. Kültür kabı hafifçe sallanıp karışımın eşit dağılması sağlandıktan sonra 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırıldı. 48. Saat sonunda medyumlar çekildi 15 mL'lik steril falkona alındı. Hücrelere taze %10 FBS'li 2 mL medyum eklendi. 72. Saate kadar inkübasyona devam edildi. 72 saat sonunda tekrar medyumlar çekilerek 48. Saat medyumları ile birleştirildi. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Medyumlar 0.45 µm'lik filtreden geçirildi. Filtreden geçirilen transfeksiyon medyumları 500'er µL olacak şekilde steril endopdorflara alıkotlandı ve -80 °C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

**Tablo 3.11:** TurboFect Reagent™ ile gerçekleştirilen geçici transfeksiyon bileşenlerinin 6 kuyucuklu plaka için kuyu başına gereken miktarları.

Bileşenler	Miktarlar
pMD2.G (Zarf Plazmidi)	300 ng
psPAX2 (Paketleme Plazmidi)	700 ng
pLKO.1-shRNA	1400 ng
TurboFect Reagent™	6 µL
Medyum	400 µL'ye tamamlanır.

### **3.2.4.10.3 Hep3B Hücrelerine Lentiviral Transdüksiyon**

Hep3B hücrelerinde kalıcı susturma çalışmaları gerçekleştirmek amacıyla büyütülen Hep3B hücreleri tripsinizasyonla kaldırılıp sayılarak 4 x 10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara bölündü. Kuyuların son hacmi %10 FBS'li antibiyotiksiz DMEM ile 2 mL'ye tamamlandı ve hücreler tutunmaları için gece boyu %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37 °C'de bekletildi. Hücreler tutunduktan sonra, hücre medyumları uzaklaştırıldı. PBS ile yıkandı. %10 FBS'li DMEM içerisine 8 µg Protamin sülfat (Ana stok: 25 mg/mL) eklenerek taze medyum hazırlandı ve iyice karıştırıldıktan sonra hücrelerin medyumları, taze protamin sülfatlı medyum ile değiştirildi. Taze medyum üzerine, -80 °C'de saklanan ve oda sıcaklığına getirilen lentiviral sıvılar, 600 µL /kuyu olacak şekilde damla damla eklendi. Plaka hafifçe çalkalanarak lentiviral sıvının dağılması sağlandı. Ardından hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.

### **3.2.4.10.4 Promisin Uygulanması**

Hücre medyumları protamin sülfatlı medyum ile değiştirildikten 48 saat sonra ilk promisin uygulaması hem kontrol hem de deney gruplarına yapıldı. Her promisin uygulaması yapılmadan önce, hücrelerin medyumları uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra yeni medyum ile değiştirildi. Kontrol grubunda bulunan tüm hücrelerin ölümü gerçekleşene kadar promisin uygulamasına kontrollü şekilde devam edildi. Hep3B hücreleri için optimize edilen 2 µg Promisin miktarı uygulandı ve 48 saatte bir doz hatırlatması yapıldı.

### **3.2.4.10.5 Tek Koloni Seçilmesi ve Büyütülmesi**

Doz hatırlatmaları yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakada bulunan hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve tek koloni seçimi için 96 kuyucuklu plakalara bölündü. Bu aşamada son kuyucuklara tek koloninin düşürülmesi hedeflendi. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara bölünüp tutunmaları beklendikten sonra belli aralıklarla promisin doz hatırlatmaları yapıldı. 96 kuyucuklu plakadaki hücreler, tek koloni seçimi için büyütüldü. Daha sonra muhtemel susmuş olan tek koloniler önce 6 kuyucuklu plakaya alınarak büyütüldü. Ardından 100 mm'lik kültür kabına alınarak pasajlandı ve stok yapıldı.

### **3.2.4.11 Overekspresyon Çalışmaları**

MIR100HG geni ve SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde aşırı ifadesini incelemek amacıyla tez çalışması kapsamında overekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi.

### 3.2.4.11.1 Ticari Transfeksiyon Reaktifi ile Geçici Transfeksiyon

Hep3B hücrelerinde geçici transfeksiyonunun gerçekleştirilmesi için 100 mm kültür kabında bulunan %80-90 doluluğa ulaşmış Hep3B hücrelerine kontrol grubu için boş pcDNA3.1 vektörü transfekte edildi. İçersine MIR100HG geni klonlanan pcDNA3.1-LincNed125 (MIR100HG) vektörü; Dr. Elisa Caffarelli, CNR, Moleküler Biyoloji ve Patoloji Enstitüsü, Roma, İtalya'dan plazmit halinde temin edilmiştir. SP1 aşırı ifade çalışmaları için boş pGFP-C1 vektörü, SP1 aşırı ifadesi için ekspresyon vektörüne klonlu SP1 plazmiti transfekte edildi. Üzerine her bir tüp için 30 µL TurboFect Reagent™ (Thermo) eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Karışım son hacmi 2 mL'ye DMEM ile tamamlandı. 20 dakika oda sıcaklığında laminar akış içerisinde inkübe edildi. Kültür kabında bulunan Hep3B hücrelerine 2 mL son hacimde TurboFect Reagent™/DNA karışımından damla damla eklendi. 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve Hep3B hücre hattına ait overekspresyon deneyleri kuruldu.

**Tablo 3.12:** TurboFect™ ile gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmaları için gerekli bileşenlerin miktarları.

Kültür Kabı	DNA	TurboFect Reagent™	Medyum (RPMI)
6 Kuyucuklu Plaka	2 µg	6 µL	400 µL'ye tamamlanır.
100 mm Kültür Kabı	10 µg	24 µL	2 mL'ye tamamlanır.

### 3.2.4.12 MIR100HG ve SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hücresel Karakterizasyonu İçin Yapılan Hücresel Çalışmalar

#### 3.2.4.12.1 Sitotoksisite Deneyi (MTT)

Deney planları kapsamında MTT testi, MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu sağlanan hücrelerde ve MIR100HG'nin susturulduğu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca SP1 transkripsiyon faktörünün karakterizasyonu çalışmaları için hem SP1 aşırı ekspre edilmiş hücrelerde hem de SP1 transkripsiyon faktörü susturulmuş hücre grubunda MTT testi gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının, proliferasyonunun ve sitotoksisitesinin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek amacıyla MTT testi uygulandı. Bu kolorimetrik yöntem, sarı renkli tetrazolium tuzunun (MTT) canlı hücrelerin metabolik aktivitesi tarafından mor renkli

formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanır. MTT testinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.14’te sunulmuştur.

**Tablo 3.13:** MTT’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.

<b>Çözeltinin Adı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
<b>MTT solüsyonu</b>	5 mg/mL konsantrasyon için 25 mL steril PBS ile çözülür. Çözelti, 0.22 µm filtre ile sterilize edilir, steril ependorflara bölünür ve -20 °C’de saklanır.
<b>0.004 M HCl İçeren İzopropanol</b>	500 mL İzopropanol (2- Propanol) son hacim içerisine 166.6 µL HCl eklenir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Hedeflenen deneyler kapsamında hem susturma çalışmalarında hem de overekspresyon çalışmalarında Hep3B hücreleri her kuyucukta 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı. Gece boyunca 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen hücreler, tutunduktan sonra bir kısmına kimyasal hipoksi oluşturmak amacıyla CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Uygulama sonrası 24, 48 ve 72 saatlerde, son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT solüsyonu eklendi ve 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda yaklaşık 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde morarma gözlemlendi. Ardından, medyum uzaklaştırıldı. 0.004 M HCl içeren izopropanol solüsyonu ile pipetaj yapılarak çözüldü. Absorbans ölçümleri, 550 nm dalga boyunda spektrofotometre ile alındı. Elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi.

#### **3.2.4.12.2 Çizik Testi**

Deney planları kapsamında çizik testi, MIR100HG’nin aşırı ekspresyonu sağlanan hücrelerde ve MIR100HG’nin susturulduğu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca SP1 transkripsiyon faktörünün karakterizasyonu çalışmaları için hem SP1 aşırı ekspre edilmiş hücrelerde hem de SP1 transkripsiyon faktörü susturulmuş hücre grubunda çizik testi gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin yara kapanmasını izlemek amacıyla, tripsinizasyon ile ayrıştırılan ve sayılan hücreler, 5 x 10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 6’lı plakalara yerleştirildi. Hücreler, tüm yüzeyi kaplayana kadar %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C ortamda inkübe edildi. Tüm kuyulara, standart olarak

beyaz pipet ucu ile artı şeklinde çizikler yapılarak hücreler arası çizik oluşturuldu. Çizik oluşturulduktan sonra, ölü hücrelerin uzaklaştırılması için hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve taze %10 FBS içeren medyum eklenerek son hacme tamamlandı. Hipoksi oluşturulacak kuyulara, taze medyum eklenmesinin ardından 300 µM CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Çizik oluşturulma süresi olan 0. saatte fotoğraflar çekilerek kayıt altına alındı. Hücrelerin mikro-göç oranının hesaplanması için 3, 6, 24 ve 48. saatlerde fotoğraflar çekilerek boşluğun kapanma süreci kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar, Image J programı ve kullanılarak analiz edildi ve GraphPad Prism programı ile grafiklendirildi.

#### **3.2.4.12.3 Koloni Formasyon Deneyi**

Deney planları kapsamında koloni formasyon deneyi, MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu sağlanan hücrelerde ve MIR100HG'nin susturulduğu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca SP1 transkripsiyon faktörünün karakterizasyonu çalışmaları için hem SP1 aşırı ekspresyon edilmiş hücrelerde hem de SP1 transkripsiyon faktörü susturulmuş hücre grubunda koloni formasyon deneyi gerçekleştirilmiştir.

Hücreler tripsinizasyon yöntemiyle kaldırıldıktan sonra, sayılarak 6 kuyucuklu plakalara belirlenen sayıda (1 x 10<sup>2</sup> hücre/kuyu) paylaştırıldı ve gece boyunca 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Ertesi gün, hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM son konsantrasyonda CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi uygulandı. Plakalar, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edilmeye devam edildi. Hücreler mikroskopla izlenerek 14 gün boyunca büyütüldü. 14. günün sonunda, kolonilerin gözlemlenebilmesi için medyum uzaklaştırıldı ve plakalar steril PBS ile 3 kez yıkandı. Ardından, her bir kuyucukta hücreleri fikse etmek amacıyla 500 µL %80 metanol eklendi. Plakalar buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, plakalar tekrar 3 kez steril PBS ile yıkandı. %1'lik kristal viyole çözeltisinden 100 µL eklenerek plakalar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda, fazla boya saf su ile temizlendi. Beliren koloniler beyaz bir arka plan üzerine yerleştirilerek fotoğraflandı. Kolonilerin sayımı, Cell Counter programı kullanılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi.

#### **3.2.4.12.4 Matrijel**

Deney planları kapsamında koloni formasyon deneyi, MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu sağlanan hücrelerde ve MIR100HG'nin susturulduğu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Deneyde, Turbofect™ Reagent ile 24 saat boyunca aşırı MIR100HG ifadesi sağlanmış

Hep3B hücreleri, boş vektör transfekte edilmiş kontrol Hep3B hücreleri, MIR100HG ifadesi baskılanmış pLKO.1-MIR100H-shRNA hücreleri ve pLKO.1-SCR Hep3B hücreleri, matrijel deneyine başlamadan önce iki kez PBS ile yıkanarak hücre geçişini artırmak amacıyla deneyden 20 saat önce FBS'siz antibiyotikli DMEM medyum eklendi. Hücreler, FBS içermeyen medyumda gece boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün, kullanılacak tüm malzemeler, tüpler ve çözeltiler -20 °C'de soğutuldu. Matrijel (Geltrex™) bir gece boyunca +4 °C'ye eritildikten sonra buz üzerinde bekletildi ve kullanım öncesinde soğuk PBS ile 4 kat dilüe edildi. Matrijel deneylerinde özel 24 kuyucuklu plakalar kullanıldı; her plaka üzerinde 8 µm por büyüklüğüne sahip 12 insert bulunur.

Steril bir cımbız yardımıyla insertler, plakanın kenarındaki boş kuyulara aktarıldı. Daha sonra, insertlerin yerleştirileceği orta kısımdaki 12 kuyuya %10 FBS içeren DMEM medyum eklendi ve her bir kuyuya 650 µL ilave edildi. Cımbız kullanılarak insertlerin üzerine, soğuk PBS ile dört kat dilüe edilmiş matrijel solüsyonundan 100 µL eklendi. Bu işlem sonrasında matrijelin katılaşması için insertler %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda, 37 °C'de yaklaşık bir saat boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda insertler, hücreler için kullanılmaya hazır hale getirildi.

Matrijelin katılaşması beklenirken, hücreler tripsinizasyon yöntemiyle ayrıştırıldı. Santrifüj işlemi sonrası hücreler, FBS içermeyen DMEM medyum kullanılarak süspansiyon haline getirildi ve mililitre başına hücre sayısı belirlendi. Insertlere dağıtılmak üzere, her 100 µL'de 150.000 hücre içerecek şekilde hücre-medyum karışımları hazırlandı.

Katılaşan matrijellerin üzerindeki PBS'li sıvı pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı ve her bir insertin üzerine 100 µL hücre-medyum karışımı aktarıldı. Insertler daha sonra dikkatlice, orta kısımdaki %10 FBS içeren medyum bulunan kuyulara yerleştirildi. Deney, 24 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda, 37 °C'de inkübe edildi.

Negatif kontrol olarak, matrijel içermeyen ve yalnızca serumsuz ortamda bulunan ancak hücre eklenmeyen kuyular hazırlandı. Pozitif kontrol olarak ise, FBS içeren fakat hücre eklenmeyen kuyular oluşturuldu.

24 saat sonra, hem insertler hem de alıcı kuyular steril 1X PBS ile yıkandı; membranların kurumasına izin verilmemesi sağlandı. Göçmemiş veya istilacı hücreler, pamuklu çubuk

kullanılarak nazikçe uzaklaştırıldı. Insertlere fiksasyon için %4 formaldehit eklendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Formaldehit ve bağlanmamış hücrelerin temizlenmesi için membranın hem üstü hem de altı steril 1X PBS ile iki kez yıkandı. Ardından, her bir kuyuya %0.2 kristal viyole boyası eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boya, 1X PBS ile iyice temizlendi. Her bir örnek, 10X objektif merceği altında çeşitli alanlardan fotoğraflandı. Hücre sayıları Image J programı ile belirlendi ve her bir örnekteki hücre sayılarının ortalaması alınarak sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi.

### **3.2.4.12.5 Flow Sitometri**

Flow sitometre deneyin de MIR100HG susturulmuş hücrelerde apoptoz gösterilmesi için Annexin V deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde ana modelimiz Hep3B hücre hattının yanında, sağlıklı karaciğer epitel modeli Clone-9 ve Mezenşimal benzeri karaciğer kanser modeli SNU-398 de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle 6 kuyulu plakalara (500,000 hücre/well) olacak şekilde MIR100HG ifadesi baskılanmış hücreler ve kontrol grubu olarak SCR hücreleri bölündü. Hücrelerin 1 gece boyunca yüzeye tutunması ve %80-90 doluluğa ulaşması sağlandı. Daha sonra hücreler PBS ile bir kez yıkandı. Ardından, hücreler Tripsin-Edta ile kaldırıldı, sonrasında hücreler 15 mL'lik falkona alınarak çöktürüldü. Daha sonra PBS ile pellet tekrar çözülerek tekrar santrifüj yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. %1 BSA içeren PBS içinde Annexin çözülerek 100 µL her örnek için eklendi. 2 dakika karanlıkta bekletildi. Bu süspansiyon hücre örnekleri Guava EasyCyte™ flow sitometri cihazında analiz edildi.

## **3.2.5 RNA Tabanlı Teknikler**

### **3.2.5.1 RNA İzolasyonu**

mRNA düzeyinde gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla hücreler üzerinde çalışmalar yürütüldü. Bu amaçla, hücreler tripsinizasyon yöntemi ile kaldırıldı ve ardından 1.000 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pellet elde edildi. Hücrelerden RNA izolasyonu, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi ve izole edilen RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

### **3.2.5.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi**

Elde edilen RNA'ların miktarını belirlemek ve saflığını değerlendirmek amacıyla, Thermo MultiskanGo µDrop™ Plate Reader cihazında absorbans ölçümü yapıldı. Her bir RNA

örneğinden 2 µL alınarak ölçüm yapıldı ve kör değeri için 2 µL dH<sub>2</sub>O eklendi. RNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülüp, A260/A280 oranı hesaplanarak RNA saflığı belirlendi. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu belirlendi

### 3.2.5.3 cDNA sentezi

İzole edilip ölçümleri yapılan RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi. 1 µg RNA'dan iki aşamalı cDNA sentezi, Thermo cDNA sentez kiti kullanılarak yapıldı. Tablo 3.15'de, cDNA sentezi için gerekli materyaller ve uygulanan koşullar verilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar, ilerleyen çalışmalar için etiketlenip -20 °C'de saklanmıştır.

**Tablo 3.14:** cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Son Konsantrasyonları</b>
RNA Kalıbı	1 µg
dH <sub>2</sub> O	X µL
OligodT Primer	1 µL
Son Hacim (V)	12.5 µL
<b>65°C'de 5 dakika</b>	
5X Reaksiyon Tamponu	1 X
dNTP Mix	20 U/µL
Ribolock RNaz İnhibitörü	1 mM
Reverse Transkriptaz	10 U/µL
Son Hacim (V)	20 µL
<b>42°C'de 60 dakika</b>	
<b>70 °C'de 10 dakika</b>	

### 3.2.5.4 Real Time PCR

Real-Time PCR reaksiyonu, 6,25 µL SYBR Green PCR master karışımı, 1 µL cDNA, 100 pmol/µL'e seyreltilmiş ileri ve geri primer stoklarından 0.5'er µL ve 4,25 µL dH<sub>2</sub>O eklenerek toplam 12,5 µL son hacminde gerçekleştirildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.17'de sunulmaktadır. Her bir cDNA örneği, hedeflenen gen ve iç kontrol gen primerleriyle,

en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Real-Time PCR reaksiyonu Tablo 3.16’da belirtilen koşullar altında yapıldı ve analizlerde Roche Light Cycler 480 cihazı kullanıldı. Sonuçlar Livak yöntemi ile değerlendirildi. Belirlenen Ct değerlerinin ortalamaları hesaplandı; ilgilenilen genin Ct ortalaması iç kontrol geninin Ct ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen bu fark, 2’nin üssü alınarak ifade edildi. Kontrol grubu normalizasyon amacıyla kendi içinde 1 olarak belirlendi ve bu veriler sütun grafiğinde gösterildi.

**Tablo 3.15:** Real Time PCR döngü şartları.

<b><u>Sıcaklık</u></b>	<b><u>Süre</u></b>	<b><u>Döngü</u></b>
94 C	4 Dakika	1 döngü
94 C	30 Saniye	
55 C	30 Saniye	35 Döngü
72 C	30 Saniye	
72 C	10 Dakika	1 Döngü

**Tablo 3.16:** Tüm PCR’larda ve Real-Time PCR’da kullanılan primerler ve dizileri.

<b><u>Primer Adı</u></b>	<b><u>Dizisi</u></b>
MIR100HG Forward	5’ -AAC TTG GCT TCC TCG CTT CT- 3’
MIR100H Reverse	5’ -TGG CTC ATG AAA ATC TAG ATG T- 3’
Hß-2 Forward	5’ -TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC- 3’
Hß-2 Reverse	5’ - CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T- 3’
SP1 Forward	5’ - AAA CAT ATC AAA GAC CCA CCA GAA T - 3’
SP1 Reverse	5’ – ATA TTG GTG GTA ATA AGG GCT GAA - 3’

### 3.2.6 Protein Tabanlı Teknikler

Tez kapsamında hem SP1 ifadesi bastırılmış hücrelerden hem de SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerden protein ekstraksiyonu için hem normoksi hem de hipoksik koşullarda protein seviyesini belirlemek amacıyla hem Western Blot hem de IFC deneyleri yapıldı.

#### 3.2.6.1 Western Blot Tekniği Kullanılarak Protein Seviyesinin Belirlenmesi

SP1 ifadesi bastırılmış hücrelerden hem de SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerden protein ekstraksiyonu için hem normoksi hem de hipoksik koşullarda protein seviyesini belirlemek amacıyla hem Western Blot hem de IFC deneyleri yapıldı.

**Tablo 3.17:** Western Blot çözeltileri ve hazırlanma yöntemleri.

Çözelti	Hazırlanışı
<b>RIPA Tamponu</b>	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0.1 (w/v) Sodyum Deoksikolat, %0.1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 içeren RIPA tamponu, proteaz inhibitörü eklenerek son hacmi tamamlandıktan sonra 15 mL'lik falkonlara bölünür. -20 °C'de saklanır.
<b>Bradford Reaktifi</b>	0.1 g Coomassie Brilliant Blue (G-250), manyetik karıştırıcı kullanılarak 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözündürüldü. Daha sonra homojen bir karışım elde etmek için %85 (w/v) fosforik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacim, dH <sub>2</sub> O ile 1 L'ye tamamlanarak çözelti, ışık geçirmeyen bir şişeye aktarıldı ve karanlık bir ortamda iki kez filtre kağıdından geçirildi. +4 °C'de saklanır.
<b>Ayrırma (Alt) Jel Tamponu</b>	18.17 g Tris-base ve 0.4 g SDS, 80 mL dH <sub>2</sub> O içinde çözündürüldü. Daha sonra pH değeri 8.8'e ayarlanarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.
<b>Yığıma (Üst) Jel Tamponu</b>	%4 (w/v) SDS ve 0.5 M Tris-base içeren bir çözelti hazırlandı. Bunun için 6 g Tris-base ve 0.4 g SDS, 80 mL dH <sub>2</sub> O içerisinde çözündürüldü. pH değeri 6,8'e ayarlandı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.
<b>Yürütme Stok Tamponu (10X)</b>	30.3 g Tris-base (0.25 M) ve 144.4 g Glisin (1.92 M) 700 mL dH <sub>2</sub> O içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH değeri 8,3'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.
<b>Transfer Tamponu</b>	100 mL 10X yürütme stok tampon, 200 mL metanol ile karıştırılarak son hacim dH <sub>2</sub> O ile 1 L'ye tamamlandı ve 500 µL %10 (w/v) SDS eklendi. Çözelti -20 °C'ye soğutulularak kullanıma hazır hale getirildi.
<b>10X Stok TBS (Tris-Buffered Saline)</b>	0.2 M Tris-base ve 1.5 M NaCl içeren bir çözelti hazırlandı. Bunun için, 24.22 g Tris-base ve 87.66 g NaCl yaklaşık 700 mL dH <sub>2</sub> O içerisinde çözülerek pH değeri 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

**Tablo 3.17:** (Devam)

<b>Bloklama</b>	%5 (w/v) Yağsız süt tozu içeren 1X TBST çözeltisi hazırlandı. 50 mL
<b>Tamponu</b>	1X TBST çözeltisi içerisine 2.5 g yağsız süt tozu eklenerek homojen bir karışım elde edildi. +4 °C'de saklandı.
<b>Ponceau Boyası</b>	Ponceau-S'in 0.1 g tartıldı, %5 (v/v) asetik asit çözeltisi içinde 100 mL olarak çözüldü.
<b>Jelden Boya</b>	Hacimce; %5 Metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH <sub>2</sub> O olacak şekilde
<b>Giderici Çözelti</b>	hazırlandı.
<b>Jel Boyama</b>	Comassie Brilliant Blue (G-250) 0.1 g tartıldı, 50 mL methanol
<b>Çözeltisi</b>	içerisinde çözülmeye dek çalkalandı. Ardından karışıma 10 mL asetik asit eklenerek homojen çözelti elde edildi. dH <sub>2</sub> O kullanılarak çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

### 3.2.6.2 RIPA Tamponu Kullanılarak Hücrelerin Lizisi ve Proteinlerin Ekstraksiyonu

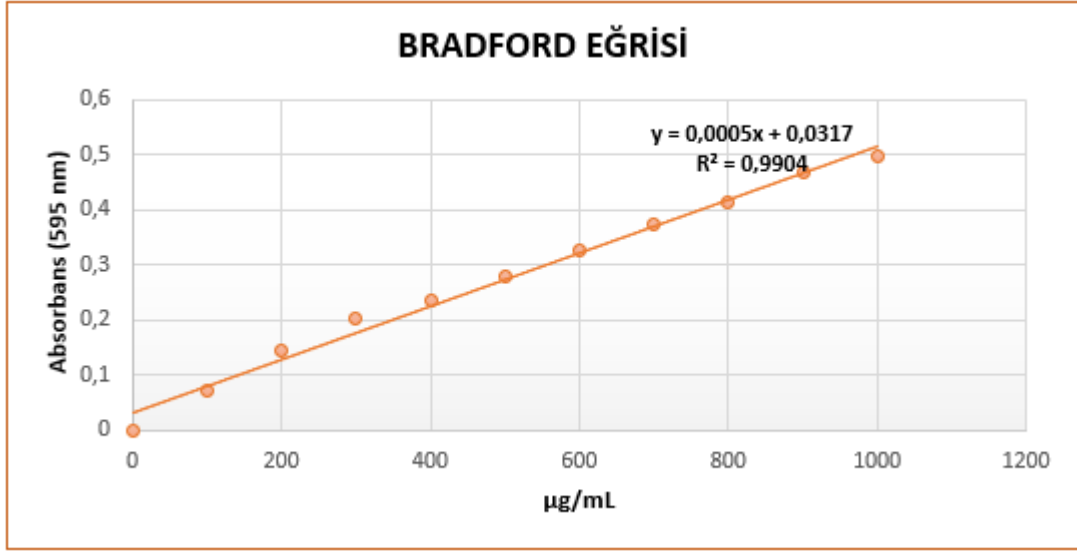
Protein ekstraksiyonu öncesinde, ekstraktların aktarılacağı ependorf tüpleri etiketlenerek soğutulmak üzere buz üzerinde bekletildi. Hücrelerden medyum uzaklaştırıldı ve iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandı. RIPA tamponu buz üzerinde eritilip her bir petri kabına 360 µL olacak şekilde eklendi ve hücreler bu tamponla buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi. Kazıyıcı %70 alkol ile sterilize edilip hücrelerin yüzeyden mekanik olarak kazınması sağlandı. Kazınan hücreler, önceden soğutulmuş etiketli ependorflara pipet yardımıyla aktarıldı. Lizisin etkili bir şekilde sağlanması amacıyla örnekler sonikasyon uygulandı. Sonikasyon cihazında buz üzerinde 2 dakika sonikasyona maruz bırakılan örnekler, ardından 2 dakika buzda bekletildi; bu döngü toplamda 3 kez tekrarlandı. İşlem sonunda, 4 °C soğutmalı santrifüjde 13.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen örneklerin hücresel atıkları pelet halinde dibe çöktü. Protein içeren süpernatant ise dikkatle alınıp temiz, soğuk ependorflara aktarıldı. Protein miktarları Bradford yöntemiyle ölçüldü ve ilerideki deneylerde kullanılmak üzere örnekler -80 °C'de saklandı.

### 3.2.6.3 Bradford Tekniği Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi için, farklı konsantrasyonlarda (100-1000 µg/mL) hazırlanan Bovine Serum Albumin (BSA) standart çözeltileri kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu. Standart eğri, örneklerdeki bilinmeyen protein miktarını hesaplamada referans değeri olarak kullanılmaktadır. Farklı konsantrasyonlardaki standart BSA çözeltilerinden 5 µL, her biri üç

tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya eklendi. Ölçümlerde kör değer olarak 5 µL dH<sub>2</sub> O kullanılarak değerlerin normalize edilmesi sağlandı. Her kuyucuğa 250 µL Bradford reaktifi ilave edilip pipetleme ile karıştırıldı, ardından çözeltiler karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. Absorbans değerleri, spektrofotometre cihazında 595 nm’de ölçüldü.

Standart BSA çözeltilerinden elde edilen veriler doğrultusunda Şekil 3.11’de gösterilen bir standart eğri oluşturuldu. Örneklerdeki protein miktarları, 595 nm absorbans değerleri ve standart eğriye dayalı Bradford Denklemi kullanılarak hesaplandı.



**Şekil 3.11: Bradford eğrisi ve denklemi.**

#### 3.2.6.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), protein örneklerinin dikey yönde elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. SDS-PAGE tekniğinde kullanılacak malzemeler ve Bio-Rad sistem aparatları saf su ile yıkandı, ardından %70’lik alkol ile dezenfekte edildi.

Kesintili sistemle hazırlanan jelde, önce ayırma jeli döküldü ve ardından üzerine yığılma jel eklendi. Proteinlerin büyüklüklerine göre ayrışmalarını sağlamak amacıyla %10 poliakrilamid ayırma jeli, Tablo 3.19’da belirtilen şekilde hazırlandı ve cam plakalar arasında 2-3 cm boşluk kalacak biçimde pastör pipeti ile döküldü. Ayırma jelinin üzerine %90’lık izopropanol eklenerek düz bir polimerleşme sağlanması beklendi. Jel polimerleştikten sonra izopropanol, kurutma kağıdıyla uzaklaştırıldı. Ardından %4 poliakrilamid yığılma jeli hazırlanarak döküldü. Camlar arasında uygun boyutta tarak yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için oda sıcaklığında beklenildi. Jel polimerleşince taraklar, kuyulara zarar

vermeden dikkatlice çıkarılarak jel aparatı dengeli bir şekilde 1X yürütme tamponu ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi.

Deneyde, en düşük protein miktarına sahip örnek referans alınarak bu miktara göre diğer örneklerde gerekli hesaplamalar yapıldı ve protein miktarları eşitlenecek şekilde standardize edildi. Her bir örneğe 5 µL yükleme boyası ilave edildi. Yükleme boyası, ticari olarak temin edilen 4X Laemmli örnek tamponu (90 µL) ile β-merkaptoetanol (10 µL) karıştırılarak hazırlandı. Örneklerin toplam hacmi, yığılma jel tamponu kullanılarak 25 µL'ye tamamlandı. Proteinlerin denatüre olması için örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Yığılma jelinin ilk kuyusuna, moleküler ağırlık tayini için 5 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo) yüklenirken, diğer kuyulara 25 µL protein örneği yerleştirildi. Yükleme işleminin ardından, jel serbest miliamper değerinde ve 80 V'ta yaklaşık 3.5-4 saat süreyle elektrik akımında yürütüldü.

**Tablo 3.18:** SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Ayrırma Jeli	Yığılma Jeli
	(%10 Poliakrilamid)	(%4 Poliakrilamid)
<b>Ayrırma (Alt) Jel Tamponu</b>	2.5 mL	-
<b>Yığılma (Üst) Jel Tamponu</b>	-	2.5 mL
<b>Akrilamid/Bisakrilamid (%40)</b>	2.5 mL	625 µL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5 mL	3.05 mL
<b>%10 (w/v) APS</b>	100 µL	50 µL
<b>TEMED</b>	10 µL	5 µL

### 3.2.6.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi

Proteinlerin SDS-PAGE jellerinden PVDF (Milipore™) membrana transferi, Bio-Rad Trans Blot sistemi ile yapıldı. SDS-PAGE'te yürütülen jel, transfer öncesinde dengelenmesi amacıyla soğuk transfer tamponu içeren bir kaptaki 5 dakika bekletildi. Aparat yardımıyla camlar birbirinden ayrıldı ve üst kısım kesilerek üst jel atıldı. Jel soğuk transfer tamponunda bekletildi, bu süreçte transfer için gerekli olan Whatman 3 MM kağıdı ve süngerler de hazırlandı. Aktifleştirilmesi gereken PVDF membran, 8 x 6 cm boyutlarında kesilmiş ve aktif yüzeyi aşağı bakacak şekilde bir kaptaki 2 dakika boyunca metanol içinde bekletildi. Ardından, membran soğuk transfer tamponuna alındı ve burada da 2 dakika bekletildi.

