

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



HEPATOSELLÜLER KANSERDE
TGF-B'NİN NONO/P54NRB
GEN İFADESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

SALİHA DERYA KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye A. TÜRKOĞLU

BALIKESİR, OCAK - 2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Saliha Derya KESKİN tarafından hazırlanan “HEPATOSELLÜLER KANSERDE TGF-B’NİN NONO/P54NRB GEN İFADESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17 Ocak 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir Üniversitesi

Üye (Asil)

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Bursa Uludağ Üniversitesi

Üye (Asil)

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye A. TÜRKOĞLU

Balıkesir Üniversitesi

Üye (Yedek)

Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Balıkesir Üniversitesi

Üye (Yedek)

Doç. Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN

Uşak Üniversitesi

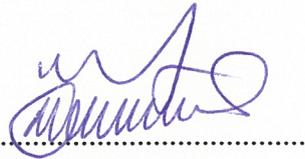
İmza



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

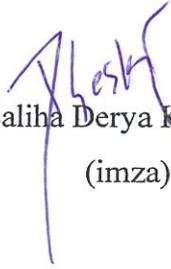


ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**HEPATOSELLÜLER KANSERDE TGF-B’NİN NONO/P54NRB GEN İFADESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**” 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.


Saliha Derya KESKİN
(imza)

ÖZET

HEPATOSELLÜLER KANSERDE TGF-B'NİN NONO/P54NRB GEN İFADESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SALIHA DERYA KESKİN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, OCAK - 2020

p54nrb/NONO, PSPC1 ve PSF/SFPQ olmak üzere memeli DBHS (*Drosophila melanogaster* behavior, human splicing) protein ailesinin üyeleridir. Bu proteinler subnükleer bölgede birlikte bulunmaktadır. p54nrb/NONO gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA sentezi ve onarım işlemleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde yer almaktadır. Başlangıçta bir RNA bağlayıcı protein olarak tanımlanan p54nrb/NONO çift sarmallı DNA, tek sarmallı DNA ve RNA ile etkileşime girer ve gen transkripsiyonu, RNA splicing ve homolog olmayan DNA uç birleştirme tamir mekanizmasının birçok aşamasında yer alır. Gen transkripsiyonundaki, RNA işlemedeki ve DNA onarımındaki rolleri nedeniyle, p54nrb/NONO kanser ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu tez çalışmasında insan hepatosellüler karsinom modeli Hep3B hücre hattında TGF- β aracılı p54nrb/NONO gen regülasyonunun belirlenmesi amaçlandı. Tez çalışması sonucunda TGF- β sitokin uyarımı ile p54nrb/NONO ekspresyonunun mRNA ve protein seviyesinde arttığı qRT-PZR ve Western Blot analizleriyle belirlendi. Bu analizlere göre mRNA seviyesinde TGF- β sitokini uygulandıktan 48 saat sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 12 kat, protein seviyesinde TGF- β sitokini uygulandıktan 6 saat sonra yaklaşık 1.7 kat artış olduğu belirlendi. Yolak inhibisyon deneyleri ile hem mRNA hem de protein seviyesinde p54nrb/NONO geninin SMAD-bağımsız TGF- β sinyal yolağını kullandığı gösterildi. Ayrıca, TGF- β 'nin p54nrb/NONO transkripsiyonel aktivitesini en büyük kontrakt P1(-730/+529)'de arttırdığı belirlendi. Hep3B hücre hattında TGF- β 'nin SMAD-bağımsız yoldan MAP2K1, PI3K, JNK, SMAD3 ve NF κ B sinyal yollarını kullanarak p54nrb/NONO transkripsiyonel aktivitesini düzenlediği belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: p54nrb/NONO, TGF- β , Hepatosellüler Karsinom (HCC).

Bilim Kod / Kodları: 20606-20610

Sayfa Sayısı: 99

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF TGF- β ON THE EXPRESSION OF NONO/P54 NRB GENE IN HEPATO-CELL

MSC THESIS
SALIHA DERYA KESKİN
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC
(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JANUARY - 2020

p54nrb/NONO, PSPC1 and PSF/SFPQ are members of the mammalian DBHS (Drosophila melanogaster behavior, human splicing) protein family. These proteins coexist in the subnuclear region. p54nrb/NONO is involved in a variety of biological processes including regulation of gene expression, DNA synthesis and repair processes. p54nrb/NONO, originally defined as an RNA binding protein, interacts with double-stranded DNA, single-stranded DNA and RNA, and takes place in several stages of gene transcription, RNA splicing and non-homologous end joining DNA repair mechanism. Due to their role in gene transcription, RNA processing and DNA repair, p54nrb/NONO is involved in cancer progression. In this thesis, it was aimed to determine TGF- β mediated p54nrb / NONO gene regulation in Hep3B cell line in the human hepatocellular carcinoma model. As a result of the thesis, it was determined that the expression of p54nrb/NONO by TGF- β cytokine stimulation was increased at mRNA and protein levels by qRT-PZR and Western Blot analyzes, respectively. According to these analyzes, it was determined that there was a 12-fold increase in the level of mRNA compared to the control group 48 hours after the TGF- β cytokine treatment, and a 1.7-fold increase in the protein level 6 hours after the TGF- β cytokine was added. Pathway inhibition experiments demonstrated that the p54nrb/NONO gene uses the SMAD-independent TGF- β signaling pathway at both the mRNA and protein levels. In addition, it was determined that TGF- β increased p54nrb/NONO transcriptional activity for the largest construct P1 (-730/+529). It was determined that TGF- β regulates p54nrb/NONO transcriptional activity by using MAP2K1, PI3K, JNK, SMAD3 and NF κ B signaling pathways from the SMAD-independent pathway in the Hep3B cell line.

KEYWORDS: p54nrb/NONO, TGF- β , Hepatocellular carcinoma (HCC).

Science Code / Codes: 20606-20610

Page Number: 99

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Sitokinler.....	2
1.1.1 Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)	2
1.1.2 TGF- β Süper Ailesi.....	3
1.1.2.1 TGF- β Süper Ailesi Yapısal Özellikleri	3
1.1.2.2 TGF- β Süper Ailesi Üyeleri.....	4
1.1.2.2.1 TGF- β Alt Ailesi	4
1.1.2.2.2 Activin Alt Ailesi	4
1.1.2.2.3 Decapentaplegic (dpp) Alt Ailesi	4
1.1.2.2.4 60A Alt Ailesi	5
1.1.2.2.5 DVR Grubu.....	5
1.1.2.2.6 Iraksak Genler	6
1.1.3 TGF - β Ligandları ve Reseptörleri	7
1.1.3.1 Reseptörlere Ligand Bağlanma Mekanizması	7
1.1.4 TGF- β Sinyalisasyonu	9
1.1.4.1 R-SMAD-Bağımlı Sinyal Yolağı.....	9
1.1.4.2 SMAD-Bağımsız Sinyal Yolağı.....	10
1.1.5 TGF- β 'nın Tümördeki Rolü	10
1.1.5.1 Tümör Baskılayıcı Olarak TGF- β	10
1.1.5.2 Tümör Aktivatör Olarak TGF- β	11
1.1.5.2.1 TGF- β İmmün İzlemeden Kaçışa Neden Olur	11
1.1.5.2.2 TGF- β Anjiyogenezi Teşvik Eder	12
1.1.5.2.3 TGF- β Epitelyal-Mezenkimal Geçişi Destekler.....	12
1.2 Paraspeckle.....	12
1.2.1 Nükleer Zenginleştirilmiş Bol Transkript 1 (NEAT1).....	14
1.2.2 DBHS Proteinleri.....	16
1.2.2.1 Paraspeckle Protein 1 (PSPC1).....	16
1.2.2.2 PSF/SFPQ (PTB İle İlişkili Splicing Faktörü).....	17
1.2.2.3 NONO/p54nrb (Non-POU Domain İçeren Oktamer Bağlanma Protein).....	18
1.2.2.3.1 NONO/p54nrb Geninin Görevleri ve Kanserdeki Rolü	19
2. TEZİN AMACI	25
3. MATERYAL METOT	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri	27
3.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları	30
3.2 Metot.....	32
3.2.1 Laboratuvar Ortamının ve Malzemelerinin Sterilizasyonu	32

3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları	32
3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Hazırlığı	32
3.2.2.1.1 Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) Hazırlanması	32
3.2.2.1.2 FBS- (Fetal Sığır-Buzağı Serumu) Hazırlanması	32
3.2.2.2 Tripsin EDTA (T.E.) Solüsyonu Hazırlanması	33
3.2.2.3 Hücre Besiyeri Ortamının Hazırlanması	33
3.2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hattı	33
3.2.2.5 -80°C 'de Stoklanan Hücre Soyunun Başlatılması	34
3.2.2.6 Hücre Soyunun Büyütülmesi	34
3.2.2.7 Hücrelerin Pasajlanması	34
3.2.2.8 Canlı Hücrelerin Tripan Mavisi Boyama İle Belirlenmesi	34
3.2.2.9 Hücrelerin -80°C Derin Dondurucuda Saklanması	35
3.2.2.10 Hücre Kültürü Aşamasındaki Deneylerin Tasarımı	35
3.2.3 RNA Eldesi Aşamasındaki Çalışmalar	36
3.2.3.1 RNA İzolasyonu	37
3.2.3.2 μ Drop™ Plate Cihazı ile RNA Kantitatif Analizi	37
3.2.3.3 Formaldehit RNA Jel Elektrofrezisi	37
3.2.3.4 Reverse Transkriptaz Enzimi ile Komplamenter DNA (cDNA) Eldesi	39
3.2.3.5 cDNA Kontrolü için PZR ve sqRT-PZR	39
3.2.3.6 Kantitatif Real-Time PZR (qRT-PZR)	41
3.2.3.7 Kantitatif RT-PZR'ın Sonuç Çözümlemesi	43
3.2.4 DNA ile ilgili Metodları	43
3.2.4.1 DNA Agaroz Jel Elektrofrezisi	43
3.2.4.1 Restriksiyon Endonükleaz Kesim	44
3.2.4.2 Büyük Ölçekli Plazmid DNA İzolasyonu	44
3.2.5 Western Blot Protein Analizi Deney Basamakları	47
3.2.5.1 RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) Lizis ve Ekstraksiyon	47
3.2.5.2 Qubit® 2.0 Fluorometer ve Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Çözümlemesi	48
3.2.5.3 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	50
3.2.5.4 PVDF Western Blot Membranına Proteinlerin Transferi	53
3.2.5.5 PVDF Membran Bloklama ve Antikorlama İşlemi	53
3.2.5.6 UVP Western Blot PVDF Membran Görüntüleme Sistemi	54
3.2.5.7 ImageJ ile Western Blot Kantitatif Analizi	54
3.2.6 Transkripsiyonel Etkinliğin Belirlenmesi İle İlgili Çalışmalar	54
3.2.6.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu (Çöktürme) ile Geçici Transfeksiyon	54
3.2.6.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	56
3.2.6.3 SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü	56
4. BULGULAR	57
4.1 TGF- β Sitokinininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisi	57
4.1.1 TGF- β Sitokinininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	57
4.1.2 TGF- β Sitokinininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi	60
4.2 İnsan p54nrb/NONO Genine Ait Promotorun İşlevsel Analizi	62
4.2.1 Transfeksiyonda Kullanılacak p54nrb/NONO Promotor Parçalarının Kontrol Kesimi	62
4.2.2 Hep3B Hücrelerinde Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu İle Geçici Transfeksiyonun Salınan Sistem Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi	63
4.2.3 TGF- β Sitokinininin p54nrb/NONO Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi	66

4.3 TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisi.....	67
4.3.1 TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	67
4.3.2. TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi	70
4.3.3. TGF- β Sitokini Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Promotor Parçasına Etkisinin Belirlenmesi.....	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
6. KAYNAKLAR.....	78
EKLER.....	96
ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Hücre çekirdeğinde paraspeckle oluşumu için hipotetik model.....	13
Şekil 1.2: p54nrb/NONO'nun X kromozomu üzerindeki lokasyonu.....	19
Şekil 2.1: Tez kapsamını özetleyen diyagram.....	26
Şekil 3.1: Hep3B, insan hepatoselüler karsinom hücre hattı (M.B: 40 x 10).	33
Şekil 3.2: Thoma Lamı (Hemositometre Lamı).....	35
Şekil 3.3: pSEAP2-Kontrol vektörü haritası.....	46
Şekil 3.4: pMetLuc Kontrol vektörü haritası.	46
Şekil 3.5: pMetLuc Reporter vektörü haritası.....	47
Şekil 3.6: Bradford standart eğrisi.....	49
Şekil 4.1: TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattı pelletlerinden elde edilen RNA örneklerinin RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	57
Şekil 4.2: cDNA kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	58
Şekil 4.3: (a) sqRT-PZR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. (b) Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO ekspresyon seviyesi.....	59
Şekil 4.4: qRT-PZR ile elde edilen TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki ekspresyon seviyesi.....	60
Şekil 4.5: TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattının PVDF membran görüntüsü..	61
Şekil 4.6: TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki protein ekspresyon seviyesinin ImageJ ile Western Blot kantitatif analizi.....	61
Şekil 4.7: pMETluc repoter vektörüne klonlanan p54nrb/NONO promotor bölgesi kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.8: pMetLuc Kontrol vektörü ve pMetLuc reporter (haberci) vektörü transfeksiyon etkinliği.	64
Şekil 4.9: Hep3B hücre hattında p54nrb/NONO genine ait promotor parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri.....	65
Şekil 4.10: p54nrb/NONO genine ait promotor parçalarına TGF- β sitokini etkisi.....	66
Şekil 4.11: Hücre içi yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücrelerinin RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	67
Şekil 4.12: cDNA Kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	68
Şekil 4.13: Hücre içi sinyal yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO mRNA ekspresyon seviyesi.	69
Şekil 4.14: TGF- β sitokinine ait hücre içi yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücre hattının PVDF membran görüntüsü.....	70
Şekil 4.15: Hep3B hücre soyunda hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin imageJ ile western blot kantitatif analizi.	71
Şekil 4.16: TGF- β sitokini yolak inhibitörlerinin 1259bç'lik P1(-730/+529) p54nrb/NONO promotor parçasına etkisi.	72

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Kimyasal ve laboratuvar malzemeleri listesi.	27
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları.	30
Tablo 3.3: 10 X FA jel tampon çözelti.	38
Tablo 3.4: 1 X FA tank tampon çözelti.	38
Tablo 3.5: Komplamenter DNA (cDNA) reaksiyon bileşenleri ve basamakları.	39
Tablo 3.6: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).	40
Tablo 3.7: H β -2 PZR döngü şartları.	41
Tablo 3.8: p54 _{nrb} /NONO PZR döngü şartları.	41
Tablo 3.9: Real-Time PZR bileşenleri.	42
Tablo 3.10: RT-PZR döngü değerleri.	42
Tablo 3.11: Tez kapsamında kullanılan ekspresyon primerleri.	42
Tablo 3.12: Agaroz jel elektroforezi deney kimyasalları.	44
Tablo 3.13: RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu malzemeleri.	48
Tablo 3.14: Bradford yöntemi kimyasal malzemeler.	50
Tablo 3.15: SDS-PAGE jel malzemeleri.	51
Tablo 3.16: SDS-PAGE işlemi aşamasında kullanılan kimyasal malzemeler.	51
Tablo 3.17: Kalsiyum Fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon için kullanılan solüsyonlar	55

SEMBOL LİSTESİ

bç	:	Baz çifti
cDNA	:	Komplamenter DNA
Ct	:	Cycle Threshold
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
DNA	:	Deoksi ribonükleik asit
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
FCS	:	Fetal calf serum
Hep3B	:	İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
NONO	:	Non-POU Domain Containing Octamer Binding
O.D	:	Optik Dansite
PBS	:	Phosphate-buffered saline
RNA	:	Ribonükleik asit
RPM	:	Revolution Per Minutes
SEAP	:	Secreted Alkaline Phosphatase
UV	:	Ultra-viyole
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yüksek laboratuvar imkanlarını sonuna kadar bizlere sağlayan, pes etmemiz için her zaman bizi cesaretlendiren, akademik duruşuyla örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Sayın Feray KÖÇKAR'a,

Bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan sevgili hocalarım Doç. Dr. Hatice Yıldırım, Dr. Öğr. Üy. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU ve Dr. Öğr. Üy. Meltem ALPER'e,

Desteklerini her zaman hissettiğim, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum canım hocalarım Öğr. Gör. Dr. Esra TOKAY'a, Öğr. Gör. Dr. Derya OKUYAN'a ve Arş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU'na,

Laboratuvar ve laboratuvar dışında birlikte olmaktan her zaman keyif aldığım, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Kübra PASPAL, Samet KARALİLİ, Candan ALTUNTAŞ, Emre YANIK, Ehed Muhammed AYMAZ, Mesut ACAR ve Serhad ONAT'a

Bu hayattaki tek idolüm bana olan inancıyla bugünlere kadar gelmemi sağlayan en kıymetli varlığım annem Ömür KESKİN'e, desteğini benden esirgemeyen canım babam Mustafa KESKİN'e

Hayatım boyunca varlığına şükrettiğim biricik ablam Ayça BAKMAZ'a, beni her zaman cesaretlendiren canım ağabeyim Buğra BAKMAZ'a

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

“Türk milletinin yürümekte olduğu ilerleme ve uygarlık yolunda, elinde ve kafasında tuttuğu meşale pozitif bilimdir.” Daima izinde yüreceğim Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2020

Saliha Derya KESKİN

1. GİRİŞ

Karaciğer kanseri, dünya çapında en sık teşhis edilen kanserlerden biridir. Yapılan çalışmalara rağmen, bu tümörler sıklıkla ileri evrede saptanmakta ve karaciğer kanserini dünya çapında en ölümcül üçüncü kanser haline getirmektedir [1]. En önemli primer karaciğer kanseri türleri hepatosellüler karsinom (HCC) ve intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) 'dir. HCC sıklıkla kronik alkol kullanımı, viral hepatit veya alkolsüz steatohepatitin neden olduğu kronik karaciğer hastalığıdır [2, 3]. HCC'nin başlaması ve ilerlemesinin çok sayıda gen içeren genetik mutasyonların birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [4].

HCC tedavisi ile ilgili önemli bir konu kemo-dirençtir: ilerlemiş hepatosellüler karsinomlu hastalar için etkili bir konvansiyonel sistemik kemoterapi yoktur, bu zamana kadar kötü prognoz ile sonuçlanmıştır [5]. Nükleer Zenginleştirilmiş Bol Transkript 1 (NEAT1), nükleer paraspeckles'te lokalize olduğu, çeşitli kanser türlerinde kemo-direnci arttırdığı gösterilmiştir [6]. Paraspeckle'ların kritik bir bileşenini temsil eden NEAT1 ile paraspeckle proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun HCC'de düzenlenmiş olup olmadığı merak edilmiş ve çeşitli analizler sonucunda PSPC1, NONO ve RBM14 ekspresyonu sonucu transkriptlerin ifadesinin HCC'de önemli ölçüde arttığını ve üç paraspeckle proteininin hepsinin transkript varyantları için zayıf prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [6].

HCC'ye potansiyel olarak dahil olan genler, 17p13.1 kromozomu üzerindeki p53 genini içerir [7-9]. HCC'nin gelişimi, hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşma, motilite, soy özgüllüğü ve normal kök hücre homeostazında kritik bir rol oynayan TGF- β sinyal yolundaki değişiklikler ile de ilişkilidir [10]. TGF- β sinyali, hedef gen ekspresyonunu aktive etmek veya baskılamak için transkripsiyon faktörleri ve koaktivatörler veya korepresörler ile işbirliği yapar. HücreSEL içeriğe bağlı olarak, TGF- β sinyalinin HCC'de çift rolü vardır. p53 sağlam olduğunda tümörjenezin erken evrelerinde, TGF- β sinyalleri, esas olarak hücre döngüsü durması ve apoptozda yer alan genlerin ekspresyonunu uyaran tümör baskılayıcı rolünü üstlenir. Tümör ilerlemesinin sonraki aşamalarında veya p53 mutasyona uğradığında, TGF- β sinyali, hücre döngüsü durması ve apoptotik genlerin ekspresyonunda bir azalma ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili genlerin ekspresyonunda bir artış ile tümör teşvik edici hale gelir [11]. HCC'nin temel etken genlerinin ve kullandığı sinyal yollarının belirlenmesi, erken teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir.

1.1 Sitokinler

Sitokinler, hücreler tarafından serbest bırakılan küçük salgılanmış proteinlerdir, hücreler arasındaki etkileşimler ve iletişim üzerinde belirli bir etkiye sahiptir. Sitokin en sık kullanılan adıdır; diğer adları arasında lenfokin (lenfositler tarafından üretilen sitokinler), monokin (monositler tarafından üretilen sitokinler), kemokin (kemotaktik etkinliğe sahip sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından üretilen ve diğer lökositler üzerinde tesirli sitokinler) bulunur. Çalışmalar sonucunda yedi adet sitokin reseptörü ailesi keşfedilmiştir: G-protein bağlı reseptörler, transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) reseptörleri, Tip I sitokin reseptörleri, Tip II sitokin reseptörleri, immüoglobulin süper ailesi reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri ve yakın zamanda tanımlanan IL-17 reseptörleri [12].

Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin etki), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin etki) etki edebilir [13]. Sitokin ağını tanımlamak için en uygun terim "pleiotropik" tir: sitokinler hücre çoğalması, kemotaksis, farklılaşma, iltihaplanma, patojenlerin ortadan kaldırılması ve hücre ölümü gibi çeşitli bağlamlarda biyolojik sonuçları tetikleyen, sıklıkla örtüşen hücre tipleri tarafından üretilir ve çalışır [14]. Sitokinler, immün sistemin gelişiminde, konak savunmasında ve tümör immünolojisinde karmaşık rol oynamaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde sitokin kaynaklı immünoterapinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

1.1.1 Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), embriyonik gelişim, hücresel homeostazın korunması, anjiyogenez ve bağışıklık düzenleme gibi bağlamsal bir tarzda geniş bir biyolojik süreç aralığına aracılık eden veya düzenleyen, yaygın olarak ifade edilen pleiotropik [15] bir sitokindir [16]. Hücresel homeostazın korunmasında yaygın ve merkezi rolüyle tutarlı olarak, TGF- β sinyalinin inhibisyonu, normal homeostatik süreçlerin ve daha sonra karsinogenezin bozulmasıyla sonuçlanır, bu yüzden TGF- β sitokini bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanır. Bununla birlikte, karsinogenez başlatıldığında, TGF- β sinyal yolu, kanser oluşumunu ilerletmek için işlev görür. Kanser başlangıcı ve ilerlemesi sırasında TGF- β sinyal yolunun bu iki-işlevli fonksiyonunu, hem aynı yolun bu farklı etkileri nasıl etkilediğini hem de terapötik amaçlar için bu yolun nasıl hedeflendiğini ayırt etmek karmaşıktır [16].

1.1.2 TGF- β Süper Ailesi

1.1.2.1 TGF- β Süper Ailesi Yapısal Özellikleri

TGF- β ailesinin çeşitli üyeleri, başlangıçta, bir amino-terminal sinyal dizisine ve değişen boyutta bir pro-domaine sahip daha büyük öncü moleküller olarak sentezlenir. Bu öncü protein genellikle 110-140 amino asitlik olgun karboksi terminal segmenti salınması için bir dibazik veya RXXR bölgesinden kırılır. Aktif sinyal molekülü, bu karboksi terminalinin hetero veya homodimerlerinden oluşur [17]. Bu kompleksin proteoliz veya düşük pH ile aktivasyonu, TGF- β alt sınıfı moleküllerin aktivitesi için önemli bir fizyolojik düzenleyici olabilir.

Olgun bölge çok fazla korunmuştur. Olgun bölgedeki yedi sistein rezidüsü, aile üyelerinin neredeyse değişmezdir. TGF- β 2'nin yakın zamandaki kristalografi çalışmaları, bu sisteinlerin altısının sistin düğümü adı verilen sert bir yapı oluşturmak için grup oluşturduğunu göstermiştir [18, 19]. Düğüm, iki disülfid bağıyla bir arada tutulan sekiz üyeli bir halkadan ve halkanın ortasından geçen üçüncü bir disülfid bağından oluşur. Her monomerdeki bir sistein rezidüsü, iki monomeri bir dimere bağlayan ek bir disülfid bağı oluşturur. Bu sisteinler GDF-3 ve GDF-9 olarak adlandırılan iki TGF- β ailesi üyesinde eksiktir. Bu disülfür bağının yokluğunda dimer oluşumunu teşvik edebilen iki monomer alt birimi arasında birçok hidrofobik bağlantı vardır. Dimerin genel yapısı şaşırtıcı bir şekilde açıktır ve merkezinde birkaç su molekülü içerir [19]. Amino-terminal bölgesi hem uzunluk hem de sekans bakımından büyük ölçüde değişir. Bu bölge, TGF- β 2'de, monomerin geri kalanına ek bir disülfid köprüsü ile bağlanan bir helezon oluşturur. Bu köprü, ailenin diğer üyelerinin çoğunda eksiktir ve karşılık gelen amino-terminal uzantısının yapısı bilinmemektedir [20].

TGF- β 1, endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede TGF- β 2'den 100 kat daha güçlüdür [21]. Kristalografi çalışmaları, TGF- β süper ailesinin üyeleri ile sinir büyüme faktörü (NGF) üyeleri ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) üyeleri arasında beklenmeyen bir benzerlik olduğu ortaya konulmuştur [22]. NGF ve PDGF monomerleri, TGF- β ile $\leq 10\%$ amino asit dizisi benzerliği gösterir. Bununla birlikte, bu faktörlerin tümü sistein düğümü motifini içerir ve monomerlerin çekirdeklerinin üç boyutlu yapıları neredeyse aynıdır. Bu benzerlikler, her üç büyüme faktörü ailesinin de ortak bir atadan geldiğini göstermektedir. Bu ata, denatürasyon ve pH'ın aşırı uçlarına karşı özellikle dirençli olabilir, bu da çeşitli hücre dışı ortamlarda hayatta kalabilecek diğer sinyal

moleküllerinin daha sonra çeşitlendirilmesi için uygun bir temel sağlar. İlginç bir şekilde, monomer alt birimleri arasındaki etkileşimler, alt birimlerin farklı yüzleri, farklı yönelimleri ve farklı simetri eksenlerini içeren TGF- β , NGF ve PDGF'nin aktif sinyalleşme dimerleri tamamen farklıdır [22]. Bu farklılıklar, TGF- β , NGF ve PDGF ailelerinin reseptör etkileşimlerinin (ve muhtemelen fonksiyonlarının) ayrı ayrı geliştiğini göstermektedir. Bu nedenle, sistin düğümü süper-ailesindeki ortak üyeliklerine rağmen, grupları ayrı olarak düşünmek hala faydalıdır [22].

1.1.2.2 TGF- β Süper Ailesi Üyeleri

1.1.2.2.1 TGF- β Alt Ailesi

TGF- β 1'e, TGF- β süper ailesinin diğer üyelerinden çok daha benzer olan en az dört gen bulunmuştur. Bu moleküller başlangıçta TGF- β 2, - β 3, - β 4 ve - β 5 olarak adlandırılmıştır, ancak bu genler farklı türdeki organizmalarda bulunmaktadır [23]. TGF- β moleküllerinin çoğu, farklı organizmalarda niteliksel olarak benzer aktivitelere sahiptir [17].

1.1.2.2.2 Activin Alt Ailesi

Aktivinler, A veya B (aynı zamanda inhibin β A (Inh β A) ve inhibe β B (Inh β B)) olarak da adlandırılan iki alt birimin homo- veya heterodimerleridir. Bu alt birimler, TGF- β süper ailesinin diğer üyelerine nazaran birbirleriyle çok daha yakından ilişkilidir. A ve B alt birimleri, inhibin a (Inha) adı verilen başka bir alt birim ile dimerler oluşturabilir. Bu alt birim çok daha uzak bir şekilde ilişkilidir ve herhangi bir alt gruba ait değildir. İnhibinler ve aktivinler birçok sistem üzerinde ters biyolojik etkiye sahiptir. Farklı ortaklarla dimerleşmenin TGF- β aile üyelerinin faaliyetlerini büyük ölçüde nasıl değiştirebileceğine dair örnekler [24].

1.1.2.2.3 Decapentaplegic (dpp) Alt Ailesi

Drosophila decapentaplegic (dpp) geni, *Drosophila*'nın gelişiminin birkaç farklı aşamasında önemli bir rol oynar. DPP geninin iki memeli homologu, cilt altına veya kaslara implante edildiğinde ektopik kemik ve kıkırdak oluşumunu indükleyebilecek faktörlerin saflaştırılması sırasında bulundu [25]. Memeli faktörleri (kemik morfogenetik proteinleri 2 ve 4 (BMP2 ve BMP4)), molekülün olgun sinyalleşme bölgesinde birbirlerine % -90, DPP'ye % 75 oranında özdeşdir. Sinek ve memeli genleri arasındaki benzerlik fonksiyonel seviyeye kadar uzanır. İnsan BMP4 dizileri, *Drosophila*'daki DPP mutasyonlarının neden

olduğu dorsoventral eksen kusurlarını kurtarabilir [26]. Tersine, DPP proteininin saflaştırılmış implantları, memelilerde kemik ve kıkırdak meydana getirebilir [26].

1.1.2.2.4 60A Alt Ailesi

Bu grup, tek bir *Drosophila* geni ve kemik formasyonu oluşumuna neden olan aktiviteye sahip bir dizi memeli homologu içerir. *Drosophila* geni, sineklerde TGF- β homologları için yapılan spesifik bir araştırmada izole edilmiştir [27]. Kromozomal harita konumundan sonra 60A olarak adlandırılmıştır, ancak normal işlevi henüz bilinmemektedir. Bu alt grubun dört memeli üyesi ya kemikle indüklenen materyalin yüksek oranda saflaştırılmış preparatlarında keşfedildi ya da ailenin diğer üyelerine homolojisi ile izole edildi: BMP5 [28], Vgr-1 veya BMP6 [29] [28], BMP7 veya osteojenik protein 1 (OP-1) [28] [30]; ve osteojenik protein 2 (OP-2) veya BMP8 [31].

1.1.2.2.5 DVR Grubu

DPP ve 60A alt grupları, TGF- β ya da aktivinlerden daha yakından ilişkilidir ve DVR olarak adlandırılan daha büyük bir molekül koleksiyonunun parçası olarak sık sık birlikte gruplandırılmıştır (DPP ve Vgl ilişkili) [32].

Growth differentiation factor 1 (Büyüme farklılaşma faktörü 1) GDF-1, TGF- β süper ailesinin ek memeli üyeleri için yapılan bir çalışma sonucu sırasında izole edilmiştir. Öncelikle sinir sisteminde ifade edilir ve sıradışı bir bisistronik mesajla kodlanır [33]. GDF-1 transkriptindeki büyük ve ayrıık açık okuma erevesi, çoklu transmembran bölgelere sahip olduğu tahmin edilen bir proteini kodlar. Bu açık okuma erevesi, fareler ve insanlar arasında büyük lde korunmuştur ve hem maya hem de *Caenorhabditis elegans*'ta homologları rapor edilmiştir [34, 35].

