

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



PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTINDA NonO/p54^{nr}b GENİNİN
YBX1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU

MERVE ERCEVAHİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Prof. Dr. Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Prostat Kanseri Hücre Hattında NonO/p54^{nr}b Geninin YBX1 Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu**” başlıklı tezde;

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

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



**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2018- 179 nolu proje ve TÜBİTAK tarafından 119Z700 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

**PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTINDA NonO/p54^{nrb} GENİNİN YBX1
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MERVE ERCEVAHİR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)
BALIKESİR, ŞUBAT - 2021**

İnsanlarda kromozom 1'de 1p34.2 lokasyonunda bulunan YBX1 (Y Box Binding Protein-1) hem DNA hem de RNA bağlanma proteindir. Prostat kansinomasında artmış YBX1 seviyeleri tanımlanmıştır. NonO/p54^{nrb} (Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein), insanlarda kromozom X'te NONO geni olarak kodlanan multifonksiyonel bir proteindir ve çoğu kanser tipinde artmış ekspresyonu tespit edilmiştir. Prostat kanseri, her yıl yaklaşık 1.600.000 vaka ve 366.000 ölümlle dünya çapında erkeklerde en yaygın görülen kanser tipidir. Erkeklerde malignite ile kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Hipoksi agresif bir fenotip ile ilişkili prostat kansinogenezinde kilit öncüdür. Grubumuz öğrencilerinden Sevgi Baysal tarafından 2016 yılında tamamlanan yüksek lisans çalışmasında NonO/p54^{nrb} prostat kanserinde hipoksik koşullarda yüksek ifade olduğu gösterilmiştir. Çalışmamda prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde hem normal hem de hipoksik koşullarda NonO/p54^{nrb} geninin YBX1 transkripsiyon faktörü tarafından hedef alınıp alınmadığı ve hipoksi ile regüle olup olmadığı araştırılmıştır. Hipoksik koşullar için PC-3 hücre hattında CoCl₂ ile kimyasal hipoksi oluşturulmuş ve bu koşullar HIF-1 α mRNA seviyesinin Real Time PCR analiziyle doğrulanmıştır. Tez çalışmamız kapsamında PC-3 hücre hattında YBX1'in NonO/p54^{nrb} promotor parçaları üzerindeki transkripsiyonel aktiviteye olan etkisi ve ayrıca etkinin mRNA ve protein seviyeleri de incelenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda YBX1' in NonO/p54^{nrb} transkripsiyonel aktivitesine, mRNA ve protein seviyesine indükleyici etkisi hipoksik koşullarda 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: YBX1, NonO/p54^{nrb}, prostat kanseri, hipoksi, western blot.

ABSTRACT

REGULATION OF NonO/p54^{nrb} GENE WITH YBX1 TRANSCRIPTION FACTOR IN PROSTATE CANCER CELL LINE

MSC THESIS

MERVE ERCEVAHIR

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SUMEYYE AYDOGAN TURKOGLU)

BALIKESİR, FEBRUARY - 2021

YBX1 (Y Box Binding Protein-1), located at the 1p34.2 location on chromosome 1 in humans, is both DNA and RNA binding protein. Increased YBX1 levels have been described in prostate carcinoma. NonO/p54^{nrb} (Non-POU Domain Containing Octamer-Binding Protein) is multifunctional protein encoded as the NONO gene on chromosome X in humans, and its increased expression has been detected in most types of cancer. Prostate cancer is the most common type of cancer in men worldwide, with approximately 1,600,000 cases and 366,000 deaths each year. Hypoxia is critical in prostate carcinogenesis associated with an aggressive phenotype. In the postgraduate study completed by Sevgi Baysal, one of our group's students, in 2016, it was shown that NonO/p54^{nrb} prostate cancer has high expression in hypoxic conditions. In my study, it was investigated whether the NonO/p54^{nrb} gene is targeted by the YBX1 transcription factor and regulated by hypoxia in PC-3, which is a prostate cancer cell line, in both normal and hypoxic conditions. For hypoxic conditions, chemical hypoxia was induced by CoCl₂ in the PC-3 and these conditions were confirmed by Real Time PCR analysis of the HIF-1 α mRNA level. Within the scope of our thesis study, the effect of YBX1 on the NonO/p54^{nrb} promoter fragments on transcriptional activity in the PC-3, as well as the mRNA and protein levels of the effect were investigated. As a result, in our study, the inducing effect of YBX1 on NonO/p54^{nrb} transcriptional activity, mRNA and protein level was determined in 24, 48 and 72 hours under hypoxic conditions.

KEYWORDS: YBX1, NonO/p54^{nrb}, prostate cancer, hypoxia, western blot.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Y Box Binding Protein-1 (Nükleaza Duyarlı Element Bağlayıcı Protein-1/Y-Kutusu Transkripsiyon Faktörü-1 (YBX1))	1
1.1.1 YBX1' in Bazı Transkripsiyonel Etkileşimleri.....	3
1.1.2 YBX1' in Farklı Kanserler ile İlişkisi.....	9
1.2 Paraspeckles ve DBHS Protein Ailesi	14
1.2.1 Kanserdeki DBHS Proteinleri	15
1.2.2 NonO/p54 ^{nrb}	15
1.2.3 NonO/p54 ^{nrb} ' nin Farklı Kanserler ile İlişkisi.....	17
1.2.4 NonO/p54 ^{nrb} Promotor Yapısı ve İlgili Gende YBX1 Regülasyonu	18
1.3 Hipoksi (Hypoxia)	19
1.3.1 Hipoksinin Kansere Progresyonundaki Rolü ve HIF-1 α Regülasyonu	20
1.3.2 Prostat Kanserinde HIF-1 α Regülasyonu.....	22
1.3.3 HIF-1 α ve YBX1 Regülasyonu.....	23
1.3.4 HIF-1 α ve NonO/p54 ^{nrb} Regülasyonu.....	24
1.4 Tez Çalışmamızın Amacı.....	24
2. MATERYAL VE METOT	28
2.1 Materyal	28
2.1.1 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Kimyasal Maddeler ve Kitler	28
2.1.2 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Araç- Gereçler	29
2.1.3 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Hücre Hattı	30
2.2 Metot	30
2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Alanların ve Malzemelerin Sterilizasyonu.....	30
2.2.2 YBX1 ve NonO/p54 ^{nrb} Genlerinin Biyoinformatik Analizleri ve Çalışmada Kullanılan Diğer Primerler.....	30
2.2.3 Hücre Kültürü Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	32
2.2.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	32
2.2.3.2 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlama İşlemi	32
2.2.3.3 Canlı Hücrelerin Sayımı	33
2.2.3.4 İlgili Hücrelerle Deney Kurulması ve Hipoksik Koşulun Sağlanması.....	33
2.2.3.5 Hücrelerin Dondurulması	34
2.2.4 DNA Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	34
2.2.4.1 YBX1 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxi Prep).....	34
2.2.4.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Tayini	35
2.2.4.3 YBX1 Plazmit DNA Kesimi	35

2.2.5 RNA Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	35
2.2.5.1 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu Yöntemi ile Transfeksiyon Deneyleri	35
2.2.5.2 RNA İzolasyonu	36
2.2.5.3 Spektrofotometre ile RNA Miktarının Hesaplanması	36
2.2.5.4 Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA Jeli)	36
2.2.5.5 cDNA Sentezi	37
2.2.5.6 PCR (Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışması ile cDNA Kontrolü	38
2.2.5.7 Agaroz Jel Elektroforezi	39
2.2.5.8 Real Time PCR	39
2.2.6 Bazal Transkripsiyonel Aktivite Tayini Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar ..	40
2.2.6.1 Transfeksiyon Deneyleri	40
2.2.6.2 Lusiferaz Aktivite Tayini	41
2.2.6.3 SEAP (Secreted Alkaline Phosphatase Assay/Salgılanan Alkalın Fosfataz) Aktivite Tayini	41
2.2.7 Protein Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	42
2.2.7.1 Transfeksiyon Deneyleri	42
2.2.7.2 RIPA Buffer ile Protein Ekstraktlarının Hazırlanması	42
2.2.7.3 Protein Miktar Tayini	42
2.2.7.4 Western Blot	43
2.2.7.5 İmmünofloresans Teknik ile NonO/p54 ^{nrb} Proteininin Hücre İçinde Lokalizasyonunun Belirlenmesi	46
3. BULGULAR	49
3.1 NonO/p54 ^{nrb} Geni ve YBX1 Transkripsiyon Faktörünün Biyoinformatik Analizleri ..	49
3.2 YBX1' in NonO/p54 ^{nrb} Geninin mRNA Seviyesindeki Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları	53
3.3 NonO/p54 ^{nrb} ' nin Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları	57
3.3.1 YBX1 Plazmit İzolasyonu	57
3.3.2 NonO/p54 ^{nrb} Promotor Konstraktlarının Restriksiyon Endonükleaz Kontrol Kesimi	58
3.3.3 Lusiferaz-SEAP Aktivite Tayini	58
3.4 YBX1' in NonO/p54 ^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları	62
3.4.1 YBX1' in NonO/p54 ^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu Western Blot Yöntemiyle Belirleme Çalışmaları	62
3.4.2 YBX1' in NonO/p54 ^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu İmmünofloresans Teknik ile Belirleme Çalışmaları	65
4. TARTIŞMA-SONUÇ	70
5. KAYNAKLAR	74
EKLER	84
EK A: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri	84
EK B: Kullanılan Vektörler	86
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kromozom 1' de YBX1 lokalizasyonu [2].	1
Şekil 1.2: YBX1' in çeşitli dokularda ifade profilleri [1].	1
Şekil 1.3: YBX1' in genomik organizasyonu [4].	2
Şekil 1.4: YBX1 yapısı [6].	2
Şekil 1.5: HeLa hücrelerinde paraspeckles yapılar [58].	14
Şekil 1.6: X kromozomunda NonO/p54 ^{nrb} lokalizasyonu [64].	15
Şekil 1.7: NonO/p54 ^{nrb} ' nin çeşitli dokularda ifade profilleri [63].	16
Şekil 1.8: Sarkoma metastazında HIF ve YBX1 regülasyonu [95].	23
Şekil 1.9: Tez çalışmamızın akış diyagramı.	27
Şekil 2.1: NonO/p54 ^{nrb} promotor parçalarının temsili diyagramı.	41
Şekil 3.1: Tez çalışmamızda kullanılan insan NonO/p54 ^{nrb} promotor bölgede (P1 (-730 / +529)) MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesinin işaretlendiği temsili diyagram.	49
Şekil 3.2: Tez çalışmamızda kullanılan insan NonO/p54 ^{nrb} promotor konstrakta (P2 (-516 / +529)) MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesinin işaretlendiği temsili diyagram.	50
Şekil 3.3: Tez çalışmamızda kullanılan insan NonO/p54 ^{nrb} promotor konstrakta (P3 (-336 / +529)) MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesinin işaretlendiği temsili diyagram.	50
Şekil 3.4: Tez çalışmamızda kullanılan insan NonO/p54 ^{nrb} promotor konstrakta (P4 (-159 / +529)) MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesinin işaretlendiği temsili diyagram.	50
Şekil 3.5: Tez çalışmamızda kullanılan YBX1 mRNA dizisi ve ifade analizlerinde kullanılan primer bölgeleri.	51
Şekil 3.6: NonO/p54 ^{nrb} ve H β 2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	52
Şekil 3.7: YBX1 ve H β 2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	53
Şekil 3.8: RNA jel elektroforez görüntüsü.	54
Şekil 3.9: H β 2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan kontrol PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	54
Şekil 3.10: Kontrol ve YBX1 transfekte PC-3 hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonu ile hipoksik koşulların doğrulanması.	55
Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında YBX1' in ektopik ifadesi.	56
Şekil 3.12: PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1' in NonO/p54 ^{nrb} mRNA seviyesine etkisi.	56
Şekil 3.13: Kesime tabi tutulmuş ve kesime tabi tutulmamış YBX1 plazmit DNA jel elektroforez görüntüsü.	57
Şekil 3.14: Kesime tabi tutulmuş NonO/p54 ^{nrb} pomotor konstraktlarının DNA jel elektroforez görüntüsü.	58
Şekil 3.15: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54 ^{nrb} P1 promotor bölgesinin (-730/+529) transkripsiyonel aktivitesi.	60
Şekil 3.16: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54 ^{nrb} P2 promotor bölgesinin (-516/+529) transkripsiyonel aktivitesi.	60
Şekil 3.17: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54 ^{nrb} P3 promotor bölgesinin (-336/+529) transkripsiyonel aktivitesi.	61

Şekil 3.18: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54 ^{nrb} P4 promotor bölgesinin (-159/+529) transkripsiyonel aktivitesi.	61
Şekil 3.19: PC-3 hücre hattında NonO/p54 ^{nrb} protein seviyesinin 24 saatte belirlenmesi.	63
Şekil 3.20: PC-3 hücre hattında NonO/p54 ^{nrb} protein seviyesinin 48 saatte belirlenmesi.	64
Şekil 3.21: PC-3 hücre hattında NonO/p54 ^{nrb} protein seviyesinin 72 saatte belirlenmesi.	65
Şekil 3.22: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan normoksik kontrol grup mikroskop görüntüleri.	66
Şekil 3.23: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan hipoksik kontrol grup mikroskop görüntüleri.	67
Şekil 3.24: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan normoksik YBX1 transfekte grup mikroskop görüntüleri.	68
Şekil 3.25: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan hipoksik YBX1 transfekte grup mikroskop görüntüleri.	69
Şekil 4.1: Tez çalışmamızda kullanılan NonO/p54 ^{nrb} promotor konstraktlarda YBX1 transkripsiyon faktörünün olası bağlanma dizisi MIA ve Y-box bölgelerinin basit diyagramda gösterimi.	72
Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA marker.	84
Şekil A.2: Thermo Scientific 100 bp DNA marker.	84
Şekil A.3: PageRuler Prestained Protein marker.	85
Şekil B.1: pGEM TM -T Easy vektör haritası (Promega).	86
Şekil B.2: pcDNA3.1 vektör haritası (Invitrogen Life Technologies).	87
Şekil B.3: pMetLuc-Reporter vektör haritası (Clontech).	88
Şekil B.4: SEAP-2 kontrol vektör haritası.	89

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Tez çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler/kitler.....	28
Tablo 2.2: Tez çalışmamızda kullanılan araç-gereçler.....	29
Tablo 2.3: Tez çalışmamızda kullanılan ekspresyon primerleri.....	31
Tablo 2.4: Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu için gerekli solüsyonlar ve içerik bilgileri. ...	35
Tablo 2.5: Formaldehit jel elektroforez çözeltileri.....	37
Tablo 2.6: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve koşullar.....	37
Tablo 2.7: H β 2 primerleri için PCR koşulları.....	38
Tablo 2.8: NonO/p54 ^{nrb} primerleri için PCR koşulları.....	38
Tablo 2.9: YBX1 primerleri için PCR koşulları.....	38
Tablo 2.10: Agaroz jel elektroforez çözeltileri.....	39
Tablo 2.11: Real time PCR reaksiyon bileşen ve miktarları.....	40
Tablo 2.12: Real time PCR döngü koşulları.....	40
Tablo 2.13: RIPA buffer solüsyon içeriği.....	42
Tablo 2.14: Lower buffer solüsyon içeriği.....	43
Tablo 2.15: Upper buffer solüsyon içeriği.....	43
Tablo 2.16: Ayırma jeli (alt jel) içeriği.....	43
Tablo 2.17: Yığıma jeli (üst jel) içeriği.....	43
Tablo 2.18: 10X Running buffer solüsyon içeriği.....	44
Tablo 2.19: 1X Running buffer solüsyon içeriği.....	44
Tablo 2.20: Transfer buffer solüsyon içeriği.....	44
Tablo 2.21: 10X TBS içeriği.....	44
Tablo 2.22: 1X TBS içeriği.....	44
Tablo 3.1: YBX1 plazmit DNA kesim planı.....	57
Tablo 3.2: NonO/p54 ^{nrb} pomotor konstraktlarının kesim planı.....	58

SEMBOL LİSTESİ

ΔNp63α	: p63 gen izoformu
3' UTR	: 3' translate edilmemiş bölge
A/P domain	: Alanin/prolin zengin domain
AP-1	: Aktivatör protein-1
AS	: Alternatif ekleme
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CDC6	: Hücre bölünmesi kontrol protein 6
circRNA	: Dairesel RNA
CK2α	: Protein kinaz CK2 alfa
CLU	: Clusterin
c-myc	: MYC proto-onkogeni
CO₂	: Karbondioksit
CoCl₂	: Kobalt klorür
CRC	: Kolorektal kanser
CSD	: Cold shock domain
CTCF	: CCCTC bağlama faktörü
CTD	: C-terminal domain
DBHS	: Drosophila behaviour/human splicing protein ailesi
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DMEM	: Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
EMT	: Epitelyal-mezenşimal geçiş
ESCC	: Özofagus yassı epitel hücreli karsinom
EtBr	: Etidyum bromür
FCS	: Fetal sığır serum
G1/S	: Hücre döngüsü kontrol noktaları
G2/M	: DNA hasar kontrol noktası
HaCat	: Keratinosit hücre hattı

HCC	: Hepatosellüler karsinom
HER-2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör-2
HIF-1	: Hipoksiyle indüklenen faktör-1
HIV-1	: Edinilmiş bağışıklık yetmezliği virüsü-1
HnRNP	: Heterojen nükleer ribonükleoprotein
Hβ2	: Human beta-2 microglobulin
IFN	: İnterferon
IL-6	: İnterlökin-6
IRP2	: Demir düzenleyici protein 2
kb	: Kilo baz çifti
lncRNA	: Uzun kodlama yapmayan RNA
LUAD	: Akciğer adenokarsinomu
MDR1	: Çoklu ilaç direnci 1 geni
MIA	: Melanoma inhibitör aktivite protein
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MMR	: DNA baz uyumsuzluğu onarımındaki eksiklikler
mRNA	: Mesajcı RNA
mRNP	: Haberci ribonükleoprotein
mtDNA	: Mitokondriyal genom
NCBI	: National center for biotechnology information
NonO/p54^{nrb}	: non-POU domain içeren nükleer RNA bağlanma proteini
NPC	: Nazofaringeal karsinom
p16	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p53	: Tümör proteini p53
PBS	: Fosfat buffer salin
PC-3	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
PCa	: Prostat kanseri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PSF	: Human splicing factor
PSPC1	: Paraspeckles protein-1
RCC	: Renal hücreli karsinoma
RNA	: Ribonükleik asit
ser102	: Serin amino asidi 102 rezidüsü

ser165	: Serin amino asidi 165 rezidüsü
ser176	: Serin amino asidi 176 rezidüsü
Siklin D1	: CCND1 geni tarafından kodlanan protein
TE	: Tripsin-EDTA
TGF-β1	: Transforme edici büyüme faktörü- β 1
TKO	: Transkripsiyonel nakavt inhibitör
YBX1	: Y-kutusu transkripsiyon faktörü-1
ZF	: Çinko parmağı (transkripsiyon faktörleri)



ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecimin tüm deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamın her basamağında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, sonsuz ilgi ve sevgisiyle her zaman yanımda hissettiğim canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU' na,

Tez çalışmalarım boyunca engin bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' a,

Lisans eğitim sürecim boyunca bizleri en donanımlı şekilde yetiştirmek adına emekleri tartışılmaz olan Doç. Dr. Hatice YILDIRIM eşliğinde bölümümüzün tüm değerli hocalarına,

Laboratuvar çalışmalarım ve her akademik faaliyetimde bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman ilgili olan, değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Derya BABACAN, Dr. Esra TOKAY ve Araş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU' na,

Zorlu laboratuvar günlerinde sevgi ve desteğini her zaman üzerimde hissettiğim canım hocam Fatma POYRAZLI' ya,

Çok şey paylaştığım canım arkadaşım Hatice ERDOĞAN' a,

Laboratuvarda birlikte çalıştığım diğer tüm ekibe,

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

Ve hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de beni yalnız bırakmayıp, sonsuz sabırla beni destekleyen aileme,

Ve bize bilim yapılacak güzellikte bir vatan emanet eden Ulu Önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK' e,

Sonsuz teşekkürler...

Balıkesir, 2021

Merve ERCEVAHİR

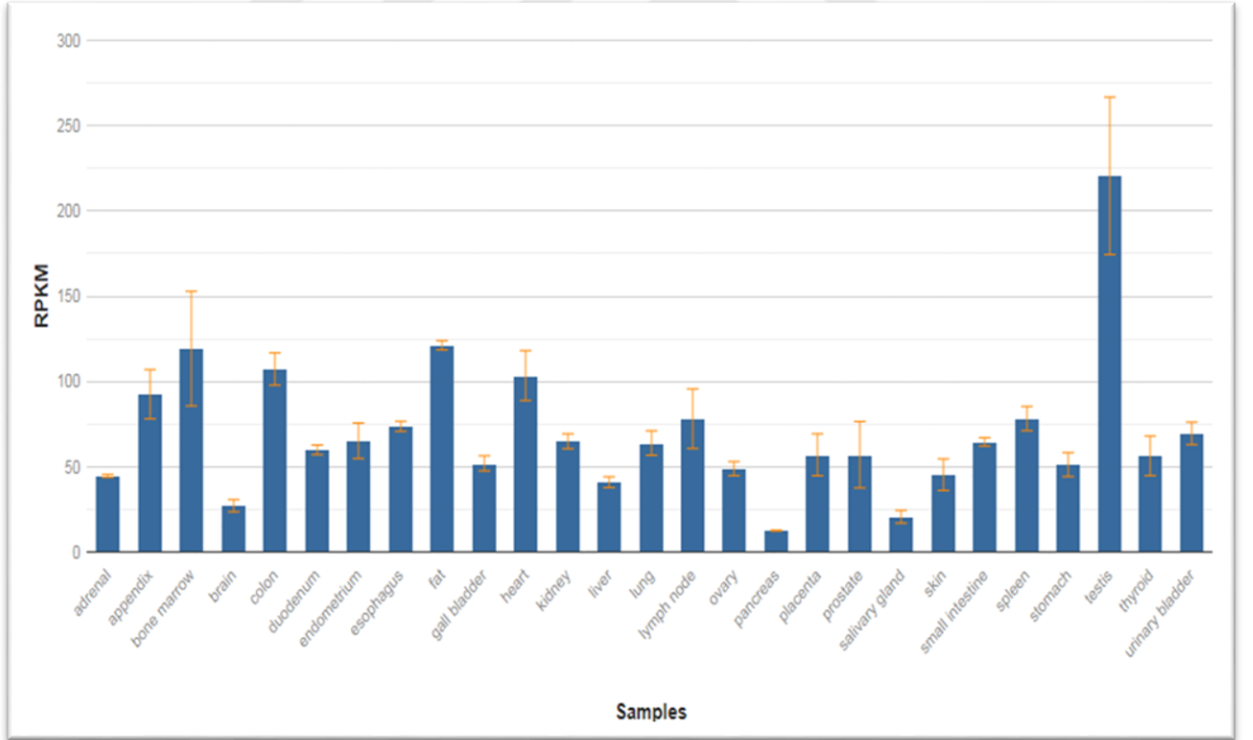
1. GİRİŞ

1.1 Y Box Binding Protein-1 (Nükleaza Duyarlı Element Bağlayıcı Protein-1/Y-Kutusu Transkripsiyon Faktörü-1 (YBX1))

İnsanlarda kromozom 1' de 1p34.2 lokasyonunda bulunan YBX1 geniyle kodlanan Y Box Binding Protein-1, Nükleaza Duyarlı Element Bağlayıcı Protein-1/Y-Kutusu Transkripsiyon Faktörü-1 isimleriyle de anılır (Şekil 1.1). YBX1 geni; nazal epitelyum, kemik iliği stromal hücrelerinde ve testislerde aşırı eksprese edilir. Ayrıca pankreas, beyin, bağırsak, adrenal bez, yağ gibi pek çok diğer dokuda ifadesi mümkündür (Şekil 1.2) [1].

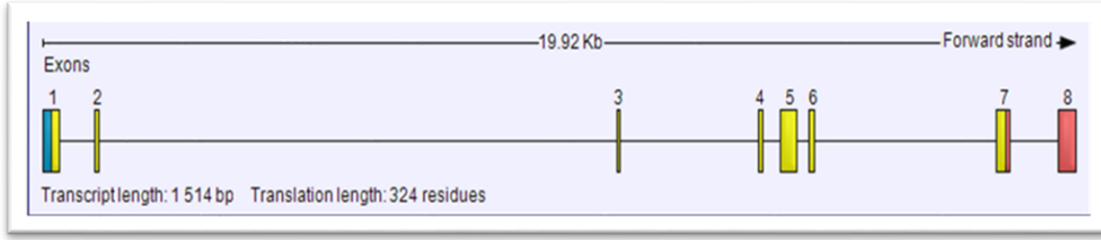


Şekil 1.1: Kromozom 1' de YBX1 lokalizasyonu [2].



Şekil 1.2: YBX1' in çeşitli dokularda ifade profilleri [1].

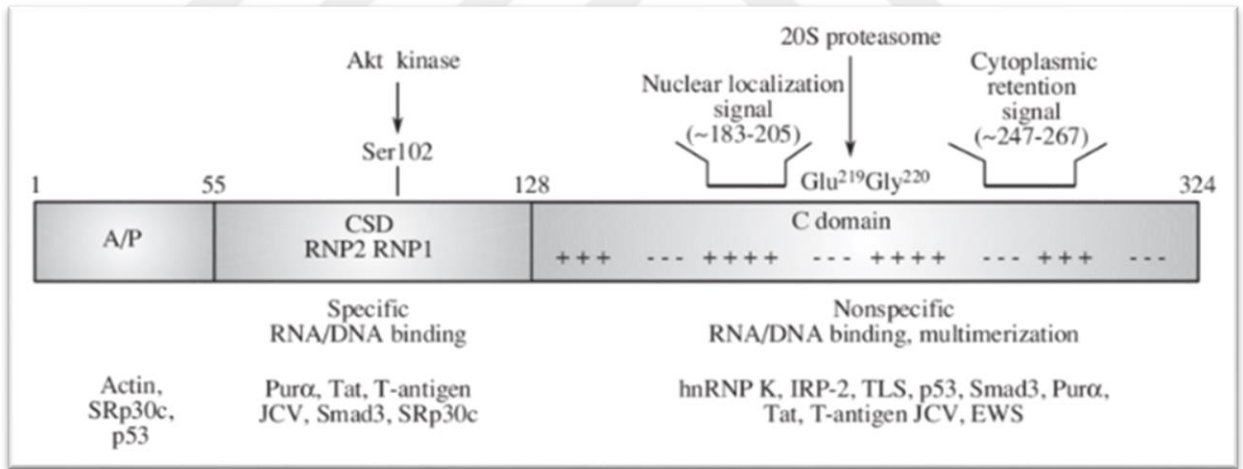
Sekans analizi çalışmaları, insan YBX1' in yaklaşık 19 kb genomik DNA' yı kapsadığını ve sekiz ekzon içerdiğini ortaya koymuştur (Şekil 1.3) [3].



Şekil 1.3: YBX1' in genomik organizasyonu [4].

Bu gen, geniş nükleik asit bağlama özelliklerine sahip, yüksek ölçüde korunmuş bir cold shock domain proteinini kodlar [1]. Cold shock domain, 1- 5 ekzonları tarafından kodlanır [5].

YBX1 üç domainden oluşur: Pozitif ve negatif yüklü amino asit kümelerini içeren N-terminal A/P (ala/pro zengin) domaini; CSD (cold shock domaini) ve CTD (C-terminal domaini). Bilinen bazı moleküler partnerleri ve etkileşimlerinin yerleri Şekil 1.4' teki gibidir. CTD domaininde gösterilen ok, proteasomal bölünme bölgelerini işaret eder.



Şekil 1.4: YBX1 yapısı [6].

A/P domaini ile Actin, p53 gibi önemli genler etkileşebilmekteyken; Cold shock domaininde Akt kinaz aracılı ser102 rezidüsünde gerçekleşen fosforilasyonlar aracılığıyla spesifik DNA/RNA bağlanma mekanizmaları aktive olur. C-terminal domaininde, spesifik olmayan DNA/RNA bağlanmaları gözlenirken; genelde hedef sinyal içerikli alanları teşkil eder [6]. YBX1, hem bir DNA hem de RNA bağlanma proteini olarak işlev görürken; transkripsiyon ve translasyon, pre-mRNA ekleme, DNA onarımı ve mRNA paketlemesinin

düzenlenmesi dahil olmak üzere çok sayıda hücrenel işlemde rol oynar [1]. Bu mekanizmaları da fosforilasyon, ubikütilasyon, asetilasyon ve metilasyon reaksiyonlarıyla regüle eder [7].

YBX1 aynı zamanda mRNP (haberci ribonükleoprotein) komplekslerinin bir bileşenidir ve mikroRNA işlemede bir role sahip olabilir. Klasik olmayan yollardan salgılanabilmekteyken, hücre dışı bir mitojen olarak işlev görebilir. Anormal ekspresyonu ise; çeşitli dokularda kanser proliferasyonu ile ilişkilidir. Bu gen, belirli kanserlerde kötü sonuç ve ilaç direnci için bir prognostik belirteç olabilir. Bu genin psödogeni çoklu kromozomlarda bulunur [1].

YBX1' in aşırı ifadesi, insan malign hastalıklarının bir belirteçidir. Örneğin, pankreatik adenokarsinom, metastatik prostat karsinomu, yumurtalık karsinomu, medulloblastom ve malign melanomda artmış YBX1 mRNA seviyeleri tanımlanmıştır. Sonuçta YBX1, çeşitli kanserlerin çok sayıda habis fenotipinde rol oynadığı bilinen bir proteindir [8].

1.1.1 YBX1' in Bazı Transkripsiyonel Etkileşimleri

CTCF (CCTC-Bağlanma Faktörü), yüksek oranda korunmuş ve hemen hemen her dokuda ifade edilen birden fazla DNA bölgesi spesifitesine sahip bir ZF (çinko parmak) transkripsiyonel faktördür. Promotör aktivasyonu veya baskılanması gibi düzenleyici mekanizmaların gerçekleştirilmesi için değişen hedef dizilere bağlanabilir. Transkripsiyon, replikasyon ve RNA işleminde rol oynadığı bilinen YBX1, çok fonksiyonlu Y-kutusu DNA/RNA bağlayıcı faktör olarak tanımlanmıştır. *In vivo* CTCF ve YBX1 komplekslerinin oluştuğu gözlenmiştir. Tek başına YBX1 ekspresyonunun hiçbir etkisi olmamasına rağmen, CTCF ile birlikte regülasyon, CTCF-odaklı c-myc transkripsiyonel baskısının belirgin bir şekilde artmasına neden olmuştur. Tümör oluşumu hem CTCF hem de YBX1' i içerir. Aynı zamanda CTCF, c-myc onkogeninin disregülasyonuna sebep olur. Öte yandan, YBX1 ekspresyonu ile meme kanseri, kolorektal karsinom, yumurtalık seröz adenokarsinom da dahil olmak üzere birçok tümörde malign fenotip gelişimi arasında bir korelasyon kurulmuştur. Birlikte ele alındığında, bu veriler, deregüle ve/veya anormal CTCF/YBX1 etkileşimlerinin, tümör gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir [9].

HnRNP (heterojen nükleer ribonükleoprotein) parçacıklarının bir bileşeni olan hnRNP K ile YBX1' in fonksiyonel olarak benzer proteinler olduğuna dair birçok gösterge vardır.

Hücre tipine ve hücre içi ortam spesifitesine bağlı olmak kaydıyla poliprimidin bakımından zengin DNA motifleri ile birlikte regülasyonları ortaya konmuştur [10].

Ökaryotik YBX1; DNA onarımı, hücre proliferasyonu ve transkripsiyon ve translasyon kontrolleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde işlev görür. İnsan YBX1' in pleiotropik (bir genin birden fazla farklı işlev gösterebilmesi) fonksiyonlarda nasıl rol oynadığına dair daha fazla bilgi edinmek için, hibrit taramalar kullanılmıştır. Sonuçlar YBX1' in, IRP2 (demir düzenleyici protein 2)' nin regülatörü olduğunu göstermiştir. Hem *in vitro* bağlanma hem de ko- immünopresipitasyon analizleri, yüksek konsantrasyonda demir varlığında YBX1 ve IRP2' nin doğrudan etkileşimini göstermiştir [11].

YBX1; transkripsiyon, RNA ekleme, translasyon, DNA onarımı, ilaç direnci ve stres yanıtları gibi çok çeşitli hücresel olaylara katılır. HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) replikasyonunda da YBX1' in varsayılan fonksiyonları araştırılmıştır. Proviral DNA transfeksiyonu ile birlikte YBX1' in aşırı ekspresyonu veya yıkımı kullanılarak yapılan fonksiyonel analizler, YBX1' in virüs üretimini arttırdığını göstermiştir. 36 kDa proteini olan YBX1' in viral transkripsiyonu uyararak HIV-1 üretimini düzenlediği bulunmuştur. Ayrıca virionların üretimine katılımı için gereken YBX1' in 1 ila 324 amino asitlerinden spesifik bir bölge belirlenmiştir [12].