Transfer kasetinde (-) kutuptan başlayarak "sünger-3 filtre kağıdı-jel-membran-3 filtre kağıdı-sünger" sırasıyla katmanlar oluşturulmuş ve katmanların üzerine silindirik aparat geçirilerek transfer sürecini bozabilecek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Transfer kaseti, negatif kutuptan pozitif kutuba doğru kapatılarak soğuk transfer tamponu bulunan tanka yerleştirildi. Transfer işlemi, serbest voltaj ve 35 mA akım ile gece boyunca +4 °C'de gerçekleştirildi.

### **3.2.6.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Tekniği ile Tespiti**

Protein transferinin ardından, PVDF membran üzerinde spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi için bloklama işlemi yapıldı. Bu amaçla, membran aktif yüzeyi yukarı bakacak şekilde temiz bir kaba alındı ve üzerine 20 mL bloklama tamponu (Tablo 3.25) eklendi. Yaklaşık bir buçuk saat boyunca oda sıcaklığında, horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran, 1X TBST solüsyonu ile üç kez, her defasında 5 dakika süreyle horizontal çalkalayıcıda yıkandı.

SP1 ve  $\beta$ -aktin protein bantlarını görüntülemek amacıyla membran uygun noktalardan kesilerek her bir parça ilgili primer antikorla muamele edildi. Bloklama tamponunda 1/400 oranında seyreltilmiş SP1 antikor ve 1/5000 oranında seyreltilmiş  $\beta$ -aktin antikor kullanıldı. Membran parçaları, 4 °C'de bir gece boyunca döner çalkalayıcıda inkübasyona alındı, ardından 1X TBST tamponunda üç kez 5'er dakika yıkandı. Sonraki aşamada, sekonder antikorlarla (Mouse  $\beta$ -aktin için 1/10.000, Rabbit SP1 için 1/10.000 oranında seyreltilmiş) oda sıcaklığında bir saat boyunca döner çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre tamamlanınca membranlar üç kez, her defasında 5 dakika TBST tamponunda yıkandı ve görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

### **3.2.6.7 Görüntüleme ve Analiz**

Proteinlerin saptanması amacıyla, belirli antikorlarla etiketlenen proteinler için (Pierce™) ECL Western Blot substratı kullanılarak görüntülendi. ECL substratı, membranda primer ve sekonder antikorlarla etiketlenen proteinlere bağlanarak ışık yayılmasına yol açtı; böylece hedef proteinlerin varlığı ve yoğunluğu görsel olarak tespit edildi. Fusion FX görüntüleme sistemi tarafından algılanan bu ışık emisyonu ile görüntü oluşturulup, fotoğraf kaydı cihaz yardımıyla alındı. Protein bantlarının fotoğraf analizi için Image J yazılımı kullanılarak, protein bantlarının yoğunluk değerleri belirlendi. Ayrıca,  $\beta$ -aktin proteini normalizasyon

referansı olarak incelendi. SP1 ve  $\beta$ -aktin analiz sonuçları, aynı örnekteki iki proteinin oranları dikkate alınarak GraphPad Prism yazılımında grafiklerle ifade edildi.

### 3.2.6.8 İmmünofloresan (IFC) Deneyi

Bu deney kapsamında, Hep3B hücrelerinde SP1 overekspresyon edilmiş hücreler, SP1 susturulmuş hücreler ve kontrol grupları arasında antijen-antikor kompleksinin floresan mikroskopta görüntülenmesi hedeflendi. Her bir kuyucuğa  $125 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde, steril yuvarlak lameller yerleştirildi ve 24 kuyucuklu plaka üzerine hücreler eklendi. Hücrelerin yüzeye tutunması amacıyla plaka, bir gece  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonra, hücrelerden tam besiyeri çıkarıldı ve hücreler iki kez 1X PBS ile yıkanarak temizlendi. Fiksasyon için hücrelere 250  $\mu\text{L}$  %4 paraformaldehit çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ardından fiksatif ortam uzaklaştırılarak hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücre zarlarını geçirgenleştirmek için %0.1 Triton X-100 içeren 250  $\mu\text{L}$  PBS eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi, ardından hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Bloklama amacıyla %1 BSA içeren 250  $\mu\text{L}$  PBS eklenerek hücreler oda sıcaklığında bir saat bekletildi, sonrasında iki kez 1X PBS ile 5 dakika süreyle yıkandı.

Daha sonra, 100  $\mu\text{L}$  primer antikor (1/200 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilmiş SP1 antikor) eklenerek, nemlendirilmiş bir kutuda  $4^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün primer antikor ortamdaki uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 1X PBS ile 5 dakika yıkandı. Kalan işlemler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda yürütüldü. Sekonder antikor olarak 1/400 oranında %1 BSA ile seyreltilmiş Alexa Fluor™ 488 anti-rabbit antikor (100  $\mu\text{L}$ ) kullanılarak nemli bir ortamda bir saat inkübe edildi. Sekonder antikor çıkarıldıktan sonra hücreler üç kez 1X PBS ile 5 dakika süreyle yıkandı. Yıkamanın ardından 300 nM DAPI çözeltisi eklenerek hücreler 1-5 dakika karanlık ortamda bekletildi ve ardından üç kez 1X PBS ile yıkama işlemi uygulandı. Mikroskop incelemesi için yuvarlak lameller dikkatlice kuyucuklardan çıkarıldı ve floresan sinyallerin korunması amacıyla antifade reaktif damlatılmış lamlar üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Lamellerin kenarları saydam oje ile sabitlenip karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakıldı. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskop kullanılarak gözlemlendi ve fotoğraflandı. Floresan görüntüleri ImageJ programı ile analiz edilerek değerlendirildi.

### **3.2.7 DNA-Protein Etkileşim Tekniği (ChIP)**

Hep3B hücre hattında SP1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotoruna bağlanmasının doğrulanması amacıyla ChIP deneyi yapılmıştır.

#### **3.2.7.1 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Fiksasyon**

MIR100HG geni promotorunda bulunan SP1 transkripsiyon faktörünün DNA-Protein etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla Hep3B hücreleri ile Kromatin Immuno Presipitasyonu (ChIP) Deneyi gerçekleştirildi. Hep3B hücreleri, 100 mm petri kabında yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra deney için hazırlandı. Hücreler tutunduktan sonra SP1-ekspresyon plazmiti bölüm 3.2.4.11.1'de anlatıldığı şekilde SP1 aşırı ifadesini sağlamak için transfekte edildi. 24 saat sonra a ChIP deneyi için hazırlık yapıldı. Hücrelerin fikse edilmesi için hücre kültür ortamına %37'lik formaldehit çözeltisinden 366.6 µL eklendi ve oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 15 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Reaksiyona girmemiş formaldehit kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla karışıma 1.3 mL 10X Glisin eklendi ve oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak 5 dakika inkübe edildi. Hücre kültür kabı buz üzerine yerleştirildi ve soğuk 1X PBS ile üç kez yıkandı. Yıkama işlemi sonrası, her 1 mL PBS içerisine 3.25 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II eklenerek hücreleri kazıma aşamasına geçildi. Hücrelerin toplanacağı ependorf tüpler buzda soğutuldu ve içerisine soğuk, proteaz inhibitörlü PBS'den 2 mL eklendi. Hücreler buzda 5 dakika bekletildi ve kazıyıcı ile toplandıktan sonra önceden soğutulmuş steril 2 mL'lik ependorflara aktarıldı. Hücreler, +4 °C'de 700 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Lizis tamponu, her bir petri kabı için 666 µL SDS Lizis Tamponu ve 3.3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II ile hazırlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti SDS lizis tamponu ile çözüldü ve 300-400 µL'lik kısımlar halinde santrifüj tüplerine bölündü.

#### **3.2.7.2 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Çapraz Bağlı DNA/Protein İmmunopresipitasyonu**

Her bir IP örneğine 600 µL soğutulmuş Dilüsyon Tamponu ve 3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli II eklendi. Dilüsyon tamponu buz üzerinde soğutulduktan sonra, -80 °C'de muhafaza edilen 100 µL hücre lizatı üzerine 600 µL Dilüsyon Tamponu ilave edilerek son hacim 700 µL'ye ulaştırıldı. Bu karışım, antikor uygulanmadan önce ön temizleme için 42 µL Protein G Agaroz ile muamele edildi ve spesifik olmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Karışım, 4 °C'de rotasyonlu döndürücüde 1 saat inkübe edildi. Ardından 5000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılarak Protein G Agaroz pelet olarak çöktürüldü, süpernatant yeni

bir ependorf tüpüne dikkatlice aktarıldı. Antikorsuz süpernatanttan %10 input olacak şekilde 7 µL ayrılarak sonraki basamaklar için +4 °C’de saklandı. Süpernatant üzerine uygun antikorlar eklendi (Tablo 3.20). Antikor eklendikten sonra karışım, 4 °C’de rotasyonlu çalkalayıcıda gece boyunca inkübe edildi. Antikor/antijen/DNA kompleksini Protein G Agaroz ile birleştirmek için ertesi gün, her IP örneğine 42 µL Protein G Agaroz eklendi ve +4 °C’de 1 saat rotasyonlu çalkalayıcıda inkübe edildi. Pelet haline getirilen Protein G Agaroz, 5000 x g’de 1 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü ve süpernatant dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı. Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin kompleksleri, Tablo 3.21’de belirtilen tamponlarla yıkanıp 700 µL tamponda resüspanse edildi. Her yıkama sonrası, 5000 x g’de 1 dakika santrifüj işlemiyle Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin komplekslerinin yıkama işlemi tamamlandı.

**Tablo 3.19:** ChIP prosedüründe kullanım amacına göre antikorlar ve miktarları.

<b>Kullanım Amacı</b>	<b>Antikor</b>
<b>Pozitif Kontrol</b>	Anti-RNA Polimeraz II (1 µg)
<b>Negatif Kontrol</b>	Normal Mouse IgG (1 µg)
<b>İlgilenilen Antikor (Mouse)</b>	SP1 (Rabbit) (1 µg)

**Tablo 3.20:** ChIP prosedüründe kullanılan yıkama tamponları ve yıkama sayıları.

<b>Tampon İsimleri</b>	<b>Yıkama Sayısı</b>
<b>Düşük Tuzlu Yıkama Tamponu</b>	1
<b>Yüksek Tuzlu Yıkama Tamponu</b>	1
<b>LiCl İçeren Yıkama Tamponu</b>	1
<b>TE Tamponu</b>	2

### 3.2.7.3 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu

Her IP tüpü için hazırlanan elüsyon tamponu, 7 µL %20 SDS, 14 µL 1 M NaHCO<sub>3</sub> ve 119 µL dH<sub>2</sub>O içerecek şekilde hazırlandı. Ayrılan input örneğine 140 µL elüsyon tamponu eklenip, Bölüm 3.2.7.4’e kadar oda sıcaklığında bekletildi. Kromatin/Antikor/Protein G Agaroz kompleksi içeren her IP tüpüne 70 µL elüsyon tamponu eklenerek, tüpler hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Sonrasında, tüpler 5000 x g’de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant temiz tüplere aktarıldı. Elüsyon tamponu eklenmesi ve inkübasyon-santrifüj işlemleri bir kez daha tekrarlandı.

#### **3.2.7.4 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi**

Bölüm 3.2.7.3'te hazırlanan %10 input ve IP örneklerine, her birine 5.6 µL 5M NaCl eklenerek, örnekler 65 °C'de sıcak su banyosunda gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, her örneğe 0.7 µL RNaz A ilave edilip, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. RNaz A'nın etkisiz hale getirilmesi için, her örneğe 2.8 µL 0.5M EDTA, 5.6 µL 1M Tris-HCl ve 0.7 µL Proteinaz K içeren bir karışım eklendi. Bu işlem ardından örnekler, 45 °C'de 1-2 saat süreyle su banyosunda bekletildi.

#### **3.2.7.5 Kromatin İmmunopresipitasyonunda DNA'nın Saflaştırılması**

Her IP örneği ve input için kitin sunduğu spin filtreler ve toplama tüpleri hazırlandı. İçinde 140 µL örnek bulunan her tüpe, 700 µL Bind Reagent A eklenip iyice karıştırıldı (her 140 µL örnek için 5 katı Bind Reagent A eklenmiş oldu). Bu aşamada örneklerde presipitasyon oluştuğu gözlemlendi. Presipite olmuş 600 µL Numune/Bağlama Reaktifi A karışımı spin filtreye aktarılarak 13.500 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Spin filtre toplama tüpünden alındı ve tüpteki sıvı uzaklaştırıldı. Spin filtre toplama tüpüne geri yerleştirilip kalan 600 µL karışım filtreye alındı ve kolondan geçirme işlemi tekrarlandı.

Filtre üzerine kit içindeki Yıkama Reaktifi B'den 350 µL eklendi, ardından 13.500 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kısım atılarak spin filtre boş şekilde bir kez daha santrifüjlendi. Steril bir ependorf tüpe alınan spin filtrenin beyaz membran kısmına 35 µL Elüsyon Tamponu C eklendi, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve ardından 13.500 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Spin filtre membranından elde edilen elüat saflaştırılmış DNA olup, Tablo 3.22'deki primerlerle Tablo 3.23'teki koşullarda Real Time PCR'a tabi tutuldu. Bu işlem SP1 bağlanma bölgelerinin tespitini sağladı. Elde edilen saf DNA, uzun süreli saklama için -20 °C'de muhafaza edildi.

**Tablo 3.21:** ChIP Real Time PCR’ında kullanılan primerlerin lokasyonları, dizileri ve büyüklükleri.

Primer Adı	Primer dizileri (5’-3’)
ChIP 1 İleri	5’-CAACTCACACAGAGGCTGTTCTT-3’
ChIP 1 Geri	5’-AACTTCTGCGCTTCCAAAATTCC-3’
ChIP 2 İleri	5’-CAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGA-3’
ChIP 2 Geri	5’-CTGCATGGCTTACGCGCTGCAT-3’

**Tablo 3.22:** ChIP Real Time PCR döngü şartları.

Segment	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön İnkübasyon	95 C	10 Dakika	1 döngü
	95 C	30 Saniye	
Amplifikasyon	55 C	30 Saniye	35 Döngü
	72 C	30 Saniye	
Erime Eğrisi	95 C	5 Saniye	1 Döngü
	65 C	1 Dakika	
Soğutma	40 C	30 Saniye	1 Döngü

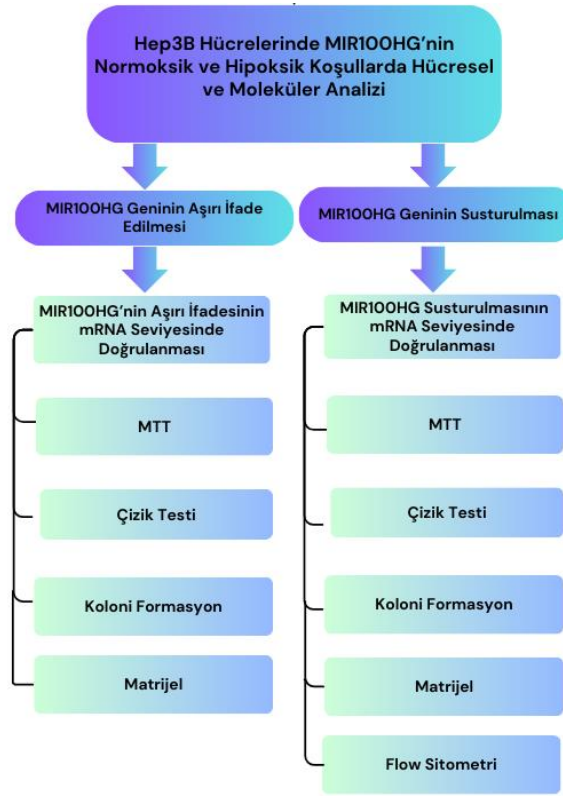
### 3.2.7.6 Sonuçların Analiz Edilmesi

Real-time PCR sonuçları Microsoft Excel’de analiz edildi. Analiz sırasında, Input CT değerlerinden %1 Log değeri çıkarılarak düzeltilmiş (Adjusted) Input değerleri hesaplandı. Bu düzeltilmiş Input değerlerinden örnek CT değerleri çıkarılarak delta CT ( $\Delta$ CT) değerleri belirlendi. Bu  $\Delta$ CT değerlerinin 2 tabanında üssü alınarak, sonuçlar 100 ile çarpılarak % Input değerleri elde edildi ve bu değerlerin ortalamaları alındı. Örneklerin % Input değerleri, negatif kontrolün % Input ortalamasına göre kat olarak ifade edildi. Elde edilen % Input kat ortalamaları ve standart sapma değerleri kullanılarak, sonuçlar GraphPad Prism programında grafikte gösterildi [111].

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hep3B Hücrelerinde MIR100HG'nin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel ve Moleküler Analizi

Hep3B hücrelerinde MIR100HG'nin normoksik ve hipoksik koşullardaki hücresel ve moleküler etkilerini analiz etmek amacıyla, MIR100HG'nin aşırı ifade edilmesi ve baskılanması gerçekleştirilmiş; mRNA düzeyinde doğrulanan hücrelerde MTT, çizik testi, koloni formasyon, matrijel ve flow sitometri deneyleri uygulanmıştır. (Şekil 4.1)



**Şekil 4.1:** Hep3B hücrelerinde MIR100HG'nin normoksik ve hipoksik koşullarda hücresel ve moleküler analizi akış diyagramı.

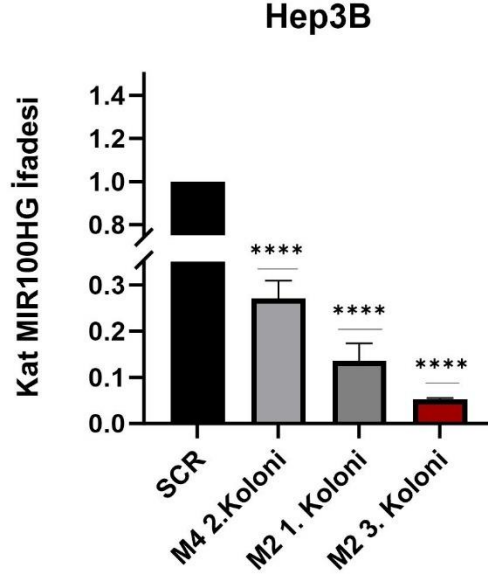
#### 4.1.1. MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanması Çalışmaları

MIR100HG geninin baskılanma çalışmaları için Aylin Türkoğlu tarafından klonlanan shRNA'lar kullanılmıştır. Klonlama çalışmalarında kullanılan primerler Tablo 4.1 'de verilmiştir.

**Tablo 4.1:** MIR100HG genine özgü tasarlanan sh-RNA oligoları ve dizileri.

<b>Primer</b>	<b>Dizisi (5'-3')</b>
<b>422 Başlangıç Pozisyonu için (M1) Forward Oligo</b>	5' CCGG—AAGACTGAAGAGACTGCTATA—CTCGAG—TATAGCAGTCTCTTCAGTCAA—TTTTTG 3'
<b>422 Başlangıç Pozisyonu için (M1) Reverse Oligo</b>	5' AATTCAAAAA—AAGACTGAAGAGACTGCTATA—CTCGAG—TATAGCAGTCTCTTCAGTCAA 3'
<b>968 Başlangıç Pozisyonu için (M2) Forward Oligo</b>	5' CCGG—AAATCACTGCTTCTAAAGAGT—CTCGAG—ACTCTTTAGAAGCAGTGAAAA—TTTTTG 3'
<b>968 Başlangıç Pozisyonu için (M2) Reverse Oligo</b>	5' AATTCAAAAA—AAATCACTGCTTCTAAAGAGT—CTCGAG—ACTCTTTAGAAGCAGTGAAAA 3'
<b>1830 Başlangıç Pozisyonu için (M3) Forward Oligo</b>	5' CCGG—AAGTTTATCAGCATTTCAGAC—CTCGAG—GTCTGAAATGCTGATAAACTT—TTTTTG 3'
<b>1830 Başlangıç Pozisyonu için (M3) Reverse Oligo</b>	5' AATTCAAAAA—AAGTTTATCAGCATTTCAGAC—CTCGAG—GTCTGAAATGCTGATAAACTT 3'
<b>2907 Başlangıç Pozisyonu için (M4) Forward Oligo</b>	5' CCGG—AAAGTGTGACTTTGTTGACAT—CTCGAG—ATGTCAACAAAGTCACACTTT—TTTTTG 3'
<b>2907 Başlangıç Pozisyonu için (M4) Reverse Oligo</b>	5' AATTCAAAAA—AAAGTGTGACTTTGTTGACAT—CTCGAG—ATGTCAACAAAGTCACACTTT 3'

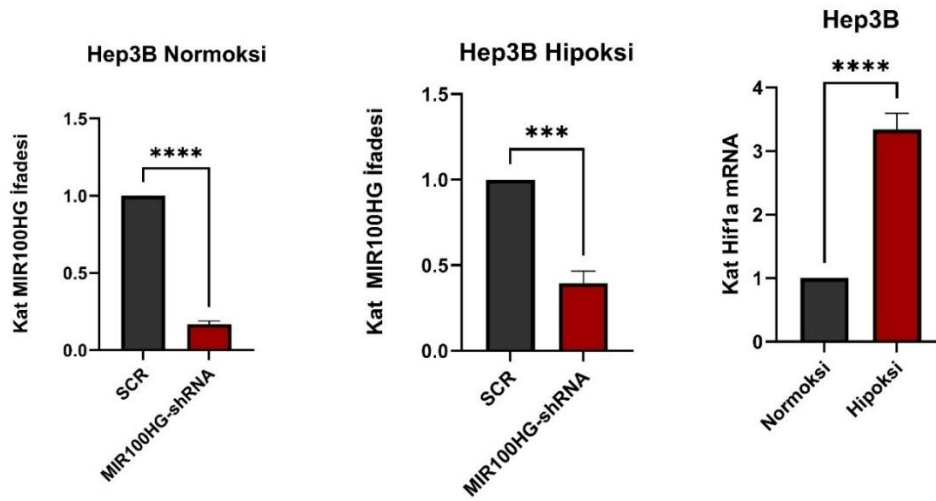
Rekombinant olan ve doğruluğu dizileme ile doğrulanan plazmitlerin yüksek konsantrasyonda ve büyük ölçekte izolasyonu (Bölüm 3.2.3.8) yapıldı. MIR100HG ifadesini baskılama çalışmaları için HEK293-T hücrelerine Bölüm 3.2.4.10.2'de anlatıldığı gibi geçici transfeksiyon yapıldı. Hep3B hücrelerine Bölüm 3.2.4.10.3'de anlatıldığı gibi transdüksiyon yapıldı. Belirli aralıklarla promisin uygulaması yapıldı ve tek koloni seçildi (Bölüm 3.2.4.10.5). Üç koloninin MIR100HG RNA ekspresyonu belirlendi. Hep3B hücreleri için koloni taraması yapıldı ve MIR100HG ekspresyon primerleri ile RNA seviyesinde susmuş olan hücreler belirlendi. (Şekil 4.2). Buna göre M2 3. Koloni susturma çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi. Susturma çalışmalarında kullanılmak üzere Hep3B MIR100HG-shRNA, ve SCR-shRNA hücreleri Bölüm 3.2.4.5'de anlatıldığı şekilde pasajlanarak büyütüldü ve hücre stokları yapıldı.



**Şekil 4.2:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesi baskılanan kolonilerin Real-Time PCR ile belirlenmesi.

#### 4.1.1.1 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Ekspresyon Seviyesinin Doğrulanması

Elde edilen kolonilerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. MIR100HG ifadesinin kontrolü için MIR100HG ekspresyon ve H $\beta$ 2 primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirildi. (Şekil 4.3)



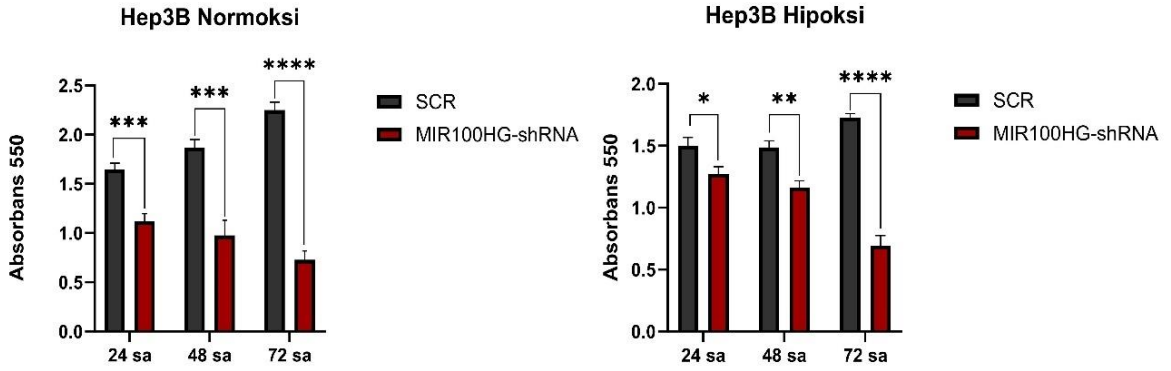
**Şekil 4.3:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin doğrulanması.

Deneyler hem hipoksik hem de normoksik koşullar altında ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması amacıyla HIF-1 $\alpha$  seviyesi analiz edildi, normoksiye göre yaklaşık 3 kat artış görüldü. Hep3B hücre hattında kontrol olarak kullanılan SCR-shRNA grubuna göre, MIR100HG-shRNA hem normoksida hem de hipoksida istatistiki olarak anlamlı olan azalmalar belirlenmiştir.

#### 4.1.1.2 MIR100HG Geninin İfadesinin Baskılandığı Hep3B Hücrelerinde Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

##### 4.1.1.2.1 MTT

Hep3B hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi deneyi gerçekleştirildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.1’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda SCR grubuna göre, MIR100HG-shRNA hücrelerinde hücre proliferasyonunun azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.

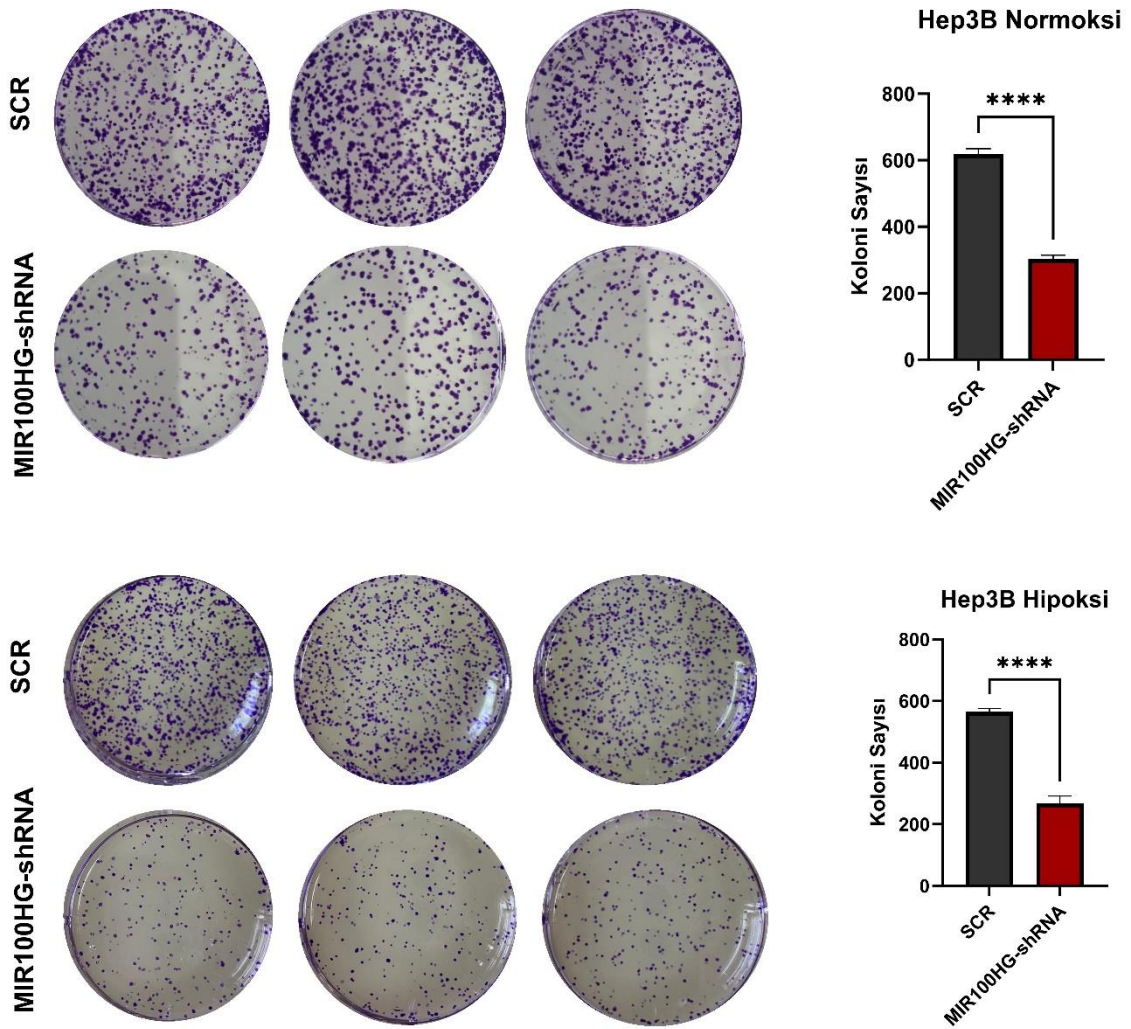


**Şekil 4.4:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

##### 4.1.1.2.2 Koloni Formasyon

Hep3B hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi için yapılan koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için

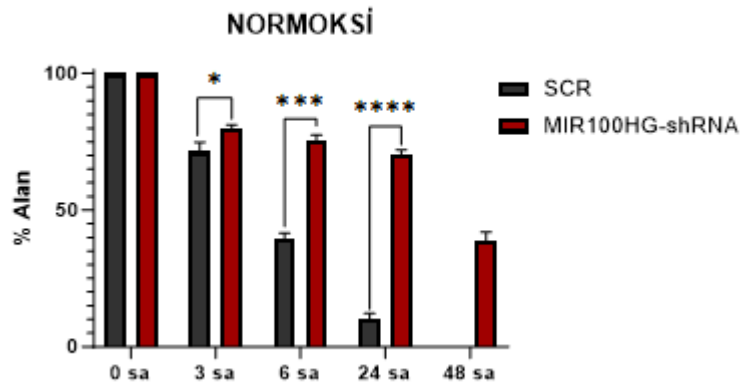
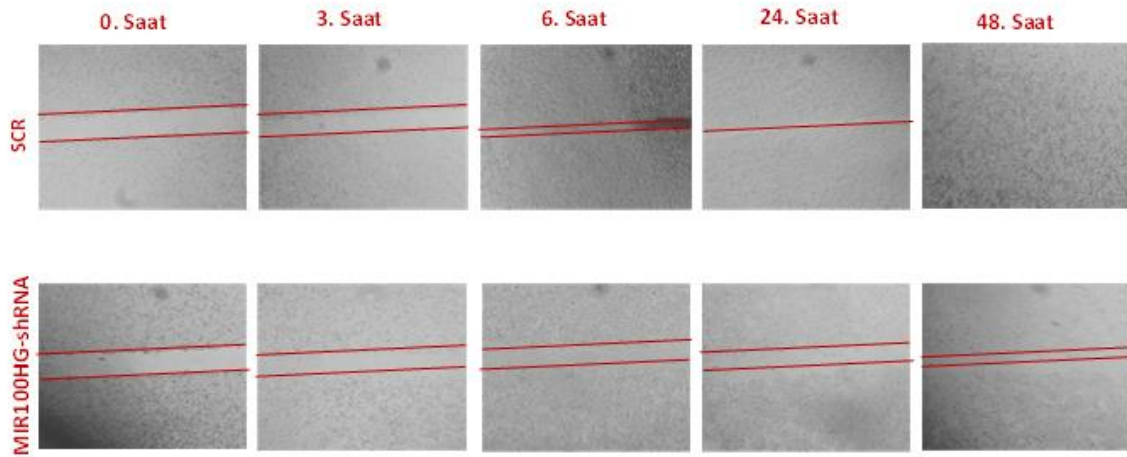
hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.3'te anlatıldığı şekilde 14 gün 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü ve 14. Gün sonuç alındı. Kuyular fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter Programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi. Elde edilen verilere göre, normoksik ve hipoksik şartlarda SCR grubuna göre, MIR100HG-shRNA hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesinin azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.