GDF-3/Vgr-2 DVR grubunun bu üyesi diğer aile üyelerine homolojisi ile de izole edildi. Vgr ile ilişkili gen 2 (Vgr2) veya büyüme farklılaşma faktörü 3 (GDF-3) olarak bağımsız bir şekilde izole eden iki grup tarafından adlandırılmıştır [36, 37]. DVR ailesinde önceden bilinen dizi gruplarından herhangi birine açıkça atanamamasına rağmen, en çok Vgr-1, BMP2, BMP6 ve GDF-1 ile benzerlik göstermektedir. GDF-3/Vgr-2 protein ürünü, TGF- β st ailesindeki normalde olgun bölgede bulunan yedi sistein rezidsinden birini bulundurmayan moleküllerden biridir. Eksik sistein rezidsi normalde iki monomer alt birimini bir dimere bağlayan zincirler arası disülfit bağını oluşturmaktadır. Bu bağlantının

normal dimer oluşumu için gerekli olup olmadığı da açık değildir. GDF-3/Vgr-2 geni, embriyonik gelişim sırasında iskelet dokusunun ossifiye edilmesinde [36] ve yetişkinlerde timus, dalak, kemik iliği ve adipoz dokusunda ifade edilir [37].

Dorsalin A gelişmekte olan chick sinir sisteminde ifade edilen TGF- β ailesi üyelerini araştırmak için yapılan çalışmada gelişmekte olan nöral tüpünün dorsal tarafında ifade edilen bir molekül olarak tanımlandı [20]. Bu molekül, dorsovental eksen boyunca nöral oluşumda önemli bir rol oynadığını gösteren iki in vitro aktiviteye sahiptir. Nöral kret hücrelerinin büyümesini artırır (normalde nöral tüpün dorsal tarafından göç eder) ve motor nöron hücrelerinin oluşumunu engeller (normalde omuriliğin sadece ventral tarafında bulunurlar). Sinir sistemi dışındaki olası rolleri henüz açıklanmamıştır, ancak BMP molekülleri gibi, dorsalin, kemik iliği hücre hatları tarafından alkalın fosfataz üretimini uyaracaktır [38].

Nodal gen, farelerde erken bir embriyonik öldürücü fenotipe neden olan bir retroviral insersiyon bölgesinde tanımlanmıştır [39]. Genin öngörülen ürünü, DVR ve activin alt grupları ile yaklaşık olarak aynıdır ve DVR sınıfının sınırlarının tanımlanmasındaki zorluklara iyi bir örnek teşkil eder [39].

1.1.2.2.6 Iraksak Genler

Miillerian inhibe edici madde (MIS) ve Inha alt birimi, TGF- β süper ailesindeki diğer üyeler ile uzaktan ilişkilidir [17]. Yakın zamanda iki ek iraksak aile üyesi bulundu. GDF'9 geni, ilave aile üyelerini saptamak için yapılan PZR ile izole edildi [37]. GDF3/Vgr2 geni gibi, onun öngörülen protein ürünü de monomerleri bir dimer içine kovalent olarak bağlaması öngörülen sistein rezidüsünden yoksundur. Genin transkriptleri sadece yetişkin hayvanların yumurtalıklarında ifade edilmektedir [38].

Ghal türevli nörotropik büyüme faktörü (GDNF), dopaminerjik nöronların hayatta kalma ve orta beyinden farklılaşmasını destekleme yeteneğine dayanarak izole edilmiştir [40]. Faktör, TGF- β süper ailesinin diğer üyelerinde bulunan yedi düzenli aralıklı sistein modelini paylaşır, ancak ailenin diğer üyeleriyle < % 25 amino asit benzerliği vardır. Orta beyin dopaminerjik nöronlar, Parkinson hastalığında kaybedilen başlıca nöron sınıfıdır. Dopaminerjik nöronların klinik önemi muhtemelen bu faktörün in vitro ve in vivo etkileri üzerine gelecekteki araştırmaların çoğunu teşvik edecektir [38].

1.1.3 TGF- β Ligandları ve Reseptörleri

TGF- β sitokin ailesi, altı konvansiyonel sistein rezidüsü ile karakterize edilir, insanda 42, sineklerde 9, kurtçuklarda 6 açık okuma çerçevesi kodlanır [41]. İki alt aile içerir, TGF- β /Activin/Nodal alt ailesi ve BMP (kemik morfogenetik proteini)/GDF (büyüme ve farklılaşma faktörü) / MIS (Müllerian inhibe edici madde) alt ailesi, sekans benzerliği ve aktive ettikleri spesifik sinyal yolları ile tanımlanmaktadır [42].

Her ne kadar çeşitli TGF- β ligandları oldukça farklı hücresel tepkiler ortaya çıkarsalar da, hepsi ortak bir dizi ve yapısal özelliklere sahiptir. Bir TGF- β sitokin aktif formu, çoğu durumda bir alt-birim disülfid köprüsü ile daha da güçlendirilen hidrofobik etkileşimlerle stabilize edilmiş bir dimerdir. Her bir monomer, "sistein düğümü" olarak bilinen sıkı bir yapı oluşturan üç korunmuş disülfür bağı ile kilitlemiş birkaç uzatılmış tel içerir [43]. Ligandların dimerik düzenlenmesi, iki tip I ve iki tip II reseptörlü bir kompleksin oluşumunu önerir. Reseptörlere ligand erişimi, kolektif olarak ligand tuzakları olarak bilinen geniş bir protein ailesi tarafından düzenlenir. Noggin-BMP7 kompleksinin kristal yapısı ligand tuzacı Noggin'in, tip I ve tip II BMP reseptörleri ile etkileşime girmesi için gerekli yüzeyleri bloke ederek BMP7'yi inhibe ettiğini ortaya koymaktadır [44]. İnsan genomundaki reseptör serin/treonin kinaz ailesi, TGF- β sinyallemesine ayrılmış 12 üyeden (7 tip I ve 5 tip II reseptör) oluşur [30]. Reseptör serin/treonin kinazların her iki tipi, sırayla bir N-terminal hücre dışı ligand bağlanma domaini, bir transmembran bölge ve bir C-terminal serin/treonin kinaz domaini halinde düzenlenmiş yaklaşık 500 amino asitten oluşur. Tip I BMP reseptörünün hücre dışı ligand bağlanma alanının genel yapıları [45] ve ayrıca Activin için tip II reseptörleri [46] ve TGF- β [47], benzer bir üç parmak toksin katlama sergilerler, her parmak bir çift anti-paralel β şeridinden oluşur. Tip I reseptörler, N-terminal kinaz domaininde GS alanı adı verilen karakteristik bir SGS₂GS₁GS₂ sekansı içerir. Tip I reseptörünün aktivasyonu, GS alanının tip II reseptörü tarafından fosforilasyonunu içerir; bu nedenle aktif bir reseptör sinyal kompleksi, ligand'a bağlı her iki reseptör tipini de içerir [42].

1.1.3.1 Reseptörlere Ligand Bağlanma Mekanizması

Biri BMP alt ailesinin üyeleri ve diğeri TGF- β ve Activinler tarafından temsil edilen, ligand-reseptör etkileşiminin iki farklı modu vardır. BMP2 ve -4 gibi BMP ligandları, tip I BMP reseptörlerinin hücre dışı ligand bağlama alanları için yüksek bir afinite ve tip II reseptörleri için düşük bir afinite sergiler. Tip I reseptör-ligand kompleksi, tip II reseptörü için daha yüksek bir bağlanma afinitesine sahiptir [45]. Bu etkileşimler ağırlıklı olarak hidrofobiktir,

BMPR-IA Phe85'in kilit bir rolü vardır. Phe85, ALK1 hariç tüm tip I reseptörlerinde benzer bir rezidü ile korunur, dimerik BMP2'de hidrofobik cebi oluşturan tüm rezidüleri, diğer tüm TGF- β ligandlarında da büyük ölçüde korunmuştur. Bu, hidrofobik cep bağlanmasının, TGF- β ligandları ve tip I reseptörleri arasındaki etkileşimler için gerekli olduğunu göstermektedir [45].

BMP'lerin aksine, TGF- β ve Activin tip II reseptörleri için yüksek afinite gösterir ve izole tip I reseptörleri ile etkileşime girmez [48]. Bu durumda, ligand ilk önce tip II reseptörünün ektodomainine sıkı bir şekilde bağlanır; bu bağlanma, tip I reseptörünün alt küme eklemesini sağlar, ligand dimer ve dört reseptör molekülü içeren büyük bir ligand reseptör kompleksi oluşturur [49]. Her ne kadar tip I reseptörleri ve bunlarla ilişkili ligandlar arasındaki etkileşimler tüm TGF- β ailesi üyeleri için korunmuş gibi görünse de, tip II reseptörlerinin farklı alt grupları ve ligandları arasındaki bağ için önemli farklılıklar vardır [49, 50]. Activin tip II reseptörü, geniş bir özgüllüğe sahiptir ve hem Activin hem de BMP ligandlarına bağlanabilir. TRII ile karşılaştırıldığında, Activin tip II reseptörünün (ActRII) ektodomaini, BMP7 [51] veya Activin A ile birlikte kristal yapısında belgelendiği gibi oldukça farklı bir ligand bağlama epitopu içerir [52]. Dizi analizi, MIS ve AMHR-II'nin, tip II reseptörlerine ligand bağlanmasındaki karmaşıklığı daha da vurgulayan üçüncü bir eşsiz bağlama ara yüzünü oluşturduğunu göstermektedir. Bu gözlemler, reseptör kompleksi düzeneğinin farklı modlarını tanımlamakta ve tip II reseptörlerinin reseptör sinyal kompleksi düzeneği için spesifikliğin belirlenmesinde daha önemli bir rol oynadığı fikrini desteklemektedir [42].

Allosterik modelde, ligandın tip II reseptörüne bağlanması, ligandın tip I reseptörü için bağlanma epitopunun açığa çıkmasına neden olan bir konformasyonel değişikliği indüklemek için gereklidir. Bu modele göre, TRII'ye bağlı TGF- β 3, büyük bir konformasyonel değişim geçirmektedir [49].

Kooperatif (işbirlikçi) modelde, tip I reseptörünün ektodomaini, tip II reseptör-ligand kompleksinin oluşumuna dayanan bir yüzey ile etkileşime girmektedir [49]. Bununla birlikte, ActRII-BMP7'nin yapısı, BMPRIA-BMP2 kompleksi ile birlikte [45], BMP7-ActRIIm BMPRIA kompleksi için bir modelin moleküler yapısına izin vermektedir [51]. Bu modelde, tip I ve tip II reseptörlerinin ektodomainleri doğrudan temas etmez; ancak bu iki reseptör, BMP7 ligandına kooperatif olarak bağlanır. Bu yüzden, bu işbirlikçilik

muhtemelen allosterik bir etkiden kaynaklanmaktadır [51].

1.1.4 TGF- β Sinyalisasyonu

1.1.4.1 R-SMAD-Bağımlı Sinyal Yolağı

R-SMAD'ler, karboksi terminal fosforilasyonu ile reseptör aracılı aktivasyon üzerine çekirdeğe göç eden ve transkripsiyon faktörleri olarak işlev gören, yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde proteinlerdir. İki R-SMAD grubu, yapısal ve fonksiyonel homolojiye dayanarak ayırt edilebilir: bir grup SMAD1, SMAD5 ve SMAD9'dan (SMAD8 olarak da bilinir) ve bir grup SMAD2 ve SMAD3'den oluşur [53]. Reseptör tip I aktivasyonu üzerinden, bu R-SMAD'ler, C-terminal SXS motiflerindeki iki serin aminoasitlerinden doğrudan fosforile edilir. Spesifik ALK'lar spesifik SMAD'leri fosforile eder: ALK1, 2, 3 ve 6, SMAD1, 5 ve 9'u fosforile ederken, ALK4, 5 ve 7, SMAD2 ve SMAD3'ü fosforile eder. Bu fosforilasyon, R-SMAD'lerin SMAD4 ile kompleksleşmesini kolaylaştırır. Bu kompleks nükleer giriş ve birikimi teşvik eder. Çekirdeğin içinde, bu SMAD kompleksi, düşük afiniteli olmasına rağmen doğrudan DNA'ya bağlanır ve DNA ile yüksek afiniteli etkileşimler için transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlar. SMAD komplekslerinin DNA'ya bağlandığı yer, DNA dizisinde bulunan karakteristik SMAD bağlayıcı motiflere bağlıdır, SMAD3/4 ve SMAD1/5/9 komplekslerine göre farklılık gösterir (örneğin SMAD2/3/4 kompleksi için GTCTAGAC [54] ve SMAD1/5/9/4 kompleksi için GCCGCGC'dir) [55]. Ayrıca, SMADlar ve DNA arasındaki bağlantı ana düzenleyici transkripsiyon faktörlerin varlığı ile düzenlenir [56]. Ana düzenleyiciler dokuya göre değişir ve kondrosit fenotipinin önemli bir ana düzenleyicisi, örneğin kollajen tip II promotöründe SMAD3/4 ile yakından etkileşime giren SRY-box9'dur (SOX9) [57]. R-SMAD sinyalleşmesinin iki önemli hedef geni, inhibitör-SMAD'lardır (I-SMAD): SMAD6 ve SMAD7 [58, 59]. Bu I-SMAD'ler, R-SMAD DNA bağlanmasını inhibe eder, SMAD4 ve R-SMAD'ler arasında kompleks oluşumunu inhibe eder, C-terminal R-SMAD fosforilasyonunu inhibe eder, reseptör fosforilasyonunu ve bozulmasını indükler. Böylece R-SMAD sinyalinin inhibitörleri olarak görev yapmış olurlar. Bu şekilde, SMAD6 baskın olarak SMAD1/5/9'u baskılar ve SMAD7 baskın olarak SMAD2/3 sinyalleşmesini baskılar. Her iki I-SMAD, hücrelere R-SMAD sinyalini etkisiz hale getirmek için önemli bir negatif geri-besleme (feedback) mekanizması sağlar [60].

1.1.4.2 SMAD-Bağımsız Sinyal Yolağı

TGF- β ailesi üyeleri R-SMAD'dan bağımsız yolları da aktive edebilir. TGF- β ile aktive olan kinaz 1 (TAK1) ve hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz 1 ve 2 (ERK1/2, MAPK3/1 olarak da bilinir) mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolakları üzerinden sinyal verir. Bu yollar TGF- β ailesi sinyalleri için özel değildir, diğer birçok büyüme faktörü ve sitokinlerin de önemli sinyal aracıdır. MAPK'lerin TGF ailesi üyeleri tarafından aktivasyonunda, reseptör aktivitesini yolak aktivasyonuna köprülemek için adaptör proteinlere ihtiyaç vardır. Örneğin ERK aktivasyonu için SHC adaptör protein 1 (SHC1)'e [61] ve TAK1 aktivasyonu için tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6)'ya ihtiyaç vardır [62, 63]. Reseptör aracılı SHC1 fosforilasyonu, GRB2/SOS, RAS, RAF ve MAP2K1 üzerinden bir MAPK sinyal kaskadını tetikler, bu da ERK1/2'nin aktivasyonuna neden olur [61]. TRAF6 farklı şekilde aktive edilir: reseptör tip I / tip II kompleks oluşumu üzerine, TRAF6 oligomerizasyonu ve otomatik ubikütilleşme olur. Poli-ubikütilleşme yoluyla TAK1 ve TGF- β ile aktive olan kinaz 1/MAP3K7 bağlayıcı protein 1 (TAB1) arasında kompleks oluşumunun tetiklenmesi, TAK1 otoposforilasyonunu ve aktifleşmesini sağlar [63]. Alternatif olarak, TAK1, BMP (ve TGF- β) reseptörleri ile etkileşerek stabilize edilen E3 ubikutin-protein ligaz XIAP (TAB1 ile kompleks halinde) ile aktive edilebilir [64, 65]. Nihayetinde, MAPK sinyalinin TGF- β ailesi üyeleri tarafından aktivasyonu, Jun proto-onkojen (c-JUN), MYC proto-onkojen (c-MYC) gibi transkripsiyon faktörlerini module ederek doğrudan gen ekspresyonunu düzenleyen JNK ve p38 kinazlarının aktivasyonu ile sonuçlanır [66].

1.1.5 TGF- β 'nın Tümördeki Rolü

TGF- β çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edilir ve sinyal yolu tümörlerde önemli bir rol oynar [67]. TGF- β tümör oluşumunda çeşitli fonksiyonları kontrol eder ve hem tümör baskılayıcı hem de aktivatör olarak görev yapar. Tümör büyümesinin erken evresinde, baskılayıcı olarak TGF- β , hücre proliferasyonunu inhibe etmek için hücre döngüsünün durdurulmasına neden olan ve hücre apoptozunu etkileyen siklin bağımlı kinaz (CDK) baskı faktörlerinin ifadesini indükleyebilir. Tersine, ilerlemiş tümörde, aktifleştirici olarak TGF-siklin ve antitümör immün tepkilerini bloke ederek tümör büyümesini, istilasını ve metastazı destekler [68].

1.1.5.1 Tümör Baskılayıcı Olarak TGF- β

TGF- β birçok erken evredeki tümörde tümör baskılayıcı rol oynar ve hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenler [69]. G1 faz hücre döngüsü durmasını teşvik ederek hücre büyümesini

inhibe etmek için sitostatik genleri aktive edebilir. Örneğin, TGF- β , p15ink4b veya p21 ekspresyonunu indükleyerek siklin kompleksi proteinlerini inhibe eder [70]. Başka bir çalışma NFAT'ın bir transkripsiyon faktörü olduğunu ve ilerleyici etkilere neden olan tümörü baskılayabileceğini göstermektedir. TGF- β sinyal yolu, NFAT fosforilasyonu ve çekirdeğe translokasyonla sonuçlanacak şekilde hücre bölünme döngüsünü aktive eder. Sonra NFAT, CDK2, CDK4 ve siklin E gibi bazı elementleri düzenleyerek tümör gelişimini teşvik etmek için Smad2 ile etkileşime girer [71]. Ek olarak, TGF- β , TGF- β indüklenebilir erken yanıt geni, ölüm-ilişkili protein kinaz, inositol-5-fosfataz, GADD45 β 'da dahil olmak üzere proapoptotik proteinlerin indüksiyonuyla da bağlantılıdır [16, 70]. Ayrıca, TGF- β 'nın Bax ve Bcl-2 arasındaki etkileşimi düzenleyebileceği ve erken tümörlerde kaspaz 3'ün efektörünü aktive edebileceği bulunmuştur [72].

1.1.5.2 Tümör Aktivatör Olarak TGF- β

1.1.5.2.1 TGF- β İmmün İzlemeden Kaçışa Neden Olur

İmmunomodülasyon ile ilgili olarak, TGF- β , immün supresyonu düzenlemede anahtar işlevi olan pleiotropik bir sitokindir [73]. TGF- β , makrofajları, NK (doğal öldürücü) hücrelerini, CD4⁺ yardımcı T hücrelerini ve CD8⁺ sitotoksik T hücrelerini doğrudan inhibe eder ve ayrıca, Th1/Th2 dengesi ile immünosüpresif düzenleyici T hücrelerini upregüle eder [74-76]. TGF- β 'nın aşırı ekspresyonunun, T hücresi dışlanmasını indükleyen ve düşük kolorektal kanserde düşük Th1 hücre-efektör fenotipinin alınmasını bloke eden birincil bir immün kaçırma mekanizmasını temsil ettiği kanıtlandı. TGF- β 'nin başarılı bir şekilde baskılanması, tümör bağışıklık sürveyansını arttırmada faydalı olacaktır, bu da metastazın azalması ile sonuçlanır [77, 78]. TGF- β 'nin sitotoksik T lenfositlerin aracılık ettiği tümör sitotoksitesine yanıt vermek için perforin, granim A, granim B, Fas ligand ve interferon ekspresyonunu açıkça inhibe ettiği ortaya konulmuştur [79].

Chen ve arkadaşları (2015), TGF- β insan PC3 ve DU145 hücrelerinde insan lökosit antijen sınıfı I antijenlerinin (HLA) downregülasyonunu indüklediğini ve sitotoksik T hücresi kaynaklı prostat kanseri hücrelerinin parçalanmasını bastırdığını göstermiştir. HLA-I ekspresyonunun, tümör immün tepkisinde azaldığı ve böylece, tümör hücrelerin immün sürveyanstan kaçmasına neden olarak kanserin ilerlemesini teşvik ettiği belirlenmiştir [80]. Bu nedenle, bu sonuçlar, immünosüpresif bir molekül olarak TGF- β 'nin immün yanıtı doğrudan baskıladığını ve ileri insan tümör hücrelerinde önemli bir unsur olduğunu ortaya koymuştur [81].

1.1.5.2.2 TGF- β Anjiyogenezi Teşvik Eder

Anjiyogenez, invazyon ve metastaz için faydalıdır, çünkü kan damarları hücrelerin büyümesi için gereken besinleri sağlayabilir [82]. TGF- β ekspresyonu, ilerlemiş tümör anjiyogenezi için çok önemlidir [83]. TSP-4, anjiyogeneze rol oynayan, hücre dışına salgılanan matris proteindir. Muppala ve arkadaşları (2017) proanjiyogenik TSP-4'ün upregülasyonunu ve TSP-4'ün endotel hücreleri üzerindeki seçici etkilerinin kanser hücresi çoğalmasını inhibe etmesine rağmen, TGF- β 'nın tümör büyümesini teşvik etmek için elverişli olduğunu buldular. Tümör ile ilişkili fibroblastların (TAF'ler) kompleks etkileşimlerini gösteren veriler, meme kanserinde tümör damarlanmasını desteklemiştir. TGF- β , perisit-endotel ilişkisini artırarak tümör anjiyogenezini arttırdığı bulunmuştur [84]. Ek olarak, Hui ve arkadaşları, TGF- β /Smad sinyalini bloke etmek için arsenik trioksit kullandığında anjiyogenik yeteneklerin zayıfladığını, miRNA-155 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir, böylece TGF- β /Smad sinyalinin prostat kanserinde anti-anjiyogeneze inhibe olduğunu bulmuşlardır [85]. Bu bulgular, TGF- β 'nin anjiyogenezi doğrudan desteklediği, böylece tümör hücrelerini, tümörün sonraki aşamasında vücuttan daha fazla beslenmesini sağladığını ve daha sonra metastazı desteklediğini göstermektedir [85].

1.1.5.2.3 TGF- β Epitelyal-Mezenkimal Geçişi Destekler

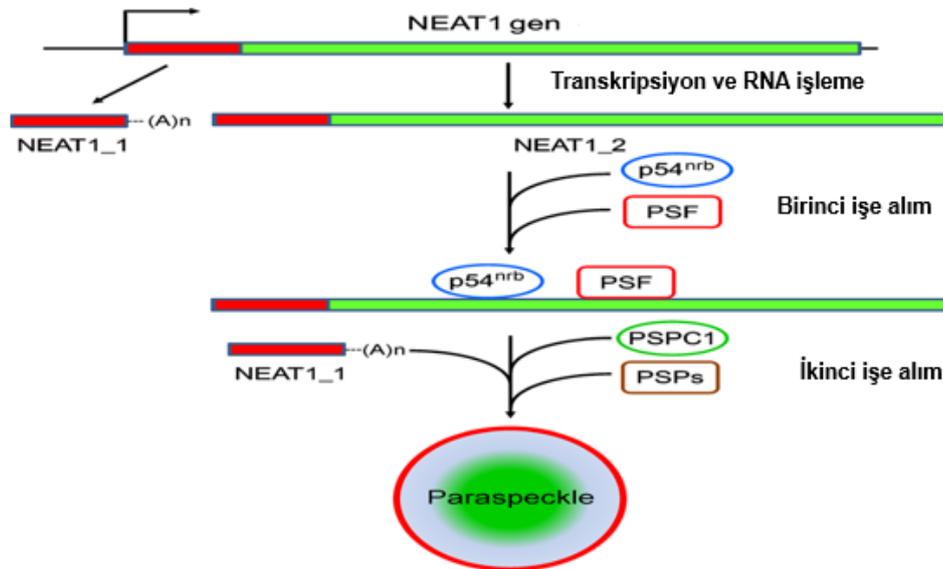
Kanser kaynaklı invazyon ve epitelyal-mezenkimal geçiş ile indüklenen metastaz için çok sayıda araştırma çalışması yapılmıştır [86]. EMT'nin hücre polaritesini değiştirebileceği ve E-kaderin gibi yapışma proteinlerini kaybedebileceği kanıtlanmıştır, böylece hücre invazyon ve metastatik yetenek gibi malign özelliklere sahip olur [87]. Çok sayıda deney, TGF- β 'nin, Snail1, Slug, Zeb1/2, Twist, β -katenin ve Foxc2 gibi EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini düzenlediğini göstermiştir [88-91]. TGF- β yollarının sıkı-bağlantı kaybından ve kısmi E-kaderin kaybından ve Smad sinyallemesine dayanan mezenkimal fenotipe tam bir E-kaderin kaybından ve dönüşümünden sorumlu olduğunu gösterilmiştir. Örneğin, Fuxe, Vincent ve Garcia de Herreros (2010), TGF- β ve kök hücre arasındaki bağlantının tümörlerde EMT'ye yol açabileceğini göstermişlerdir. Bu özellikler, TGF- β 'nin çeşitli ileri tümörlerde tümör baskılayıcı rolü sağlayabildiğini göstermektedir [92].

1.2 Paraspeckle

Paraspecklar, memeli hücre çekirdeğinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoproteinlerdir. Bu yapılar, farklılaşmış hücrelerde belirli genlerin ekspresyonunun kontrol edilmesini RNA'nın nükleer tutulmasıyla sağlar. Çekirdek paraspeckle proteinleri

(PSF/ SFPQ, p54^{nrb}/NONO ve PSPC1 (paraspeckle proteini 1)), DBHS (Drosophila melanogaster behavior, human splicing) ailesinin üyeleridir. Bu proteinler, uzun protein kodlamayan RNA NEAT1 ile birlikte, paraspeckles oluşturmak ve bütünlüklerini korumak için birleşirler [93].

İnsan NEAT1 geni, iki lncRNA izoform transkriptine, NEAT1_1 ve NEAT1_2'ye kopyalanır. Sadece NEAT1_1 transkripti poliadenile edilmiştir. Paraspeckles oluşumu esas olarak bileşen alınımının iki aşamasını içerir. İlk işe alımda, iki bol paraspeckle proteini, p54^{nrb} ve PSF, NEAT1_2 transkriptinin iç bölgesine bağlanır. İlk işe alım, PSPC1, NEAT1_1 ve diğer paraspeckle proteinlerinin (PSP'ler) ikinci işe alımlarını paraspeckles oluşturmak için tetikler [94](Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Hücre çekirdeğinde paraspeckle oluşumu için hipotetik model [94].

Hücre çekirdeği, özellikle karmaşık ökaryotlarda, oldukça organize bir yapıdır. Kromozomlar ayrık halde bulunurlar ve çekirdekçik, kaval cisimciği, paraspeckle ve nükleer speckle'lar subnükleer yapıyı zenginleştirir [95]. Nükleer organizasyon, genomun korunmasına ve gen ekspresyonunun kontrolüne bağlıdır ve böylece büyümeyi, gelişmeyi ve hücrel proliferasyonu etkiler. Dahası, nükleer organizasyonun bozulması genellikle akut promyelositik lösemi hastalığında subnükleer promyelositik lösemi cisimciklerinin kaybı gibi hastalık durumları ile ilişkilidir [96].

Paraspeckles nispeten yeni tanımlanmış bir subnükleer yapıdır. Bilinen herhangi bir subnükleer yapının belirteci ile direkt olarak eşleşmeyen nükleer proteinin bulunmasıyla keşfedilmişlerdir [97]. Bu yapılar paraspeckles olarak adlandırılmıştır, çünkü splicing faktörlerinde zenginleştirilen nükleer speckle'ların yakınında bulunan interkromatin alanında gözlenmişlerdir [97].

Paraspeckler, memeli çekirdekleriyle sınırlıdır ve transforme ve primer hücre hatlarında, embriyonik fibroblastlarda, dokularda ve tümörijenik biyopsilerde bulunurlar [98-101]. Aynı zamanda paraspeckler dinamik yapılardır; örneğin, paraspeckles insan embriyonik kök hücrelerinde yoktur, ancak farklılaştıktan sonra ortaya çıkar [102]. Bu cisimler yaklaşık 0,5–1,0 µm boyutundadır ve sayıları hem hücre popülasyonları içinde hem de hücre tipine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin; HeLa hücrelerine her bir çekirdekte 13–17 paraspeckle bulunurken, NIH3T3 hücrelerinin her bir çekirdeğinde 5–10 adettir [98, 100, 103].

1.2.1 Nükleer Zenginleştirilmiş Bol Transkript 1 (NEAT1)

Global sekans analizi ile insan ve diğer memeli genomlarının, toplam genomun 2% 'sini oluşturan 20.000-25.000 protein kodlayan gen arasında olduğu bilinmektedir [104, 105], (Uluslararası İnsan Genomu Sıralama Konsorsiyumu, 2004); Memeli transkriptomunun son araştırmaları, genomun çoğunluğunun, kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak adlandırılan protein kodlama kapasitesine sahip olmayan RNA transkriptlerine kopyalandığını ortaya çıkarmıştır [106-108]. Çok sayıda ncRNA'nın, hem kodlayıcı hem de antisens doğrultuda protein kodlayıcı genlerin intronlarından ve protein kodlayıcı genler arasındaki genomik bölgelerden kopyalandığı bulunmuştur [109].

Geniş ncRNA kategorisi, küçük ncRNA'lara (sncRNA'lar) ve uzun ncRNA'lara (lncRNA'lar > 200 bp) bölünerek uzunluğa göre sınıflandırılmıştır. Her ne kadar farklı sncRNA sınıflarının (örneğin, mikroRNA'lar, siRNA'lar, piwi-etkileşimli RNA'ların) rolleri ve kimlikleri, önemli çalışmalar nedeniyle iyi anlaşılrsa da, hücrede lncRNA'ların çeşitli fonksiyonları büyük ölçüde bilinmemektedir [110-113].

LncRNA'ların güncel çalışmaları, lncRNA'ların hücresel fonksiyonlarının, gen ekspresyonu düzenleme, protein komplekslerinin başlatılması ve sürdürülmesi ve alt hücre mimarisi gibi çeşitli biyolojik işlemlere dahil olduğunu ortaya çıkarmıştır [109, 110, 114, 115]. Dahası,

araştırmalar da lncRNA'ların önemli fizyolojik ve patolojik rollere sahip olduğu gösterilmiştir [109].

Tanımlanan lncRNA'ların çoğunun, RNA polimeraz II ile kopyalandığı ortaya çıkmıştır. Pek çok lncRNA'nın, belirli fonksiyonlara sahip olduklarını gösteren, belirli hücre tiplerine ve alt hücre bölmelerine spesifik olduğu bulunmuştur [109, 110, 114]. İnsan lncRNA alt hücre lokalizasyonunun kapsamlı çalışmaları, önemli sayıda lncRNA'nın hücre çekirdeğinde spesifik olarak lokalize olduğu, nükleer olayları ve mimariyi düzenledikleri gösterilmiştir [108, 110, 116].

NEAT1 lncRNA'lar, insan kromozomu 11q13.1 üzerinde ailesel tümör sendromu çoklu endokrin neoplazisi (MEN) tip I denilen genetik bir lokustan RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona tabi tutulur ve iki izoform transkript, 3.7 kb NEAT1_1 (MEN ϵ) ve 23-kb NEAT1_2 (MEN β) 'den oluşur [117]. NEAT1 RNA izoformları aynı promotörü ve 5' ucunu paylaşır, ancak farklı RNA işleme mekanizmaları tarafından üretilen farklı 3'-uçlarına sahiptir. NEAT1_1, bir poli (A) kuyruğu ile kanonik bir RNA transkripti oluşturmak için parçalanır ve poliadenile edilir. Buna karşılık, RNase P, birincil NEAT1_2 transkriptinin 3' ucunda bulunan tRNA benzeri yapıyı tanır ve poliadenile edilmemiş 3'-ucu ile bir RNA transkripti oluşturmak için onu parçalar [101].