YBX1 MajSAT (uydu) RNA' ya bağlanan bir protein olarak tanımlanmıştır. MajSAT RNA, stres koşulları altında YBX1' in nükleer translokasyonunu inhibe eder; böylece DNA hasar onarım işlevini azaltır. YBX1' in indüklenmiş ekspresyonu anormal fenotipleri önemli ölçüde azaltır. Bu bulgular, kanser gelişiminin erken safhasında, uydu transkriptlerinin, onkojenik süreçlerde önemli olabilecek YBX1 disfonksiyonunu indükleyerek "intrinsik mutajenler" olarak hareket edebileceğini göstermektedir [13].

mtDNA (mitokondriyal genom)' nın korunması, uygun hücresel fonksiyon için gereklidir. mtDNA' da hasar ve mutasyon birikimi hastalıklara, kansere ve yaşlanmaya yol açar. DNA baz uyumsuzluğu onarımındaki eksiklikler (MMR), DNA mikrosatellit instabilitesi, mutasyon birikimi ve kanser ile ilişkilidir. İnsan mitokondrilerinde MMR proteinleri ve fonksiyonu henüz saptanmamıştır. Bir çalışmada YBX1 mitokondriyal uyumsuzluğu bağlayan bir protein olmak üzere aday olarak belirlenmiştir. Bu protein, insan hücrelerindeki mitokondriye lokalize olur ve HeLa mitokondriyal ekstraktlarında saptanan

uyumsuzluk aktivitesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Ayrıca, hücrelerde YBX1 yıkımı mitokondriyal DNA mutajenezini artırır. Sonuçlar, insan mitokondrilerinin, muhtemelen uyumsuzluk tanıma adımlarında YBX1' in katıldığı fonksiyonel bir MMR onarım yolu içerdiğini göstermektedir [14].

IFN-gama (interferon gama), sınıf II MHC (majör histo-uyumluluk kompleksi) genlerinin en güçlü indükleyicisidir. Bu indüksiyona, sınıf II MHC genlerinin promotör bölgesindeki üç DNA elemanı aracılık eder. Bu DNA elemanlarından biri olan γ , ters bir CCAAT kutusu içerir. Daha önce tanımlanmış YBX1 geninin, sınıf II MHC promotörünün IFN-gama indüksiyonunu ve ayrıca promotöründe bir γ elementi içeren Ii (invariant chain) genini baskılayabildiğine dair kanıtlar sunulmuştur [15].

YBX1 hücre tipine bağlı bir şekilde salgılanır. YBX1' in lokalizasyonu IL-6 (pleiotropik sitokin interlökin-6)' nın üretimini etkiler. Makrofajlarda ve dendritik hücrelerde yapılan çalışmalarla, YBX1 aracılı IL-6 mRNA üretiminin hücre tipine bağlı olduğu ve YBX1' in diferansiyel lokalizasyon paternleri ile sıkı bir şekilde düzenlendiği ortaya konmuştur. Sonuçta, YBX1' in makrofajlardaki hücre içi IL-6 mRNA seviyelerini negatif olarak düzenlediği, makrofajlardaki hücre içi IL-6 mRNA seviyelerini kontrol etmek için aktif olarak hücre dışı boşluğa sitosolik IL-6 mRNA salgıladığı gözlenirken; dendritik hücrelerde IL-6 mRNA stabilizasyonunu da sağladığı rapor edilmiştir [16].

MMP (matriks metalloproteinaz)' ler; gelişme, doku yeniden modellenmesi ve patojenik hastalık durumlarında hücre istila sırasında hücre dışı matriksin bozunmasını uygulayan anahtar enzimlerdir. MMP-13, metastatik kanser ve artrit patogenezinde önemli rollere sahiptir. YBX1, MMP-13 transaktivasyonunun yeni bir baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır. YBX1, *in vitro* olarak DNA affinite kromatografisinde, MMP-13 promotörü içindeki AP-1 (Aktivatör Protein-1) DNA sekansına bağlanır. Kromatin immünopresipitasyon deneyleri, YBX1' in canlı hücrelerdeki MMP-13 gen promotörüne AP-1 bölgesini içeren kısma bağlandığını gösterir. YBX1, AP-1 sahasında tümör promotörünün neden olduğu MMP-13 promotör transaktivasyonunu baskılar [17].

YBX1' in aşırı ekspresyonu; EGFR, HER-2 ve CDC6 dahil olmak üzere çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive eder, böylece YBX1 hücre proliferasyonunu destekler. Ayrıca, daha önce YBX1' in, siklin D1 transkripsiyonunu aktive ettiği ve p16 transkripsiyonunu

baskıladığı, böylece G1/S faz hücre döngüsü geçişini desteklediği gösterilmiştir. TKO hücrelerde YBX1 susturulmasının siklin D1 mRNA düzeylerini düşürdüğü de ortaya konmuştur. İlginç bir şekilde, YBX1' in susturulması bu hücrelerde p16 mRNA seviyelerini etkilememiştir. YBX1' in susturulması, hücreler G1 fazı tutuklama kapasitesini kaybetmesine rağmen TKO hücre çoğalmasını durdururken; bu da YBX1' in G1 fazına ek olarak diğer hücre döngüsü fazlarının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. HCT116 hücrelerinde YBX1' in susturulması G2/M fazı durmasına neden olmuştur; bu da YBX1' in G2/M fazını pozitif olarak düzenlediğini açıklamaktadır [18].

YBX1, p53 tümör baskılayıcı proteini ile etkileşime girer. YBX1' in nükleer lokalizasyonu için transkripsiyonel olarak aktif p53 gereklidir. Eldeki veriler, YBX1' in, p53' ün hücre ölümüne neden olma yeteneğini inhibe ettiğini; ancak p53' ün hücre döngüsünün durması için gerekli olan kinaz p21' i kodlama yeteneğine müdahale etmediğini göstermektedir. Ayrıca nükleer YBX1' in, p53' ün stres aktivasyonundan sonra normal meme epitel hücrelerinde Bax proteini seviyesini arttırmada başarısızlıkla ilişkili olduğu da ortaya koyulmuştur. Birlikte ele alındığında bulgular, YBX1' in, ilaç direnci ve tümör prognozu ile korelasyon sağlayan p53 aktivitesini seçici olarak değiştirdiğini göstermektedir [19].

YBX1, keratinosit farklılaşmasında $\Delta Np63\alpha$ aracılı regüle olur. Yüksek $\Delta Np63\alpha$ seviyeleri, ubikutine bağımlı proteolizi azaltarak çekirdekte YBX1 stabilizasyonunu sağlar. Çekirdekte YBX1 birikimi de $\Delta Np63\alpha$ ekspresyonunu arttırır. Ancak; düşük $\Delta Np63\alpha$ seviyelerinde; keratinosit farklılaşma esnasında YBX1 proteolizi artar, bu durum da YBX1 protein seviyelerinin azalmasına sebep olur. Araştırmacılar sonuçta; $\Delta Np63\alpha$ ' nın YBX1 ile fiziksel etkileşime girdiğini ve $\Delta Np63\alpha$ ' nın mitotik anlamda aktif HaCat keratinositlerinde apoptoza neden olduğunu gösterirken; YBX1 susturmanın da mitotik olarak aktif hücreleri apoptoza götürdüğünü de aydınlatmışlardır [20].

YBX1, transkripsiyonel ve translasyonel düzenleme yoluyla ilaç direnci, hücre proliferasyonu ve metastaz ile ilişkili çoklu fonksiyonlara sahiptir. YBX1' in artan ekspresyonu, tümör büyümesi ve agresifliği ile yakından ilişkilidir. YBX1 protein düzeyleri p16 tümör baskılayıcı genin ekspresyon seviyeleri ile ters korelasyon gösterir. Kromatin immünopresipitasyon deneyleri, YBX1' in p16 promotörü ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Tüm bulgular, YBX1' in doğrudan p16 transkripsiyonuna

bağlandığını ve baskıladığını, daha sonra hücre büyümesinin teşvik edilmesine ve hücre sel yaşlanmanın önlenmesine neden olduğunu ortaya koymuştur [21].

Epidermiste, tabakalı epitelin bütünlüğü, progenitör hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma arasındaki dengeyi sürdürme yeteneğine bağlıdır. Progenitör hücrelerin epidermisteki davranışının altında yatan transkripsiyonel yollar hakkında çok şey bilinmesine rağmen; proteomun şekillendirilmesinde hız sınırlayıcı bir adım olan mRNA bağlayıcı proteinlerin posttranskripsiyonel regülasyonunun rolü tam olarak anlaşılamamıştır. YBX1' in, epidermiste progenitör hücrelerin fonksiyonunun kritik bir efektörü olduğu bildirilmiştir. YBX1 ekspresyonu *in vivo* döngüsel keratinosit progenitörleri ile sınırlıdır ve genetik ablasyonu cilt yapısında kusurlara yol açar. Ayrıca YBX1' in, 3' UTR yoluyla yaşlanma ile ilişkili bir sitokin mRNA alt kümesinin translasyonunu düzenleyerek epidermal progenitör yaşlanmasını negatif olarak kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular, YBX1' i epidermal homeostazın sürdürülmesi için gereken posttranskripsiyonel bir efektör olarak ortaya koymaktadır [22].

Kordomalar, kötü prognozu olan ve onaylanmış hedefli tedavisi olmayan nadir kemik tümörleridir. YBX1 tümör büyümesini, istilasını ve ilaç direncini artırır. Bununla birlikte, YBX1' in kordomadaki rolü belirsizdir. İmmünohistokimya analizleri kullanılarak YBX1' in normal dokulara kıyasla 32 kordoma dokusunda anlamlı şekilde upregüle edildiği gösterilmiştir. Biyolojik fonksiyon çalışmaları YBX1' in G1/S faz geçişini hızlandırdığını ve apoptozu inhibe ettiğini gösterir. Daha fazla araştırma; YBX1' in, kordoma hücrelerindeki promotörüne doğrudan bağlanarak EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) transkripsiyonunu arttırdığını ortaya koymuştur. YBX1, p-EGFR, p-AKT ve hücre apoptozunu, hücre döngüsü geçişini ve hücre istilasını etkileyen genlerin protein ekspresyonunu düzenler. YBX1, kordomada EGFR/AKT yolunu aktive ederken, bu YBX1 kaynaklı yüksek ekspresyonu, ilgili yolak inhibitörleri downregüle etmiştir. Bu veriler YBX1' in EGFR/AKT yolu yoluyla spinal kordomada tümör oluşumunu ve ilerlemesini desteklediğini göstermiştir. YBX1, kordoma için prognostik ve öngörücü bir biyobelirteç ve rasyonel bir terapötik hedef olarak işlev görebilecektir [23].

YBX1, bir transkripsiyon/translasyon düzenleyici proteindir ve bunun ekspresyonu, kanser saldırganlığı ile ilişkilidir. Araştırmacılar, akciğer adenokarsinom hücrelerinde TGF- β 1 (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β 1) kaynaklı EMT (Epitelyal-Mezenşimal Geçiş)

sırasında YBX1' in düzenleyici etkilerini araştırmıştır. YBX1' in azalması, E-kaderin promotör aktivitesini arttırırken; YBX1' in artması, YBX1 seviyesinin EMT ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. TGF- β 1 ile indüklenen YBX1 ekspresyonu ve TGF- β 1, sitosolik YBX1' i çekirdeğe stabilize etmiştir. YBX1' in aşırı ekspresyonu, epitelyal markörlerin TGF- β 1 ile indüklenen azalışını, mezenşimal markörlerin artışını ve hücre göçünü arttırmıştır. Ayrıca bu durum, TGF- β 1 ile indüklenen Akt aktivasyonu yoluyla E-kaderin transkripsiyonel baskılayıcılarının ekspresyonunu arttırmıştır. Bu mekanizma ile EMT indüklenmiştir [24].

CK2 α (Protein Kinaz CK2 alfa) çoklu malignitelerin gelişiminde rol oynar. YBX1' in aşırı ifadesi, tümör proliferasyonu, ilaç direnci ve kötü prognoz ile ilgilidir. Çalışmalar, hem CK2 α ' nın hem de YBX1' in PI3K/AKT yolunu düzenleyebildiğini göstermiştir. Sonuçlar, CK2 α ve YBX1' in birlikte inhibisyonunun, PI3K/AKT sinyal yolunu inaktive etmede sinerjistik etkiler gösterdiğini; tümör büyümesi ve migrasyonunda yer alan mekanizmalardan biri olabileceğini ortaya koymuştur [25].

YBX1 ekspresyonu potansiyel bir onkogen olarak rolüne işaret eden çeşitli kanserlerde artar. Belirli koşullar altında, YBX1 ayrıca ilaç direncinin geliştirilmesinde rol oynayan MDR1 (Çoklu İlaç Direnci 1) geninin ekspresyonunu da teşvik eder. Bu nedenle, YBX1 düzenlemesinin mekanizmasını ve kanser gelişimini teşvik etme üzerindeki aşağı yönlü etkilerini anlamak çok önemlidir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar YBX1 düzenlemesinin mekanizmalarını vurgulamıştır. Kütle spektrometri analizleri YBX1 fonksiyonunun regülasyonunda önemli rol oynayan çeşitli translasyon sonrası değişiklikler bildirmiştir. Fosforilasyon YBX1' de en yaygın olarak meydana gelen posttranslasyonel modifikasyondur. Tanımlanan ilk fosforilasyon bölgesi, YBX1' in CSD bölgesinde ser102' dir ve bu aynı zamanda YBX1' de en çok çalışılan alandır. Buradaki fosforilasyon, YBX1' in nükleer translokasyonunu kolaylaştırarak ve DNA' ya bağlanmasını arttırarak YBX1 onkojenik yeteneğini artırabilir [26].

YBX1, farklı hücre tiplerinde farklı mekanizmalarda çalışabilen çok görevli bir proteindir. Hücre döngüsü kontrol noktalarını geçersiz kılar, genomik instabiliteyi destekler, anjiyogenezi düzenleyebilir, istila ve metastazda rol oynar ve iltihaplanmayı teşvik eder. Kanserde kötü prognoz ile ilişkili olduğu için bir biyobelirteç olarak ve yeni bir terapötik hedef olarak kabul edilmelidir [27].

1.1.2 YBX1' in Farklı Kanserler ile İlişkisi

lncRNA (uzun kodlama yapmayan RNA)' lar çeşitli ve temel biyolojik süreçlerde rol oynar. LINC00312, akciğer adenokarsinomu ile ilişkilidir. LINC00312' nin YBX1' e doğrudan bağlanarak akciğer kanseri hücrelerinin göçünü ve istilasını ve indüklediği ortaya konmuştur. YBX1' in, LINC00312' in 0-2410 nükleotidlik 5' bölgesi içinde farklı fragmanlarla ilişkili olduğunu da gösterilmiştir [28]. Farklı bir lncRNA MIR22HG' nin azalan ekspresyonu, akciğer kanseri ve kötü prognoz ile ilişkilidir. MIR22HG, YBX1 proteinini bağlar. MIR22HG' nin susturulması YBX1, MET ve p21 onkogenlerinin disregulasyonu yoluyla akciğer kanserlerinde hücre çoğalmasını ve antiapoptozu teşvik ederek onkojenik bir rol oynamıştır [29]. Yine bir lncRNA çalışmasına göre de; PIK3CD-AS2, Akciğer Adenokarsinomu (LUAD) progresyonunda önemli bir regülatördür. *In vitro* çalışmalar, PIK3CD-AS2' nin, tümör baskılayıcı p53 sinyalizasyonunu azaltarak LUAD ilerlemesini desteklediğini açıklar. PIK3CD-AS2, YBX1 proteinini bozunmadan koruyarak p53 sinyalini baskılar. Sonuçta; PIK3CD-AS2' nin, YBX1 ile bağlanma ve proteazomal degradasyondan koruma yoluyla p53 sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir [30].

YBX1 protein seviyeleri çoğu meme kanserinde yükselir ve yüksek YBX1 seviyeleri ilaç direnci ve zayıf klinik sonuç ile ilişkilendirilmiştir. YBX1, RNA metabolizmasında ve translasyonunda ek fonksiyonlara sahip; strese duyarlı, hücre döngüsü ayarlı bir transkripsiyon faktörüdür. Bir transgenik fare modelinde, insan hemaglutinin etiketli YBX1' in, mitotik başarısızlık ve sentrozom amplifikasyonundan kaynaklanan genetik instabilitenin indüksiyonu ile dikkat çekici derecede çeşitli meme karsinomlarını stimüle ettiği gözlenmiştir [31]. YBX1; meme kanserinde, özellikle TNBC (Üçlü Negatif Meme Kanseri) hücre invazyonuna aracılık etmede önemli role sahiptir. Proteom kütle spektrometri analizleri, hücre matrisi ve hücrenin matris etkileşim proteinlerinin kanserde kritik rol oynadığını gösterir. YBX1' in MMP-1 promotörüne bağlandığı ve yüksek ekspresyonu ile hücre invazyonunu arttırdığı gözlenmiştir. YBX1' in MMP-1 ve beta- katenin regülasyonu ile meme kanseri invazyonuna ve metastazına aracılık ettiği gösterilmiştir [32].

EMT hücre plastisitesini indükler ve metastazı teşvik eder. Çok fonksiyonlu onkoprotein YBX1 ve IL-6, tümör hücresi metastazı ve EMT' de ilişkilidir. YBX1 ve IL-6 arasındaki doğrudan etkileşim meme kanseri metastazını düzenler. Meme kanseri hücre hatlarında YBX1' in aşırı ekspresyonu; IL-6 üretimini indükler bu durum da YBX1 fosforilasyonunu

ve ekspresyonunu arttırır. Sonuçta artan hücre göçü ve istilası dahil olmak üzere EMT özellikleri indüklenir [33]. İnvaziv meme kanseri hücre hatlarında metastaza aracılık etmede YBX1' in rolünü araştırmak adına yine bir çalışmada da; YBX1 proteininin downregülasyonu, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre göçünü ve istilasını inhibe etmiştir. Bu hücre hattında YBX1 susturulmasının, CORO1C geni regülasyonu ile invaziv potansiyeli inhibe ettiği ortaya koyulmuştur [34].

DACH1, kas, nöral ve meme dahil olmak üzere çeşitli doku tiplerinin kök hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynar. YBX1' in DACH1' e bağlanmasını incelemek için MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. YBX1' in karboksil alanı, DACH1' in karboksil terminaline bağlanır. Oluşan fosforilasyon, DACH1' in nükleer ve sitoplazmik translokasyonunu belirler. DACH1 hücresel EMT' yi inhibe ederken, YBX1' i indükler. Meme kanseri invazifliğinin YBX1 indüksiyonu DACH1 tarafından antagonize edilir. Sonuçta YBX1 ve DACH1 ekspresyonu meme kanserinde ters korelasyon gösterir [35].

lncRNA HOXC-AS3, mide kanseri dokularında önemli ölçüde artmaktadır ve hücre proliferasyonunu ve göçünü *in vitro* ve *in vivo* düzenler. Kütle spektrometri analizleri, YBX1' in HOXC-AS3 ile etkileştiğini tanımlar. Anormal histon modifikasyonu ile aktive edilmiş HOXC-AS3 mide kanseri onkojeninde önemli rol oynar [36]. circRNA (Dairesel RNA)' ların da mide kanseri tümör oluşumunu düzenlediği öngörülmüştür. circRNA hsa_circ_0008035 mide kanseri dokusunda ve hücrelerinde aşırı eksprese edilir. Araştırmacılar, circRNA' ların işlevlerini uygulamak için RNA bağlayıcı protein ile bağlanarak miRNA' ları hedefleyebileceğini göstermektedir. Hsa_circ_0008035, miR-375' i hedefler. YBX1, hsa_circ_0008035/miR-375' in fonksiyonel proteini olarak işlev görür [37]. Mide kanserinde YBX1 ekspresyonunu ele alan farklı bir çalışmada; FOXC-2, mide karsinomunun oluşumu, gelişimi, istilası ve metastazı ile ilişkilidir. YBX1 ile regülasyonu sonucu epitelyal mezeneşimal geçiş sürecini aktifleştirir ve MMP-2 ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinin metastazını teşvik eder [38].

Warburg etkisi olarak da bilinen aerobik glikoliz, kanserin önemli bir özelliğidir. YBX1' in mesane kanserinde glikoz metabolizmasının glikoliz kısmına dahil olduğu ortaya konmuştur. YBX1' in glikolizi arttırdığı gösterilmiştir. YBX1, glikolizi kolaylaştırmak için glikolitik enzimleri düzenleyen c-Myc ve HIF-1 α (Hypoxia- Inducible Factor 1-alpha)' nın ekspresyonunu düzenler [39].

YBX1 *in vitro* ve *in vivo* karaciğer hücrelerinin çoğalmasını teşvik eder. YBX1 ayrıca HCC (Hepatosellüler Karsinom) hücre çoğalması, yer değiştirmesi ve ilaca karşı direnç ile de ilişkilidir. YBX1, HCC hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu teşvik ederek ve tümör oluşumunda rol oynayarak Wnt/ β -katenin sinyal yolunda yer almıştır [40].

Araştırmacılar NPC (Nazofaringeal Karsinom) dokularında YBX1 ekspresyonunun arttığını keşfetmişlerdir. YBX1 protein seviyeleri, NPC hastalarında metastaz ile pozitif korelasyon göstermiştir. Ayrıca, YBX1' in ifadesi membran E-kaderin düzeyleri ile negatif, Vimentin ekspresyonu ile pozitif korelasyon göstermiştir. *In vitro* olarak, YBX1 ekspresyonu nazofaringeal karsinom hücrelerinin invaziv ve göç kabiliyeti ile yakından ilişkilidir. TGF- β 1 muamelesi, CNE1 hücrelerinde yüksek YBX1 ekspresyonu ile birlikte EMT' ye yol açmıştır. Bu şekilde TGF- β 1/YBX1 sinyallemesinin NPC' de EMT' ye aracılık eden mekanizmalardan biri olabileceği ortaya koyulmuştur [41].

RCC (Renal Hücreli Karsinom), büyük ölçüde tedavi edilemez kalan ölümcül ürolojik bir tümördür. RCC' de YBX1 ve G3BP1 proteinleri etkileşir. YBX1/G3BP1 kompleksi, RCC hücrelerinde upregüle SPP1 aracılığıyla NF- κ B sinyal yolağını etkinleştirir. RCC hastalarında YBX1 ekspresyonu G3BP1 ve SPP1 ile korelasyon göstermektedir [42].

YBX1' in potansiyel bir NF- κ B aktivatörü olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, kütle spektrometri analizi kullanarak YBX1 üzerinde ser165' in fosforilasyonunu belirlenmiştir. Birlikte ele alındığında kolon kanserinde; YBX1' in NF- κ B aktivasyonu ve YBX1' in ser165' in fosforilasyonu yoluyla bir tümör promotörü olarak işlev gördüğüne dair kanıtlar sunulmuştur [43]. Farklı bir çalışmada da yine, NF- κ B aktivasyonunun ser176 rezidülerinin fosforilasyonu ile sağlandığı keşfedilmiştir. Kolon kanserinde ser176 veya ser165 fosforilasyonunun veya her iki YBX1' in blokajı ile yeni bir kanser tedavisi stratejisi sağlanabilir [44].

YBX1' in kolon kanserinde; hücre proliferasyonu, migrasyonu, apoptozu ve EGFR ekspresyonunda önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Ayrıca apoptoz ve EGFR ekspresyonunun, RAS/RAF yolağının mutasyonel durumundan etkilenebildiği ve YBX1 yoluyla kontrol edilebildiği kanıtlanmıştır [45].

Pankreas kanseri en agresif kanserlerden biridir. YBX1, pankreas kanseri hücre dizilerinde ve hasta doku örneklerinde aşırı eksprese edilir. YBX1' in susturulması, *in vitro* MMP ekspresyonunun azalmasıyla hücre istilasını önemli ölçüde azaltır. Ayrıca YBX1 ekspresyonunun, 3' UTR' ye doğrudan bağlanma yoluyla miR-216a tarafından bastırıldığı bulunmuştur. miR-216a ve YBX1 ekspresyon seviyeleri pankreas kanseri hücre hatlarında ters korelasyon göstermiştir. Ek olarak, miR-216a' nın ektopik ekspresyonu, hücre istilasını *in vitro* inhibe etmiştir. Birlikte ele alındığında bulgular; YBX1' in metastatik davranışa aracılık etmede önemli bir rol oynayabileceğini ve YBX1' in miR-216a tarafından bastırılmasının pankreas kanserinde tümör metastazını inhibe etmek için umut verici bir terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir [46]. PDAC (Pankreatik Duktal Adenokarsinom), sıklıkla geç tanı ve tedavi nedeniyle en ölümcül kanserler arasındadır. Bu nedenle PDAC mekanizmalarının belirlenmesi çok önemlidir. Yüksek oranda korunmuş bir transkripsiyon faktörü olan YBX1' in PDAC' de önemli ölçüde fazla eksprese edildiği, kötü prognoz ve azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PDAC hücre hatlarında YBX1; hücre döngüsü ilerlemesini, proliferasyonunu ve GSK3β (Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta) aktivitesi ile hücre döngüsüyle ilgili proteinler siklin D1 ve E1' in ekspresyonunu düzenlemiştir [47].

Clusterin, kanserde geniş spektrumlu tedavi direncini veren, stresle aktive edilen bir şaperondur. YBX1, clusterin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak düzenlemek için doğrudan CLU promotör bölgelerine bağlanır. Prostat kanseri hücrelerine bakıldığında; yüksek seviyelerde ekspresyona sahip YBX1 ve clusterin görülmektedir [48].

YBX1' in ERZ2 ve Raf-1 ile proteazomal yol boyunca etkileşime girdiği ve regüle ederken ERK yolunun YBX1 aktivitesini düzenlediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca ERK yolu ile YBX1 arasındaki karşılıklı düzenleme ve bu regülasyonun prognostik önemi insan prostat kanseri dokularında doğrulanmıştır. Eldeki sonuçlara göre; EGF, Raf/ERK/RSK sinyalini uyararak YBX1 fosforilasyonuna neden olur. YBX1 ifadesi Raf/ERK/RSK sinyallemesini etkilerken, protein stabilitesindeki bir artış yoluyla ERK2 protein seviyelerini kısmen düzenler. İnsan prostat kanseri dokularında YBX1 ve ERK2' nin protein ekspresyonlarının yanı sıra fosforile YBX1, olumsuz klinikopatolojik parametreler ile ilişkilidir [49].

FOXO3a, Forkhead O transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir. FOXO3a, hücre döngüsü kontrol noktalarına katkıda bulunan faktörleri indükler ve çeşitli malign tümörlerde tümör

baskılayıcı olarak kabul edilir. Prostat kanserinde fonksiyonel rollerini doğrulamak için FOXO3 α ve YBX1 arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaya göre; hem FOXO3 α hem de YBX1 proteinlerinin ERK sinyallemesi ile fosforillendiği, çeşitli hücre hatlarında FOXO3 α inaktivasyonu ve YBX1 aktivasyonu gözlemlendiği; buna göre prostat kanserinde FOXO3 α ve YBX1' in, ana regülatör ERK yoluyla sırasıyla tümör baskılayıcı gen ve onkogen olarak ters korele roller oynadığı sonuçları çıkarılmıştır [50].

EMT PCa (Prostat Kanseri) metastazında da önemli bir rol oynar. PCa' da YBX1 aşırı eksprese edilir ve E-kadherin ile ters korelasyon gösterir. Endojen EMT de, YBX1 ekspresyonunu indükler. Ekspresyonu artan YBX1, tümörjenik olmayan prostat epitel hücrelerinde de mezenşimal bir fenotipi indükler. YBX1 fosforilasyonunu ve EMT inhibisyonunu gerçekleştiren bazı kemoterapötik ajanlar tanımlanmıştır [51].

PI3K/AKT ve p53 sinyalleşmesi ve bazı büyüme faktörlerinin YBX1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ancak çok az bir artış meydana gelir. Hem melanom hücrelerinde aktive edilen MAPK ve PI3K/AKT sinyal yollarının hem de p53 aşırı ekspresyonunun YBX1 ser102 fosforilasyonunu arttırdığı, NF- κ B sinyalleşmesinin ise fosforilasyonu engellediği belirtilmiştir. Melanom hücrelerinde YBX1' in aşırı ekspresyonu, translasyon verimliliğini inhibe eder ve bu durumda melanom hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması YBX1 protein ekspresyonunu kısıtlayan bir otheregülatör bir döngü olduğunu gösterir [52]. Artan YBX1 ekspresyonu melanom hücresi tümör oluşumunu artırır. YBX1 lokalizasyonu ağırlıklı olarak sitoplazmiktir ve melanom hücrelerinde ser102 fosforilasyonu ile düzenlenir. YBX1, ser102 fosforilasyonu olmadan melanom hücrelerinin büyümesi üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir. ser102 defosforile YBX1, melanoma hücrelerinin göç potansiyelini artırırken YBX1' in aşırı ekspresyonu, melanom hücrelerinde EMT benzeri bir kapasitenin elde edilmesini kolaylaştırır [53].

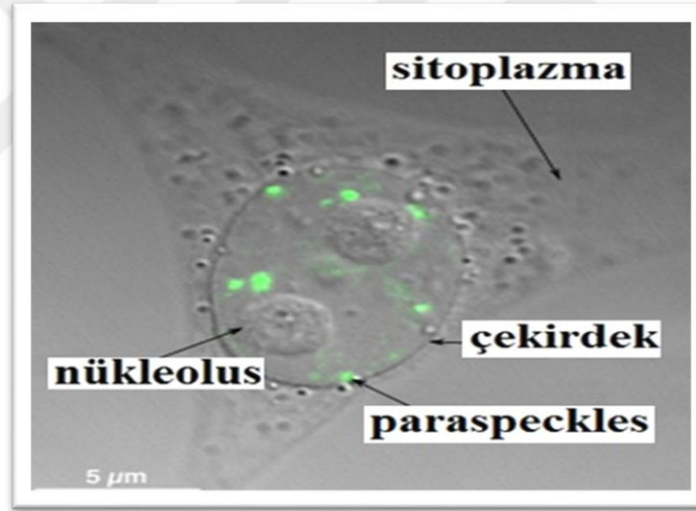
Yine, YBX1' in aktivasyonu yoluyla melanoma gelişiminin teşvik edildiğini açıklayan bir çalışmaya göre; YBX1, NonO/p54^{nrb} geninde transkripsiyonun aktivasyonu için MIA (Melanoma Inhibitory Activity) proteinine aracılık eden bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyonel promotor analizleriyle tanımlanmıştır. MIA, malign melanomun ilerlemesi ve metastazında önemli bir işleve sahiptir. NonO/p54^{nrb}' nin YBX1' in aktivasyonu yoluyla transkripsiyonel seviyede MIA tarafından düzenlendiği ortaya konulmuştur. Sonuçta, insan NonO/p54^{nrb} promotor kontsrahtlarının güçlü bir şekilde korunduğu ve bunların

aktivitesinin MIA tarafından regüle edildiği gösterilmiştir [54]. İnsan NonO/p54^{nrb} geni, X kromozomunun artı kolunda yer alır ve NonO proteinini kodlar [55]. Bu protein, DBHS (Drosophila Behaviour/Human Splicing) protein ailesi mensubudur [56].

1.2 Paraspeckles ve DBHS Protein Ailesi

lncRNA molekülleri, gen regülasyonundaki en yeni ve en az anlaşılan moleküllerden bazılarıdır. Bu nedenle, iyi tanımlanmış RNA ve protein bileşenlerine sahip model sistemlere ihtiyacımız vardır. Bu sistem paraspeckles' tır. Paraspeckles, belirli bir lncRNA iskelesi etrafında inşa edilen protein açısından zengin nükleer organellerdir. Yeni keşifler, bazıları geniş polimerizasyon içerikli çoklu RNA-protein ve protein-protein etkileşimleri yoluyla paraspeckles' ın nasıl oluştuğunu göstermektedir [57].

Paraspeckles, memeli hücre çekirdeklerinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoprotein gövdeleridir.



Şekil 1.5: HeLa hücrelerinde paraspeckles yapılar [58].

Bu yapılar, RNA' nın nükleer tutulumu ile farklılaşmış hücrelerde belirli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Çekirdek paraspeckles proteinleri (PSF/SFPQ, NonO/p54^{nrb} ve PSPC1 (Paraspeckles Protein-1)) DBHS ailesinin üyeleridir. Bu proteinler, uzun protein içermeyen RNA NEAT1 (MEN-ε/β) ile birlikte paraspeckles oluşturmak ve bütünlüklerini korumak için birleşir [59]. Sonuçta paraspeckles ve bileşenleri; farklılaşma, viral enfeksiyon ve stres tepkileri de dahil olmak üzere birçok hücrel işlem sırasında gen ekspresyonunun kontrol edilmesinde rol oynayabilir [60].