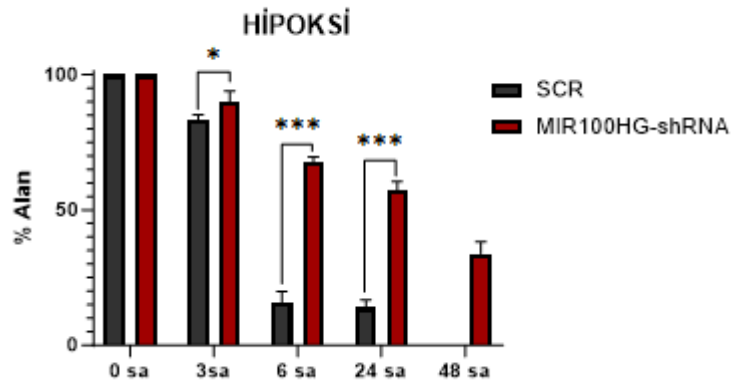
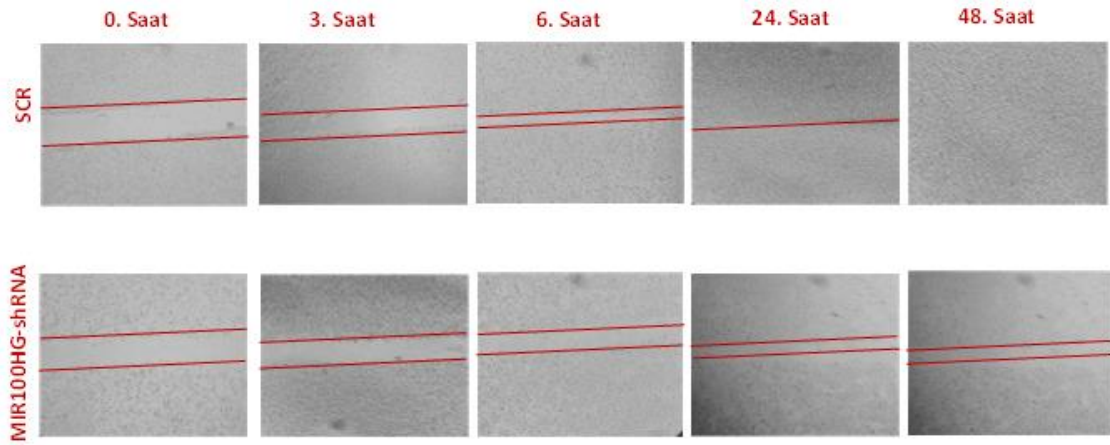
**Şekil 4.5:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni Formasyon analizi.

#### 4.1.1.2.3 Çizik Testi

Hep3B hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çizik testi deneyi yapıldı. (Bölüm 3.2.4.12.2) Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.2 'de anlatıldığı şekilde 0. Saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6-24 ve 48. Saatlerde fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi.



**Şekil 4.6:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi.

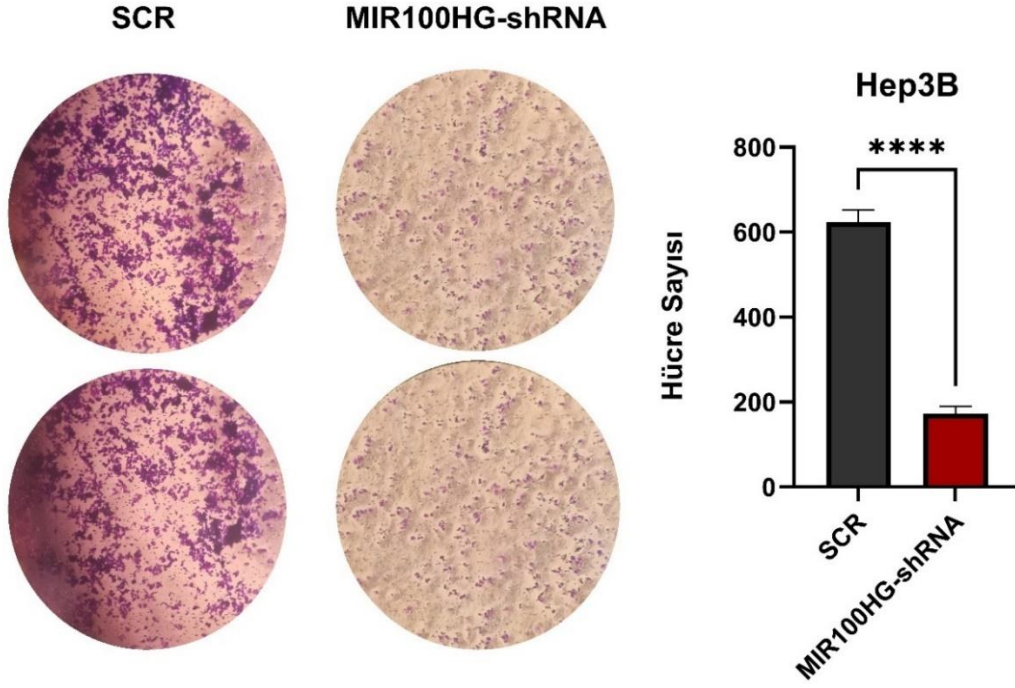


**Şekil 4.7:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi.

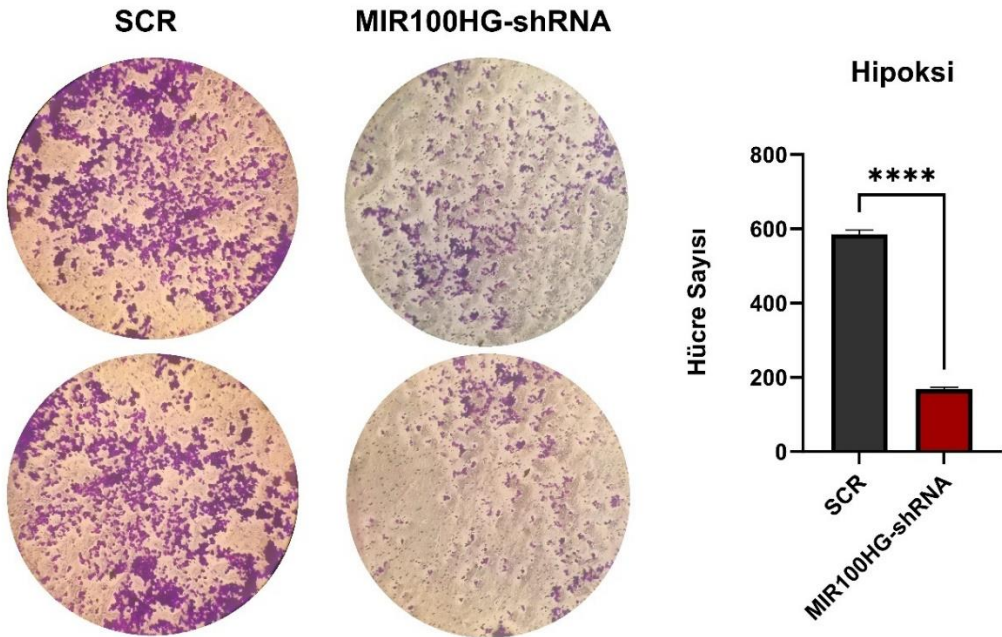
Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda SCR grubuna göre, MIR100HG-shRNA hücrelerinde daha yavaş bir kapanma olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.

#### 4.1.1.2.4 Matrijel

Hep3B hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda migrasyon-invazyon yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.4.12.4' de anlatıldığı şekilde matrijel deneyi yapıldı. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Hücre sayıları Image J programının hücre sayacı eklentisi Cell Counter ile belirlendi. Her bir örnek için, birden fazla alandan gelen hücre sayılarının ortalaması alınarak, sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi.



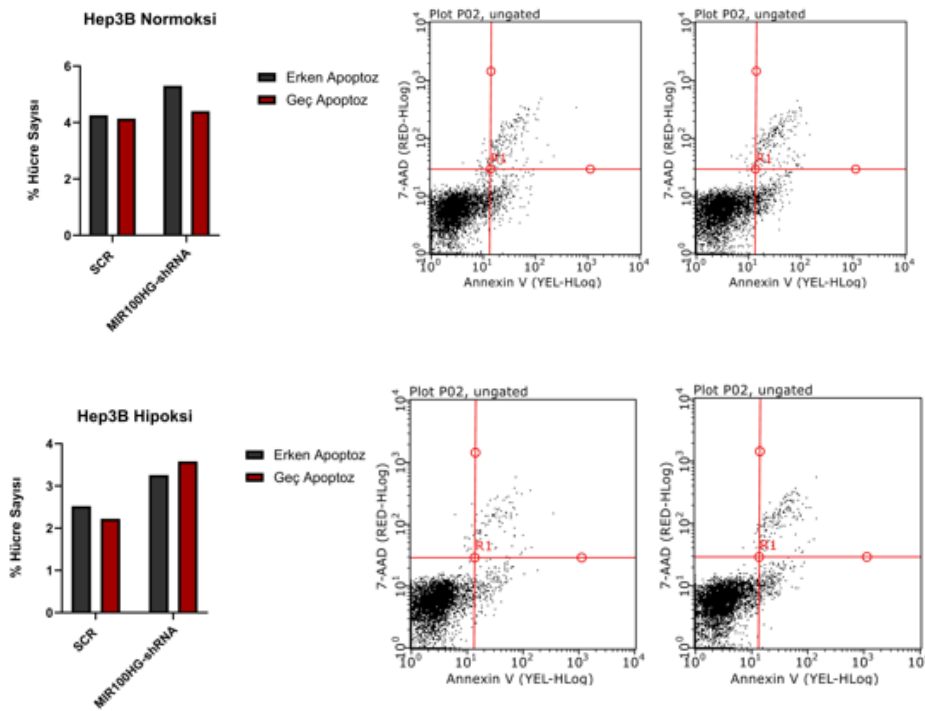
**Şekil 4.8:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda matrijel analizi.



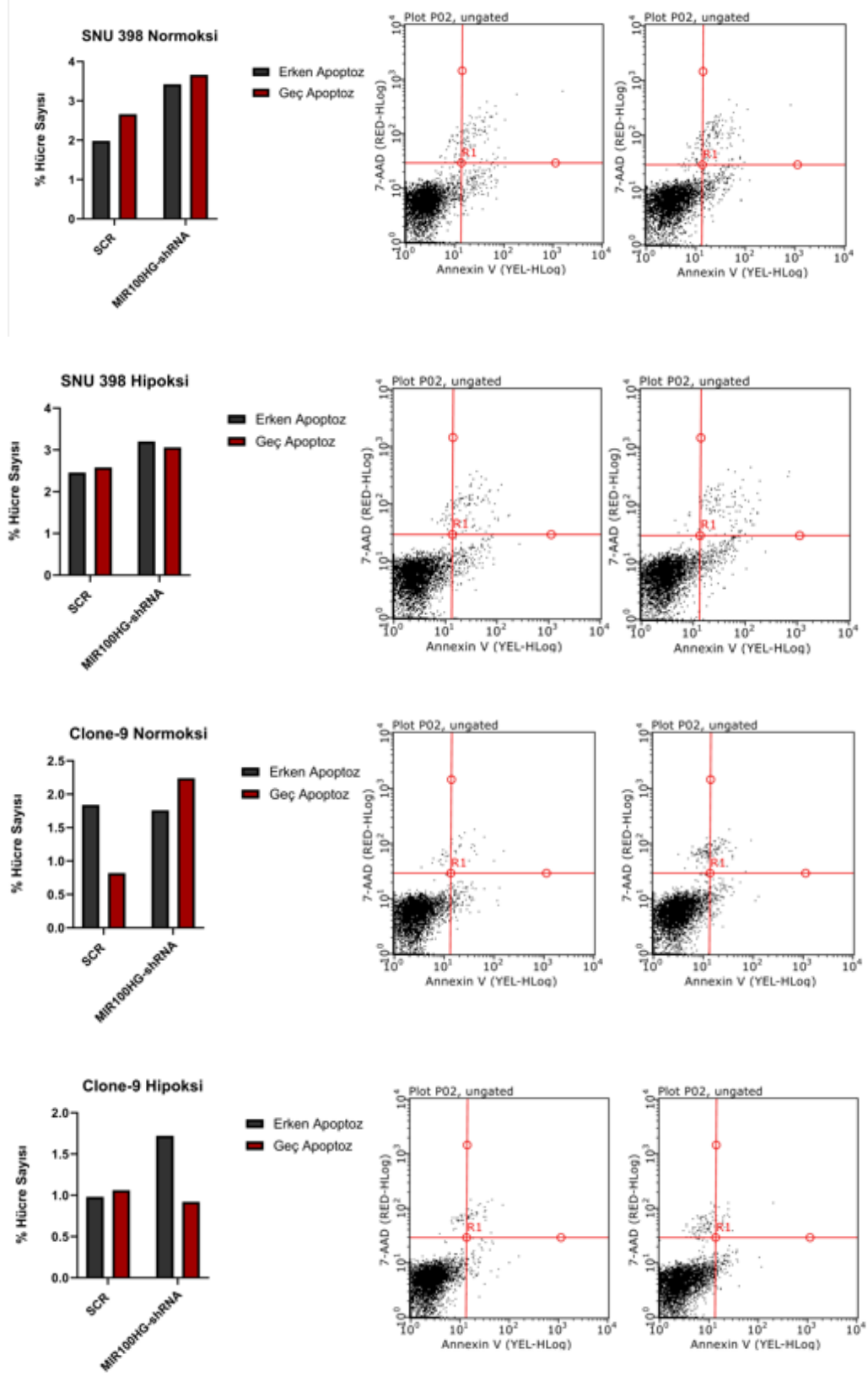
**Şekil 4.9:** Hep3B hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda matrijel analizi.

#### 4.1.1.2.5 Flow Sitometri

Flow sitometre deneylerinde MIR100HG susturulmuş hücrelerde apoptoz gösterilmesi için Annexin V deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde ana modelimiz Hep3B hücre hattının yanında, sağlıklı karaciğer epitel modeli Clone-9 ve Mezenşimal benzeri karaciğer kanser modeli SNU-398 de gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp 2 kez PBS ile yıkanıp medyum uzaklaştırılmıştır. Daha sonra Bölüm 3.2.4.12.5’ de anlatıldığı gibi flow sitometri deneyi yapılmıştır. Sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirilmiştir (Şekil 4.10). Hep3B hücrelerinde normoksik koşullarda, SCR grubuna kıyasla MIR100HG ifadesi baskılanan hücrelerde erken apoptoz eğilimi artmıştır. Hipoksik koşullarda ise bu hücrelerde geç apoptoz eğilimi, erken apoptoza kıyasla daha belirgin bir şekilde artmıştır. SNU-398 hücrelerinde normoksik koşullarda, MIR100HG ifadesi baskılanan hücrelerde hem erken apoptoz hem de geç apoptoz eğiliminde bir artış gözlenmiştir. Hipoksik koşullarda ise bu artış özellikle erken apoptozda daha belirgin olmuştur. Clone-9 hücrelerinde normoksik koşullarda, MIR100HG ifadesi baskılanan hücrelerde geç apoptoz eğilimi artarken, hipoksik koşullarda bu eğilim erken apoptoza yönelmiştir.



**Şekil 4.10:** MIR100HG ifadesi baskılanmış Hep3B, SNU 398 ve Clone-9 hücrelerinde annexin 5 boyamasının flow sitometre analizi.



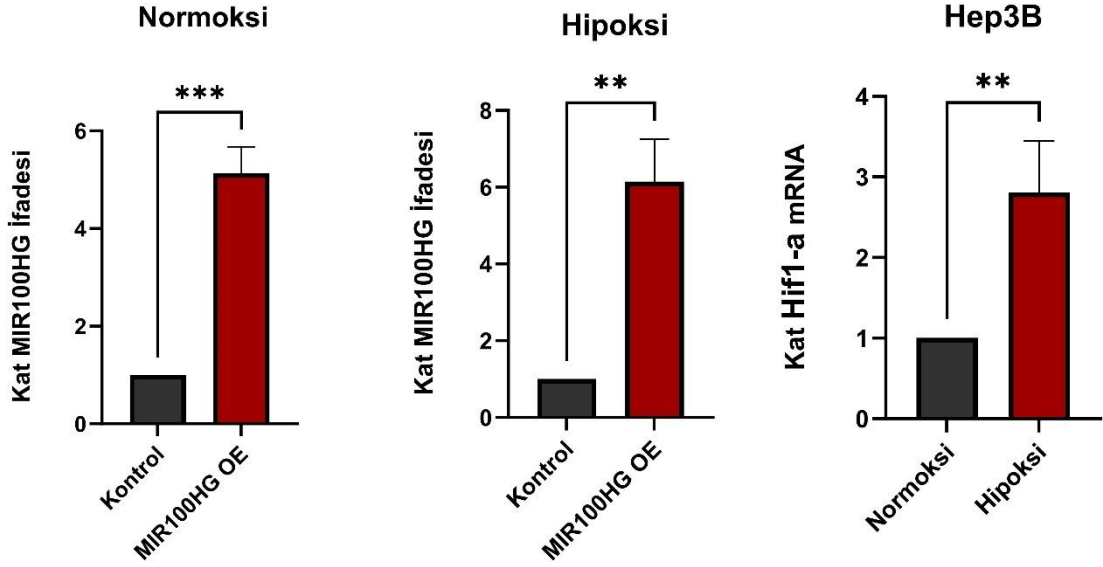
Şekil 4.11: (Devam)

#### **4.1.2 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları**

Tez kapsamında Hep3B hücre hattında, MIR100HG aşırı ifadesinin hücrelerin karakterizasyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2.4.11.1’de anlatıldığı şekilde pcDNA3.1 vektörüne klonlanmış halde bulunan MIR100HG geninin ve kontrol olarak kullanılacak olan boş pcDNA3.1 vektörünün Hep3B hücre hattına TurboFect™ Reagent ile transfeksiyonu gerçekleştirildi. Boş vektör ve MIR100HG aşırı ifade edilen hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.2.5.1). Bölüm 3.2.5.3’te anlatıldığı şekilde cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA’ların MIR100HG ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ile analiz edildi (Bölüm 3.2.5.4). Kontrol grubuna kıyasla, overekspresyon yapılan deney gruplarında MIR100HG aşırı ifadesi doğrulandı. Ardından MIR100HG aşırı ifadesinin Hep3B hücreleri üzerindeki, proliferasyonu, koloni oluşturma kapasitesi, hücre göçü ve migrasyon invazyon gibi etkilerini tespit etmek amacıyla MTT testi, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri gerçekleştirildi.

##### **4.1.2.1 MIR100HG Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Ekspresyon Seviyesinin Doğrulanması**

MIR100HG geninin Hep3B hücrelerinde aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullar altında ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için bölüm de anlatıldığı gibi Real-Time PCR yapıldı. Real-Time PCR sonuçları, GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 4.11). Deney hem hipoksik hem de normoksik ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması için HIF-1 $\alpha$  seviyesi analiz edildi ve normoksiye göre yaklaşık 3 kat artış görülmüştür. Hep3B hücre hattında kontrol grubuna göre, pcDNA3.1-MIR100HG vektörü overekspre edilen hücrelerde normokside yaklaşık 5 kat ve hipokside yaklaşık 6 kat istatistiki olarak anlamlı olan artış belirlenmiştir.

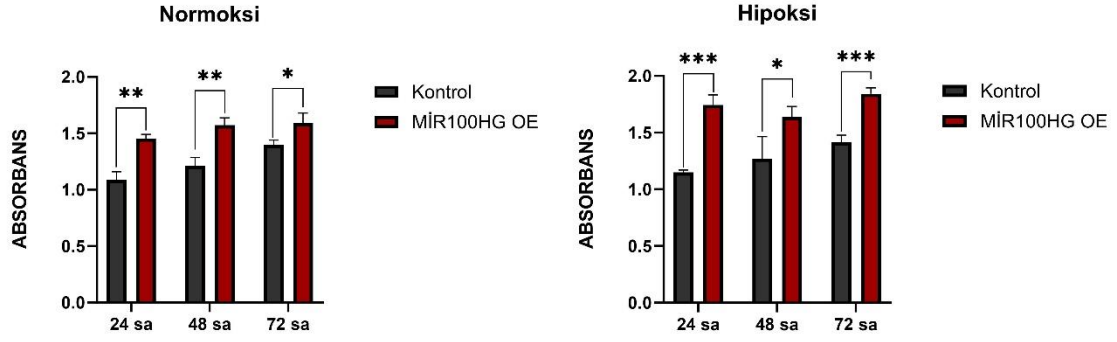


**Şekil 4.12:** Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin doğrulanması.

#### 4.1.2.2 MIR100HG Geninin Aşırı İfade Edildiği Hep3B Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

##### 4.1.2.2.1 MTT

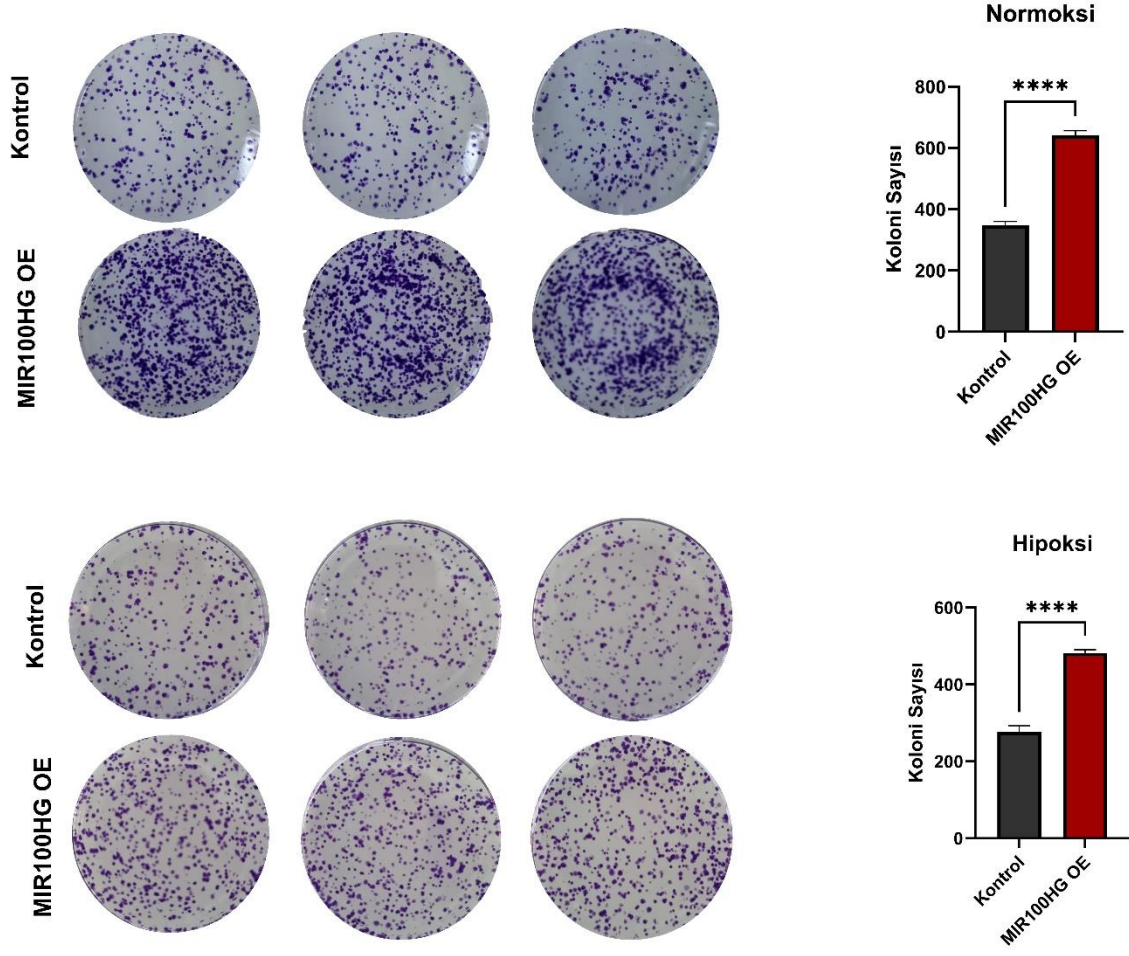
Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda neden olduğu hücre proliferasyonuna etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.1). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.1’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda yapılan 24, 48 ve 72 saatlik deney sonucunda MIR100HG aşırı ifade edildiğinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. (Şekil 4.12).



**Şekil 4.13:** Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

#### 4.1.2.2.2 Koloni Formasyon

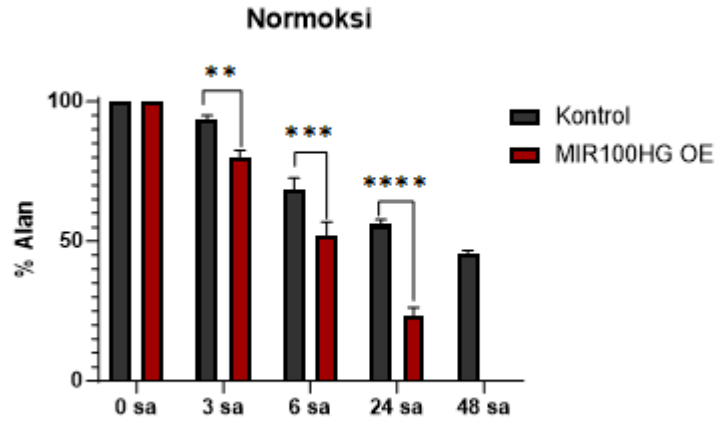
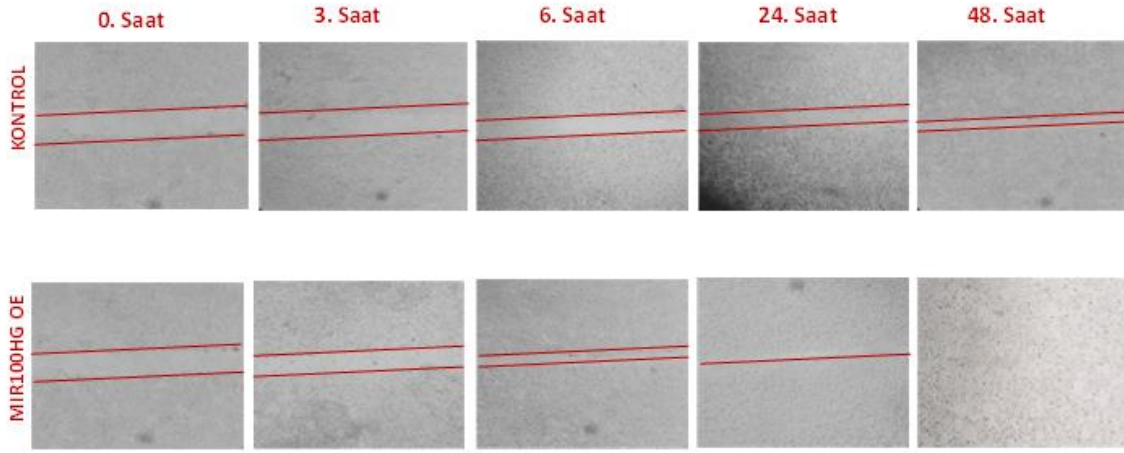
Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan koloni formasyon deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.3). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 14. Gün kuyular fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter Programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi (Şekil 4.13). Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifade edildiğinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda koloni oluşturma yeteneğinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olduğu gösterilmiştir.



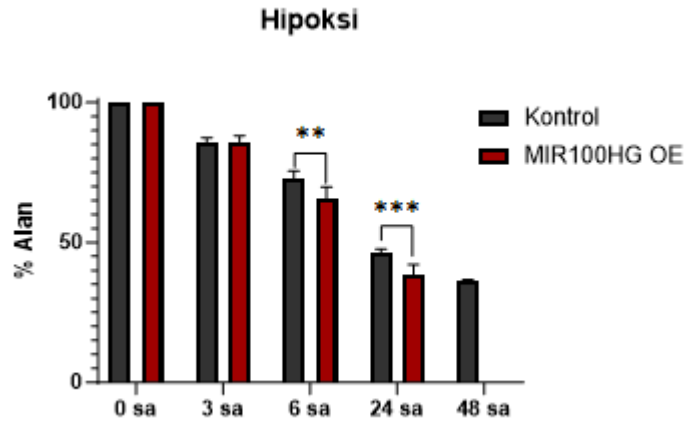
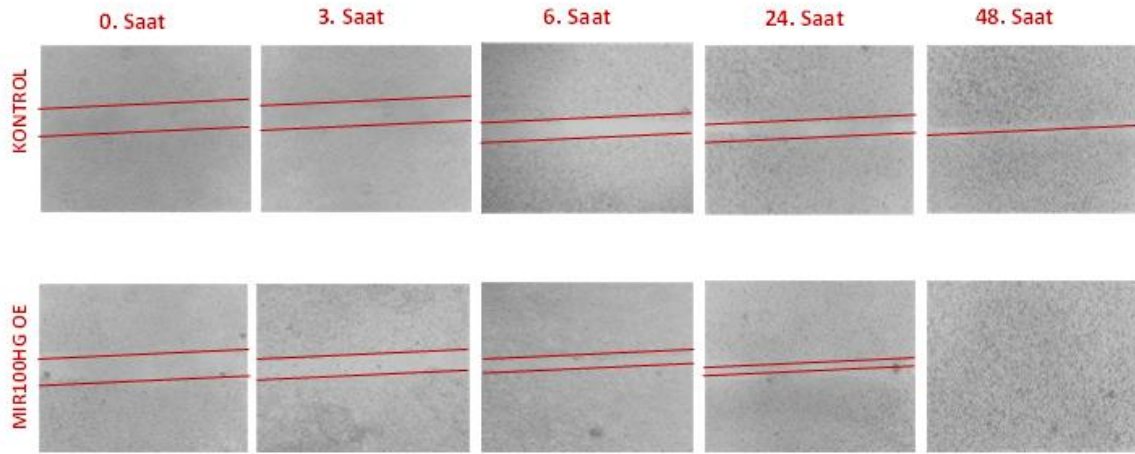
**Şekil 4.14:** Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.