NEAT1, nükleer cisimlerin biyogenezi ve bakımı, kromatin yeniden modelleme, gen ekspresyonu düzenleme, stres ve immün yanıtlar, organogenez ve kanser dahil patolojik hastalıkların gelişimi için kritik öneme sahiptir [101].

NEAT1-içeren paraspeckler yakın zamanda p53 yolunun işlevine bağlanmıştır. Adriaens ve meslektaşları, NEAT1'i p53'ün downstream hedef geni olarak tanımladılar ve farmakolojik olarak tetiklenen veya onkojene bağlı replikasyon stresinin NEAT1 ekspresyonunu, fare ve insan hücrelerinde p53 aktivasyonuna bağlı bir şekilde paraspeckles oluşumunu uyardığını bulmuşlardır [118]. Dahası, ATR sinyalinin NEAT1'e bağlı aktivasyonu, p53'ün onkojene bağlı aktivasyonunu zayıflatır. NEAT1_2'nin paraspeckle oluşumundaki asıl rolü paraspecklerin fonksiyonel olarak p53 sinyalleşmesinin biyolojik yönleriyle bağlantılıdır [118].

Chakravarty ve arkadaşları, potansiyel olarak epigenetik bir mekanizma yoluyla prostat kanseri genlerinin aktiveştirilmesinde NEAT1'in onkogenik rolünü ortaya koymaktadır [119].

1.2.2 DBHS Proteinleri

Günümüzde, paraspeckle proteinleri, PSPC1, p54nrb/NONO ve PSF/SFPQ olmak üzere memeli DBHS (Drosophila behavior, human splicing) protein ailesinin üyeleridir. Subnükleer bölgede birlikte bulunmaktadır. DBHS protein ailesinin bu üç üyesi paraspeckle'nın en iyi çalışılmış iç protein bileşenleridir. Bu ailenin tüm üyeleri arasındaki bildirilen etkileşimler, in vivo da homo veya heterodimer halinde olduklarını göstermektedir [120, 121]. İki N-uç RNP-tipi RNA tanıma motifleri ve bir C-uç coiled-coil domaini içinde >%50 sekans benzerlikleri vardır. C-uç coiled-coil domaini dimerizasyona aracılık eder [121].

DBHS proteinleri çekirdek içinde dinamik haldedir: normal koşullar altında nükleoplazma, paraspeckles ve çekirdekçik arasında geçiş yaparlar ve RNA Pol II transkripsiyonu inhibe edildiğinde perinükleolar kapak yapıları içinde birikirler. HeLa hücrelerinde yüksek oranda ifade edilen iki DBHS proteininin (p54nrb/NONO ve PSF/SFPQ) herhangi birinin baskılanmasının paraspeckles kaybına neden olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşılık, HeLa hücrelerinde daha az bulunan DBHS proteini PSPC1'in baskılanması paraspeckle yapısı üzerinde etkisi olmamıştır [122]. Bu nedenle, yüksek oranda eksprese edilmiş DBHS protein dimerleri paraspeckle yapısal bütünlüğünün çekirdeğindedir. DBHS ailesini proteinlerinin çok çeşitli fonksiyonları vardır. Hem çift hem de tek iplikli DNA ve RNA'ya bağlandıkları gösterilmiştir ve farklı komplekslerde birlikte görev alırlar [123]. Bu fonksiyonlar, transkripsiyon başlangıcı [124-126], koaktivasyon [127, 128], transkripsiyon ve RNA işleminin birçok yönünü kapsar. Ayrıca, alternatif splicing [129-132] ve transkripsiyonel sonlandırma da görevlidirler [133]. Paraspeckle ile ilgili başka bir fonksiyon, PSF/SFPQ ve p54nrb/NONO'nun RNA'nın nükleer tutunumuna dahil edilmesidir. Adeninden Inozine hiper-düzenlenmiş RNA'nın çekirdekten ayrılmasını önlerler [134].

1.2.2.1 Paraspeckle Protein 1 (PSPC1)

Paraspeckle protein 1 (PSPC1) ilk olarak paraspeckle adı verilen belirli nükleer yapıda bulunan yapısal bir protein olarak tanımlandı [97]. PSPC1, ökaryotlarda en yaygın RNA splicing domaini olan ve PSPC1'in paraspeckles'a lokalizasyonu için bir ön koşul olan RNA

tanıma motifinin (RRM) iki kopyasını içerir [135]. Fox ve arkadaşları, PSPC1'in mRNA splicing düzenlenmesinde rol oynayabileceğini bildirmiştir. Ayrıca, PSPC1'in androjen reseptörü aracılı transkripsiyon aktivitesini düzenleyebileceği öne sürülmüştür [121].

PSPC1'in, hücrel DNA damage response (DDR) (DNA hasar yanıtı) temel araçları olan serin/treonin protein kinazları Ataksi Telanjiektazi Mutated (ATM) ve Ataksi Telanjiektazi ve Rad3 ile ilişkili protein (ATR) tarafından fosforile edilebildiği rapor edilmiştir [136-138]. Proteom çalışmasında PSPC1'in sisplatin tedavisi ile indüklenebileceği de gösterilmiştir. PSPC1'in sisplatin kaynaklı G1/S fazında hücre döngüsünde durması için önemlidir, çünkü PSPC1'in susturulması, hücrelerin G2/M fazına geçmesine neden olmaktadır [135]. Ayrıca, PSPC1 baskılandığında apoptotik hücrelerde de önemli bir artış gözlenmiştir [135]. Aynı zamanda PSPC1 yokluğunda mitotik katastrof yoluyla Metil metansülfonat (MMS) kaynaklı apoptoz artmıştır [135].

1.2.2.2 PSF/SFPQ (PTB İle İlişkili Splicing Faktörü)

100 kDa'lık bir polipeptit olan PSF (polipirimidin bölgesi bağlayıcı proteini (PTB) ile ilişkili splicing faktörü) tanımlandı ve PTB ile kompleks içerisinde karakterize edildi [129]. Polipirimidin bölge, birçok ökaryotun birçok intronunda bulunan ve 3'-splice bölgesinin tanımlanması için birçok faktörün bağlanabileceği önemli bir bölgedir. Bununla birlikte, PSF'nin çoğu nükleer matriks ile ilişkilidir ve PTB'ye bağlı değildir [139]. İmmün flüoresan boyama, hem diffüz hem de noktasal modellerinde PSF'nin nükleoplazmik dağılımını göstermiştir [140, 141]. Buradaki nükleoplazmik lokalizasyon, RNA tanıma motifi 2 (RRM 2) varlığı ile belirlenir [142]. PSF'nin prolin/glutamin bakımından zengin N-terminali, protein-protein etkileşimlerinde yer alabilmektedir [129].

PSF, RNA polimeraz II (pol II) C-terminal domaini (CTD), transkripsiyonel faktörleri, koregülatörler ile etkileşime girer ve bazı durumlarda, gen transkripsiyonu başlatmayı düzenlemek için hedeflenen promotorun DNA dizilerine doğrudan bağlanır. PSF, bir yardımcı splicing faktörü olarak U1A, U2AF ve beş küçük nükleer riboprotein de dahil olmak üzere birçok spliceosome bileşeni ile kompleksler oluşturur. Hem adım I hem de II pre-mRNA eklenmesini katalizleyen temel bir RNA splicing faktörüdür. Buna ek olarak, PSF'nin alternatif RNA splicing'i düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca PSF, 3'polidadienilasyondan, transkripsiyon sonlandırılmasından ve RNA'nın nükleusta tutunumundan sorumlu protein komplekslerinde de mevcuttur [139].

PSF, *Saccharomyces cerevisiae* splicing faktörü PRP18'e karşı bir antikor ile tanımlanan p54nrb/NONO ile bir heterodimer oluşturur. RNA splicing faktörü olarak klonlanan p54nrb/NONO, RNA tanıma motifi bölgesinde, PSF ile % 71 özdeş amino asidi paylaşır. PSF'ye benzer şekilde p54nrb/NONO, transkripsiyon başlatma, RNA işleme ve DNA tamiri de dahil olmak üzere birçok nükleer fonksiyona katılır [143].

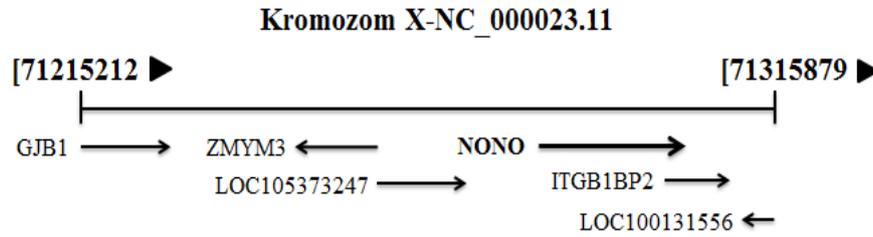
1.2.2.3 NONO/p54nrb (Non-POU Domain İçeren Oktamer Bağlanma Protein)

Saccharomyces cerevisiae splicing faktörü PRP18'in bir insan homoloğu aranırken, PRP18'e karşı antikorlarla güçlü bir şekilde reaksiyona giren bir polipeptit bulundu. Bu polipeptid western blot deneyi kullanılarak HeLa hücrelerinden saflaştırıldı ve NONO/p54nrb (nükleer-RNA bağlanma proteini, 54 kDa) olarak adlandırıldı. NONO/p54nrb proteinini kodlayan cDNA'lar, saflaştırılmış proteinin kısmi sekansından türetilmiş problemlerle klonlandı. Bu cDNA'lar aynı kodlama sekanslarına sahiptir, ancak 5'-UTR bölgesindeki alternatif splicing'in bir sonucu olarak farklılık gösterir. Bu cDNA'lar iki RNA tanıma motifi (RRM) içeren 471 aminoasitlik polipeptidi kodlar. İnsan NONO/p54nrb, ortak bir epitop (antijen belirleyici) dışında PRP18 maya faktörü ile homolojiye sahip değildir, ancak bunun yerine her iki RRM'yi içeren bir 320 aa bölgesindeki insan splicing faktörü PSF ile % 71 aynıdır. Ek olarak, hem NONO/p54nrb hem de PSF, ana homoloji bölgesi dışındaki Pro ve Gln kalıntıları bakımından zengindir. *Drosophila* normal görme ve kur yapma şarkısı için gerekli olan, no-on-transient A (nonA) geni, tarafından kodlanan üç üründen biri olan *Drosophila* puf spesifik protein BJ6, aynı 320 aa bölgesinde NONO/p54nrb ile % 42 aynıdır [124]. p54nrb, PSF ve NONA/BJ6 arasındaki çarpıcı homoloji, farklı mRNA splicing seviyesindeki çeşitli yolların düzenlenmesinde rol oynayabilecek DBHS domain (*Drosophila* behavior, human splicing) adı verilen yeni bir filogenetik olarak korunmuş protein segmentini tanımlar [124]. p54nrb/NONO proteini de, PTB ile ilişkili splicing faktörü (PSF) ve paraspeckle protein 1'i (PSPC1) içeren DBHS protein ailesine aittir; bu proteinler homo veya heterodimerler oluşturarak spesifik fonksiyonları yerine getirirler [144]. non-POU domain içeren oktamere bağlayıcı protein p54nrb/NONO, nükleer hormon reseptörlerinin RNA prosesini içeren splicing ve transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan çok işlevli bir nükleer proteindir [144].

Ayrıca NONO/p54nrb, CAII antikorları tarafından tanınan bir polipeptit CA inhibitör afinite kromatografisi kullanılarak birkaç sıçan dokusundan saflaştırılmıştır. Görünür 66 kDa kütle polipeptidi, amino asit dizilimi ve CA aktivite ölçümleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Önceden klonlanmış ve karakterize edilmiş RNA ve DNA bağlayıcı nükleer faktör olan p54nrb/NONO ile aynı olduğu görülmüştür. Bakulovirüsde üretilen rekombinant p54nrb/NONO, CA inhibitör afinite kromatografi matrisine bağlandı ve saptanabilir CA aktivitesi (25 ünite / mg) olarak ölçülmüştür [145].

p54nrb/NONO geni, insanda, X kromozomunun q13.1 bölgesinde bulunur. 11 intron ve 13 ekzon içermektedir. p54nrb/NONO geninin psödogenleri, 2. ve 16. kromozomlarda bulunmaktadır. Veri tabanında, P54; NMT55; NRB54; NONO/P54nrb; PPP1R114 olarak adlandırılmaktadır [146] (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: p54nrb/NONO'nun X kromozomu üzerindeki lokasyonu [146].

1.2.2.3.1 NONO/p54nrb Geninin Görevleri ve Kanserdeki Rolü

p54nrb/NONO gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA sentezi ve onarım işlemleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde yer almaktadır [123, 129, 147]. Başlangıçta bir RNA bağlayıcı protein [124] olarak tanımlanan NONO/p54nrb çift sarmallı DNA, tek sarmallı DNA ve RNA ile etkileşime girer ve gen transkripsiyonu, RNA splicing'i ve homolog olmayan DNA uç birleştirme (NHEJ) işleminin [132] birçok aşamasında yer alır. Gen transkripsiyonundaki, RNA işlemedeki ve DNA onarımındaki rolleri nedeniyle, p54nrb/NONO kanser ilerlemesinde rol oynamaktadır. p54nrb/NONO'nun insan kanserinin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. p54nrb/NONO protein ekspresyonu, vasküler invazyonlar ve mesane kanserlerinin zayıf hasta sağkalımı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir [148].

p54nrb/NONO'nun aşırı ekspresyonu, insan göbük ven endotel hücrelerinin (HUVEC) invazyonunu arttırmıştır [149]. Papiller renal hücreli karsinomda p54nrb/NONO ve TFE3

genlerinin kromozomal translokasyonu sıklıkla belirlenmiştir [150]. Ayrıca bazı çalışmalar göstermektedir ki p54nrb/NONO insan nöroblastomu için bağımsız bir prognostik faktördür [151].

De novo ve kalıtsal X-kromozom hücre adhezyon molekülü protokadherin 19 (PCDH19) mutasyonları, çok değişkenli epilepsi, otizm, bilişsel gerileme ve davranış problemleri sendromuna neden olmaktadır. PCDH19 protein etkileşimli bir ortak olarak, çok işlevli bir nükleer paraspeckle proteini olan p54nrb/NONO belirlenmiştir. Meme kanseri hücreleri kullanılarak PCDH19- p54nrb/NONO kompleksinin ERa aracılı gen ekspresyonunun pozitif bir ko-regülatörü olduğu gösterilmiştir [152].

Progesteron reseptörü (PR) gebeliğin oluşumunda ve korunmasında önemli rol oynar. Çekirdek düzenleyicilerle dinamik etkileşimler yaparak, PR, myometriumun kasılma aktivitesini artıran ve doğum sancısı başlamasına katkıda bulunan genlerin ekspresyonunu baskılar. p54nrb/NONO progesterondan bağımsız olarak PR ile doğrudan etkileşime girer. PSF'nin aksine, p54nrb/NONO, PR protein yıkımını arttırmaz ve PR'ye DNA'ya bağlanmayı bloke etmez. Daha ziyade, NONO/p54nrb, N-terminalinden PR-DNA kompleksine N-terminali boyunca mSin3A'yı alır ve progesteron-cevap elemanı-lusiferaz haberci geninin PR aracılı transaktivasyonunu inhibe eder. Doğum sırasındaki p54nrb/NONO'nun azalmış ifadesi, connexin 43 ifadesi üzerinde PR aracılı inhibisyonu baskılamak için hareket edebilir ve doğum eyleminin başlamasına katkıda bulunabilir [153].

Meme kanserinde lipid metabolizmasının düzensizliği sıktır. Bununla birlikte, altta yatan mekanizmalar belirsiz kalır ve anormal lipid metabolizmasının meme kanserinin malign fenotiplerine katkısı az anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarla nükleer protein p54(nrb)/NONO'nun, insan hastalarında normal dokulara kıyasla meme kanseri dokularında yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. p54(nrb)/NONO'nun meme kanserindeki işlevlerini belirlemek için, bir biyokimyasal tarama yapılmıştır ve lipid biyosentezinde yer alan genler için bir ana aktivatör olan SREBP-1a, p54(nrb) 'nin yeni bir etkileşimli proteini olarak tanımlanmıştır. İnsan meme kanseri dokularında, p54nrb/NONO ve SREBP-1a proteinlerinin seviyeleri birbirleriyle pozitif korele olduğu gösterilmiştir. Biyokimyasal analizler, p54(nrb)/NONO'nun korunmuş Y267 rezidüsü SREBP-1a'nın nükleer formuna bağlanması için gerekli olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, nükleer SREBP-1a'ya bağlanan p54nrb/NONO, nükleer SREBP-1a protein stabilitesinde bir artışa neden olduğu

belirlenmiştir. Sonuç olarak, p54nrb/NONO, meme kanseri hücrelerinde SREBP-1 ile uyarılmış lipojenik genlerin ve lipit üretiminin transkripsiyonunu uyardığı, ayrıca hem p54nrb/NONO hem de SREBP-1a in vitro meme kanseri hücre büyümesi için gerekli olduğu bulunmuştur. p54(nrb)/NONO'nun çekirdekteki SREBP-1a'nın yeni bir düzenleyicisi olduğu belirlenmiştir [154].

p54nrb/NONO glukokortikoid üretimi için gerekli bir gen olan CYP17A1'in transkripsiyonunu düzenleyen bir protein kompleksinin bileşeni olarak tanımlanmıştır. H295R insan adrenokortikal hücrelerinde p54nrb/NONO ekspresyonunun susturulmasının hücrelerin hücre içi cAMP üretimini ve daha sonra adrenokortikotropin hormonu (ACTH) uyarımına yanıt olarak kortizol biyosentezini artırma kabiliyetini azalttığını gösterilmiştir. İlginç bir şekilde PDE2A, PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4D ve PDE11A dahil fosfodiesteraz (PDE) izoformlarının ifadesi, p54nrb/NONO susturulmuş hücrelerde indüklendiği gösterilmiştir. Ayrıca, p54nrb/NONO için, eksoribonükleaz XRN2 ile PDE transkriptlerinin etkileşimi kolaylaştırarak PDE transkriptlerinin stabilitesini düzenlemede bir rol oynadığı tanımlanmıştır. p54nrb/NONO'nun, PDE transkriptlerinin splicing'ini ve parçalanmasını düzenleyerek cAMP'ye bağlı sinyalleme ve nihayetinde cAMP ile uyarılan glukokortikoid biyosentezini düzenlediği rapor edilmiştir [155].

İntrasisternal A partikülleri gibi DNA elementlerine bağlanmaya ek olarak, p54nrb/NONO'nun diğer transkripsiyon faktörlerinin cevap elementlerine bağlanmasını teşvik ettiği de bilinmektedir [126]. Polipirimidin kanal bağlayıcı protein ile ilişkili splicing faktörü (PSF)-p54nrb/NONO heterodimeri, tiroid hormon reseptörü [156] ve androjen reseptörü dahil olmak üzere birkaç nükleer reseptörün (NR) transkripsiyonel aktivitesini düzenler [157]. Bu heterodimerik kompleks ayrıca, iç nükleer matriks yapısal protein matrin 3'e bağlanarak aşırı Adeninden Inozine hiperedite olan RNA'ların nükleer tutunumunu teşvik eder [134, 158] ve topoizomerez I aktivitesini uyarır [159].

Fare embriyosunun implantasyon öncesi gelişimi sırasında nükleer organizasyon, kromatinin yeniden programlanması için gerekli özellikleri gösterir [160]. Bunlar histon modifikasyonları, nükleer yeniden konumlandırma ve spesifik genlerin aktivasyonu ile ilişkili kromatinin yeniden düzenlenmesidir. Bu aşamalar sırasında metiltransferaz CARM1'in (histon koaktivatör ilişkili arginin metiltransferaz 1) heterojen aktivitesi, histon H3R26'nın (histon H3 arjinin 26 metilasyonu) farklı metilasyonuna yol açar. CARM1'in

fare embriyosundaki 2-4 hücreli evreye geçişinde nükleer granüller içinde biriktiği ve çoğunun paraspeckle'lara karşılık geldiği gösterilmiştir. Paraspeckle bileşeni NEAT1 ve ortağı p54nrb/NONO, CARM1'in paraspeckle'lar ile ilişkisi ve H3R26 metilasyonu için gereklidir. CARM1 ayrıca paraspeckle organizasyonunu da etkiler. NEAT1 veya p54nrb/NONO'nun tükenmesi 16 ila 32 hücreli aşamada embriyonun gelişmemesi ile sonuçlanır [161].

Spermatogenez ve sağlıklı testis gelişimi, erkek üreme fonksiyonu için ön koşuldur. Testis sertoli hücrelerinde önemli bir reseptör olan Androjen reseptörü (AR) androjen spesifik cevapta rol oynar ve disfonksiyonu anormal sperm gelişimine neden olarak erkek kısırlığına neden olur. p54nrb/NONO (Non-POU Domain İçeren Oktamer Bağlanma Protein), AR'nin transkripsiyonunu arttırmak için bir koaktivatör görevi görürken AR, testis sertoli hücrelerinde p54nrb/NONO tarafından düzenlenebilir. LncRNA'lar hemen hemen her spermatogenez basamağında rol oynarlar. Ek olarak, p54nrb/NONO'nun, bir AR koaktivatörü olarak prostat kanseri hücrelerinde AR transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir [162]. Fare testis sertoli hücrelerinde, DBHS ailesi proteinleri AR'nin kompleksler halinde fonksiyonel aktivasyon bölgesi, androjen tepki elemanları içeren plazmidlerin lusiferaz analizi, DBHS ailesi proteinlerinin AR transkripsiyonunu artırabildiği gösterilmiştir. DBHS ailesi proteininin bir üyesi olarak p54nrb/NONO'nun testis sertoli hücrelerinde AR'yi düzenleyebileceği tahmin edilebilir [162].

Meme kanseri vakaları klinikopatolojik ve immünohistokimyasal incelendiğinde, p54nrb/NONO'nun meme kanseri hastaları için önemli bir bağımsız prognostik faktör olduğunu gösterilmiştir. Özellikle, siRNA aracılı p54nrb/NONO baskılanması, hem hormon duyarlı MCF-7 hem de hormona dirençli MB-MDA-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir. p54nrb/NONO'nun, hücre proliferasyonuna bağlı genlerin mRNA'ya bağlanarak meme kanseri proliferasyonu için kilit bir düzenleyici olduğu ve ilerlemiş hastalık için potansiyel yeni bir teşhis ve tedavi hedefi olabileceğini gösterilmiştir [163].

Aort diseksiyonu (AD), kollajen üretimi ile fibroz da dahil olmak üzere hücre dışı matristeki değişiklikler ile karakterize edilir. AD'li hastalar anlamlı derecede azalmış p54nrb/NONO ekspresyonu sergilemiştir. p54nrb/NONO ve kollajen arasındaki anlamlı korelasyonunun, p54nrb/NONO'nun kollajen oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir [164].

p54nrb/NONO'nun ayrıca PSF ile bir kompleks oluşturduğu ve DNA çift iplikçikli tamir mekanizmasında homolog olmayan uç birleştirme işleminde görev aldığı gösterilmiştir [165].

Tümör nekroz faktöre bağlı apoptozu indükleyen ligand tarafından başlatılan apoptoz sırasında, PTB'nin etkileşime girdiği RNA splicing proteinlerinin (PSF/SFPQ) karakter içeriğinde bir değişiklik vardır. PTB ve bağlanma ortaklarının hücresel düzeylerini tek tek veya birlikte kullanarak değiştirmenin, bu işlemi hızlandıran PTB, YBX1, PSF ve p54nrb/NONO'nun artmış ifadesi ile apoptoz hızlarını doğrudan değiştirmek için yeterli olduğunu gösterilmiştir [166].

TNF- α , tümör hücreleri gibi birkaç hücre tipinde apoptozu uyarırken, endotel hücreleri TNF- α kaynaklı hücre ölümüne dirençlidir. RNA bağlayıcı protein p54nrb/NONO ve 14-3-3 protein HS1'in TNF- α tarafından indüklenen ekspresyonu endotel hücrelerinin TNF- α aracılı hücre korumasına katkıda bulunabilir. Bu genlerin farklı deneysel ortamlarda hücre sağkalımı ve hücre döngüsü kontrolünde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [167].

p54nrb/NONO ayrıca RNA splicing ile ilişkilidir. Örneğin, U5 short hairpain RNA'ya (shRNA) bağlanarak pre-mRNA ile etkileşime girer ve transkripsiyon/splicing komplekslerinde bulunan 5 'splicing bölgesine bağlanır [124, 130, 168-171].

Jurkat T hücrelerinde p54nrb/NONO ekspresyonunun baskılanması arttırılmış HIV-1 gag mRNA ekspresyonu ve Gag protein sentezi, viral gen ekspresyonu ve RNA düzenlenmesinin, p54nrb/NONO knockdown (KD) hücrelerinde artmış HIV-1 replikasyonuna neden olan olaylar olduğu gösterilmiştir [172].

RA (Romatoid artrit) hastalarının sinovyal dokularında p54nrb/NONO ifadesinin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Fonksiyonel çalışma, p54nrb/NONO'nun, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 ve TNF- α dahil enflamatuar faktörlerin seviyelerini arttırabileceği gösterilmiştir. p54nrb/NONO'nun aşırı ifadesinin, NF κ B'nin önemli bir alt birimi olan P65'in protein seviyelerini indükleyebileceği bulunmuştur. Buna karşılık, p54nrb/NONO'nun RNAi tarafından parçalanması, NF κ B ifadesini önemli ölçüde azaltmıştır [173].

Malign melanom, melanositlerden veya melanositlerden gelişen hücrelerden kaynaklanan bir neoplazmı temsil eder [174]. Melanom inhibe edici aktivitenin (MIA), malign melanomun ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı ve erken tümör oluşumu aşamalarında melanomla ilişkili molekülleri ve yolakları etkilediği gösterilmiştir. p54nrb/NONO promotöründe MIA'ya bağımlı aktivasyon için gerekli ve yeterli bir derece korunmuş bir bölge tespit edilmiştir [175]. MIA'nın p54nrb/NONO'nun düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. p54nrb/NONO'nun sırasıyla normal insan melanositleri veya normal cilt ile karşılaştırıldığında hem melanom hücre hattında hem de melanom dokusu örneklerinin çekirdeğinde güçlü bir şekilde eksprese edildiği ve lokalize olduğu gösterilmiştir [176]. Aynı zamanda kondrositlerdeki son çalışmalar MIA'nın p54nrb/NONO'nun transkripsiyonunu düzenleyebildiğini [177] ve p54nrb'nin modifikasyon mRNA ekspresyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir [178].

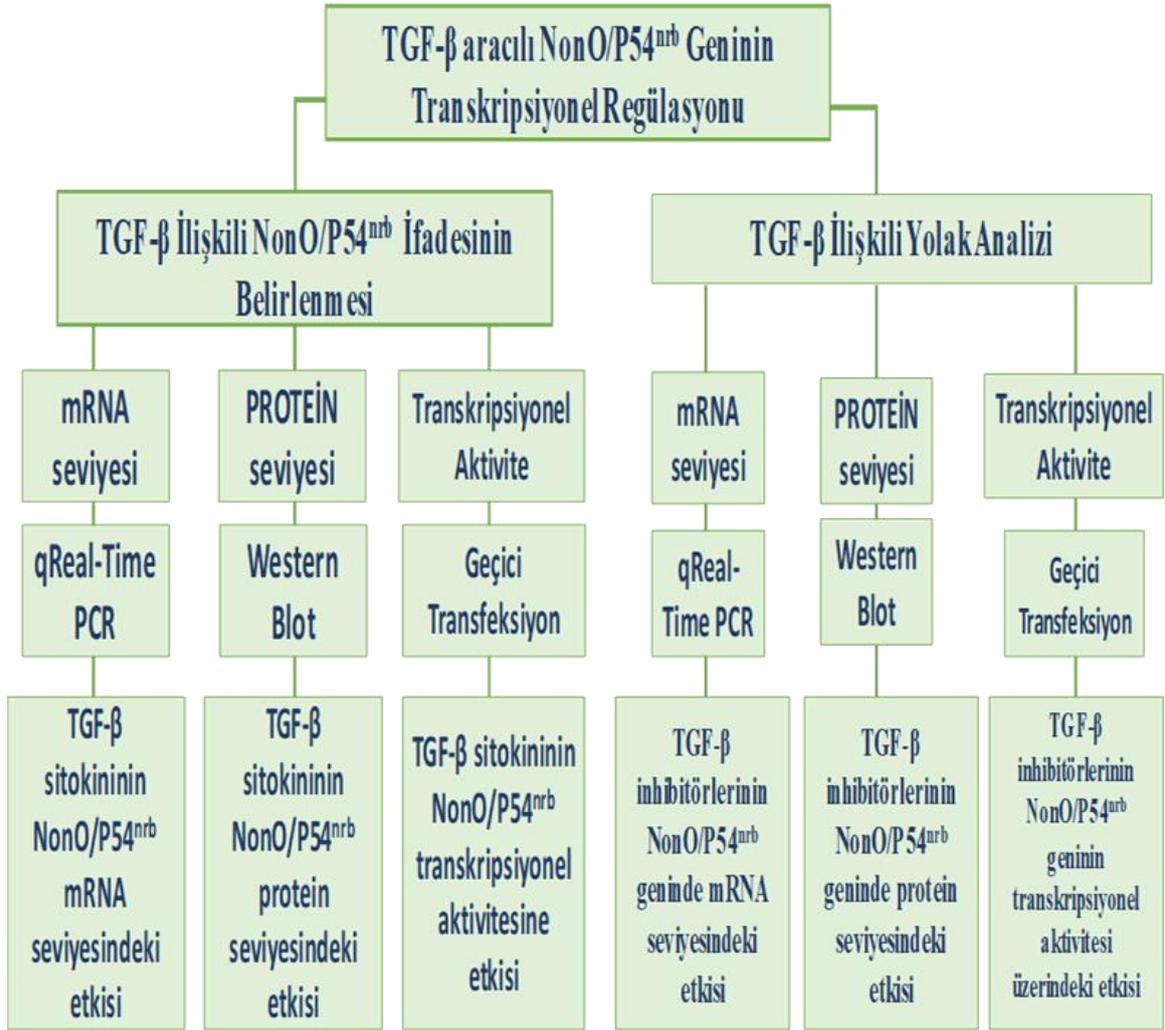
Özofagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC), Çin'deki en yaygın malignitelerden biridir ve yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. RNA splicing faktörü p54nrb/NONO'nun ESCC büyümesi, apoptoz ve istilanın önemli bir düzenleyicisi olduğunu bildirilmiştir. P54nrb/NONO protein seviyeleri, ESCC'de, komşu iyi huylu özofagus skuamöz epiteli ile karşılaştırıldığında çarpıcı bir şekilde artış olduğu gözlemlenmiştir. Çoklu ESCC hücre modellerini kullanılarak, siRNA ile p54nrb/NONO'nun baskılanması sonucunda ESCC hücrelerinin proliferasyonu, istilası ve apoptosisi önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir [179].