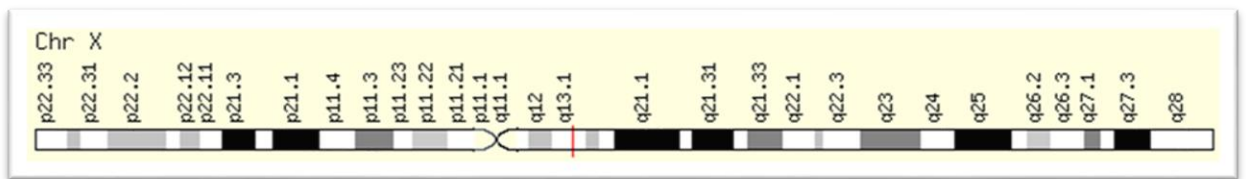
1.2.1 Kanserdeki DBHS Proteinleri

lncRNA NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript-1) nükleer paraspeckles' ın yapıtaşısıdır ve son zamanlarda kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumlarda anormal bir şekilde ifade edildiği için önemli ölçüde dikkat çekmiştir. NEAT1 ve paraspeckles oluşumu, çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kaldıktan sonra hücrelerde artar ve hücre metabolizmasında önemli bir rol oynar. NEAT1, HSF1 (Isı Şoku Transkripsiyon Faktör-1/Heat Shock Transcription Factor-1)' in yeni bir hedef genidir ve ısı şoku tepki yolu SFN (Sülforafan/Sulforaphane) veya yükseltilmiş sıcaklık ile aktive edildiğinde upregüle olur. HSF1, NEAT1 promotöründeki yeni tanımlanan korunmuş bir ısı şoku elemanına spesifik olarak bağlanır. Buna paralel olarak SFN, HSF1' e bağlı bir mekanizma yoluyla NEAT1 içeren paraspeckles oluşumunu başlatır. HSF1, moleküler şaperonları kodlayanlar da dahil olmak üzere bir dizi genin ekspresyonunu teşvik ederek proteotoksik strese hücresel yanıtta önemli bir rol oynar. Bu ilişkiler çerçevesinde, kanser ve nörodejeneratif bozukluklar gibi insan hastalıklarında potansiyel olarak önemlidir [61].

DBHS ailesine ait NonO/p54^{nrb} nadiren tek başına işlev gören çok fonksiyonlu bir nükleer proteindir. Ortaya çıkan somut kanıtlar, bu proteinin; mRNA birleştirme, DNA denatürasyon-renatürasyon süreçleri, transkripsiyonel düzenleme, kusurlu RNA' nın nükleer tutuklaması mekanizması ve DNA onarımını içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan gen düzenlemesinin hemen hemen her adımında yer aldığını göstermiştir. NonO/p54^{nrb}, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte yer alır. NonO/p54^{nrb}' nin düzensizliği birçok kanser türünde bulunmuştur. Bu nedenle yeni bir biyobelirteç veya kanserler için olası bir terapötik hedef olmasını sağlayabilecek önemli bulgular gösterilmiştir [62].

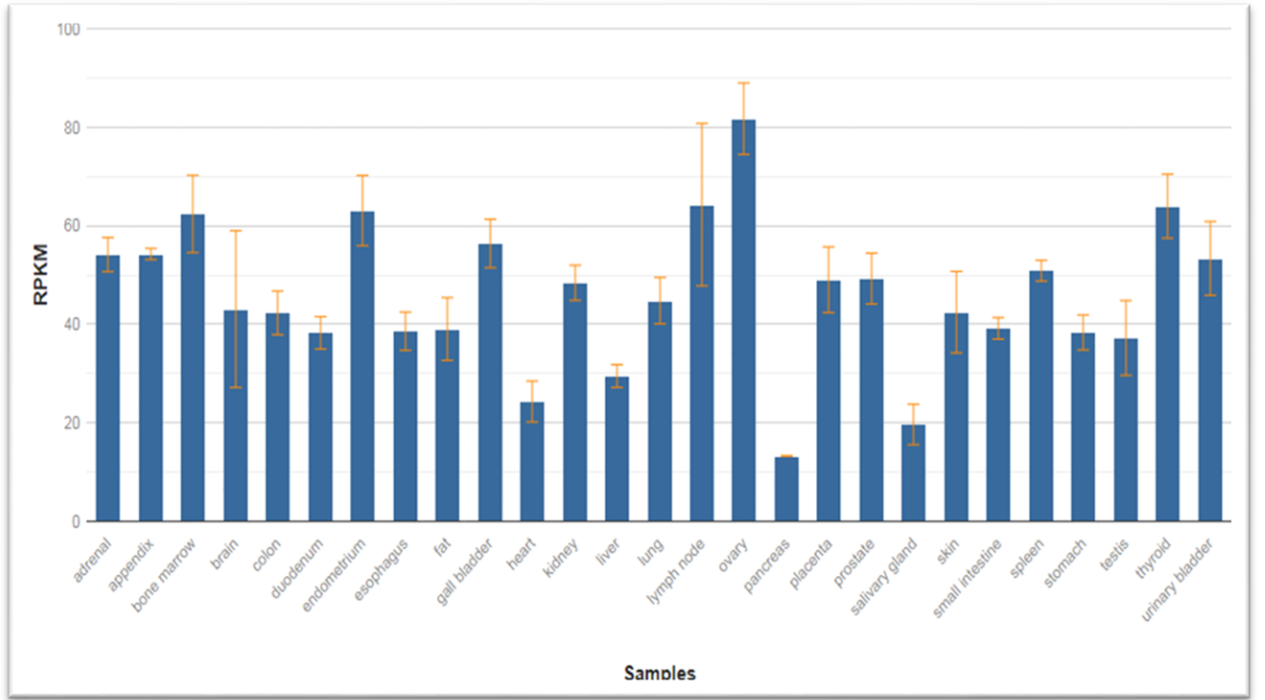
1.2.2 NonO/p54^{nrb}

X kromozomunun q13.1 bölgesinde bulunan NonO/p54^{nrb} geni, 13 ekzon 11 introna sahiptir (Şekil 1.6). Bu genin, 2. ve 16. kromozomlarda da pseudogenleri bulunmaktadır. Veri tabanlarında; P54, NMT55, NRB54, P54NRB olarak isimlendirilmektedir [63].



Şekil 1.6: X kromozomunda NonO/p54^{nrb} lokalizasyonu [64].

NonO/p54^{nrb} proteini ilk olarak 1993 yılında Cold Springs Harbour Laboratuvarındaki araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir. Başlangıçta bir RNA bağlayıcı protein olarak tanımlanmış olması nedeniyle, Nuclear RNA- bağlayıcı protein, 54 kDa olduğu için p54^{nrb} olarak adlandırılmıştır. 471 amino asitlik bir polipeptid kodladığı; ayrıca PSF (Human Splicing Factor) ile % 71 sekans benzerliğine sahip olduğu belirtilmiştir [56]. şekil 1.7' de gösterildiği üzere, ifadesi; kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta bulunmuştur. Meme tümör hücre hattında da mevcuttur. Yumurtalıklarda da yaygın ifade gösterir [63].



şekil 1.7: NonO/p54^{nrb}' nin çeşitli dokularda ifade profilleri [63].

Splicing mekanizmasında, genlerin transkripsiyonel regülasyonunda, HIV' in *gag* bölgesinde aktivasyon gösterdiğinden multifonksiyonel protein ozelliği gösterir [63].

Yapısal anlamda DBHS ailesinin diğer proteinlerinde olduğu gibi, NonO/p54^{nrb} proteini de nadiren tek başına işlev görür ve çeşitli işlevleri yerine getirmek için diğer DBHS proteinleri ile homo- ve heterodimerleri oluşturur [65]. Bu dimerlerin, buldukları hücrenin türüne özgü farklı fonksiyonlara sahip olabileceği teorileşmiştir [66].

Fonksiyonel anlamda NonO/p54^{nrb} ise; birçok nükleer süreçle ilgilenir ve hem DNA hem de RNA'ya bağlanır [67]. DBHS protein ailesinin tüm proteinlerinde olduğu gibi çok işlevli bir nükleer protein olarak tanımlanmaktadır [68].

1.2.3 NonO/p54^{nrb}'nin Farklı Kanserler ile İlişkisi

ESCC (Özofagus Yassı Epitel Hücreli Karsinom/Esophageal Squamous Cell Carcinoma), Çin'deki en yaygın malignitelerden biridir ve mortalite ile ilişkilidir. Bununla birlikte, ESCC tümör oluşumu ve metastazını kontrol eden moleküler mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. NonO/p54^{nrb} downregülasyonunun, özofagus yassı epitel hücreli karsinomda büyümeyi ve invazyonu baskılayarak apoptozu indüklediğini açıklayan çalışmaya göre; NonO/p54^{nrb}, Akt ve Erk1/2 sinyal yollarını aktive eder. Bu şekilde ESCC'nin çoklu biyolojik süreçlerinde güçlü bir rol oynar ve tümör oluşumunu teşvik eder [69].

Moleküler hedefleri ve işlevleri açıkça tanımlanmamış RNA bağlayıcı proteinlerin insan kanserinde birden fazla rolü vardır. Hastalardan elde edilen genomik analizler, NonO/p54^{nrb}'nin akciğer kanserinde potansiyel bir onkojenik gen olduğunu ortaya koymaktadır. NonO/p54^{nrb}, normal dokulara kıyasla akciğer kanseri dokularında yüksek oranda eksprese edilir ve ekspresyonu, akciğer kanseri hastalarının kötü prognozu ile korele edilmiştir. Bir RNA bağlayıcı protein olan NonO/p54^{nrb}, akciğer kanserinde NAMPT genini düzenleyerek enerji metabolizmasını yönetir [70].

Anormal lipit metabolizmasının meme kanserinin malign fenotiplerine katkısı tam olarak anlaşılacakla birlikte, bu kanser tipinde lipit metabolizmasının düzensizliği yaygındır. NonO/p54^{nrb}, meme kanseri hücrelerinde lipojenik genlerin SREBP-1 α aracılı transkripsiyonunu ve lipit üretimini uyarır. SREBP-1 α 'ya bağlanan NonO/p54^{nrb}, *in vivo* meme tümörü gelişimi için de kritiktir [71]. Farklı bir çalışmaya göre yine NonO/p54^{nrb}; post-transkripsiyonel düzeyde SKP2 ve E2F8 RNA ekspresyonunu düzenleyerek meme kanseri hücre proliferasyonunda kritik bir rol oynar [72].

AS (Alternatif Ekleme/Alternative Splicing) kanser çeşitliliğini ve karmaşıklığını arttıran önemli bir adımdır. Son kanıtlar, AS'nin kanserde giderek daha önemli bir role sahip olduğunu vurgular. Bununla birlikte, AS'nin altında yatan mekanizmalar ve HCC düzensizliği anlaşılması güçtür. HCC'li hastalarda, RNA bağlayıcı protein NonO/p54^{nrb} ekspresyonunun sıklıkla arttığı ve kötü sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir [73].

pancEts-1, mide kanserinin kötü prognozuyla ilişkili bir lncRNA' dır. Mide kanserinin ilerlemesi için bir potansiyel oluşturur. pancEts-1, mide kanseri hücrelerinde NonO/p54^{nrb} proteini ile etkileşime girer. pancEts-1, NonO/p54^{nrb} aracılı ERG transaktivasyonunu kolaylaştırarak Ets-1 ekspresyonunu düzenler. Ets-1 ekspresyonunun artması, mide kanseri hücrelerinin tümör oluşumunun ve agresifliğinin artırılması ile sonuçlanır [74].

LncRNA GAPLINC' in artan ekspresyonu ile CRC (Kolorektal Kanser/Colorectal Cancer)' de artan tümör boyutu koreledir. CRC hastalarında GAPLINC, PSF/NonO/p54^{nrb} ye bağlanma yoluyla ve kısmen SNAI2 ekspresyonunu uyararak kolorektal karsinoma istilasını destekler [75].

Sağlıklı melanositlerde NonO/p54^{nrb} ekspresyonu olmadığı saptanmıştır. MIA, malign melanomda anahtar proteindir. İlginç bir şekilde, son çalışmalar MIA' nın bir NonO/p54^{nrb} regülatörü olduğunu göstermektedir. Metastatik melanom doku örneklerinde MIA aracılı aşırı NonO/p54^{nrb} ekspresyonu gösterilmiştir [76].

1.2.4 NonO/p54^{nrb} Promotor Yapısı ve İlgili Gende YBX1 Regülasyonu

2013 yılında Schmid ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; NonO/p54^{nrb} promotor bölgesinin yüksek derecede korunmuş sekansı için ECR tarayıcı aracı kullanılarak *in silico* analizi yapılmıştır. Program ile NonO/p54^{nrb} geninin 5' ucunun hemen yukarısında yaklaşık olarak 1600 bp' lik bir bölge tespit edilmiştir. Promotor çalışmaları için pGL4.10 lusiferaz ekspresyon vektörü içerisine farede ATG protein başlangıç kodonuna yakın 9160 bç ile 7461 bç' den ve 8436 ile 6833 bç' den korunmuş bölge klonlanmıştır. Fonksiyonel promotor analizleri ile NonO/p54^{nrb} transkripsiyonunun aktivasyonu için MIA' ya aracılık eden YBX1 transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Sonuç olarak insan ve fare NonO/p54^{nrb} promotor kontsrahtları güçlü bir şekilde korunmuş ve bunların aktivitesinin MIA tarafından regüle edildiği gösterilmiştir [54].

MIA/CD-RAP, kıkırdak farklılaşması ve melanoma ilerlemesinde rol oynayan küçük bir proteindir. Yakın zamanda, NonO/p54^{nrb} nin, kondrojenez ve malign melanomayı iletirmek için MIA/CD-RAP kompleksini bir aracı olarak regüle ettiği ortaya çıkmıştır. Kıkırdaktaki MIA/CD-RAP moleküler mekanizması bugüne kadar ayrıntılı olarak tanımlanmadığı için, kondrojenezde NonO/p54^{nrb} transkripsiyonunun düzenlenmesi incelenmiştir. Melanoma hücrelerinde NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesinin MIA/CD-RAP'

a bağı olarak korunmuş 42 bç' lik bir DNA elementi tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. NonO/p54^{nrb} promotorunun MIA/CD-RAP bağı düzenleyici bölgesindeki YBX1' in önemi kondrosit sisteminde teyit edilmektedir. YBX1, MIA/CD-RAP' a bağı kondrojenezin bir regülatörüdür [77].

YBX1' in aşırı ekspresyonunun kolorektal SW480 ve HT29 kanser hücrelerinde kemoterapötik direnç oluşturduğu gösterilmiştir. Önemli olarak, NonO/p54^{nrb} veya RALY susturulmuş SW480 ve HT29 kolorektal kanser hücre hatları, YBX1' in aşırı ekspresyonuna rağmen kemoterapötik ajanlara duyarlıdır. Sonuçta, NonO/p54^{nrb} veya RALY' nin YBX1 proteinini aşırı eksprese eden kolorektal kanserlerde önemli ölçüde kemoterapötik direnci arttırdığı gösterilmiştir [78].

1.3 Hipoksi (Hypoxia)

Hipoksi, vücudun bir bölgesinin veya tamamının doku düzeyinde yeterli oksijen tedarikinden yoksun kaldığı bir durumdur [79]. Hipoksi, tüm vücudu etkileyen genelleştirilmiş hipoksi ve vücudun bir bölgesini etkileyen lokal hipoksi olarak sınıflandırılabilir [80]. Oksijen arzından tamamen yoksun bırakılan hipoksi anoksi olarak adlandırılır [81].

Fiziksel hipoksi; oksijen ayarlı inkübatörler kullanılarak, hücrelere özgü bir şekilde istenilen oksijen koşullarında ayarlanabilir. Oksijen seviyesi % 1-5 oranında olmak kaydıyla hücreleri hipoksik koşula maruz bırakmak mümkündür. Hücre kültüründe kullanılan inkübatörler normal hücre kültür ortamı için altta su haznesi bulunarak içerisindeki nem oranı ayarlanmakta ve sıcaklık 37 °C olup, ortam % 5 CO₂ içermelidir [82].

Kimyasal Hipoksi oluşturmak üzere uygulanan CoCl₂ (Kobalt Klorür) yöntemi ise; ucuz ve hızlı olma avantajına sahiptir. Bu ürün, HIF-1 α ' yı indükleyerek hipoksiyi taklit eder, ancak diğer genleri de düzenleyebilir. Diğer hücrelerin fonksiyon ve fenotipi üzerindeki etkilerin kontrol edilerek kullanılması gerekir. Hipoksiyi taklit eden bir başka kimyasal da DFO (Deferoksamin Mesilat, 100 μ M nihai konsantrasyonda kullanılır). Bu kimyasalın kullanımı, deney hücrelerinin hipoksik durumunu etkilemeden kültür kaplarının birçok kez açılmasına izin verir [83].

1.3.1 Hipoksinin Kanser Progresyonundaki Rolü ve HIF-1 α Regülasyonu

Tümör mikroçevresi; birçok farklı hücre tipi, anormal vasküler ağ ve immünsüpresif sitokinlerden oluşan karmaşık bir ekosistemdir. Tümörlerin düzensiz büyüme dinamikleri, artan oksijen tüketimine ve dolayısıyla hipoksik koşullara yol açar. Hipoksi, kötü klinik sonuç, artan tümör heterojenitesi ve kemoterapiye direnç mekanizmalarının ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir [84].

Kanserdeki metabolik dönüşüm bilginiz son birkaç yılda belirgin bir şekilde iyileşmiş olsa da, hipoksinin çoğu hücre metabolik yol üzerindeki etkisi hala tam olarak açık değildir. Hipoksinin neden olduğu metabolik düzenlenme, metabolik stres sırasında hücre ve dokuların hayatta kalmasına izin verecek şekilde tasarlanmıştır. Bazı hastalıklarda doku fonksiyonunu korumak için bu değişiklikleri desteklemek gerekir. Bununla birlikte, hipoksi kanserlerde malign ilerlemeyi tetikler, tedaviye direnç ve artan metastatik potansiyel sayesinde daha düşük hayatta kalma ile sonuçlanır [85].

Hipoksik mikroçevre, hücre tümörlerini çeşitli şekillerde düzenleyen katı tümörlerin en önemli özelliklerinden biridir. Hipoksiye bir yanıt olarak, kanser hücrelerinde hücre büyümesi, metabolizması, metastazı ve bağışıklığında yer alan çok sayıda hedef gen aktive edilir. HIF-1, bir heterodimerik DNA bağlanma kompleksidir ve yapısal olarak bir oksijene duyarlı HIF-1 α alt biriminden ve yapısal olarak eksprese edilen HIF-1 β alt birimden oluşur. Hücreleri bu şekilde, bir transkripsiyon faktörü olarak azalmış oksijen mevcudiyeti için adapte eder. HIF-1, tümör oluşumunda rol oynayan birçok geni düzenler [86].

Hipoksi, hem kanser hücrelerini hem de tümör mikro çevresini etkiler ve kanserin ilerlemesi ve yayılması sürecinde önemli bir rol oynar. Hipoksi tümör neovaskülarizasyonunu, metabolizmayı, hücre hayatta kalmasını ve hücre ölümünü düzenler. Buna ek olarak, hipoksi EMT benzeri kanser hücresi göçüne ve tedaviye direnç mekanizmaları dahil özelliklere katkıda bulunur. Kanser süreçlerinin her adımı, HIF, NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını içeren hipoksiyi aktive eden transkripsiyonel programlar tarafından kontrol edilir. Bu mekanizma ile pozitif ve negatif feed-back döngülerine neden olan ve hipoksik etkileri artıran veya azaltan karmaşık bir hücre sinyalleme ağı uyarılır [87].

Hipoksi, TGF- β , PI3K/Akt, Wnt ve Jagged/Notch gibi çeşitli yollara aracılık ederek karmaşık bir mekanizma yoluyla EMT' yi ve metastazı indükler. Bu şekilde oluşan E-kaderin ekspresyonunun kaybı invazyon ve metastaza katkıda bulunur ve hipoksi aracılı transkripsiyonel baskı ile elde edilir. Bağlantılı olarak, hipoksik ortamın, HIF-1 α /VEGF regülasyonunun damar büyümesini uyararak anjiyogenezde büyük bir etkisi vardır. Düşük oksijen seviyeleri ayrıca ANGPT2, FGF ve HGF dahil olmak üzere diğer ikincil faktörler yoluyla da süreci teşvik edebilir. Hipoksinin neden olduğu metabolik adaptasyonlar arasında Warburg etkisi-glikolize metabolik bir geçiş- ve GLUT1 aşırı ekspresyonu bulunur. Böylece hipoksinin regüle ettiği bir başka mekanizmanın oksidatif fosforilasyondan glikolize metabolik geçiş olduğu bildirilmiştir [88].

Hipoksi ve apoptotik hücre ölümü arasındaki bağlantının ele alındığı bir çalışmaya göre; p53 geni, insan kanserlerinde açık ara en sık mutasyon geçirmiş genidir. p53-eksik fareler genellikle yüksek spontan tümör insidansı ile ilişkilidir, bu da tümör gelişimi sırasında güçlü p53 inaktivasyonunu gösterir. HIF-1 α ' nın, hipoksiye uyum sağlamak için p53 tümör baskılayıcı protein seviyelerini düzenlediği kanıtlanmıştır. Ayrıca; tersine, p53 geni de HIF-1 α protein seviyelerini negatif olarak düzenleyebilir. Hafif hipoksik koşullar altında, hücreleri apoptoza karşı korumak ve hücre sağkalımını desteklemek için p53 protein seviyeleri azaltılır. Bununla birlikte, şiddetli hipoksik, hatta anoksik koşullar altında, p53 protein seviyeleri stabilize edilir, böylece HIF-1 α transkripsiyonel aktivitesini azaltır ve apoptotik hücre ölümü indüklenir [89].

Hipoksiye yanıtta en önemli transkripsiyonel regülatör olan HIF-1 α ' nın, hipoksik gen ekspresyonunu ve sinyal iletim transdüksiyon ağlarını önemli ölçüde regüle ettiği gösterilmiştir. Son birkaç on yılda, artan sayıda çalışma, hipoksik tümör bölgelerinde lncRNA' ların önemini ortaya koymuştur. Bu HRN (Hipoksiye Yanıt Veren NcRNA)' ler; transkripsiyonel, posttranskripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde hipoksik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli roller oynar. Ek olarak, önemli bir gen ekspresyon regülatörü olarak lncRNA' lar, HIF-1 α ekspresyonunun çoklu seviyelerde düzenlenmesinde umut verici roller sergilerler. Kanser tanısında ve prognozunda HRN' lerin biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli vardır [90].

1.3.2 Prostat Kanserinde HIF-1 α Regülasyonu

HIF-1 α , prostat kanseri ile yakın bir ilişkiye sahiptir. Sadece anjiyogenez, hücre çoğalması/sağkalımı ve glikoz metabolizmasında değil, aynı zamanda prostat kanserinde p53, p21 ve Notch sinyal iletim yollarında da rol oynar [91].

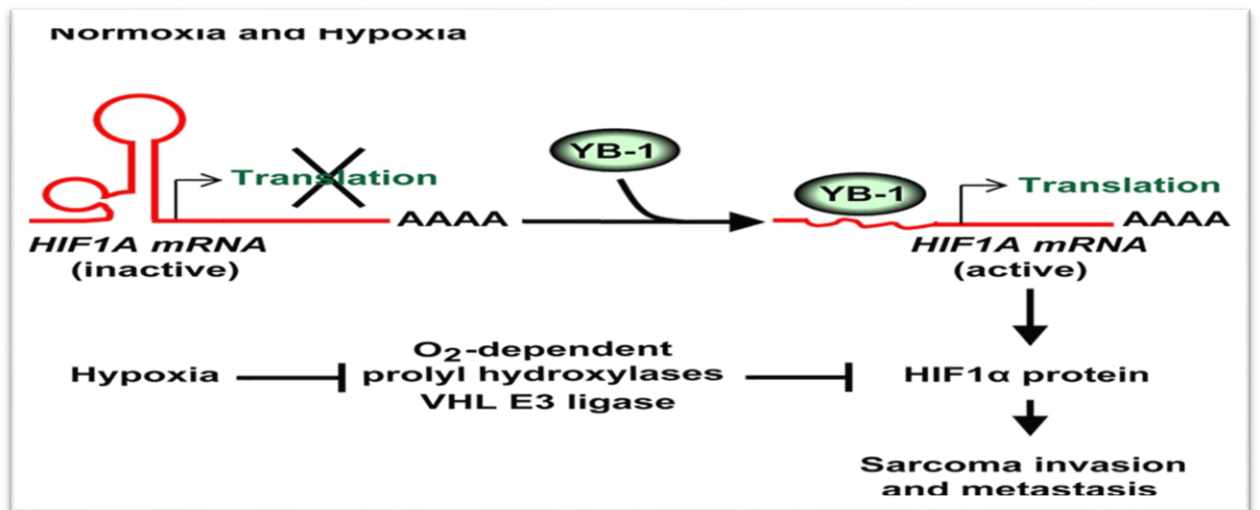
Bir dizi çalışma yeni bir terapötik hedef olarak Notch yolağının potansiyelini araştırmıştır. Notch-1 reseptörü ve jagged-1 ligand, prostat kanserinin metastazı ve ilerlemesinde anahtar rol alır. Notch-1 veya jagged-1 kodlayan genlerin downregüle ekspresyonunun, prostat kanseri hücre invazyonunun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Notch-1 ve jagged-1' in siRNA (small interfering RNA) ile downregülasyonu, prostat kanseri hücrelerinde hücre büyümesi, migrasyonu, istilası ve apoptoz indüksiyonunun inhibisyonuna yol açmıştır. Bir çalışmada, Notch-1 ve jagged-1' in inhibisyonu; AKT, mTOR ve NF- κ B sinyal yolağı genlerinin aktivasyonuna da neden olmuştur. Sonuçta; Notch sinyal yolağı farklılaşma, proliferasyon, anjiyogenez, ve apoptozda rol oynar. Notch reseptörlerinin, ligandların ve hedeflerin düzensiz ekspresyonu, prostat kanseri dahil olmak üzere birçok katı tümörde gözlenir. Hipoksi, prostat tümörlerinin ortak bir özelliğidir, bu da artan gen instabilitesine ve tümör saldırganlığına ayrıca azalmış tedavi yanıtına yol açar. Notch sinyal yolağının vasküler hücre metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir ve hipoksinin neden olduğu faktörlere cevap verir [92].

Prostat kanseri erkeklerde önde gelen malignite ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Hipoksi agresif bir fenotip ile ilişkili prostat karsinogenezinde kilit bir öncül olarak kabul edilir. HIF-1 α hipoksi altında aktive olan anahtar faktördür ve anjiyogenez, EMT, metastaz, hayatta kalma, proliferasyon, terapötik direnç için zemin oluşturur. HIF-1 α ' nın yanı sıra, kanser hücrelerinde hipoksik koşullar altında PI3K/Akt/mTOR, NADPH Oksidaz (NOX), Wnt/ β -katenin ve Hedgehog da dahil olmak üzere diğer sinyal yolları, HIF-1 α ' ya bağımlı veya bağımsız biyolojik süreçlere katkıda bulunur. Hipoksik kanser hücreleri, hem lokal hem de uzak tümör mikroçevresinde geniş çaplı değişikliklere neden olur ve son çalışmalar, nanosize veziküller olan "eksozomlar" ın hipoksiye bağlı tümör mikroçevresi yeniden şekillenmesine aracılık etmede önemli rolünü destekleyen çok sayıda kanıt sağlamıştır. Eksozomların hipoksik koşullarda neden olduğu anjiyogenez, EMT, tümör oluşumu ve stabilitesi bildirilmiştir. Sonuçta, tümör mikroçevresinde hipoksik tepkinin elçisi olarak eksozomlar, prostat kanseri ilerlemesini desteklemiştir [93].

Tümörler, hücrelerin etrafındaki mikroçevre ile iletişim kurduğu ve kendi hayatta kalma ve malignitelerini destekleyen özellikler geliştirdiği karmaşık dokulardır. Hipoksi ve inflamasyon, hem kanser kök hücrelerini hem de farklılaşmış tümör hücrelerini etkileyen prostat tümör mikroçevresinin kilit özellikleridir. HIF' ler ve NF- κ B, sırasıyla hipoksik ve enflamatuar streslere karşı transkripsiyonel cevabın anahtar düzenleyicileridir ve aralarındaki karmaşık mekanizma yaygın olarak belgelenmiştir. Normal prostat dokusunun büyümesinde ve fonksiyonunda önemli rol oynayan androjen ve östrojen sinyalleri dereğülasyonlu olduğunda, malign hastalıkların ayırt edici özelliklerinin edinilmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, androjen ve östrojen reseptörlerinin prostat kanserinde HIF/NF- κ B sinyali ile ağ oluşturduğu gösterilmiştir [94].

1.3.3 HIF-1 α ve YBX1 Regülasyonu

Metastatik yayılım, yüksek riskli sarkomlar için belirgin olan kanser hastalarında önde gelen ölüm nedenidir. Önceki araştırmalar, EMT ve epitelyal malignitelerin metastazında YBX1 için önemli roller tanımlamıştır. Araştırmacılar klinik verilere dayanarak, YBX1' in yüksek riskli sarkomlarda önemli bir metastatik devre anahtarı olduğunu bildirmişlerdir. Veriler, YBX1' i sarkom hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonunun kritik bir regülatörü olarak açıklamaktadır. Şekil 1.8' de belirtildiği üzere; YBX1, HIF-1 α transkriptlerine doğrudan bağlanır ve ekspresyonunu artırır. Bu mekanizma, HIF-1 α -aracılı sarkom hücresi istilasına ve gelişmiş metastatik kapasiteye yol açmaktadır [95].



Şekil 1.8: Sarkoma metastazında HIF ve YBX1 regülasyonu [95].

1.3.4 HIF-1 α ve NonO/p54^{nrb} Regülasyonu

Tümörlerdeki hipoksiye adapte olmuş kanser hücreleri, kanserin patolojik ilerlemesine katkıda bulunur. Bu nedenle kanser araştırmaları, kanser hücrelerinde hipoksi adaptasyonundan sorumlu moleküllerin tanımlanmasına ve hipoksiye uyarlanmış kanser hücrelerine karşı etkili yeni bileşiklerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Doğal deniz ürünü furospinosulin-1, kültürlenmiş kanser hücrelerine karşı hipoksi seçici büyüme inhibisyonu göstermiştir ve kesin etki şekli ve moleküler hedefleri belirsiz kalmasına rağmen *in vivo* anti-tümör aktivitesi göstermiştir. Sonuçta; furospinosulin-1' in tümörlerin hipoksik bölgelerine karşı seçici olarak etkili olduğu ve daha önce kanser hücrelerinde hipoksi adaptasyonunun aracıları olarak tanımlanmamış transkripsiyonel regülatör NonO/p54^{nrb}, ye doğrudan bağlandığı kanıtlanmıştır [96].

1.4 Tez Çalışmamızın Amacı

Kanser progresyonunda kanser hücreleri ile onların mikroçevresi arasındaki iletişim önemlidir. Hipoksi özellikle solid tümörlerde oldukça karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri oksijeni yeterli miktarda alamadığında; hücre ölümüne gitmeden çeşitli genetik farklılıklar meydana getirerek hipoksik koşula adapte olmaktadır. Hipoksinin, çeşitli tümör tiplerinde radyo ya da kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Pek çok klinik araştırmalar, tümörün hipoksik olduğunu ve hipoksinin artmasıyla tümör çapının da arttığını göstermektedir.

YBX1, geniş nükleik asit bağlama özelliklerine sahip bir transkripsiyon faktördür. Pek çok makromolekül ve genle etkileşimleri mevcuttur. Araştırmacılar tarafından ayrı ayrı ele alındığında aşırı ekspresyonu pek çok tümörjenik hikaye ve kanser türüyle ilişkilidir.

X kromozomunun q13.1 bölgesinde bulunan NonO/p54^{nrb} geni ise; multifonksiyonel olup, yine bu genin de birçok kanser tipinde farklı ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Akciğer kanseri ve meme kanserinde artmış ifade gösterir. Özellikle malign melanoma ve hepatoselüler karsinomda da ispatlanmış yüksek ifadelere sahipken; prostat kanseriyle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

NonO/p54^{nrb} geninin yüksek ifadesinin aracılık ettiği melanoma gelişimini detaylandıran çalışmaya göre; bu genin transkripsiyonel aktivasyonunu MIA proteini gerçekleştirir.

NonO/p54^{nrb}, YBX1' in aktivasyonu ile transkripsiyonel seviyede MIA tarafından düzenlenir [54].