#### 4.1.2.2.3 Çizik Testi

Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla çizik testi deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.2). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.2’de anlatıldığı şekilde 0. Saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6-24 ve 48. Saatlerde fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi. Elde edilen verilere göre, normoksik koşullarda MIR100HG aşırı ifade edilmiş hücrelerde alanın kontrol grubuna göre daha hızlı kapanığı gösterilmiştir. Hipoksi koşullarında ise, normoksi koşullara benzer ancak daha yavaş bir kapanma gerçekleştiği belirlenmiştir.



**Şekil 4.15:** Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Çizik testi analizi.

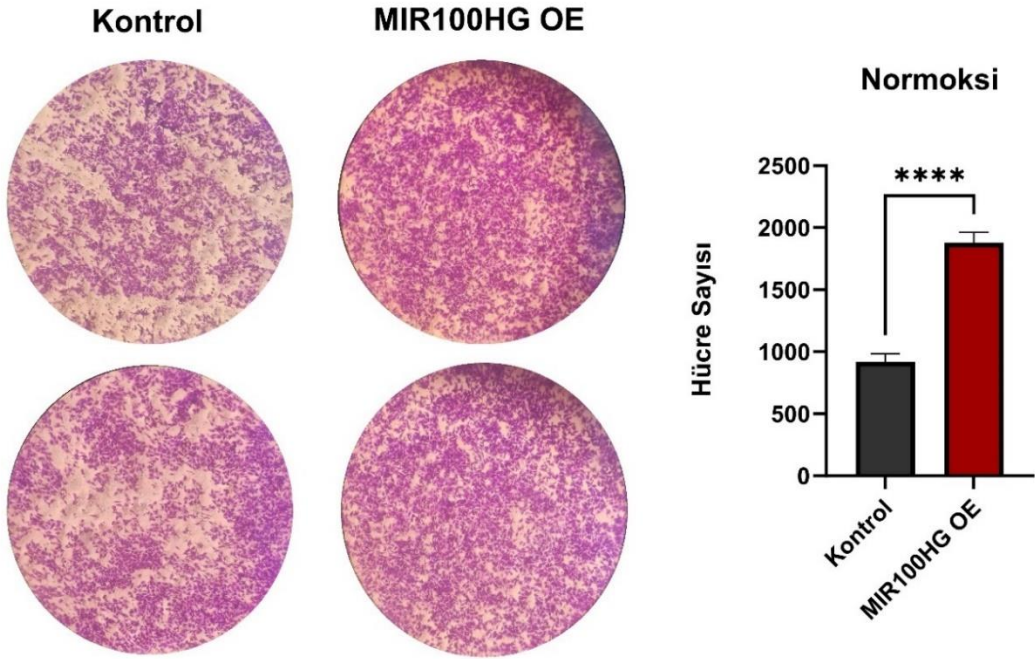


**Şekil 4.16:** Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Çizik testi analizi.

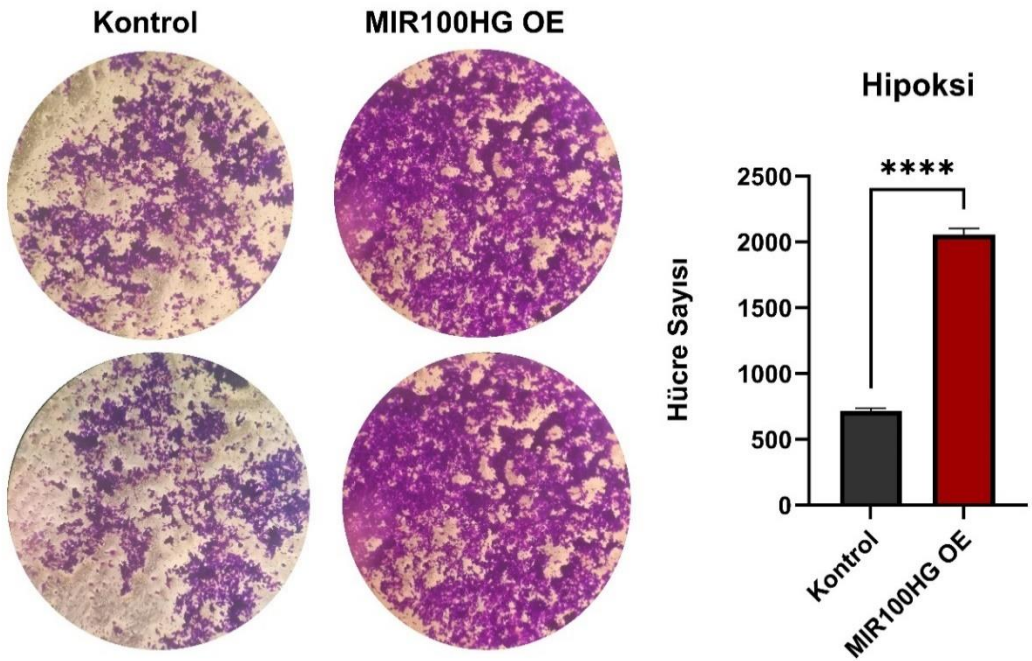
#### 4.1.2.2.4 Matrijel

Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda migrasyon-invazyon yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan matrijel deneyi yapıldı. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.4'te belirtilen prosedürdeki adımlar izlenerek deney gerçekleştirildi. Her kuyuda 10X objektif mercekle birden fazla alan fotoğraflandı. Hücre sayıları Image J programının hücre sayacı eklentisi Cell Counter ile belirlendi. Her bir örnek için, birden fazla alandan gelen hücre sayılarının ortalaması alınarak, sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi. Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifade edildiğinde hem normoksik

hem de hipoksik koşullarda invazyon yeteneğinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olduğu gösterilmiştir.



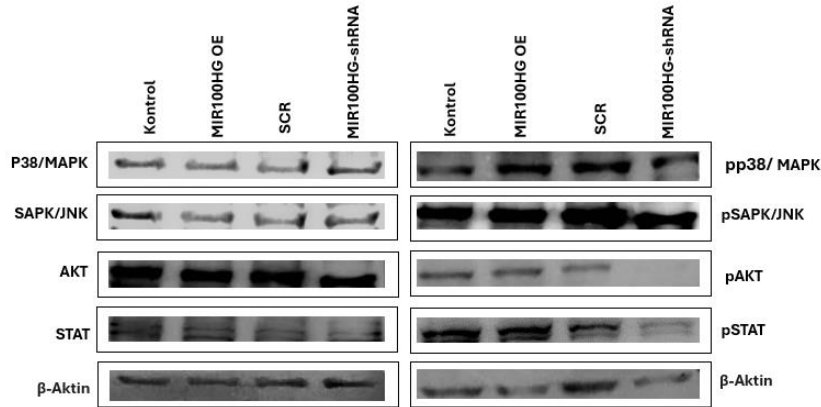
şekil 4.17: Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik matrijel analizi.



şekil 4.18: Hep3B hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik matrijel analizi.

#### 4.1.2.2.5 MIR100HG Aşırı İfade Edilmiş ve Baskılanmış Hücrelerde Hücre İçi Yolakların Western Blot Tekniğiyle Belirlenmesi

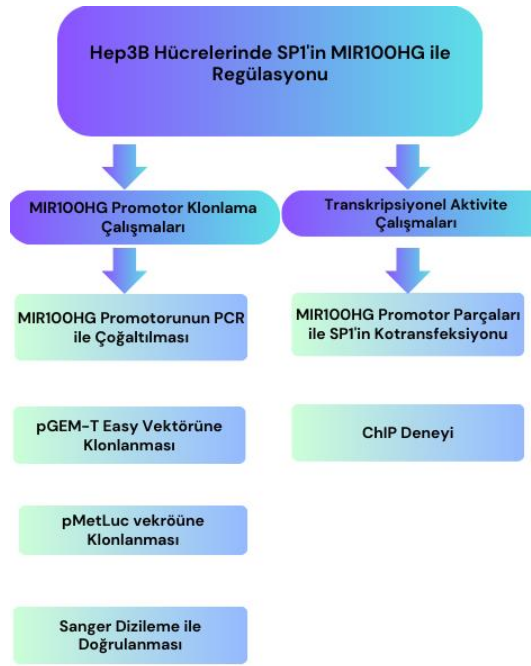
MIR100HG ifadesi baskılanmış ve MIR100HG aşırı ifade edilmiş Hep3B hücrelerinde yolakların protein seviyesininin doğrulanması amacıyla Western blot yöntemi gerçekleştirildi.  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde hücreler 6 kuyucuğa sahip plakalara paylaştırılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C’de gece boyu tutunmaları için bekletildi. 37 °C’de, 24 saat inkübe edildikten sonra, Bölüm 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde RIPA tamponu ile protein ekstraktları elde edildi ve Bölüm 3.2.6.3’te anlatıldığı şekilde Bradford ile miktarları belirlendi. Protein ekstraktları ile Bölüm 3.2.6.4’te anlatıldığı gibi SDS-PAGE gerçekleştirildi. Protein örneklerinin molekül büyüklüklerine göre ayrılması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.6.5’te anlatıldığı gibi PDVF membrana transfer işlemi yapıldı. Daha sonra p38, SAPK, AKT, STAT fosfosuz ve fosfolu antikorlarla 1/1000 oranında antikorlama yapıldı. ECL Western substratı uygulandıktan sonra membranda bulunan protein bantları, Fusion FX sisteminde görüntülendi. Görüntülenen bantlar  $\beta$ -aktin antikoruna ile elde edilen sonuçlara göre normalize edilerek, veriler GraphPad programında grafiklendirildi (Şekil 4.18). Hep3B hücrelerinde MIR100HG ifadesi baskılandığında, p38 ve AKT hücre içi sinyal yollarında SCR grubuna kıyasla belirgin bir azalma görülmüş ve fosforillenmiş AKT yolağındaki protein bandının tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, MIR100HG'nin aşırı ifade edilmesi, p38 ve AKT yollarında kontrol grubuna göre belirgin bir artışa yol açmıştır.



**Şekil 4.19:** Hep3B hücre hattında, MIR100HG aşırı ifade edilmiş ve baskılanmış hücrelerde hücre içi sinyal iletim yolunda görev yapması muhtemel moleküllerin ve fosforillenmemiş ve fosforillenmiş protein ifadelerine ait western blot görüntüsü.

## 4.2 MIR100HG Geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü Tarafından Transkripsiyonel Regülasyonu

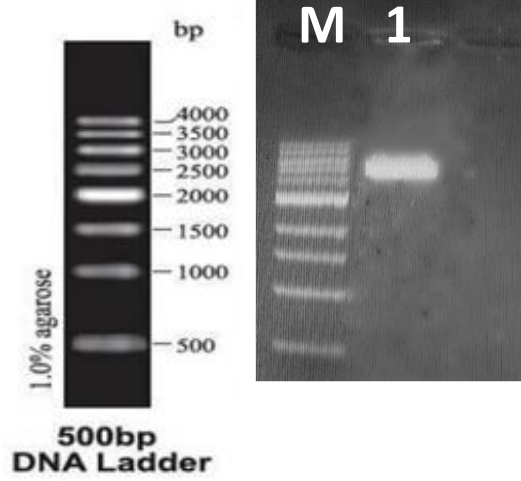
Hep3B hücrelerinde MIR100HG'nin SP1 transkripsiyon faktörü tarafından regülasyonunu tespit etmek amacıyla öncelikle MIR100HG promotor parçaları pMetLuc vektörüne klonlanmıştır. MIR100HG promotor parçaları ve ekspresyon vektörüne klonlu SP1 transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için birlikte transfekte edilmiştir. SP1'in MIR100HG promotoruna bağlanmasının doğrulanması için ChIP deneyi yapılmıştır. (Şekil 4.19)



**Şekil 4.20:** MIR100HG Geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü Tarafından Transkripsiyonel Regülasyonunun akış diyagramı.

### 4.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

MIR100HG promotorunu klonlama çalışmalarında kullanmak amacıyla Bölüm 3.2.3.1'de belirtilen şekilde Hep3B hücrelerinden genomik DNA izole edildi. Elde edilen genomik DNA %0.8'lik agaroz jelinde, DNA Jel Elektroforezi ile görüntülendi. Spektrofotometrik olarak konsantrasyonu ve saflığı belirlendi (Şekil 4.20).



**Şekil 4.21:** Hep3B hücrelerinden izole edilen genomik DNA'nın %0.8'lik Agaroz jel elektroforez görüntüsü.

#### 4.2.2 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlanması

Promotor bölgesinin amplifikasyonu için kullanılacak primerler, çeşitli uzunluklardaki promotor dizilerini çoğaltacak şekilde tasarlandı. Primerlerin erime sıcaklıkları ( $T_m$ ), GC içeriği (%) ve dizilerinin özgüllüğünü sağlamak amacıyla NCBI Blast analizleri gerçekleştirildi. Haberci vektör sistemine uygun oryantasyonda klonlama sağlanması için primerlerin 5' uçlarına belirli restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri eklendi. Bu amaçla promotor bölgesine ait restriksiyon haritası oluşturulurken Restriction Mapper Version 3 programı kullanıldı. Yapılan analiz sonucunda, MIR100HG geninde çalışılması planlanan 1300 baz çiftlik bölgeyi kesmeyen enzimler belirlendi; bu doğrultuda, HindIII tanıma dizisi forward primerlere, XhoI tanıma dizisi ise reverse primere eklendi. Tasarlanan primer dizileri ve özelliklerine dair detaylar Tablo 4.2'de sunulmaktadır.

**Tablo 4.2:** MIR100HG genine ait tasarlanan ve restriksiyon enzim bölgeleri eklenen promotor klonlama primerleri.

Primer	Dizisi (5'-3')
<b>Forward Primer 5: (-1013/+231)</b>	5'-AAGTTAACTCCATTTTATGGAC-3'
<b>Forward Primer 4: (-815/+231)</b>	5'-TTCCACTGGACTCTATTAAAC-3'
<b>Forward Primer 3: (-678/+231)</b>	5'-TTCTCCATAAGCAACATAGAC-3'
<b>Forward Primer 2: (-397/+231)</b>	5'-GACTGGACCATCAAGTCTTT -3'
<b>Forward Primer 1: (-188/+231)</b>	5'-TTTCCCTGAGAAATTGCAGA -3'
<b>Ortak Reverse Primer:</b>	5'-CTTGTACTATTCCCTCCTTAAT-3'

### 4.2.3 MIR100HG Promotorunun PCR ile çoğaltılması

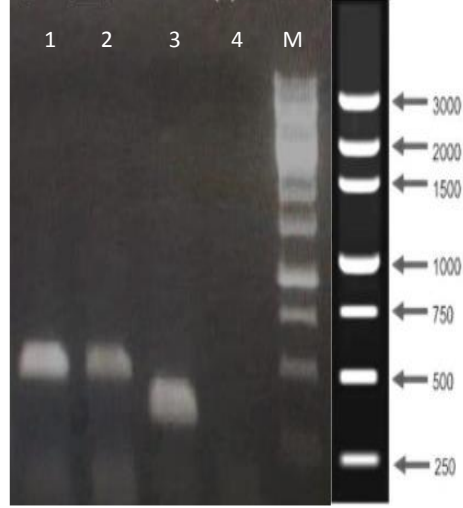
MIR100HG promotorunun çoğaltılması ve klonlanması için 5 farklı klonlama (promotor) primeri tasarlandı. **Bu tez kapsamında -188/+231 promotor primerinin çoğaltılması ve klonlanmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir.** -397/+231, -1013/+231 Aylin Turkoğlu tarafından ve -678/+231, -815/+231 Rumeysa Alaçam tarafından klonlanmıştır. 250 ng gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı MIR100HG 419 bc promotor parçasının PCR bileşenleri Tablo 4.3'de verilmiştir. Tüm PCR reaksiyonlarında, pozitif kontrol olarak insan ̢-mikroglobulin primer setleri kullanılmıştır. Ayrıca her PCR reaksiyonunda DNA içermeyen negatif kontrol de dahil edilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Tablo 4.4'de verilmiştir. PCR reaksiyonu sonrasında, PCR rnleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (şekil 4.21). Çoğaltılan PCR rnleri kesilerek Jelden DNA purifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.3.5).

**Tablo 4.3:** -188/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR reaksiyon bileşenleri.

<b>Bileşenler</b>	<b>419 bc</b>	<b>(+) Kontrol</b>	<b>(-) Kontrol</b>
<b>gDNA</b>	1 ̢L	1 ̢L	-
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 ̢L	2 ̢L	2 ̢L
<b>KCl Tampon</b>	5 ̢L	5 ̢L	5 ̢L
<b>Forward Primer</b>	1 ̢L	1 ̢L	1 ̢L
<b>Reverse Primer</b>	1 ̢L	1 ̢L	1 ̢L
<b>dNTP</b>	1 ̢L	1 ̢L	1 ̢L
<b>Taq Polimeraz</b>	0.5 ̢L	0.5 ̢L	0.5 ̢L
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	38.5 ̢L	38.5 ̢L	39.5 ̢L
<b>Toplam hacim</b>	50 ̢L	50 ̢L	50 ̢L

**Tablo 4.4:** -188/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR döngü şartları.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü</b>
95 C	5 Dakika	1 döngü
95 C	45 Saniye	
55 C	45 Saniye	35 Döngü
72 C	45 Saniye	
72 C	10 Dakika	1 Döngü



**Şekil 4.22:** MIR100HG -188+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-2: 419 bp büyüklüğündeki promotor parçası, 3: Pozitif kontrol 4: Negatif kontrol M: 250 bp Marker.

#### 4.2.4 MIR100HG Geninin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Jelden geri kazanılan ve kontrol edilen -188/+231 promotor parçası ile pGEM-T Easy (Promega) vektörü PCR tabanlı T:A klonlama stratejisi kullanılarak ligasyon kurulmuştur. Ligasyon bileşenleri Tablo 4.5’de verildiği gibidir. Reaksiyon 16 °C’de 16 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.5:** Promotor parçası ile pGem-T Easy vektörünün ligasyon reaksiyonu bileşenleri.

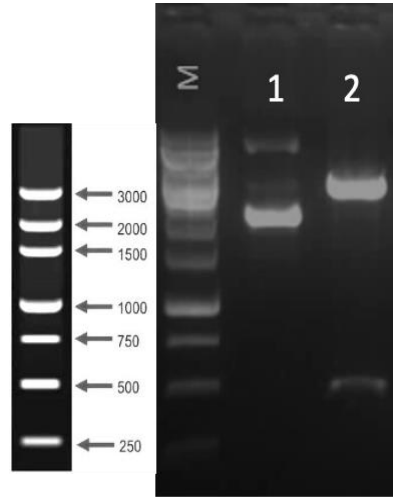
Malzemeler	419 bç (-188/+231)
<b>Geri kazanılan DNA</b>	15 µL
<b>pGEM-T Easy Vektör</b>	2 µL
<b>T4 DNA Ligaz</b>	1 µL
<b>T4 DNA Ligaz Buffer</b>	2 µL
<b>Toplam</b>	20 µL

Oluşturulan -188/+231 promotor parçası ile pGEM-T Easy vektörünün ligasyon ürünleri, Bölüm 3.2.3.6’da belirtildiği gibi transforme edilmiştir. Ampisilinli petrilere X-Gal ve IPTG eklenmiştir, transformasyon ürününün ekimi yapılmıştır. Mavi-Beyaz koloni seçimi stratejisiyle rekombinant olduğu düşünülen beyaz kolonilerin, bek alevi yanında steril öze yardımı ile Ampisilin antibiyotigi içeren 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi gerçekleştirilmiştir. Sıvı kültürlerden MN NucleoSpin Plasmid Miniprep kiti kullanılarak Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı gibi plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bölüm 3.2.3.2’de

anlatıldığı gibi plazmit miktarları tespit edilmiştir. Daha sonra rekombinant kolonileri belirlemek için Bölüm 3.2.3.6’da anlatıldığı şekilde XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile 37 °C’de 1 saat kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kesim reaksiyonuna ait bileşenler Tablo 4.5’de verilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.3.4’de belirtilen şekilde %1’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. pGEM-T Easy vektörüne klonlanan promotor parçalarına ait 419 bç’lik bantlar kesilerek jelden DNA purifikasyonu Bölüm 3.2.3.4’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.6:** Rekombinant kolonilerin tespiti için kurulan kesim reaksiyon bileşenleri.

Malzemeler	(-188/+231)-pGEM-T Easy
Plazmid İzolasyonu	1 µg
XhoI	1 µL
HindIII	1 µL
Cut Smart Buffer	5 µL
Toplam Hacim	50 µL



**Şekil 4.23:** MIR100HG -188/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. M: 1kb (250 bç) Büyüklük Belirteci, 1: Koloni 1 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 2: Koloni 2 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi.

#### 4.2.5 MIR100HG Promotor Parçalarının pMETluc Haberci Vektör Sistemine Alt Klonlaması

MIR100HG promotorunun transkripsiyonel aktivitesini belirlemek için PCR tekniği kullanılarak çoğaltılan ve T:A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy vektörüne aktarılan promotör parçaları, haberci vektör sistemi olan pMetLuc (Clontech) vektörüne alt

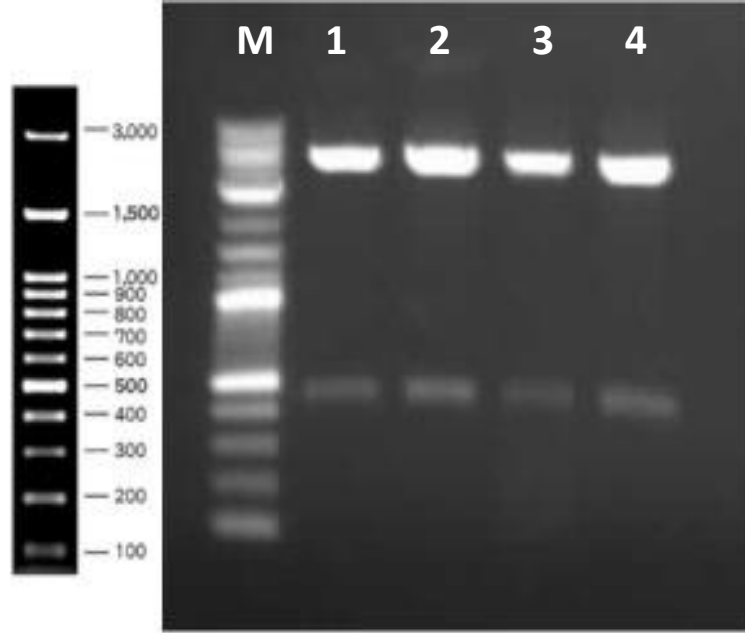
klonlanmıştır (Şekil 4.23). Bu sistem, salınabilir bir lusiferaz enzimi sentezleyebilme özelliğine sahiptir. Promotörün maksimum aktif bölgesini belirlemek amacıyla kısaltılan promotor parçaları, pMetLuc vektör sistemine ayrı ayrı klonlanarak test edilmiştir. Alt klonlama çalışmaları için, pMetLuc vektörü gliserol stoklarından sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. 16 saat 37 °C’de kültür büyütüldükten sonra Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı şekilde plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmid konsantrasyonları belirlenmiştir (Bölüm 3.2.3.2). Klonlamaya devam etmek için pMetLuc vektörü 3.2.3.6’da anlatıldığı gibi kesilmiştir. Sonrasında örnekler agaroz jelde yürütülmüştür. Kesim sonrası oluşan bantlar kesilerek jelden geri kazanılmıştır (Bölüm 3.2.3.5). pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış ve geri kazanılmış DNA ile pMetLuc vektörü ile ligasyon kurulmuştur. Ligasyon koşulları Tablo 4.6’da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. 16 saat 16 °C’de bekletilen ligasyon ürünleri ertesi gün DH5α hücrelerine transforme edilmiştir (Bölüm 3.2.3.6). Ertesi gün koloniler rekombinantların tespiti için araştırılmıştır. Her bir koloni büyütülmüş, plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.3.7). XhoI ve HindIII kesimi ile rekombinantların tespiti gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.3.6). Kesim planı Tablo 4.7’de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.3.4’te anlatıldığı şekilde %1’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

**Tablo 4.7:** PmetLuc vektörü ve MIR100HG promotor parçasının ligasyon bileşenleri.

<b>Malzemeler</b>	<b>419bp</b>
<b>Geri kazanılan DNA</b>	12 µL
<b>pMetLuc Vektör</b>	5 µL
<b>T4 DNA Ligaz</b>	1 µL
<b>T4 DNA Ligaz Buffer</b>	2 µL
<b>Toplam</b>	20 µL

**Tablo 4.8:** Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla kurulan kesim reaksiyonu bileşenleri.

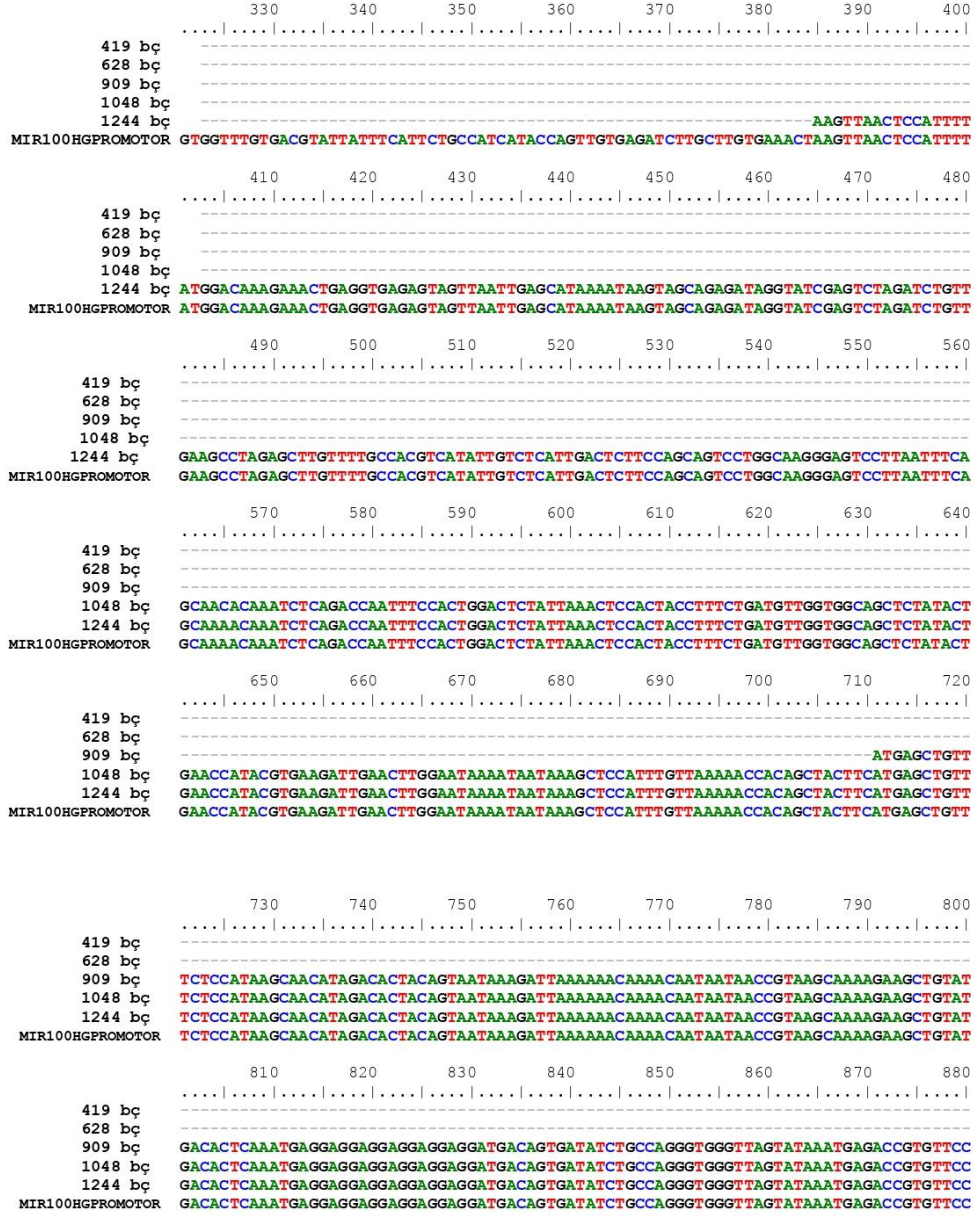
<b>Malzemeler</b>	<b>(-188/+231)-pMetLuc</b>
<b>Plazmid İzolasyonu</b>	1 µg
<b>XhoI</b>	1 µL
<b>HindIII</b>	1 µL
<b>Cut Smart Buffer</b>	4 µL
<b>Toplam Hacim</b>	50 µL



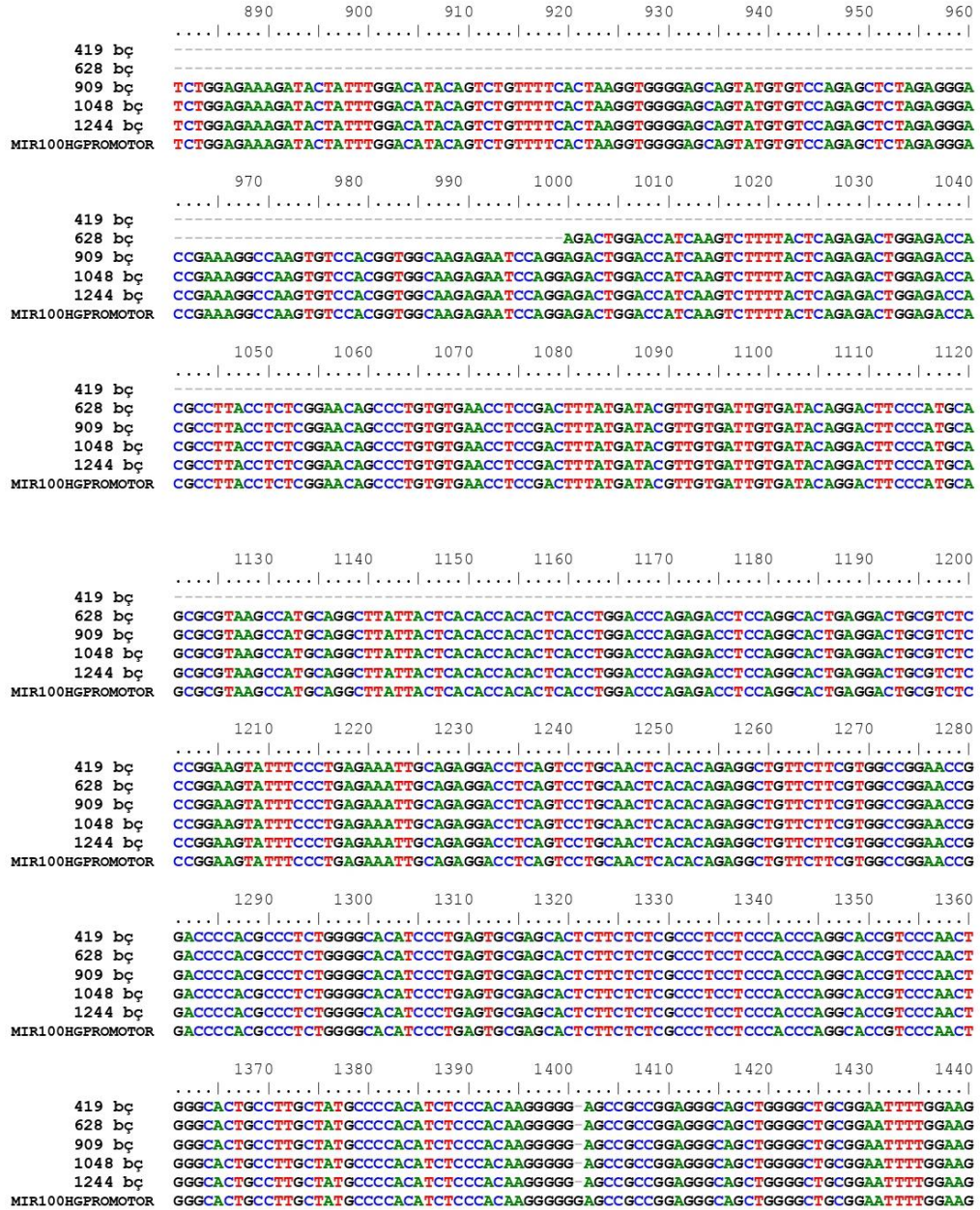
**Şekil 4.24:** MIR100HG -188/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. M: 1kb (100 bç) Büyüklük Belirteci, 1: Koloni 1 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 2: Koloni 2 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi, 3: Koloni 3 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi 4: Koloni 4 -188/+231 XhoI/HindIII kesimi.