2. TEZİN AMACI

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak p54nrb/NONO geninde TGF- β sitokininin, insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (Hep3B) mRNA ve protein seviyesinde meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi ve ardından özel hücre içi sinyal yolak inhibitörleri kullanılarak p54nrb/NONO geninde TGF- β sitokini bağlantılı hücre içi sinyal yolaklarının, insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (Hep3B) mRNA, protein ve transkripsiyonel aktivitesindeki seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda tasarlanan tez kapsam planı Şekil 2.1’de verilmiştir. Bu plana göre;

- i. TGF- β sitokininin, p54nrb/NONO geninin mRNA seviyesine etkisinin belirlenmesi amacı ile insan hepatoselüler karsinom modeli olan Hep3B hücre hattında sqRT-PZR ve RT-PZR metodunun uygulanması ile belirlenmesi
- ii. TGF- β sitokininin, p54nrb/NONOGenin protein seviyesine etkisinin western blot tahlili ile çözümlenmesi
- iii. TGF- β sitokininin, insan hepatoselüler karsinom modeli olan Hep3B hücre hattında p54nrb/NONOGenindeki transkripsiyonel etkinlikteki seviyenin belirlenmesi
- iv. p54nrb/NONOGenine ait klonlanmış olan promotor parçalarının Hep3B hücre hattına geçişi transfeksiyon yöntemi ile aktararak transkripsiyonel etkinliğin belirlenmesi
- v. Hep3B hücre hattında p54nrb/NONOGenin TGF- β sitokini bağlantılı hangi hücre içi sinyal yolaklarını kullandığının mRNA seviyesinde RT-PZR metodu ile belirlenmesi
- vi. Hep3B hücre hattında p54nrb/NONOGenin TGF- β sitokini bağlantılı hangi hücre içi sinyal yolaklarını kullandığının protein seviyesinde western blot tahlili ile belirlenmesi
- vii. TGF- β sitokini varlığında p54nrb/NONOpromotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etki eden hücre içi sinyal yolaklarının belirlenmesi



Şekil 2.1: Tez kapsamını özetleyen diyagram.

3. MATERYAL METOT

3.1 Materyal

3.1.1 DeneY alışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri

DeneY çalışmasının öncesinde kullanılacak olan kimyasal malzemelerin güvenlik protokolleri incelenmiş, sağlığı tehditeden unsurlar göz önünde bulundurularak hazırlıklar gerçekleştirilmiştir. DeneY süresince kullanılan kimyasal ve laboratuvar malzemeleri Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kimyasal ve laboratuvar malzemeleri listesi.

Hücre Kültürü DeneY alışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medyum	Gibco, Euroclone
Fetal Sığır-Buzağı Serumunu (FBS-FCS)	Gibco
Fosfat Tamponlu Tuzlu su (PBS) Tableti	VWR Amresco
Penisilin-Streptomisin Solüsyon	HyQ
Antibiyotik-Antimiyotik Solüsyon	Gibco
Sığır Serum Albümini (BSA)	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck (Sigma-Aldrich)
Tripan Blue Solüsyonu	Sigma
Tris Base	Sigma
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
25-75 cm ² hücre kültürü şişesi	Sarstedt, Germany
6 kuyulu hücre kültürü plakası	SPL Life Sciences
3 mL Steril yarı saydam Pastör Pipeti	IsoLab
10-25 mL Tek Kullanımlık Cam Pipet	Sarstedt, Germany
Steril Filtre (Filtropur) 0.20 M	Sarstedt, Germany
Steril 15-50 mL Falkon	İsoLab
Eppendorf	İsoLab

Tablo 3.1 (devamı)

Sitokin ve Yolak İnhibisyon Deneyleri İçin Kullanılan Malzemeler	
Transforming Growth Factor beta (TGF- β)	PeptoTech
MAP2K1 İnhibitörü (MEKI)	Cell Signaling
PI3K İnhibitörü (Wortmannin)	Cell Signaling
JNK İnhibitörü (SP600125)	Santa Cruz Biyoteknoloji
p38 MAPK İnhibitörü (PD169316)	Sigma
SMAD3 İnhibitörü (SIS3)	Santa Cruz Biyoteknoloji
NFkB İnhibitörü	Santa Cruz Biyoteknoloji
RNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler	
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma
2 X RNA yükleme boyası	Thermo scientific
GeneJET RNA Pürifikasyon Kit	Thermo scientific
Steril İnsülin Enjektörü	Bd Micro-Fine
Agaroz	Sigma, Prona
%99 Formaldehit	Sigma
2-Beta Merkaptoetanol	Merck
MOPS	Sigma
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma
NaAc	Sigma
%37'lik (12.3M) Formaldehit	Fluka
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
Etidyum bromür (Et-Br)	Fisher BioReagent
Etanol	Merck
DNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler	
Oligo dT	Thermo scientific
Deoksinükleotid(dNTP _{mix}) mix solüsyon	NEB
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo scientific

Tablo 3.1 (devamı)

DNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler	
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo scientific
RiboLock RNaz İnhibitör	Thermo scientific
Taq DNA Polimeraz (rekombinant)	Thermo scientific
10X Taq Tamponu (NH ₄) ₂ SO ₄	Thermo scientific
MgCl ₂	Thermo scientific
Agaroz	Sigma, Prona
GeneRuler 1 kb DNA belirteç	Fermantas
1 kb DNA belirteç	NEB
Jel Yükleme Boyası, Mor (6X)	NEB
6X DNA Yükleme Boyası	Thermo scientific
RealQ Plus 2X Master Mix	Ampliqon
Beyaz, 96 kuyulu plaka	LightCycler480
96 kuyulu plaka jelatini	Thermo scientific
NucleoBond® Xtra Midi Plus kit	Macharey-Nagel
Western Blot Analizi (DNA-Protein) Çalışmaları için Kullanılan Malzemeler	
4x Laemmlı Örnek Tamponu (4XLSB)	Bio-Rad
Protein Belirteci (Rainbow Marker)	Thermo scientific
PVDF Membran 0.45 µm	Millipore
Akrilamid Bis-Akrilamid (37.5:1)	Sigma
Akrilamid Bis-Akrilamid (19:1)	Sigma
Amonyum Persülfat (APS)	Fisher Scientific
%90'lık İzopropanol	Merck
2-Beta Merkaptotanol	Merck
TEMED (1,2-bis- (dimetilamino) etan)	Bio-Rad
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma
2-Beta Merkaptotanol	Sigma
TWEEN® 20	Sigma
Yağsız Süt Tozu (non-fat dry Milk)	Santa Cruz
NonO/p54 ^{nrb} Monoklonal Antikor	Thermo scientific

Tablo 3.1 (devamı)

Western Blot Analizi (DNA-Protein) Çalışmaları için Kullanılan Malzemeler	
NONO Poliklonal Antikor	İnvitrogen
Monoklonal Anti-Beta-Aktin Antikor	Sigma
beta-Actin Mouse mAb	Cell Signaling
HRP m-IgGκ BP (Beta-aktin Antikor)	Santa Cruz Biyoteknoloji
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biyoteknoloji
Pierce TM ECL	Thermo Scientific

Transkripsiyonel Etkinliğin Belirlemesi İle İlgili Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	
HEPES	Sigma
SEAP ve Lusiferaz Substratları	Takara Clontech
Ready-To-Glow TM Secreted Luciferase Reporter Assay	Takara Clontech
CaCl ₂	Sigma
Restriksiyon Endonükleaz	Thermo Scientific TM FastDigest TM

3.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Deneyisel işlemler gerçekleştirilirken çeşitli cihazlardan yararlanılmıştır. Cihazların gerekli periyodik temizlikleri yapılmıştır. Kullanılan laboratuvar cihazları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları.

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları	
Laminar Flow Kabin (Hava filtreli)	TelStar BIOII, İspanya
CO ₂ ’li İnkübatör	Nuaire, ABD
-80 ° C Derin Dondurucu	Wise Cryo
+4 ve -20 Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Su Banyosu	PolyScience
Ultrasonik su banyosu	PlusLab
Isıtıcı Blok	Major Science
Santrifüj (15 ml’lik Falkona uygun)	Nüve

Tablo 3.2 (devamı)

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları	
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Vorteks	Velp Scientifica
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Masa Tipi pH metre	Hanna
İnkübatör (Sterilizasyon için)	Memmert
Otoklav	HMC HIRAMAYA
Elektroforez Güç Kaynağı (DNA-RNA)	Thermo Scientific
Tank Blot Sistemi	Bio-Rad
PZR Thermocycler	Thermo
Light- Cyclers 480 Real-Time PCR	Roche Life Science
μ Drop™ Plate	Thermo Fisher Scientific, Multiskango
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific, Multiskango
Qubit® 2.0	Thermo Fisher Scientific, İnvitrogen
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
SDS-PAGE Araçları	Bio-Rad
UV Görüntüleme sistemi	Vılber Lourmat
Otomatik Pipet	Thermo, Eppendorf, Finnpiette
Elektronik Pipet Kontrolörü	IsoLab
Döner Hareketli (Rotating) Çalkalayıcı	Thermo Scientific
Hassas terazi	Sartorius
Mikrodalga fırın	Arçelik, Türkiye
Buz Makinası	Hoshızakı, Japonya
Ultra Saf Su Cihazı (Zeneer Power I)	Human Corporation

3.2 Metot

3.2.1 Laboratuvar Ortamının ve Malzemelerinin Sterilizasyonu

Gerekli cam malzemelerin, pipet uçlarının, çeşitli solüsyonların, çalışma sırasında giyilen önlüklerin sterilizasyonu 121°C’de 20 dakika otoklav cihazında ve devamında 80°C’lik etüvde sağlandı. Çalışma alanı ve gerekli araç gereçler Biokon A dezenfektanı ve %70’lik Etil alkol ile muameleden sonra kurularak steril edildi. Ultraviyole lamba ile bakteri, virüs, mantar ve diğer mikroorganizmaları UV ışınlarına maruz bırakarak öldüren dezenfeksiyon sistemi kullanıldı. Hücre kültürü laboratuvarında havadan kaynaklanan kirleticileri önlemek amaçlı HEPA Filtre cihazı kullanıldı. Ortam periyodik olarak virkonlu su ve Sodyum Hipoklorit ile steril edildi.

3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü ortamı çalışmada yer alan hücre soyu ve kurulacak olan deneyin özelliği dikkate alınarak laboratuvar protokollerine uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Hazırlığı

Hücre kültürü çalışmaları laboratuvar protokolleri dikkate alınarak gerçekleştirildi. Sterilizasyon, kullanılacak malzemelerin ısıya dayanıklılıkları dikkate alınarak gerçekleştirildi. Otoklav ile steril edilemeyen sıvı malzemeler için steril şırınga ucu filtreleri kullanıldı.

3.2.2.1.1 Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) Hazırlanması

PBS tablet, ambalajında yer alan kullanım şekline göre hazırlandı. Her bir tablet, 100 ml steril suda çözüldüğünde 1XPBS elde edilir. Sterilizasyonu 20 dakika 121°C’de otoklav yapılarak ve steril filtre kullanılarak sağlandı. +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2.1.2 FBS- (Fetal Sığır-Buzağı Serumu) Hazırlanması

Gibco firmasından temin edilen ana stok kullanımdan önce eritildi, sonrasında su banyosunda 55°C’de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi ve herhangi bir kontaminasyonun önlenmesi açısından 50 mL’lik steril falkonlara paylaştırıldı. -20 °C’de buzdolabında bir sonraki kullanım için saklandı.

3.2.2.2 Tripsin EDTA (T.E.) Solüsyonu Hazırlanması

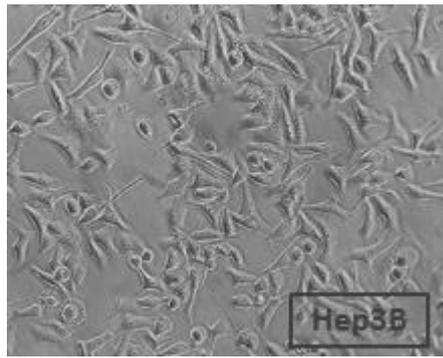
Deney çalışmasında kullanılan hücre soyunun, bulunduğu ortamın yüzeyine yapışık olması durumunda, yüzeyde toplu ve yapışık şekilde bulunduğu halden süspanse duruma getirmek için %0.25 EDTA'lı Tripsin solüsyonu kullanıldı. Öncesinde 1X PBS solüsyonu distile su ile hazırlandı. 100 ml 1X PBS solüsyonun içerisine 0.25 gr tripsin, 0.2 gr EDTA eklendi. Steril filtrelerden geçirilerek 15 mL'lik falkonlara alikot edildi. -20 °C'de buzdolabında bir sonraki kullanım için saklandı.

3.2.2.3 Hücre Besiyeri Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürü deney çalışmalarında Hep3B hücre hattı için Gibco, high glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı ve içerisinde L-glutamine bulunup bulunmama durumuna göre son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde eklendi. Sonrasında son konsantrasyonları %10 Fetal Calf Serum (FCS) ve %1 penisilin-streptomisin solüsyonu içerecek şekilde besiyeri hazır hale getirildi. Kullanılmadan önce steril filtreden geçirildi. +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hattı

ATTC'den satın alınan Hep3B insan hepatoselüler karsinom hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları sırasında elde edilen hücrenin morfolojik yapısının mikroskopik görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Hep3B, insan hepatoselüler karsinom hücre hattı (M.B: 40 x 10).

3.2.2.5 -80°C 'de Stoklanan Hücre Soyunun Başlatılması

Hücreler -80°C derin dondurucudan çıkarılır, hızlıca 37°C'ye önceden ayarlanmış su banyosunda tamamen eriyene kadar bekletilir. Eriyen hücre %10 FCS +%1 antibiyotik içeren DMEM ile karıştırılır. Karışım pipetaj yapılarak homojen hale getirilir. Sonrasında 1000 rpm'de 5 dakika hücreler santrifüj edilir. Elde edilen pellet temiz %10 FCS +%1 antibiyotik +DMEM (medyum) ile çözüldükten sonra hücre kültürü şişesine ekim yapılır ve uygun şekilde şişeler etiketlenir. %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.6 Hücre Soyunun Büyütülmesi

25 cm²'lik flaskta soyu başlatılan hücre hattı genel olarak 75 cm²'lik flasklarda son hacmi 15 mL %10 FCS +%1 antibiyotik + DMEM içerecek şekilde pasaj yapılarak büyütüldü. Her gün inverted mikroskop altında morfolojileri, doluluk oranları incelendi ve besi yeri ortamlarının rengi, bulanıklılık durumları gözlemlendi.

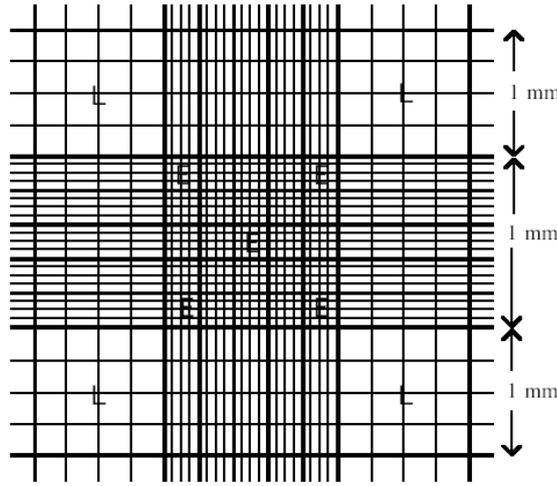
3.2.2.7 Hücrelerin Pasajlanması

Inverted mikroskop altında incelenen hücrelerin %80-90 civarında dolulukları gözlemlendiği durumda pasaj işlemi yapıldı. Flasklardaki medyum uzaklaştırıldı, pH'ı dengeleyen PBS eklendi (FCS uzaklaştırılarak tripsin aktivitesi artırıldı). Adherent hücrenin flask yüzeyinden kalkması için Tripsin-EDTA eklendi (25cm² için 1 mL ve 75 cm² için 3 mL) ve 3-4 dakika inkübatöre kaldırıldı. Tripsinizasyonu gözlemlenen hücrelere medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Pellet %10 FCS + %1 antibiyotik + DMEM ile çözüldü, flasklara ekim yapıldı. % 5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.8 Canlı Hücrelerin Tripan Mavisi Boyama İle Belirlenmesi

Deney çalışmalarında Tripan Mavi ile canlı hücreler belirlendi. Süspanse duruma getirilmiş hücrelerin toplam hacmini hesaplamak için 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0.1mm derinliği olan Thoma lamı (hemositometre lamı) (Şekil 3.2) kullanıldı. Toplam hücre pelleti temiz 10 mL medyum ile çözüldü ve 1 mL'si ependorfa alındı. Başka bir ependorfa 10 µL Tripan mavisi eklendi ve daha önceden ependorfa ayrılmış olan 1 mL süspanse haldeki hücreden 10 µL alınarak tripan mavi boyası içeren ependorfa alındı (1:1 dilusyon oranında), 3-4 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve pipetaj yapılarak 10 µL Thoma lamı düzeneğine

aktarıldı. Mikroskop altında hücreler sayıldı ve mavi boyanan hücreler (ölü hücre) bu sayıma dahil edilmedi.



Şekil 3.2: Thoma Lamı (Hemositometre Lamı).

1mL süspans hücrenin toplam sayısı aşağıdaki yöntem ile bulunur:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL} = \text{Thoma lamı sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

3.2.2.9 Hücrelerin -80°C Derin Dondurucuda Saklanması

Hücreler flaskı yeteri kadar doldurduğunda (%80-90), flask içindeki medyum uzaklaştırıldı. PBS ile hücreler yıkandı sonrasında yüzeye yapışık hücreler tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve flaska medyum eklendi süspans hale getirildi ve 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Pellet ilk olarak PBS solüsyonu ile çözüldü (medyum tamamen uzaklaştırıldı) ve tekrar santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant hiç kalmayacak şekilde otomatik pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Pellet 900 µL FCS ve 100 µL DMSO solüsyonu ile çözüldü, cryovial tüpe aktarıldı ve etiketlendi. -80°C ultra dondurucuda bir sonraki kullanım için saklandı.

3.2.2.10 Hücre Kültürü Aşamasındaki Deneylerin Tasarımı

Tez kapsamında çalışılacak hücre soyunun sorunsuz şekilde büyüdüğünden emin olundu. %80-90 doluluk oranı gözlemlendikten sonra, 3.2.2.8’de anlatıldığı gibi hücre sayımı işlemi gerçekleştirildi. Hücre sayısı hemositometre formülüne göre belirlendi.

Deney için 25 cm² 'lik son hacmi 5 mL (5000 µL) medyum içeren ve 2 000.000 hücre sayısı kapasiteli flask ya da 6 kuyucuklu son hami 2 mL(2000 µL) medyum içeren ve 500.000 hücre sayısı kapasiteli plaka kullanıldı.

Sitokin deneyi için eşit sayıda hücre, hücre kültürü kaplarına paylaştırıldı. 1 gece % 5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün medyum uzaklaştırıldı ve % 0.1 BSA'lı DMEM eklendi ve 1 saatliğine inkübatöre koyuldu. 1 saatin sonunda kontrol grubu hariç diğer flasklardaki hücrelere 20 ng/mL TGF-β sitokini uygulandı. 1, 3, 6, 24 ve 48 saatin sonunda pelletler elde edildi. İzolasyon çalışmalarına hemen başlanılmayacaksa, -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Yolak inhibisyon deneyi için eşit sayıda hücre hücre kültürü kaplarına paylaştırıldı. 1 gece %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün medyum uzaklaştırıldı ve % 0.1 BSA'lı DMEM eklendi ve 1 saatliğine inkübatöre koyuldu. 1 saatin sonunda kontrol ve TGF-β sitokin grubu hariç geri kalan flasklardaki hücrelere tez kapsamındaki inhibitörler (MEKI (10µM) (MAP2K1), wortmannin (1µM) (PI3K inh.), SP600125 (20µM) (JNK inh.), PD169316 (12.5µM) (p38 MAPK inh.), SIS3 (1µM) (SMAD3), NFκB (5µM) inhibitörü) uygulandı ve 45 dakikalığına inkübatöre kaldırıldı. 45 dakika sonunda kontrol grubu hariç diğer flasklardaki hücrelere 20 ng/mL TGF-β sitokini uygulandı. 6 saatin sonunda pelletler elde edildi. İzolasyon çalışmalarına hemen başlanılmayacaksa, -80°C ultra dondurucuda daha sonra izolasyonu yapılmak üzere saklandı.

3.2.3 RNA Eldesi Aşamasındaki Çalışmalar

RNA ile ilgili deney çalışmaları yapılmadan önce Dietil pirokarbonat (DEPC)'lı su çözeltisi hazırladı. 1000 mL steril otoklavlanmış dH₂O'dan 1 mL otomatik pipet ile çekilip atıldı ve 1 mL Dietil pirokarbonat (DEPC) eklendi (% 0.1 DEPC içeren su). 37°C sıcaklığa sahip inkübatörde 12 saat boyunca bekletildi. 12 saatin sonunda 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldı. RNA izolasyonu için hazırlanacak tampon çözeltilerin tamamı % 0.1 DEPC içeren steril dH₂O ile hazırlandı. RNaz içermeyen ortam sağlandı.

3.2.3.1 RNA İzolasyonu

İzolasyon işlemi yapılacak ortam ve kullanılan otomatik pipetler önce % 70 etil alkol içeren steril su ile daha sonra % 0.1 DEPC'li su içeren solüsyon ile temizlendi. Hep3B hücre hattı ile yapılan çalışmalardan elde edilen pelletler, Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit'te yer alan izolasyon basamakları uygulanarak hücrelere ait RNA'ların elüsyonları enjeksiyonluk su ile alındı. Verimli bir izolasyon sonucu için liziz basamağında steril insülin iğnesi kullanıldı. RNA örnekleri, -80°C ultra dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3.2 µDrop™ Plate Cihazı ile RNA Kantitatif Analizi

RNA'nın konsantrasyon ölçümü µDrop™ Plate Cihazı ile yapıldı. µDrop™ plakaya elde edilen RNA örneğinden 2 µL ve kör(blank) olarak; elüsyon alınan steril enjeksiyonluk dH₂O'dan 2 µL konuldu. Spektrofotometre cihazına yerleştirilen plakadaki RNA örneklerin konsantrasyon miktarı ve saflık belirtme için 260 nanometre ve 280 nanometre'de absorbansları alındı. RNA örneklerin konsantrasyon miktarı ve saflık tayini hesaplaması aşağıdaki formüller ile yapıldı;

$$\text{RNA Konsantrasyon miktarı} = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L},$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.3.3 Formaldehit RNA Jel Elektroforezi

RNA'nın nicel analizinden sonra nitel analizi için formaldehit RNA jel elektroforezi yapıldı. RNA çalışmalarında ortamın RNaz içermemesi için cam malzemeler % 0.1 DEPC'li dH₂O'da 12 saat boyunca bekletildi. 12 saatin sonunda 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldı. Agaroz jelin döküleceği elektroferez tankı, kaseti ve jel tarağı gibi aparatlar % 0.5 SDS çözeltisi ile muamele edildikten sonra % 0.1 DEPC içeren steril su ile durulandı. Elektroferez aparatları % 96'lık etanolden geçirildi ve kurumaya bırakıldı.

% 1'lik formaldehit agaroz jelin hazırlanması için 0.5 g agaroz, 10 X FA jel tamponu (Tablo 3.3) ile çözüldü. Steril DEPC'li su ile önceden muamele edilip 80°C etüvde kuruması sağlanmış erlen mayer şişesine aktarıldı ve üzerine 45 mL % 0.1 DEPC'li sudan eklendi. Karışım mikrodalga fırında içerisinde partiküller kaybolana kadar kaynatıldı. Sıcaklık 50°C'ye kadar düştüğünde 900 µL % 37'lik (12.3M) formaldehit kimyasalı eklendi. Hemen ardından 1 µL Etidyum bromür (Et-Br) eklendi ve erlen mayer şişesi dikkatlice çalkalandı.

Önceden hazırlanan kaset düzeneğine jel döküldü. Çeker ocakta jelin donması beklendi. FA agaroz jel donduğunda, içerisinde 1 X FA tank tamponu (Tablo 3.4) bulunan jel elektroforezi tankına yerleştirildi ve kuyucuk oluşumu için kasete yerleştirilen tarak çıkarıldı.

Elde edilen RNA örneklerinin jele yüklenmesi için öncesinde 3 µL RNA örneğinden PZR tüpüne paylaştırıldı ve üzerine 3 µL, 2 X RNA yükleme boyası eklendi. Bu karışım önceden 70 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 10 dakika bekletilerek degradasyonu sağlandı. Daha sonra 10 dakika buzda bekletildi. 6 µL olacak şekilde örnekler FA agaroz jele yüklendi. 80 voltta 30 dakika boyunca yürütüldü. Sonuç UV jel görüntüleme sistemi ile yapıldı.

Tablo 3.3: 10 X FA jel tampon çözelti.

FA Jel Tampon Çözelti	Stok Solüsyonu	Son Konsantrasyon
Etilen diamin tetra asetik asit (pH:8)	0.5 M	0.05 M
Sodyum asetat (NaAc)	1 M	0.01 M
3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (pH:7)	1 M	0.2 M
Tampon çözelti % 0.1 DEPC içeren dH ₂ O ile hazırlandı. pH:7.0'a ayarlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldıktan sonra kullanıldı.		

Tablo 3.4: 1 X FA tank tampon çözelti.

FA Tank Tampon Çözelti	Son Konsantrasyon
10 X FA Jel Tamponu	1 X
%37 'lik (12.3M) Formaldehit	0.25 M
Tampon çözelti % 0.1 DEPC içeren dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldıktan sonra kullanıldı.	

3.2.3.4 Reverse Transkriptaz Enzimi ile Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Reverse transkriptaz enzimi ile kalıp RNA'dan sentezlenen DNA elde edildi. Bu işlem iki basamakta gerçekleştirildi. Her iki basamakta Tablo 3.5'de verilmiştir. Birinci basamakta Thermo scientific OligodT solüsyonu ile mRNA'nın poly(A) kuyruğuna bağlanarak ifade olan RNA, total RNA'dan elde edilmiş oldu. İkinci basamakta Thermo scientific Reverse Transkriptaz enzimi ile tek zincirli mRNA kalıbından, tek zincirli komplementer DNA (cDNA) oluşturuldu. -20°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Tablo 3.5: Komplementer DNA (cDNA) reaksiyon bileşenleri ve basamakları.

Kullanılan Reaksiyon İçeriği ve Miktarı	Son Konsantrasyon
Oligo (dT)	1 µL
RNA kalıbı	1000 ng RNA için belirlenen X µL
dH ₂ O (Enjeksiyonluk dH ₂ O)	X
Son hacim	12.5 µL
1.Basamak: PZR cihazında 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi.	
Deoksinükleotid(dNTP)mix (10 mM)	1mM
5 X Reaksiyon Tamponu (1 mL)	1 X
RiboLock RNaz İnhibitörü (40 U/ µL)	20 U/ µL
RevertAid Reverse Transkriptaz (200 U/ µL)	10 U/ µL
Toplam hacim	20 µL
2.Basamak: PZR cihazında 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 10 dakika işleme tâbi tutuldu.	

3.2.3.5 cDNA Kontrolü için PZR ve sqRT-PZR

Deney çalışmasının bu basamağında kontrol geni olan H β -2 gen primerleri kullanılarak elde edilen komplementer DNA'nın varlığı ve verimliliği kontrol edildi. Tablo 3.6'de H β -2 primerleri ile kurulan PZR reaksiyonu ve Tablo 3.7'da PZR döngü şartları gösterilmiştir. PZR işleminin gerçekleşme durumu pozitif (daha önceden çalıştığı belirlenmiş cDNA) ve negatif (Enjeksiyonlu dH₂O ile kontaminasyon durumu) kontrol ile sağlandı.

Tablo 3.6: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).

Hβ-2 PZR Solüsyon	Örnek	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
cDNA kalıbı	1 μ L	1 μ L	-
10XTaqTampon ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (1.25mL)	5 μ L	5 μ L	5 μ L
dNTPmix (10 mM)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
MgCl₂ (25 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L
Geri Hβ-2 Primeri	1 μ L	1 μ L	1 μ L
İleri Hβ-2 Primeri	1 μ L	1 μ L	1 μ L
dH₂O	36.5 μ L	36.5 μ L	37.5 μ L
Taq DNA Polimeraz (rekombinant) (5U/μL)	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
Son Hacim	50 μ L	50 μ L	50 μ L

Komplamenter DNA(cDNA)'nın varlığı ve verimliliği kontrol edildikten sonra spesifik p54nrb/NONO ve H β -2 ekspresyon primerleri ile sqRT-PZR kuruldu. Tablo 3.8'da p54nrb/NONO PZR döngü şartları gösterilmiştir. PZR örnekleri agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra UV görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen jel görüntüsündeki DNA bantları densitometrik olarak analiz edildi.

Tablo 3.7: H β -2 PZR döngü şartları.

H β -2 PZR	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	
Bağlanma	55 °C	1 dakika	22
Uzama	72 °C	2 dakika	
Final Uzama	72 °C	10 dakika	1
Son Bekletme	4 °C	-	-

Tablo 3.8: p54nrb/NONO PZR döngü şartları.

p54nrb/NONO PZR	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	
Bağlanma	55 °C	1 dakika	30
Uzama	72 °C	2 dakika	
Final Uzama	72 °C	10 dakika	1
Son Bekletme	4 °C	10 dakika	1

3.2.3.6 Kantitatif Real-Time PZR (qRT-PZR)

Gen ekspresyon analizinin kantitatif olarak değerlendirilmesi LightCycler® 480 Sistemi (Roche Life Science) kullanılarak sağlandı. H β -2 primerleri mRNA ekspresyonunun hassas karşılaştırmaları için kullanıldı. p54nrb/NONO ve H β -2 komplementer DNA ile deneysel hatayı ortadan kaldırmak için üç tekrarlı şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plakanın tek bir kuyucuğuna yüklenen son hacim 12.5 μ L'dir. Real Time PZR reaksiyon bileşenleri Tablo 3.9'de, reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken döngü protokolü Tablo 3.10'de, kullanılan ekspresyon primerleri Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.9: Real-Time PZR bileşenleri.

LightCycler® 480 RT-PZR Bileşenleri	Hacim	Son Kons.
RealQ Plus 2X Master Mix	6,25 µL	1X
İleri Primer (10 pmol) (NonO) (Hβ-2)	0.5 µL	0.1 µM
Geri Primer (10 pmol) (NonO) (Hβ-2)	0.5 µL	0.1 µM
Steril dH₂O (Enjeksiyonluk su)	4.25 µL	-
Kalıp DNA	1 µL	20 ng (1-100 ng)

Tablo 3.10: RT-PZR döngü değerleri.

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95 °C	15.01 saniye	1
Amplifikasyon	95-55-72 °C	30-30-30 saniye	40
Erime eğrisi	95-65-97 °C	5 s -1 dk –Sürekli	1
Soğutma	40 °C	30 saniye	1

Tablo 3.11: Tez kapsamında kullanılan ekspresyon primerleri.

