

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



HEPATOSELLÜLER KANSERDE MIR100HG'NİN KLF7
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU

RÜMEYSA ALAÇAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Tuğba TÜMER
 Doç. Dr. Esra TOKAY

BALIKESİR, HAZİRAN - 2024

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**HEPATOSELLÜLER KANSERDE MIR100HG'NİN KLF7 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ İLE 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.

Rümeysa ALAÇAM

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 112Z950 nolu proje ile desteklenmiştir.

Rümeysa ALAÇAM TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

**HEPATOSELLÜLER KANSERDE MIR100HG'NİN KLF7 TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜ İLE REGÜLASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
RÜMEYSA ALAÇAM
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, HAZİRAN-2024**

MIR100HG geni, insanda 11. kromozomun q kolunda lokalize olan bir lncRNA'dır. MIR100HG, çeşitli kanserlerde anormal olarak ifade edilir ve tümör hücre biyolojisi ile kanserle bağlantılı birçok yolakta yer alarak onkojenik ya da tümör baskılayıcı bir rol üstlenir. Literatürde hakkında çok az çalışma bulunan MIR100HG geni kolorektal kanserde, larengeal skuamöz hücreli karsinomada, mide kanserinde ve hepatosellüler karsinomada ifade olan bir genidir.

Bu tez çalışması kapsamında MIR100HG'nin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmıştır. İnsan MIR100HG promotor bölgesine ait kısaltılarak hazırlanan 5 farklı delesyon konstraktı (1244 bç -1013/+231, 1046 bç -815/+231, 909 bç -678/+231, 628 bç -397/+231 ve 419 bç -188/+231) klonlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, bu konstraktlardan 1046 bç (-815/+231) ve 909 bç (-678/+231) promotor konstraktlarının klonlanması gerçekleştirilmiştir. Geçici transfeskiyon deneylerinde, insan hepatosellüler karsinoma hücre modelinde (Hep3B) tüm promotor konstraktlarının aktif olduğu ve 628 bç (-397/+231), 1046 bç (-815/+231) ve 1244 bç (-1013/+231) promotor parçalarının en yüksek bazal aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda MIR100HG'nin promotor bölgesinde olası KLF7 bağlanma bölgelerini içerdiği tespit edilmiştir. Promotor parçalarının KLF7 transkripsiyon faktörü ile kotransfeksiyonu MIR100HG'nin transkripsiyonel seviyesini arttırmıştır. Ayrıca KLF7'nin overekspresyonunun, MIR100HG'nin ifadesini mRNA düzeyinde normoksik ve hipoksik koşullarda arttırdığı qRT-PCR ile gösterilmiştir. Kromatin İmmünopresipitasyonu (ChIP) analizi ile KLF'nin MIR100HG promotorunda fonksiyonel olarak farklı bağlanma bölgeleri olduğu doğrulanmıştır. KLF7'nin overekspresyonunun doğrulanması, normoksik ve hipoksik koşullarda, mRNA düzeyinde qRT-PCR, MTT, Koloni Formasyon, Scratch (Migrasyon) ve IFC deneyleri ile gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Hepatosellüler Karsinoma, lncRNA, MIR100HG, KLF7

Bilim Kod / Kodları : 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 107

ABSTRACT

REGULATION OF MIR100HG BY KLF7 TRANSCRIPTION FACTOR IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

MSC THESIS

RÜMEYSA ALAÇAM

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JUNE - 2024

The MIR100HG gene, located on the q arm of chromosome 11 in humans, is a long non-coding RNA (lncRNA). MIR100HG is abnormally expressed in various cancers and plays an oncogenic or tumor-suppressive role by participating in multiple pathways associated with tumor cell biology and cancer. Although there are few studies on MIR100HG in the literature, it is a gene expressed in colorectal cancer, laryngeal squamous cell carcinoma, gastric cancer, and hepatocellular carcinoma.

In this thesis, the transcriptional regulation of MIR100HG by the KLF7 transcription factor has been elucidated. Five different deletion constructs of the human MIR100HG promoter region (1244 bp -1013/+231, 1046 bp -815/+231, 909 bp -678/+231, 628 bp -397/+231, and 419 bp -188/+231) were prepared and cloned. Among these, the cloning of the 1046 bp (-815/+231) and 909 bp (-678/+231) promoter constructs was accomplished within this thesis study. In transient transfection experiments using the human hepatocellular carcinoma cell model (Hep3B), it was determined that all promoter constructs were active, and the promoter fragments of 628 bp (-397/+231), 1046 bp (-815/+231), and 1244 bp (-1013/+231) showed the highest basal activity.

Bioinformatic analyses identified potential KLF7 binding sites within the MIR100HG promoter region. Co-transfection of promoter fragments with the KLF7 transcription factor increased the transcriptional level of MIR100HG. Additionally, qRT-PCR demonstrated that KLF7 overexpression increased MIR100HG expression at the mRNA level under both normoxic and hypoxic conditions. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis confirmed that KLF7 functionally binds to different regions of the MIR100HG promoter. The validation of KLF7 overexpression, under normoxic and hypoxic conditions, was shown at the mRNA level through qRT-PCR, MTT, colony formation, scratch (migration), and IFC assays.