#### 4.2.6 Sanger Dizileme

İnsan MIR100HG promotor bölgesine ait 5' uç delesyonlu her bir parça PCR ile çoğaltıldığından, bu işlem sırasında oluşabilecek mutasyonları kontrol etmek ve dizinin MIR100HG promotör bölgesine ait olup olmadığını doğrulamak amacıyla, rekombinant olduğu düşünülen plazmitler BM Labosis/Ankara firmasına gönderilmiştir. Dizileme için pMetLuc dizileme primeri ve MIR100HG için tasarlanan spesifik klonlama primerleri de sağlanarak okuma yapılmıştır. Elde edilen en büyük MIR100HG promotor parçaları, NCBI veri tabanındaki MIR100HG genomik dizisiyle NCBI-BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmış ve kromozom 11'deki [-1013/+231] bç bölgesiyle eşleştiği doğrulanmıştır. Tüm promotor konstrakları ve NCBI'daki MIR100HG geni ile yapılan çoklu hizalama işlemleri BIOEDIT programında gerçekleştirilmiş, dizilerde PCR'a bağlı herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir (Şekil 4. 24).



Şekil 4.25: 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotoru ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması.

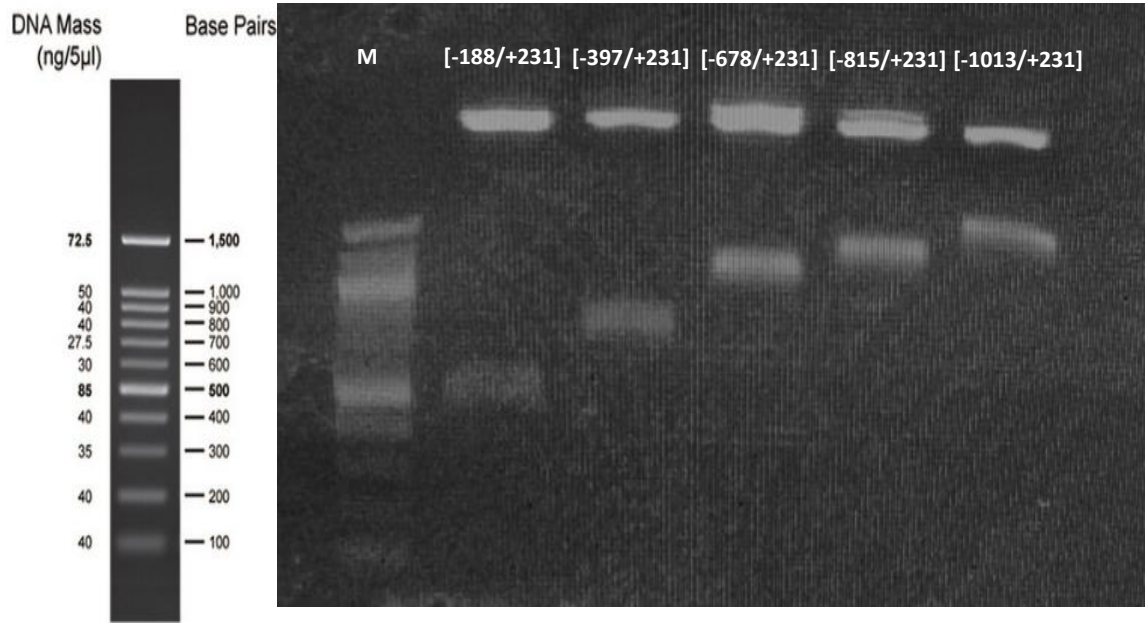


Şekil 4.24: (Devam)

#### 4.2.7 Klonlanan Promotor Parçalarının Midiprep ile Büyük Ölçekte İzolasyonu Kontrol Kesimi

Rekombinant ve Sanger dizileme ile doğrulanan konstraktlar, MIR100HG geninin bazal aktivitesini incelemek amacıyla geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere büyük ölçekli plazmit izolasyonu yapılmıştır. (Bölüm 3.2.3.8) Bu amaçla, pMetLuc vektörüne klonlanmış [-188/+231] promotor parçasının gliserol stoklarından 20 mL kanamisinli LB besiyerine ekim yapıldı ve kültürler, 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde bir

gece boyunca inkübe edildi. Sonrasında bu ön kültürler, 200 mL kanamisinli LB besiyerine aktarıldı. OD<sub>600</sub> değeri 2'ye yaklaştığında kültürler buz üzerine alınarak büyümeleri durduruldu. Kültürler, 5000 x g'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlenerek pelet elde edildi. Bu aşamadan sonra, Bölüm 3.2.3.8'de belirtilen MN Nucleobond® Xtra Midi Plus Midi Prep kiti kullanılarak -188/+231-pMetLuc plazmitlerinin izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı gibi XhoI/HindIII ile kontrol kesimleri yapıldı ve %1 agaroz jel elektroforez ile kesim ürünleri görüntülendi.

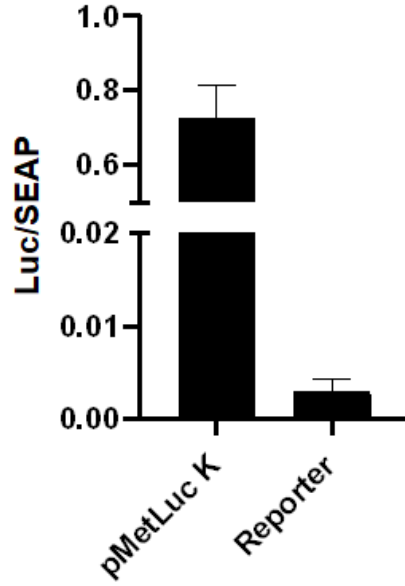


**Şekil 4.26:** pMetLuc vektöre klonlanmış MIR100HG promotor parçalarının midiprep kontrol kesim jel görüntüsü.

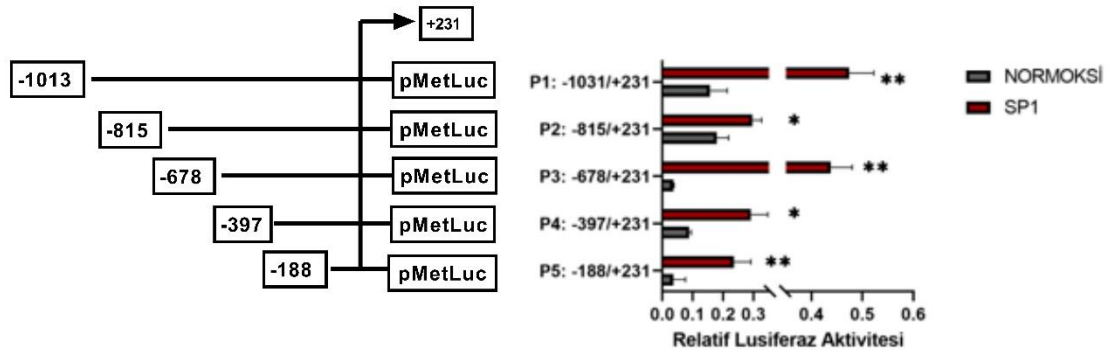
#### **4.2.8 MIR100HG Promotor Parçaları ile Birlikte SP1 Transkripsiyon Faktörünün Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi**

MIR100HG genine ait promotor parçaları ile birlikte SP1 ekspresyon plazmiti aynı anda kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yöntemiyle salınabilir lusiferaz yöntemi kullanılmıştır. Deneyler 48 kuyucuklu plakalarda yapılmış ve transfeksiyon işlemi Bölüm 3.2.4.9.1 'de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. pMetLuc vektörüne MIR100HG promotor parçalarıyla birlikte ekspresyon vektörüne klonlu SP1 transkripsiyon faktörü klonlanmış halleri ve her kuyucukta transfeksiyon etkinliğini normalize etmek amacıyla 0.5 µg SEAP ekspresyon vektörü de transfekte edilmiştir. Ayrıca, genel transfeksiyon etkinliğini değerlendirmek için güçlü viral promotor taşıyan pMetLuc kontrol plazmiti ve negatif kontrol olarak promotor içermeyen pMetLuc reporter vektörü transfekte edilmiştir. Her

deney üç kez tekrar edilmiştir. Medyumlar 48. ve 72. saatlerde toplanarak -20 °C’de saklanmıştır. Bölüm 3.2.4.9.2’de anlatıldığı şekilde, lusiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçülmüş, luminometrede elde edilen lusiferaz değerleri SEAP aktivitesine bölünerek Luc/SEAP oranları hesaplanmıştır.



**Şekil 4.27:** Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz aktiviteleri.

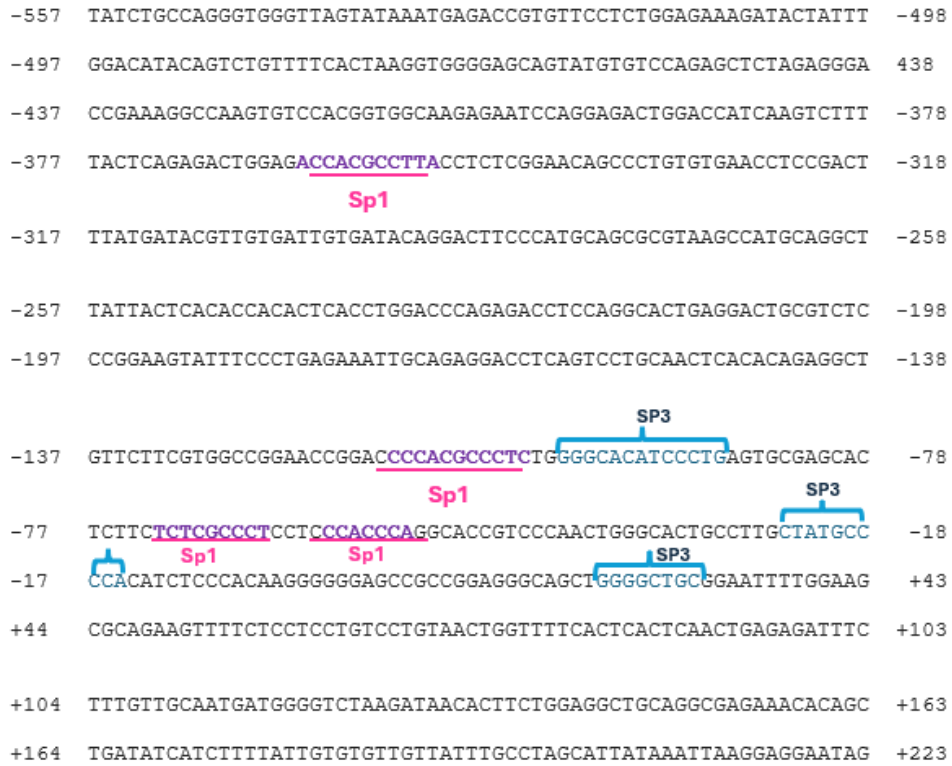


**Şekil 4.28:** MIR100HG promotor parçalarıyla birlikte SP1 transkripsiyon faktörü kontransfekte edildiğinde Lusiferaz/SEAP değerleri.

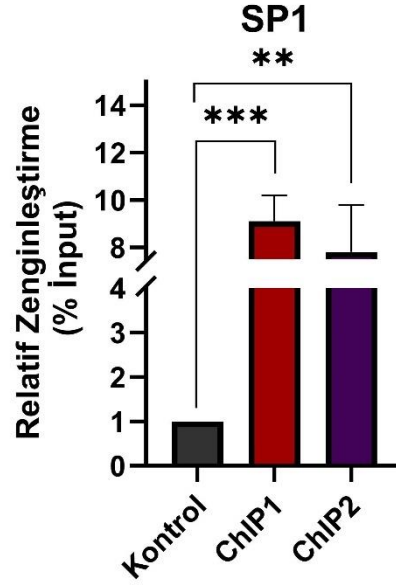
Yapılan çalışma sonucunda Şekil 4.27’te gösterildiği şekilde MIR100HG promotor parçaları ile SP1 transkripsiyon faktörü beraber transfekte edildiğinde bütün promotor parçalarında transkripsiyonel aktivite artmıştır.

#### 4.2.9 MIR100HG Promotorunda Bulunan SP1 Bağlanma Bölgelerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi ve Doğrulanması

MIR100HG promotoru üzerinde bulunması muhtemel olan SP1 bağlanma bölgeleri yapılan biyoinformatik çalışmalar doğrultusunda tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Promo PROMO, ALGGEN internet sitesinde bağlanma bölgeleri analiz edilmiştir. Buna göre 4 tane SP1, 3 tane SP3 bağlanma bölgesi belirlenmiştir. Hep3B hücrelerine Bölüm 3.2.4.11.' de anlatıldığı gibi SP1 ekspresyon plazmiti transfekte edilmiştir. 24 saat sonunda Bölüm 3.2.7.1' de anlatıldığı gibi fiksasyon işlemi yapılmıştır. Bölüm 3.2.7.2' de anlatıldığı gibi uygun antikorla DNA-Protein etkileşimi oluşturulmuştur ve Bölüm 3.2.7.5' de anlatıldığı gibi DNA saflaştırma basamağı gerçekleştirilmiştir. ChIP deneyi sonucunda elde edilen DNA örnekleri ile Real-time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri %10 inputa göre normalize edilip IgG uygulanan negatif kontrole göre kat alınmıştır. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirilmiştir. (Şekil 4.29)



Şekil 4.29: MIR100HG promotoru üzerinde olası SP1 ve SP3 bağlanma bölgeleri.

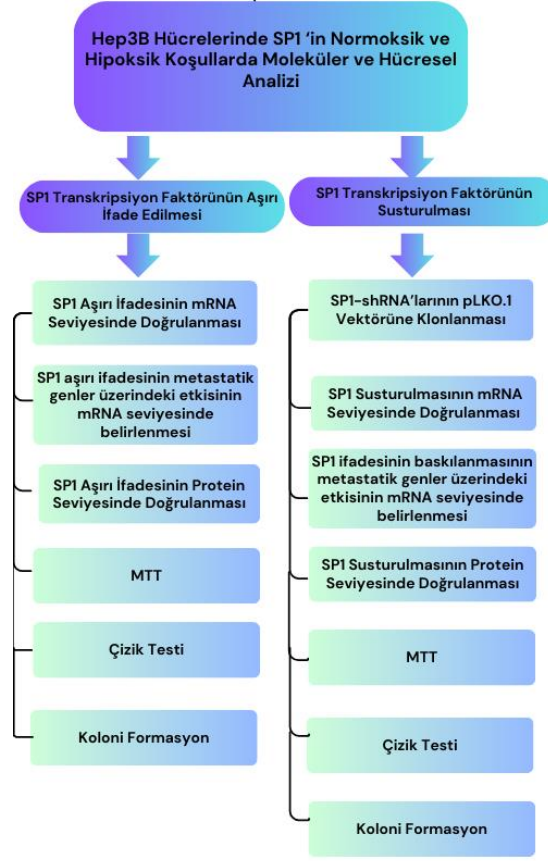


**Şekil 4.30:** Hep3B hücrelerinde SP1 antikorunu kullanarak gerçekleştirilen ChIP deneyinin analizi.

Deney sonucunda, SP1 ekspresyon plazmidi transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG promotorunda SP1 bağlanma bölgelerinin istatistiksel olarak anlamlı bağlanmanın gerçekleştiği gösterilmiştir. MIR100HG promotor bölgesinde SP1 bağlanmalarının -260/+56 bölgesinde gösterilmiş olması SP1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG regülasyonunda önemli bir transkripsiyon faktörü olduğunu göstermektedir.

#### **4.3 Hep3B Hücrelerinde SP1 Transkripsiyon Faktörünün Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel ve Moleküler Analizi**

Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün normoksik ve hipoksik koşullardaki hücresel ve moleküler etkilerini analiz etmek amacıyla SP1'in aşırı ifade edilmesi ve baskılanması gerçekleştirilmiş; mRNA düzeyinde doğrulanan hücrelerde MTT, çizik testi ve koloni formasyon deneyleri yapılmıştır. Ayrıca, SP1'in aşırı ifade edilmesi ve baskılanması durumunda metastatik genlerin mRNA seviyesindeki etkileri belirlenmiştir. (Şekil 4.30)



**Şekil 4.31:** Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün normoksik ve hipoksik koşullarda hücrel ve moleküler analizi akış diyagramı.

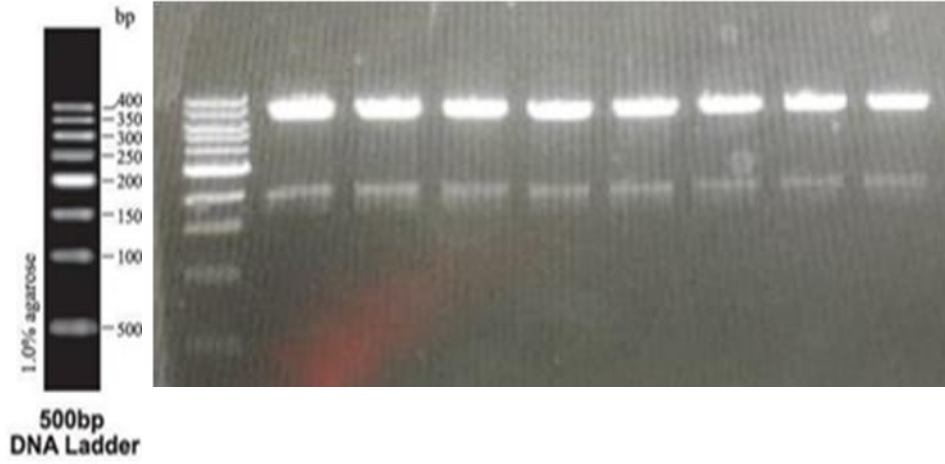
### 4.3.1 Hep3B Hücrelerinde SP1 İfadesinin Baskılanması

#### 4.3.1.1 SP1 shRNA Oligolarının Tasarlanması

SP1 transkripsiyon faktörüne özgü sh-RNA Oligolarının tasarlanması için Whitehead Biyomedikal Araştırma Enstitüsü'nün sunmuş olduğu siRNA seçim programı kullanılarak gerçekleştirildi. Program sonuçları, BLAST ile analiz edildi. sh-RNA oligo primerleri tasarlandı ve sipariş edildi.

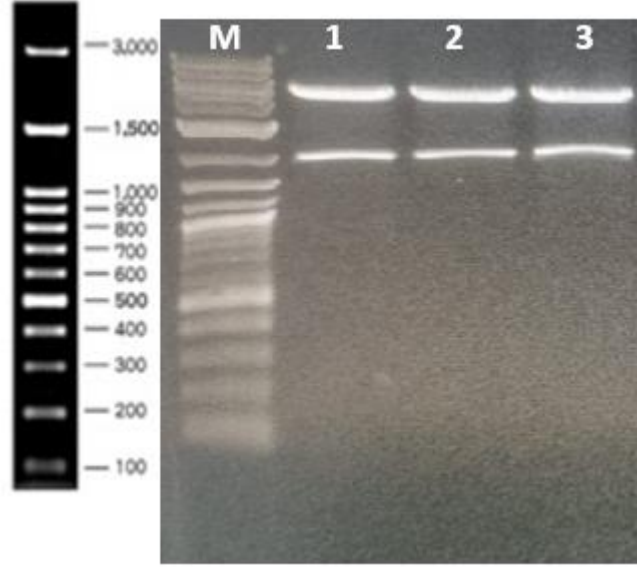
#### 4.3.1.2 SP1 sh-RNA Oligolarının pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması

pLKO.1-TRC klonlama vektörüne, sh-RNA oligolarının klonlanabilmesi için öncelikle, pLKO.1-TRC vektörünün AgeI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.3.6). Kesim örnekleri DNA jel elektroforezi görüntülendi. Biri 7 kb, biri 1.9 kb olmak üzere iki bant gözlemlendi. (Şekil 4.31). 7 kb'de gözlemlenen bantlar jelden kesilerek, GeneJET Gel Ekstraksiyon Kit (Thermo Scientific) ile geri kazanıldı (Bölüm 3.2.3.5).



**Şekil 4.32:** pLKO.1-TRC klonlama vektörünün AgeI ve EcorI restriksiyon enzimleri ile hazırlanması.

Oligolar 20  $\mu$ M konsantrasyon olacak şekilde sulandırıldı. Ardından 5  $\mu$ L Forward oligo, 5  $\mu$ L Reverse oligo, 5  $\mu$ L 10x NEB tamponu, 35  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O eklendi. 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından birkaç saat boyunca yavaşça oda sıcaklığına soğutuldu. Ardından pLKO.1-TRC vektörü ve SP1 shRNA oligoları ile Bölüm 3.2.3.7'de anlatıldığı şekilde ligasyon kuruldu. Ligasyon ürünleri, DH5 $\alpha$  kompetan hücrelerine Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde transforme edilip, ampisilin içeren LB agar üzerine ekim yapıldı. Kültürlerden, NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit kullanılarak küçük ölçekte plazmid izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.2.3.7). DNA miktarı ve saflığı spektrofotometreyle belirlendi. SP1 shRNA oligolarının pLKO.1-TRC vektörüne klonlamasının kontrolü için Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde EcoRI ve NcoI enzimi ile kesim kuruldu. Kesim reaksiyonu 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Rekombinant kolonilerde 2 kb ve 5 kb'de olmak üzere iki bant gözlemlendi (Şekil 4.32). Klonlamanın doğrulanması için, örnekler dizi analizine gönderildi.

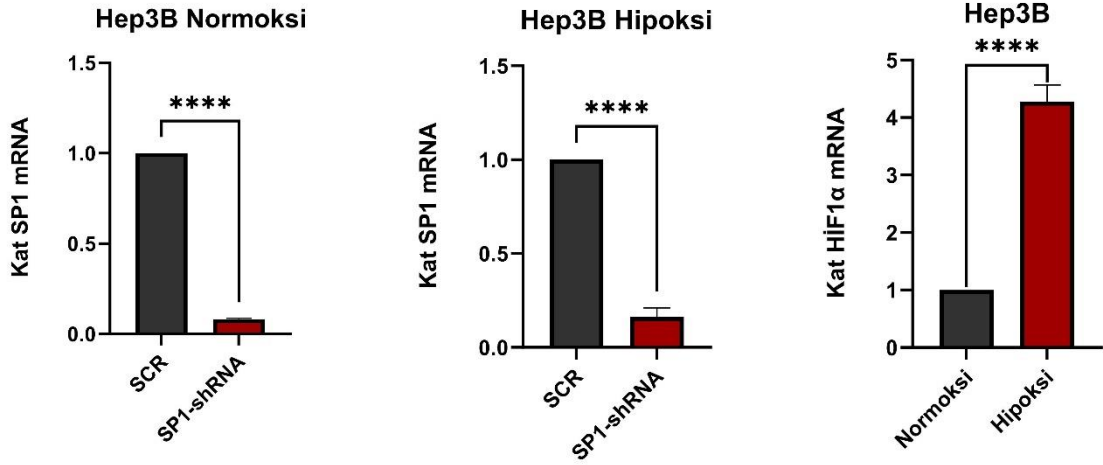


**Şekil 4.33:** Rekombinant S1, S2 ve S3 SP1-shRNA vektörlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: 100bp Marker.

Rekombinant olan ve doğruluğu dizileme ile doğrulanan plazmidlerin yüksek konsantrasyonda ve büyük ölçekte izolasyonu (Bölüm 3.2.3.8) yapıldı. MIR100HG ifadesini baskılama çalışmaları için HEK293-T hücrelerine Bölüm 3.2.4.10.2’de anlatıldığı gibi geçici transfeksiyon yapıldı. Hep3B hücrelerine Bölüm 3.2.4.10.3’de anlatıldığı gibi transduksiyon yapıldı. Belirli aralıklarla promisin uygulaması yapıldı ve tek koloni seçildi (Bölüm 3.2.4.10.5). Hep3B hücreleri için koloni taraması yapıldı. Susturma çalışmalarında kullanılmak üzere Hep3B SP1-shRNA, ve SCR-shRNA hücreleri Bölüm 3.2.4.5’de anlatıldığı şekilde pasajlanarak büyütüldü ve hücre stokları yapıldı.

#### **4.3.1.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulması**

Elde edilen kolonilerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. SP1 ifadesinin kontrolü için SP1 ekspresyon ve H $\beta$ 2 primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirildi.

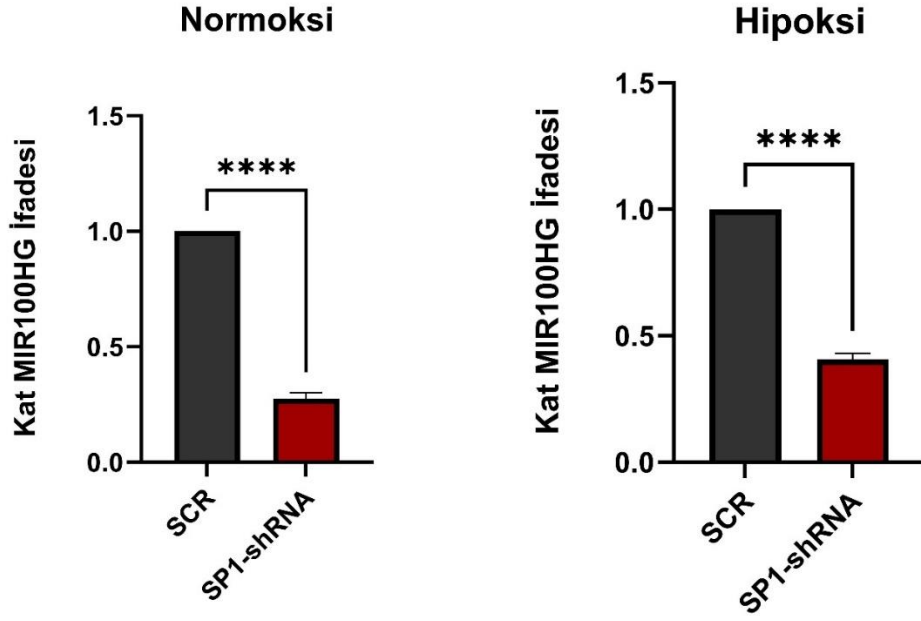


**Şekil 4.34:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.

Deneyler hem hipoksik hem de normoksik koşullar altında ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması amacıyla HIF-1 $\alpha$  seviyesi analiz edildi, normoksiye göre yaklaşık 4 kat artış görüldü. Hep3B hücre hattında kontrol olarak kullanılan SCR-shRNA grubuna göre, SP1-shRNA hem normoksizde hem de hipoksizde istatistiki olarak anlamlı olan azalmalar belirlenmiştir.

#### 4.3.1.4 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında MIR100HG İfadesinin Belirlenmesi

SCR ve SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde H $\beta$ 2 ve MIR100HG primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirildi. Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesi baskılandığında MIR100HG ekspresyon seviyesi hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı bir şekilde azalmıştır.

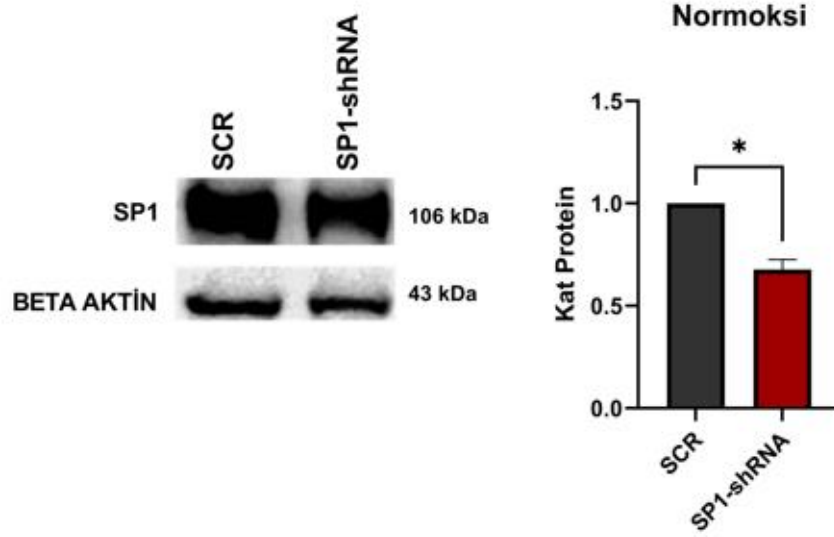


**Şekil 4.35:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının MIR100HG ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda ekspresyon seviyesinin belirlenmesi.

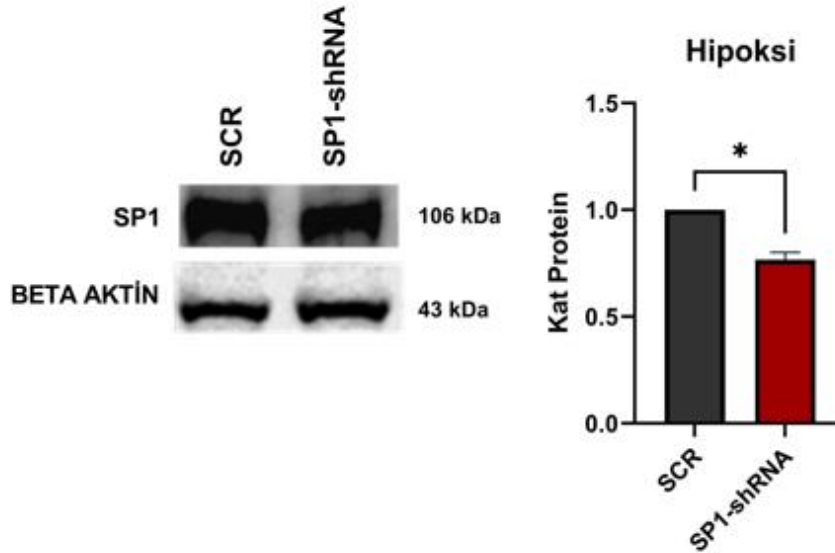
#### **4.3.1.5 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin Western Blot ile Belirlenmesi**

SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinden ve SCR hücrelerinden normoksik ve hipoksik ortamlarda protein seviyesininin doğrulanması amacıyla Western blot yöntemi gerçekleştirildi.  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde hücreler 6 kuyucuğa sahip plakalara paylaştırılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C’de gece boyu tutunmaları için bekletildi. Hipoksi oluşturulacak kuyulara 300 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması gerçekleştirildi. 37 °C’de, 24 saat inkübe edildikten sonra, Bölüm 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde RIPA tamponu ile protein ekstraktları elde edildi ve Bölüm 3.2.6.3’te anlatıldığı şekilde Bradford ile miktarları belirlendi. Protein ekstraktları ile Bölüm 3.2.6.4’te anlatıldığı gibi SDS-PAGE gerçekleştirildi. Protein örneklerinin molekül büyüklüklerine göre ayrılması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.6.5’te anlatıldığı gibi PDVF membrana transfer işlemi yapıldı. Daha sonra SP1 baskılanmasının protein seviyesinde kanıtlanması amacıyla Bölüm 3.2.6.6 ‘da belirtildiği şekilde SP1 primer ve sekonder antikoru uygulandı. ECL Western substratı uygulandıktan sonra membranda bulunan protein bantları, Fusion FX sisteminde görüntülendi. Görüntülenen bantlar β-aktin antikoru ile elde edilen sonuçlara göre normalize

edilerek, veriler GraphPad programında grafiklendirildi. Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesi baskılandığında SCR hücrelerine göre, hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında SP1 protein seviyesinin Western Blot tekniği ile anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir.