Tez kapsamında kullanılan ekspresyon primerleri	
NonO/p54^{nrb} İleri P.	5'-AACGAGAGCAGCCACCCAGA-3'
NonO/p54^{nrb} Geri P.	3'-CTGTCTCATTAGCATGACCT-5'
Hβ-2 İleri Primeri	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
Hβ-2 Geri Primeri	3'-CATGTCTCCATCCCACTTAACT-5'

3.2.3.7 Kantitatif RT-PZR'ın Sonuç Çözümlemesi

Nicel bir gen ekspresyon deneyi olan RT- PZR cihazlarından sağlanan CT (eşik döngüsü) değerleri, Microsoft Excel elektronik tablo programına aktarıldı (Livak metodu) [180]. p54nrb/NONO gen ekspresyon seviyesinin analizi, aynı başlangıç koşullarını sağlamak için H β -2 internal kontrol geni ve standart malzeme olan kontrol grubu ekspresyon seviyeleri kullanılarak sağlandı ve üç tekrarlı çalışıldı. p54nrb/NONO Ct sayısal değerleri, H β -2 internal kontrol genin Ct sayısal ortalamasından çıkarıldı. Değerin 2 tabanındaki kuvveti ve bu kuvvet değerlerinin ortalaması alındı. Standart malzeme olan kontrol grubu değerleri kendisine bölünerek '1' birim olarak kabul edildi. Deney grubu değerleri, kontrol grubu değerine bölündü ve 1'in katı şeklinde neticeler elde edildi. Sayısal analizler MiniTab (One Way ANOVA) ile çözümlendi. $p \leq 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.4 DNA ile ilgili Metodları

3.2.4.1 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Komplementer DNA'nın kontrolü için H β -2 primerleri ile kurulan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) örnekleri agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra UV görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Jel elektroforezi için ilk olarak 5 X TBE (Tris-Borate-EDTA) tampon çözeltisi (Tablo 3.11) hazırlandı. 5 X TBE tampon çözelti 0.5 X TBE'ye seyreltilerek kullanıldı. %1'lik agaroz jel için 0.75 g agaroz, 75 mL 0.5 X TBE (Tablo 3.12) tampon çözeltisi ile çözüldükte sonra mikrodalga fırında partikülleri kaybolana kadar kaynatıldı. Erlen mayer şişesi içerisindeki karışım çeker ocakta 50 °C'ye düştükten sonra içerisine 3 μ L Etidyum bromür (Et-Br) (Fisher BioReagent) eklendi. Önceden ayarlanmış jel elektroforez kasetine tarak yerleştirildikten sonra jel döküldü. Agaroz jel donduktan sonra içerisinde 0.5 X TBE tampon çözeltisi bulunan tanka yerleştirildi. Jel Elektroforezi sistemi hazırlandıktan sonra H β -2 PZR örnekleri 6 X DNA yükleme boyası ile belirlenen oranda boyandı. Boyanan örnekler otomatik pipet yardımı ile kuyucuklara yüklendi. DNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, jele yüklenen 1 kb DNA belirteç ile belirlendi. 90 voltda 45 dakika yürütülerek, UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Tablo 3.12: Agaroz jel elektroforezi deney kimyasalları.

Agaroz jel elektroforezi deney kimyasalları	
5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	54g Tris Base (Sigma), 27.5g Borik asit (Sigma), 20 mL 0.5M'lık EDTA (pH:8) tartıldı. 1 L steril dH ₂ O ile manyetik karıştırıcıda çözüldü. pH'ı 8.0'e ayarlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldı.
0.5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	1 L 0.5X TBE için 100 mL 5X TBE, mezürle ölçüldü ve üzeri 900 mL steril dH ₂ O ile tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldı.
1 kb DNA Belirteç (NEB)	1 µL belirteç, 1 µL 6X yükleme boyası, 4 µL enjeksiyonluk dH ₂ O ependorf içerisinde karıştırıldı. -20°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.4.1 Restriksiyon Endonükleaz Kesim

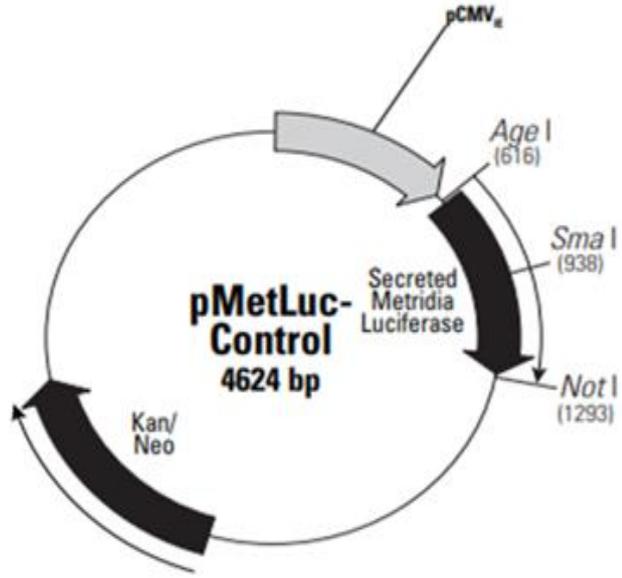
Restriksiyon endonükleaz enzim ile gerçekleştirilen kesim işleminde son hacim 40 µL olacak şekilde; 1000 ng DNA'nın uygun endonükleaz ile kesimi için 1 ünite enzim ve 1X konsantrasyonda tampon kullanıldı. Thermo Scientific™ firmasına ait FastDigest™ restriksiyon kesim ürünleri kullanıldı.

3.2.4.2 Büyük Ölçekli Plazmid DNA İzolasyonu

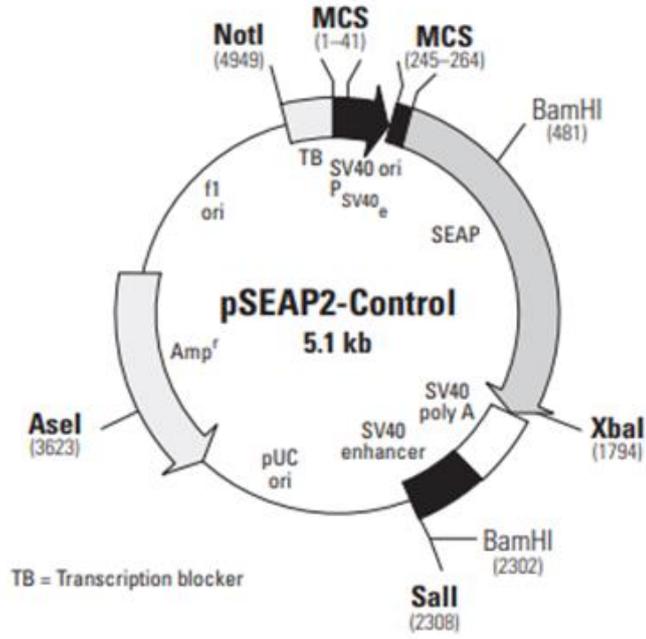
p54nrb/NONOgenine ait 4 farklı promotor parçası P1 (-730/+529), P2(-516/+529), P3 (-336/+529), P4 (-159/+529)'ün transfeksiyon etkinliğini genel olarak belirlenmesi için pozitif kontrol olarak pMetLuc Kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 3.3). Transfeksiyonel çalışmalarının normalizasyonu için pSEAP2 kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 3.4). P54nrb/NONOgenine ait 4 farklı promotor parçasının bazal aktivitelerinin belirlenmesi için pMetLuc Reporter vektörü kullanıldı (Şekil 3.5).

pMetLuc Kontrol, pMetLuc Reporter ve SEAP kontrol vektörlerinin gliserol stokları -80°C'den çıkarıldı ve buz üzerinde erimesi beklendi. İlgili antibiyotiği barındıran; sırasıyla

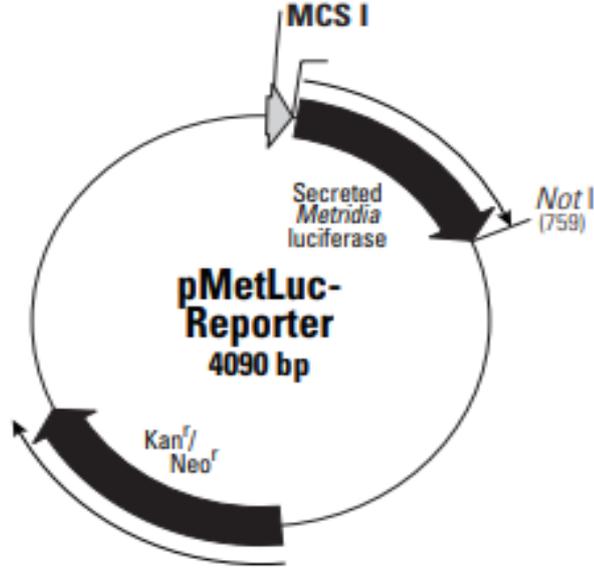
pMetLuc Kontrol ve pMetLuc Reporter vektörü için kanamisin, SEAP kontrol vektörü için ampisilin içeren LB agarlara örneklerden 100 µL alınarak ekim yapıldı ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. Ertesi sabah tek koloniler gözlemlendi ve petriler +4°C'de muhafaza edildi. Daha sonra ilgili antibiyotiği barındıran 5 mL LB Broth'a tek kolonilerden steril öze yardımı ile ekim gerçekleştirildi. 37°C sıcaklığa sahip çalkalamalı inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün ön kültürlerden yeterli miktarda gliserol stok yapılarak -80°C'de muhafaza edildi ve ön kültürlerin bir kısmı yine ilgili antibiyotiği içeren 100 mL LB Broth'a alınarak Erlenmayer şişelerinde büyük hacme geçildi. 37°C sıcaklığa sahip çalkalamalı inkübatöre kaldırıldı. Bir sonraki gün Macharey-Nagel marka NucleoBond® Xtra Plus kit kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.2 'de ifade edildiği şekilde bu sefer DNA konsantrasyonunu saptamak için µDrop™ Plate cihazı ile 260 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Kullanılacak plazmid miktarı ''DNA Konsantrasyon miktarı = (A₂₆₀ x sulandırma katsayısı x 50 ng/µl) '' formülü ile hesaplandı.



Şekil 3.4: pMetLuc Kontrol vektörü haritası.



Şekil 3.3: pSEAP2-Kontrol vektörü haritası.



Şekil 3.5: pMetLuc Reporter vektörü haritası.

3.2.5 Western Blot Protein Analizi Deney Basamakları

Western blot laboratuvar tekniği, hücrelerden ekstrakte edilen birçok proteinden, ayırt edilmek istenen spesifik proteini ayırmak ve tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. Teknik, bu görevi yerine getirmek için üç element kullanır: (1) büyüklüğüne göre ayırma, (2) katı bir desteğe aktarma ve (3) hedef proteini görselleştirmek için uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanarak işaretleme [181].

3.2.5.1 RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) Lizis ve Ekstraksiyon

Hücre kültürü deney çalışmalarında elde edilen pelletler zorunda kalınmadığı sürece -80°C derin dondurucuya kaldırılmadan direkt protein molekülünü elde etmek için RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu ile çözüldü. RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponunun hazırlanışı Tablo 3.13’de verilmiştir. Protein izolasyonu, hücre pelletlerinde kalan medyumunu uzaklaştırmak için 500 µL PBS ile çözülmesiyle başladı ve 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Medyumdan arınan hücrelerin üzerine 250 µL RIPA tamponu eklendi ve çözüldü (Akışkanlık durumu gözlemlendi). Daha sonra ultrasonik su banyosunda (buz ile soğutulmuş) 2.30 saniye (%50 güç) lizise devam edildi. RIPA tamponu ile çözülen pelletler 15 dakika buzda çalkalanarak bekletildi. 15 dakikanın sonunda 14.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice buzda bekletilmiş, yeniden etiketleme yapılmış steril

ependorflara alındı. Protein izolasyonu işleminin her aşamasının buz üzerinde olmasına dikkat edildi.

Tablo 3.13: RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu malzemeleri.

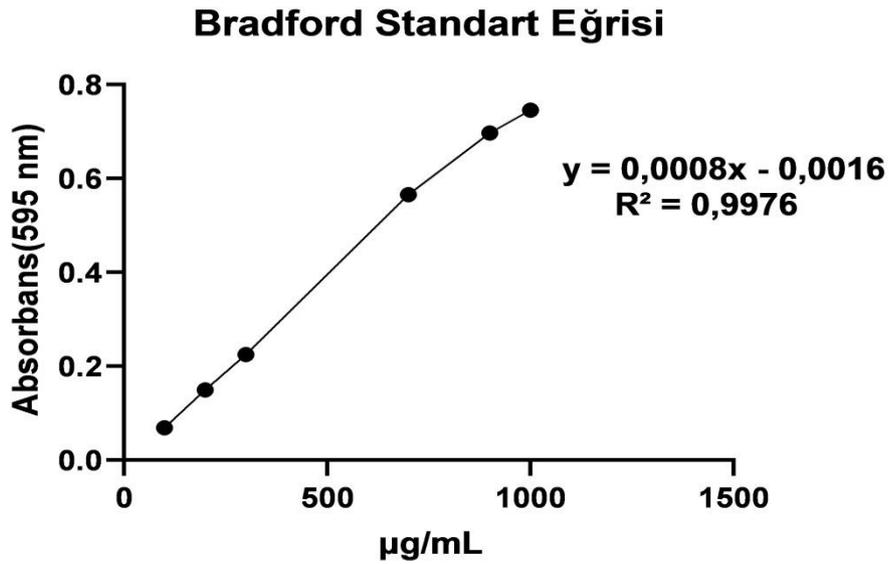
Son Konsantrasyon
1mM EGTA (Etilen glikol tetraasetik asit) (500 µL)
140 mM NaCl (7 mL)
10 mM Tris Cl pH:8 (Trizma® base) (500 µL)
% 1 Triton x100 (500 µL)
%0.1 SDS (Sodyum dodesil sülfat) (10 mL)
%0.1 Sodyum deoksikolat (0.05 gram)
1mM EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) (100 µL)
+ Proteaz inhibitörü (2 tablet)

Tampon çözelti hazırlandıktan sonra 15 mL'lik steril falkonlara paylaştırıldı. -20°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.5.2 Qubit® 2.0 Fluorometer ve Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Çözümlemesi

Tez kapsamında, ilk protein konsantrasyon ölçümü aşamasında Qubit® 2.0 Florometre cihazı ve Qubit Protein Assay Kit'i kullanıldı. Miktar tayini yapılacak ürün sayısı kadar steril PZR tüpünün içerisine 199 µL Qubit® Protein Tamponu ve 1 µL Qubit® Protein Reaktifi eklendi. Vorteks işlemi ile karıştırıldı. Karışım içerisinden 1 µL çekilip atıldı. 1 µL izole edilen protein örneğinden konuldu. Vorteks edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Qubit® 2.0 Florometre cihazında protein analizi bölümü seçildi. Ölçüm cihazında 'µg/mL' cinsinden sonuç alındı. Bu rakam (A) sulandırma katsayısı ($A \times 200 = B$) ile çarpıldıktan sonra çıkan sonuç (B) her örneğin 50.000 µg/mL kadar protein içermesi için bu sayı ile bölündü ($50.000 \mu\text{g/mL} / B = C \mu\text{L}$). Elde edilen değer miktarında protein örneği yüklemesi yapıldı. Örnekler -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Tez kapsamında, ikinci protein

konsantrasyon ölçümü aşamasında Bradford protein yöntemi kullanıldı. Yöntemde kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.14’de verilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için ‘Bradford standart eğrisi’ grafiği baz alınarak Bradford konsantrasyon ölçümü denklemi oluşturuldu. Stok çözelti (BSA), steril dH₂O ve reaktif (boya) kullanılarak kalibrasyon örnekleri hazırlandıktan sonra 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 250 µL eklendi ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüm yapıldı. Değerler ile Bradford standart eğrisi oluşturuldu. Grafik sonucunda bulunan denkleme göre hesaplama yapıldı. 1µL’deki protein konsantrasyonu miligram cinsinden bulundu. Ölçüm sonucu kadar protein yüklemesi yapıldı. Örnekler -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Tez kapsamında kullanılan Bradford Standart Eğrisi Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.6: Bradford standart eğrisi.

Tablo 3.14: Bradford yöntemi kimyasal malzemeler.

Reaktifin hazırlanması (1L ürün eldesi için)	Standart eğri için Stok BSA çözeltisi hazırlanması (1L ürün eldesi için)
100 mL % 95'lik Fosforik asit	0.1g BSA (Sığır serum albümini)
50 mL % 95'lik Etanol	
0.1g Coomassie Brilliant Blue	100 mL steril dH ₂ O ile çözülür. +4°C'de buzdolabında muhafaza edilir.
Kimyasal malzemeler steril dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi.	

3.2.5.3 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Deney çalışmalarına stok solüsyonların hazırlanması ve SDS-PAGE jel dökme aparatlarının sterilizasyonu ile başlandı. SDS-PAGE jel dökme aparatlarından cam plakalar, jel tarakları, cam sıkıştırma mandalları, elektrofrez tankı; ilk önce %70'lik etil alkol solüsyonuyla muamele edildi. Daha sonra steril saf su ile durulandı ve kağıt havlu ile kurulandı. Aparatlar uygun şekilde monte edildi ve jel dökmeye hazır hale getirildi. İlk önce yığıma jeli hazırlandı ve cam plakaların arasına belli miktarda otomatik pipet yardımıyla enjekte edildi. SDS poliakrilamid jelin düzlenmesi için %90'luk izopropanol veya steril dH₂O kullanıldı. Jel polimerleştikten sonra jeli düzlemek için konulan maddeler kurutma kağıdı (filtre kağıdı) ile uzaklaştırıldı. İkinci olarak ayırma jeli döküldü ve hızlıca uygun mm'deki kuyucuk oluşturacak jel tarağı cam plakaların arasına yerleştirildi. Jel 1X Yürütme tamponu içerisinde, +4°C buzdolabında muhafaza edildi. Tablo 3.15'de SDS-PAGE jel malzemeleri verilmiştir.

Konsantrasyonu ölçülen, hepsi 50.000 µg/mL protein içerecek şekilde hesaplanan protein örneklerinden gereken miktar, buzda bekletilmiş yeni ependorfa aktarıldı. Bu protein örneğinin üzerine 5 µL, 4X Laemmli protein örneği tamponu (4XLSB) ve 2-Beta merkaptto etanol karışımından eklendi. Daha sonra son hacmi 30 µL'ye tamamlayacak şekilde upper tampon solüsyonu eklendi. Bu karışımlar denatürasyon işlemi için 95°C sıcak su banyosunda

5 dakika bekletildi. Öncesinde elektroforez tankının içerisine, SDS poliakrilamid jeller tank aparatına sabitlenip konuldu. İlk kuyuya 5 µL protein belirteci (Rainbow Marker) yüklendikten sonra 25-30 µL protein örnekleri yüklendi. Elektroforez tankında ilk önce cam plakalar arasına, örnekler yüklendikten sonra tankın dış kısmına, içerisinde % 0.1 oranında SDS içeren 1X yürütme tamponu eklendi. 90 V akımda protein belirteci belirgin şekilde açılana kadar (~2-2.5 saat) yürütüldü. Tablo 3.16'da SDS-PAGE işlemi aşamasında kullanılan kimyasal malzemeler verilmiştir.

Tablo 3.15: SDS-PAGE jel malzemeleri.

(2 jel için)	Yığıma Jeli	%10'luk Ayırma Jeli
Tampon	1.25 mL (Üst Tamponu)	2.5 mL (Alt Tamponu)
Akrilamid-Bisakrilamid (37,5:1)/ (19:1)	0.625 mL	2.5 mL
ddH₂O	3.07 mL	5 mL
%10 APS	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Tablo 3.16: SDS-PAGE işlemi aşamasında kullanılan kimyasal malzemeler.

Kullanılan Solüsyon	İçeriğın Hazırlanması
Üst tamponu	6.6 g Tris, 0.4 g SDS hassas terazide tartıldı. pH:6.8'e ayarlanarak ultra steril dH ₂ O ile 0,1 L'ye tamamlandı. +4°C buzdolabında muhafaza edildi.
Alt tamponu	19.8 g Tris, 0.4 g SDS hassas terazide tartıldı. pH:8.8'e ayarlanarak ultra steril dH ₂ O ile 0.1 L'ye tamamlandı. +4°C buzdolabında muhafaza edildi.
Yükleme boyası	900 µL 4XLSB için 100 µL 2-Beta Merkaptolanol Kullanıldı. Miktar örnek sayısına göre ayarlandı.

Tablo 3.16 (devamı)

Kullanılan Solüsyon	İçeriğın Hazırlanması
Coomassie Brillant Mavi R-250 Boya (Poliakrilamid Jel boyama çözeltisi)	0.25 g Coomassie Brillant Blue 250, 0.1L %95'lik Etanol, % 10 Asetik Asit karışımı hazırlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.
10X Yürütme tamponu	30.3 g Tris, 144.4 g Glisin tartıldı. pH:8.3'e ayarlanarak ultra steril dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. +4°C buzdolabında muhafaza edildi.
1X Yürütme tamponu	100 mL 10X yürütme tamponu, 900 mL ultra steril dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. İçerisine 10 mL %10'luk SDS çözeltisinden eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.
%10 SDS çözeltisi	10 g SDS hassas terazide tartıldı. Üzerine 100 mL ultra steril dH ₂ O eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.
Transfer tamponu	100 mL 10X yürütme tamponu ile 200 mL metanol; ultra steril dH ₂ O ile 1L'ye tamamlandı. İçerisine 500 µL %10 SDS solüsyonu eklendi. -20°C buzdolabında soğutuldu. (Taze hazırlanır.)
10X TBS tampon solüsyonu	24.22 g Tris, 87.6 g NaCl hassas terazide tartıldı. pH:7.5'e ayarlanarak ultra steril dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlandı. +4°C buzdolabında muhafaza edildi.
1X TBS-(%0,1) Tween20 tampon solüsyonu	100 mL10XTBS tamponu, 900 mL ultra steril dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. İçerisine 1 mL tween20 maddesi eklendi. +4°C buzdolabında en fazla bir hafta muhafaza edildi.
Bloklama tampon solüsyonu	20 mL 1XTBS-tween20 solüsyonuna 1 g yağsız süt tozu eklendi. +4°C buzdolabında en fazla bir hafta muhafaza edildi.

3.2.5.4 PVDF Western Blot Membranına Proteinlerin Transferi

Western blot işleminde, SDS-poliakrilamid jelde yürütülen protein örneklerinin difüze olmaması için hızlı şekilde PVDF (poliviniliden diflorür) membrana transfer işlemine devam edildi. Yürütme işlemi devam ederken transfer tamponu (Tablo 3.16) taze şekilde hazırlandı ve soğuması için buzdolabına konuldu. Transfer işleminde kullanılacak PVDF membranlar (8.5x5.2 cm) jele uygun ebatlarda kesilip, kullanıma hazır hale getirildi. Sandviç hazırlamada kullanılacak olan Thermo Scientific™ Pierce™ western kurutma filtresi kağıtları ve transfer süngerleri soğuk transfer tamponu içerisinde bekletildi. 1X yürütme tamponunda yürütülesi biten cam plakalar arasındaki SDS-poliakrilamid jeller soğuk transfer tamponunun içerisinde en az 5 dakika bekletildi. Protein örneklerinin, Poliviniliden florür (PVDF) membrana adsorbe olma şansını en üst düzeye çıkarmak için, 1 dakika boyunca soğuk metanolde transferden önce membranlar ıslatıldı. Daha sonra en az 5 dakika soğuk transfer tamponunda bekletildi. Cam plakalar arasındaki soğuk transfer tamponunda bekletilen jeller dikkatli bir şekilde cam plakalardan ayrıldı. Sırasıyla sünger, 1 adet kurutma filtresi kağıdı, PVDF membran (aktif yüzey üstte), SDS-poliakrilamid jel, 1 adet kurutma filtresi kağıdı ve en son sünger transfer kasetinin içerisine yerleştirilerek transfer sandviç sistemi oluşturuldu. Sandviç transfer tankına yerleştirildi ve içerisine soğuk transfer tamponundan 1000 mL kadar eklendi. +4°C’de (buzdolabında) 15 V akımda 1 gece boyunca transfere bırakıldı.

3.2.5.5 PVDF Membran Bloklama ve Antikorlama İşlemi

Transfer işlemi tamamlanmış PVDF membranlar steril pens yardımı ile sandviçten ayrıldı. 50 mL’lik steril falkon içerisine PVDF membran yerleştirildi. Üzerine 5-10 mL 1XTBS-Tween20 solüsyonu (Tablo 3.20) eklendi ve 5 dakika döner hareketli çalkalayıcıda yıkandı. Bu işlem yapılırken; jelde yürütülen protein örneklerinin PVDF membrana transferi ve yürütme işleminin kontrolü için SDS-poliakrilamid jel, 5 dakika Coomassie Brilliant Mavi R-250 boyası ile boyandı ve 5 dakika sonunda Coomassie Brilliant Mavi R-250 boyası tamamen arıtılana kadar su ile jel yıkandı ve işlemin gidişatı kontrol edildi. 1XTBS-Tween20 solüsyonu ile yıkanması biten PVDF membran, daha sonra antikorların spesifik olmayan bir şekilde membrana bağlanmasını önlemek için 1-1.5 saat arasında 20 mL bloklama tampon solüsyonu (Tablo 3.20) ile döner hareketli çalkalayıcıda çalkalandı. Bu işlemin ardından üç kere 5’er dakika 1XTBS-Tween20 ile membran yıkandı. PVDF membran, tez kapsamında ilgilenilen proteinin seçici olarak tespit edilmesi için ilk olarak, 1/1000 oranında P54nrb/NONObirincil antikoru ile +4°C’de 1 gece inkübe edildi ve işlem

sonunda üç kere 5'er dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı. İkinci olarak membran, 1/5000 oranında hazırlanan floresan etiketli sekonder antikör ile 1-1.5 saat inkübe edildi ve ardından üç kere 5'er dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı.

Western blot sonuçlarını analiz edebilmek için membran 1/1000 oranında Beta-aktin birincil antikörü (normalizatör olarak) ile +4°C'de 1 gece inkübe edildi ve işlem sonunda üç kere 5'er dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı. Daha sonra 1/5000 oranda hazırlanan sekonder antikör ile 1-1.5 saat inkübe edildi ve ardından üç kere 5'er dakika 1XTBS-Tween20 ile yıkandı.

3.2.5.6 UVP Western Blot PVDF Membran Görüntüleme Sistemi

Spesifik antikörler ile inkübe edilen protein örneklerinin transfer edildiği PVDF membranlar, yabanturpu peroksidaz (HRP) substratı olan ECL (gelişmiş kemilüminesans) solüsyonu ile 1 dakika karanlık ortamda bekletildi. UVP BioSpectrum görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.2.5.7 ImageJ ile Western Blot Kantitatif Analizi

PVDF membranda elde edilen protein bantlarının göreceli (kesin değer yok) analizi ImageJ görüntüleme programı ile dansitometrik olarak değerlendirildi. Sayısal değerlendirme; deney grubunun, standart deney malzemesi kontrol grubu ve β -Aktin proteini ile karşılaştırılması ile sağlandı (normolizasyon). Sayısal analizler MiniTab (One Way ANOVA) ile gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.6 Transkripsiyonel Etkinliğin Belirlenmesi İle İlgili Çalışmalar

3.2.6.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu (Çöktürme) ile Geçici Transfeksiyon

Tez kapsamındaki Hep3B hücreleri 3.2.2'de ifade edildiği gibi deney çalışmalarına uygun şekilde büyütüldü ve deney kurmak için yeterli doluluk oranına ulaşıldı. İlk gün gerçekleştirilecek transfeksiyon aşaması için 12 kuyulu plakanın 6 adet kuyusunun her birine 250.000 hücre (pMetLuc Kontrol vektör, pMetLuc Reporter vektör ve pSEAP2 kontrol vektör için) ve 4 adet 25 cm²'lik flask başına 2.000.000 hücre (promotor parçası grubu için) düşecek şekilde paylaştırıldı. Bir gece %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün 12 kuyulu plaka için son hacim 45 µL ve 25 cm²'lik flask için 315 µL olacak şekilde 2 M CaCl₂ solüsyonu Hep3B hücrelerine transfekte edilecek DNA (p54nrb/NONO promotor parçaları) ile karıştırıldı. Bu karışıma sırasıyla 45 µL ve 315 µL, 2X HEPES solüsyonundan pastör pipet ile baloncuk oluşturarak damla damla eklendi. Bu karışım hiç hareket ettirilmeden 1 saat boyunca beklendi ve çökelti oluşumu incelendi. Bu karışım plaka ve flaska damla damla eklendi. 24 saatliğine %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı.

Üçüncü gün flaskta bulunan hücreler ile tekrar deney kurularak 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 200 µL hacimde 30.000 hücre paylaştırıldı ve %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. Beşinci gün hücrelerin DMEM'leri atılarak; her bir kuyu PBS ile yıkanarak, 200'er µL % 0.1 BSA'lı DMEM eklendi ve 1 saat inkübatöre kaldırıldı. Bir saat sonunda tez kapsamındaki hücre içi sinyal yolak inhibitörleri belirlenen hacimde uygulanıp; 45 dakika inkübatöre kaldırıldı. 45 dakika sonunda kuyu başına 20 ng/mL olacak şekilde TGF-β sitokini uygulandı ve 6 saat %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre kaldırıldı. 6 saatin sonunda kuyulardaki medyumlardan 100 µL örnek çekildi ve etiketli ependorflara aktarıldı. -20°C'de muhafaza edildi. SEAP ve Lusiferaz etkinliği luminometre cihazı ile ölçüldü.

Tablo 3.17: Kalsiyum Fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon için kullanılan solüsyonlar.

Kullanılan Solüsyon	İçeriğın Hazırlanması
2 M CaCl₂	14.7 g CaCl ₂ tartıldı ve 50 mL'ye distile dH ₂ O ile tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav yapıldı ve filtre edildi. +4°C'de muhafaza edildi.
2X HEPES	1.6 g NaCl, 0.04 g Na ₂ HPO ₄ , 1.3 g HEPES, 100 mL distile dH ₂ O ile tamamlandı. pH 7.05 – 7.12 olmalıdır. Otoklav yapıldı ve filtre edildi. -20°C'de saklandı.

3.2.6.2 Salnan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

-20°C’de muhafaza edilen örneklerin Lusiferaz etkinliğinin luminometre cihazı ile ölçülmesi için ilk olarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Bu sırada Takara Clontech marka 10X Lusiferaz Substratı 1X olacak şekilde sulandırıldı. Hücre kültüründe elde edilen transfeksiyon medyumlarından 9 µL çekilerek 384 kuyulu plakanın her bir kuyucuğuna paylaştırıldı ve üzerine 1 µL 1X Substrat/Reaksiyon tamponu eklendi. Plaka luminometre cihazına yerleştirildi ve ölçüm alındı. Bu işlemler hızlı bir şekilde gerçekleştirildi.