KEYWORDS: Hepatocellular Carcinoma, lncRNA, MIR100HG, KLF7

Science Code / Codes : 20606, 20610

Page Number : 107

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Hepatosellüler Karsinoma (HCC)	1
1.2 Uzun Kodlanmayan RNA'lar (lncRNA'lar)	2
1.2.1 Kanser ve lncRNA'lar	3
1.2.2 MIR100HG Geni.....	7
1.3 Transkripsiyon Faktörleri ile Gen Regülasyonu	8
1.3.1 Transkripsiyonel Aktivasyon	9
1.3.2 Transkripsiyonel Baskılama.....	11
1.3.3 Kruppel Benzeri Faktörler (KLF)	12
1.3.4 Kruppel-Benzeri Faktör 7 (KLF 7)	13
2. TEZİN AMACI	15
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1 MATERYALLER.....	18
3.1.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat	18
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	19
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu	25
3.2 METOD.....	25
3.2.1 Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu.....	25
3.2.2 MIR100HG Promotor Klonlama Çalışmaları	26
3.2.2.1 Biyoinformatik Analizler ve Primer Tasarımı	26
3.2.2.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	26
3.2.2.3 MIR100HG Promotor Primerleri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	27
3.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi ve Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması.....	28
3.2.2.5 Bakteriyel Katı ve Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması	29
3.2.2.6 DH5 α Hücre Soyunun Kompetent Hücre Haline Getirilmesi	30
3.2.2.7 Ligasyon.....	30
3.2.2.8 Transformasyon.....	31
3.2.2.9 Gliserol Stok Hazırlanması	32
3.2.2.10 Restriksiyon Endonükleaz Kesim	32
3.2.2.11 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu	33
3.2.2.12 Orta Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu.....	34
3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Teknikler	35
3.2.3.1 Besiyerinin Hazırlanması	35
3.2.3.2 Kullanılacak Kimyasal Malzemelerin Hazırlığı	35
3.2.3.3 Hücre Kültürünün Başlatılması, Pasajlanması ve Dondurulması	36

3.2.3.4 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Sayımı	37
3.2.3.5 Geçici Transfeksiyon Çalışmaları	38
3.2.3.6 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi	41
3.2.3.7 Hipoksi Modeli Oluşturma.....	42
3.2.3.8 MTT Deneyi.....	42
3.2.3.9 Koloni Formasyon Deneyi	43
3.2.3.10 Scratch (Migrasyon) Deneyi	43
3.2.3.11 İmmünofloresan (IFC) Deneyi	44
3.2.4 RNA Çalışmaları	45
3.2.4.1 Hücreden RNA Eldesi.....	45
3.2.4.2 RNA'nın Miktar Tayini	46
3.2.4.3 RNA Agaroz Jel Elektroforezi	46
3.2.4.4 cDNA Sentezi.....	47
3.2.4.5 cDNA Kalitesinin Kontrolü.....	48
3.2.4.6 Real Time PCR (qRT-PCR)	49
3.2.5 Kromatin İmmüno Presipitasyonu (ChIP) Deneyi.....	51
3.2.5.1 Hücrelerin Fiksasyonu ve Kromatin Parçalanması	53
3.2.5.2 Antikor ile İmmünopresipitasyon	53
3.2.5.3 Çapraz Bağların Çözülmesi	54
3.2.5.4 Saflaştırılmış DNA Eldesi	54
4. BULGULAR.....	56
4.1 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlama Çalışmaları.....	56
4.1.1 MIR100HG Genine Ait Promotor Bölgesinin Biyoinformatik Analizi	56
4.1.2 909 bç (-678/+231) ve 1046 bç (-815/+231) Promotor Parçalarının T:A Stratejisi ile pGEMT-Easy Vektöre Klonlanması.....	58
4.1.3 909 bç (-678/+231) ve 1046 bç (-815/+231) Promotor Parçalarının pMetLuc-reporter Vektöre Alt Klonlanması	61
4.1.4 MIR100HG Genine Ait Promotor Parçalarının Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyonu.....	64
4.1.5 MIR100HG Genine Ait Promotor Parçalarının KLF7 Transkripsiyon Faktörü ile Ko-Transfeksiyonu	65
4.2 KLF7 Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı Ekspresyonu.....	66
4.2.1 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde mRNA Düzeyinde Belirlenmesi .	66
4.2.2 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi	71
4.2.3 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	72
4.2.4 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	75
4.2.5 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Protein Düzeyinde IFC ile Belirlenmesi	78
4.2.6 KLF7 Aşırı Ekspresyonu Sonucunda Spesifik KLF7 Antikoru ile CHIP Deneyi	82
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	84
6. KAYNAKLAR (IEEE)	88
EKLER.....	100
EK A: 909 bç (-678/+231) Promotor Konstraktına Ait Dizi Analizi Sonucu.....	101

EK B: 1046 bç (-815/+231) Promotor Konstraktına Ait Dizi Analizi Sonucu	103
EK C: Transkripsiyon Faktörlerinin MIR100HG Promotoruna Olası Bağlanma Bölgeleri ..	105
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: LncRNA'ların fonksiyonları.....	3
Şekil 1.2: LncRNA'ların normal ve anormal ekspresyonu.....	5
Şekil 1.3: Kanser fenotiplerinde lncRNA'lar.....	6
Şekil 1.4: MIR100HG geninin şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.5: Transkripsiyonel aktivasyon	10
Şekil 1.6: Transkripsiyonel baskılama.....	11
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaları özetleyen akış diyagramı.....	17
Şekil 3.1: pGEM-T Easy vektörün şematik gösterimi.....	22
Şekil 3.2: pMetLuc Kontrol vektörün şematik gösterimi.....	23
Şekil 3.3: pMetLuc Reporter vektörün şematik gösterimi	23
Şekil 3.4: Seap-2 Kontrol vektörün şematik gösterimi	24
Şekil 3.5: Çalışmada kullanılan Hep3B hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20X).....	25
Şekil 4.1: MIR100HG promotor bölgesi içerisinde tasarlanan primerlerin promotor üzerinde gösterimi	57
Şekil 4.2: M: 1 kb Marker, 1-8: MIR100HG 909 bç, 9-16: 1046 bç promotor parçalarının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü	59
Şekil 4.3: M: 1 kb Marker, 1: 909 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 909 bç 1. Koloniye ait kesilmemiş plazmit, 3: 909 bç 2. Koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 909 bç 2. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü	60
Şekil 4.4: M: 1 kb Marker, 1: 1046 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 1046 bç 1. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü	60
Şekil 4.5: M: 100 bç Marker 1,2,3,4: MIR100HG 909 bç, 5,6,7,8: 1046 bç promotor parçalarının ve 9, 10, 11, 12: pMetLuc vektörün XhoI/HindIII restriksiyon endonükleaz kesim jel görüntüsü	61
Şekil 4.6: M: 100 bç Marker, 1: 909 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 909 bç 2. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 3: 909 bç 3. Koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 909 bç 4. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 5: 909 bç 5. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 6: 909 bç 6. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi jel görüntüsü.....	62
Şekil 4.7: M: 500 bç Marker, 1: 1046 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 1046 bç 1. koloniye ait kesilmemiş plazmit, 3: 1046 bç 2. Koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 1046 bç 2. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü	63
Şekil 4.8: pMetLuc vektörü içerisine klonlanmış MIR100HG promotor konstraktlarının şematik gösterimi	64
Şekil 4.9: MIR100HG promotor kontrastraktlarına (P1, P2, P3, P4 ve P5) ait Luc/SEAP değerleri	65
Şekil 4.10: KLF7 transkripsiyon faktörünün, MIR100HG promotor kontrastraktlarının (P1, P2, P3, P4 ve P5) transkripsiyonel aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 4.11: Normoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi.....	67