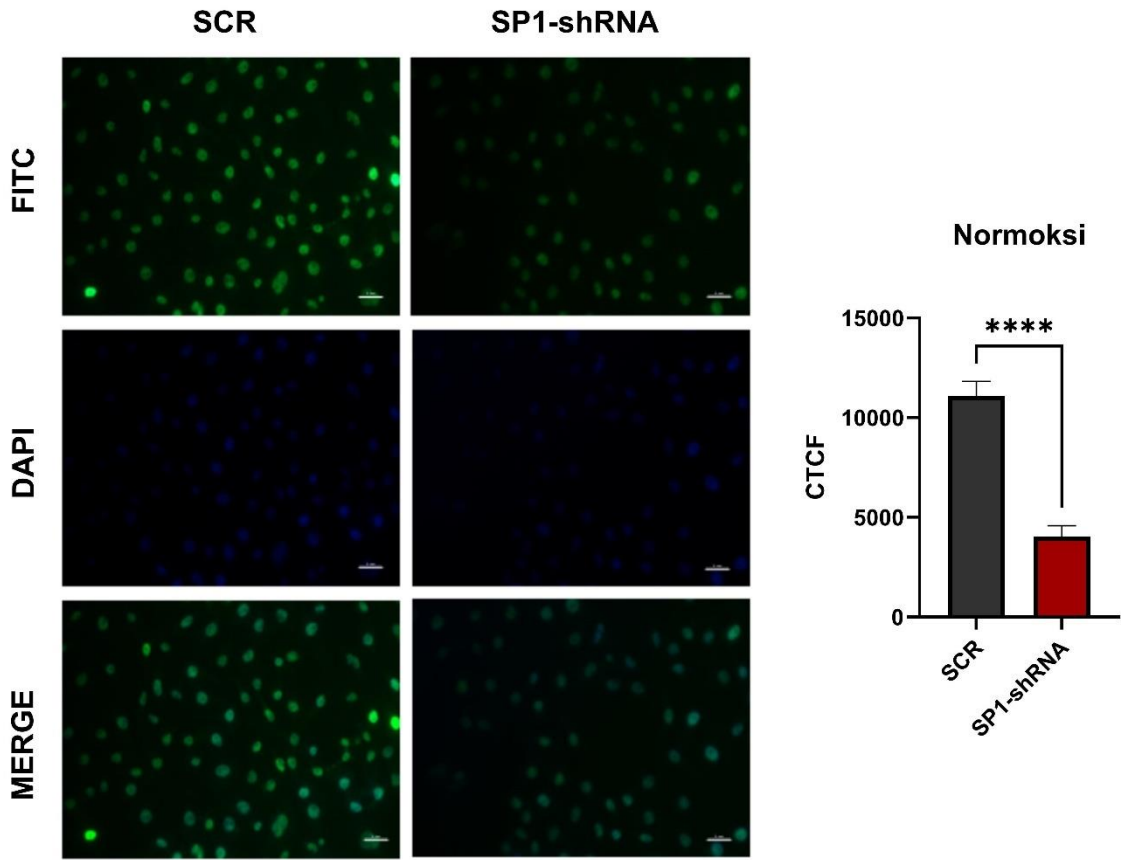
**Şekil 4.36:** SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin normoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi.



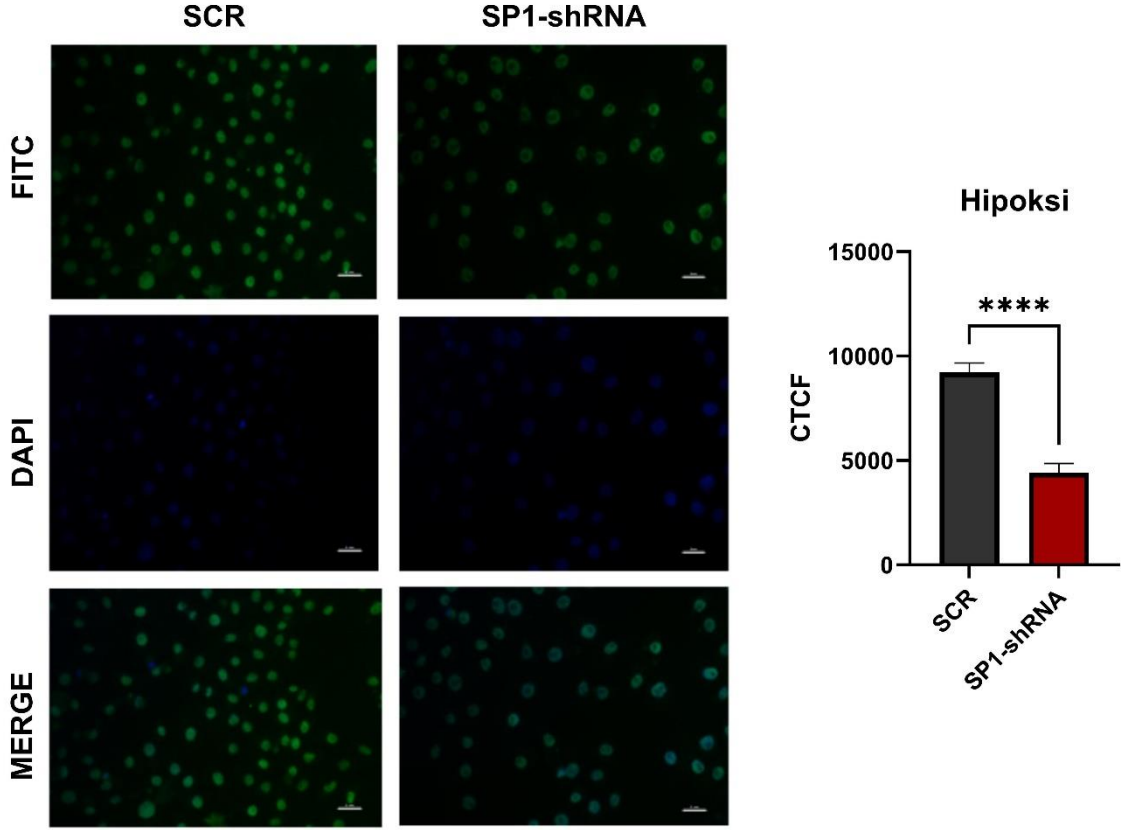
**Şekil 4.37:** SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin hipoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi.

#### 4.3.1.6 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin IFC Deneyi ile Belirlenmesi

SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinden ve SCR hücrelerinden normoksik ve hipoksik ortamlarda protein seviyesininin doğrulanması amacıyla IFC deneyi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.6.7). Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesi baskılandığında SCR grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında SP1 protein seviyesinin IFC deneyi ile anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 4.38: Hep3B hücre hattında SP1 antikoruna ile normoksik koşullarda SP1 baskılanmasının protein seviyesinde doğrulanması.

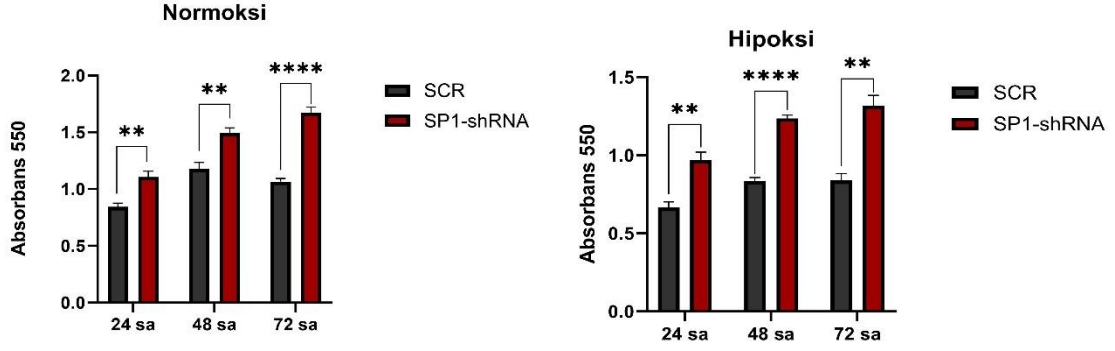


**Şekil 4.39:** Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile hipoksik koşullarda SP1 baskılanmasının protein seviyesinde doğrulanması.

#### 4.3.1.7 SP1 Transkripsiyon Faktörünün İfadesinin Baskılandığı Hep3B Hücrelerinde Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

##### 4.3.1.7.1 MTT

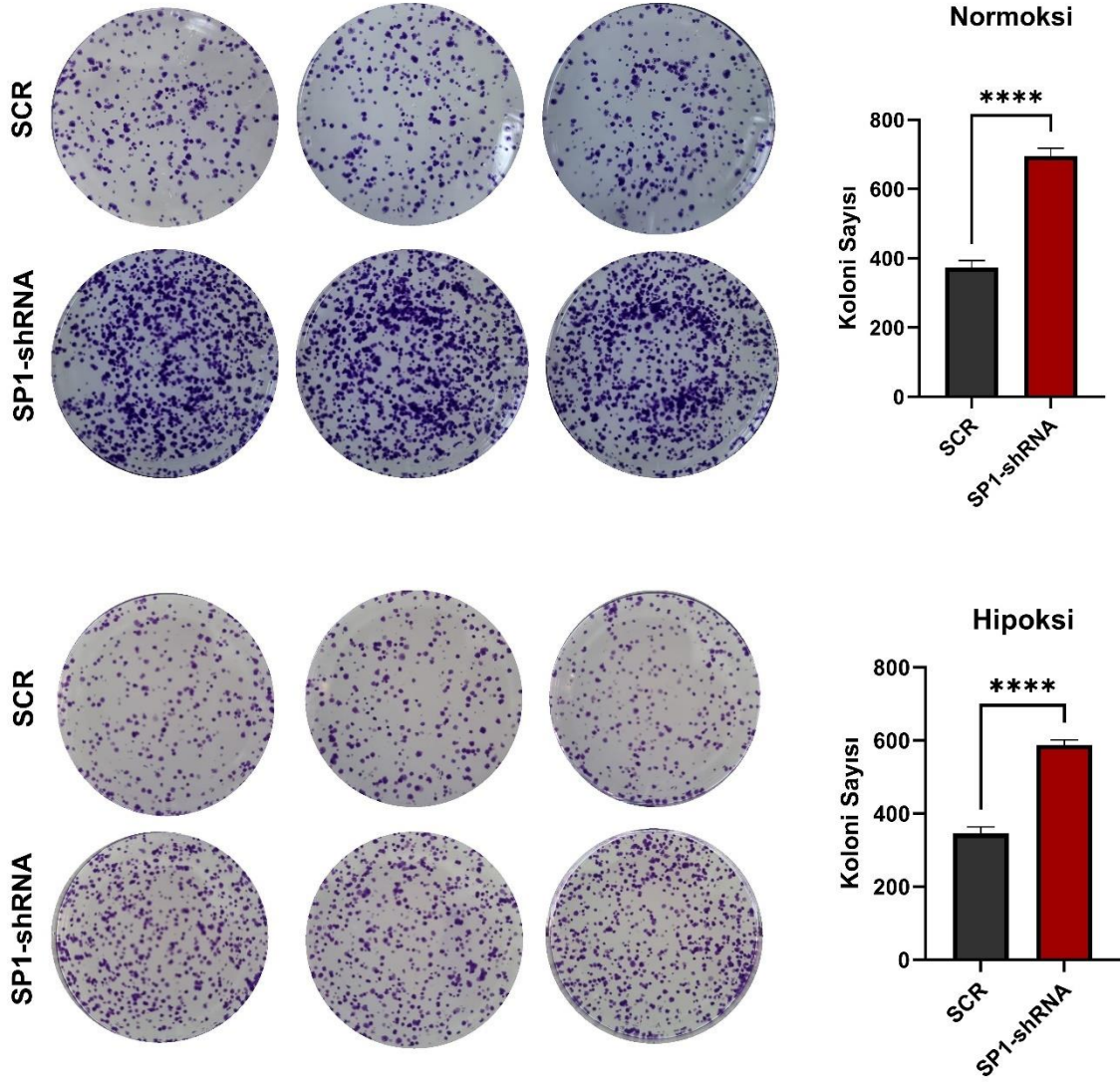
Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi deneyi gerçekleştirildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.1’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda SCR grubuna göre, SP1-shRNA hücrelerinde hücre proliferasyonunun arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.



**Şekil 4.40:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

#### 4.3.1.7.2 Koloni Formasyon

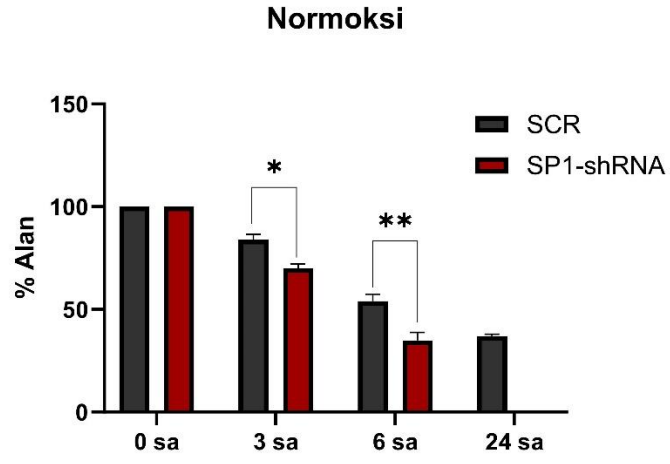
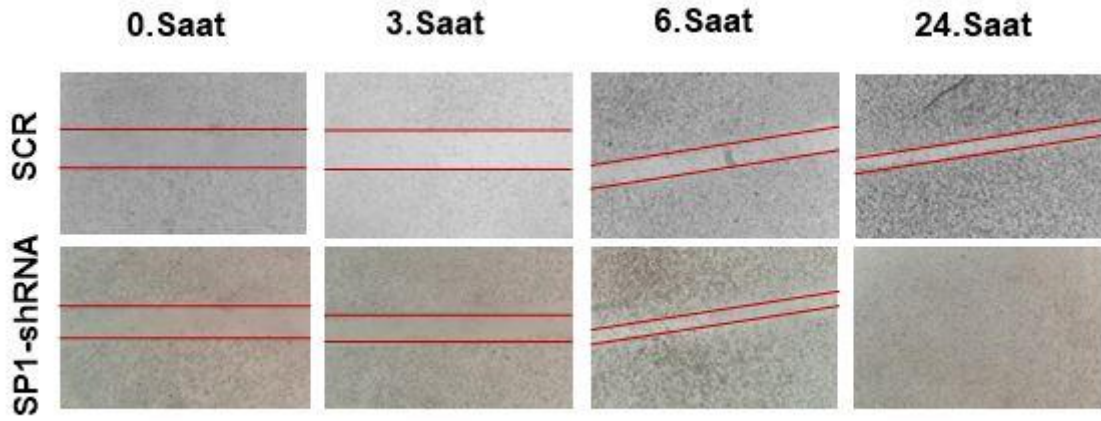
Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi için yapılan koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.3'te anlatıldığı şekilde 14 gün 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü ve 14. Gün sonuç alındı. Kuyular fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter Programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi. Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda SCR grubuna göre, SP1-shRNA hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesinin arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.



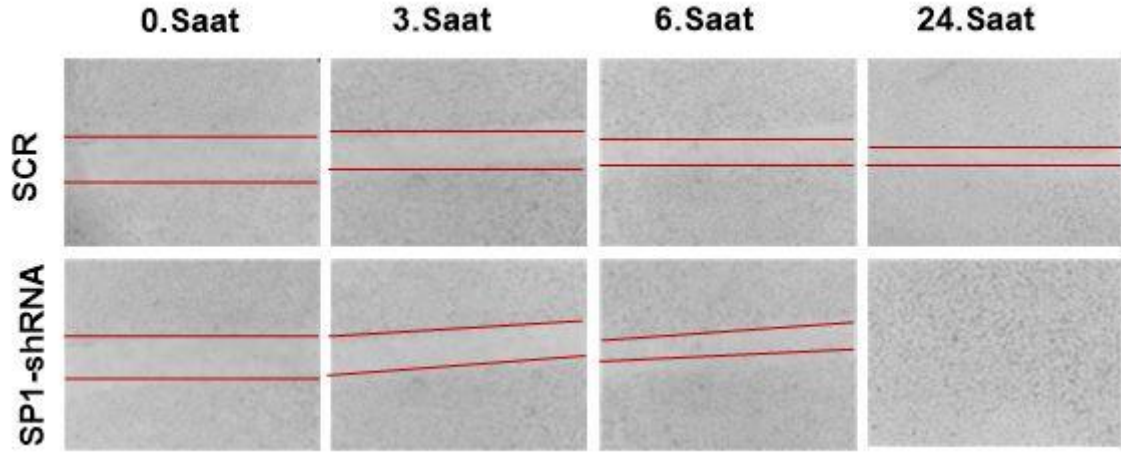
**Şekil 4.41:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni Formasyon analizi.

#### 4.3.1.7.3 Çizik Testi

Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çizik testi deneyi yapıldı. (Bölüm 3.2.4.12.2) Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.2 'de anlatıldığı şekilde 0. saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6-24 ve 48. Saatlerde fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi.



**Şekil 4.42:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi.



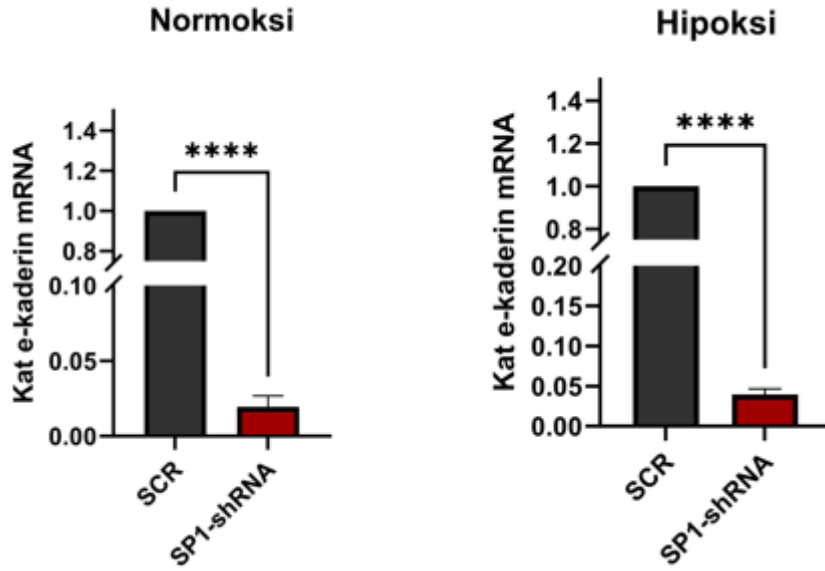
**Şekil 4.43:** Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi.

Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda SCR grubuna göre, MIR100HG-shRNA hücrelerinde daha hızlı bir kapanma olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildiği gösterilmiştir.

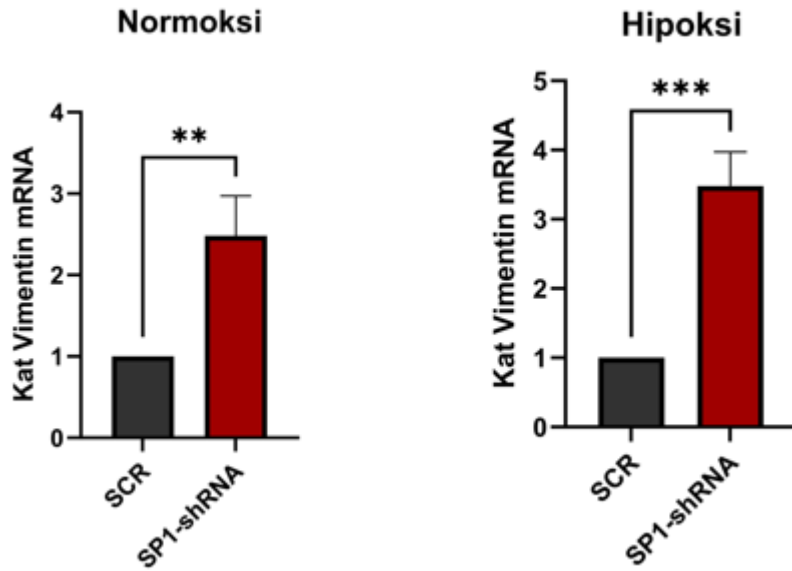
#### 4.3.1.8 SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde baskılanmasının, normoksik ve hipoksik koşullar altında metastatik genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi

SCR ve SP1 ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde H $\beta$ 2, e-kaderin ve vimentin primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirildi. Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesi baskılandığında, hem normoksik koşullarda hem de hipoksik koşullarda e-kaderin

ifadesi anlamlı derecede azalmıştır, vimentin ifadesi normoksik koşullarda yaklaşık 3 kat hipoksikde yaklaşık 4 kat anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.44: Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının e-kaderin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi.



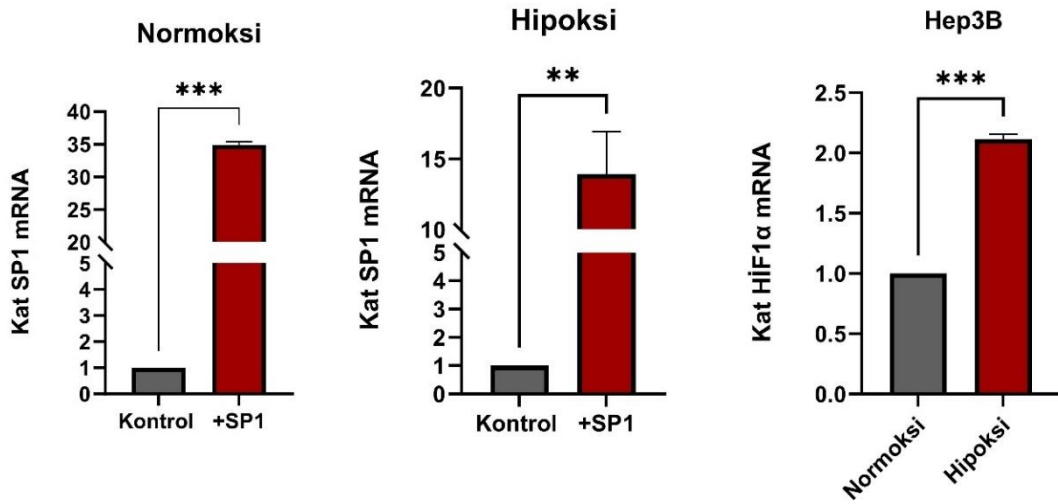
Şekil 4.45: Hep3B hücre hattında SP1 ifadesinin baskılanmasının vimentin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi.

### 4.3.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları

Tez kapsamında Hep3B hücre hattında, SP1 aşırı ifadesinin hücrelerin karakterizasyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2.4.11.1’de anlatıldığı şekilde SP1 ekspresyon vektörünün ve kontrol olarak kullanılacak olan boş pGFP-C1 vektörünün Hep3B hücre hattına TurboFect™ Reagent ile transfeksiyonu gerçekleştirildi. Boş vektör ve SP1 transkripsiyon faktörünün aşırı ifade edildiği hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.2.5.1). Bölüm 3.2.5.3’te anlatıldığı şekilde cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA’lar ile SP1 ve MIR100HG ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ile analiz edildi (Bölüm 3.2.5.4). Kontrol grubuna kıyasla, overekspresyon yapılan deney gruplarında SP1 aşırı ifadesi doğrulandı. Ardından SP1 aşırı ifadesinin Hep3B hücreleri üzerindeki, proliferasyonu, koloni oluşturma kapasites ve hücre göçü gibi etkilerini tespit etmek amacıyla MTT testi, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri gerçekleştirildi.

#### 4.3.2.1 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması

SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullar altında mRNA Seviyesinde doğrulamak için bölüm de anlatıldığı gibi Real-Time PCR yapıldı. Real-Time PCR sonuçları, GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 4.45).

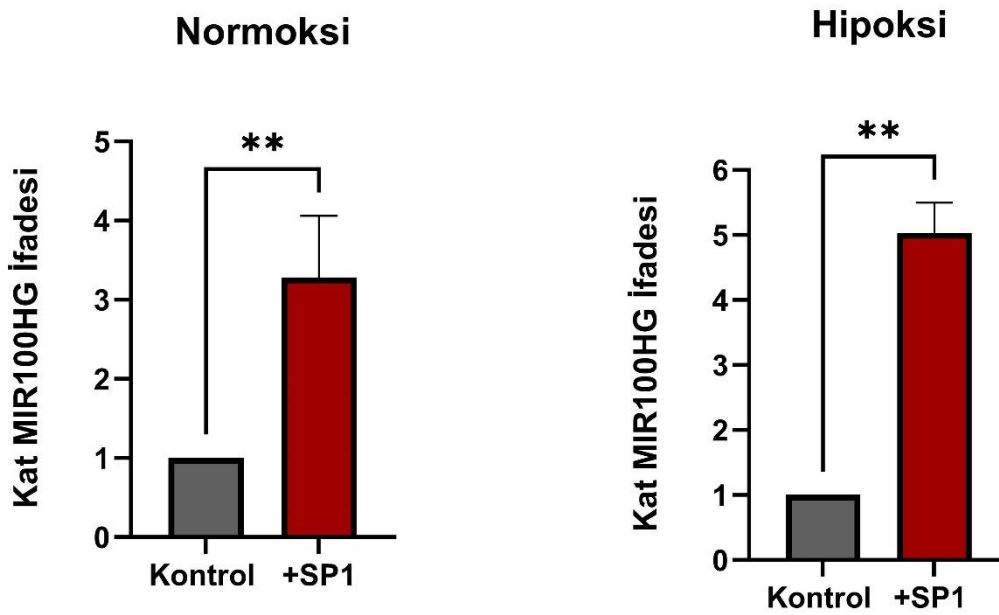


Şekil 4.46: Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.

Deney hem hipoksik hem de normoksik ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması için HIF-1 $\alpha$  seviyesi analiz edildi ve normoksiye göre yaklaşık 2 kat artış görülmüştür. Hep3B hücre hattında kontrol grubuna göre, SP1 ekspresyon vektörü aşırı ifade edilen hücrelerde normoksidede yaklaşık 35 kat ve hipoksidede yaklaşık 15 kat anlamlı olan artış belirlenmiştir.

#### 4.3.2.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında MIR100HG İfadesinin Belirlenmesi

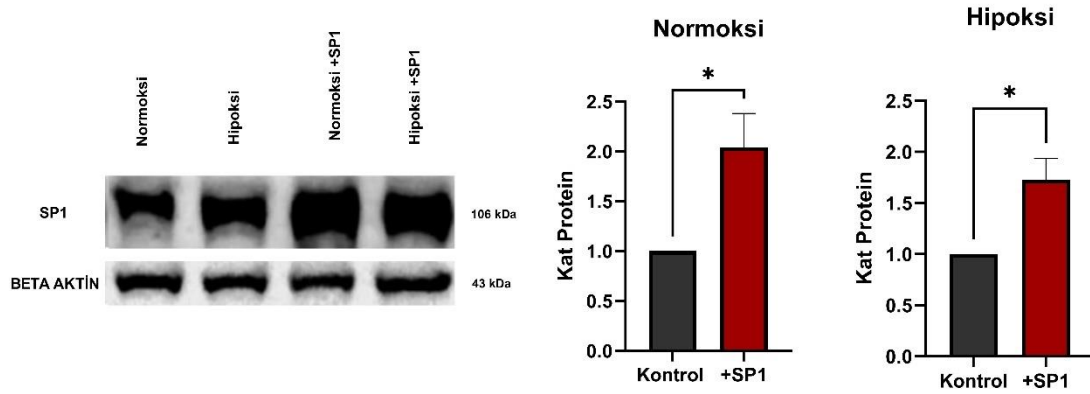
SP1 aşırı ifade edilmiş Hep3B hücrelerinde H $\beta$ 2 ve MIR100HG primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirildi. Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifade edildiğinde MIR100HG ekspresyonu normoksidede yaklaşık 3 kat hipoksidede yaklaşık 5 kat arttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.47: Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda MIR100HG ekspresyon seviyesinin belirlenmesi.

### 4.3.2.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin Western Blot ile Belirlenmesi

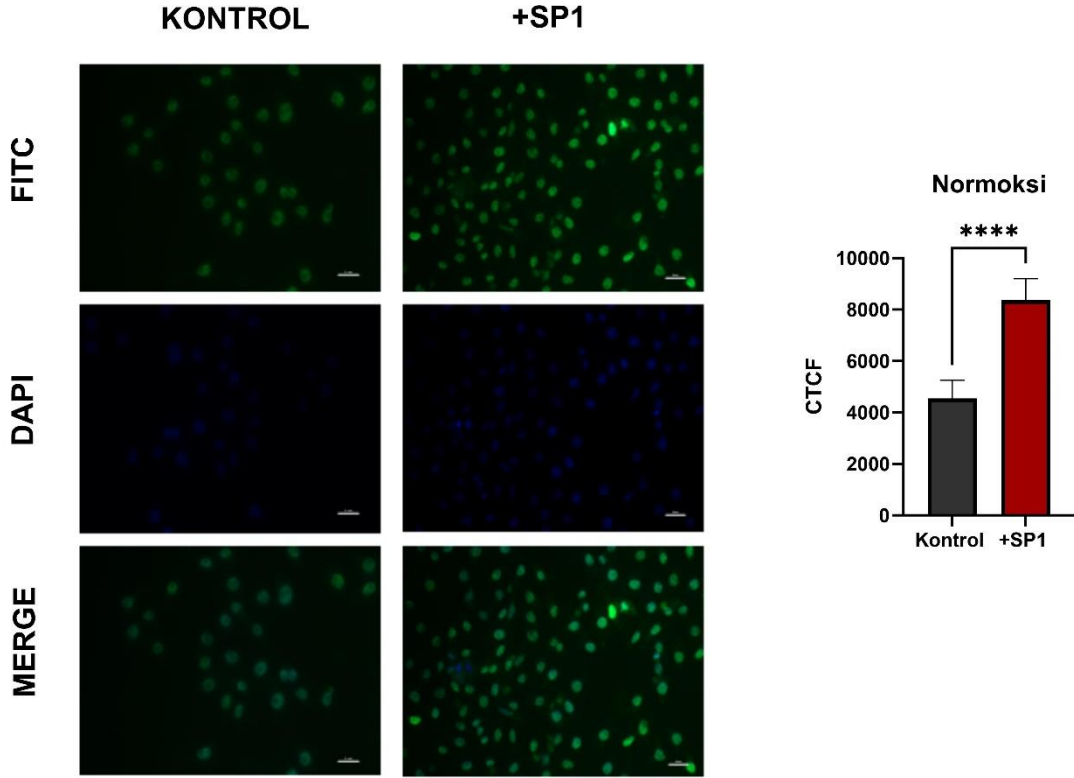
SP1 ekspresyon vektörü ve boş pGFP-C1 vektörünün Hep3B hücre hattına TurboFect™ Reagent ile transfeksiyonu gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.4.11.1). SP1 aşırı ifadesinin protein seviyesinde doğrulanması için western blot yapıldı.  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde hücreler 6 kuyucuğa sahip plakalara paylaştırılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C’de gece boyu tutunmaları için bekletildi. Hipoksi oluşturulacak kuyulara 300 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması gerçekleştirildi. 37 °C’de, 24 saat inkübe edildikten sonra, Bölüm 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde RIPA tamponu ile protein ekstraktları elde edildi ve Bölüm 3.2.6.3’te anlatıldığı şekilde Bradford ile miktarları belirlendi. Protein ekstraktları ile Bölüm 3.2.6.4’te anlatıldığı gibi SDS-PAGE gerçekleştirildi. Protein örneklerinin protein büyüklüklerine göre ayrılması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.6.5’te anlatıldığı gibi PDVF membrana transfer işlemi yapıldı. Daha sonra SP1 baskılanmasının protein seviyesinde kanıtlanması amacıyla Bölüm 3.2.6.6 ‘da belirtildiği şekilde SP1 primer ve sekonder antikoru uygulandı. ECL Western substratı uygulandıktan sonra membranda bulunan protein bantları, Fusion FX sisteminde görüntüledi. Görüntülenen bantlar β-aktin antikoru ile elde edilen sonuçlara göre normalize edilerek, veriler GraphPad programında grafiklendirildi (Şekil 4.47).