MIA/CD-RAP, kondrojenez süreçlerinde rol oynayan bir proteindir. Yakın zamanda, NonO/p54^{nrb}' nin, kondrojenez ilerletmek için MIA/CD-RAP kompleksini regüle ettiği açıklanmıştır. Yukarıda bahsi geçen melanoma gelişimi örneğindeki gibi; NonO/p54^{nrb} promotorunun MIA/CD-RAP bağlı regülatör bölgesindeki YBX1' in önemi kondrosit sisteminde teyit edilmektedir. YBX1, MIA/CD-RAP' a bağlı kondrojenezin bir regülatörüdür [77].

Literatürde NonO/p54^{nrb} geni ve YBX1 transkripsiyon faktörü regülasyonları hakkında sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Kanser ile ilgili genlerin hipoksik koşullardaki regülasyonunu tespit etmek oldukça önemlidir. Son yıllardaki çalışmalarla, NonO/p54^{nrb} geninin YBX1 transkripsiyon faktörü ile regüle edildiği kondrojenez süreçleri ve malign melanomda gösterilmiştir. Ayrıca YBX1 ve HIF-1 α arasındaki ilişki sarkoma hücrelerinde gösterilmiştir. Daha önce danışman hocam tarafından yürütülen Sevgi Baysal tarafından tamamlanan yüksek lisans tezinde HIF-1 α ' nın NonO/p54^{nrb} ifadesini hipoksi koşullarda arttırdığı da gösterilmiştir [97]. Ancak prostat kanserinde NonO/p54^{nrb}, YBX1 transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilip edilmediği gösterilmemiştir.

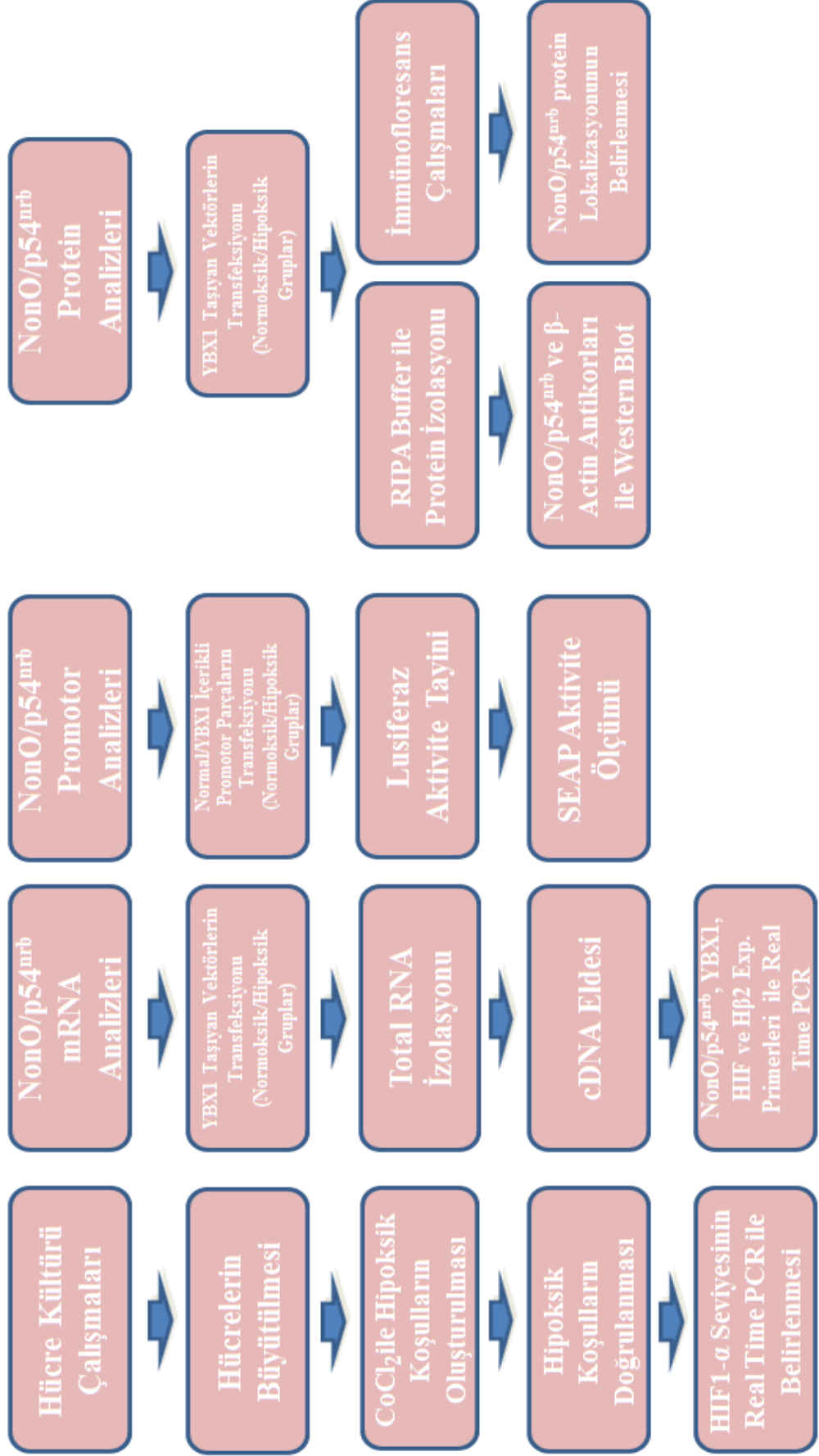
Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız; PC-3 (İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı/Human Prostate Cancer Cell Line) hücrelerinde, hem normal hem de hipoksik koşullarda NonO/p54^{nrb} geninin YBX1 transkripsiyon faktörü tarafından hedef alınıp alınmadığı sorusunu cevaplandırmak üzere planlanmıştır. Çalışmamızda prostat kanserinde NonO/p54^{nrb} geninin hipoksik ve normoksik koşullarda YBX1 tarafından regülasyonu; mRNA seviyesinde, promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi düzeyinde ve protein seviyesinde incelenmiştir.

Bu amaçlar doğrultusunda tez çalışmamızın kapsamı şu şekildedir;

1. YBX1 genini içeren ökaryotik ekspresyon vektörünün PC-3 hücrelerine normoksik ve hipoksik koşullarda transfeksiyonu yapıp ve ektopik ekspresyon Real Time PCR tekniği ile doğrulanmıştır. **(Ko-transfeksiyonlarda YBX1 genlerini içeren vektörlerin kullanımı öncesi test edilmesi amacıyla)**

2. NonO/p54^{nrb} promotor bölgesinin 5' ucu sabit tutularak 3' ucundan kısaltılarak hazırlanan NonO/p54^{nrb} promotor parçaları PC-3 hücrelerine transfekte edilmiştir. (Bazal transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi amacıyla)
3. YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} promotor dizisinde bağlanma motifleri bulunmaktadır. YBX1 ekspresyon plazmiti NonO/p54^{nrb} promotor parçalarıyla birlikte PC-3 hücrelerine hem normoksik hem de hipoksik koşullarda geçici olarak transfekte edilmiştir ve lusiferaz aktivitesi ölçülerek NonO/p54^{nrb} promotor aktivitesine olan katkısı belirlenmiştir. (YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} transkripsiyonel aktivitesine olan katkısının belirlenebilmesi amacıyla)
4. Küçük 25 cm² flasklara 2 µg YBX1 transkripsiyon faktörü hem normal hem de hipoksik koşullarda PC-3 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Real Time PCR ile NonO/p54^{nrb} mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grupları ile karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. (YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} mRNA düzeyine olan etkilerinin normal ve hipoksik koşullarda belirlenmesi amacıyla)
5. Küçük 25 cm² flasklara 2 µg YBX1 transkripsiyon faktörü hem normal hem de hipoksik koşullarda PC-3 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan sonra hücre pelletlerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Western blot yöntemi ile NonO/p54^{nrb} protein ekspresyon seviyesinin kontrol grupları ile karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. (YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} protein düzeyine olan etkilerinin normal ve hipoksik koşullarda belirlenmesi amacıyla)
6. 12' li well plate' e ilgili kuyucuk başına 0,5 µg YBX1 transkripsiyon faktörü hem normal hem de hipoksik koşullarda PC-3 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan sonra tüm kuyucuklarda immünofloresans teknik uygulanmıştır. (YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} protein düzeyinde normal ve hipoksik koşullarda hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla)

PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTINDA NonO/p54^{nrb} GENİNİN YBX1
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU



Şekil 1.9: Tez çalışmamızın akış diyagramı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Tüm tez çalışması boyunca uygulanan hücre kültürü çalışmalarında ve DNA, RNA, promotor ve protein tabanlı tekniklerde kullanılmış olan kimyasal maddeler aşağıda belirtilen Tablo 2.1' de listelenmiştir.

Tablo 2.1: Tez çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler/kitler.

İlgili Kimyasal/Kit	Üretici Firma
Agarose	Sigma
Akrilamid- Bisakrilamid	Merck
Ampicilin	Sigma
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
β - Merkaptoetanol	Merck
β - Actin Antikor	Sigma
CaCl ₂ (Kalsiyum Klorid)	Sigma
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
DMEM F12	EuroClone
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Sigma
DNTP	Thermo
ECL Kit	Thermo
EDTA	Merck
Etanol	Sigma
Et- Br (Etidyum Bromür)	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
Formaldehid	Sigma
RNA İzolasyon Kiti	Thermo Scientific
Gliserol	Merck
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sigma
Hepes	Sigma
MOPS (Asitsiz)	Merck
MgCl ₂ (Magnezyum klorür)	Thermo
Metanol	Sigma
NaCl ₂ (Sodyum klorid)	Sigma
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma
Oligo DT	Thermo
Ribolock RNAase İnhibitör	Thermo
PBS	Sigma
PVDF Membran	Millipore
Page Ruler Prest	Thermo
Reverse Transkriptaz	Thermo
SDS	Sigma

Tablo 2.1: (devam).

Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
SYBR® Green Master Mix	Ampliqon III
Taq Buffer (5X)	Thermo
Taq Polimeraz	Thermo
Tripsin	Sigma
Trizma Base	Sigma
Tween 20	Sigma
TEMED	Sigma
Tripan Blue	Sigma
Sekonder Antikor (goat, anti-rabbit)	Abcam
NONO Antikor	Thermo
Transfeksiyon Kiti	ViaFect™ Transfeksiyon kit
Lusiferaz-SEAP Kit	Takara

2.1.2 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Araç- Gereçler

Çalışmada kullanılmış olan araç- gereçler Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2.2: Tez çalışmamızda kullanılan araç-gereçler.

Cihaz/Araç-Gereç İsmi	Firma/Marka
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo
Buz Makinesi	F. Frigoriferi Scientifici
Hassas Terazi	Sartorius
PCR Cihazı	Bio-rad
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Santrifüj	Hettich Zentrifugen
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex
Elektroforez Güç Kaynağı	Elektromag
Jel Görüntüleme Sistemi	Bioimaging Systems
Otomatik Pipetler	Thermo
Laminar Air Flow	Telstar BIOII
Inverted Mikroskop	Nikon
İnkübatör	WTB, German, Nüve
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	GFL
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Spektrofotometre	Thermo
Luminometre	Thermo
pH Metre	WTW
Vorteks	Elektromag
Otoklav	Hirayama
qRT-PCR	Roche
SDS-PAGE Aparatları	Bio-rad

2.1.3 Tez Çalışmamızda Kullanılmış Olan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında kullanılan PC-3 hücre hattı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden sağlanmıştır.

2.2 Metot

2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Alanların ve Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan ve yüksek sıcaklığa dayanıklı mikropipet uçları, PCR tüpleri, endodorflar, tüm cam malzemeler ve bakteri kültür ortamı 1,02 atm basınçlı otoklavda 121 °C' de 20 dakika boyunca steril edildi. Otoklavı gerçekleştiren malzemeler 80 °C sıcaklıktaki etüvde kurumaya bırakıldıktan sonra kullanıldı.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışmalarında; laminar flow ve inkübatör periyodik bir şekilde, Çamaşır Suyu (Sodyum Hipoklorit/NaClO), % 70' lik Etil alkol ve virkon (Virkon S Geniş Spektrumlu Virüsidal Dezenfektan) ile temizlendi. Çalışmaların olmadığı zamanlarda kültür odası ve laminar flow UV ışığına maruz bırakılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Ayrıca RNA tabanlı çalışmalarda yukarıda belirtilen temizleme solüsyonlarına ilaveten ortam ve mikropipetler DEPC (Diethyl Pirokarbonat) içerikli su ile temizlendi.

2.2.2 YBX1 ve NonO/p54^{nrb} Genlerinin Biyoinformatik Analizleri ve Çalışmada

Kullanılan Diğer Primerler

Grubumuz öğrencilerinden Yağmur Vecide Yeşildirek' in 2017 yılında lisans bitirme çalışmasında yürütülen Tübitak 2015/1 Dönem 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı 1919B011500276 numaralı proje kapsamında YBX1 geninin tüm nükleotit dizisi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) sayfasından bulunmuştur [Gen Bankası No: NM_004559.4]. Bu genin 253 bp' lik bölgesi belirlenip, ileri ve geri primer dizaynı yapılmıştır.

NonO/p54^{nrb} geninin tüm nükleotit dizisi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) sayfasından bulunmuştur [Gen Bankası No: NC_000023]. Ekspresyon çalışmaları için NonO/p54^{nrb} geninin transcript variant 4, mRNA dizisine bakılarak ileri ve geri primer dizaynı yapılmıştır [97].

Hairpin oluşumu, Tm değerlerinin hesaplanması, % G-C içeriğinin bulunması gibi değişkenler Oligo Analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. ([http:// www.idtdna. Com /analyzer/ Applications/OligoAnalyzer](http://www.idtdna.Com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer)).

Housekeeping genler; tipik olarak temel hücrel fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli olan kurucu genlerdir ve normal ve patofizyolojik koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde eksprese edilirler. Bu genlerin optimizasyonu RT-PCR gibi gen ekspresyon deneylerinde kullanılmadan önce yapılmalıdır. Bu doğrultuda H β 2 (Human Beta-2 Microglobulin) ekspresyon primerleri de tez çalışmamız kapsamında kullanıldı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Tez çalışmamızda kullanılan ekspresyon primerleri.

Gen	Primer Dizi	Tm (°C)
YBX1	Forward Primer: 5'- GGGACAAGAAGGTCATCGCAACGAA- 3'	76
	Reverse Primer: 5'- TGAACTGGAACACCACCAGGACCTG- 3'	78
NonO/p54 ^{nrb}	Forward Primer: 5'-ATATGCCACTCCGTGGAAAG-3'	54.8
	Reverse Primer: 5'-GAAGGAGCCTTCACTGCATC-3'	55.9
H β 2	Forward Primer: 5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	60
	Reverse Primer: 5'-CATGTCTCCATCCCCTTAACT-3'	60
HIF-1 α	Forward Primer: 5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT- 3'	56.9
	Reverse Primer: 5'-TGTCCCTGTGGTGA CT TGTCC- 3'	56.9

2.2.3 Hücre Kültürü Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

2.2.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.3.1.1 FCS (Fetal Calf Serum) ve Kültür Medyumunun Hazırlanması

Ticari olarak Gibco firmasından temin edilen FCS' nin transferi soğuk zincirle yapıldı. Stok serumun ilk kullanımdan önce +4 °C' de bir gece boyunca erimesi sağlandı. Eritme işleminin ardından 37 °C' de 15 dakika ve 56 °C' de 35 dakika ısı ile inaktive edilerek küçük hacimlere paylaştırılıp sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

Hücrelere besiyeri oluşturmak üzere; DMEM (Dulbecco' s Modified Eagles Medium)' e son konsantrasyon % 10 olacak şekilde FCS ve son konsantrasyon % 1 olacak şekilde antibiyotik eklendi. Hücrelerin rutin büyütülmesinde, pasajlanmasında ve deneyler esnasında bu medyum kullanıldı.

2.2.3.1.2 PBS (Phosphate Buffered Saline) ve TE (Trypsin-EDTA)' nin Hazırlanması

Ticari olarak Sigma firmasından temin edilen PBS tabletleri, her 100 mL başına 1 tablet olacak şekilde saf su içerisinde çözülerek 121 °C' de 20 dakika otoklav yapıp steril edildikten sonra +4 °C' de muhafaza edildi.

TE hazırlamak üzere; steril cam malzemeler kullanılarak, % 0,05 Trypsin ve 0,5 mM EDTA, % 1' lik PBS içerisinde çözüldü. 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı ve -20 °C' de muhafaza edildi.

2.2.3.2 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlama İşlemi

İlk olarak kullanılacak ortam ve malzemelerin sterilizasyonu sağlandıktan sonra, Bölüm 2.2.3.1.1' de açıklandığı şekilde medyum hazırlandı. -80 °C derin dondurucuda daha öncesinde muhafaza edilmiş olan hücreler alınarak, çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler % 10 FCS içerikli 5 ml DMEM' e alındı, alt üst edilerek 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilip oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pellet yine % 10 FCS içerikli DMEM ile çözüldü ve son hacim 15 mL olacak şekilde 75 cm²' lik flasklara ekimi yapıldı. Flasklar isim tarih ve pasaj numaraları yazılarak etiketlenip, % 5 CO₂ içerikli ve sıcaklığı 37 °C ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin büyümesi rutin aralıklarla mikroskopta incelendi. Hücreler buldukları flasksın yüzeyini % 80- 90 oranlarında doldurduktan sonra, hücrelerin içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Daha sonra PBS ile yıkama işlemine tabi tutulup PBS de ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreleri buldukları yüzeyden koparmak amacıyla 25 cm² flaskslar için 1 mL, 75 cm² flaskslar için ise 3 mL TE kullanılarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. TE' nin aktivitesini inaktive etmek üzere, kullanılan TE miktarının iki katı kadar FCS içerikli DMEM karışımından eklendi. Hücreler santrifüj tüplerine alınarak 1000 rpm' de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet, bölünecek her flask başına FCS içerikli DMEM' in 2 mL' sinde çözülerek; daha öncesinde içerisine FCS içerikli DMEM' den 13 mL eklenmiş 75 cm² lik flaskslara alınıp, etiketlemesi yapıldı. Büyümeye bırakılmak üzere % 5 CO₂ içerikli ve sıcaklığı 37 °C ayarlı inkübatöre kaldırıldı. Bu teknik ile PC-3 hücre hattı, haftada ortalama 1- 2 kez pasajlama işlemi yapılarak oluşturulup, hücreler çoğaltıldı.

2.2.3.3 Canlı Hücrelerin Sayımı

Transfeksiyon işlemleri, hipoksik koşulun oluşturulması ve RNA izolasyonu için ilgili hücre hattının büyütülmesinden sonra canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Bu işlem için toplam hücre süspansiyonunda mm² başına düşen hücre sayısını hesaplarken; üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip olan, böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği Thoma Lamı kullanıldı. 1: 1 oranına uygun biçimde 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl Trypan Blue karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sağlandıktan sonra pipetajlama ile homojenizasyon sağlandı. Canlı hücrelerin sayımı Thoma Lamına alınıp mikroskopta yapıldı. Ölü hücreler Trypan Blue' yu absorbe edeceği için mavi boyanırken, canlı hücreler boyanmadı. Daha sonra kesişim alanındaki karelerde bulunan hücreler sayılarak aşağıdaki formüle göre hesaplaması yapıldı.

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

2.2.3.4 İlgili Hücrelerle Deney Kurulması ve Hipoksik Koşulun Sağlanması

Belli zaman dilimlerinde (24, 48 ve 72 saat olmak üzere) normoksik ve hipoksik koşullarda RNA hücre pelleti almak üzere plate out yapıldı. Bunun için 75 cm² lik flaskslarda büyütülen hücreler minimum pasaj numarası 3' e geldiklerinde hücre sayımı yapıldı. 25cm² lik flaskslara % 10 FCS içerikli DMEM ortamında her flaska 2 milyon adet hücre olacak şekilde hücreler yayıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Normoksik koşulu sağlaması için hücrelere herhangi bir kimyasal uygulanmazken; hipoksik ortamı sağlaması

istenilen flasklara, son konsantrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ eklenerek kimyasal yöntemle hipoksik koşul oluşturuldu. İstenilen koşullar altında inkübe edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat zaman dilimleri sonunda TE ile kaldırılarak RNA izolasyonu yapılmak, ardından ilgili ekspresyon primerlerinin optimizasyonunu sağlamak üzere pelletler alındı ve -80 °C dolaba kaldırıldı.

Transfeksiyon deneyleri için hücre sayımından sonra yine 25 cm²' lik flask başına 2 milyon adet hücre olacak şekilde % 10 FCS içerikli DMEM ortamında hücreler yayıldı. 24 saat sonra transfeksiyon deneyi kuruldu. Tüm deneysel süreçlerde transfeksiyonlar, Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu ve/veya ViaFect™ Transfeksiyon kiti ile gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72 saat hipoksik koşulu sağlanması istenilen flasklara, transfeksiyondan 2 saat sonra 150 µM olacak şekilde CoCl₂ muamele edildi. İstenilen koşullar altında inkübe edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat zaman dilimleri sonunda TE ile kaldırılarak RNA izolasyonu ve protein izolasyonu yapılmak üzere pelletler alındı ve -80 °C dolaba kaldırıldı.

2.2.3.5 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Bölüm 2.2.3.2' de açıklandığı şekilde flasklara eşit oranda paylaşırma aşamasına kadar getirilip, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelletine FCS ve % 10 DMSO (Dimethyl Sulfoxide/Dimetil Sülfoksit) eklenerek, hücreler süspanse hale getirildi. Cryovial tüplere koyulup etiketlemesi yapılarak -80 °C' de muhafaza edildi.

2.2.4 DNA Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

2.2.4.1 YBX1 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxi Prep.)

Büyük miktarlarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Nucleobond Xtra Midi Plus Plazmit DNA izolasyon kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde; seçici antibiyotik (Ampicillin) içerikli 10 ml LB broth besiyerine uygun bakteri soyu tek koloni ekim yapıldı. 37 °C' de, 12- 16 saat, 200 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Sonrasında bu besiyeri, 1/1000 oranında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilüe edilip, yine 12- 16 saat çalkalamalı etüve bırakıldı. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra kit protokolünün basamaklarına uygun şekilde izolasyon gerçekleştirilip, spektrofotometre ölçümleri yapıldı. Sonuçta yüksek saflık ve yoğunlukta DNA elde edildi.

2.2.4.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Tayini

İzole edilen plazmit DNA' nın miktarı ve saflığı 260 nm ve 280 nm' de absorbans alımı ile hesaplandı. Bu amaçla kuvarz küvetlere kör değer için, 200 µl dH₂O, DNA ölçümleri için, 195 µl dH₂O ve ilgili plazmit DNA koyuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{DNA miktarı: } A_{260} \times 50 \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Saflık: } A_{260} / A_{280}$$

2.2.4.3 YBX1 Plazmit DNA Kesimi

İlgili gen bölgesinin mevcut plazmit DNA' da varlığının kontrolünün sağlanması amacıyla YBX1 plazmit kesimi gerçekleştirildi. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için; DNA (YBX1 plazmit), green buffer, dH₂O, Hind III ve XhoI restriksiyon enzimleri kullanılırken, tüp başına son hacim 20 µl olacak şekilde 37 °C' de 30 dakika inkübasyon sağlandı. Daha sonra kesim planının agaroz jel elektroforezinde görüntüsü alınarak kontrol sağlandı.

2.2.5 RNA Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

2.2.5.1 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu Yöntemi ile Transfeksiyon Deneyleri

6. veya 7. pasaja gelmiş optimal büyüklüğe ulaşan hücreler Trypan Blue kullanılıp hemositometrik olarak sayıldı ve 12 adet 25cm²' lik flaska, flask başına 2 milyon hücre olacak şekilde dikkatlice paylaştırıldı. Homojen olarak antibiyotiksiz besiyerinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, gerekli stok solüsyon verileri Tablo 2.4' te belirtilen Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu yöntemi ile transfeksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 2.4: Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu için gerekli solüsyonlar ve içerik bilgileri.

Solüsyon	İçerik
CaCl ₂ (2mM)	14,7 gram CaCl ₂ , 50 mL' ye dH ₂ O ile tamamlandı. Otoklavı yapıp, +4 °C' de saklandı.
2X HEPES (pH: 7,05-7,12 olmalıdır.)	1,6 gram NaCl; 0,04 gram Na ₂ HPO ₄ ve 1,3 gram HEPES 100 mL' ye dH ₂ O ile tamamlandı. Otoklavı yapıp, -20 °C' de saklandı.

2.2.5.2 RNA İzolasyonu

İzolasyonun gerçekleştirileceği alan ve izolasyon esnasında kullanılacak tüm malzemeler bir Ribonükleaz (RNase/RNAz) inhibitörü olan DEPC' li su ile temizlendi. RNA izolasyonu yapılmak üzere daha önceden -80 °C dolaba kaldırılan hücre pelletlerinin buz kalıbı üzerinde çözülmesi sağlanıp, pelletler PBS ile yıkandı. Bu işlemin ardından RNA izolasyonu Thermo firmasının bir ürünü olan "GeneJET RNA Purification Kit" ile protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA miktarı belirlendikten sonra örnekler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C dolaba kaldırıldı.

2.2.5.3 Spektrofotometre ile RNA Miktarının Hesaplanması

Kuvartz küvetlere kör değer için 200 µl dH₂O; RNA ölçümleri için 195 µl dH₂O ve 5µl ilgili RNA örneği koyuldu. Safliklarının belirlenmesi amacıyla 260 ve 280 nm' lerde absorbans ölçümü alınıp; miktar tayini ve saflık analizi aşağıda belirtilen formüllere göre yapıldı.

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

$$\text{Saflık: } A_{260} / A_{280}$$

2.2.5.4 Formaldehit Jel Elektrofrez (RNA Jeli)

İzole edilmiş RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümünün jel elektrofrez ile kontrolünün sağlanması amacıyla Formaldehit Jel Elektrofrez gerçekleştirildi.

Elektrofrez tankı ve aparatları jel dökülmeden önce % 0,5' lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC' li sudan geçirildi. Daha sonra etanol ile yıkandıktan sonra peçete üzerinde kurumaya bırakıldı. 0,5 gram agarose, 5 ml 10X FA jel tampon ve 50 ml DEPC' li su mikrodalgada kaynatıldı ve buharlaşma bitene kadar soğumaya bırakıldı. 900 µL formaldehit ve 1 µL etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel donduktan sonra kaset 1XFA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. 5 µL RNA örneği ve 3 µL 2X yükleme boyası 65 °C' de 3- 5 dakika bekletildi ve buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi. (Tablo 2.5 Formaldehit Jel Elektrofrez Çözeltileri).

Tablo 2.5: Formaldehit jel elektroforez çözeltileri.

Solüsyon	İçerik
10X FA Jel Tamponu	41,9 gram MOPS(asitsiz); 6.8 gram Na-asetat; H ₂ O; 20 ml 0,5 M EDTA; pH: 7 ve 1 litreye tamamlandı.
FA Jel Yürütme Tamponu	100 ml 10X FA Jel tamponu, 20 ml % 37' lik(12,3 M) formaldehit, 880 ml DEPC' li su.
1L DEPC' li H₂O	1ml DEPC 1L dH ₂ O' ya eklendi ve 37 °C' de 1 gece bekletildi.

2.2.5.5 cDNA Sentezi

İzole edilen RNA' lardan konsantrasyonu 1 µg' a karşılık gelecek hacimlerde alınıp Reverse Transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA elde edildi. Tepkime aşağıda belirtilen Tablo 2.6 koşullarında gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen cDNA' nın 1µl' si Hß2 ekspresyon primerleriyle gerçekleştirilen kontrol PCR' da kullanılarak cDNA kalitesi saptandı.

Tablo 2.6: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve koşullar.

Reaksiyon Bileşenleri	Son Konsantrasyon
RNA Kalıp Zincir	1 µg
dH ₂ O	X µL
Oligo dT	200 pmol
Total hacim	12,5 µL
65 °C' de 5 dakika	
5X Reaksiyon Tamponu	1 X
dNTP (mix)	1 mM
Ribolock RNaz İnhibitörü	20 U / µL
Reverse Transkriptaz	10 U / µL
Total hacim	20 µL
42 °C' de 60 dakika	
70 °C' de 10 dakika	

2.2.5.6 PCR (Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışması ile cDNA Kontrolü

İlk olarak; elde edilen cDNA örneklerinin kontrolünün sağlanması için 1 µL cDNA ve Hβ2 ekspresyon primerleri kullanılarak koşulları Tablo 2.7’ de gösterilen bir kontrol PCR kuruldu. Daha sonra insan NonO/p54^{nrb} geni için tasarlanan spesifik primerler ve YBX1 geni için tasarlanan spesifik primerler ile PCR çalışmaları gerçekleştirildi (Tablo 2.8 ve Tablo 2.9).

Bahsi geçen her üç PCR çalışmasında tüp başına 1 µL cDNA, 0,2 mM dNTP, 1 µg forward ve reverse primerler, Ampliqon III Taq DNA polimeraz, 10X Taq Buffer ve 2 mM MgCl₂ kullanılırken, total hacim 50 µL’ yi verecek miktarda da dH₂O eklendi.

Tablo 2.7: Hβ2 primerleri için PCR koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94 °C	2 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	60 sn	
Bağlanma	60 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	45 sn	
Final Uzama	72 °C	5 dk	1 döngü

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

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94 °C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn	
Bağlanma	51 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	30 sn	
Final Uzama	72 °C	5 dk	1 döngü

Tablo 2.9: YBX1 primerleri için PCR koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94 °C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn	
Bağlanma	61 °C	30 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	30 sn	
Final Uzama	72 °C	5 dk	1 döngü

2.2.5.7 Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez, agarın ana bileşenlerinden olan agaroz matriksinde DNA veya proteinler gibi karışık bir makromolekül popülasyonunu ayırmak üzere moleküler biyoloji ve genetik, biyokimya ve klinik kimyada kullanılan bir jel elektrofrez yöntemidir. Burada DNA ve RNA fragmanları uzunluklarına göre ayrılabilir. Bu bağlamda % 0,8 Agaroz içerikli jel hazırlandı. Jel hazırlamak üzere 0,6 gram Agaroz tartılıp, 75 mL içeriği ve hazırlanışı Tablo 2.10' da gösterilen 0,5X TBE tamponunda mikrodalga fırın kullanılarak çözündürülüp homojenize edildi ve soğumaya bırakıldı. Jel kasete dökülmeden önce üzerine UV Transillüminatör cihazda görüntüleyebilmek için son konsantrasyon 0,5 µg / ml olacak miktarda EtBr (Etidyum Bromür/Ethidium bromide) eklendi. Taraklar kasete yerleştirildikten sonra jel döküldü ve polimerizasyona bırakıldı. Polimerleşen jelde kuyucuk oluşumunu sağlayan taraklar jelden çıkarıldı. Jel kaseti elektrofrezin yapılacağı tanka yerleştirilerek, tank 0,5X TBE tamponu ile dolduruldu. Örneklerin kuyulara inmesini sağlamak ve jelde yürürken takibini yapabilmek amacıyla her birine 6X Loading Dye koyuldu. Bu işlem için 25 µl hacim başına 5 µl boya oranı kullanıldı. Daha sonra 90 Voltta 40 dakika yürütülerek UV Transillüminatör cihazda fotoğraflanması yapıldı.

Tablo 2.10: Agaroz jel elektrofrez çözeltileri.

Solüsyon	İçerik
5X TBE (pH: 8,00)	54 gram Tris Base ve 27,5 gram Borik Asit tartılıp, 20 ml 0,5M EDTA eklendi. pH 8,00' e ayarlanıp, dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.
0,5X TBE	5X TBE stok tampondan 100 ml alınarak üzeri dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.

2.2.5.8 Real Time PCR

Roche Diagnostic' in Light Cycler 485 isimli cihazı kullanılarak Real Time PCR gerçekleştirildi. Real Time PCR tekniği; kontrol ve transfeksiyon çalışmalarından elde edilen her bir cDNA için üç tekrara sahip olacak şekilde tasarlandı. Çalışmada NonO/p54^{nrb}, YBX1 ve HIF ekspresyon primerlerinin yanı sıra Hβ2 ekspresyon primerleri de internal kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 2.11' de verilirken; Real time PCR döngü koşulları Tablo 2.12' de gösterilmiştir.