Şekil 4.12: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi.....	68
Şekil 4.13: Normoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi	68
Şekil 4.14: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi	69
Şekil 4.15: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonunun mRNA düzeyindeki değişimi	70
Şekil 4.16: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda zamana bağlı hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi	71
Şekil 4.17: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda zamana bağlı hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi	72
Şekil 4.18: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda koloni formasyon görüntüleri	73
Şekil 4.19: KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturması üzerindeki etkisi	73
Şekil 4.20: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda koloni formasyon görüntüleri	74
Şekil 4.21: KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturması üzerindeki etkisi	74
Şekil 4.22: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda migrasyon deneyi görüntüleri	76
Şekil 4.23: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda yara iyileşmesi ve hücre göçüne etkisi	76
Şekil 4.24: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda migrasyon deneyi görüntüleri	77
Şekil 4.25: Hep3B hücrelerinde, KLF7 genin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda yara iyileşmesi ve hücre göçüne etkisi	77
Şekil 4.26: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, normoksik koşullarda KLF7 antikoru uygulanmış IFC deneyi görüntüleri.....	79
Şekil 4.27: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, normoksik koşullarda KLF7 antikoru ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi	79
Şekil 4.28: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda KLF7 antikoru uygulanmış IFC deneyi görüntüleri.....	80
Şekil 4.29: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda KLF7 antikoru ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi	80
Şekil 4.30: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru uygulanmış IFC deneyi görüntüleri.....	81
Şekil 4.31: Hep3B hücrelerinde, KLF7 aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi	81
Şekil 4.32: KLF7 antikorunun KLF7 aşırı ifadesine bağlı CHIP deneyi analizi.....	83

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1:	Kullanılan cihazlar ve markası	18
Tablo 3.2:	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar	19
Tablo 3.3:	RNA çalışmalarında kullanılan bileşenler.....	20
Tablo 3.4:	DNA çalışmalarında kullanılan bileşenler	20
Tablo 3.5:	Klonlama çalışmalarında kullanılan vektörler	22
Tablo 3.6:	Transformasyon çalışmalarında kullanılan bakteri suşu ve genotipi	24
Tablo 3.7:	Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan bileşenler	24
Tablo 3.8:	MIR100HG promotör PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler	27
Tablo 3.9:	PCR reaksiyon koşulları	28
Tablo 3.10:	Agaroz Jel Elektroferezinde kullanılan çözeltiler.....	28
Tablo 3.11:	Restriksiyon endonükleaz kesiminde kullanılan bileşenler ve miktarları	33
Tablo 3.12:	Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve içerikleri	38
Tablo 3.13:	Formaldehit-agaroz jel elektroferezinde kullanılan tamponların hazırlanışı	47
Tablo 3.14:	RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve reaksiyon basamakları	48
Tablo 3.15:	H β -2-M genine ait primer dizileri.	48
Tablo 3.16:	H β -2-M PCR reaksiyon koşulları	49
Tablo 3.17:	H β -2-M PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler	49
Tablo 3.18:	Çalışmada kullanılan ekspresyon primerleri.....	50
Tablo 3.19:	Real Time PCR bileşenleri.....	50
Tablo 3.20:	Real Time PCR reaksiyon koşulları.....	51
Tablo 3.21:	ChIP qRT-PCR'ında kullanılan MIR100HG ChIP primerleri ve dizileri	55
Tablo 4.1:	MIR100HG promotör primerleri.....	58

SEMBOL LİSTESİ

ATP	: Adenozin Tri-Fosfat (Adenosine Triphosphate)
ADP	: Adenozin Di-Fosfat (Adenosine Diphosphate)
bç	: Baz çifti
β	: Beta
bk.	: Bakınız
cDNA	: Komplementer DNA
ChIP	: Kromatin İmmünopresipitasyon (Chromatin Immunoprecipitation)
Ct	: Cycle threshold
CTCF	: Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı
dk.	: Dakika
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiaminetetraasetik asit
Et-Br	: Etidyum Bromür
FA	: Formaldehit
FBS	: Fetal Bovine Serum
g	: Gram
HCC	: Hepatosellüler karsinoma
HEPES	: N-2-Hidroksietilpiperazin-N-2-etansülfonik asit
IFC	: İmmünofloresan
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	: Kilobaz
KLF7	: Kruppel-like Factor 7
L	: Litre
LacZ	: β-galactosidase geni
LB	: Luria Broth
LncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
M	: Molar
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MW	: Moleküler ağırlık
NaAc	: Sodyum Asetat

ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik Densite
PBS	: Phosphate Buffered Salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PIC	: Ön- Başlatma Kompleksi
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı (Rounds per minute)
RT	: Reverse Transkriptaz
SEAP	: Salınan alkalın fosfataz (Secreted alkaline phosphatase)
TF	: Transkripsiyon faktörü
UV	: Ultraviyole
X-gal	: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
% (v/v)	: Hacimce yüzde
% (w/v)	: Hacimde kütlece yüzde

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında öğretilerinden azami derecede istifade ettiğim ve öğretilerinin hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, çalışmalarım süresince deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Esra TOKAY'a, Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU'na ve Arş. Gör. Serhad ONAT'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimde 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını tamamlama sürecimde, daima yanımda olup, dostluğuyla bu tez çalışmasını sadece akademik bir başarı değil aynı zamanda kıymetli ve paha biçilemez anılarla dolu değerli bir dönem haline getiren, sahip olduğu ışıkla beni korkularımdan ve kaygılarımdan arındırıp daima yoluma ışık olan sevgili dostum Rümeyşa VAPUR ÖNDÜL'e teşekkür eder, sağlık ve mutluluğun hep yanında olmasını dilerim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bana sadece arkadaş değil aynı zamanda yoldaş da olan, iyi kötü her anımda elimi bırakmayıp şefkatli ve olgun yüreğiyle beni cesaretlendiren, karşıma çıkan zorluklarla mücadele edebilmem için bana ihtiyacım olan gücü veren sevgili dostum Munise AKBABA'ya çok teşekkür ederim.

Attığım adımlarda beni daima destekleyen, iyi günlerde mutluluğumu paylaşırken zor günlerimde güç verip ellerimi sımsıkı tutan, maddi manevi bütün zorlukları birbirimize olan inancımız ve sevgimizle aştığımız, yanımda olmasının bana verdiği huzur ve güvenle her zorluğun üstesinden gelmemi sağlayan, hayat arkadaşım, sevgili eşim Ahmet Faruk ALAÇAM'a, sonsuz destekleri için dedem Necip MUMCU ve anneannem Ayşe MUMCU'ya, benim için hem yol gösterici bir abla hem de sevgi dolu bir teyze olan Deniz MUMCU'ya, yüksek lisans sürecimin güzelliklerini ve zorluklarını benimle paylaşan, bana her zaman destek olan ikinci ailem; başta annem Doç. Dr. Sema MUMCU ALAÇAM'a, babam Rıza ALAÇAM'a ve abim Ali Tarık Alaçam'a yürekten teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hüznümü de neşemi de kalplerinde taşıyan, bana varlıklarıyla güç verip attığım her adımda yanımda olan kardeşlerim Yasemin ŞAHİN, Eda ŞAHİN ve ikiz kardeşim Hacı Mehmedhan ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını; eğitim hayatım boyunca attığım her adımda koşulsuz desteklerini esirgemeyen, emek vermenin ve eğitimin kıymetini bilip beni bu motivasyon ve bilinçle yetiştiren, yaptıkları fedakarlıklar ve bana olan inançları ile her zaman ileriye adım atmamı sağlayan, sevgili annem Zehra ŞAHİN ve sevgili babam Zeki ŞAHİN'e ithaf ediyorum.

Balıkesir, 2024

Rümeyşa ALAÇAM

1. GİRİŞ

1.1 Hepatosellüler Karsinoma (HCC)

En yaygın görülen primer karaciğer kanseri olan Hepatosellüler karsinom (HCC), küresel olarak kansere bağlı ölümler arasında en üst sırada yer alır. Hepatit B ve C siroz gelişimi için bağımsız risk faktörleri iken siroz ise HCC'nin ortaya çıkmasında en önemli risk faktörü olmaya devam etmektedir [1]. Hepatit D (HDV) koinfeksiyonu, metabolik unsurlar (obezite, insülin direnci, Tip II diyabet veya alkole bağlı olmayan HCC'deki dislipidemi) ve toksin ya da çevresel faktörler (örneğin alkol veya sigara kullanımı) HCC için diğer risk faktörleri arasında sayılabilir [2]. Karaciğer rezeksiyonu ve nakli için erken evre HCC hastaları tercih edilmektedir ve bu yaklaşım hastalara %70-80 oranında 5 yıllık sağkalım sunar [3]. Hepatosellüler karsinomun ileri evre hastaları için ise kemoterapi, immünoterapi ve onkolitik virüslerle tedavi planlanmaktadır. Ancak ileri evre HCC hastalarında uygulanan tedaviler yüksek ölüm oranları ile sonuçlanmaktadır [4].

Kanser heterojenliği, dinamik olarak genetik, epigenetik ve hücresel mikroçevre faktörlerinden etkilenir [5]. Dolayısıyla, HCC'nin oluşumu ve gelişiminde hem genetik hem de epigenetik faktörlerin etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, HCC oluşumunda sadece mutasyonlar yeterli değildir, yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarının da HCC mekanizmasını doğrudan etkilediği bilinmektedir [6]. Özellikle, HCC'de görülen bazı epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyon paternlerinde bozulma, histon modifikasyonları ve mikroRNA (miRNA) düzenlemesindeki anormallikler yer alır [7].

DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu kontrol eden metil gruplarının eklenmesiyle gerçekleşir. HCC'de genellikle tümör baskılayıcı genlerde hipermetilasyon ve genom genelinde hipometilasyon görülür [8]. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) aracılığıyla Sitozin bazından sonra Guanin bazının geldiği CpG adalarında meydana gelir [9]. Metilasyon CpG yoğunluğunun düşük olduğu veya tekrarlayan DNA bölgelerinde gerçekleşir [10]. HCC (hepatosellüler karsinom) gelişimine neden olan çeşitli tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri arasında RIZ1, SOCS3, E-cadherin, GSTP1, p73, RASSF1A, SOCS1, Hint1 ve RB1 genleri yer almaktadır. Bu genler genellikle hipermetilasyona maruz kalarak işlevlerini kaybederler ve bu süreç, hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, bu genler hücre döngüsü kontrolü, DNA tamiri ve sitokin sinyalizasyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde kritik görevler üstlenir. Özellikle, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını sağlayan hücre

proliferasyonu, hücrelerin büyüme ve bölünme süreçlerini yöneten hücre döngüsü kontrolü, DNA'nın hasar gördüğünde onarılmasını sağlayan DNA tamiri ve bağışıklık sistemi sinyalizasyonunu düzenleyen sitokin sinyalizasyonu gibi süreçlerde önemli işlevler üstlenirler. [11].

Histon modifikasyonları; HCC gelişiminde ve progresyonunda önemli bir rol oynar. Özellikle asetilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar HCC'deki gen ekspresyonunu etkileyerek kanserle ilişkili yolları düzenler. Histon modifikasyonları, kromatin düzenleyicilerin ve transkripsiyon faktörlerinin bir araya gelmesini etkileyebildiği gibi, efektör proteinleri de sürece dahil ederek aşağı yönlü sinyal yollarını dolaylı olarak aktive edebilir [12].

mikroRNA'lar (miRNA); HCC gelişiminde, epigenetik faktörler arasında önemli bir role sahiptir. miRNA biyosentezinde ve dışı aktarımında meydana gelen bozukluklar, miRNA ekspresyonunda genel bir düzensizliğe yol açarak insan HCC'sinde de görülen anormalliklere neden olabilir. Örneğin; tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesi (miR-15a/16-1, miR-122, miR-199a/b-3p) HCC gelişiminde tekrarlı olarak baskılanırken "oncomiR" olarak bilinen ve kanser gelişimini destekleyen miRNA'ların ifadesi ise (miR-21, miR-221, miR-222 gibi) HCC gelişiminde artış gösterir [8].

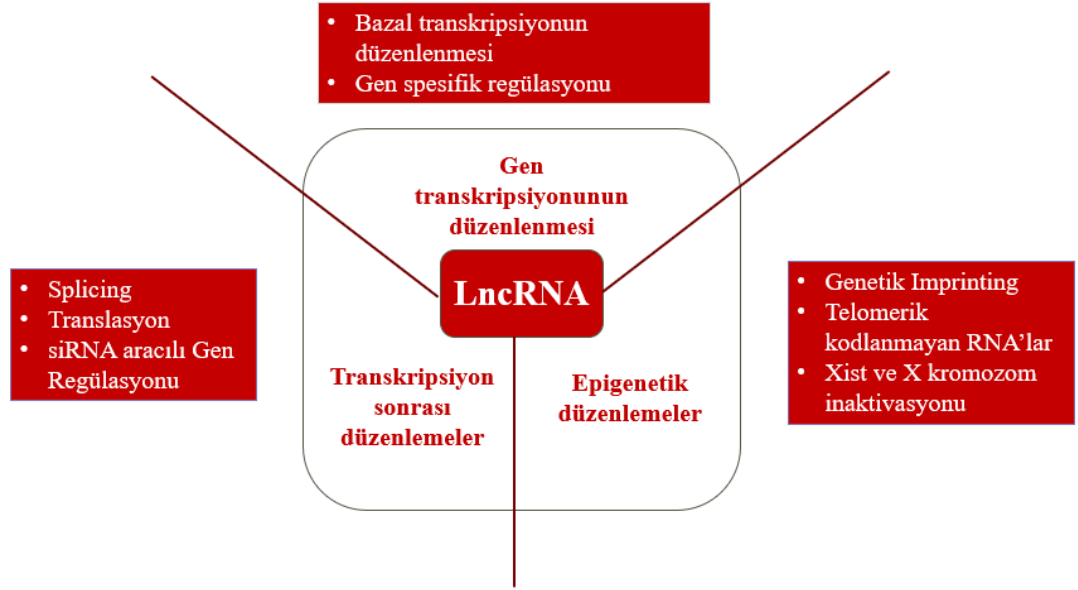
1.2 Uzun Kodlanmayan RNA'lar (lncRNA'lar)

Protein kodlayan genlerin bir bileşeni olan lncRNA'lar, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir [13]. lncRNA'lar, 200 nükleotidden daha uzun transkript uzunluğuna sahip RNA molekülleridir ve mRNA'nın aksine başlama ve bitiş kodonları yoktur. Bu sebeple protein kodlayamazlar. Ancak epigenetik, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (bk. Şekil 1.1). lncRNA'lar; RNA, DNA ve proteinlerle etkileşime girip RNA-RNA, RNA-DNA ve RNA-protein kompleksleri oluşturarak çeşitli işlevler üstlenirler. Bu kompleksler aracılığıyla lncRNA'lar gen ekspresyonunu ve kromatin yapısını birden fazla mekanizma ile düzenleyebilirler [14]:

Tuzak etkisi ile lncRNA'lar, RNA ve proteinlere bağlanarak onların işlevlerini modifiye edebilir veya engelleyebilirler,

İskelet etkisi ile lncRNA'lar, kromatin yapısının düzenlenmesi ve gen ekspresyonunun kontrolü için bir "iskelet" işlevi görerek, DNA ve ilgili proteinler arasında köprüler kurar ve sinyal yollarını organize edebilirler,

Transkripsiyon sonrası etki ile de LncRNA'lar, transkripsiyonla ilişkili bölgeleri bloke etmek amacıyla RNA dimerleri oluşturabilir. Bu süreç, protein kodlayan genlerin translasyonunu, stabilitesini ve bölünmesini düzenleyerek gen ekspresyonunu kontrol eder [15].