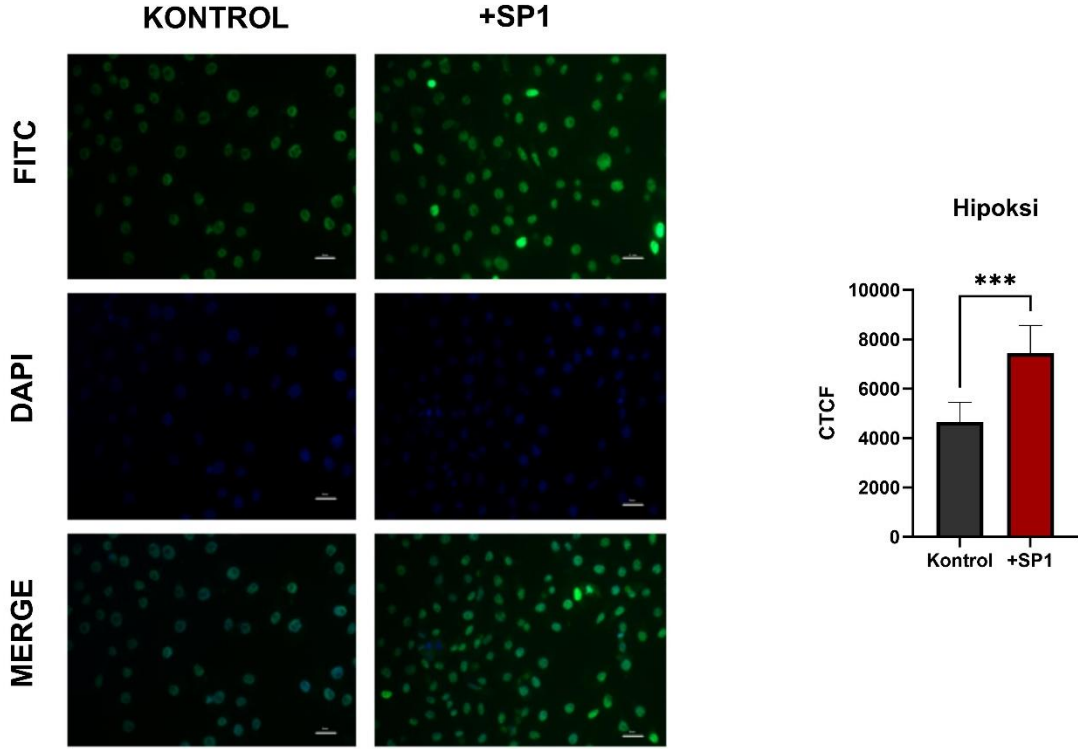
**Şekil 4.48:** SP1 aşırı ifade edilen Hep3B hücrelerinde SP1 ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda Western Blot yöntemi ile protein seviyesinin belirlenmesi.

#### 4.3.2.4 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Hep3B Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinin IFC Deneyi ile Belirlenmesi

SP1 aşırı ifade edilen hücrelerde ve boş pGFP-C1 hücrelerinden normoksik ve hipoksik ortamlarda protein seviyesininin doğrulanması amacıyla IFC deneyi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.6.7)



Şekil 4.49: Hep3B hücre hattında SP1 antikoruna ile normoksik koşullarda SP1 aşırı ifadesinin protein seviyesinde doğrulanması.

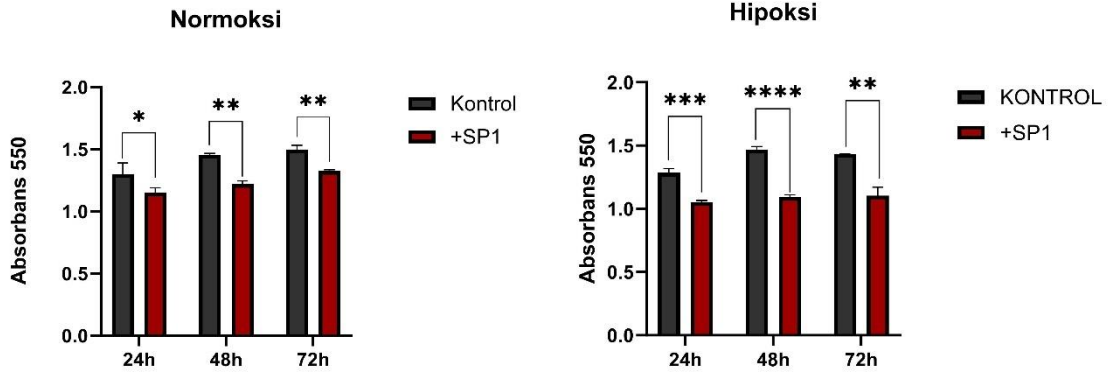


**Şekil 4.50:** Hep3B hücre hattında SP1 antikoru ile hipoksik koşullarda SP1 aşırı ifadesinin protein seviyesinde doğrulanması.

#### 4.3.2.5 SP1 Transkripsiyon Faktörünün Aşırı İfade Edildiği Hep3B Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

##### 4.3.2.5.1 MTT Testi

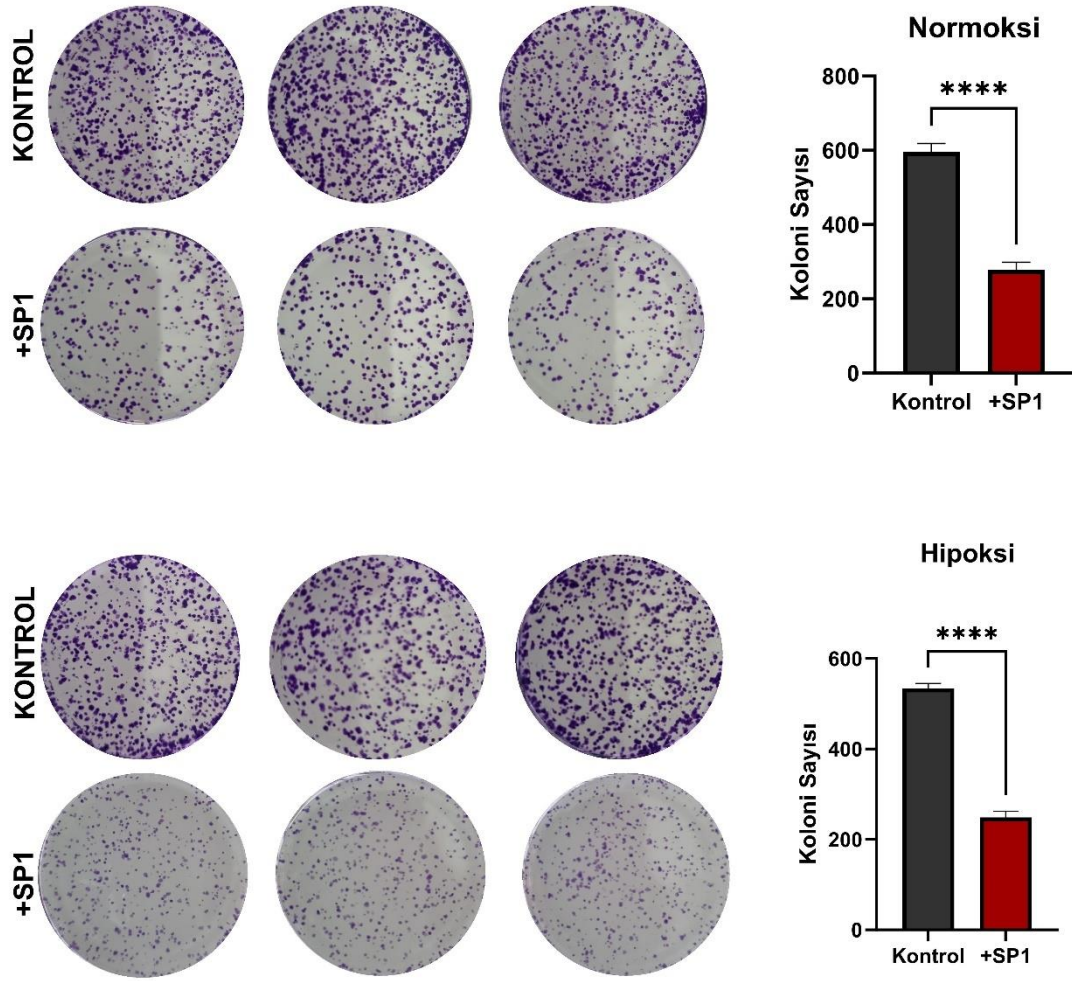
Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda neden olduğu hücre proliferasyonuna etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.1). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.1’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda yapılan 24, 48 ve 72 saatlik deney sonucunda SP1 aşırı ifade edildiğinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.50).



**Şekil 4.51:** Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

#### 4.3.2.5.2 Koloni Formasyon

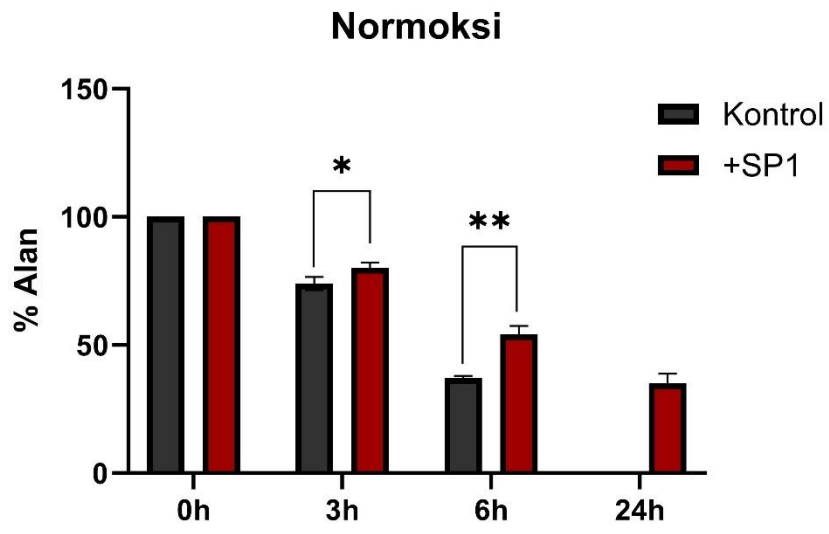
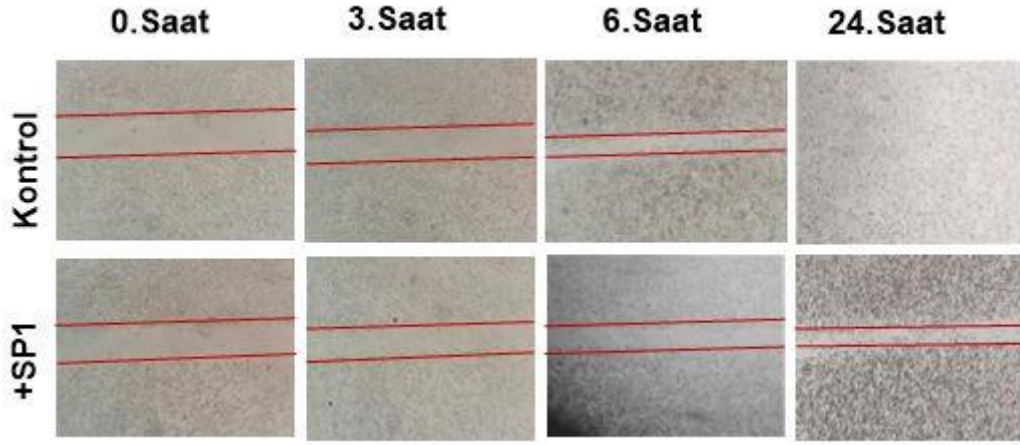
Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan koloni formasyon deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.3). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 14. Gün kuyular fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter Programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi (Şekil 4.51). Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifade edildiğinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda koloni oluşturma yeteneğinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir.



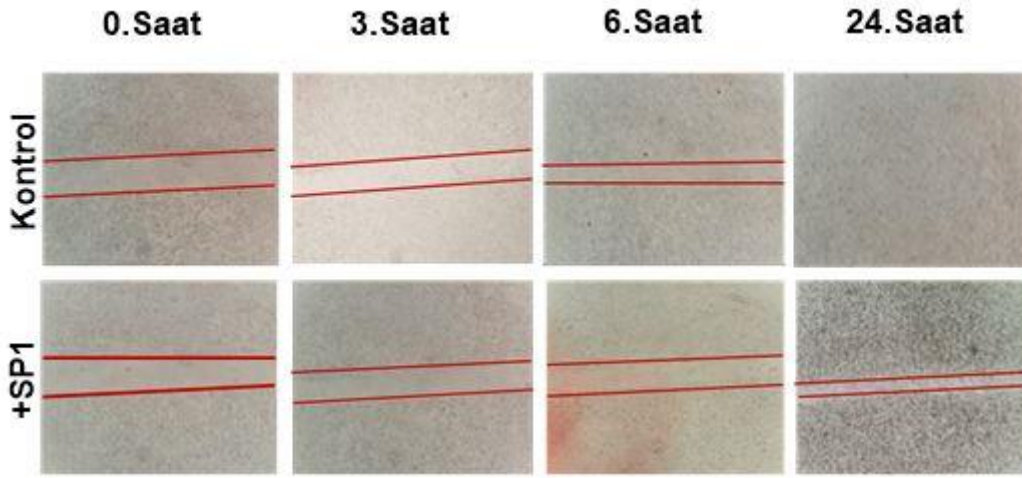
**Şekil 4.52:** Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.

#### 4.3.2.5.3 Çizik Testi

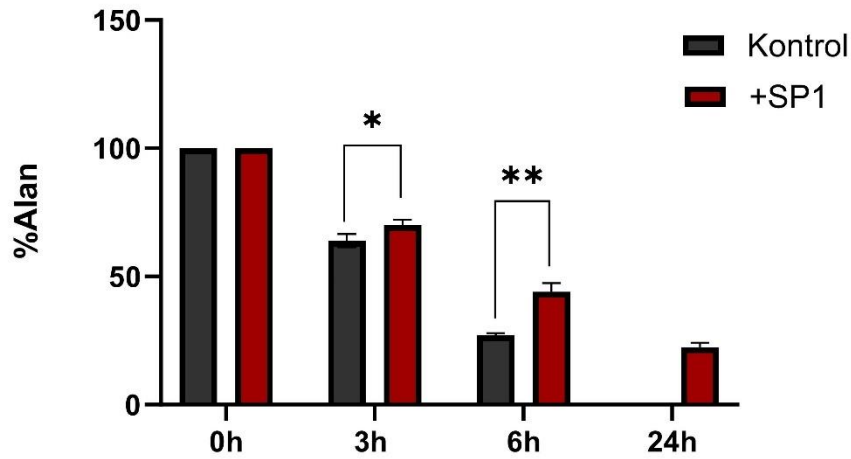
Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla çizik testi deneyi yapıldı (Bölüm 3.2.4.12.2). Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300  $\mu$ M olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  uygulandı. Bölüm 3.2.4.12.2’de anlatıldığı şekilde 0. Saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6 ve 24. Saatlerde fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi. Elde edilen verilere göre, normoksik ve hipoksik koşullarda SP1aşırı ifade edilmiş hücrelerde alanın kontrol grubuna göre daha yavaş kapanığı gösterilmiştir.



**Şekil 4.53:** Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin normoksik koşullarda çizik testi analizi.



### Hipoksi

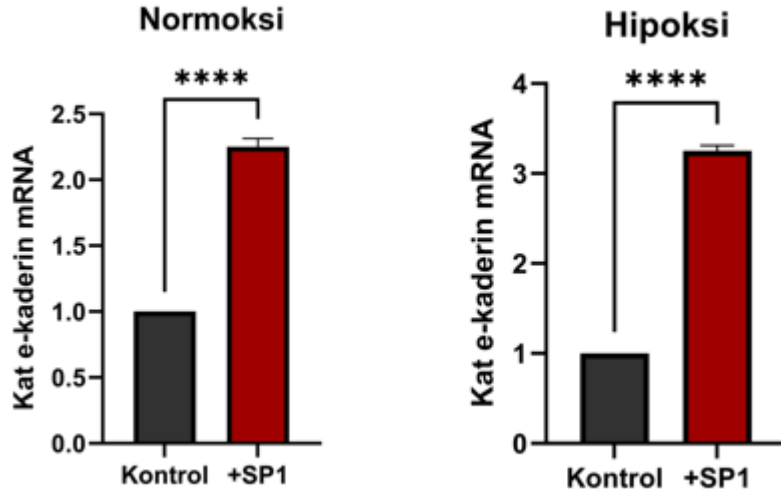


**Şekil 4.54:** Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda çizik testi analizi.

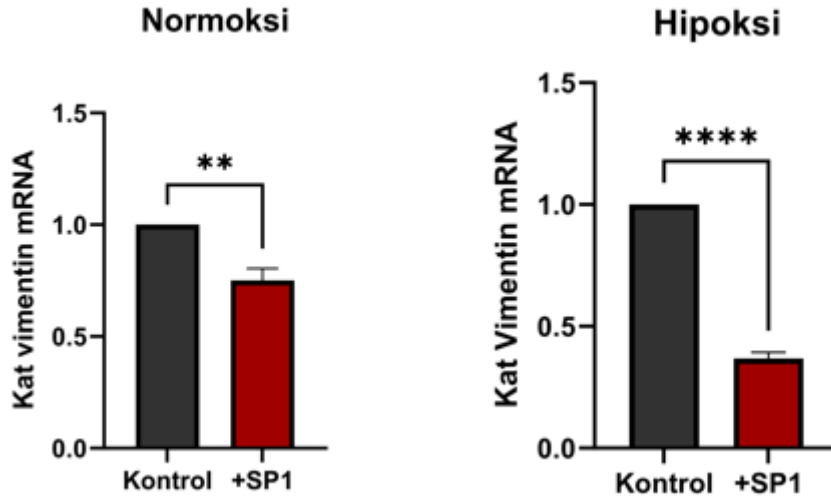
#### 4.3.2.6 SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde Aşırı İfade Edilmesinin, normoksik ve hipoksik koşullar altında metastatik genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Kontrol grubu olarak boş pGFP-C1 vektörü ve SP1 aşırı ifade edilmiş Hep3B hücrelerinde H $\beta$ 2, e-kaderin ve vimentin primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.5.2 ve 3.2.5.3). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edildi ve grafiklendirildi. Hep3B hücrelerinde SP1 aşırı ifade edildiğinde normoksik koşullarda e-

kaderin ifadesi yaklaşık 2 kat, hipoksik koşullarda yaklaşık 3 kat artmıştır. Vimentin ifadesi hem normoksida hem de hipoksida anlamlı şekilde azalmıştır.



Şekil 4.55: Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin e-kaderin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi.



Şekil 4.56: Hep3B hücre hattında SP1 aşırı ifadesinin vimentin ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde belirlenmesi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uzun kodlamayan RNA (lncRNA) MIR100HG, özellikle hepatosellüler karsinomda (HCC) olmak üzere çeşitli kanserlerde önemli bir gen olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmalar, MIR100HG'nin susturulmasının HCC hücrelerinde hücre canlılığını azaltabileceğini ve apoptozu artırabileceğini ve böylece tümör ilerlemesini engelleyebileceğini göstermiştir [47]. Bu lncRNA'nın, çoğalma ve apoptoz gibi hücrel süreçleri düzenlemede önemli olan miR-100, let-7a-2 ve miR-125b dahil olmak üzere çeşitli mikroRNA'ları düzenlediği ve aynı zamanda bu genleri intronunda taşıdığı bilinmektedir [26] [112]. HCC bağlamında, MIR100HG'nin ifade düzeyleri tümör invazyonu ve metastaz dahil olmak üzere klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir [113].

Bu tez kapsamında, MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullardaki hücrel etkileri, MIR100HG'nin SP1 tarafından transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi ve MIR100HG promotorunda SP1 bağlanma bölgelerinin ChIP deneyi ile doğrulanması, SP1 'in normoksik ve hipoksik koşullarda hücrel ve moleküler etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Hep3B hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında MIR100HG ifadesinin baskılanması sonrasında hücrel etkileri araştırılmıştır. Hep3B hücrelerinde kalıcı olarak MIR100HG ifadesinin baskılanması mRNA seviyesinde kanıtlanmıştır. MIR100HG ifadesi baskılanmış hücrelerde MTT testinde hücre proliferasyonunun tüm saat dilimlerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. MIR100HG ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinde hücre göçünün kontrol grubuna göre çiziklerin hem normoksi hem de hipoksi grubunda daha yavaş kapandığı gösterilmiştir. MIR100HG ifadesi baskılanmış Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği kontrol grubuna hem normoksik hem de hipoksik koşullarda azalmıştır. MIR100HG ifadesi baskılanmış hücrelerde invazyon yeteneğine matrijel deneyi ile bakılmıştır ve kontrol grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda MIR100HG ifadesi baskılanmış hücrelerde invazyon yeteneğinin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. MIR100HG baskılanmasının hücrel etkilerini belirlemek amacıyla yapılan MTT, çizik testi, koloni formasyon deneyi, matrijel ve flow sitometri deneyleri sonucunda birbiri ile tutarlı ve uyumlu veriler elde edilmiştir.

MIR100HG aşırı ekspresyonunun, birden fazla çalışmada tümör ilerlemesi, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. MIR100HG'nin HCC'deki rolü çok yönlüdür ve mikroRNA'larla ve malignitenin agresif doğasına katkıda bulunan çeşitli sinyal yollarıyla etkileşimleri içerir. Araştırmalar, MIR100HG'nin normal karaciğer dokularına kıyasla HCC dokularında yukarı düzenlendiğini gösterilmiştir ve bu da kanser ilerlemesi için bir biyobelirteç olarak potansiyelini göstermektedir [47]. MIR100HG'nin, özellikle hepatoselüler karsinom (HCC) dahil olmak üzere kanserlerde, kritik bir düzenleyici olarak rol oynadığı ve düzensizliğinin onkojenik işlevlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir; bu düzensizlik, hücre çoğalması ve invazyonu gibi çeşitli kanser süreçlerini kolaylaştırmaktadır [30].

Hep3B hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda MIR100HG aşırı ifadesinin sonrasında hücresel etkileri araştırılmıştır. Hep3B hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesi mRNA seviyesinde kanıtlanmıştır. MIR100HG aşırı ifade edilmiş hücrelerde MTT testinde hücre proliferasyonunun tüm saat dilimlerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. MIR100HG aşırı ifade edilmiş hücrelerde hücre göçünün, kontrol grubuna göre çiziklerin hem normoksi hem de hipoksi grubunda daha hızlı kapandığı gösterilmiştir. MIR100HG aşırı ifade edilmiş Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği kontrol grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. MIR100HG aşırı ifadesi edilmiş hücrelerde invazyon yeteneğine matrijel deneyi ile bakılmıştır ve kontrol grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda MIR100HG aşırı ifade edilmiş hücrelerde invazyon yeteneğinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. MIR100HG aşırı ifadesinin hücresel etkilerini belirlemek amacıyla yapılan MTT, çizik testi, koloni formasyon deneyi, matrijel ve flow sitometri deneyleri sonucunda birbiri ile tutarlı ve uyumlu veriler elde edilmiştir.

MIR100HG'nin kanser biyolojisindeki önemli rolü, farklı kanserlerde yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. Literatürde, MIR100HG 'nin Akut megakaryoblastik Lösemi hücre hatlarında ve hastalarda (AMKL) fazla miktarda ifade olduğu tanımlanmıştır. MIR100HG susturulmasının AMKL hücre hatlarında lösemik hücre büyümesini engellediği rapor edilmiştir [32]. Kolorekteal kanserde ve baş-boyun squamaoz kanserlerde MIR100HG'nin iki bağlantılı miRNA'nın, miR-100 ve miR-125-b, Cetuximab ilacına dirençte artmış olduğu gösterilmiştir. miR-100/125b'nin Wnt/ $\beta$ -catenin yolağındaki genleri

baskıladığını bulmuşlardır. Ayrıca GATA-1 transkripsiyon faktörünü MIR100HG'nin promotoruna bağlanarak ifadesini azalttığı gösterilmiştir [26]. Kolorektal kanser hasta dokularında MIR100HG'nin ifadesinin fazla olduğu ve ifadesinin arttığı durumlarda hücre metastazını arttırdığını göstermişlerdir. Özellikle altı farklı kolorektal kanser hücresi kullanarak metastaz-invazyon deneyi yapmışlardır. Ayrıca in vivo deney sonucunda da MIR100HG'nin susturulmasının farede metastazı azalttığını tanımlamışlardır [29]. MIR100HG'nin hasta dokularında ve osteosarkom hücrelerinde ifadesinin artmış olduğu gösterilmiştir. MIR100HG'nin susturulması sonrasında hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu başlattığı bulunmuştur [114]. MIR100HG'nin Triple negatif meme kanserinde (TNBC) protoonkogen olarak davrandığı gösterilmiştir. MIR100HG'nin susturulmasının, meme kanseri hücrelerini azalmasına ve p27 geninin artmasında neden olduğu anlaşılmıştır. [115]. Dil skuamoz hücreli karsinoma hücrelerinde biyoinformatik olarak metastazdan sorumlu genler arasında yer almıştır [116]. Larangial squamaz kanserinde MIR100HG'nin ekspresyonunda artış tanımlanmıştır. Ayrıca genin overekspresyonu migrasyon ve invazyonu artırmıştır [41].

MIR100HG'nin ifadesinin baskılanması ve hücrel etkilerinin incelenmesi literatürde sınırlı sayıda çalışılmış bir konudur. Bu tez çalışması, MIR100HG'nin susturulmasının kanser tedavisinde hedeflenebilecek potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle, bu genin yüksek ekspresyon seviyelerinin kötü prognozla ilişkilendirilmesi, MIR100HG'yi terapötik müdahale için değerli bir hedef haline getirmektedir. Tez kapsamında yapılan deneyler, MIR100HG'nin susturulmasının proliferasyon, göç, invazyon ve koloni oluşturma gibi kanserle ilişkili hücrel süreçleri anlamlı şekilde baskıladığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, literatürde MIR100HG'nin tedaviye direnç ve metastaz artışıyla ilişkilendirildiğini belirten çalışmalarla uyumludur. Bu bulgular, MIR100HG'nin kanser hücrelerinin malign özelliklerini azaltan bir hedef olabileceğini desteklemektedir. Tezin birinci iş paketinde MIR100HG'nin aşırı ekspresyonu ve baskılanmasının hücrel etkileri üzerine yapılan deneyler, tutarlı ve tamamlayıcı sonuçlar sunmuştur. Bu durum, MIR100HG'nin kanser biyolojisindeki kritik rolünü ve tedavi hedefi olarak potansiyelini güçlendirmektedir. Sonuç olarak, MIR100HG'nin susturulmasının maligniteye karşı etkili bir strateji olabileceği gösterilmiştir. Gelecekteki çalışmalar, bu genin moleküler mekanizmalarının detaylandırılmasına ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesine odaklanmalıdır.

MIR100HG promotorunun transkripsiyonel aktivitesini tespit etmek için MIR100HG promotor parçaları pMetLuc vektörüne klonlanmıştır. MIR100HG promotorunun SP1 tarafından regülasyonunu tespit etmek için MIR100HG promotor parçaları ile SP1 ekspresyon plazmiti birlikte transfekte edilmiş ve sonuçlar, yalnızca MIR100HG promotor parçalarının transfekte edildiği kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. MIR100HG promotor parçaları ve SP1 birlikte transfekte edildiğinde, kontrol grubuna kıyasla tüm promotor parçalarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. MIR100HG promotoruna SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasını doğrulamak ve DNA-protein etkileşimlerini belirlemek amacıyla CHIP deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada öncelikle, MIR100HG promotorundaki olası SP1 bağlanma bölgeleri PROMO/ALGGEN programı kullanılarak biyoinformatik analizle tespit edilmiştir. CHIP primerlerinin tasarımı sırasında, SP1 bağlanma bölgelerini içermelerine dikkat edilerek iki farklı ileri ve geri CHIP primeri dizayn edilmiştir. Hep3B hücrelerine SP1 ekspresyon plazmiti transfekte edildikten sonra yapılan CHIP deneyi sonucunda, MIR100HG promotoruna özgü CHIP primerlerinin her birinde SP1 antikoru ile immünopresipitasyon tespit edilmiştir. Bu bağlanmanın özellikle -260/+56 bölgesini içeren primerlerin hedeflediği bölgede en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir.

MIR100HG promotoruna SP1 transkripsiyon faktörünün bağlandığının CHIP deneyi ile belirlenmesi ilk kez literatüre kazandırılmıştır. SP1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG'yi regüle ettiği ilk olarak bu tez çalışmasında gösterilmiştir.

SP1 transkripsiyon faktörü, özellikle gen susturulması ve kanser ilerlemesi bağlamında, gen düzenlemesinde önemli bir rol oynar. SP1, çeşitli genlerin GC açısından zengin promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel aktivitelerini etkileme yeteneğiyle bilinir. SP1'in bu çok yönlü rolü, özellikle gen susturulmasına yol açabilen DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi mekanizmalar yoluyla hem gen ifadesinin aktivasyonunda hem de baskılanmasında yer almasıyla vurgulanmaktadır.

Hep3B hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda SP1 transkripsiyon faktörünün kalıcı olarak ifadesinin baskılanmasının sonrasında hücrel ve moleküler düzeyde etkileri araştırılmıştır. Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün kalıcı olarak ifadesinin baskılanması mRNA ve protein seviyesinde kanıtlanmıştır. SP1 ifadesi baskılanmış hücrelerde MIR100HG ekspresyon seviyesine bakılmıştır ve hem normoksik hem hipoksik SP1 azaldığında MIR100HG'nin de azaldığı gösterilmiştir. SP1 ifadesi

baskılanmış hücrelerde MTT testinde hücre proliferasyonunun tüm saat dilimlerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. SP1 ifadesi baskılanmış hücrelerde hücre göçünün, kontrol grubuna göre hem normoksi hem de hipoksi grubunda daha hızlı kapandığı gösterilmiştir. SP1 ifadesi baskılanmış hücrelerde koloni oluşturma yeteneği kontrol grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. SP1 ifadesi baskılanmış hücrelerde hücrel etkilerin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT, çizik testi ve koloni formasyon deneyleri sonuçları birbirleri ile pozitif korelasyon içindedir.