Tablo 2.11: Real time PCR reaksiyon bileşen ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
SYBR® Green Master Mix	5 µL
cDNA	1 µL
dH ₂ O	2 µL
Son Hacim	10 µL

Tablo 2.12: Real time PCR döngü koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 °C	10 dk	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 sn	
Bağlanma	55 °C	10 sn	35 döngü
Uzama	72 °C	15 sn	
Final Uzama	95 °C	5 sn	1 döngü
	65 °C	1 dk	

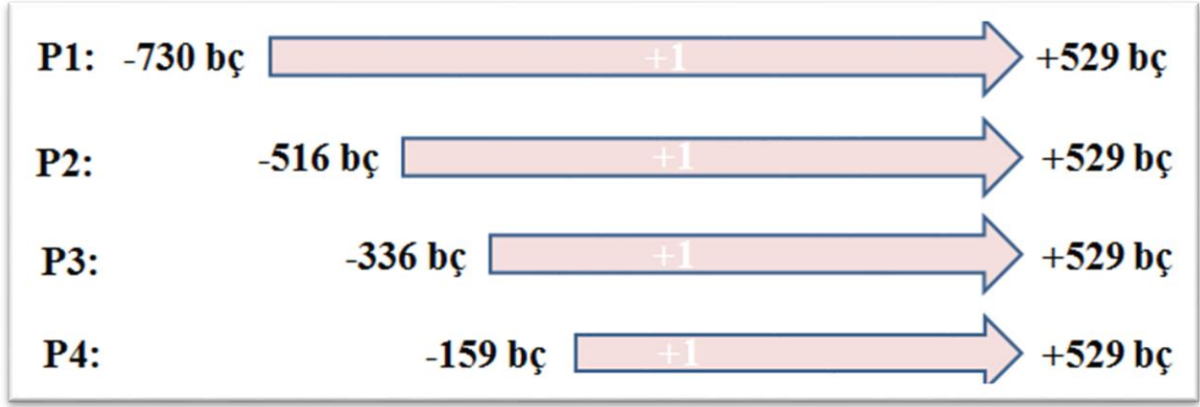
NonO/p54^{nrb}, YBX1 ve HIF için üç tekrarlı Ct değerlerin ortalaması alındı. Ayrıca internal kontrol Hβ2 ortalaması da alındı. Hβ2 kontrol genin ortalama değerinden elde edilen ilgili genin ortalama değeri çıkarıldı. Sonuç değeri, 2' nin üssü olacak şekilde kuvvet alındı. Kontrol grup kendine bölündü ve 1 sayısı elde edildi. Daha sonra ilgili zaman aralığında çalışılan deney grubu, aynı zaman aralığında çalışılan kontrol grubuna bölündü. Bunun sonucunda 1' in katı şekilde değerler elde edildi ve sütun grafiği oluşturuldu.

2.2.6 Bazal Transkripsiyonel Aktivite Tayini Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan

Metotlar

2.2.6.1 Transfeksiyon Deneyleri

6. veya 7. pasaja gelmiş optimal büyüklüğe ulaşan hücreler Trypan Blue kullanılıp hemositometrik olarak sayıldı ve 12' li well platelere kuyucuk başına 250 000 hücre olacak şekilde dikkatlice paylaştırıldı. Homojen olarak antibiyotiksiz besiyerinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, ViaFect™ Transfeksiyon kiti ile transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden yaklaşık 2 saat sonra uygun kuyulara hipoksiya uygulaması yapıldı. Sonrasında 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde, normoksik/hipoksik kontrol; YBX1 ve NonO/p54^{nrb} promotor konstraktların transfekte hücre medyumları olmak üzere 4' er adet medyum endorflara alınıp -20 dolaba saklandı.



Şekil 2.1: NonO/p54^{nrb} promotor parçalarının temsili diyagramı.

2.2.6.2 Lusiferaz Aktivite Tayini

İlgili medyumlar her bir ependorftan 9' ar μL alınarak, 384 well plate kuyucularına koyuldu. Takara Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay Kit içerisindeki 10X Lusiferaz Substratı, kit içerisindeki eşit hacimdeki substrat buffer ile çözülerek hazırlanıp, Reaksiyon Tamponu ile 1X' e dilüe edildi. Bir örnek için taze hazırlanmış 1X Substrat/Reaksiyon tamponundan 1 μL kullanıldı ve bütün örnekler luminometrede tek tek hızlıca ölçülerek sonuçlar alındı.

2.2.6.3 SEAP (Secreted Alkaline Phosphatase Assay/Salgılanan Alkalın Fosfataz)

Aktivite Tayini

SEAP aktivitesini ölçmek üzere yine Takara Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay Kit, protokolüne uygun şekilde kullanıldı. İlgili medyumlardan 5 μL alınarak 384 well plate kuyucuklarına koyuldu. Kit içerisindeki 5X dilüsyon tamponu 1X' e dilüe edilerek kuyucuk başına 15' er μL olacak şekilde eklendi. Plate alüminyum folyo ile sarılarak 65 °C' de 30 dakika; ardından 2- 3 dakika buzda bekletilip sonrasında oda sıcaklığına alındı. Oda sıcaklığına gelen kuyucuklara SEAP substrattan 20' şer μL eklendi. Son olarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından sonuçlar luminometre ile alındı.

2.2.7 Protein Tabanlı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

2.2.7.1 Transfeksiyon Deneyleri

6. veya 7. pasaja gelmiş optimal büyüklüğe ulaşan hücreler Trypan Blue kullanılıp hemositometrik olarak sayıldı ve 12 adet 25cm²' lik flaska, flask başına 2 milyon hücre olacak şekilde dikkatlice paylaştırıldı. Homojen olarak antibiyotiksiz besiyerinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, ViaFect™ Transfeksiyon kiti ile transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden yaklaşık 2 saat sonra uygun kuyulara hipoksiya uygulaması yapıldı. Sonrasında 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde, normoksik/hipoksik kontrol ve YBX1 transfekte hücre pelletleri, daha sonra protein ekstraktlarının hazırlanması amacıyla -80 °C' lik dolaba koyuldu.

2.2.7.2 RIPA Buffer ile Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

-80 °C' de protein ekstraksiyonu için muhafaza edilen; 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde, normoksik/hipoksik kontrol ve YBX1 transfekte edilmiş hücre pelletleri çıkarılarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Her birine, içerik bilgisi Tablo 2.13' te verilen 100 µl RIPA buffer eklendi. 40 dakika buz üzerinde bekletildi. Bekleme süresi boyunca 10 dakikada bir pipetaj yapıldı. +4 °C ayarlı soğutmalı santrifüjde 1200 g' de santrifüj edildi. Bu işlemin ardından süpernatant kısımlar etiketlenmiş ve buz üzerinde daha önceden soğutulmuş ependorflara alındı. Örnekler -80 °C' de muhafaza edildi.

Tablo 2.13: RIPA buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
TrisCl (pH: 8)	10 mM, 500 µl
SDS	% 0,1' lik, 10 ml
Triton X 100	% 1' lik, 500 µl
Sodyum Deoxycholate	% 0,1' lik, 0,05 gram
NaCl	140 mM, 7ml
EDTA	1 mM, 100 µl
EGTA	1 mM, 500 µl
Proteaz İnhibitörü	2 tablet

2.2.7.3 Protein Miktar Tayini

Protein örneklerinin ölçümü "BRADFORD" reaktifiyle gerçekleştirilmiş olup kör kuyuya 5 µL dH₂O ve 250 µL bradford koyulurken; örnek kuyulara 3 µL protein, 2 µL dH₂O ve 250 µL bradford eklenmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, western blot için 30 µg olacak şekilde protein miktarı hesaplaması yapılmıştır.

2.2.7.4 Western Blot

Bu teknikte kullanılan stok solüsyonlar ve içerik bilgileri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 2.14: Lower buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
Tris	19,8 gram
SDS	0,4 gram
dH ₂ O	pH: 8,8' e ayarlanır; 100 mL' ye tamamlanır.

Tablo 2.15: Upper buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
Tris	6,6 gram
SDS	0,4 gram
dH ₂ O	pH: 6,8' e ayarlanır; 100 mL' ye tamamlanır.

Tablo 2.16: Ayırma jeli (alt jel) içeriği.

Madde	Miktar (2 adet jel için)
Lower Buffer	2,5 mL
Akrilamid- bisakrilamid	2,5 mL
dH ₂ O	5 mL
%10' luk APS (Amonyumpersülfat)	100 µL
TEMED	10 µL

Tablo 2.17: Yığıma jeli (üst jel) içeriği.

Madde	Miktar (2 adet jel için)
Upper Buffer	1,25 mL
Akrilamid- bisakrilamid	0,625 mL
dH ₂ O	3,07 mL
%10' luk APS (Amonyumpersülfat)	50 µL
TEMED	5 µL

Tablo 2.18: 10X Running buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
Tris	30,3 gram
Glycine	144,4 gram
dH ₂ O	pH: 8,3' e ayarlanır; 1L' ye tamamlanır.

Tablo 2.19: 1X Running buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
10X Running Buffer	100 mL
dH ₂ O	900 mL
%10' luk SDS	10 mL

Tablo 2.20: Transfer buffer solüsyon içeriği.

Madde	Miktar
10X Running Buffer	200 mL
Methanol	200 mL
dH ₂ O	1L' ye tamamlanır.
%10' luk SDS	1L için 500 µL eklenir.

Tablo 2.21: 10X TBS içeriği.

Madde	Miktar
Tris (0,2 M)	24,22 gram
NaCl (1,5 M)	87,66 gram
dH ₂ O	pH: 7,5' e ayarlanır; 1L' ye tamamlanır.

Tablo 2.22: 1X TBS içeriği.

Madde	Miktar
10X TBS	100 mL
dH ₂ O	900 mL
Tween 20	1L için 1mL eklenir.

2.2.7.4.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE, Ulrich K. Laemmli tarafından geliştirilmiş 5 ile 250 kDa arasındaki moleküler kütlelere sahip proteinleri ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir elektroforetik sistemdir. Bu bağlamda, gerekli cam malzemeler ve elektroforez aparatları saf su, % 70' lik etanol ve % 90' lık izopropanol ile steril edildi. Stok solüsyonlar ise önceden hazırlanıp, otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Ayırma jeli dikkatlice camların üst kısımlarında yaklaşık 2,5 cm boşluk kalacak şekilde dikkatlice döküldü. Bu esnada hava kabarcığı oluşumu gözlenmemesi için % 90' lık izopropanol eklendi. Yaklaşık 30 dakika beklenerek ayırma jelinin tamamen donduğundan emin olundu. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üzerine dökülen izopropanol kurutma kağıdı ile ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra yığma jeli hazırlandı ve polimerize olan alt jelin üzerine döküldü. Üst jel döküldükten sonra hemen kuyucuk oluşumunu sağlayan taraklar yerleştirildi. Yığma jeli de tamamen donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve kuyu oluşumu gözlemlendi. Hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

Miktarları hesaplanan proteinler 22,5 µl hacimde alındı. Protein örneği başına 900 µl 4X Sample Laemmli Buffer' a 100 µl β- merkapto etanol oranlı karışım hazırlandı. Bu karışımdan 7,5 µl alınarak proteinlere eklendi ve son hacim 30 µl olacak şekilde tamamlandı. Örnekler proteinler 5 dakika 95 °C' de denatüre edilerek hazırlandı. İlk kuyuya 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder, diğer kuyulara ise proteinler sırasıyla yüklendi. Örneklerin yürütülmesi için tank, hazırlanışı Tablo 2.19' da gösterilen 1X Running Buffer solüsyonu ile jel sayısı ve 1X Running Buffer oranına dikkat edilerek dolduruldu. Örnekler güç kaynağı ile 90 V akımda yaklaşık iki saat yürütüldü.

2.2.7.4.2 Proteinlerin Membrana Transferi

Her transfer işlemi için taze hazırlanmış olması gerekli olan Transfer buffer, Tablo 2.20' de belirtildiği şekilde hazırlandı ve kullanımdan önce -20 °C' de bir süre bekletildi. Aralarında jeller bulunan camlar, transfer aparatları, süngerler ve uygun boyutlarda kesilerek hazırlanmış kurutma kağıtları transfer tamponunda yaklaşık 10 dakika boyunca bekletildi. Transfer aşaması için PDVF (0,45 µm Milipore) membran kullanıldı. Ayrıca bu membran, soğuk metanolde 1 dakika tutulduktan sonra transfer

buffera alınarak transfer sistemi için hazırlandı. Cam levhalar arasındaki jel çıkartıldı; yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra, transfer kaset arasına sırasıyla süngerler, kurutma kağıtları, jel, membran, tekrar kurutma kağıtları ve süngerler yerleştirilmek suretiyle sandviç hazırlandı. Bu esnada hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Son olarak, transfer kaset, soğuk transfer tamponu ile doldurulmuş olan Bio- Rad Trans Blot sistemine yerleştirildi ve 15 voltluk akım ile +4 °C' de bir gece boyunca proteinlerin membrana transferi sağlandı.

2.2.7.4.3 Protein Örneklerinin Tespiti ve Görüntüleme

Transfer sisteminden çıkarılan membranlar; öncelikle oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda 1 saat boyunca 20 mL hacimli, 1:20 oranında yağsız süt tozu ve 1X TBS' ten oluşan Blocking Buffer ile muamele edildi. 1 saatin sonunda bu solüsyon uzaklaştırılarak, 3 kez 5' er dakika Tablo 2.22' de içerik bilgisi verilen 1X TBS ile yıkandı. Sonrasında NonO/p54^{nrb} primer antikoru ile yine horizontal çalkalayıcı aracılığıyla 1 gece +4 °C' de muamele edildi. Yine 5' er dakikalık 1X TBS ile yıkamalara tabi tutuldu. Daha sonra da NonO/p54^{nrb} sekonder antikoru ile horizontal çalkalayıcı aracılığıyla yine en az 1 saat muamele edildi. Son olarak da 1'e 1 oranında Reagent A ve B ile hazırlanan Pierce ECL (Thermo marka) substrat solüsyonuna en az 3 dakika tabi tutularak görüntü alma işlemleri gerçekleştirildi.

Membranlar, Strip Buffer ile muamele sonrasında Blocking Buffer ile horizontal çalkalayıcıda 1 saat boyunca bloklamaya alındı. Daha sonra 5' er dakikalık 1X TBS ile yıkamalara tabi tutuldu. Sonrasında normalizasyon için; Beta actin primer antikoru ile horizontal çalkalayıcı aracılığıyla 1 gece muamele edildi. Yine 5' er dakikalık 1X TBS ile yıkamalara tabi tutuldu. Daha sonra da Beta actin sekonder antikoru ile horizontal çalkalayıcı aracılığıyla yine en az 1 saat muamele edildi. Son olarak da 1'e 1 oranında Reagent A ve B ile hazırlanan Pierce ECL (Thermo marka) substrat solüsyonuna en az 3 dakika tabi tutularak görüntü alma işlemleri gerçekleştirildi.

2.2.7.5 İmmünofloresans Teknik ile NonO/p54^{nrb} Proteininin Hücre İçinde

Lokalizasyonunun Belirlenmesi

İmmünofloresans teknik uygulamak üzere 12' li well plate kullanıldı ve her kuyucuğa özel yuvarlak lameller yerleştirildi. Kuyucuk başına 250.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi sağlandı ve son hacim antibiyotiksiz, % 10 FCS içerikli DMEM ile 1 mL'

ye tamamlanıp uygun hücre kültürü inkübatöründe 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, ilgili kuyucuklara CoCl_2 ile hipoksik koşul uygulamaları ve ViaFect™ Transfeksiyon kiti ile 0,5 µg YBX1 transfeksiyonları gerçekleştirildi.

3. gün, hücresel yoğunluğun % 80- 90 oranına ulaştığı kuyucuklardan medyum çekilip, hücreler 2 kez PBS ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Her kuyucuğa % 4' lük paraformaldehit çözeltisi eklenerek 15 dk boyunca fiksasyon sağlandı. Bu içerik pipetle çekilerek atıldı ve PBS ile hücreler üç kez yıkandı. Hücrelere, ilgili proteinin hücre zarında bulunmama ihtimaline karşın, antikorların hücre içine geçebilmesi için hücre zarlarının porlarını genişletmek üzere PBS içinde hazırlanmış % 0.3' lük Triton X-100 muamelesi yapıldı, 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda Triton X-100' ü uzaklaştırmak üzere PBS ile 2 kez yıkama işlemi yapıldı.

İstenmeyen spesifik bağlanmaları engellemek üzere ise; hücrelere % 10 BSA içeren PBS' den 100 µL eklendi ve yarım saat oda ısısında bekletildi. Bloklama basamağının sonunda hücreler 2 kez 5' er dk boyunca PBS ile yıkanarak bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.

Primer antikor muamelesi, 1/100 oranında % 1 BSA içeren PBS serum ile dilüe edilmiş 100 µL NonO/p54^{nrb} primer antikor eklenerek gerçekleştirildi ve 60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin sonunda primer antikor kuyulardan uzaklaştırılıp ve kuyular 3'er kez PBS ile yıkandı.

Bu basamaktan sonraki aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirilmiş olup, floroform konjugat sekonder antikor 1/100 oranında olacak şekilde % 1 BSA içeren PBS ile hazırlandı ve her kuyuya 200 µL eklenerek 1 saat karanlık ortamda inkübe edildi. Sonrasında sekonder antikor kuyulardan çekilip ve 3' er kez PBS ile yıkandı. Her kuyuya 1 µg/mL DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol) eklenerek hücrelerin çekirdek boyaması yapıldı. 15- 20 saniye beklendikten sonra PBS eklenerek ortam sulandırıldı. Lamalara yuvarlak lameller kapatılmadan önce floresans sinyalin zamanla solmasını engelleyen "Mounting Medyum (Antifade solüsyon)" damlatıldı. Daha sonra yuvarlak lameller pens yardımıyla çıkartılıp ters çevrilerek lam üzerine koyulup 4 kenarı oje yardımıyla sabitlendi.

Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' ne ait laboratuvarında bulunan floresans ataçmanlı "Nikon DS-RI2" marka mikroskop floresans görüntülemelerinde kullanıldı.

Mikroskop ile elde edilen görüntüler "Image J" programı kullanılarak densitometrik olarak analiz edildi. Belirli sayıdaki hücrenin çevresi sınırlandırılarak belli değerler elde edildi. Floresans hücre ışınması verilen formül doğrultusunda hesaplandı;

Total hücre floresans ışınması= Tüm yoğunluk- (Hücre alanı × arka plan değeri)



3. BULGULAR

3.1 NonO/p54^{nr}b Geni ve YBX1 Transkripsiyon Faktörünün Biyoinformatik

Analizleri

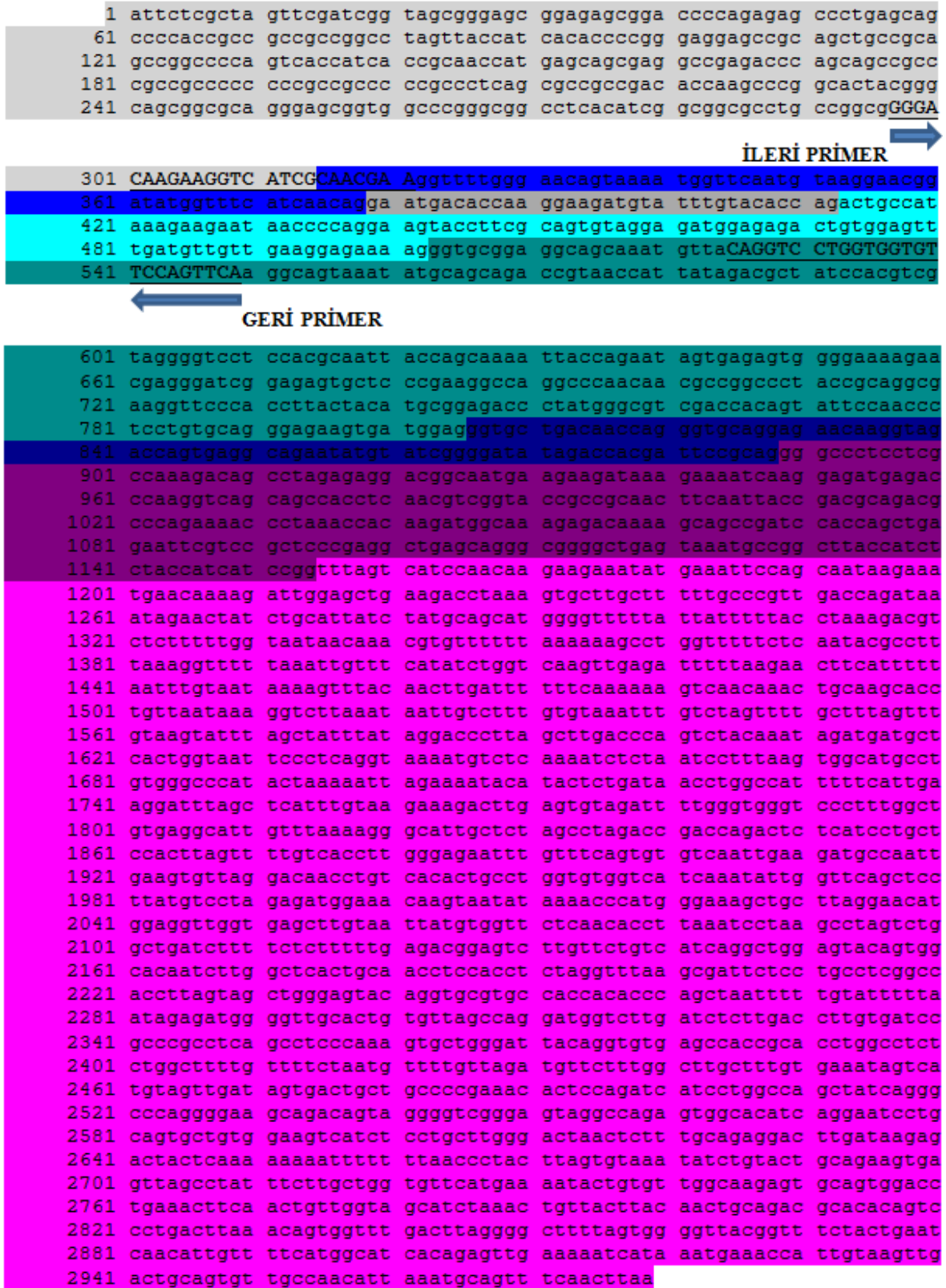
NonO/p54^{nr}b promotör bölgesinde MIA proteine bağlı regülasyonu insan ve farede korunmuştur. -7079 ile -7037 arası 42 bp' lik bir DNA elementi, MIA ile artan NonO/p54^{nr}b promotör aktivitesinde kritik rol oynar. NonO/p54^{nr}b promotöründe MIA ilişkili transkripsiyon bağlanma bölgesinin tanımlanması Gene2Promoter programı (www.genomatix.de) kullanılarak gerçekleştirildi. İlgili promotör bölgede ATG başlangıç kodonuna göre -7075 ile -7070 bp' yi kapsayan bölge MIA' ya bağlı aktivasyondan sorumludur. Program analizi sonrasında gen regülasyonunu fosforilasyonlar kanalıyla düzenleyen YBX1 transkripsiyon faktörü için varsayılan bağlanma bölgesi belirlendi.

Şekil 3.1' de, çalışmamızda kullanılan, Bölüm 2.2.6.1' de temsili diyagramına yer verilen NonO/p54^{nr}b promotör dizide, MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesi lokalizasyonu mevcuttur. Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4' te ise; çalışmamızda kullandığımız diğer promotör konstraktlarda da ilgili bağlanma bölgesinin gösterimine yer verilmiştir.



Şekil 3.1: Tez çalışmamızda kullanılan insan NonO/p54^{nr}b promotör bölgede (P1 (-730 / +529)) MIA aracılı YBX1 bağlanma bölgesinin işaretlendiği temsili diyagram.

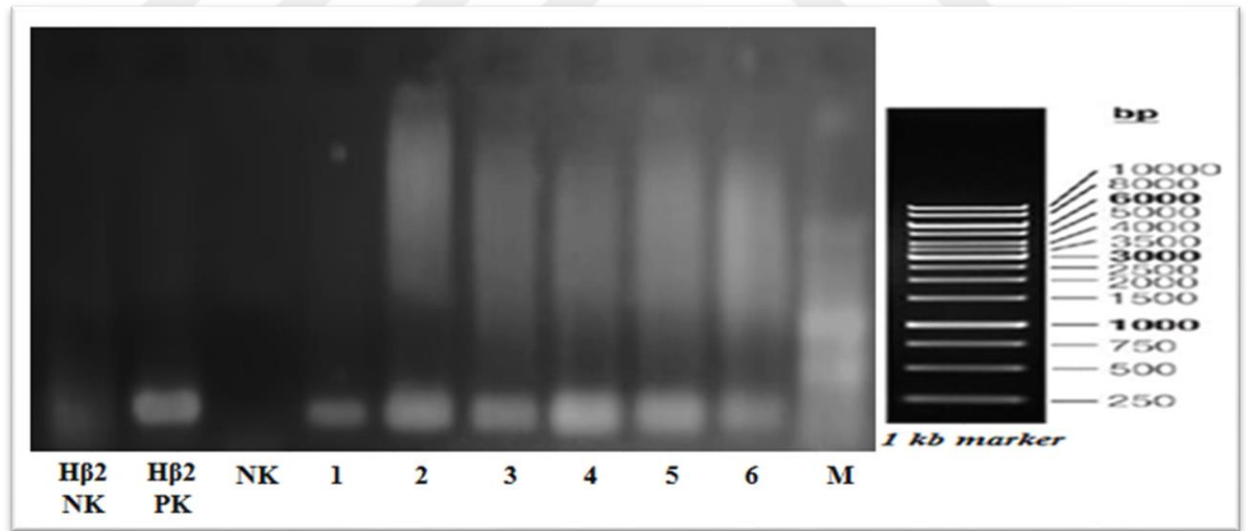
Bölüm 2.2.2' de bahsedildiği üzere, YBX1 mRNA nükleotid dizisi verilen Şekil 3.5' te, tasarlanan ileri ve geri ekspresyon primerlerinin gösterimi mevcuttur.



Şekil 3.5: Tez çalışmamızda kullanılan YBX1 mRNA dizisi ve ifade analizlerinde kullanılan primer bölgeleri. (Ekzonlar farklı renklerle gösterilmiştir. 1. Ekzon: açık gri, 2.

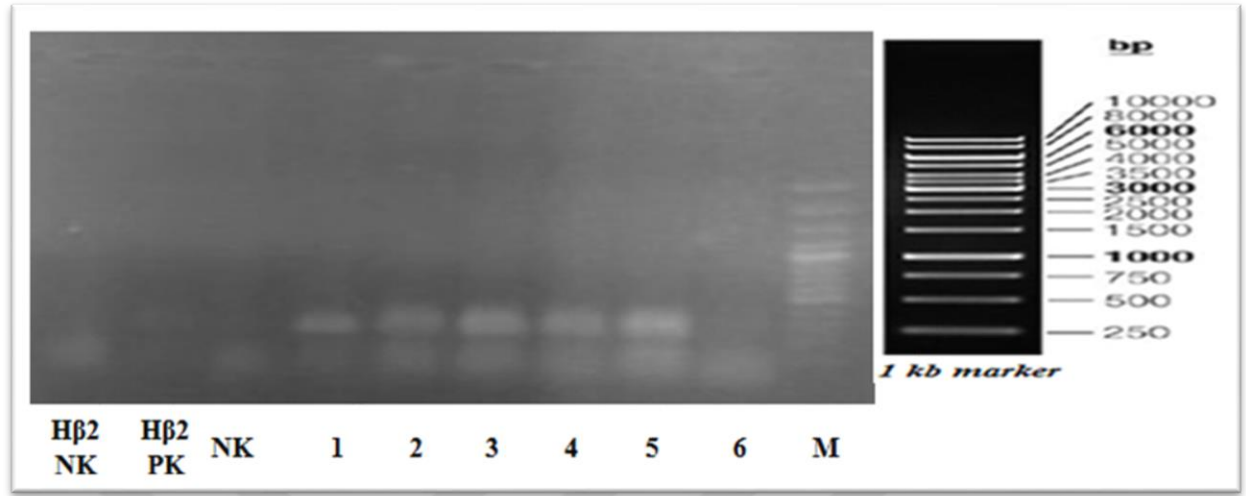
Ekzon: mavi, 3. Ekzon: koyu gri, 4. Ekzon: turkuaz, 5. Ekzon: deniz mavisi, 6. Ekzon: lacivert, 7. Ekzon: mor ve 8. Ekzon: pembe; ileri ve geri ekspresyon primer dizileri koyu büyük harfler ile altı çizili olarak gösterilmiştir.)

Mevcut NonO/p54^{nrb} ve YBX1 ekspresyon primerlerinin optimizasyonunu sağlamak amacıyla, Bölüm 2.2.3.2' de açıklandığı üzere PC-3 hücreleri büyütüldü. Bölüm 2.2.3.4' te belirtilen şekilde normoksik ve hipoksik kontrol gruplardan oluşan deney kurulduktan sonra, ilgili hücre pelletlerinden Bölüm 2.2.5.2' de detaylandırılan kit protokolü ile uygun ortamda RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında Bölüm 2.2.5.3' te belirtildiği şekilde RNA miktarları hesaplanıp, Bölüm 2.2.5.5' te açıklandığı üzere cDNA eldesi sağlandı. Bölüm 2.2.5.6' da açıklanan H β 2 ekspresyon primerleriyle gerçekleştirilen kontrol PCR' ı ile cDNA kalitesi belirlenip, sonrasında koşulları sırasıyla Tablo 2.8 ve 2.9' da verilen NonO/p54^{nrb} ve YBX1 ekspresyon primerlerinin optimizasyon PCR' ları gerçekleştirildi. İlgili PCR ürünlerinin Bölüm 2.2.5.7' de bahsi geçen agaroz jel elektroforezi uygulaması sonucunda ilgili görüntülemelerin (Şekil 3.6 ve 3.7) yapılmasıyla tamamlandı.



Şekil 3.6: NonO/p54^{nrb} ve H β 2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (H β 2 NK: H β 2 Primerleri ile Oluşturulmuş Negatif Kontrol, H β 2 PK: H β 2 Primerleri ile Oluşturulmuş Pozitif Kontrol, NK: NonO / p54^{nrb} Primerleri ile Oluşturulmuş Negatif Kontrol, 1: PC- 3 hücresi 72H Hipoksik Koşul cDNA' sı, 2: PC- 3 hücresi 72H Normoksik Koşul cDNA' sı, 3: PC- 3 hücresi 48H Hipoksik Koşul cDNA' sı, 4: PC- 3 hücresi 48H Normoksik Koşul cDNA' sı, 5: PC- 3

hücresi 24H Hipoksik Koşul cDNA' s1, 6: PC- 3 hücresi 24H Normoksik Koşul cDNA' s1, (M: Marker)

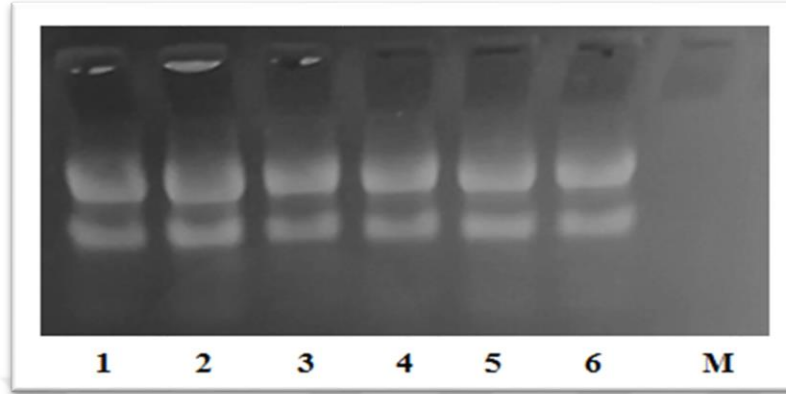


Şekil 3.7: YBX1 ve Hβ2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (Hβ2 NK: Hβ2 Primerleri ile Oluşturulmuş Negatif Kontrol, Hβ2 PK: Hβ2 Primerleri ile Oluşturulmuş Pozitif Kontrol, NK: YBX1 Primerleri ile Oluşturulmuş Negatif Kontrol, 1: PC- 3 hücresi 72H Hipoksik Koşul cDNA' s1, 2: PC- 3 hücresi 72H Normoksik Koşul cDNA' s1, 3: PC- 3 hücresi 48H Hipoksik Koşul cDNA' s1, 4: PC- 3 hücresi 48H Normoksik Koşul cDNA' s1, 5: PC- 3 hücresi 24H Hipoksik Koşul cDNA' s1, 6: PC- 3 hücresi 24H Normoksik Koşul cDNA' s1, M: Marker)

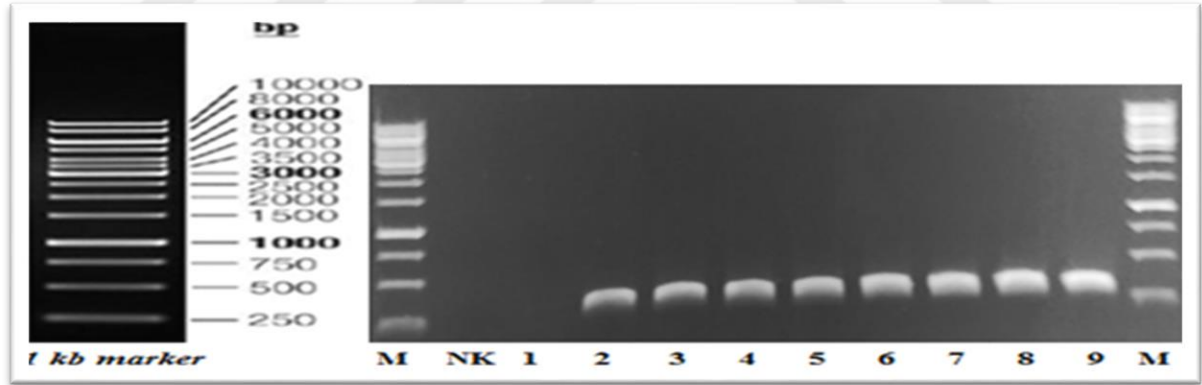
3.2 YBX1' in NonO/p54^{nrb} Geninin mRNA Seviyesindeki Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları

NonO/p54^{nrb} geninin PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1 transfeksiyonu gerçekleştirildiğinde meydana gelecek olan mRNA seviyesindeki ekspresyonu belirlemek amacıyla, Bölüm 2.2.3.2' de açıklandığı üzere PC-3 hücreleri büyütüldü. Bölüm 2.2.5.1' de belirtilen şekilde transfeksiyon deneyi kurulduktan sonra, ilgili hücre pelletlerinden Bölüm 2.2.5.2' de detaylandırılan kit protokolü ile uygun ortamda RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında Bölüm 2.2.5.3' te belirtildiği şekilde RNA miktarları hesaplanıp, RNA kalitesini gözlemleyebilmek adına Bölüm 2.2.5.4' te detaylandırıldığı şekilde formaldehit jel elektroforezi (RNA jel elektroforezi) yapıldı (Şekil 3.8). Herhangi bir degradasyon saptanmayan RNA' lardan Bölüm 2.2.5.5' te açıklandığı üzere cDNA eldesi sağlandı. Ardından Bölüm 2.2.5.6' da açıklanan Hβ2 ekspresyon primerleriyle gerçekleştirilen kontrol PCR' ı ile cDNA kalitesi

belirleme prosedürü, ilgili PCR ürünlerinin Bölüm 2.2.5.7’ de bahsi geçen agaroz jel elektroforezi uygulaması sonucunda ilgili görüntülemenin (Şekil 3.9) yapılmasıyla tamamlandı.