Şekil 1.1: LncRNA'ların fonksiyonları [15].

1.2.1 Kanser ve LncRNA'lar

Kodlanan genom tüm gen dizilerinin sadece %2'sinden azını oluşturduğu için, kodlanmayan genomdaki mutasyonların çoğu kanser fenotipine yol açar [16]. RNA, DNA'dan transkribe edilir ve DNA ile protein üretimi arasında bir köprü işlevi görür. RNA, kodlanan RNA (mRNA) ve kodlanmayan RNA (ncRNA) olarak iki ana sınıfa ayrılır [17]. Son zamanlarda, yüksek verimli dizileme teknolojisinin ilerlemesi ile birçok kodlanmayan RNA (ncRNA) keşfedilmiştir ve ncRNA'ların farklı kanser türlerinde onkogen ve tümör baskılayıcı gen işlevi görerek düzensiz şekilde ifade edildiği gösterilmiştir [18, 19].

Kodlanmayan genomdaki mutasyonlar, insan kanserinin temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir [20]. LncRNA'lar protein kodlayıcı gen dizilerine sahip olmasalar da önemli biyolojik süreçlerde düzenleyici RNA'lar olarak işlev görebilirler. LncRNA'lar, mRNA'ya benzer biçimde, RNA polimeraz II tarafından kopyalanır, başlık eklenir, poliadenile edilir ve kesilerek olgun hale getirilir [21].

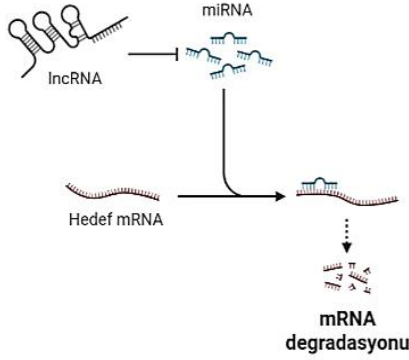
LncRNA'lar, proteinlerle belirli etkileşimler kurabilen karmaşık üç boyutlu yapılara katlanarak baz eşleşmesi ile RNA veya DNA molekülleriyle etkileşime girerek DNA, protein ve RNA'dan oluşan işlevsel bir ağ oluşturabilirler [18]. LncRNA'ların işlevleri hücre içerisinde buldukları konumlara göre değişiklik gösterir.

Çekirdekte bulunan lncRNA'lar; epigenetik ve transkripsiyon düzeyinde gen düzenlenmesine katılarak; histon modifikasyonları, DNA metilasyonunun kontrolü, kromatin modifikasyonları, transkripsiyon faktörleriyle iş birliği ve çekirdek içerisindeki proteinlerle etkileşim kurma gibi süreçlerde işlev görürler [22-26].

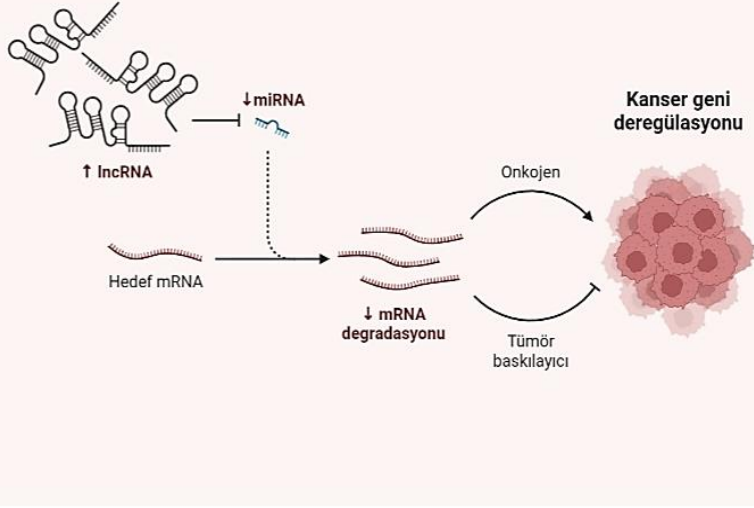
Sitoplazmada bulunan lncRNA'lar ise transkripsiyon sonrası ve translasyonel düzeylerde gen düzenlemesine katılarak; sitoplazmanın içerisindeki proteinlerle etkileşim kurma, mRNA metabolizmasının düzenlenmesi, endojen rekabetçi RNA (ceRNA) olarak mikroRNA ile etkileşim kurma gibi süreçlerde işlev görürler [27-29].

Dolayısıyla lncRNA'lar, kanser hücrelerinin çoğalmasında, vücutta diğer doku ve organlara yayılmasında (metastaz), çevre dokulara saldırmasında (invazyon) ve tedaviye karşı direnç geliştirmesinde önemli roller üstlenir. Gen düzenlenmesini farklı seviyelerde kontrol ederek, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını teşvik eden ya da ilaç tedavisine yanıtlarını değiştiren çeşitli biyolojik süreçlerde yer alırlar [18].

Normal Ekspresyon



Anormal lncRNA Ekspresyonu



Şekil 1.2: LncRNA'ların normal ve anormal ekspresyonu [30].