3.2.6.3 SEAP (Salnan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü

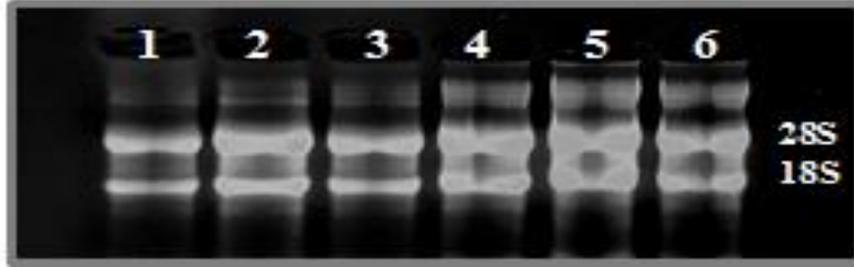
SEAP aktivitesinin luminometre cihazı ile ölçülmesi için ilk olarak buz üzerinde erimesi sağlandı. İlk olarak hücre kültüründe elde edilen transfeksiyon medyumlarından 5 µL çekilerek 384 kuyulu plakanın her bir kuyucuğuna paylaştırıldı ve üzerine 15 µL Takara Clontech marka 1X Dilüsyon tamponundan eklendi. 384 kuyucuklu plaka alüminyum folya ile hiçbir yeri açık kalmayacak şekilde sarıldı. Plaka, 65°C’ye getirilmiş su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra 2-3 dakikalığına buz üzerine konularak oda sıcaklığına getirildi. Oda ısısındaki SEAP substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 20µL eklendi ve yine oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra Plaka luminometre cihazına yerleştirildi ve ölçüm alındı. Bu işlemler hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sayısal veriler Excel Programında değerlendirildi. Sayısal analizler MiniTab (One Way ANOVA) ile gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 TGF- β Sitokininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisi

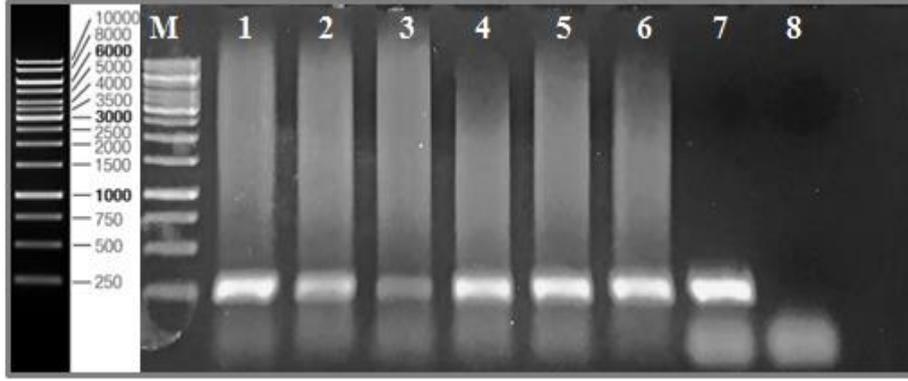
4.1.1 TGF- β Sitokininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

TGF- β sitokininin p54nrb/NONO geni üzerindeki etkisinin mRNA seviyesinde belirlenmesi için yapılan çalışmalarda öncelikli olarak Bölüm 3.2.2.6 'da ifade edildiği şekilde Hep3B insan hepatoselüler karsinom hücre hattı büyütüldü. Sonrasında Bölüm 3.2.2.10'da ifade edildiği şekilde tez kapsamında planlandığı gibi deney kuruldu ve kontrol, 1, 3, 6, 24 ve 48. saat hücre pelletleri alındı. Bölüm 3.2.3.1'de ifade edildiği şekilde elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA'ların kalitesinin kontrolü Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı gibi RNA jel elektroforezi ile belirlendi (Şekil 4.1). RNA'nın deneysel çalışmaların devamında kullanılabilmesi için kalitesi kontrol edildikten sonra 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde miktar tayini yapıldı. Daha sonra 3.2.3.4'de ifade edildiği şekilde komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar referans (normalizatör) gen olan H β -2 gen primerleri kullanılarak 3.2.3.5'de ifade edildiği şekilde kontrol PZR'ı kuruldu ve elde edilen PZR örnekleri 3.2.4.1'de ifade edildiği şekilde DNA agaroz jel elektroforezi yapıldı ve UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi (Şekil 4.2). Kontrol PZR'ın amacı elde edilen cDNA'nın kullanılabilirliğinin belirlenmesidir.



Şekil 4.1: TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattı pelletlerinden elde edilen RNA örneklerinin RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

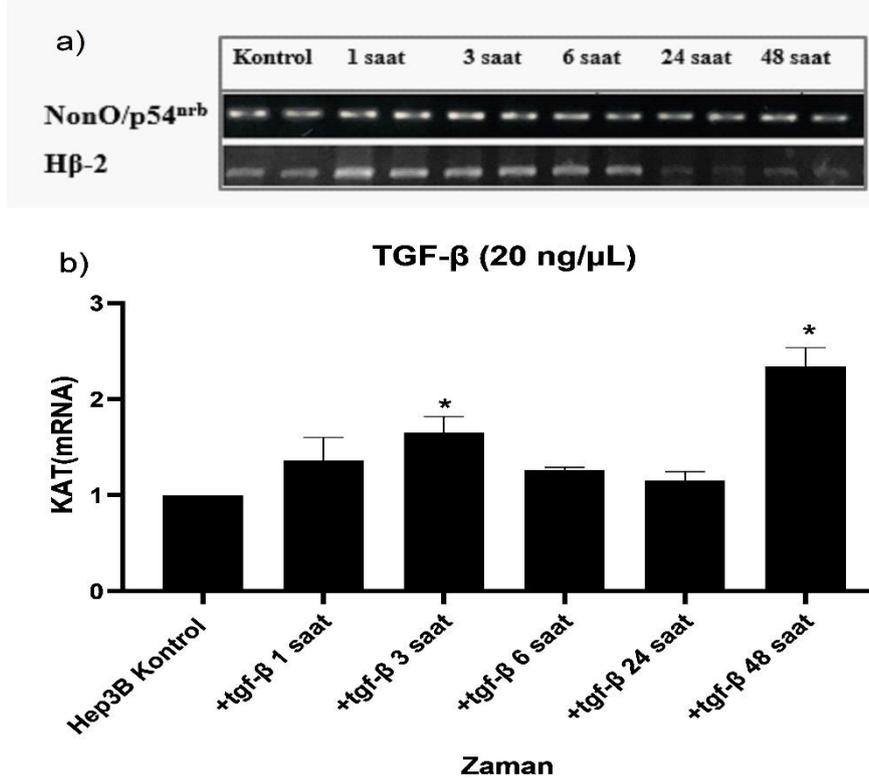
1:Kontrol grubu **2:** 1. saat grubu **3:** 3. saat grubu **4:** 6. saat grubu **5:** 24. saat grubu **6:** 48. saat grubu



Şekil 4.2: cDNA kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

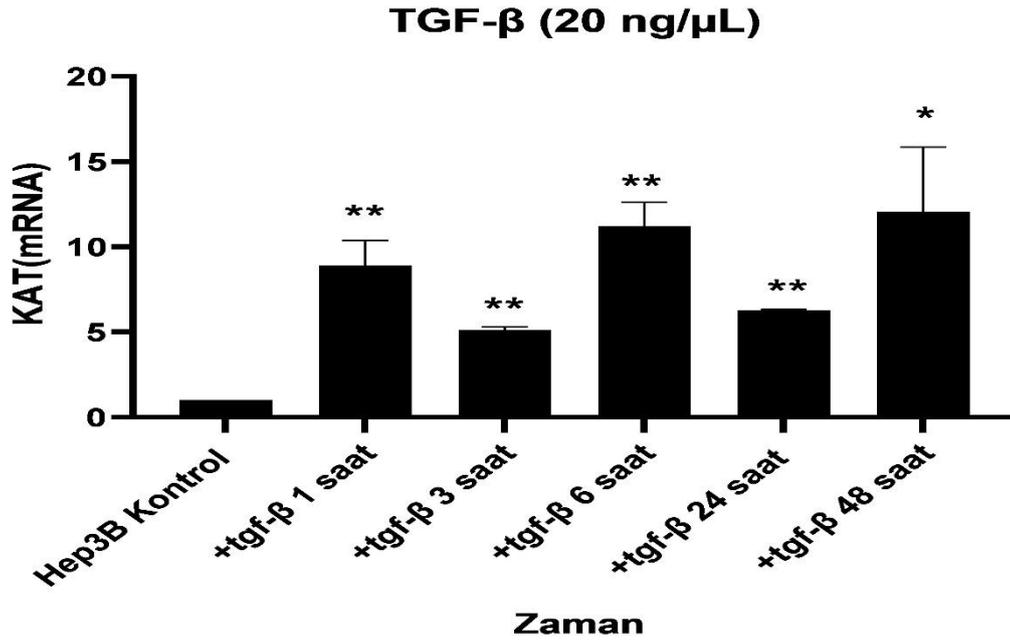
M: 1 kb DNA belirteci. **1:** Kontrol grubu **2:** 1. saat grubu **3:** 3. saat grubu **4:** 6. saat grubu **5:** 24. saat grubu **6:** 48. saat grubu **7:** Pozitif kontrol grubu **8:** Negatif kontrol grubu.

Komplementer DNA kontrolü gerçekleştirildikten sonra Bölüm 3.2.3.5’de ifade edildiği şekilde spesifik p54nrb/NONO ve H β -2 ekspresyon primerleri ile sqRT-PZR kuruldu. sqRT-PZR örnekleri Bölüm 3.2.4.1’de ifade edildiği şekilde DNA agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra UV görüntüleme sistemi ile görüntülendi (Şekil 4.3 (a)). Elde edilen DNA bantlarının göreceli (kesin değer yok) analizi İmageJ görüntüleme programı ile dansitometrik olarak değerlendirildi. Sayısal değerlendirme; deney grubunun, standart deney malzemesi kontrol grubu ve H β -2 ile karşılaştırılması ile sağlandı (normolizasyon). Dansitometrik analiz ile p54nrb/NONO geninin Hep3B hücre hattında TGF- β sitokini ile muamelesi sonucunda mRNA ifadesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p54nrb/NONO geninin Hep3B hücre hattında TGF- β sitokini ile en fazla 48 saatte artış olduğu belirlendi (Şekil 4.3(b)).



Şekil 4.3: (a) sqRT-PZR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. (b) Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO ekspresyon seviyesi.

Semikantitatif Reverse Transkriptaz PZR'dan sonra elde edilen komplamanter DNA (cDNA) örnekleri ile Bölüm 3.2.3.6'de ifade edildiği şekilde kantitatif Real Time PZR (qRT-PZR) işlemi gerçekleştirildi. p54nrb/NONO ve H β -2 gen ekspresyon primerleri ile gerçekleştirilen Real Time PZR'ın sayısal sonuç çözümü Bölüm 3.2.3.7'de ifade edildiği şekilde gerçekleştirildi. TGF- β sitokininin p54nrb/NONO geni üzerinde Hep3B hücre hattında zamana bağlı etkisi araştırıldığında mRNA ifadesinin arttığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TGF- β sitokininin en fazla 6 ve 48. saatte p54nrb/NONO genine mRNA ekspresyon seviyesinde etki ettiği gözlemlendi (Şekil 4.4).

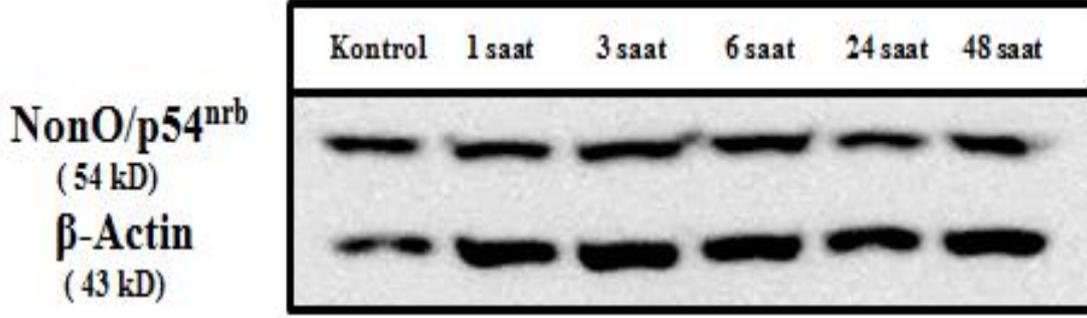


Şekil 4.4: qRT-PZR ile elde edilen TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki ekspresyon seviyesi.

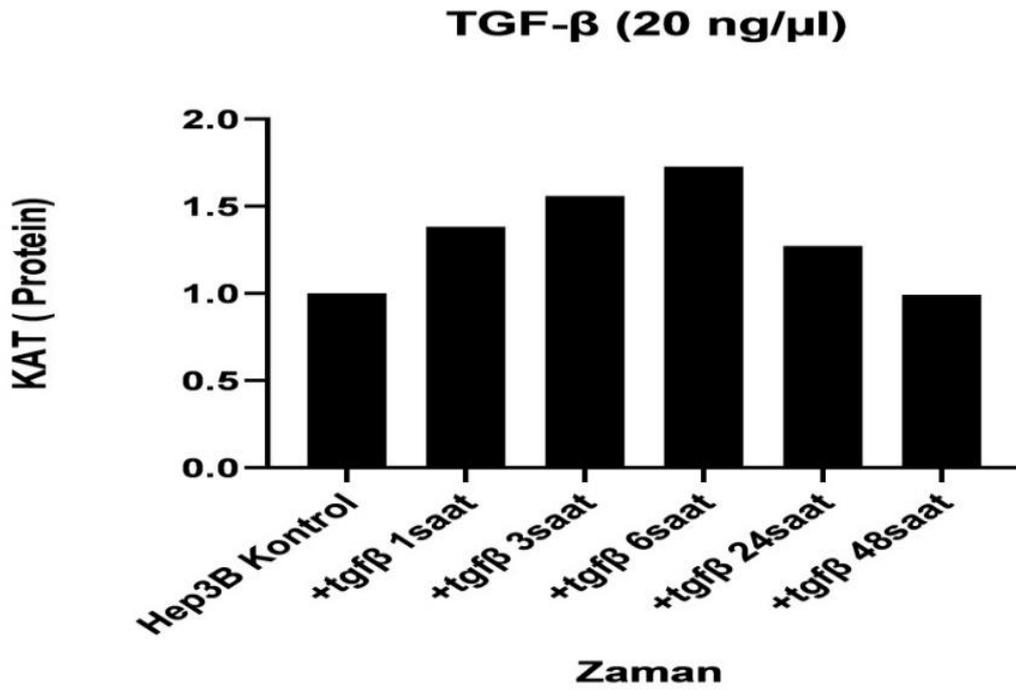
(* $p \leq 0.05$ - 0.01 aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

4.1.2 TGF- β Sitokininin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

TGF- β sitokininin p54nrb/NONO geni üzerindeki etkisinin protein seviyesinde belirlenmesi için yapılan çalışmalarda öncelikli olarak Bölüm 3.2.2.6 'da anlatıldığı şekilde Hep3B hücre soyu büyütüldü. Daha sonra Bölüm 3.2.2.10'da anlatıldığı gibi tez kapsamında planlandığı şekilde deney kuruldu ve kontrol, 1, 3, 6, 24 ve 48. saat hücre pelletleri alındı. Hücre kültürü deney çalışmalarında elde edilen pelletler Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde Western Blot Protein Analizi Deney Basamaklarına tabi tutuldu. Bölüm 3.2.5.6'da anlatıldığı şekilde UVP Western Blot PVDF Membran Görüntüleme Sistemi ile elde edilen protein bantları görüntülendi (Şekil 4.5). Daha sonra Bölüm 3.2.5.7'de anlatıldığı şekilde ImageJ ile Western Blot kantitatif analizi yapıldı. Sonuç olarak TGF- β sitokini uygulanan Hep3B hücrelerinde p54nrb/NONO protein ifadesinin zamana bağlı olarak 6. saate kadar arttığı ve sonrasında kademeli olarak düştüğü gözlemlendi. Böylece TGF- β sitokinin p54nrb/NONO protein ifadesine en fazla 6. saatte etkili olduğu görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: TGF-β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattının PVDF membran görüntüsü.



Şekil 4.6: TGF-β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki protein ekspresyon seviyesinin ImageJ ile Western Blot kantitatif analizi.

4.2 İnsan p54nrb/NONO Genine Ait Promotorun İşlevsel Analizi

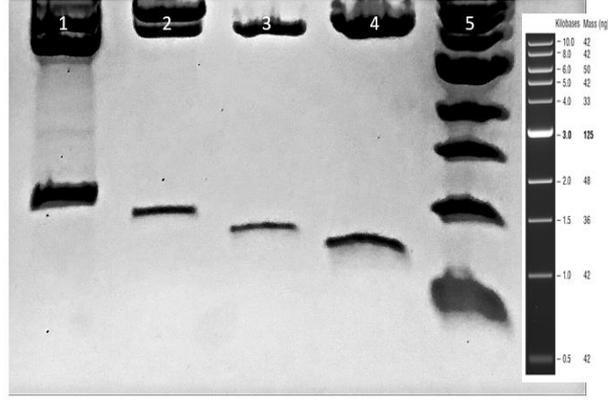
4.2.1 Tranfeksiyonda Kullanılacak p54nrb/NONO Promotor Parçalarının Kontrol Kesimi

p54nrb/NONO geninin klonlama çalışmaları Sevgi BAYSAL tarafından gerçekleştirilmiştir [182].

Çalışmanın bu basamağında p54nrb/NONO promotorundan eksiltiyle oluşturulmuş 4 farklı promotor parçası P1(-730/+529), P2(-516/+529), P3(-336/+529), P4 (-159/+529)'ün büyük ölçekli plazmit DNA izolasyonu örneklerinin ilk olarak spektrofotometre cihazında konsantrasyon miktarı ve saflık tayini için 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alındı. Kesim işlemi için kullanılacak plazmid miktarı "DNA Konsantrasyon miktarı = (A₂₆₀ x sulandırma değeri x 50 ng/μl) /1000", formülü ile hesaplandı (Absorbansın '1' değeri 1 cm³'lük küvette 50 μg/mL miktarında çift zincirli DNA'yı temsil eder).

DNA konsantrasyon hesabından sonra uygun restriksiyon endonükleazlar olan Thermo Scientific™ firmasına ait FastDigest™ XhoI ve HindIII enzimleri ile p54nrb/NONO geni promotor parçalarının kesimi gerçekleştirildi. Kontrol kesiminin doğrulanması için örnekler 6X DNA yükleme boyası ile boyandı. Daha sonra p54nrb/NONO promotor parçaları 90 voltta, 1 saat boyunca DNA agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek, UV görüntüleme sisteminde görüntülendi.

p54nrb/NONO promotorundan eksiltiyle oluşturulmuş 4 farklı promotor parçası P1(-730/529), P2(-516/529), P3(-336/529), P4(-159/529), Thermo Scientific firmasına ait GeneRuler 1 kb DNA belirteç ile promotor konstraktlarının baz çifti boyutları UV görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.7).

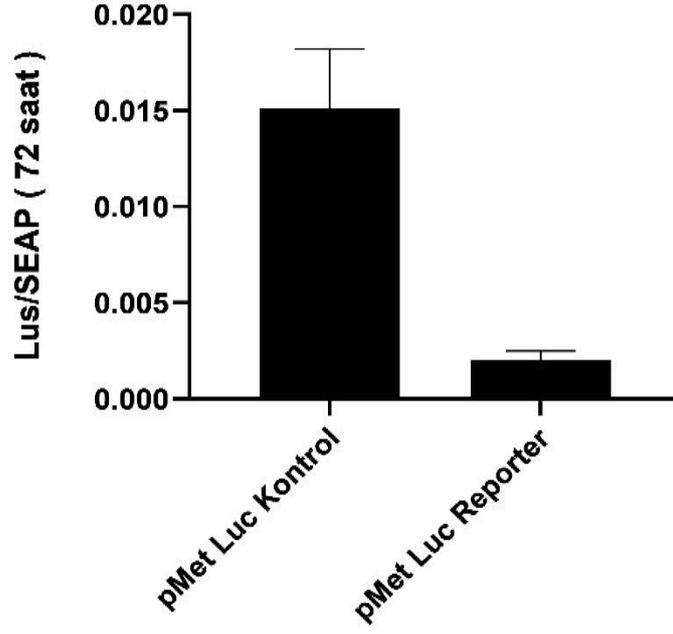


Şekil 4.7: pMETLuc repoter vektörüne klonlanan p54nrb/NONO promotor bölgesi kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.

1: 1259 bç P1(-730/+529), **2:** 1045 bç P2(-516/+529), **3:** 865 bç P3(-336/+529), **4:** 688 bç P4(-159/+529) **5:** 1 kb DNA Ladder, NEB.

4.2.2 Hep3B Hücrelerinde Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu İle Geçici Transfeksiyonun Salınan Sistem Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi

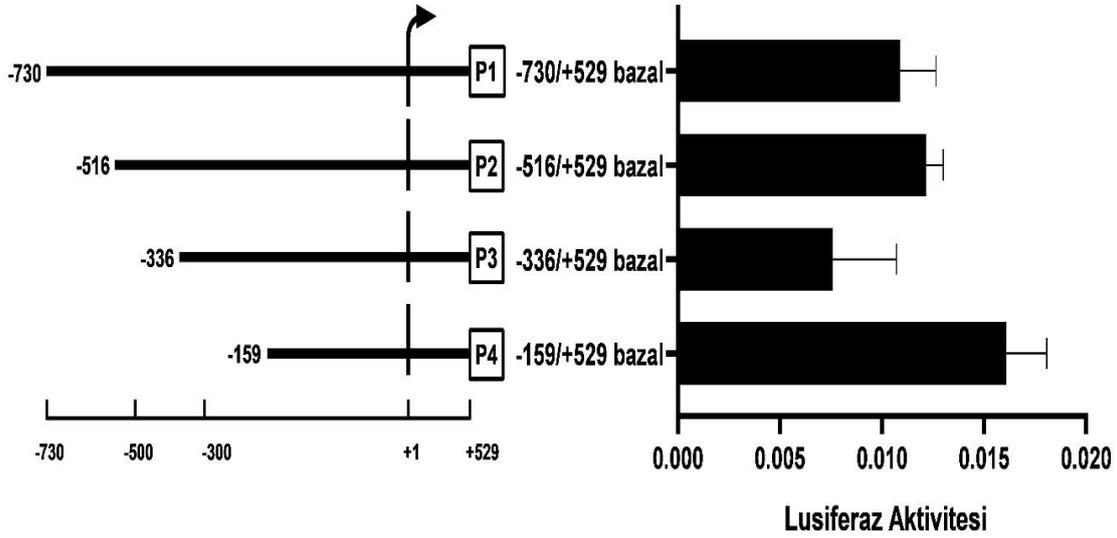
Tez kapsamında belirlenen Hep3B hücreleri ile geçici transfeksiyon deneyleri, kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. İlk olarak geçici transfeksiyon işleminin Hep3B hücre hattında çalıştığının belirlenmesi için pMetLuc kontrol vektörü ve pMetLuc reporter vektörü Bölüm 3.2.6.1’de anlatıldığı şekilde kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemi ile hücrelere transfekte edildi. Viral promotor bulunduran pMetLuc kontrol vektörü transfeksiyonda yüksek aktivite gösterdiği için pozitif kontrol olarak işlev görür. Bu çalışmada pMetLuc reporter vektörü, promotor parçası taşımayan (boş) vektördür ve negatif kontrol olarak işlev görür. Lusiferaz enzim etkinliğini ölçmek için Takara Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assay kiti kullanıldı. Luminoskan Ascent marka luminometre cihazı ile Bölüm 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde ölçülen Lusiferaz aktivitesi, Bölüm 3.2.6.3’de anlatılan Salınan Alkalın Fosfataz aktivitesi ölçümü kantitatif değerlerine oranlanarak sonuçlandırıldı. Hep3B hücre hattına transfeksiyonu gerçekleştirilen kontrol gruplarının değerleri sonucunda Şekil 4.8’de transfeksiyonun çalıştığı belirlendi.



Şekil 4.8: pMetLuc Kontrol vektörü ve pMetLuc reporter (haberci) vektörü transfeksiyon etkinliği.

p54nrb/NONO promotorundan eksiltiyle oluşturulmuş 4 farklı promotor parçası P1(-730/+529), P2(-516/+529), P3(-336/+529), P4(-159/+529)'ün her biri tez kapsamında belirlenen hücre modeli olan Hep3B hücresine transfeksiyonu gerçekleştirilerek p54nrb/NONO promotorunun bazal aktiviteleri bağıl olarak karşılaştırıldı. Geçici transfeksiyon işleminde p54nrb/NONO promotor parçaları 25 cm²'lik flask için 10 µg kadar kullanıldı. Geçici transfeksiyon işlemi Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Bağıl yolla değerlendirilen transfeksiyon aktivitesinin analizi için 12 kuyulu plakada çalışıldı ve 5 µg SEAP vektörü transfekte edildi. Viral promotora sahip olan SEAP vektörü yüksek alkalen-fosfotaz aktivitesi gösteren bir vektördür. Lusiferaz aktivitesine ait değerler SEAP değerleri ile normalize edildi. Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardan 100 µL medyum alınarak, lusiferaz ve SEAP etkinlikleri Bölüm 3.2.6.2 ve 3.2.6.3'de anlatıldığı şekilde ölçüldü.

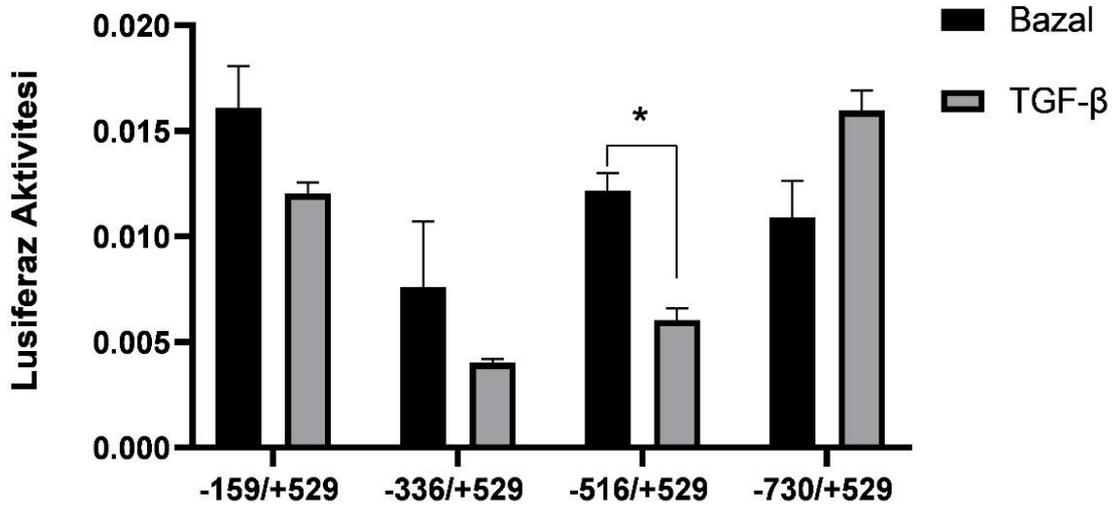
Hep3B hücre hattında gerçekleştirilen geçici transfeksiyon çalışmalarında bütün lusiferaz aktiviteyi değerlendirildiğinde 688 bç'lik P4(-159/+529) p54nrb/NONO promotör parçasının en yüksek aktiviteye sahip promotör parçası olduğu belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Hep3B hücre hattında p54nrb/NONO genine ait promotör parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteyi.

4.2.3 TGF- β Sitokininin p54nrb/NONO Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi

TGF- β sitokininin p54nrb/NONO promotor parçalarının aktivitelerine etkisinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı şekilde işlem basamakları gerçekleştirildi. Elde edilen değerler sonucunda TGF- β sitokininin dört farklı p54nrb/NONO promotor parçasından 1259 bç’lik P1(-730/+529) p54nrb/NONO promotor parçasına etki ettiği ve promotor aktivitesini arttırdığı belirlendi. Sonuç olarak TGF- β sitokininin p54nrb/NONO promotor parçalarını farklı şekilde regüle ettiği saptandı (Şekil 4.10).



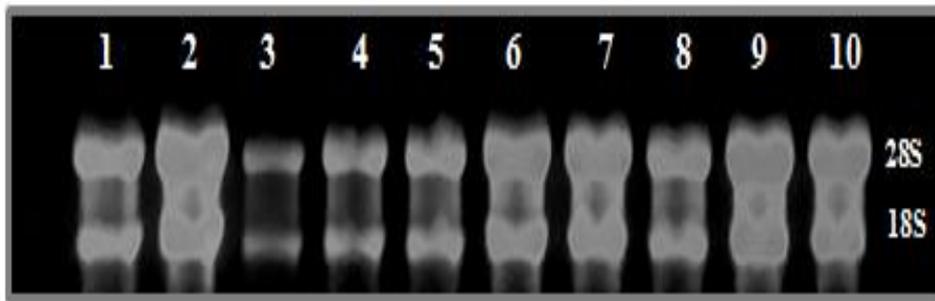
Şekil 4.10: p54nrb/NONO genine ait promotor parçalarına TGF- β sitokini etkisi.

(* $p \leq 0.05$ - 0.01 aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ ’den küçük değer)

4.3 TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisi

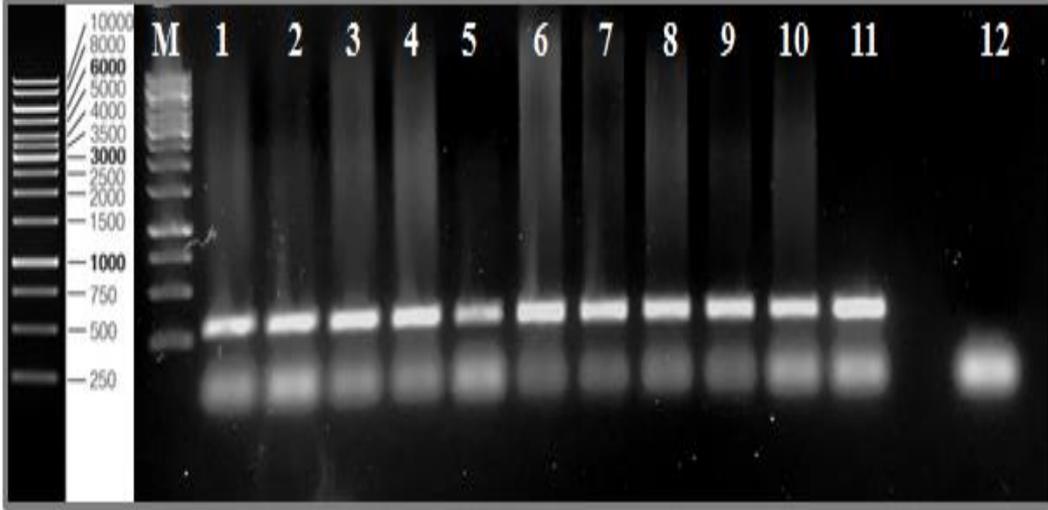
4.3.1 TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

TGF- β sitokinin hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin p54nrb/NONO geni üzerindeki etkisinin mRNA seviyesinde belirlenmesi için yapılan çalışmalarda öncelikli olarak Bölüm 3.2.2.6 'da ifade edildiği şekilde Hep3B insan hepatoselüler karsinom hücre hattı büyütüldü. Daha sonra Bölüm 3.2.2.10'da ifade edildiği gibi tez kapsamında planlandığı şekilde hücre içi sinyal yolak inhibitörleri ile (Aktinomisin-D, sikloheksimid, MEKI, wortmannin, SP600125 (JNK inh.), PD169316 (p38 MAPK inh.), SIS3 (SMAD3), NFkB inhibitörü) yolak inhibisyon deneyi kuruldu ve 6 saat sonunda hücre pelletleri alındı. Bölüm 3.2.3.1'de ifade edildiği şekilde elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA'ların kalitesinin kontrolü Bölüm 3.2.3.3'de ifade edildiği gibi RNA jel elektroforezi ile belirlendi (Şekil 4.11). RNA'nın deneysel çalışmaların devamında kullanılabilmesi için kalitesi kontrol edildikten sonra 3.2.3.2'de ifade edildiği şekilde miktar tayini yapıldı. Daha sonra 3.2.3.4'de ifade edildiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar referans (normalizatör) gen olan H β -2 gen primerleri kullanılarak 3.2.3.5'de anlatıldığı şekilde kontrol PZR'ı kuruldu ve elde edilen PZR örnekleri 3.2.4.1'de ifade edildiği şekilde DNA agaroz jel elektroforezi yapıldı ve UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: Hücre içi yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücrelerinin RNA agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

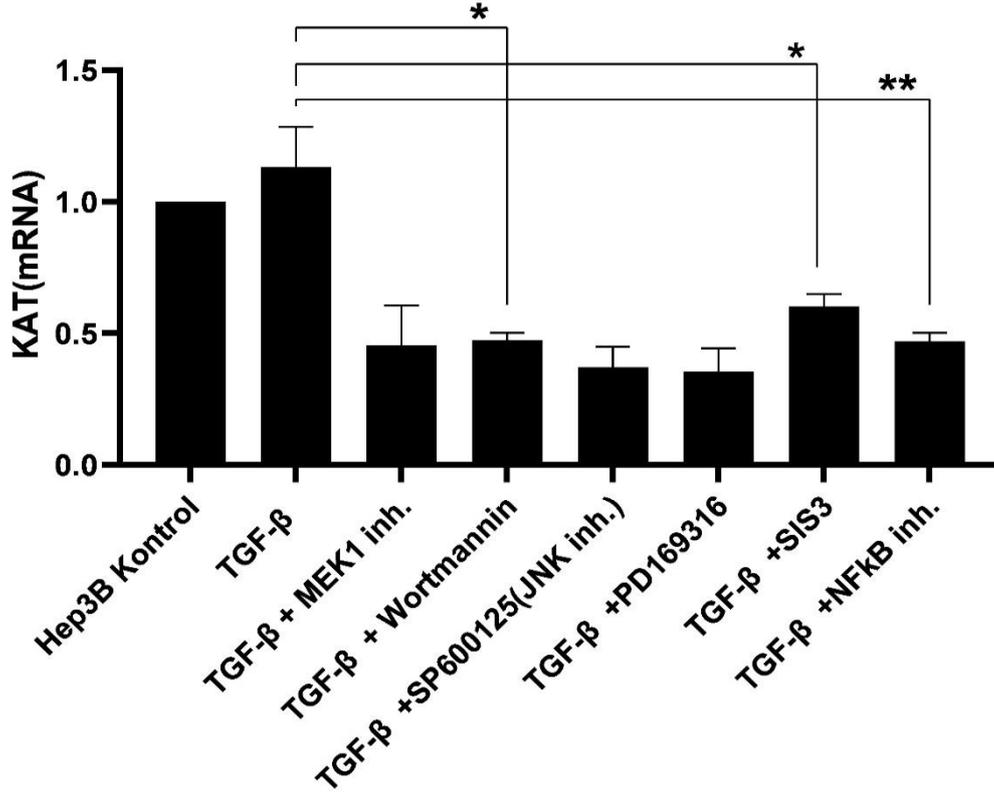
1: Kontrol grubu **2:** TGF- β grubu **3:** Aktinomisin-D grubu **4:** Sikloheksimid grubu **5:** MEKI grubu **6:** Wortmannin grubu **7:** SP600125 grubu **8:** PD169316 grubu **9:** SIS3 grubu **10:** NFkB grubu.