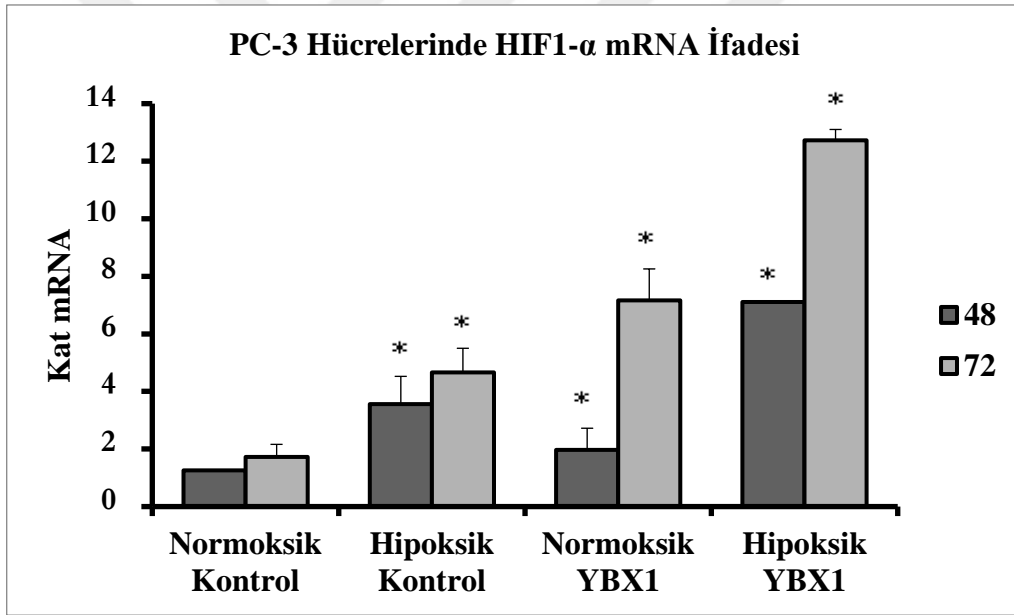


Şekil 3.8: RNA jel elektroforez görüntüsü. (1: PC-3 hücresi 72H Hipoksik mRNA’ sı, 2: PC-3 hücresi 72H Normoksik mRNA’ sı, 3: PC-3 hücresi 48H Hipoksik mRNA’ sı, 4: PC-3 hücresi 48H Normoksik mRNA’ sı, 5: PC-3 hücresi 24H Hipoksik mRNA’ sı, 6: PC-3 hücresi 24H Normoksik mRNA’ sı, M: RNA Marker)

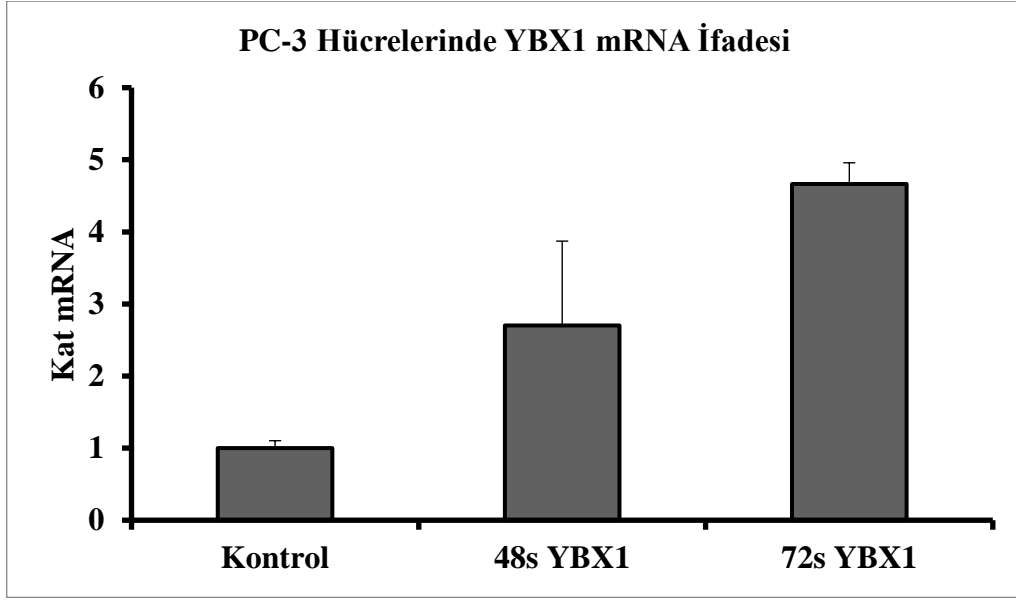


Şekil 3.9: Hβ2 ekspresyon primerleri kullanılarak kurulan kontrol PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1: Boşluk, 2: 72H YBX1 transfekte edilmiş hipoksik koşul cDNA’ sı, 3: 72H YBX1 transfekte edilmiş normoksik koşul cDNA’ sı, 4: 72H hipoksik koşul cDNA’ sı, 5: 72H normoksik koşul cDNA’ sı, 6: 48H YBX1 transfekte edilmiş hipoksik koşul cDNA’ sı, 7: 48H YBX1 transfekte edilmiş normoksik koşul cDNA’ sı, 8: 48H hipoksik koşul cDNA’ sı, 9: 48H normoksik koşul cDNA’ sı)

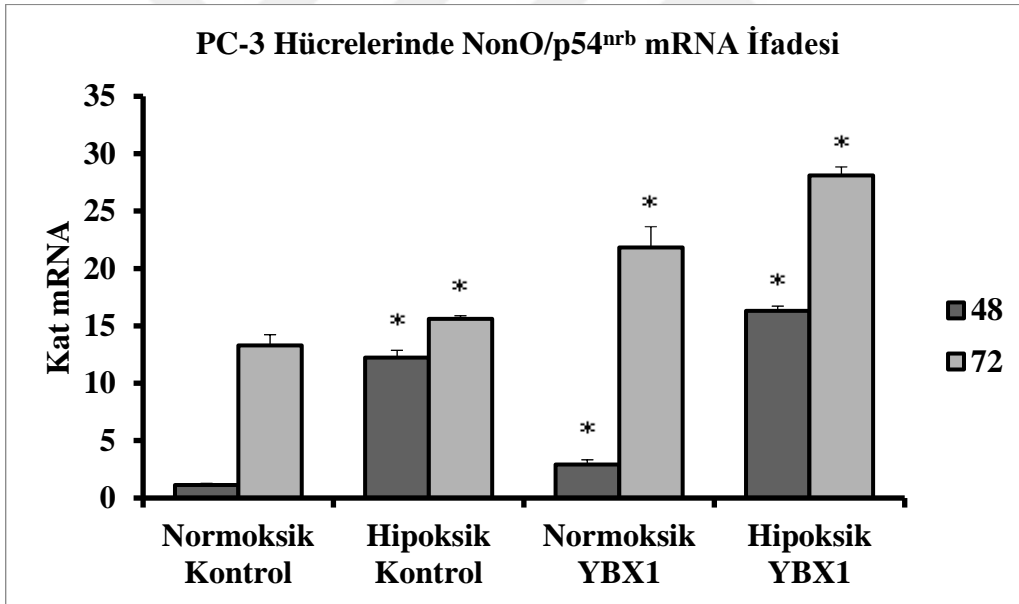
Daha sonra elde edilen cDNA' lar kullanılarak Bölüm 2.2.5.8' de açıklandığı şekilde NonO/p54^{nrb}, YBX1, HIF ve H β 2 ekspresyon primerleri ile uygun koşulları Tablo 2.12' de verilen Real Time PCR uygulamasına gidildi. Bu uygulama ile hem YBX1 transkripsiyon faktörünün hem de hipoksinin NonO/p54^{nrb} mRNA seviyesi üzerindeki etkisinin analizi gerçekleştirildi. Elde edilen cT değerler Livak metodu ile değerlendirildi. Şekil 3.10' da gösterildiği üzere öncelikle, HIF-1 α mRNA seviyeleri normal ve hipoksik koşullarda karşılaştırılmış ve hipoksik koşul doğrulanmıştır. Şekil 3.11' de, YBX1 mRNA seviyeleri incelendiğinde, PC-3 hücrelerinde ektopik ifade etkisi ortaya koyulmuştur. NonO/p54^{nrb} mRNA seviyeleri incelendiğinde ise; hipoksik koşullarda arttığı yeniden teyit edilmiştir. Normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1' in NonO/p54^{nrb}' nin mRNA seviyesini PC-3 hücrelerinde arttırdığı bulunmuştur. YBX1' in NonO/p54^{nrb}' nin mRNA seviyesi üzerindeki indükleyici etkisi hipoksik koşullarda daha güçlüdür (Şekil 3.12).



Şekil 3.10: Kontrol ve YBX1 transfekte PC-3 hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonu ile hipoksik koşulların doğrulanması.



Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında YBX1' in ektopik ifadesi.



Şekil 3.12: PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1' in NonO/p54^{nrb} mRNA seviyesine etkisi.

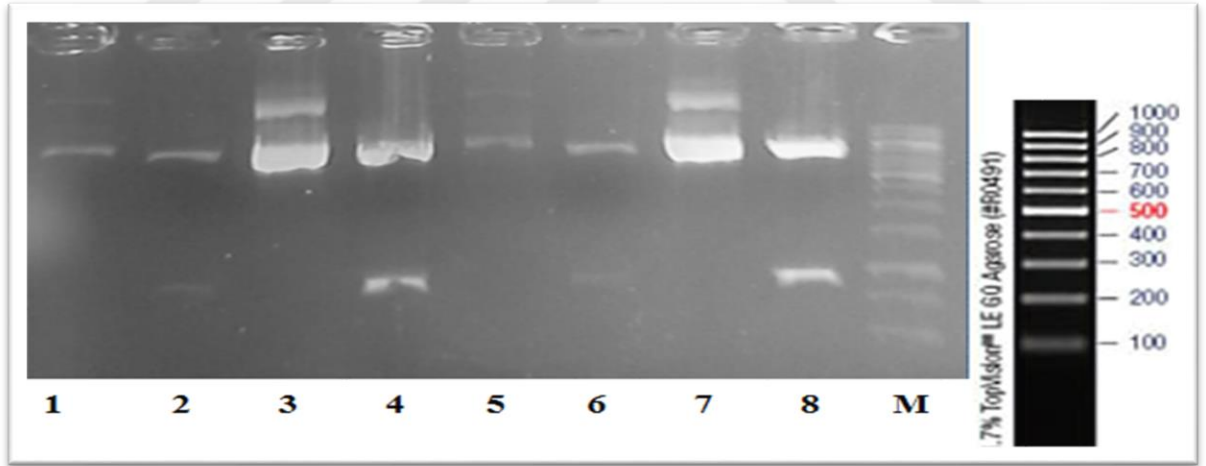
3.3 NonO/p54^{nrb}' nin Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları

3.3.1 YBX1 Plazmit İzolasyonu

Transfeksiyon deneylerine geçmeden önce, Bölüm 2.2.4.1' de detaylandırılan maxi-prep YBX1 plazmit izolasyonu ilgili kitle gerçekleştirilip, Bölüm 2.2.4.2' de bahsedildiği gibi yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda 389 ve 375 ng/μL plazmit elde edildi. Tablo 3.1' de planı verilen ilgili Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle Bölüm 2.2.4.3' te detaylandırıldığı üzere kontrol kesimi yapıldı ve görüntülendi. Kesime tabi tutulmamış elüsyonlar da, 5: 1 oranında DNA/6X loading dye karışımı ile jele yüklendi (Şekil 3.13).

Tablo 3.1: YBX1 plazmit DNA kesim planı.

Bileşen	Miktar
DNA	5 μL
Green Buffer	2 μL
Hind III	1 μL
Xho I	1 μL
dH ₂ O	11 μL
Total Hacim	20 μL



Şekil 3.13: Kesime tabi tutulmuş ve kesime tabi tutulmamış YBX1 plazmit DNA jel elektroforez görüntüsü. (1: 375 ng plazmit DNA 2. Elüsyon (Kesilmemiş), 2: 375 ng plazmit DNA 2. Elüsyon (Kesilmiş), 3: 375 ng plazmit DNA 1. Elüsyon (Kesilmemiş), 4: 375 ng plazmit DNA 1. Elüsyon (Kesilmiş), 5: 389 ng plazmit DNA 2. Elüsyon (Kesilmemiş), 6: 389 ng plazmit DNA 2. Elüsyon (Kesilmiş), 7: 389 ng plazmit DNA 1. Elüsyon (Kesilmemiş), 8: 389 ng plazmit DNA 1. Elüsyon (Kesilmiş) M: 100 bp marker)

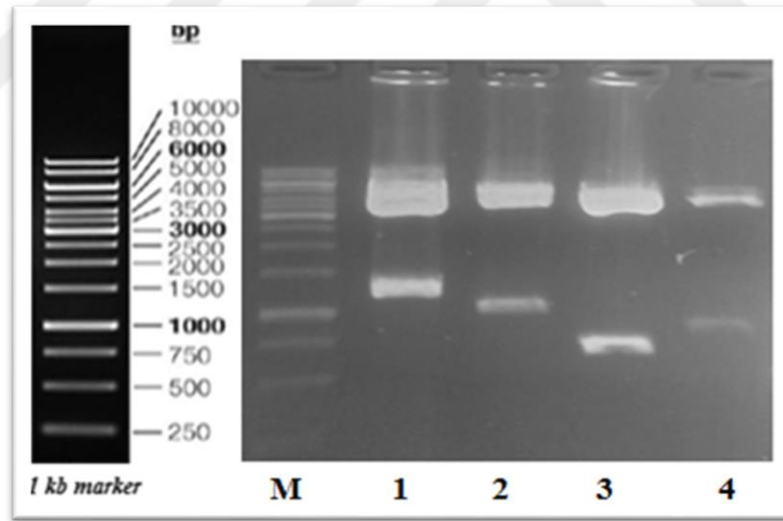
3.3.2 NonO/p54^{nrb} Promotor Konstraktlarının Restriksiyon Endonükleaz Kontrol

Kesimi

Bazal aktivite tayini için gerçekleştirilen çalışmalarda, laboratuvarımızda daha önce Uzman Biyolog Sevgi Baysal tarafından pMet Luc Reporter vektörüne alt klonlanması gerçekleştirilen 4 adet NonO/p54^{nrb} promotör konstraktı Tablo 3.2’ de planı verilen ilgili Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kontrol kesime tabi tutulup, görüntülenmiş ve bu görüntü Şekil 3.14’ te verilmiştir.

Tablo 3.2: NonO/p54^{nrb} pomotor konstraktlarının kesim planı.

1779 ng/µl (P1)	4630 ng/µl (P2)	1143 ng/µl (P3)	318 ng/µl (P4)
DNA: 3 µl	DNA: 1 µl	DNA: 3 µl	DNA: 5 µl
Green Buffer: 2 µl	Green Buffer: 2 µl	Green Buffer: 2 µl	Green Buffer: 2 µl
Hind III: 1 µl	Hind III: 1 µl	Hind III: 1 µl	Hind III: 1 µl
Xho I: 1 µl	Xho I: 1 µl	Xho I: 1 µl	Xho I: 1 µl
dH ₂ O: 13 µl	dH ₂ O: 15 µl	dH ₂ O: 13 µl	dH ₂ O: 11 µl
Total Hacim: 20 µl	Total Hacim: 20 µl	Total Hacim: 20 µl	Total Hacim: 20 µl



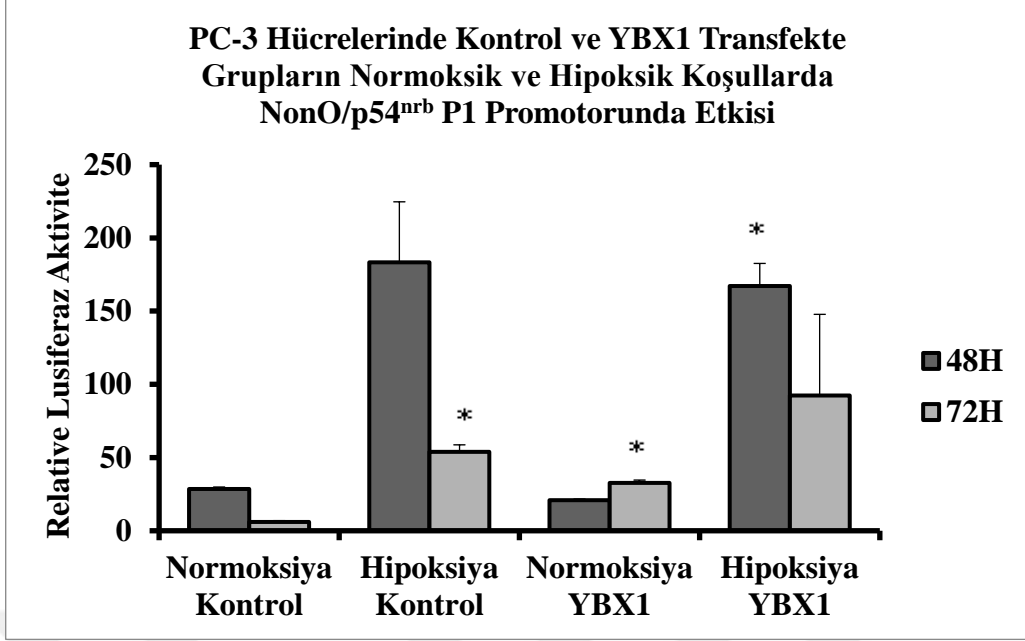
Şekil 3.14: Kesime tabi tutulmuş NonO/p54^{nrb} pomotor konstraktlarının DNA jel elektroforez görüntüsü. (1: P1 (-730/+529) plazmit DNA, 2: P2 (-516/+529) plazmit DNA, 3: P4 (-159/+529) plazmit DNA, 4: P3 (-336/+529) plazmit DNA, M: 1 kb marker)

3.3.3 Lusiferaz-SEAP Aktivite Tayini

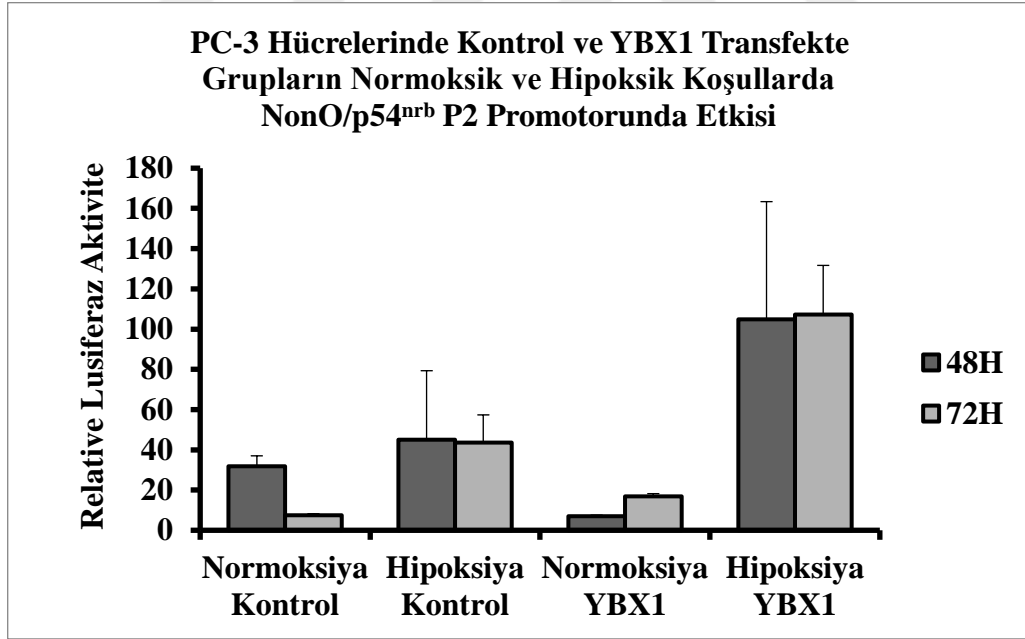
İlgili NonO/p54^{nrb} promotör konstraktları (Şekil 2.1), Bölüm 2.2.6.1’ de detaylandırılan protokol kapsamında 0,5 µg konsantrasyonda olacak şekilde; öte yandan transfeksiyon

başarısının normalizasyonunu sağlayan pSeap2-Kontrol vektör de 0,5 µg konsantrasyona sahip olacak şekilde, hipoksik ve normoksik koşulların uygulandığı 2 adet 12' li well plate lere kuyucuk başına 250.000 hücre olacak miktarda paylaştırılan PC-3 hücrelerine transfekte edildi. 48 ve 72 saat dilimleri şeklinde belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda transfeksiyon medyumlarından eppendorflara 500' er µL alınarak Bölüm 2.2.6.2' de belirtildiği gibi lusiferaz aktivitesi ve Bölüm 2.2.6.3' te belirttiği gibi SEAP aktivitesi ölçüldü. Ölçüm sonuçlarında elde edilen Lusiferaz değerler, SEAP değerlerine bölünerek aktivasyon tayini belirlenip, sonuçlar aşağıdaki grafiklerle (Şekil 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18) ortaya koyulmuştur.

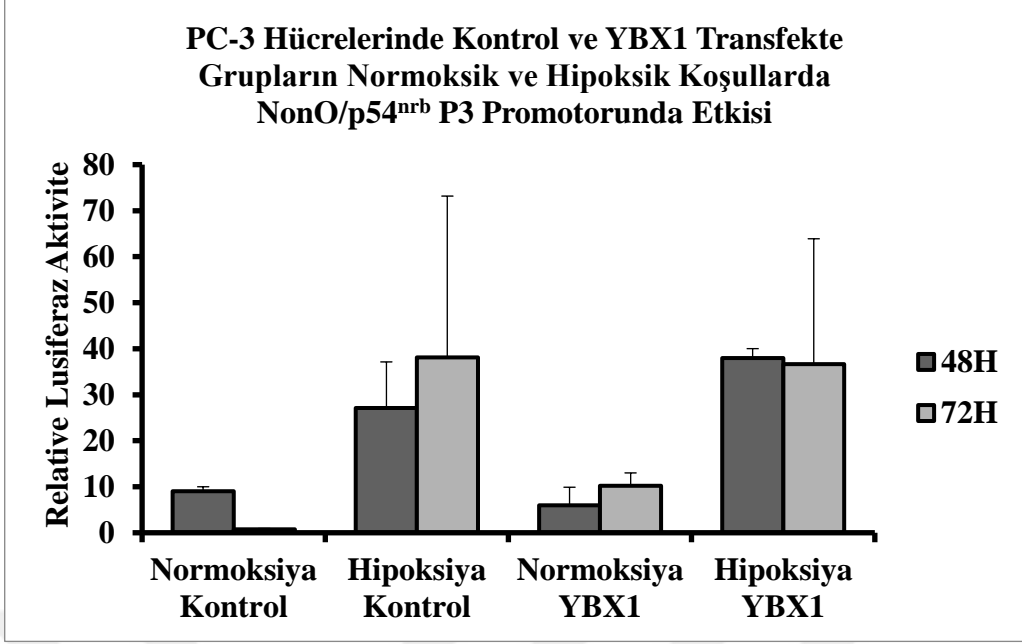
YBX1 transkripsiyon faktörünün NonO/p54^{nrb} promotör konstraktlarına etkisinin belirlenmesi için ise; Bölüm 2.2.6.1' de açıklandığı üzere, ilgili transfeksiyon süreçlerine ek olarak, 0,5 µg konsantrasyonlu YBX1 transfeksiyonu da yine hipoksik ve normoksik koşulların uygulandığı 2 adet 12' li well plate lere kuyucuk başına 250.000 hücre olacak miktarda paylaştırılan PC-3 hücrelerine uygulandı. 48 ve 72 saat dilimleri şeklinde belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda transfeksiyon medyumlarından eppendorflara 500' er µL alınarak Bölüm 2.2.6.2' de belirtildiği gibi lusiferaz aktivitesi ve Bölüm 2.2.6.3' te belirttiği gibi SEAP aktivitesi ölçüldü. Ölçüm sonuçlarında elde edilen Lusiferaz değerler, SEAP değerlerine bölünerek lusiferaz aktivitesi normalize edilmiştir. P1 promotör parçasında hipoksik koşullarda aktivite artışı 48 ve 72 saatlerde teyit edilmiştir. YBX1' in P1 promotör parçası üzerindeki etkisi incelendiğinde ise 72 saatte hipoksik koşullardaki aktivitesini indükleyici etkisi görülmüştür (Şekil 3.15). P2 promotör parçasında hipoksik koşullarda aktivite artışı 48 ve 72 saatlerde teyit edilmiştir. YBX1' in P2 promotör parçası üzerindeki etkisi incelendiğinde hem 48 hem de 72 saatte hipoksik koşullardaki aktivitesini indükleyici etkisinin daha güçlü olduğu görülmüştür (Şekil 3.16). YBX1' in P3 promotör parçası üzerindeki etkisi incelendiğinde hem 48 hem de 72 saatte hipoksik koşullardaki aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 3.17). YBX1' in P4 promotör parçası üzerindeki etkisi incelendiğinde ise, 48 saatte hipoksik koşullardaki aktivitesinin en yüksek indükleyici etki olduğu görülmektedir (Şekil 3.18).



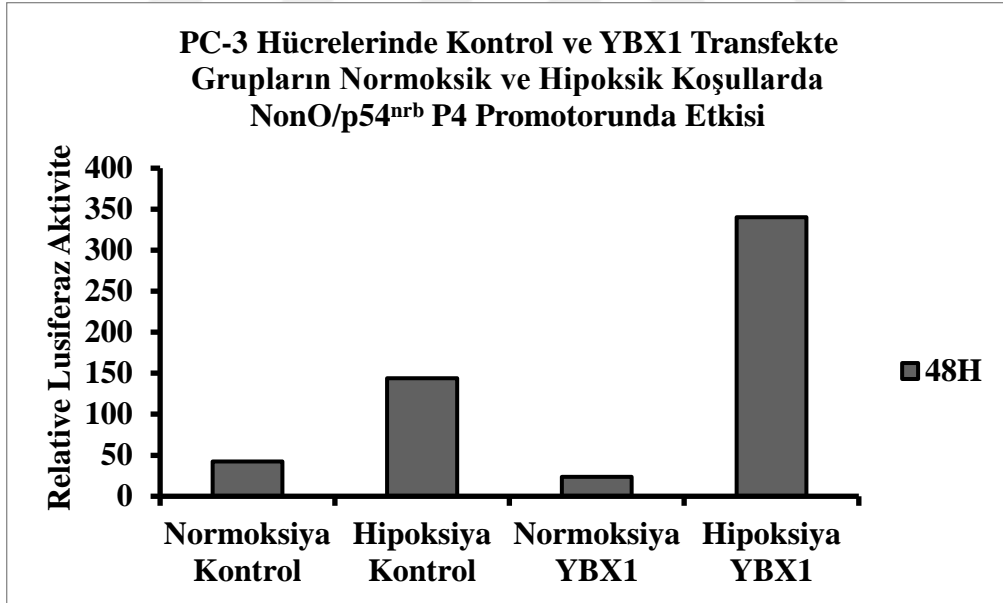
Şekil 3.15: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54^{nrb} P1 promotor bölgesinin (-730/+529) transkripsiyonel aktivitesi.



Şekil 3.16: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54^{nrb} P2 promotor bölgesinin (-516/+529) transkripsiyonel aktivitesi.



Şekil 3.17: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54^{nrb} P3 promotor bölgesinin (-336/+529) transkripsiyonel aktivitesi.

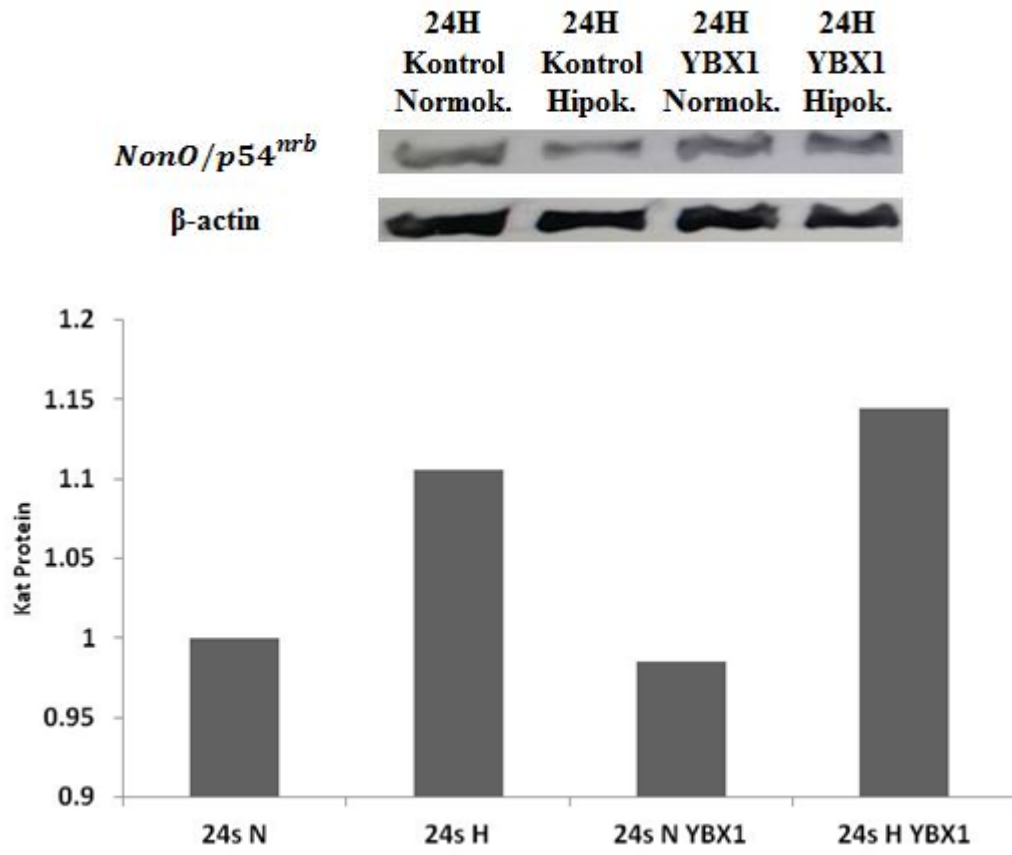


Şekil 3.18: PC-3 hücrelerinde YBX1 transfekte edilmiş ve edilmemiş gruplarda NonO/p54^{nrb} P4 promotor bölgesinin (-159/+529) transkripsiyonel aktivitesi.