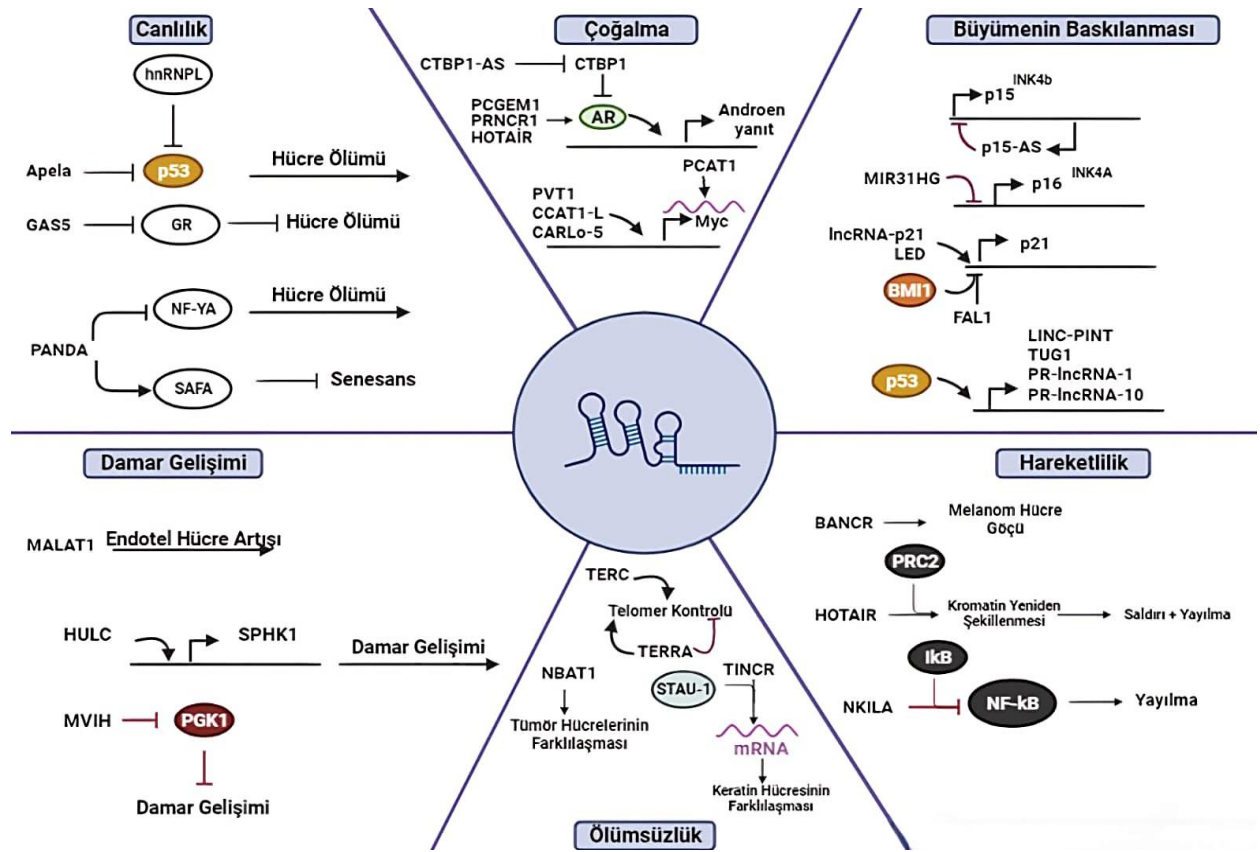
LncRNA'ların çoğu, kemokin ve hormonal sinyal yollarında yer alan genlerin düzenlenmesinde görev alır [31]. T hücreli akut lenfoblastik lösemide, Notch1 onkogeni, lncRNA LUNAR1'in insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörünün ekspresyonunu arttırarak büyüme teşvik etmesine neden olur [32]. Prostat kanserinde ise androjen sinyalleşmesi, doğrudan androjen reseptörüyle etkileşime giren veya androjen reseptör baskılayıcılarını engelleyen lncRNA'ların işlevine dayanır ve bu lncRNA'lar, prostat kanseri hücrelerinin büyümesinde önemli bir rol oynar [33, 34].

LncRNA'ların tümör baskılayıcı ve büyüme engelleyici yolların düzenlenmesinde önemli rolleri vardır [35, 36]. LncRNA transkripsiyonu, farklı hücre döngüsü koşullarında ve yaşlanma sırasında aktif olarak düzenlenir [16]. Örneğin lncRNA'ların bir kısmı, p15INK4b, p16INK4a ve p14ARF'yi kodlayan CDKN2A/CDKN2B bölgesindeki ana tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenler. Kodlamayan antisens transkript p15-AS ise p15INK4b genini heterokromatin oluşturarak baskılar ve lösemik hücrelerde yüksek p15-AS ekspresyonu düşük p15INK4b seviyesiyle ilişkilendirilir [37].

Tümör hücrelerinin seçici avantajı, telomer bakımına, besin stresi toleransına ve bazı kanserlerde farklılaşmamış tümör hücrelerinin korunmasına bağlıdır. Örneğin; lncRNA Growth arrest

specific 5 (Gas5), hücrelerin besin eksikliği veya büyüme faktörlerinin geri çekilmesi sonrasında durdurulan hücrelerde indüklenir [16]. Gas5, glukokortikoid reseptörünün (GR) DNA bağlanma bölgesine tutunarak bir yanıt faktörü gibi davranır ve glukokortikoid ile ilişkili genlerin ifadesini engeller [38, 39]. GR'nin bu şekilde bloke edilmesi, hücrelerin apoptoz inhibitörü 2'nin ekspresyonunu azaltarak normal hücrelerde stres koşulları altında apoptozu artırır [39]. Ancak, insan meme kanseri hücrelerinde Gas5'in baskılanması ise, besin bakımından fakir olan tümör mikroçevresinde meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına yardımcı olur [40].