Hep3B hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda SP1 transkripsiyon faktörünün aşırı ifadesinin sonrasında hücrel ve moleküler düzeyde etkileri araştırılmıştır. Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün aşırı ifadesi mRNA ve protein seviyesinde kanıtlanmıştır. SP1 aşırı ifade edilen hücrelerde MIR100HG ekspresyon seviyesine bakılmıştır ve hem normokside hem hipokside SP1 ekspresyonu arttığında MIR100HG'nin de arttığı gösterilmiştir. SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerde MTT testinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre tüm saat dilimlerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerde hücre göçünün, kontrol grubuna göre hem normoksi hem de hipoksi grubunda daha yavaş kapandığı gösterilmiştir. SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerde koloni oluşturma yeteneği kontrol grubuna göre hem normoksik hem de hipoksik koşullarda anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. SP1 aşırı ifade edilmiş hücrelerde hücrel etkilerin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT, çizik testi ve koloni formasyon deneyleri sonuçları birbirleri ile pozitif korelasyon içindedir.

SP1'in işlevinin kritik yönlerinden biri, DNA metilasyonu ile etkileşimidir. Gen promotorlarındaki CpG adalarının metilasyonu, SP1 bağlanmasını inhibe ederek transkripsiyonel susturmaya yol açabilir. Örneğin, çalışmalar akciğer kanseri hücrelerinde GST-M2 promotorunun hipermetilasyonunun SP1'in bağlanmasını önlediğini ve bunun da gen ifadesinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir [117]. Benzer şekilde, SP1'in CDCA3 promotoruna bağlanması, gastrik kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı teşvik eden DNA metilasyonundan etkilenir [118]. Bu, SP1'in epigenetik modifikasyonların gen ifadesi üzerindeki etkilerini aracılık etmedeki önemli rolünü vurgular. SP1'in kendisinin susturulmasının hücrel davranış üzerinde derin etkileri olduğu gösterilmiştir. Örneğin, glioma hücrelerinde SP1'in susturulması, tümör invazyonu için çok önemli olan matris

metalloproteinazlarının invazivitesinin azalmasına ve ifadesinin değişmesine neden olmuştur [57]. Başka bir çalışmada, kolorektal karsinom hücrelerinde SP1'in susturulması telomeraz aktivitesini baskılamış ve apoptozu teşvik etmiştir; bu da kanser hücresi sağ kalımının sürdürülmesindeki rolünü göstermektedir [119]. Bu bulgular, SP1'in yalnızca çeşitli genlerin ifadesini düzenlemekle kalmayıp aynı zamanda kanser hücresi çoğalması ve sağ kalımında da kritik bir rol oynadığını göstermektedir. SP1 ile diğer transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşim, düzenleyici rolünü daha da karmaşık hale getirmektedir. Örneğin, SP1 ve p53 arasındaki etkileşimin tümör baskılayıcı genlerin ifadesini düzenlediği, SP1'in genellikle hücrel bağlama bağı olarak transkripsiyonu artırabilen veya engelleyebilen bir yardımcı düzenleyici olarak hareket ettiği gösterilmiştir [120]. Ek olarak, SP1'in kendisinin düzenlenmesi, DNA'ya bağlanma afinitesini ve transkripsiyonel aktivitesini değiştirebilen fosforilasyon ve asetilasyon gibi transasyon sonrası modifikasyonlardan etkilenebilir [53].

SP1'in tümör baskılayıcı rolü, genellikle diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimleri ve belirli genlerin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Örneğin, bazı araştırmalar, SP1'in belirli tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu artırabileceğini ve bu sayede tümör gelişimini inhibe edebileceğini göstermektedir [121] [122]. Ancak, SP1'in etkileri, hücre tipine ve mikroçevre koşullarına bağı olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin, bazı kanser türlerinde SP1'in susturulması, tümör hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını artırabilirken, diğerlerinde ise SP1'in aktivasyonu tümör baskılayıcı etkiler gösterebilir [123] [124].

SP1'in tümör baskılayıcı rolü üzerine yapılan çalışmalar, bu transkripsiyon faktörünün farklı kanser türlerinde nasıl işlev gördüğünü anlamak için önemlidir. Örneğin, bazı araştırmalar, SP1'in belirli mikroRNA'lar tarafından düzenlendiğini ve bu düzenlemenin kanser hücrelerinin büyümesi ve invazyonu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir [64] [125]. Bu durum, SP1'in hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı özellikler gösterebileceğini desteklemektedir. Ayrıca, SP1'in diğer transkripsiyon faktörleriyle olan etkileşimleri, kanser hücrelerinin davranışını etkileyen karmaşık bir ağı oluşturmaktadır [71] [126].

Sonuç olarak, SP1'in tümör baskılayıcı veya onkogenik rolü, kanser biyolojisi alanında önemli bir araştırma konusudur. SP1'in etkileri, hücre tipine, mikroçevre koşullarına ve genetik arka plana bağı olarak değişiklik göstermektedir. Bu tez kapsamında SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerinde ifadesinin baskılanması ile hücrel ve

moleküler düzeyde etkileri tespit edilmiştir ve Sp'in tümör baskılayıcı özelliği ortaya çıkarılmıştır ve literatüre katkıda bulunulmuştur.

SP1'in hem gen transkripsiyonunun aktivatörü hem de baskılayıcısı olarak ikili rolü iyi belgelenmiştir. Onkogenlerin ekspresyonunu artırabilirken aynı anda tümör baskılayıcı genleri baskılayabilir ve böylece onkojenik sürece katkıda bulunabilir. Örneğin, akciğer kanserinde, SP1'in TAp73 $\gamma$  geninin promotoruna bağlanarak tümör oluşumuyla ilişkili olan ekspresyonunu desteklediği gösterilmiştir [52]. Belirli kanserler bağlamında, SP1'in aşırı ifadesi tümör büyümesini teşvik eden yolların aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, pankreas kanserinde, SP1'in hücre dışı matris yeniden şekillenmesinde ve tümör invazyonunda rol oynayan matris metalloproteinazların (MMP'ler) ifadesini düzenlediği gösterilmiştir [127]. Benzer şekilde, kolorektal kanserde, SP1 hücre göçünü ve invazyonunu kolaylaştıran genlerin önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmış ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyeline katkıda bulunmuştur [128] [129].

Bazı durumlarda, SP1, özellikle erken evre tümörlerde veya belirli uyaranlara yanıt olarak bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir. Bu ikilik, SP1'in kanser biyolojisindeki rolünün karmaşıklığını vurgular ve işlevlerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasına duyulan ihtiyacın altını çizer.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Hua, S., et al., *miR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1*. *Cancer cell international*, 2019. 19(1): p. 1-11.
- [2] Wang, J.-P., et al., *Clinicopathological characteristics and surgical outcomes of sarcomatoid hepatocellular carcinoma*. *World Journal of Gastroenterology*, 2020. 26(29): p. 4327.
- [3] Rawla, P., et al., *Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma*. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 2018. 22(3): p. 141-150.
- [4] Ghouri, Y.A., I. Mian, and J.H. Rowe, *Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis*. *Journal of carcinogenesis*, 2017. 16.
- [5] Wu, L., et al., *Tumor-Associated Macrophages (TAMs) Polarization by Single-Cell Sequencing Combined with Bulk Data in Hepatocellular Carcinoma Cell*. 2024.
- [6] Zhu, Z., et al., *Identification, verification and pathway enrichment analysis of prognosis-related immune genes in patients with hepatocellular carcinoma*. *Frontiers in Oncology*, 2021. 11: p. 695001.
- [7] Chen, T., et al., *Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog (VPS72) binding to lysine acetyltransferase 5 (KAT5) promotes the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma through regulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway*. *Bioengineered*, 2022. 13(4): p. 9197-9210.
- [8] Gong, A. and X. Li, *The efficacy and safety of Apatinib combined with TACE in the treatment of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis*. *World Journal of Surgical Oncology*, 2022. 20(1): p. 69.
- [9] Wang, H., et al., *Long non-coding RNA CRNDE promotes the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through miR-217/MAPK 1 axis*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2018. 22(12): p. 5862-5876.
- [10] Chen, B.W., et al., *lncRNA-POIR promotes epithelial–mesenchymal transition and suppresses sorafenib sensitivity simultaneously in hepatocellular carcinoma by sponging miR-182-5p*. *Journal of cellular biochemistry*, 2021. 122(1): p. 130-142.
- [11] Peng, H., et al., *The roles of lncRNA in hepatic fibrosis*. *Cell & bioscience*, 2018. 8: p. 1-8.

- [12] Amodio, N., et al., *MALAT1: a druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches*. Journal of hematology & oncology, 2018. 11: p. 1-19.
- [13] Galasso, M., M. Elena Sana, and S. Volinia, *Non-coding RNAs: a key to future personalized molecular therapy?* Genome medicine, 2010. 2: p. 1-10.
- [14] Paraskevopoulou, M.D., et al., *DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts*. Nucleic acids research, 2016. 44(D1): p. D231-D238.
- [15] Karagkouni, D., et al., *DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions*. Nucleic acids research, 2018. 46(D1): p. D239-D245.
- [16] Batista, P.J. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease*. Cell, 2013. 152(6): p. 1298-1307.
- [17] Ashouri, A., et al., *Pan-cancer transcriptomic analysis associates long non-coding RNAs with key mutational driver events*. Nature communications, 2016. 7(1): p. 13197.
- [18] Sun, M., et al., *LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1*. Cancer research, 2016. 76(21): p. 6299-6310.
- [19] Li, Y., et al., *Identification and characterization of lncRNA mediated transcriptional dysregulation dictates lncRNA roles in glioblastoma*. Oncotarget, 2016. 7(29): p. 45027.
- [20] Cheng, Y., et al., *Long noncoding RNA expression signatures of colon cancer based on the ceRNA network and their prognostic value*. Disease markers, 2019. 2019(1): p. 7636757.
- [21] Zheng, Y., et al., *LncRNA GAS5 contributes to lymphatic metastasis in colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. 7(50): p. 83727.
- [22] Jang, S.Y., et al., *Clinical significance of lncRNA-ATB expression in human hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2017. 8(45): p. 78588.
- [23] Li, Y., et al., *NEAT expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer*. Oncotarget, 2015. 6(29): p. 27641.
- [24] Shi, Z., et al., *Long non-coding RNA mortal obligate RNA transcript suppresses tumor cell proliferation in prostate carcinoma by inhibiting glucose uptake*. Oncology Letters, 2019. 18(4): p. 3787-3791.
- [25] Bhan, A., M. Soleimani, and S.S. Mandal, *Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm*. Cancer research, 2017. 77(15): p. 3965-3981.

- [26] Lu, Y., et al., *lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling*. *Nature medicine*, 2017. 23(11): p. 1331-1341.
- [27] Ghafouri-Fard, S., et al., *A concise review on the role of MIR100HG in human disorders*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023. 27(16): p. 2278-2289.
- [28] Shang, C., et al., *Characterization of long non-coding RNA expression profiles in lymph node metastasis of early-stage cervical cancer*. *Oncology Reports*, 2016. 35(6): p. 3185-3197.
- [29] Li, W., et al., *Elevated MIR100HG promotes colorectal cancer metastasis and is associated with poor prognosis*. *Oncology letters*, 2019. 18(6): p. 6483-6490.
- [30] Wu, Y., et al., *LncmiRHG-MIR100HG: A new budding star in cancer*. *Frontiers in Oncology*, 2022. 12: p. 997532.
- [31] Bagheri, P., M. Sharifi, and A. Ghadiri, *Downregulation of MIR100HG induces apoptosis in human megakaryoblastic leukemia cells*. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 2021. 37: p. 232-239.
- [32] Emmrich, S., et al., *LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia*. *Molecular cancer*, 2014. 13: p. 1-12.
- [33] Aheget, H., et al., *Exosomes: Their role in pathogenesis, diagnosis and treatment of diseases*. *Cancers*, 2020. 13(1): p. 84.
- [34] Chen, F.-Y., et al., *Long non-coding RNA MIR100HG promotes the migration, invasion and proliferation of triple-negative breast cancer cells by targeting the miR-5590-3p/OTX1 axis*. *Cancer cell international*, 2020. 20: p. 1-15.
- [35] Zhang, G., et al., *Long non-coding RNA PTCSC3 suppresses triple-negative breast cancer by downregulating long non-coding RNA MIR100HG*. *Oncology Letters*, 2023. 26(2): p. 1-10.
- [36] Mei, J., et al., *Systematic characterization of non-coding RNAs in triple-negative breast cancer*. *Cell Proliferation*, 2020. 53(5): p. e12801.
- [37] Chen, D., et al., *miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion*. *PLoS genetics*, 2014. 10(2): p. e1004177.
- [38] Yuan, K., Y. Sun, and Y. Ji, *miR-509-3p Suppresses Migration, Invasion, and Epithelial–Mesenchymal Transition in Melanoma Cells by Targeting Collagen Triple Helix Repeat Containing 1*. *Balkan Medical Journal*, 2021. 38(3): p. 177.
- [39] Ho-Xuan, H., et al., *Gene expression signatures of a preclinical mouse model during colorectal cancer progression under low-dose metronomic chemotherapy*. *Cancers*, 2020. 13(1): p. 49.

- [40] Zhang, S., et al., *MIR100HG regulates CALD1 gene expression by targeting miR-142-5p to affect the progression of bladder cancer cells in vitro, as revealed by transcriptome sequencing*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022. 8: p. 793493.
- [41] Huang, Y., C. Zhang, and Y. Zhou, *LncRNA MIR100HG promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma through the downregulation of miR-204-5p*. *OncoTargets and therapy*, 2019: p. 2967-2973.
- [42] Liu, Y., et al., *MIR100HG promoted ferroptosis via regulating the expression of ACSL3 in lung cancer cells*. 2023.
- [43] Li, P., et al., *CXXC finger protein 4 inhibits the CDK18- ERK1/2 axis to suppress the immune escape of gastric cancer cells with involvement of ELK1/MIR100HG pathway*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. 24(17): p. 10151-10165.
- [44] Tan, Z., et al., *Prognosis analysis and validation of lipid metabolism-associated lncRNAs and tumor immune microenvironment in bladder cancer*. *Aging (Albany NY)*, 2023. 15(16): p. 8384.
- [45] Jung, E., et al., *Microrna-based therapeutics for drug-resistant colorectal cancer*. *Pharmaceuticals*, 2021. 14(2): p. 136.
- [46] Chen, B., et al., *Targeting non-coding RNAs to overcome cancer therapy resistance*. *Signal transduction and targeted therapy*, 2022. 7(1): p. 121.
- [47] Li, F., et al., *Long noncoding RNA MIR100HG knockdown attenuates hepatocellular carcinoma progression by regulating microRNA-146b-5p/Chromobox 6*. *Gastroenterology Research and Practice*, 2021. 2021(1): p. 6832518.
- [48] Ren, L., et al., *A cuproptosis-related LncRNA signature: Integrated analysis associated with biochemical recurrence and immune landscape in prostate cancer*. *Frontiers in Genetics*, 2023. 14: p. 1096783.
- [49] Xu, F.F., et al., *MiR-520f promotes cell aggressiveness by regulating fibroblast growth factor 16 in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2017. 8(65): p. 109546.
- [50] Li, X.-Y., et al., *MicroRNA-34a-5p enhances sensitivity to chemotherapy by targeting AXL in hepatocellular carcinoma MHCC-97L cells*. *Oncology Letters*, 2015. 10(5): p. 2691-2698.
- [51] Chowdhury, S.M., et al., *Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular carcinoma using complementary microRNAs*. *Journal of Controlled Release*, 2016. 238: p. 272-280.
- [52] Logotheti, S., et al., *Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73 $\gamma$  in lung cancer*. *The FEBS journal*, 2010. 277(14): p. 3014-3027.

- [53] Young, M.-J., et al., *Estradiol-mediated inhibition of Sp1 decreases miR-3194-5p expression to enhance CD44 expression during lung cancer progression*. Journal of biomedical science, 2022. 29(1): p. 3.
- [54] Vellingiri, B., et al., *Understanding the role of the transcription factor Sp1 in ovarian cancer: from theory to practice*. International journal of molecular sciences, 2020. 21(3): p. 1153.
- [55] Yao, J.C., et al., *Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer*. Clinical cancer research, 2004. 10(12): p. 4109-4117.
- [56] Wang, L., et al., *Altered expression of transcription factor Sp1 critically impacts the angiogenic phenotype of human gastric cancer*. Clinical & experimental metastasis, 2005. 22: p. 205-213.
- [57] Guan, H., et al., *Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP- 2- mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome*. International journal of cancer, 2012. 130(3): p. 593-601.
- [58] Meng, Q., et al., *Circular RNA circSCAF11 accelerates the glioma tumorigenesis through the miR-421/SP1/VEGFA axis*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2019. 17: p. 669-677.
- [59] Jungert, K., et al., *Sp1 is required for transforming growth factor- $\beta$ -induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells*. Cancer research, 2007. 67(4): p. 1563-1570.
- [60] Zhang, H.-w., et al., *A regulatory loop involving miR-29c and Sp1 elevates the TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer*. Oncotarget, 2016. 7(52): p. 85905.
- [61] Hu, L., et al., *Sp1 mediates the constitutive expression and repression of the PDSS2 gene in lung cancer cells*. Genes, 2019. 10(12): p. 977.
- [62] Liu, N., et al., *hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor*. Nucleic Acids Research, 2016. 44(18): p. 8693-8703.
- [63] Malsy, M., B. Graf, and K. Almstedt, *The active role of the transcription factor Sp1 in NFATc2-mediated gene regulation in pancreatic cancer*. BMC biochemistry, 2019. 20: p. 1-11.

- [64] Xia, S.-S., et al., *MicroRNA-22 suppresses the growth, migration and invasion of colorectal cancer cells through a Sp1 negative feedback loop*. *Oncotarget*, 2017. 8(22): p. 36266.
- [65] Jiang, J., et al., *Functional interaction of E1AF and Sp1 in glioma invasion*. *Molecular and cellular biology*, 2007. 27(24): p. 8770-8782.
- [66] Kong, L.-M., et al., *A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis*. *Cancer research*, 2014. 74(14): p. 3764-3778.
- [67] Liang, X., et al., *Suppression of lung cancer cell invasion by LKB1 is due to the downregulation of tissue factor and vascular endothelial growth factor, partly dependent on SPI*. *International journal of oncology*, 2014. 44(6): p. 1989-1997.
- [68] Hung, W.-C. and H.-C. Chang, *Indole-3-carbinol inhibits Sp1-induced matrix metalloproteinase-2 expression to attenuate migration and invasion of breast cancer cells*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009. 57(1): p. 76-82.
- [69] Chang, W.-C. and J.-J. Hung, *Functional role of post-translational modifications of Sp1 in tumorigenesis*. *Journal of biomedical science*, 2012. 19: p. 1-7.
- [70] Spengler, M.L. and M.G. Brattain, *Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(9): p. 5567-5574.
- [71] Long, J., et al., *Specific protein 1, c-Abl and ERK1/2 form a regulatory loop*. *Journal of Cell Science*, 2019. 132(1): p. jcs222380.
- [72] Xu, X.-W., et al., *SP1 reduces autophagic flux through activating p62 in gastric cancer cells*. *Molecular Medicine Reports*, 2018. 17(3): p. 4633-4638.
- [73] Previdi, S., et al., *Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts*. *Gynecologic oncology*, 2010. 118(2): p. 182-188.
- [74] DeFino, M.C., et al., *Differential regulation of GPR54 transcription by specificity protein-1 and partial estrogen response element in mouse pituitary cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010. 393(4): p. 603-608.
- [75] Yen, W.H., et al., *Sp1-mediated ectopic expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 in hepatocellular carcinoma*. *Cancer medicine*, 2016. 5(3): p. 465-477.
- [76] Wang, Y., et al., *Establishment and verification of a prognostic risk score model based on immune genes for hepatocellular carcinoma in an Asian population*. *Translational Cancer Research*, 2023. 12(10): p. 2806.

- [77] Kim, M.-O., et al.,  *$\beta$ -Ionone enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through Sp1-dependent upregulation of DR5 and downregulation of NF- $\kappa$ B activity*. *Molecular cancer therapeutics*, 2010. 9(4): p. 833-843.
- [78] Feng, G., et al., *Hepatitis B virus X protein up-regulates C4b-binding protein  $\alpha$  through activating transcription factor Sp1 in protection of hepatoma cells from complement attack*. *Oncotarget*, 2016. 7(19): p. 28013.
- [79] Liu, H., et al., *Hepatitis B virus X protein upregulates transcriptional activation of human telomerase reverse transcriptase*. *Virus genes*, 2010. 40: p. 174-182.
- [80] Wang, J., et al., *Transcriptome analysis reveals the anti-cancerous mechanism of licochalcone  $\alpha$  on human hepatoma Cell HepG2*. *Frontiers in Nutrition*, 2021. 8: p. 807574.
- [81] Kai-Yun, C., et al., *LncRNA CRNDE is involved in radiation resistance in hepatocellular carcinoma via modulating the SPI/PDK1 axis*. *Neoplasma*, 2022. 69(4).
- [82] Li, X., et al., *Differentially expressed long noncoding RNAs involved in FUBP1 promoting hepatocellular carcinoma cells proliferation*. *BioMed Research International*, 2021. 2021(1): p. 6664519.
- [83] Zhao, B., et al., *MiRNA-124 inhibits the proliferation, migration and invasion of cancer cell in hepatocellular carcinoma by downregulating lncRNA-UCA1*. *OncoTargets and therapy*, 2019: p. 4509-4516.
- [84] He, Y., et al., *Transcriptome-wide 5-methylcytosine functional profiling of long non-coding RNA in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Management and Research*, 2020: p. 6877-6885.
- [85] Zhang, Q., et al., *Hypoxia-induced lncRNA-NEAT1 sustains the growth of hepatocellular carcinoma via regulation of miR-199a-3p/UCK2*. *Frontiers in oncology*, 2020. 10: p. 998.
- [86] Wang, X.L., et al., *Long noncoding RNA DGCR5 represses hepatocellular carcinoma progression by inactivating Wnt signaling pathway*. *Journal of cellular biochemistry*, 2019. 120(1): p. 275-282.
- [87] Jiang, H., et al., *A four- long noncoding RNA signature predicts survival of hepatocellular carcinoma patients*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2020. 34(9): p. e23377.
- [88] Liu, C., et al., *MicroRNA- 138 targets SPI to inhibit the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells*. *Oncology Letters*, 2018. 15(1): p. 1279-1286.

- [89] Ying, J., et al., *MicroRNA-363-3p is downregulated in hepatocellular carcinoma and inhibits tumorigenesis by directly targeting specificity protein 1*. *Molecular Medicine Reports*, 2017. 16(2): p. 1603-1611.
- [90] Liu, Y., et al., *miR-612 suppresses stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by modulating Sp1/Nanog signaling*. *Cell death & disease*, 2016. 7(9): p. e2377-e2377.
- [91] Lee, R.H., et al., *Quercetin induces antiproliferative activity against human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by suppressing specificity protein 1 (Sp1)*. *Drug Development Research*, 2015. 76(1): p. 9-16.
- [92] Qian, Y., et al., *AQP9 suppresses hepatocellular carcinoma cell invasion through inhibition of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression under hypoxia*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020. 35(11): p. 1990-1997.
- [93] Muz, B., et al., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy*. *Hypoxia (Auckl)*. 2015; 3: 83–92. Epub 2016/10/25. doi: 10.2147/HP.
- [94] Pang, M.-F., et al., *Tissue stiffness and hypoxia modulate the integrin-linked kinase ILK to control breast cancer stem-like cells*. *Cancer research*, 2016. 76(18): p. 5277-5287.
- [95] Gao, J.-L. and Y.-G. Chen, *Natural compounds regulate glycolysis in hypoxic tumor microenvironment*. *BioMed research international*, 2015. 2015(1): p. 354143.
- [96] Roy, S., et al., *Hypoxic tumor microenvironment: Implications for cancer therapy*. *Experimental Biology and Medicine*, 2020. 245(13): p. 1073-1086.
- [97] Carnero, A. and M. Lleonaart, *The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution*. *Inside the Cell*, 2016. 1(2): p. 96-105.
- [98] Natarajan, S., et al., *Collagen remodeling in the hypoxic tumor-mesothelial niche promotes ovarian cancer metastasis*. *Cancer research*, 2019. 79(9): p. 2271-2284.
- [99] Tang, K., et al., *Hypoxia promotes breast cancer cell growth by activating a glycogen metabolic program*. *Cancer research*, 2021. 81(19): p. 4949-4963.
- [100] Kim, I., et al., *Cancer-associated fibroblasts in the hypoxic tumor microenvironment*. *Cancers*, 2022. 14(14): p. 3321.
- [101] Hu, M., et al., *The regulation of immune checkpoints by the hypoxic tumor microenvironment*. *PeerJ*, 2021. 9: p. e11306.
- [102] Berchem, G., et al., *Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF- $\beta$  and miR23a transfer*. *Oncoimmunology*, 2016. 5(4): p. e1062968.

- [103] Eckert, F., et al., *Rationale for combining radiotherapy and immune checkpoint inhibition for patients with hypoxic tumors*. *Frontiers in immunology*, 2019. 10: p. 407.
- [104] Hasmim, M., et al., *Critical role of tumor microenvironment in shaping NK cell functions: implication of hypoxic stress*. *Frontiers in immunology*, 2015. 6: p. 482.
- [105] Meng, W., et al., *Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment*. *Molecular cancer*, 2019. 18: p. 1-14.
- [106] Miyazaki, Y., et al., *The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma*. *International journal of oncology*, 2008. 32(1): p. 145-151.
- [107] Cai, C., L. Yang, and K. Zhou, *8DEstablishment and validation of a hypoxia-related signature predicting prognosis in hepatocellular carcinoma*. *BMC gastroenterology*, 2021. 21: p. 1-14.
- [108] Zhang, B., et al., *A hypoxia-related signature for clinically predicting diagnosis, prognosis and immune microenvironment of hepatocellular carcinoma patients*. *Journal of Translational Medicine*, 2020. 18: p. 1-17.
- [109] Xu, H., et al., *MiR-338-3p inhibits hepatocarcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib by targeting hypoxia-induced factor 1 $\alpha$* . *PloS one*, 2014. 9(12): p. e115565.
- [110] Bui, B.P., et al., *Hypoxia-inducible factor-1: a novel therapeutic target for the management of cancer, drug resistance, and cancer-related pain*. *Cancers*, 2022. 14(24): p. 6054.
- [111] Lacazette, E., *A laboratory practical illustrating the use of the ChIP- qPCR method in a robust model: Estrogen receptor alpha immunoprecipitation using MCF-7 culture cells*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2017. 45(2): p. 152-160.
- [112] Liu, H., et al., *Interaction of lncRNA MIR100HG with hnRNPA2B1 facilitates m6A-dependent stabilization of TCF7L2 mRNA and colorectal cancer progression*. *Molecular cancer*, 2022. 21(1): p. 74.
- [113] Gao, C., et al., *Identification of senescence-associated long non-coding RNAs to predict prognosis and immune microenvironment in patients with hepatocellular carcinoma*. *Frontiers in Genetics*, 2022. 13: p. 956094.
- [114] Su, X., et al., *ELK1-induced upregulation of long non-coding RNA MIR100HG predicts poor prognosis and promotes the progression of osteosarcoma by epigenetically silencing LATS1 and LATS2*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. 109: p. 788-797.

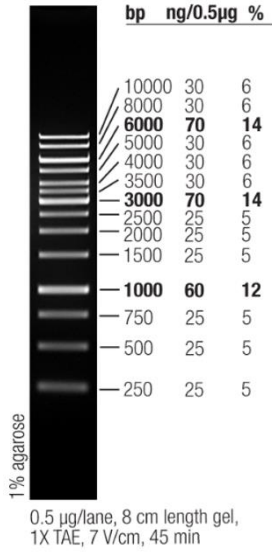
- [115] Wang, S., et al., *LncRNA MIR100HG promotes cell proliferation in triple-negative breast cancer through triplex formation with p27 loci*. *Cell death & disease*, 2018. 9(8): p. 805.
- [116] Zhou, R.-S., et al., *Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue*. *BMC cancer*, 2019. 19: p. 1-10.
- [117] Tang, S.C., et al., *Epigenetic mechanisms for silencing glutathione S- transferase m2 expression by hypermethylated specificity protein 1 binding in lung cancer*. *Cancer*, 2011. 117(14): p. 3209-3221.
- [118] Yu, J., et al., *DNA hypomethylation promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by regulating the binding of SP1 to the CDCA3 promoter*. *Journal of cellular biochemistry*, 2020. 121(1): p. 142-151.
- [119] Zhao, L., et al., *Silencing Sp1 suppresses telomerase activity and promotes apoptosis of SW480 cells line in colorectal carcinoma*. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2011. 10: p. 220-224.
- [120] Angrisani, A., et al., *Specific Protein 1 and p53 interplay modulates the expression of the KCTD-containing Cullin3 adaptor suppressor of Hedgehog 2*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021. 9: p. 638508.
- [121] Shi, S. and Z.G. Zhang, *Role of Sp1 expression in gastric cancer: A meta- analysis and bioinformatics analysis*. *Oncology Letters*, 2019. 18(4): p. 4126-4135.
- [122] Hedrick, E., et al., *Specificity protein (Sp) transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 are non-oncogene addiction genes in cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. 7(16): p. 22245.
- [123] Jiang, D., et al., *Epigenetic silencing of ZNF132 mediated by methylation-sensitive Sp1 binding promotes cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma*. *Cell death & disease*, 2018. 10(1): p. 1.
- [124] Kim, T.W., et al., *Epigenetic modification of TLR4 promotes activation of NF- $\kappa$ B by regulating methyl-CpG-binding domain protein 2 and Sp1 in gastric cancer*. *Oncotarget*, 2015. 7(4): p. 4195.
- [125] Hu, J., et al., *miRNA-223 inhibits epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma cells via Sp1*. *International journal of oncology*, 2016. 49(1): p. 325-335.
- [126] Safe, S., et al., *Specificity protein transcription factors and cancer: opportunities for drug development*. *Cancer prevention research*, 2018. 11(7): p. 371-382.
- [127] Zhang, B., et al., *The LIM protein Ajuba/SP1 complex forms a feed forward loop to induce SP1 target genes and promote pancreatic cancer cell proliferation*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019. 38: p. 1-11.

- [128] Yu, Y., et al., *SP1 upregulated FoxO3a promotes tumor progression in colorectal cancer*. *Oncology reports*, 2018. 39(5): p. 2235-2242.
- [129] Zhang, W., et al., *miR-320a/SP1 negative reciprocal interaction contributes to cell growth and invasion in colorectal cancer*. *Cancer Cell International*, 2021. 21: p. 1-13.

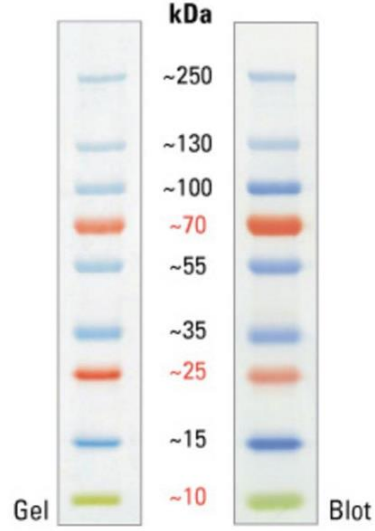
# **EKLER**

## EKLER

### EK A: Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



▲ **1 kb DNA Ladder**  
(GeneRuler™)



▲ **Protein Ladder**  
(PageRuler™)

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Şevin AVŞAR KOÇ

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

### Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2024
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Biyoloji Öğretmenliği	2021
Lise	Eryaman Anadolu Lisesi	2017