Şekil 4.12: cDNA Kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

M: 1 kb DNA belirteci. **1:** Kontrol grubu **2:** TGF- β grubu **3:** Aktinomisin-D grubu **4:** Sikloheksimid grubu **5:** MEKI grubu **6:** Wortmannin grubu **7:** SP600125 grubu **8:** PD169316 grubu **9:** SIS3 grubu **10:** NF κ B grubu **11:** Pozitif Kontrol grubu **12:** Negatif kontrol grubu.

Reverse Transkriptaz PZR'ından sonra elde edilen komplementer DNA (cDNA) örnekleri ile Bölüm 3.2.3.6'de ifade edildiği şekilde kantitatif Real Time PZR (qRT-PZR) işlemi gerçekleştirildi. p54nrb/NONO ve H β -2 gen ekspresyon primerleri ile gerçekleştirilen Real Time PZR'ın değerlendirilmesi Bölüm 3.2.3.7'de ifade edildiği şekilde yapıldı. Analiz sonucunda p54nrb/NONO geninin TGF- β sitokin hücre içi sinyal yolak inhibitörleri uygulanan Hep3B hücre hattındaki mRNA ekspresyon seviyesi ile sadece TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki mRNA ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında; wortmannin (PI3K), SIS3 (SMAD3), NF κ B inhibitörü ile muamele olmuş Hep3B hücre hattındaki mRNA ekspresyon seviyesindeki düşüşün anlamlı olduğu istatistiksel analiz programı olan MiniTab (One Way ANOVA) kullanılarak belirlendi. Bu sonuca bakılarak p54nrb/NONO geninin TGF- β sitokin hücre içi sinyal yolağıyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.13).

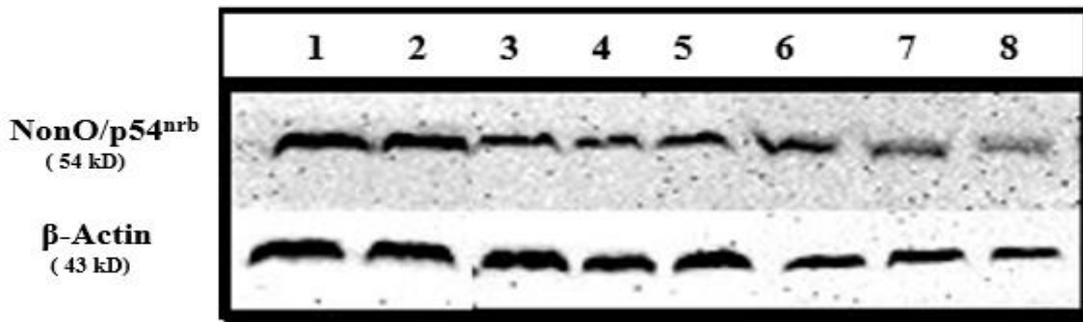


Şekil 4.13: Hücre içi sinyal yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO mRNA ekspresyon seviyesi.

(* $p \leq 0.05-0.01$ aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

4.3.2. TGF- β Sitokini Hücre İçi Sinyal Yolak İnhibitörlerinin p54^{nrb}/NONO Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

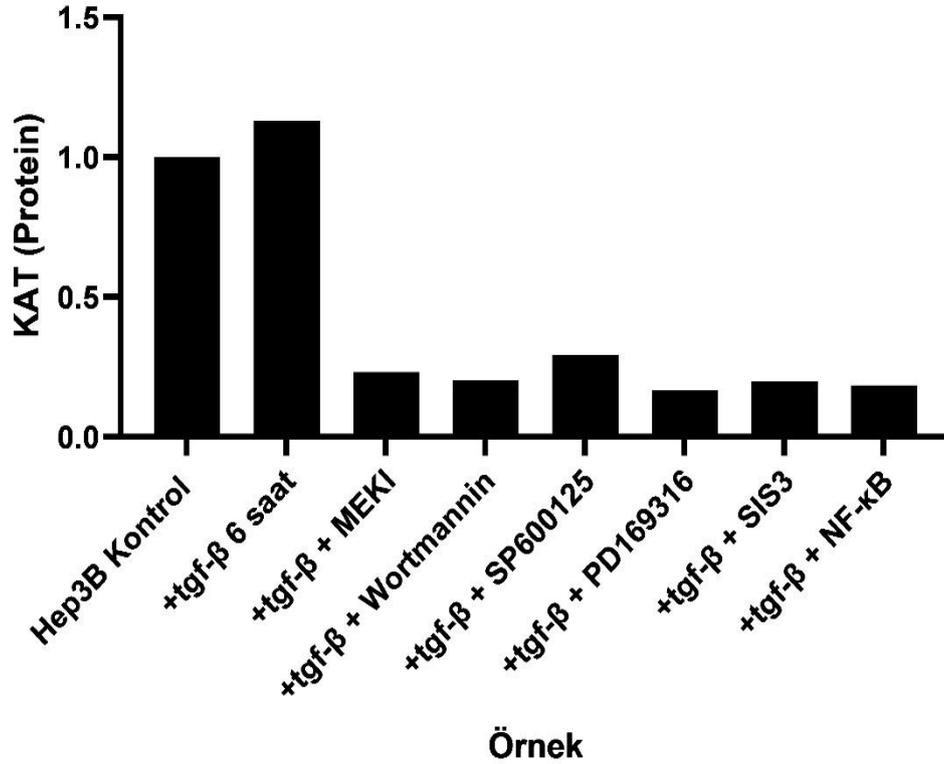
TGF- β sitokini hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin p54^{nrb}/NONO geni üzerindeki etkisinin protein seviyesinde belirlenmesi için yapılan çalışmalarda öncelikli olarak Bölüm 3.2.2.6 'da anlatıldığı şekilde Hep3B hücre soyu büyütüldü. Daha sonra Bölüm 3.2.2.10'da anlatıldığı gibi tez kapsamında planlandığı şekilde hücre içi sinyal yolak inhibitörleri ile (MEKI, wortmannin (PI3K inh.), SP600125 (JNK inh.), PD169316 (p38 MAPK inh.), SIS3 (SMAD3), NF κ B inh.) yolak inhibisyon deneyi kuruldu ve 6 saat sonunda hücre pelletleri alındı. Hücre kültürü deney çalışmalarında elde edilen pelletler Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde Western Blot Protein Analizi Deney Basamaklarına tabi tutuldu. Bölüm 3.2.5.6'da anlatıldığı şekilde UVP Western Blot PVDF Membran Görüntüleme Sistemi ile elde edilen protein bantları görüntüledi (Şekil 4.14). Daha sonra Bölüm 3.2.5.7'de anlatıldığı şekilde ImageJ ile Western Blot kantitatif analizi yapıldı. Sonuç olarak p54^{nrb}/NONO geninin TGF- β sitokin hücre içi sinyal yolak inhibitörleri uygulanan Hep3B hücre hattındaki protein ifadesi ile sadece TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki protein ifadesi karşılaştırıldığında; MEKI, wortmannin (PI3K inh.), SP600125 (JNK inh.), PD169316 (p38 MAPK inh.), SIS3 (SMAD3), NF κ B inhibitörleri ile muamele olmuş Hep3B hücre hattındaki protein ifadesinde düşüş gözlemlendi. Bu sonuca bakılarak p54^{nrb}/NONO geninin TGF- β sitokin hücre içi sinyal yolağıyla yakından ilişkili olduğu belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.14: TGF- β sitokinine ait hücre içi yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücre hattının PVDF membran görüntüsü.

1: Kontrol grubu **2:** TGF- β grubu **3:** MEKI grubu **4:** Wortmannin grubu **5:** SP600125 grubu **6:** NF κ B grubu **7:** SIS3 grubu **8:** PD169316 grubu.

TGF- β (20 ng/ μ L) Yolak İnhibisyon

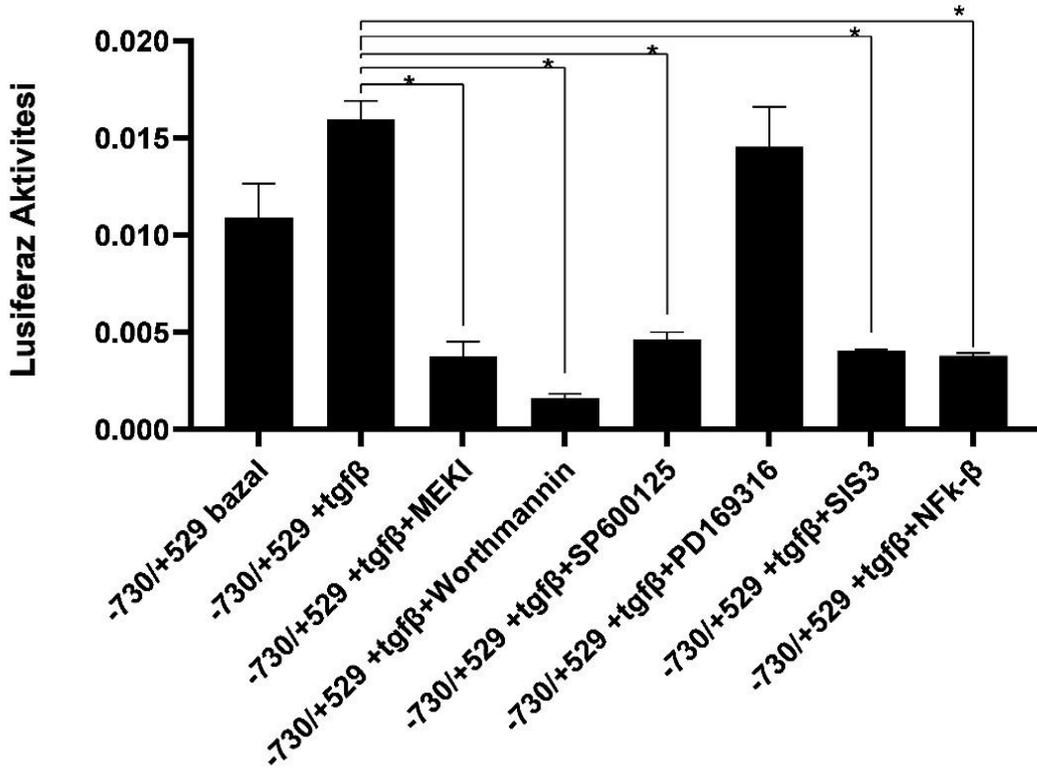


Şekil 4.15: Hep3B hücre soyunda hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin imageJ ile western blot kantitatif analizi.

4.3.3. TGF- β Sitokini Yolak İnhibitörlerinin p54nrb/NONO Promotor Parçasına Etkisinin Belirlenmesi

Tez kapsamında Hep3B hücre hattında TGF- β sitokininin hangi hücre içi sinyal yollarını kullanarak p54nrb/NONO genine ait promotor parçasına etki ettiğinin belirlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda hücre içi sinyal yolak inhibitörleri olan MEK1 (MAP2K1), wortmannin (PI3K inh.), SP600125 (JNK inh.), PD169316 (p38 MAPK inh.), SIS3 (SMAD3), NF κ B inhibitörü kullanıldı ve Bölüm 3.2.6'da anlatılan deneysel basamaklar gerçekleştirildi. Bunun sonucunda Bölüm 4.2.3'de belirtildiği gibi Hep3B hücre hattında gerçekleştirilen geçici transfeksiyon çalışmalarında bütün lusiferaz aktiviteleri değerlendirildiğinde TGF- β sitokininin 1259 bp'lik P1(730/+529) p54nrb/NONO promotor parçasının üzerinde etkili olduğu belirlendi. Bu nedenle hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin etkinliği bu promotor parçası transfekte edilerek analiz edildi. Analiz

sonucunda 1259 bç'lik P1(-730/+529) p54nrb/NONO promotör parçasında anlamlı şekilde MAP2K1, PI3K, JNK, SMAD3 ve NFkB sinyal yollarının inhibisyonu belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: TGF- β sitokini yolak inhibitörlerinin 1259bç'lik P1(-730/+529) p54nrb/NONO promotör parçasına etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gen ekspresyonunun kontrolü, proteinler ve nükleik asitler arasındaki dinamik etkileşimi içerir. Gen regülasyonu boyunca çeşitli bileşenleri ve yolları düzenlemek ve entegre etmek, hücrenin DNA, RNA ve proteini köprüleyebilecek faktörlere ihtiyacı vardır. Köprüleme proteinlerinin böyle bir örneği, "multifonksiyonel" *Drosophila behavior/human splicing* (DBHS) ailesidir [183]. DBHS proteinleri yüksek oranda korunmuş art arda dizili N-terminal RNA Tanıma Motifleri (RRM'ler), bir NonA / paraspeckle alanı (NOPS) ve bir C-terminal coiled-coil (sarmal bobin) ile tanımlanır [124]. İnsanlarda ailenin üç üyesi vardır: splicing faktörü prolin/glutamin bakımından zengin (SFPQ / PSF), non-POU domain içeren oktamer bağlayıcı protein (p54nrb/NONO) ve paraspeckle protein bileşeni 1 (PSPC1/PSP1). DBHS proteinleri, nükleoplazmada bulunur ve çeşitli koşullar altında kromatin ya da DNA hasar odaklarına lokalize olmuş paraspeckle olarak adlandırılan alt nükleer cisimler içinde bulunabilir [93, 123, 184]. non-POU domain içeren oktamer bağlayıcı protein p54nrb/NONO, nükleer hormon reseptörlerinin RNA işlenmesi, RNA splicing ve transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan çok işlevli bir nükleer proteindir [144]. Gen transkripsiyonundaki, RNA işlenmesindeki ve DNA onarımındaki rolleri nedeniyle, p54nrb/NONO kanser başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Birçok hücre fonksiyonu, sitokin reseptörü süper ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. Bu reseptörler tarafından sinyalleşme, reseptör kompleksine alınan sinyal proteinlerinin tirozin fosforilasyonuna bağlanan ligand bağlayan Janus kinazları (JAK) ile ilişkilerine bağlıdır. Bunlar arasında, sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STATS), sitokin tepkilerinin çeşitliliğine katkıda bulunan transkripsiyon faktörleri yer alır [185]. Fonksiyonel çalışmalar, p54nrb/NONO'nun Interlökin 1, 2, 6, 8 ve TNF- α dahil enflamatuar faktörlerin seviyelerini arttırabileceği gösterilmiştir. p54nrb/NONO'nun aşırı ifadesinin, NF κ B'nin önemli bir alt birimi olan P65'in protein seviyelerini indükleyebileceği bulunmuştur [173]. RNA bağlayıcı protein p54nrb/NONO TNF- α tarafından indüklenen ekspresyonu endotel hücrelerinin TNF- α aracılı hücre korumasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir [167].

İnsan p54nrb/NONO geni ile ilgili transkripsiyonel regülasyon seviyesinde sınırlı sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Tez kapsamında, literatürde insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (Hep3B), TGF- β sitokini aracılı p54nrb/NONO geni transkripsiyonel

regülasyonuna yönelik bir çalışmanın bulunmamasından dolayı bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında öncelikli olarak p54nrb/NONO geninde TGF- β sitokininin, insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (Hep3B), mRNA ve protein seviyesinde meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi, sonrasında özel hücre içi sinyal yolak inhibitörleri kullanılarak p54nrb/NONO geninde TGF- β sitokini bağlantılı hücre içi sinyal yolaklarının, insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (Hep3B) mRNA, protein ve transkripsiyonel aktivitesindeki seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu hedef doğrultusunda ilk olarak normal oksijen koşulları altında Hep3B hücre hattı uygun kültür şartlarında büyütüldü ve belli doluluk oranlarına ulaştıklarında pasajlanmak suretiyle soy devam ettirildi. Deney kurulması için uygun hale getirilen hücreler 20 ng/mL TGF- β sitokini ile muamele edildi. Tez kapsamında belirlenen inkübasyon süreleri sonunda elde edilen hücre pelletlerinden mRNA ve protein seviyesinde, sırasıyla qRT-PZR ve western blot analizleri yapabilmek için uygun izolasyonlar gerçekleştirildi. p54nrb/NONO geninin Hep3B hücre hattında TGF- β sitokini ile muamelesi sonucunda mRNA ifadesinde artış gözlemlendi. Aynı şekilde TGF- β sitokini uygulanan Hep3B hücrelerinde p54nrb/NONO protein ifadesinin zamana bağlı artışı gözlemlendi.

p54nrb/NONO, mesane kanseri ve prostat kanserinde upregüle olduğu gösterilmiştir [148]. Küçük olmayan karaciğer kanseri hücresi (NSCLC) ile yapılan bir çalışmada lusiferaz aktivitesi ölçüldüğünde, p54nrb/NONO promotörü +311/+414 fragmanında önemli bir düzenleme bölgesi olduğunu gösterilmiştir. p54nrb/NONO promotörü +109/+203 bölgesinin delesyona uğratılması, lusiferaz aktivitesinin bir kısmının düşmesine neden olduğu gösterilmiştir [186]. İnsan p54nrb/NONO genine ait promotörün işlevsel analizi, tez kapsamında belirlenen Hep3B hücreleri ile geçiçi transfeksiyon deneyleri; kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. p54nrb/NONO geninin klonlama çalışmaları Sevgi BAYSAL tarafından gerçekleştirilmiştir [182].

PC3 hücrelerinde yapılan çalışmada promotör konstraktlarının bazal aktivitesi normoksik ve hipoksik koşullar altında belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda p54nrb/NONO P1(-730/+529) ve P2(-516/+529) promotör parçalarının bazal aktivitesinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan lusiferaz aktivitesi ölçümlerine göre hipoksik koşullarda normoksik koşullara göre promotör aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Hipoksik koşullar altında promotör aktivitesinin yüksek olması

promotor dizisinde HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olabileceği öngörülmüştür. Bu öngörü EMSA deneyleri ile doğrulanmıştır ve bunun sonucunda p54nrb/NONO geninin hipoksi ile regüle olduğu belirlenmiştir[182].

p54nrb/NONO promotorundan eksiltiyle oluşturulmuş 4 farklı promotor parçası P1(-730/+529), P2(-516/+529), P3(-336/+529), P4(-159/+529)'ün her biri Hep3B hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilerek p54nrb/NONO promotorunun bazal aktiviteleri karşılaştırıldı. p54nrb/NONO geni P1(-730/+529), P2(-516/+529), P3(-336/+529), P4(-159/+529) promotor konstraktlarına ait transkripsiyonel etkinlik hesaplandığında Hep3B hücre hattında tüm promotor konstraktları aktivite gösterdi. Bütün lusiferaz aktiviteleri değerlendirildiğinde 688 bç'lik P4(-159/+529) p54nrb/NONO promotor konstraktının en yüksek aktiviteye sahip promotor konstraktı olduğu belirlendi. PC3 hücre hattında yapılan çalışma ve Hep3B hücre hattında yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında p54nrb/NONO promotor konstraktlarının farklı bazal aktivite göstermesinin nedeni dokuya spesifik transkripsiyonel regülasyon olduğunu göstermektedir.

TGF- β sitokininin p54nrb/NONO promotor konstrakt aktivitelerine etkisinin belirlenmesi için aynı şekilde geçici transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. TGF- β sitokininin, dört farklı p54nrb/NONO promotor konstraktından 1259 bç'lik P1(-730/+529) promotor konstraktına etki ettiği ve promotor aktivitesini arttırdığı belirlendi. Sonuç olarak TGF- β sitokinin p54nrb/NONO promotor konstraktlarını farklı şekilde regüle ettiği saptandı.

Hücrel homeostazın korunmasında yaygın ve merkezi rolüyle tutarlı olarak, TGF- β sinyalinin inhibisyonu, normal homeostatik süreçlerin ve daha sonra karsinogenезin bozulmasıyla sonuçlanır, bu yüzden TGF- β sitokini bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanır [16]. TGF- β sitokini hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin p54nrb/NONO geni üzerindeki etkisinin belirlenmesi için tez kapsamında belirlenen Hep3B hücre hattının uygun kültür şartlarında büyütüldü ve belli doluluk oranlarına ulaştıklarında pasajlanmak suretiyle soy devam ettirildi. Deney kurulması için uygun hale getirilen hücreler ile planlanan şekilde hücre içi sinyal yolak inhibitörleri uygulandı. Tez kapsamında belirlenen inkübasyon süresi sonunda elde edilen hücre pelletlerinden mRNA ve protein seviyesinde, sırasıyla qRT-PZR ve western blot analizleri yapabilmek için uygun izolasyonlar gerçekleştirildi. SMAD-bağısız TGF- β sinyal yolağının p54nrb/NONO üzerindeki etkisinin mRNA seviyesinde; wortmannin (PI3K), SIS3 (SMAD3), NF κ B inhibitörü ile muamele olmuş Hep3B hücre

hattında düşüş meydana geldi ve bu düşüşün anlamlı olduğu istatistiksel analiz programı olan MiniTab (One Way ANOVA) kullanılarak belirlendi. Daha sonra sadece TGF- β sitokini uygulanmış Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO protein ifadesi ile TGF- β ve sinyal yolak inhibitörleri uygulanmış Hep3B hücre hattındaki p54nrb/NONO protein ifadesi karşılaştırıldığında; MEKI, wortmannin (PI3K inh.), SP600125 (JNK inh.), PD169316 (p38 MAPK inh.), SIS3 (SMAD3), NFkB inhibitörleri ile muamele olmuş Hep3B hücre hattındaki protein ifadesinde düşüş gözlemlendi.

RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolu, karaciğer kanserinin gelişiminde ve korunmasında en önemli hücre sel sinyalleşme basamaklarından biridir. Bir dizi spesifik fosforilasyon olayı boyunca, bu yol, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) gibi vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) gibi ligand bağlı tirozin kinaz reseptörlerinden hücre dışı sinyalleri iletir [187]. Bu tez kapsamında Hep3B hücre hattında transforme edici büyüme faktörü (TGF- β)'nün hangi hücre içi sinyal yollarını kullanarak p54nrb/NONO genine ait promotör konstantına etki ettiğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen geçici tranfeksiyon çalışmaları sonucunda bütün lusiferaz aktiviteleri değerlendirildiğinde TGF- β sitokininin 1259 bç'lik P1(730/+529) p54nrb/NONO promotör konstraktı üzerinde etkili olduğu belirlendi. Bu nedenle hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin etkinliği bu promotör parçası transfekte edilerek analiz edildi. Analiz sonucunda 1259 bç'lik P1(-730/+529) p54nrb/NONO promotör parçasında anlamlı şekilde MAP2K1, PI3K, JNK, SMAD3 ve NFkB sinyal yollarının inhibisyonu belirlendi. Bu sonuca bakılarak Hep3B hücre hattında p54nrb/NONO geninin TGF- β sitokin hücre içi sinyal yolağıyla yakından ilişkili olduğu belirlendi.

Bu çalışma daha sonra yapılacak olan paraspeckle, sitokin ve promotör çalışmalarına öncülük edebilir. İleride yapılacak olan deneyler doğrultusunda daha derin promotör analizleri yapıp promotordaki transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri açığa çıkartılabilir. Ayrıca in vivo deneyler ile hücre içi sinyal yolak inhibitörleri kullanılarak kanser araştırmalarına katkıda bulunulabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, "Global cancer statistics," (in eng), *CA Cancer J Clin*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90, Mar-Apr 2011.
- [2] A. Braillon, "Hepatocellular carcinoma," (in eng), *Lancet*, vol. 380, no. 9840, pp. 469; author reply 470-1, Aug 4 2012.
- [3] F. Heindryckx *et al.*, "Inhibition of the placental growth factor decreases burden of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma in a transgenic mouse model," (in eng), *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 24, no. 9, pp. 1020-32, Sep 2012.
- [4] M. Fujimori *et al.*, "Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma," (in eng), *Cancer Res*, vol. 51, no. 1, pp. 89-93, Jan 1 1991.
- [5] T. Yau, P. Chan, R. Epstein, and R. T. Poon, "Evolution of systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma," (in eng), *World J Gastroenterol*, vol. 14, no. 42, pp. 6437-41, Nov 14 2008.
- [6] S. M. Kessler *et al.*, "Hepatocellular Carcinoma and Nuclear Paraspeckles: Induction in Chemoresistance and Prediction for Poor Survival," (in eng), *Cell Physiol Biochem*, vol. 52, no. 4, pp. 787-801, 2019.
- [7] X. W. Wang *et al.*, "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma," (in eng), *Toxicology*, vol. 181-182, pp. 43-7, Dec 27 2002.
- [8] T. Okada *et al.*, "Gene expression profile linked to p53 status in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma," (in eng), *FEBS Lett*, vol. 555, no. 3, pp. 583-90, Dec 18 2003.
- [9] A. T. De Souza, G. R. Hankins, M. K. Washington, T. C. Orton, and R. L. Jirtle, "M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity," (in eng), *Nat Genet*, vol. 11, no. 4, pp. 447-9, Dec 1995.
- [10] J. Massague, "TGFbeta in Cancer," (in eng), *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 215-30, Jul 25 2008.
- [11] S. Rao and L. Mishra, "Targeting Transforming Growth Factor Beta Signaling in Liver Cancer," (in eng), *Hepatology*, vol. 69, no. 4, pp. 1375-1378, Apr 2019.
- [12] S. Lee and K. Margolin, "Cytokines in cancer immunotherapy," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 3856-93, Oct 13 2011.
- [13] J. M. Zhang and J. An, "Cytokines, inflammation, and pain," (in eng), *Int Anesthesiol Clin*, vol. 45, no. 2, pp. 27-37, Spring 2007.

- [14] E. Vacchelli *et al.*, "Trial Watch: Immunostimulatory cytokines," (in eng), *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 4, pp. 493-506, Jul 1 2012.
- [15] G. J. Prud'homme, "Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations," (in eng), *Lab Invest*, vol. 87, no. 11, pp. 1077-91, Nov 2007.
- [16] J. J. Huang and G. C. Blobe, "Dichotomous roles of TGF-beta in human cancer," (in eng), *Biochem Soc Trans*, vol. 44, no. 5, pp. 1441-1454, Oct 15 2016.
- [17] J. Massague, "The transforming growth factor-beta family," (in eng), *Annu Rev Cell Biol*, vol. 6, pp. 597-641, 1990.
- [18] S. Daopin, K. A. Piez, Y. Ogawa, and D. R. Davies, "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily," (in eng), *Science*, vol. 257, no. 5068, pp. 369-73, Jul 17 1992.
- [19] M. P. Schlunegger and M. G. Grutter, "An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2," (in eng), *Nature*, vol. 358, no. 6385, pp. 430-4, Jul 30 1992.
- [20] K. Basler, T. Edlund, T. M. Jessell, and T. Yamada, "Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member," (in eng), *Cell*, vol. 73, no. 4, pp. 687-702, May 21 1993.
- [21] S. W. Qian, J. K. Burmester, J. R. Merwin, J. A. Madri, M. B. Sporn, and A. B. Roberts, "Identification of a structural domain that distinguishes the actions of the type 1 and 2 isoforms of transforming growth factor beta on endothelial cells," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no. 14, pp. 6290-4, Jul 15 1992.
- [22] N. Q. McDonald and W. A. Hendrickson, "A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif," (in eng), *Cell*, vol. 73, no. 3, pp. 421-4, May 7 1993.
- [23] D. W. Burt and I. R. Paton, "Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family," (in eng), *DNA Cell Biol*, vol. 11, no. 7, pp. 497-510, Sep 1992.
- [24] S. Y. Ying, "Inhibins, activins and follistatins," (in eng), *J Steroid Biochem*, vol. 33, no. 4b, pp. 705-13, Oct 1989.
- [25] J. M. Wozney *et al.*, "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities," (in eng), *Science*, vol. 242, no. 4885, pp. 1528-34, Dec 16 1988.
- [26] R. W. Padgett, J. M. Wozney, and W. M. Gelbart, "Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 7, pp. 2905-9, Apr 1 1993.

- [27] K. A. Wharton, G. H. Thomsen, and W. M. Gelbart, "Drosophila 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 20, pp. 9214-8, Oct 15 1991.
- [28] A. J. Celeste *et al.*, "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 24, pp. 9843-7, Dec 1990.
- [29] K. M. Lyons, R. W. Pelton, and B. L. Hogan, "Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development," (in eng), *Genes Dev*, vol. 3, no. 11, pp. 1657-68, Nov 1989.
- [30] E. Ozkaynak *et al.*, "OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family," (in eng), *Embo j*, vol. 9, no. 7, pp. 2085-93, Jul 1990.
- [31] E. Ozkaynak *et al.*, "Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 267, no. 35, pp. 25220-7, Dec 15 1992.
- [32] K. M. Lyons, C. M. Jones, and B. L. Hogan, "The DVR gene family in embryonic development," (in eng), *Trends Genet*, vol. 7, no. 11-12, pp. 408-12, Nov-Dec 1991.
- [33] S. J. Lee, "Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 10, pp. 4250-4, May 15 1991.
- [34] R. Waterston *et al.*, "A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*," (in eng), *Nat Genet*, vol. 1, no. 2, pp. 114-23, May 1992.
- [35] J. Boyer, S. Pascolo, G. F. Richard, and B. Dujon, "Sequence of a 7.8 kb segment on the left arm of yeast chromosome XI reveals four open reading frames, including the CAP1 gene, an intron-containing gene and a gene encoding a homolog to the mammalian UOG-1 gene," (in eng), *Yeast*, vol. 9, no. 3, pp. 279-87, Mar 1993.
- [36] C. M. Jones, D. Simon-Chazottes, J. L. Guenet, and B. L. Hogan, "Isolation of Vgr-2, a novel member of the transforming growth factor-beta-related gene family," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 6, no. 11, pp. 1961-8, Nov 1992.
- [37] A. C. McPherron and S. J. Lee, "GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 268, no. 5, pp. 3444-9, Feb 15 1993.