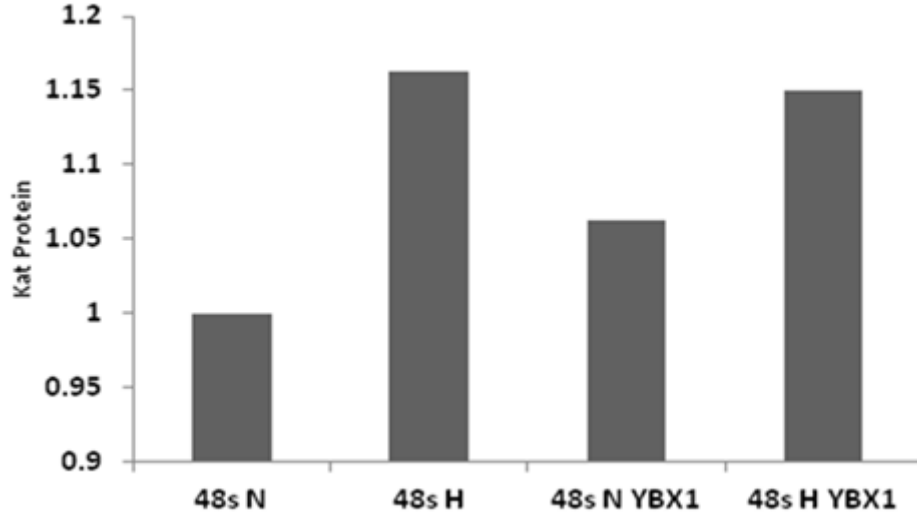
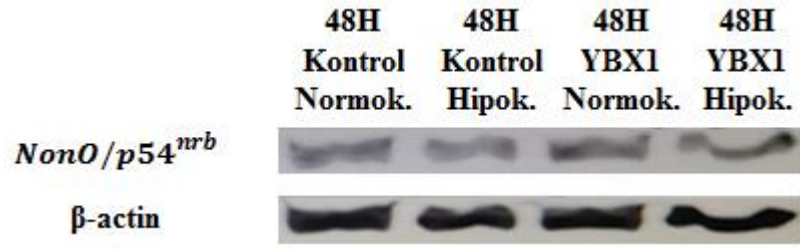
3.4 YBX1' in NonO/p54^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları

3.4.1 YBX1' in NonO/p54^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu Western Blot Yöntemiyle Belirleme Çalışmaları

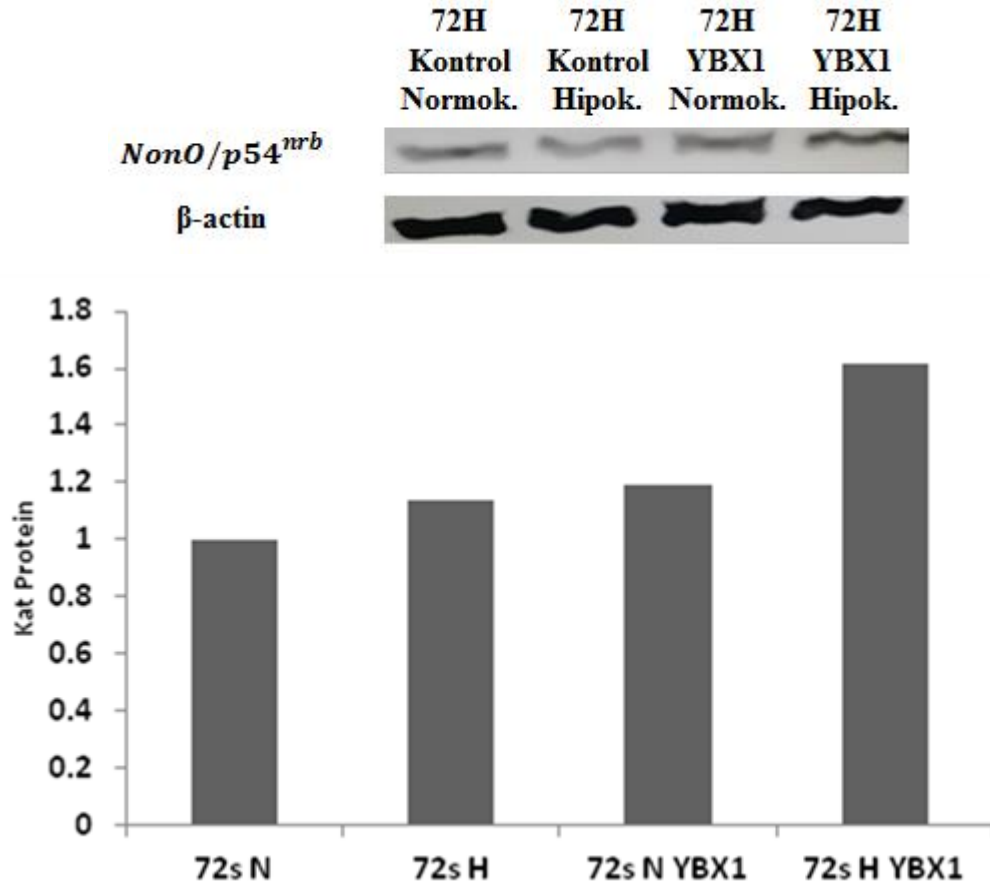
NonO/p54^{nrb} geninin PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1 transfeksiyonu gerçekleştirildiğinde meydana gelecek olan protein seviyesindeki ekspresyonu belirlemek amacıyla, Bölüm 2.2.3.2' de açıklandığı üzere PC-3 hücreleri büyütülüp, Bölüm 2.2.7.1' de detaylandırıldığı gibi transfeksiyon deneyleri gerçekleştirildi. Sonrasında ilgili protein ekstraktları Bölüm 2.2.7.2' de açıklandığı şekilde, içerik detayı Tablo 2.13' te verilen RIPA buffer ile hazırlandı. Her grup için protein miktarı 30 µg olacak şekilde hesaplanan protein ekstraktlar Bölüm 2.2.7.4.1' de detaylandırılan SDS-PAGE sistemde yürütüldü. Bu sürecin ardından, Bölüm 2.2.7.4.2' deki şekilde membrana transferi sağlanan proteinler, bloklanıp sırasıyla NonO/p54^{nrb} primer ve sekonder antikolarıyla ve Beta actin primer ve sekonder antikolarıyla ayrı ayrı muamelesi yapıp görüntü alma işlemine geçildi. (Şekil 3.19, 3.20 ve 3.21). Western blot sonuçları incelendiğinde özellikle YBX1 transfekte edilen hipoksik koşullarda 72 saatte NonO/p54^{nrb} protein seviyesinde artış tespit edilmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.19: PC-3 hücre hattında NonO/p54^{nrb} protein seviyesinin 24 saatte belirlenmesi.



Şekil 3.20: PC-3 hücre hattında NonO/p54^{nrb} protein seviyesinin 48 saatte belirlenmesi.

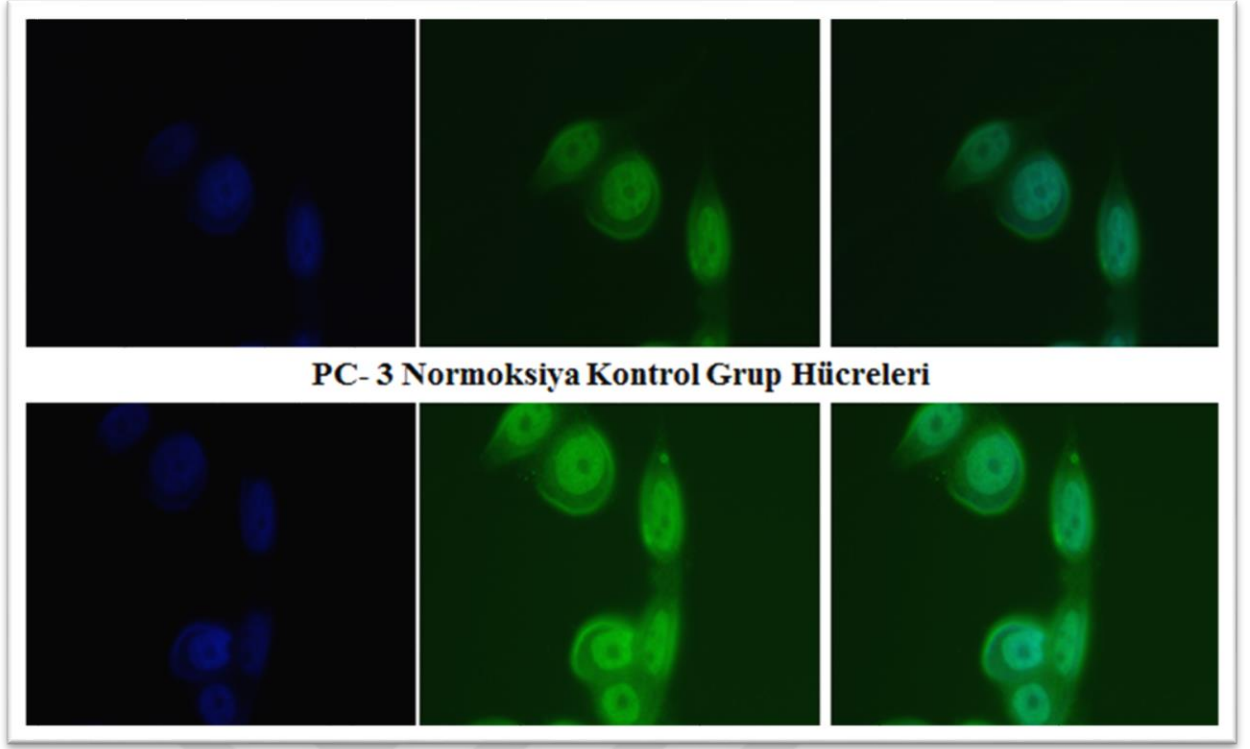


Şekil 3.21: PC-3 hücre hattında NonO/p54^{nrb} protein seviyesinin 72 saatte belirlenmesi.

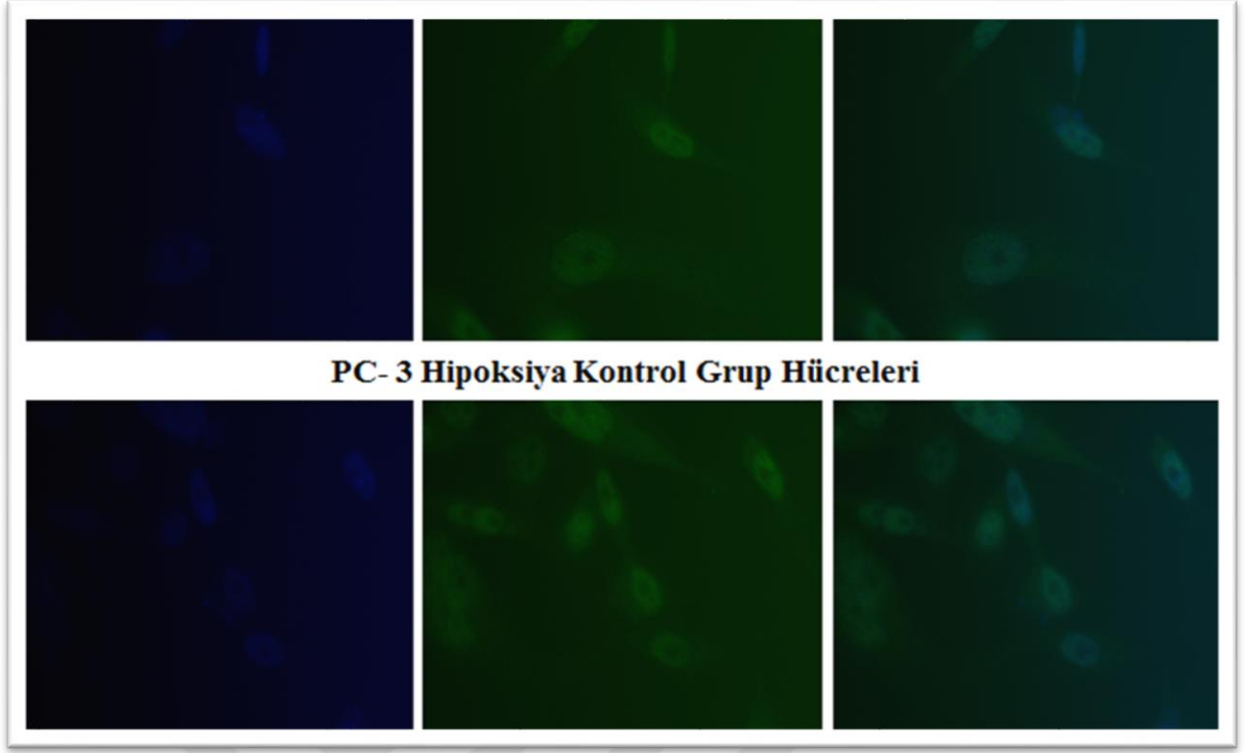
3.4.2 YBX1' in NonO/p54^{nrb} Geninin Protein Seviyesindeki Ekspresyonunu

İmmüno Floresans Teknik ile Belirleme Çalışmaları

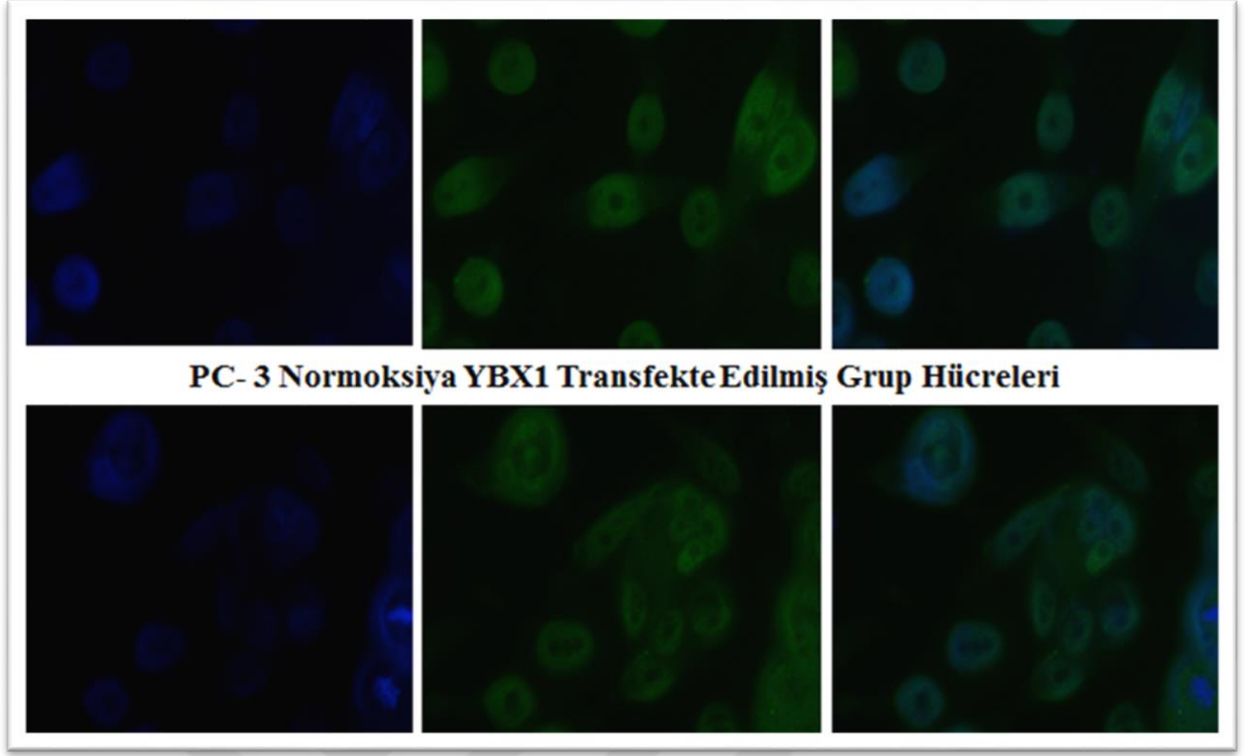
İmmüno floresans teknik ile NonO/p54^{nrb} proteininin hücre içinde lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.2.7.5' te açıklandığı üzere PC-3 hücreleri 12' li well plate' e uygun miktarlarda ekilip; ertesı gün hipoksi uygulaması ve transfeksiyon basamakları gerçekleştirildi. 3. Gün ise yine Bölüm 2.2.7.5' te detaylı bir şekilde açıklandığı üzere immüno floresans teknik uygulandı. Elde edilen preparatlar floresan mikroskobu ile görüntüldü (Şekil 3.22, 3.23, 3.24 ve 3.25). Normoksik koşullara kıyasla, hipoksik koşullarda NonO/p54^{nrb} protein seviyesi artarken (Şekil 3.22 ve 3.23); transfeksiyon gerçekleştirilmemiş gruplara kıyasla, YBX1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş gruplarda yine NonO/p54^{nrb} protein seviyesinin artmış olduğu belirlendi (Şekil 3.23 ve 3.25).



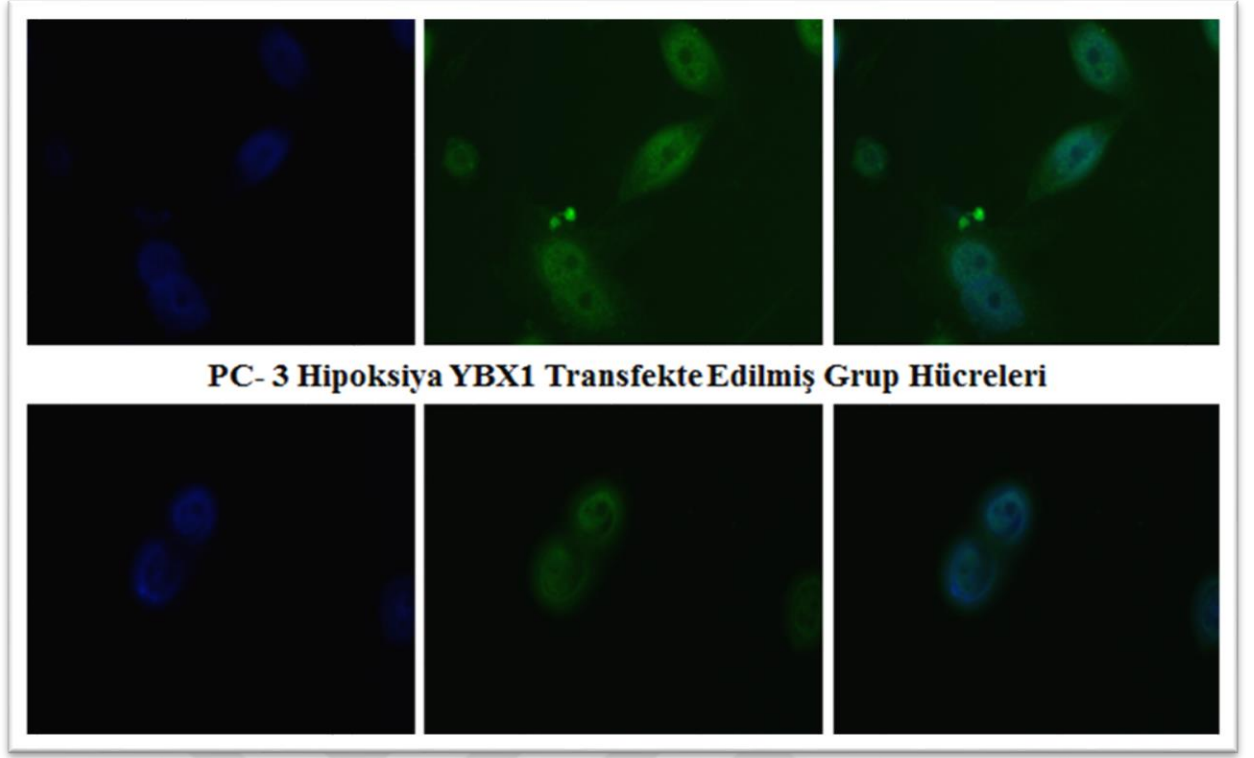
Şekil 3.22: İmmüno Floresans teknik uygulaması sonucu alınan normoksik kontrol grup mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.23: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan hipoksik kontrol grup mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.24: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan normoksik YBX1 transfekte grup mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.25: İmmünofloresans teknik uygulaması sonucu alınan hipoksik YBX1 transfekte grup mikroskop görüntüleri.

Normoksik koşullara kıyasla, hipoksik koşullarda NonO/p54^{nrb} protein seviyesi artarken; transfeksiyon gerçekleştirilmemiş gruplara kıyasla, YBX1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş gruplarda yine ilgili protein seviyesinin artmış olduğu belirlendi.

4. TARTIŞMA-SONUÇ

YBX1 pekçok dokuda yüksek oranda eksprese olan bir proteindir. Hem bir DNA hem de RNA bağlanma proteini olarak işlev görürken; transkripsiyon ve translasyon, pre-mRNA ekleme, DNA onarımı ve mRNA paketlemesinin düzenlenmesi gibi üzere çok sayıda hücrenel işlemlerde rol oynayarak multifonksiyonel özellik kazanır [1]. Bu mekanizmaları da ubikütilasyon, asetilasyon ve metilasyon reaksiyonlarıyla gerçekleştirirken, gen regülasyonunda daha çok fosforilasyon reaksiyonlarına tabi olur [7].

Daha önce yapılmış çalışmalarla; pankreatik adenokarsinom, metastatik prostat kansinoması, yumurtalık kansinoması, medulloblastom ve malign melanomda artmış YBX1 mRNA seviyeleri gösterildiğinden, insan malign hastalıklarının bir belirteci olabileceği düşünülmektedir [8].

NonO/p54^{nrb} geni ise; kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas ve pek çok dokuda yaygın ifade gösterir [63]. Çoklu nükleer süreçlerle ilgilenirken, hem DNA hem de RNA'ya bağlanarak çok işlevli bir protein olarak tanımlanmaktadır [68].

Yakın zamanda, NonO/p54^{nrb}'nin, kondrojenezin ilerletmek için MIA/CD-RAP kompleksini regüle ettiği açıklanmıştır. Bu mekanizmayı gerçekleştirmek üzere MIA/CD-RAP'ın YBX1'in regülatör bölgesine bağlanması kritiktir. YBX1, MIA/CD-RAP'a bağlı kondrojenezin bir regülatörüdür [77]. Yapılan araştırmalarla çoğu kanser tipinde artmış NonO/p54^{nrb} ekspresyonu tespit edilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde artmış ekspresyon gösterilmişken [97]; metastatik melanoma örnekleri de NonO/p54^{nrb} güçlü ekspresyonunu göstermektedir. Fonksiyonel promotor analizleri ile YBX1'i, NonO/p54^{nrb} transkripsiyonunun aktivasyonu için MIA proteine aracılık eden transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır [54].

Literatürde NonO/p54^{nrb} geni ve YBX1 transkripsiyon faktörü regülasyonları hakkında sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle YBX1 ve NonO/p54^{nrb} regülasyonunun aydınlatılması kritiktir. Son yıllardaki çalışmalarla, NonO/p54^{nrb} geninin YBX1 transkripsiyon faktörü ile regüle edildiği kondrojenez süreçleri ve malign melanomda gösterilmiştir. Ancak prostat kanserinde bu genin ilgili transkripsiyon faktörü ile nasıl

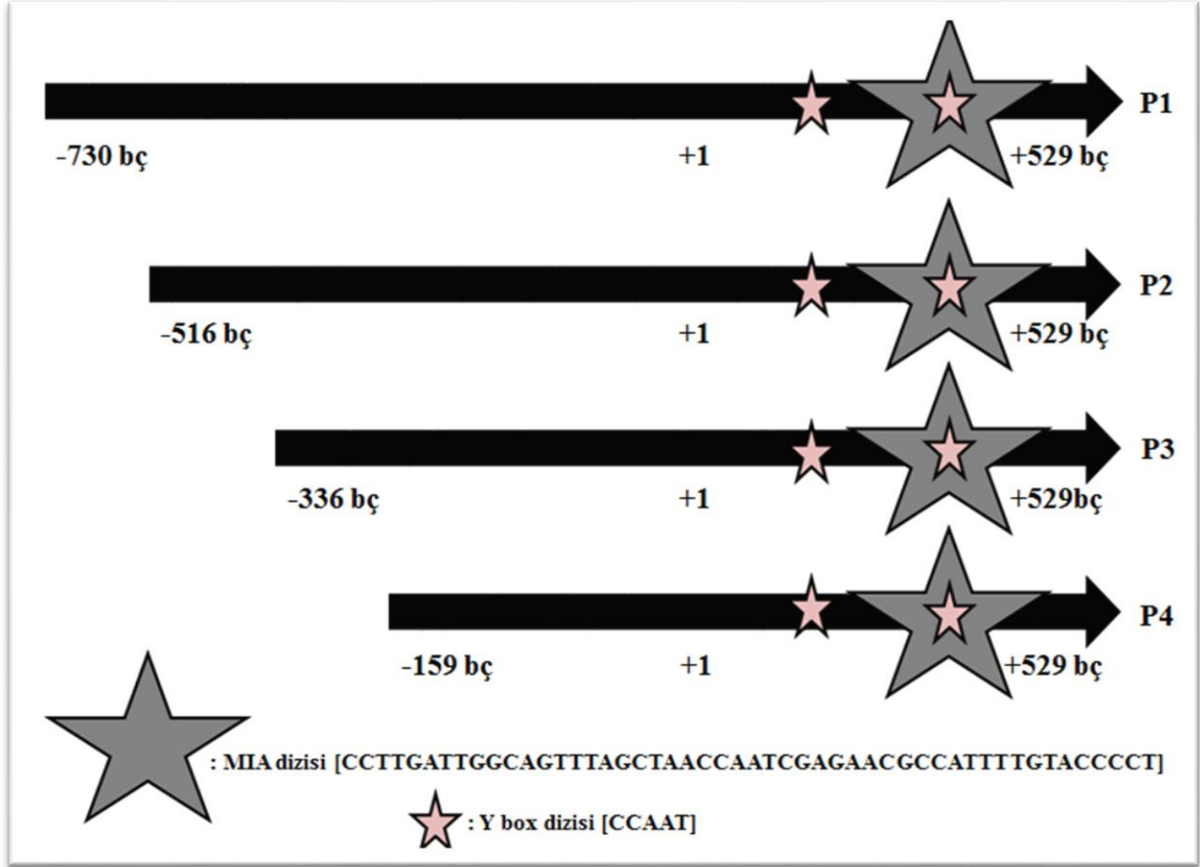
regüle edildiğine dair veriler mevcut değildir. Tümör mikroçevresi; birçok farklı hücre tipi, anormal vasküler ağ ve immünsüpresif sitokinlerden oluşan karmaşık bir ekosistemdir. Tümörlerin düzensiz büyüme dinamikleri, artan oksijen tüketimine ve dolayısıyla hipoksik koşullara yol açar. Hipoksi, kötü klinik sonuç, artan tümör heterojenitesi ve kemoterapiye direnç mekanizmalarının ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir [84]. Prostat kanseri erkeklerde malignite ile kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Hipoksi agresif bir fenotip ile ilişkili prostat karsinogenezinde kilit öncül olarak kabul edilir [93]. Kanser ilişkili genlerin hipoksik koşullardaki regülasyonunu tespit etmek de oldukça önem arz etmektedir. Literatürde prostat kanserinde kötü sonuç ve kötü prognozla ilişkilendirilebilecek HIF-1 α regülasyonları ile ilgili çalışmalar da oldukça az sayıdadır.

Bu bağlamda çalışmamızda prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde hem normal hem de hipoksik koşullarda NonO/p54^{nrb} geninin YBX1 transkripsiyon faktörü tarafından hedef alınıp alınmadığı araştırılmıştır. Tez çalışmamız kapsamında, transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarını baz alan sınırlı sayıdaki çalışmayla bazı yönleri aydınlatılan söz konusu genlerin PC-3 hücre hattında bazal aktivite, mRNA ve protein düzeylerinde transkripsiyonel regülasyonu incelenmiştir.

İlk olarak PC-3 hücreleri büyütülüp, gerekli pasajlamalar yapılarak deney kurulması için hazır hale getirilmiştir. 12 adet küçük 25 cm² lik flaska, flask başına 2 milyon adet hücre eşit olarak paylaştırılmıştır. Daha sonra ilgili flasklara 5 μ g YBX1 transfeksiyonu gerçekleştirilip, deneylerimiz kapsamında CoCl₂ ile oluşturulan kimyasal hipoksik koşullar HIF-1 α mRNA seviyesinin Real Time PCR analiziyle doğrulanmıştır. PC-3 hücrelerinde YBX1 mRNA seviyeleri incelendiğinde, ektojik ifade profilleri ortaya koyulmuştur. NonO/p54^{nrb} seviyeleri incelendiğinde ise; hipoksik koşullardaki artış yeniden teyit edilirken, normoksik ve hipoksik koşullarda YBX1' in NonO/p54^{nrb} nin mRNA seviyesini PC-3 hücre hattında arttırdığı belirlenmiştir. YBX' in NonO/p54^{nrb} nin mRNA seviyesi üzerindeki indükleyici ifadesinin hipoksik koşullarda daha güçlü olduğu ortaya koyulmuştur.

Bazal aktivite tayini çalışmaları kapsamında ise; 4 adet 12' li well plate' e deney kurulması için hazır hale gelen PC-3 hücreleri kuyucuk başına 250 000 hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra ilgili kuyucuklara 0,5' er μ g NonO/p54^{nrb} promotor konstraktları ve YBX1 geçici transfeksiyonu ile 150 μ M CoCl₂ muamelesi gerçekleştirilip

48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde kuyucuklardan alınan medyumlar aracılığı ile her bir promotor parçasının aktivitesi tayin edilmiştir. Her bir promotor konstrakta (Şekil 4.1) hipoksik koşullarda aktivite artışı 48 ve 72 saatlerde teyit edilirken, P4 promotor parçası üzerindeki transkripsiyonel aktivitenin etkisi dikkate alındığında 48 saatlik dilimde hipoksik koşullardaki aktivitenin en yüksek indükleyici etki olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1: Tez çalışmamızda kullanılan NonO/p54^{nrb} promotor konstraktlarda YBX1 transkripsiyon faktörünün olası bağlanma dizisi MIA ve Y-box bölgelerinin basit diyagramda gösterimi.

Protein seviyesindeki analizler için western blot ve IFC analizlerinde özellikle 72 saatlik zaman dilimlerinde YBX1 transfekte edilen hipoksik koşul gruplarında NonO/p54^{nrb} protein seviyesinde artış rapor edilmiştir.

Tüm çalışmanın sonucunda elde edilen verilerde, YBX1' in NonO/p54^{nrb} geni ile ekspresyonunu, mRNA, protein ve bazal aktivite seviyesinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde normoksik ve hipoksik koşullarda artışını indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca immüno Floresans teknik ile kontrol ve deney gruplarında yine normoksik ve hipoksik

koşullarda ilgili hücrelerde NonO/p54^{nrb} protein lokalizasyonu da ilk kez ortaya koyulmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında ilk kez Prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde normal ve hipoksik koşullarda YBX1' in NonO/p54^{nrb} geninin regülasyonuna katkısı incelenmiştir. Çalışmamız kapsamında YBX1 NonO/p54^{nrb}' nin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu etki hipoksik koşullarda oldukça güçlü bulunmuştur. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler literatüre prostat kanserinin regülasyonu hakkında yeni bilgiler sunmuştur. Daha sonra yapılacak çalışmalar için yönlendirici olacağı kanaatindeyiz.



5. KAYNAKLAR

- [1] NCBI, *YBX1 Y-box binding protein 1 [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4904> (accessed Feb. 02, 2021).
- [2] GeneCards, *YBX1 Gene*. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YBX1&keywords=YBX1> (accessed Feb. 02, 2021).
- [3] Y. Makino, et al., “Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter”, *Nucleic Acids Res*, vol. 24, pp. 1873-1878, May 1996, doi.org/10.1093/nar/24.10.1873.
- [4] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, YBX1 (Y box binding protein 1). http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_YBX1.html (accessed Feb. 02, 2021).
- [5] D. Nashchekin, et al., “Two splicing isoforms of the Y-box protein ctYB-1 appear on the same mRNA molecule”, *FEBS J*, vol. 274, pp. 202-211, Jan 2007, doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05576.x.
- [6] M. A. Skabkin, D. N. Lyabin and L. P. Ovchinnikov. “Nonspecific and Specific Interactions of Y-Box-Binding Protein 1 (YB-1) with mRNA and Posttranscriptional Regulation of Protein Synthesis in Animal Cells”, *Molecular Biology*, vol. 40, pp. 551–563, Jul 2006, doi.org/10.1134/S0026893306040078.
- [7] L. Prabhu, A.-V. Hartley, M. Martin, F. Warsame, E. Sun and T. Lu. “Role of post-translational modification of the Y box binding protein 1 in human cancers”, *Genes & Diseases*, vol. 2, pp. 240-246, Sep 2015, doi.org/10.1016/j.gendis.2015.05.001.
- [8] P. K. Maurya, et al., “Role of Y Box Protein-1 in cancer: As potential biomarker and novel therapeutic target”, *Journal of Cancer*, vol. 8, pp. 1900-1907, Jul 2017, [doi: 10.7150/jca.17689](https://doi.org/10.7150/jca.17689).
- [9] I. V. Chernukhin, et al., “Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF”, *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 29915-29921, Sep 2000, doi.org/10.1074/jbc.M001538200.
- [10] M. Shnyreva, D. S. Schullery, H. Suzuki, Y. Higaki and K. Bomsztyk. “Interaction of two multifunctional proteins: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein”, *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 15498-15503, May 2000, doi.org/10.1074/jbc.275.20.15498.

- [11] M. Ashizuka, et al., “Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2”, *Mol Cell Biol*, vol. 22, pp. 6375-6383, Sep 2002, doi: 10.1128/mcb.22.18.6375-6383.2002.
- [12] Y.-M. Jung, K.-L. Yu, S.-H. Park, S.-D. Lee, M.-J. Kim and J.-C. You. “Investigation of function and regulation of the YB-1 cellular factor in HIV replication”, *BMB Rep*, vol 51, pp. 290-295, Jun 2018, doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.6.231.
- [13] T. Kishikawa, M. Otsuka, T. Yoshikawa, M. Ohno, H. Ijichi and K. Koike. “Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1”, *Nat Commun*, vol. 7, Sep 2016, doi: 10.1038/ncomms13006.
- [14] N. C. de Souza-Pinto, et al., “Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria”, *DNA Repair (Amst)*, vol. 8, pp. 704-719, Jun 2009, doi: 10.1016/j.dnarep.2009.01.021.
- [15] J. P. Ting, et al., “YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes”, *J Exp Med*, vol 179, pp. 1605-1611, May 1994, doi: 10.1084/jem.179.5.1605.
- [16] S. Kang, et al., “Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1”, *Plos One*, vol. 9, Nov 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112754.
- [17] S. Samuel, K.K. Beifuss and L.R. Bernstein. “YB-1 binds to the MMP-13 promoter sequence and represses MMP-13 transactivation via the AP-1 site”, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1769, pp. 525-531, Sep-Oct 2007, doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.07.003.
- [18] Y. Kotake, N. Arikawa, K. Tahara, H. Maru and M. Naemura. “Y-box Binding Protein 1 Is Involved in Regulating the G2/M Phase of the Cell Cycle”, *Anticancer Res*, vol. 37, pp. 1603-1608, Apr 2017, DOI: 10.21873/anticancerres.11490.
- [19] C. Homer, et al., “Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function”, *Oncogene*, vol. 24, pp. 8314-25, Dec 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208998.
- [20] O. di Martino, et al., “ Δ Np63 α controls YB-1 protein stability: evidence on YB-1 as a new player in keratinocyte differentiation”, *Genes Cells*, vol. 21, pp. 648-660, Jun 2016, doi: 10.1111/gtc.12373.
- [21] Y. Kotake, et al., “YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene”, *Genes Cells*, vol. 18, pp. 999-1006, Sep 2013, doi: 10.1111/gtc.12093.
- [22] E. Kwon, et al., “The RNA-binding protein YBX1 regulates epidermal progenitors at a posttranscriptional level”, *Nat Commun*, vol. 9, Apr 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04092-0.

- [23] C. Liang, et al., “Y-box binding protein-1 promotes tumorigenesis and progression via the epidermal growth factor receptor/AKT pathway in spinal chordoma”, *Cancer Sci*, vol. 110, pp. 166-179, Jan 2019, doi: 10.1111/cas.13875.
- [24] B. Ha, E. B. Lee, J. Cui, Y. Kim and H. H. Jang. “YB-1 overexpression promotes a TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition via Akt activation”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 458, pp. 347-351, Mar 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.114.
- [25] W. F. Xu, et al., “Co-targeting CK2 α and YBX1 suppresses tumor progression by coordinated inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway”, *Cell Cycle*, vol. 18, pp. 3472-3490, Dec 2019, doi: 10.1080/15384101.2019.1689474.
- [26] L. Prabhu, A. V. Hartley, M. Martin, F. Warsame, E. Sun and T. Lu. “Role of post-translational modification of the Y box binding protein 1 in human cancers”, *Genes Dis*, vol. 2, pp. 240-246, Sep 2015, doi: 10.1016/j.gendis.2015.05.001.
- [27] A. Lasham, C. G. Print, A. G. Woolley, S. E. Dunn and A. W. Braithwaite. “YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target?”, *Biochem J*, vol. 449, pp. 11-23, Jan 2013, doi: 10.1042/BJ20121323.
- [28] Z. Peng, et al., “The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1”, *Mol Cancer*, vol. 17, pp. 11-23, Nov 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0920-z.
- [29] W. Su, et al., “Silencing of Long Noncoding RNA MIR22HG Triggers Cell Survival/Death Signaling via Oncogenes YBX1, MET, and p21 in Lung Cancer”, *Cancer Res*, vol. 78, pp. 3207-3219, Jun 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0222.
- [30] X. Zheng, et al., “The long non-coding RNA PIK3CD-AS2 promotes lung adenocarcinoma progression via YBX1-mediated suppression of p53 pathway”, *Oncogenesis*, vol. 9, Mar 2020, doi: 10.1038/s41389-020-0217-0.
- [31] S. Bergmann, et al., “YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification”, *Cancer Res*, vol. 65, pp. 4078-4087, May 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4056.
- [32] J. P. Lim, et al., “Silencing Y-box binding protein-1 inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness via regulation of MMP1 and beta-catenin expression”, *Cancer Lett*, vol. 452, pp. 119-131, Jun 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.014.

- [33] B. Castellana, T. Aasen, G. Moreno-Bueno, S. E. Dunn and S. Ramón y Cajal. “Interplay between YB-1 and IL-6 promotes the metastatic phenotype in breast cancer cells”, *Oncotarget*, vol. 6, pp. 38239-38256, Nov 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5664.
- [34] J. P. Lim, S. Shyamasundar, J. Gunaratne, O. J. Scully, K. Matsumoto and B. H. Bay. “YBX1 gene silencing inhibits migratory and invasive potential via CORO1C in breast cancer in vitro”, *BMC Cancer*, vol. 17, Mar 2017, doi: 10.1186/s12885-017-3187-7.
- [35] K. Wu, et al., “Cell fate factor DACH1 represses YB-1-mediated oncogenic transcription and translation”, *Cancer Res*, vol. 74, pp. 829-39, Feb 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2466.
- [36] E. Zhang, et al., “A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1”, *Genome Biol*, vol. 19, Oct 2018, doi: 10.1186/s13059-018-1523-0.
- [37] S. Huang, et al., “A novel circular RNA hsa_circ_0008035 contributes to gastric cancer tumorigenesis through targeting the miR-375/YBX1 axis”, *Am J Transl Res*, vol. 11, pp. 2455-2462, Apr 2019.
- [38] X. Jin, et al., “Expression of FOXC-2 and YB-1 in Gastric Carcinoma and Its Role in Invasion and Metastasis”, *Article in Chinese*, vol. 49, pp. 215-220, Mar 2018.
- [39] L. Xu, H. Li, L. Wu and S. Huang. “YBX1 promotes tumor growth by elevating glycolysis in human bladder cancer”, *Oncotarget*, vol. 8, pp. 65946–65956, Sep 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19583.
- [40] H. M. Chao, H. X. Huang, P. H. Chang, K. C. Tseng, A. Miyajima and E. Chern. “Y-box binding protein-1 promotes hepatocellular carcinoma-initiating cell progression and tumorigenesis via Wnt/ β -catenin pathway”, *Oncotarget*, vol. 8, pp. 2604-2616, Jan 2017, doi: 10.18632/oncotarget.13733.
- [41] L. L. Zhou, et al., “High YBX1 expression indicates poor prognosis and promotes cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma”, *Exp Cell Res*, vol. 361, pp. 126-134, Dec 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.009.
- [42] Y. Wang, et al., “The interaction of YBX1 with G3BP1 promotes renal cell carcinoma cell metastasis via YBX1/G3BP1-SPP1- NF- κ B signaling axis”, *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 38, Sep 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1347-0.

- [43] L. Prabhu, et al., “Critical role of phosphorylation of serine 165 of YBX1 on the activation of NF- κ B in colon cancer”, *Oncotarget*, vol. 6, pp. 29396-412, Oct 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5120.
- [44] M. Martin, et al., “Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF- κ B in Colon Cancer”, *J Biol Chem*, vol. 292, pp. 3433-3444, Feb 2017, doi: 10.1074/jbc.M116.740258.
- [45] S. Nagasu, et al., “Y-box-binding protein 1 inhibits apoptosis and upregulates EGFR in colon cancer”, *Oncol Rep*, vol. 41, pp. 2889-2896, May 2019, doi: 10.3892/or.2019.7038.
- [46] J. Lu, et al., “YB-1 expression promotes pancreatic cancer metastasis that is inhibited by microRNA-216a”, *Exp Cell Res*, vol. 359, pp. 319-326, Oct 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.039.
- [47] Z. Liu, et al., “Overexpression of YBX1 Promotes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Growth via the GSK3B/Cyclin D1/Cyclin E1 Pathway”, *Mol Ther Oncolytics*, vol. 17, pp. 21-30, Mar 2020, doi: 10.1016/j.omto.2020.03.006.
- [48] M. Shiota, et al., “Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer”, *Mol Cancer Res*, vol. 9, pp. 1755-66, Dec 2011, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0379.
- [49] K. Imada, et al., “Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression”, *Clin Cancer Res*, vol. 19, pp. 4638-50, Sep 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3705.
- [50] K. Imada, et al., “FOXO3a Expression Regulated by ERK Signaling is Inversely Correlated With Y-Box Binding Protein-1 Expression in Prostate Cancer”, *Prostate*, vol. 77, pp. 145-153, Feb 2017, doi: 10.1002/pros.23254.
- [51] M. I. Khan, et al., “YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin”, *Oncotarget*, vol. 5, pp. 2462-74, May 2014, doi.org/10.18632/oncotarget.1790.
- [52] T. Sinnberg, et al., “MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop”, *Exp Dermatol*, vol. 21, pp. 265-270, Apr 2012, doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01448.x.
- [53] C. Kosnopfel, et al., “YB-1 Expression and Phosphorylation Regulate Tumorigenicity and Invasiveness in Melanoma by Influencing EMT”, *Mol Cancer Res*, vol. 16, pp. 1149-1160, Jul 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0528.

- [54] R. Schmid, K. Meyer, R. Spang, B. Schitteck and A. K. Bosserhoff. “Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1”, *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 26, pp. 685-96, Sep 2013, doi: 10.1111/pcmr.12119.
- [55] NCBI, *NONO non-POU domain containing octamer binding [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4841> (accessed Feb. 02, 2021).
- [56] 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”, *Nucleic Acids Res*, vol. 21, pp. 4085-92, Aug 1993, doi: 10.1093/nar/21.17.4085.
- [57] A. H. Fox, S. Nakagawa, T. Hirose and C. S. Bond. “Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation”, *Trends Biochem Sci*, vol. 43, pp. 124-135, Feb 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2017.12.001.
- [58] Wikipedia, Paraspeckle. <https://en.wikipedia.org/wiki/Paraspeckle> (accessed Feb. 02, 2021).
- [59] C. S. Bond and A. H. Fox. “Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA”, *J Cell Biol*, vol. 186, pp. 637-44, Sep 2009, doi: 10.1083/jcb.200906113.
- [60] A. H. Fox and A. I. Lamond. “Paraspeckles”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, Jul 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000687.
- [61] S. M. Lellahi, et al., “The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response”, *J Biol Chem*, vol. 293, pp. 18965-18976, Dec 2018, doi: 10.1074/jbc.RA118.004473.
- [62] P. Feng, et al., “NONO and tumorigenesis: More than splicing”, *J Cell Mol Med*, vol. 24, pp. 4368-4376, Apr 2020, doi: 10.1111/jcmm.15141.
- [63] NCBI, *NONO non-POU domain containing octamer binding [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4841#gene-expression> (accessed Feb. 02, 2021).
- [64] GeneCards, NONO Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NONO&keywords=NONO> (accessed Feb. 02, 2021).
- [65] 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”, *Mol Biol Cell*, vol. 16, pp. 5304-15, Nov 2005, doi: 10.1091/mbc.e05-06-0587.
- [66] G. J. Knott, C. S. Bond and A. H. Fox. “The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSCP1: a multipurpose molecular scaffold”, *Nucleic Acids Res*, vol. 44, pp. 3989-4004, May 2016, doi: 10.1093/nar/gkw271.

- [67] Y. Shav-Tal and D. Zipori. “PSF and p54nrb/NonO – multi-functional nuclear proteins”, *FEBS Lett*, vol. 531, pp. 109-14, Nov 2002, doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03447-6.
- [68] J. B. Duvignaud, et al., “Structure, Dynamics, and Interaction of p54(nrb)/NonO RRM1 with 5' Splice Site RNA Sequence”, *Biochemistry*, vol. 55, pp. 2553-66, May 2016, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01240.
- [69] R. Cheng, et al., “Downregulation of NONO induces apoptosis, suppressing growth and invasion in esophageal squamous cell carcinoma”, *Oncol Rep*, vol. 39, pp. 2575-2583, Jun 2018, doi: 10.3892/or.2018.6334.
- [70] S. J. Kim, et al., “An RNA-binding-protein, NONO governs energy metabolism by regulating NAMPT in lung cancer”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 528, pp. 376-382, Jul 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.011.
- [71] Z. Zhu, et al., “p54(nrb)/NONO regulates lipid metabolism and breast cancer growth through SREBP-1A”, *Oncogene*, vol. 35, pp. 1399-410, Mar 2016, doi: 10.1038/onc.2015.197.
- [72] K. Iino, et al., “RNA-binding protein NONO promotes breast cancer proliferation by post-transcriptional regulation of SKP2 and E2F8”, *Cancer Sci*, vol. 111, pp. 148-159, Jan 2020, doi: 10.1111/cas.14240.
- [73] Z. Hu, et al., “Splicing Regulator p54nrb /Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein Enhances Carcinogenesis Through Oncogenic Isoform Switch of MYC Box-Dependent Interacting Protein 1 in Hepatocellular Carcinoma”, *Hepatology*, vol. 72, pp. 548-568, Aug 2020, doi: 10.1002/hep.31062.
- [74] D. Li, et al., “Ets-1 promoter-associated noncoding RNA regulates the NONO/ERG/Ets-1 axis to drive gastric cancer progression”, *Oncogene*, vol. 37, pp. 4871-4886, Aug 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0302-4.
- [75] P. Yang, T. Chen, Z. Xu, H. Zhu, J. Wang and Z. He. “Long noncoding RNA GAPLINC promotes invasion in colorectal cancer by targeting SNAI2 through binding with PSF and NONO”, *Oncotarget*, vol. 7, pp. 42183-42194, Jul 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9741.
- [76] S. Schiffner, N. Zimara, R. Schmid and A. K. Bosserhoff. “p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma”, *Carcinogenesis*, vol. 32, pp. 1176-82, Aug 2011, doi: 10.1093/carcin/bgr103.

- [77] R. Schmid, K. Meyer, R. Spang, B. Schitteck and A. K. Bosserhoff. “YBX1 is a modulator of MIA/CD-RAP-dependent chondrogenesis”, *Plos One*, vol. 8, Dec 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082166.
- [78] S. P. Tsofack, et al., “NONO and RALY proteins are required for YB-1 oxaliplatin induced resistance in colon adenocarcinoma cell lines”, *Mol Cancer*, vol. 10, Nov 2011, doi: 10.1186/1476-4598-10-145.
- [79] J. Samuel and C. Franklin. “Hypoxemia and Hypoxia”, *Common Surgical Diseases*, pp. 391-394, 2008, doi.org/10.1007/978-0-387-75246-4_97.
- [80] K. K. Das, et al., “Chapter 26 - Heavy Metals and Low-Oxygen Microenvironment— Its Impact on Liver Metabolism and Dietary Supplementation”, *Dietary Interventions in Liver Disease*, pp. 315-332, Feb 2019, doi.org/10.1016/B978-0-12-814466-4.00026-4.
- [81] J. P. Crehan. “Pulmonary Pathophysiology: The Essentials”, *Chest journal*, vol. 74, pp. 28, Oct 1978, doi.org/10.1016/S0012-3692(15)37359-1.
- [82] R. Wang, F. Jin and H. Zhong. “A novel experimental hypoxia chamber for cell culture”, *Am J Cancer Res*, vol. 4, pp. 53-60, Jan 2014.
- [83] D. Wu and P. Yotnda. “Induction and testing of hypoxia in cell culture”, *J Vis Exp*, Aug 2011, doi: 10.3791/2899.
- [84] A. Vito, N. El-Sayes and K. Mossman. “Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment”, *Cells*, vol. 9, Apr 2020, doi: 10.3390/cells9040992.
- [85] K. L. Eales, K. E. Hollinshead and D. A. Tennant. “Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells”, *Oncogenesis*, vol. 5, Jan 2016, doi: 10.1038/oncsis.2015.50.
- [86] T. Zhang, C. Suo, C. Zheng and H. Zhang. “Hypoxia and Metabolism in Metastasis”, *Adv Exp Med Biol*, vol. 1136, pp. 87-95, Jun 2019, doi: 10.1007/978-3-030-12734-3_6.
- [87] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab and A. K. Azab. “The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy”, *Hypoxia (Auckl)*, vol. 3, pp. 83-92, Dec 2015, doi.org/10.2147/HP.S93413.
- [88] A. A. Tirpe, D. Gulei, S. M. Ciortea, C. Crivii and I. Berindan-Neagoe. “Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes”, *Int J Mol Sci*, vol. 20, Dec 2019, doi: 10.3390/ijms20246140.
- [89] X. Jing, et al., “Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment”, *Mol Cancer*, vol. 18, Nov 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1089-9.

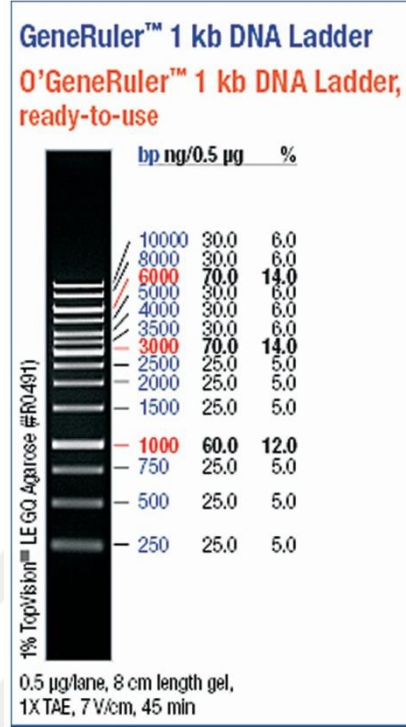
- [90] X. Peng, H. Gao, R. Xu, H. Wang, J. Mei and C. Liu. “The interplay between HIF-1 α and noncoding RNAs in cancer”, *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 39, Feb 2020, doi: 10.1186/s13046-020-1535-y.
- [91] Z. H. Pan and Z. D. Chen. “Hypoxia-inducible factor 1 and prostate cancer”, *National Journal of Andrology*, vol. 13, pp. 356-9, Apr 2007.
- [92] L. Marignol, K. Rivera-Figueroa, T. Lynch and D. Hollywood. “Hypoxia, notch signalling, and prostate cancer”, *Nat Rev Urol*, vol. 10, pp. 405-13, Jul 2013, doi: 10.1038/nrurol.2013.110.
- [93] G. Deep and G. K. Panigrahi. “Hypoxia-Induced Signaling Promotes Prostate Cancer Progression: Exosomes Role as Messenger of Hypoxic Response in Tumor Microenvironment”, *Crit Rev Oncog*, vol. 20, pp. 419-34, Feb 2017, doi: 10.1615/CritRevOncog.v20.i5-6.130.
- [94] M. A. Russo, et al., “Hypoxia and Inflammation in Prostate Cancer Progression. Cross-talk with Androgen and Estrogen Receptors and Cancer Stem Cells”, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, vol. 16, pp. 235-248, Dec 2016, doi: 10.2174/1871530316666161130160144.
- [95] A. M. El-Naggar, et al., “Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis”, *Cancer Cell*, vol. 27, pp. 682-97, May 2015, doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.003.
- [96] M. Arai, et al., “Furospinosulin-1, Marine Spongean Furanosesterterpene, Suppresses the Growth of Hypoxia-Adapted Cancer Cells by Binding to Transcriptional Regulators p54(nrb) and LEDGF/p75”, *Chembiochem*, vol. 17, pp. 181-9, Jan 2016, doi: 10.1002/cbic.201500519.
- [97] S. Baysal, “NonO/p54^{nrb} promotörünün klonlanması ve fonksiyonel analizi”, Yüksek Lisans tezi, Balıkesir Üniv., Balıkesir, 2016.



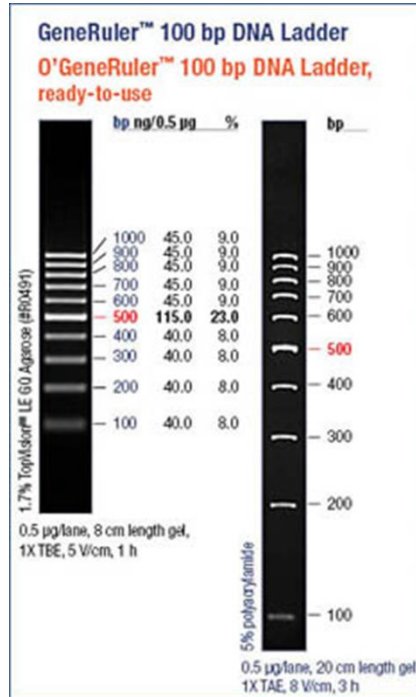
EKLER

EKLER

EK A: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri

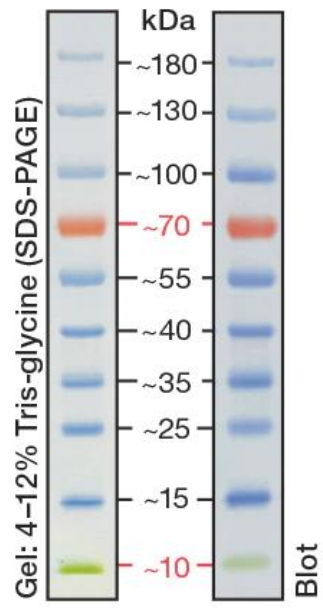


Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA marker.



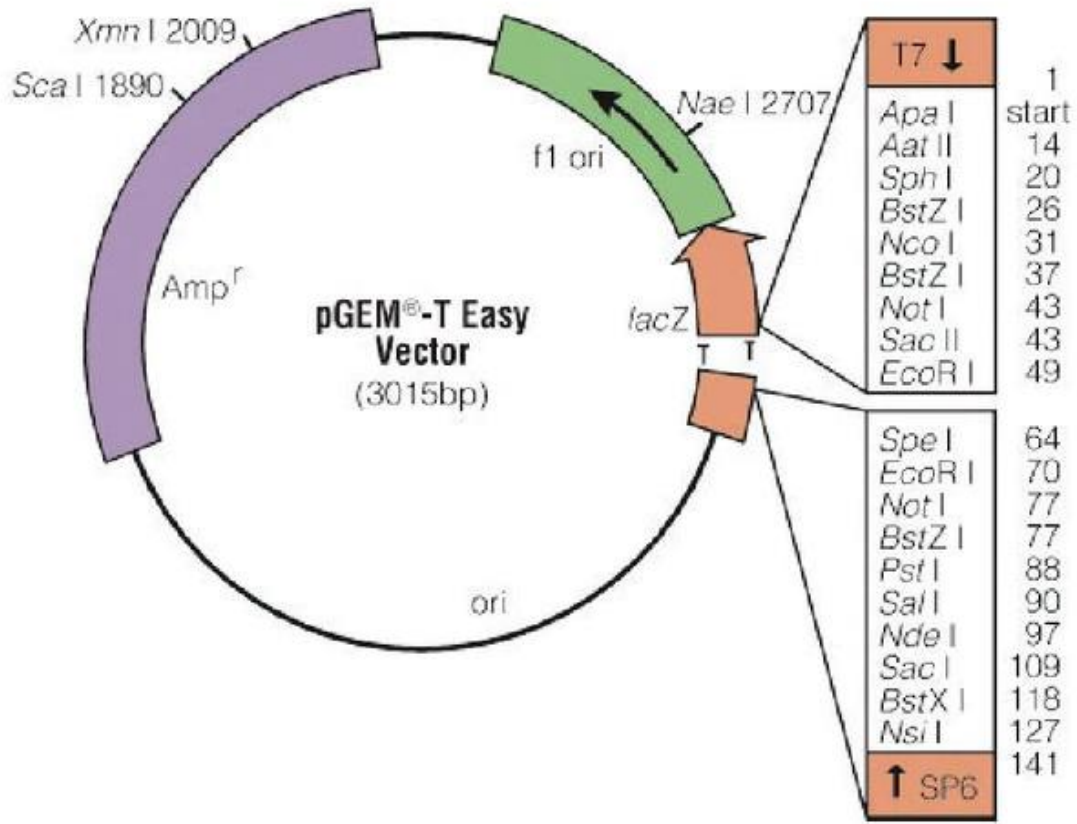
Şekil A.2: Thermo Scientific 100 bp DNA marker.

PageRuler Prestained Protein Ladder

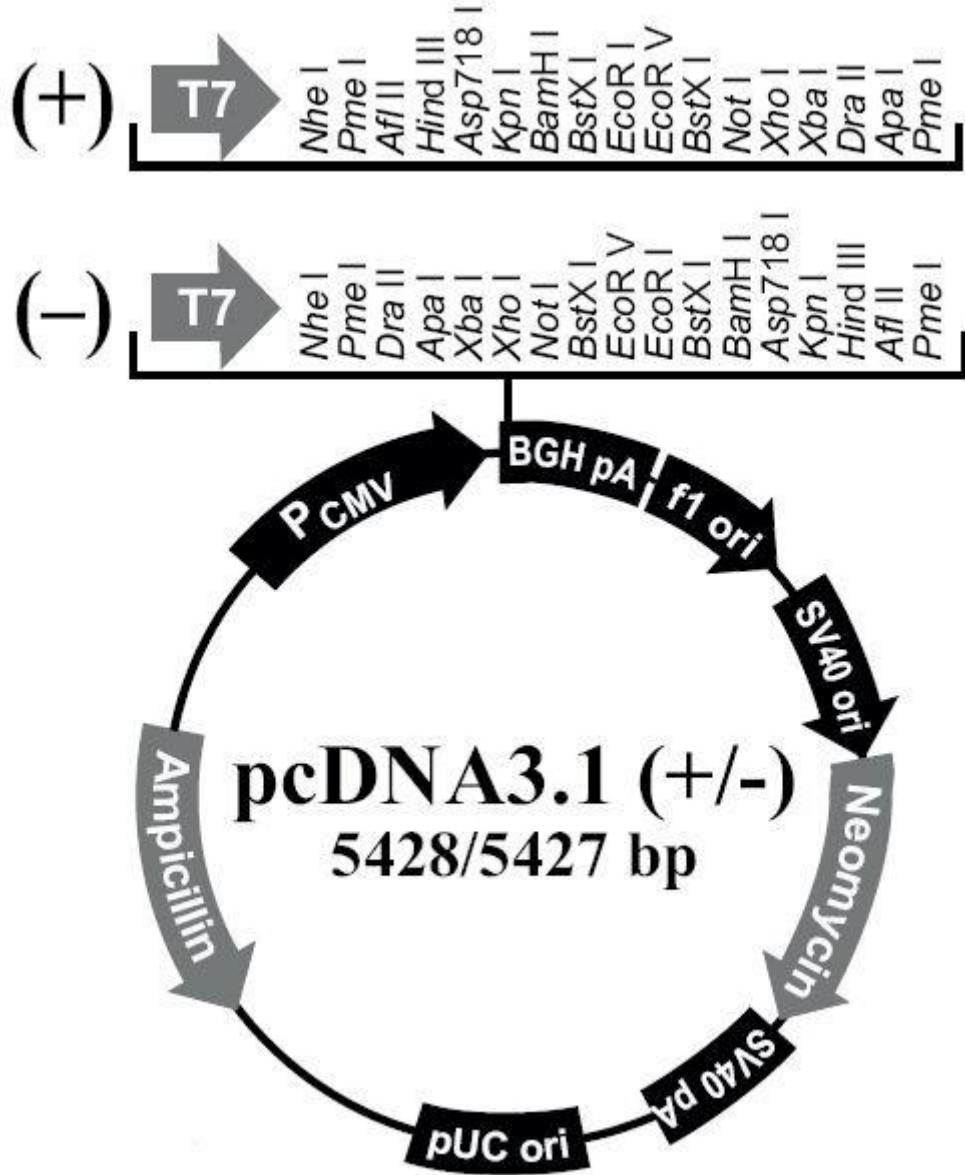


Şekil A.3: PageRuler Prestained Protein marker.

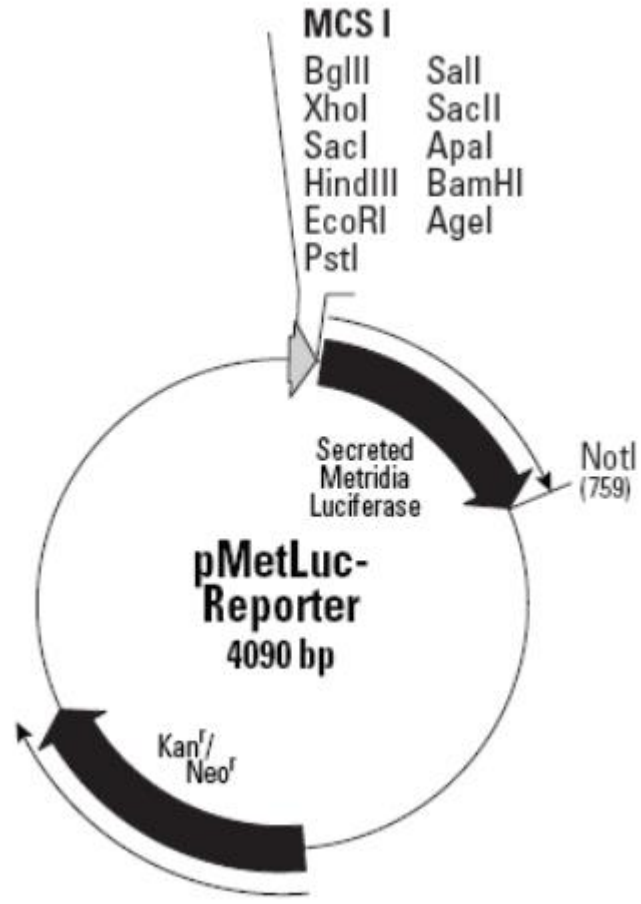
EK B: Kullanılan Vektörler



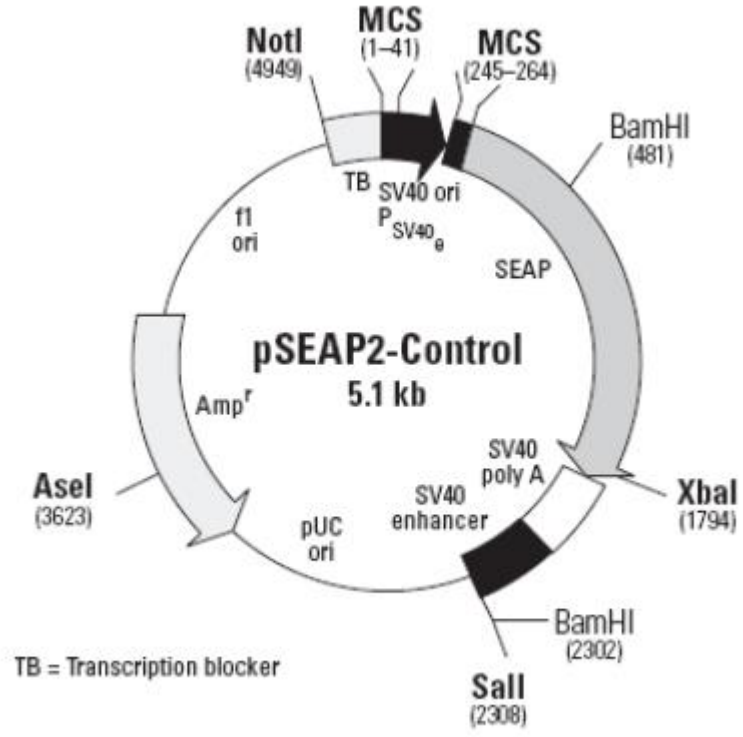
Şekil B.1: pGEM™-T Easy vektör haritası (Promega).



Şekil B.2: pcDNA3.1 vektör haritası (Invitrogen Life Technologies).



Şekil B.3: pMetLuc-Reporter vektör haritası (Clontech).



Şekil B.4: SEAP-2 kontrol vektör haritası.