- [38] D. M. Kingsley, "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms," (in eng), *Genes Dev*, vol. 8, no. 2, pp. 133-46, Jan 1994.
- [39] X. Zhou, H. Sasaki, L. Lowe, B. L. Hogan, and M. R. Kuehn, "Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation," (in eng), *Nature*, vol. 361, no. 6412, pp. 543-7, Feb 11 1993.
- [40] L. F. Lin, D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins, "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons," (in eng), *Science*, vol. 260, no. 5111, pp. 1130-2, May 21 1993.
- [41] E. S. Lander *et al.*, "Initial sequencing and analysis of the human genome," (in eng), *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921, Feb 15 2001.
- [42] Y. Shi and J. Massague, "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus," (in eng), *Cell*, vol. 113, no. 6, pp. 685-700, Jun 13 2003.
- [43] P. D. Sun and D. R. Davies, "The cystine-knot growth-factor superfamily," (in eng), *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 24, pp. 269-91, 1995.
- [44] J. Groppe *et al.*, "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin," (in eng), *Nature*, vol. 420, no. 6916, pp. 636-42, Dec 12 2002.
- [45] T. Kirsch, W. Sebald, and M. K. Dreyer, "Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex," (in eng), *Nat Struct Biol*, vol. 7, no. 6, pp. 492-6, Jun 2000.
- [46] J. Greenwald, W. H. Fischer, W. W. Vale, and S. Choe, "Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase," (in eng), *Nat Struct Biol*, vol. 6, no. 1, pp. 18-22, Jan 1999.
- [47] C. C. Boesen, S. Radaev, S. A. Motyka, A. Patamawenu, and P. D. Sun, "The 1.1 Å crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain," (in eng), *Structure*, vol. 10, no. 7, pp. 913-9, Jul 2002.
- [48] J. Massague, "TGF-beta signal transduction," (in eng), *Annu Rev Biochem*, vol. 67, pp. 753-91, 1998.
- [49] P. J. Hart, S. Deep, A. B. Taylor, Z. Shu, C. S. Hinck, and A. P. Hinck, "Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex," (in eng), *Nat Struct Biol*, vol. 9, no. 3, pp. 203-8, Mar 2002.
- [50] P. C. Gray *et al.*, "Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 5, pp. 3206-12, Feb 4 2000.

- [51] J. Greenwald *et al.*, "The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly," (in eng), *Mol Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 605-17, Mar 2003.
- [52] T. B. Thompson, T. K. Woodruff, and T. S. Jardetzky, "Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions," (in eng), *Embo j*, vol. 22, no. 7, pp. 1555-66, Apr 1 2003.
- [53] C. H. Heldin, K. Miyazono, and P. ten Dijke, "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins," (in eng), *Nature*, vol. 390, no. 6659, pp. 465-71, Dec 4 1997.
- [54] L. Zawel *et al.*, "Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators," (in eng), *Mol Cell*, vol. 1, no. 4, pp. 611-7, Mar 1998.
- [55] K. Kusanagi, H. Inoue, Y. Ishidou, H. K. Mishima, M. Kawabata, and K. Miyazono, "Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 555-65, Feb 2000.
- [56] T. Gaarenstroom and C. S. Hill, "TGF-beta signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation," (in eng), *Semin Cell Dev Biol*, vol. 32, pp. 107-18, Aug 2014.
- [57] T. Furumatsu, M. Tsuda, N. Taniguchi, Y. Tajima, and H. Asahara, "Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 280, no. 9, pp. 8343-50, Mar 4 2005.
- [58] A. Nakao *et al.*, "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling," (in eng), *Nature*, vol. 389, no. 6651, pp. 631-5, Oct 9 1997.
- [59] T. Imamura *et al.*, "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily," (in eng), *Nature*, vol. 389, no. 6651, pp. 622-6, Oct 9 1997.
- [60] N. G. M. Thielen, P. M. van der Kraan, and A. P. M. van Caam, "TGFbeta/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis," (in eng), *Cells*, vol. 8, no. 9, Aug 24 2019.
- [61] M. K. Lee *et al.*, "TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA," (in eng), *Embo j*, vol. 26, no. 17, pp. 3957-67, Sep 5 2007.
- [62] M. Yamashita, K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu, and Y. E. Zhang, "TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta," (in eng), *Mol Cell*, vol. 31, no. 6, pp. 918-24, Sep 26 2008.

- [63] M. Landstrom, "The TAK1-TRAF6 signalling pathway," (in eng), *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 42, no. 5, pp. 585-9, May 2010.
- [64] K. Yamaguchi *et al.*, "XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway," (in eng), *Embo j*, vol. 18, no. 1, pp. 179-87, Jan 4 1999.
- [65] S. Galban and C. S. Duckett, "XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 17, no. 1, pp. 54-60, Jan 2010.
- [66] R. Derynck and Y. E. Zhang, "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling," (in eng), *Nature*, vol. 425, no. 6958, pp. 577-84, Oct 9 2003.
- [67] F. Verrecchia and F. Redini, "Transforming Growth Factor-beta Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment," (in eng), *Front Oncol*, vol. 8, p. 133, 2018.
- [68] A. B. Roberts and L. M. Wakefield, "The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 15, pp. 8621-3, Jul 22 2003.
- [69] X. J. Wang, "Role of TGFbeta signaling in skin carcinogenesis," (in eng), *Microsc Res Tech*, vol. 52, no. 4, pp. 420-9, Feb 15 2001.
- [70] T. Imamura, A. Hikita, and Y. Inoue, "The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis," (in eng), *Breast Cancer*, vol. 19, no. 2, pp. 118-24, Apr 2012.
- [71] S. Sengupta, S. Jana, and A. Bhattacharyya, "TGF-beta-Smad2 dependent activation of CDC 25A plays an important role in cell proliferation through NFAT activation in metastatic breast cancer cells," (in eng), *Cell Signal*, vol. 26, no. 2, pp. 240-52, Feb 2014.
- [72] H. W. Zhao *et al.*, "TGF-beta/Smad2/3 signal pathway involves in U251 cell proliferation and apoptosis," (in eng), *Gene*, vol. 562, no. 1, pp. 76-82, May 10 2015.
- [73] Z. Li *et al.*, "Tumor-derived transforming growth factor-beta is critical for tumor progression and evasion from immune surveillance," (in eng), *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 15, no. 13, pp. 5181-6, 2014.
- [74] A. de Gramont, S. Faivre, and E. Raymond, "Novel TGF-beta inhibitors ready for prime time in onco-immunology," (in eng), *Oncoimmunology*, vol. 6, no. 1, p. e1257453, 2017.

- [75] P. Saas and S. Perruche, "Functions of TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells," (in eng), *Crit Rev Immunol*, vol. 32, no. 6, pp. 529-53, 2012.
- [76] D. V. F. Tauriello *et al.*, "TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis," (in eng), *Nature*, vol. 554, no. 7693, pp. 538-543, Feb 22 2018.
- [77] H. Y. Park, L. M. Wakefield, and M. Mamura, "Regulation of tumor immune surveillance and tumor immune subversion by tgf-Beta," (in eng), *Immune Netw*, vol. 9, no. 4, pp. 122-6, Aug 2009.
- [78] D. A. Thomas and J. Massague, "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance," (in eng), *Cancer Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 369-80, Nov 2005.
- [79] Y. Chen *et al.*, "Transforming growth factor beta signaling pathway: A promising therapeutic target for cancer," (in eng), *J Cell Physiol*, Jul 22 2019.
- [80] A. Garcia-Lora, I. Algarra, and F. Garrido, "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 195, no. 3, pp. 346-55, Jun 2003.
- [81] X. H. Chen *et al.*, "TGF-beta and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells," (in eng), *Mol Immunol*, vol. 65, no. 1, pp. 34-42, May 2015.
- [82] R. J. Akhurst and R. Derynck, "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword," (in eng), *Trends Cell Biol*, vol. 11, no. 11, pp. S44-51, Nov 2001.
- [83] G. Ferrari, B. D. Cook, V. Terushkin, G. Pintucci, and P. Mignatti, "Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 219, no. 2, pp. 449-58, May 2009.
- [84] J. Zonneville, A. Safina, A. M. Truskinovsky, C. L. Arteaga, and A. V. Bakin, "TGF-beta signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association," (in eng), *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 670, Jun 19 2018.
- [85] H. Ji *et al.*, "Inhibition of transforming growth factor beta/SMAD signal by MiR-155 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in prostate cancer," (in eng), *Cancer Sci*, vol. 105, no. 12, pp. 1541-9, Dec 2014.
- [86] M. Forino *et al.*, "TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture," (in eng), *Int J Exp Pathol*, vol. 87, no. 3, pp. 197-208, Jun 2006.

- [87] H. Peinado, F. Portillo, and A. Cano, "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis," (in eng), *Int J Dev Biol*, vol. 48, no. 5-6, pp. 365-75, 2004.
- [88] S. A. Mani *et al.*, "Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 24, pp. 10069-74, Jun 12 2007.
- [89] H. P. Naber, Y. Drabsch, B. E. Snaar-Jagalska, P. ten Dijke, and T. van Laar, "Snail and Slug, key regulators of TGF-beta-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 435, no. 1, pp. 58-63, May 24 2013.
- [90] H. Peinado, M. Quintanilla, and A. Cano, "Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 278, no. 23, pp. 21113-23, Jun 6 2003.
- [91] D. Medici, E. D. Hay, and D. A. Goodenough, "Cooperation between snail and LEM-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 1871-9, Apr 2006.
- [92] J. Fuxe, T. Vincent, and A. Garcia de Herreros, "Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes," (in eng), *Cell Cycle*, vol. 9, no. 12, pp. 2363-74, Jun 15 2010.
- [93] C. S. Bond and A. H. Fox, "Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 186, no. 5, pp. 637-44, Sep 7 2009.
- [94] P. K. Lo, B. Wolfson, and Q. Zhou, "Cellular, physiological and pathological aspects of the long non-coding RNA NEAT1," (in eng), *Front Biol (Beijing)*, vol. 11, no. 6, pp. 413-426, Dec 2016.
- [95] M. Platani and A. I. Lamond, "Nuclear organisation and subnuclear bodies," (in eng), *Prog Mol Subcell Biol*, vol. 35, pp. 1-22, 2004.
- [96] K. Weis *et al.*, "Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells," (in eng), *Cell*, vol. 76, no. 2, pp. 345-56, Jan 28 1994.
- [97] J. S. Andersen *et al.*, "Directed proteomic analysis of the human nucleolus," (in eng), *Curr Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 1-11, Jan 8 2002.
- [98] A. H. Fox *et al.*, "Paraspeckles: a novel nuclear domain," (in eng), *Curr Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 13-25, Jan 8 2002.

- [99] K. V. Prasanth *et al.*, "Regulating gene expression through RNA nuclear retention," (in eng), *Cell*, vol. 123, no. 2, pp. 249-63, Oct 21 2005.
- [100] C. M. Clemson *et al.*, "An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles," (in eng), *Mol Cell*, vol. 33, no. 6, pp. 717-26, Mar 27 2009.
- [101] H. Sunwoo, M. E. Dinger, J. E. Wilusz, P. P. Amaral, J. S. Mattick, and D. L. Spector, "MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles," (in eng), *Genome Res*, vol. 19, no. 3, pp. 347-59, Mar 2009.
- [102] L. L. Chen and G. G. Carmichael, "Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA," (in eng), *Mol Cell*, vol. 35, no. 4, pp. 467-78, Aug 28 2009.
- [103] S. Cardinale, B. Cisterna, P. Bonetti, C. Aringhieri, M. Biggiogera, and S. M. Barabino, "Subnuclear localization and dynamics of the Pre-mRNA 3' end processing factor mammalian cleavage factor I 68-kDa subunit," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 18, no. 4, pp. 1282-92, Apr 2007.
- [104] R. H. Waterston *et al.*, "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome," (in eng), *Nature*, vol. 420, no. 6915, pp. 520-62, Dec 5 2002.
- [105] M. Kellis *et al.*, "Defining functional DNA elements in the human genome," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 17, pp. 6131-8, Apr 29 2014.
- [106] P. Carninci *et al.*, "The transcriptional landscape of the mammalian genome," (in eng), *Science*, vol. 309, no. 5740, pp. 1559-63, Sep 2 2005.
- [107] E. Birney *et al.*, "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project," (in eng), *Nature*, vol. 447, no. 7146, pp. 799-816, Jun 14 2007.
- [108] P. Kapranov *et al.*, "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription," (in eng), *Science*, vol. 316, no. 5830, pp. 1484-8, Jun 8 2007.
- [109] T. R. Mercer, M. E. Dinger, and J. S. Mattick, "Long non-coding RNAs: insights into functions," (in eng), *Nat Rev Genet*, vol. 10, no. 3, pp. 155-9, Mar 2009.
- [110] K. V. Prasanth and D. L. Spector, "Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum," (in eng), *Genes Dev*, vol. 21, no. 1, pp. 11-42, Jan 1 2007.

- [111] T. Derrien *et al.*, "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression," (in eng), *Genome Res*, vol. 22, no. 9, pp. 1775-89, Sep 2012.
- [112] T. M. Eidem, J. F. Kugel, and J. A. Goodrich, "Noncoding RNAs: Regulators of the Mammalian Transcription Machinery," (in eng), *J Mol Biol*, vol. 428, no. 12, pp. 2652-2659, Jun 19 2016.
- [113] A. M. Schmitt and H. Y. Chang, "Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways," (in eng), *Cancer Cell*, vol. 29, no. 4, pp. 452-463, Apr 11 2016.
- [114] K. C. Wang and H. Y. Chang, "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs," (in eng), *Mol Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 904-14, Sep 16 2011.
- [115] M. K. Iyer *et al.*, "The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome," (in eng), *Nat Genet*, vol. 47, no. 3, pp. 199-208, Mar 2015.
- [116] T. Chujo, T. Yamazaki, and T. Hirose, "Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1859, no. 1, pp. 139-46, Jan 2016.
- [117] S. C. Guru *et al.*, "A transcript map for the 2.8-Mb region containing the multiple endocrine neoplasia type 1 locus," (in eng), *Genome Res*, vol. 7, no. 7, pp. 725-35, Jul 1997.
- [118] C. Adriaens *et al.*, "p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity," (in eng), *Nat Med*, vol. 22, no. 8, pp. 861-8, Aug 2016.
- [119] D. Chakravarty *et al.*, "The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer," (in eng), *Nat Commun*, vol. 5, p. 5383, Nov 21 2014.
- [120] R. Myojin *et al.*, "Expression and functional significance of mouse paraspeckle protein 1 on spermatogenesis," (in eng), *Biol Reprod*, vol. 71, no. 3, pp. 926-32, Sep 2004.
- [121] A. H. Fox, C. S. Bond, and A. I. Lamond, "P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 16, no. 11, pp. 5304-15, Nov 2005.
- [122] Y. T. Sasaki, T. Ideue, M. Sano, T. Mituyama, and T. Hirose, "MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 8, pp. 2525-30, Feb 24 2009.

- [123] Y. Shav-Tal and D. Zipori, "PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins," (in eng), *FEBS Lett*, vol. 531, no. 2, pp. 109-14, Nov 6 2002.
- [124] B. Dong, D. S. Horowitz, R. Kobayashi, and A. R. Krainer, "Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 21, no. 17, pp. 4085-92, Aug 25 1993.
- [125] Y. S. Yang, J. H. Hanke, L. Carayannopoulos, C. M. Craft, J. D. Capra, and P. W. Tucker, "NonO, a non-POU-domain-containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of Drosophila nonAdiss," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 9, pp. 5593-603, Sep 1993.
- [126] Y. S. Yang, M. C. Yang, P. W. Tucker, and J. D. Capra, "NonO enhances the association of many DNA-binding proteins to their targets," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 25, no. 12, pp. 2284-92, Jun 15 1997.
- [127] S. Kuwahara *et al.*, "PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription," (in eng), *Biol Reprod*, vol. 75, no. 3, pp. 352-9, Sep 2006.
- [128] A. L. Amelio *et al.*, "A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 51, pp. 20314-9, Dec 18 2007.
- [129] J. G. Patton, E. B. Porro, J. Galceran, P. Tempst, and B. Nadal-Ginard, "Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor," (in eng), *Genes Dev*, vol. 7, no. 3, pp. 393-406, Mar 1993.
- [130] R. Peng, B. T. Dye, I. Perez, D. C. Barnard, A. B. Thompson, and J. G. Patton, "PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA," (in eng), *Rna*, vol. 8, no. 10, pp. 1334-47, Oct 2002.
- [131] S. Kameoka, P. Duque, and M. M. Konarska, "p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes," (in eng), *Embo j*, vol. 23, no. 8, pp. 1782-91, Apr 21 2004.
- [132] T. Ito *et al.*, "Brm transactivates the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene and modulates the splicing patterns of its transcripts in concert with p54(nrb)," (in eng), *Biochem J*, vol. 411, no. 1, pp. 201-9, Apr 1 2008.
- [133] S. Kaneko, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, and J. L. Manley, "The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-

- mRNA 3' processing and transcription termination," (in eng), *Genes Dev*, vol. 21, no. 14, pp. 1779-89, Jul 15 2007.
- [134] Z. Zhang and G. G. Carmichael, "The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs," (in eng), *Cell*, vol. 106, no. 4, pp. 465-75, Aug 24 2001.
- [135] X. Gao *et al.*, "Paraspeckle protein 1 (PSPC1) is involved in the cisplatin induced DNA damage response--role in G1/S checkpoint," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e97174, 2014.
- [136] I. M. Ward and J. Chen, "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 276, no. 51, pp. 47759-62, Dec 21 2001.
- [137] T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich, and P. A. Jeggo, "ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation," (in eng), *Cancer Res*, vol. 64, no. 7, pp. 2390-6, Apr 1 2004.
- [138] M. S. Huen and J. Chen, "Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites," (in eng), *Trends Biochem Sci*, vol. 35, no. 2, pp. 101-8, Feb 2010.
- [139] M. Meissner, T. Dechat, C. Gerner, R. Grimm, R. Foisner, and G. Saueremann, "Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB," (in eng), *J Cell Biochem*, vol. 76, no. 4, pp. 559-66, Jan 2000.
- [140] Y. Shav-Tal, B. C. Lee, S. Bar-Haim, H. Schori, and D. Zipori, "Reorganization of nuclear factors during myeloid differentiation," (in eng), *J Cell Biochem*, vol. 81, no. 3, pp. 379-92, 2001.
- [141] Y. Shav-Tal *et al.*, "Nuclear relocation of the pre-mRNA splicing factor PSF during apoptosis involves hyperphosphorylation, masking of antigenic epitopes, and changes in protein interactions," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 12, no. 8, pp. 2328-40, Aug 2001.
- [142] B. T. Dye and J. G. Patton, "An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 263, no. 1, pp. 131-44, Feb 1 2001.
- [143] L. Liu *et al.*, "Consensus PP1 binding motifs regulate transcriptional corepression and alternative RNA splicing activities of the steroid receptor coregulators, p54nrb and PSF," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 25, no. 7, pp. 1197-210, Jul 2011.

- [144] R. Yamamoto *et al.*, "Overexpression of p54(nrb)/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth," (in eng), *Oncotarget*, vol. 9, no. 12, pp. 10510-10524, Feb 13 2018.
- [145] P. Karhumaa *et al.*, "Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 21, pp. 16044-9, May 26 2000.
- [146] NCBI. (2019, Nov 3). *NONO non-POU domain containing octamer binding [Homo sapiens (human)]*. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4841>
- [147] S. Li *et al.*, "Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no. 20, pp. 6746-53, Nov 2009.
- [148] P. Barboro *et al.*, "Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis," (in eng), *Cell Oncol*, vol. 30, no. 1, pp. 13-26, 2008.
- [149] Y. M. Kim *et al.*, "Systemic analysis of tyrosine phosphorylated proteins in angiopoietin-1 induced signaling pathway of endothelial cells," (in eng), *J Proteome Res*, vol. 6, no. 8, pp. 3278-90, Aug 2007.
- [150] J. Clark *et al.*, "Fusion of splicing factor genes PSF and NonO (p54nrb) to the TFE3 gene in papillary renal cell carcinoma," (in eng), *Oncogene*, vol. 15, no. 18, pp. 2233-9, Oct 1997.
- [151] P. Y. Liu *et al.*, "Effects of a novel long noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc expression and neuroblastoma progression," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 106, no. 7, Jul 2014.
- [152] D. H. Pham *et al.*, "Protocadherin 19 (PCDH19) interacts with paraspeckle protein NONO to co-regulate gene expression with estrogen receptor alpha (ERalpha)," (in eng), *Hum Mol Genet*, vol. 26, no. 11, pp. 2042-2052, Jun 1 2017.
- [153] X. Dong, C. Yu, O. Shynlova, J. R. Challis, P. S. Rennie, and S. J. Lye, "p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gja1)," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 23, no. 8, pp. 1147-60, Aug 2009.
- [154] Z. Zhu *et al.*, "p54(nrb)/NONO regulates lipid metabolism and breast cancer growth through SREBP-1A," (in eng), *Oncogene*, vol. 35, no. 11, pp. 1399-410, Mar 17 2016.

- [155] J. Y. Lu and M. B. Sewer, "p54nrb/NONO regulates cyclic AMP-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mRNA splicing and degradation," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 35, no. 7, pp. 1223-37, Apr 2015.
- [156] M. Mathur, P. W. Tucker, and H. H. Samuels, "PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 21, no. 7, pp. 2298-311, Apr 2001.
- [157] K. Ishitani, T. Yoshida, H. Kitagawa, H. Ohta, S. Nozawa, and S. Kato, "p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 306, no. 3, pp. 660-5, Jul 4 2003.
- [158] S. Hisada-Ishii, M. Ebihara, N. Kobayashi, and Y. Kitagawa, "Bipartite nuclear localization signal of matrin 3 is essential for vertebrate cells," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 354, no. 1, pp. 72-6, Mar 2 2007.
- [159] T. Straub *et al.*, "The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 273, no. 41, pp. 26261-4, Oct 9 1998.
- [160] H. D. Morgan, F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik, "Epigenetic reprogramming in mammals," (in eng), *Hum Mol Genet*, vol. 14 Spec No 1, pp. R47-58, Apr 15 2005.
- [161] A. Hupalowska, A. Jedrusik, M. Zhu, M. T. Bedford, D. M. Glover, and M. Zernicka-Goetz, "CARM1 and Paraspeckles Regulate Pre-implantation Mouse Embryo Development," (in eng), *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1902-1916.e13, Dec 13 2018.
- [162] Z. Zhao *et al.*, "LncNONO-AS regulates AR expression by mediating NONO," (in eng), *Theriogenology*, Nov 7 2019.
- [163] K. Iino *et al.*, "RNA-binding protein NONO promotes breast cancer proliferation via posttranscriptional regulation of SKP2 and E2F8," (in eng), *Cancer Sci*, Nov 16 2019.
- [164] Z. Ren *et al.*, "Decreased expression of P54(nrb) /NonO correlates with collagen deposition and fibrosis in human aortic dissection," (in eng), *Histopathology*, vol. 65, no. 4, pp. 570-80, Oct 2014.
- [165] C. L. Bladen, D. Udayakumar, Y. Takeda, and W. S. Dynan, "Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 280, no. 7, pp. 5205-10, Feb 18 2005.

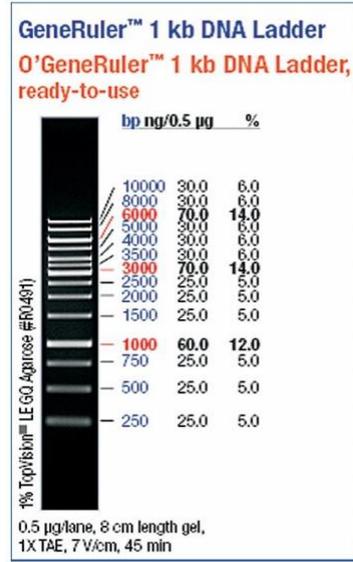
- [166] H. A. King *et al.*, "Remodelling of a polypyrimidine tract-binding protein complex during apoptosis activates cellular IRESs," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 21, no. 1, pp. 161-71, Jan 2014.
- [167] S. Stier *et al.*, "Identification of p54(nrb) and the 14-3-3 Protein HS1 as TNF-alpha-inducible genes related to cell cycle control and apoptosis in human arterial endothelial cells," (in eng), *J Biochem Mol Biol*, vol. 38, no. 4, pp. 447-56, Jul 31 2005.
- [168] M. Dreger, L. Bengtsson, T. Schoneberg, H. Otto, and F. Hucho, "Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 21, pp. 11943-8, Oct 9 2001.
- [169] A. Basu, B. Dong, A. R. Krainer, and C. C. Howe, "The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 17, no. 2, pp. 677-86, Feb 1997.
- [170] M. Hallier, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin, "The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 271, no. 19, pp. 11177-81, May 10 1996.
- [171] M. Marko, M. Leichter, M. Patrino-Georgoula, and A. Guialis, "hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 316, no. 3, pp. 390-400, Feb 1 2010.
- [172] C. St Gelais, J. Roger, and L. Wu, "Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein Negatively Regulates HIV-1 Infection in CD4(+) T Cells," (in eng), *AIDS Res Hum Retroviruses*, vol. 31, no. 8, pp. 806-16, Aug 2015.
- [173] Q. Li, H. Guo, H. Li, Q. Zhu, and Y. Liu, "P54/nrb prompts rheumatoid arthritis progression mainly by transcriptionally activating NF-kappaB signaling," (in eng), *Pharmazie*, vol. 72, no. 5, pp. 260-264, May 1 2017.
- [174] Z. Kozovska, V. Gabrisova, and L. Kucerova, "Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells," (in eng), *Neoplasma*, vol. 63, no. 4, pp. 510-7, 2016.
- [175] R. Schmid, K. Meyer, R. Spang, B. Schitteck, and A. K. Bosserhoff, "Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1," (in eng), *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 26, no. 5, pp. 685-96, Sep 2013.
- [176] S. Schiffner, N. Zimara, R. Schmid, and A. K. Bosserhoff, "p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma," (in eng), *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 8, pp. 1176-82, Aug 2011.

- [177] R. Schmid *et al.*, "Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice," (in eng), *Cell Death Dis*, vol. 1, p. e97, Nov 11 2010.
- [178] K. Hata *et al.*, "Paraspeckle protein p54nrb links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 118, no. 9, pp. 3098-108, Sep 2008.
- [179] R. Cheng *et al.*, "Downregulation of NONO induces apoptosis, suppressing growth and invasion in esophageal squamous cell carcinoma," (in eng), *Oncol Rep*, vol. 39, no. 6, pp. 2575-2583, Jun 2018.
- [180] K. J. L. D.Schmittgenb, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-408, December 2001.
- [181] T. Mahmood and P. C. Yang, "Western blot: technique, theory, and trouble shooting," (in eng), *N Am J Med Sci*, vol. 4, no. 9, pp. 429-34, Sep 2012.
- [182] S. Baysal, "NonO/p54nrb promotorunun klonlanması ve fonksiyonel analizi / Cloning of the human NonO/p54nrb promoter and functional analysis," Master, Biology, Balikesir University, Balikesir, 432795, 2016.
- [183] G. J. Knott, C. S. Bond, and A. H. Fox, "The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. 9, pp. 3989-4004, May 19 2016.
- [184] A. H. Fox and A. I. Lamond, "Paraspeckles," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, no. 7, p. a000687, Jul 2010.
- [185] J. N. Ihle, "Cytokine receptor signalling," (in eng), *Nature*, vol. 377, no. 6550, pp. 591-4, Oct 19 1995.
- [186] Y.-H. L. Sheng-Yi Lin, Hsuan-Yu Chen, Huei-Wen Chen, Sung-Liang Yu, Tse-Ming Hong, Gee-Chen Chang and Jeremy J.W. Chen, "Characterization of p54nrb/NonO promoter in NSCLC.," *AACR 104th Annual Meeting* vol. Volume 73, no. Issue 8, pp. 6-10, April 2013.
- [187] G. H. Qiu, X. Xie, F. Xu, X. Shi, Y. Wang, and L. Deng, "Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B," (in eng), *Cytotechnology*, vol. 67, no. 1, pp. 1-12, Jan 2015.


EKLER

EKLER

EK A: DNA ve RNA Büyüklük Belirteci




Şekil A. 1: DNA büyüklük belirteci (1kb).



Şekil A. 2: RNA büyüklük belirteci.

EK B Protein Büyüklük Belirteci



Şekil B. 1: Protein büyüklük belirteci.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Saliha Derya KESKİN

Doğum tarihi ve yeri : 09.08.1994 -BALIKESİR

e-posta : sdkeskin152@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017-2020
Lisans	Marmara Üniversitesi/Biyoloji	2012-2016
Lise	Zühtü Özkardaşlar Lisesi	2008-2012

Eğitim Bilgileri

Lisans: Biyoloji (2012-2016)

Pedagojik Formasyon: Biyoloji Eğitimi (2016)

Yüksek Lisans: Moleküler Biyoloji ve Genetik (2017-2020)

Tez Konusu: Hepatosellüler kanserde TGF-B'nın NONO/p54nrb gen ifadesine etkisinin belirlenmesi

Öğrenilmiş Bazı Metotlar: Hücre Kültürü, Real Time PZR, Geçici Transfeksiyon, Western Blot, Gen Klonlaması, MTT.

Bilgisayar Programları: Minitab14, Endnote, ImageJ, Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Powerpoint

Dereceler

Marmara Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2013

Marmara Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2014

Marmara Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2015

Marmara Üniversitesi Bölüm Üçüncüsü Mezuniyet Derecesi- 2016 (3.48/ 4.00)

Katıldığı Kurslar

Marmara Üniversitesi 2016 – Pedagojik Formasyon Programı

UÜTTO ve BAUN Prokob İşbirliğinde ‘‘ Let’s Up’’ Programı – 2016

Katıldığı Ulusal ve Uluslararası Kongre ve Sempozyumlar

Boğaziçi Üniversitesi V. Evrim, Bilim ve Eğitim Sempozyumu - 2015

Uludağ Üniversitesi Kanser Genetiği ve Moleküler Biyolojide Güncel Gelişmeler – 2017

Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik I. Kariyer Günleri – 2018

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi GENÇOMÜ Öğrenci Kongresi – 2018

BAUGEN I. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi – 2018

Uludağ Üniversitesi ‘‘Nöropsikiyatri ve Genetik Ulusal Öğrenci Sempozyumu – 2018

1. Ulusal Lise Öğrencileri Kongresi (ULOK 2018) – 2018 (Düzenleme Kurulu)

6th International Congress of the Molecular Biology Association Of Turkey, İzmir – 2018 (Poster Sunumu)