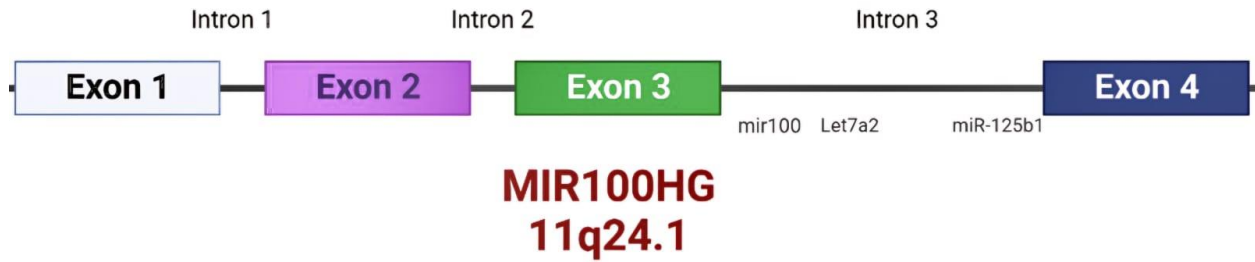
LncRNA'lar, kanser teşhisi ve tedavisinde, önemli potansiyellere sahip unsurlar olarak kabul edilmektedir [41]. Farklı kanser türlerinde lncRNA'ların geniş yelpazede ekspresyon seviyelerine sahip olması, tümörlere özgü olmaları ve vücut sıvılarında (plazma ve idrar) stabil olarak bulunabilmeleri, bu molekülleri kanser tanı ve tedavisi için önemli bir araç haline getirir [42].



Şekil 1.3: Kanser fenotiplerinde lncRNA'lar [16].

1.2.2 MIR100HG Geni

MIR100HG geni, insanda 11. kromozomun q kolunda lokalize olan bir lncRNA'dır. MIR100HG; 3. intronunda let-7a-2, miR-125b-1 ve miR-100 olmak üzere 3 adet miRNA içermektedir (Şekil 1.4) [43]. MIR100HG geni; ismini intronunda bulunan miR-100' den köken almıştır ve bu yüzden bu gen, MIR100-konakçı geni (MIR100HG; MIR100HostingGene) olarak isimlendirilmiştir. Aynı zamanda Linc-NeD-125 olarak da adlandırılmaktadır. MIR100HG geni 4 ekzondan oluşur ve 23 transkripte sahiptir [44]. MIR100HG, miRNA öncüsü olarak görev yapmasının yanı sıra, nöronal farklılaşmayı özel olarak uyarması, primatlarda evrimsel olarak korunmuş olması ve farklılaşma sinyalleri altında bir araya getirilmiş, stabil bir molekül olarak birikmesi gibi özellikleriyle de içsel işlevlere sahip olabileceğini gösterir [45]. MIR100HG, insan transkriptomu analizinde ilk kez tespit edilmiş, nöral kök hücrelerin nöronal farklılaşmasında ve mezenkimal kök hücrelerin kaderini belirlemede kritik bir rol oynadığı belirlenmiş, ardından da çeşitli malign tümörlerde tanımlanmıştır [46-52].



Şekil 1.4: MIR100HG geninin şematik gösterimi.

MIR100HG, çeşitli kanserlerde anormal olarak ifade edilir ve tümör hücre biyolojisi ile kanserle bağlantılı birçok yolda yer alarak onkojenik ya da tümör baskılayıcı bir rol üstlenir. MIR100HG'nin anormal ifadesi kötü prognoz ve klinikopatolojik özelliklerle yakından ilişkilidir [53]. Örneğin; kolorektal kanserde, MIR100HG ekspresyonunun artması tümörün yayılma hızını artırır ve hastalığın seyrini kötüleştirir [54]. Larengeal skuamöz hücreli karsinomada ise MIR100HG'nin yüksek ifadesi, miR-204-5p'nin baskılanması yoluyla kanserin ilerlemesine katkıda bulunur [55]. MIR100HG'nin artan ifadesi hepatosellüler karsinomun (HCC) gelişimi ile de ilişkilendirilmiştir. MIR100HG'nin baskılanması, HCC hücrelerinin büyüme, hareket ve

yayıma yeteneklerini azaltmaktadır [56]. Ayrıca, MIR100HG'nin baskılanması, mide kanseri hücrelerinde çoğalmanın önlenmesine yardımcı olur, bu da bu RNA molekülünün potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir [57].

MIR100HG, çeşitli kanser türlerinde birçok sinyal yollarında rol oynamaktadır. MIR100HG'nin sinyal yollarındaki rolüne ilişkin olarak, β -katenin/TCF4 MIR100HG'nin promotoruna bağlanabilmektedir. Kolorektal kanser örneklerinde, MIR100HG HDAC6 ve β -katenin ile negatif korelasyon gösterir. β -katenin ifadesinin artması, MIR100HG ifadesini ve H3K27Ac yoğunluğunu azaltmaktadır [58]. MIR100HG, TGF- β yollarını düzenleyerek rahim ağzı kanserinde lenf nodu metastazında (LNM) da kritik bir rol oynamaktadır [51]. MIR10HG'nin yüksek ifadesi, TGF- β yollarının bozulmasının neden olduğu servikal displazinin malign progresyonunu teşvik etmektedir. Bu bağlamda, MIR100HG erken evre rahim ağzı kanserinde LNM'nin TGF- β yolları aracılığıyla düzenlenmesinde oldukça etkin bir faktördür [52]. Pankreas kanseri hücrelerinde ise TGF β , MIR100HG transkripsiyonunu teşvik etmektedir [59]. Ancak TGF β 'nin etkisiyle MIR100HG'nin içerdiği üç adet miRNA'dan yalnızca miR-125b ve miR-100'ün ifadeleri artarken, miR-let-7a-2'nin ifadesinde artış gözlenmemiştir [60]. Buradan yola çıkarak, MIR100HG'nin transkripsiyonel aktivitesinin sinyal yolları tarafından farklı şekillerde düzenlendiği söylenebilir.

1.3 Transkripsiyon Faktörleri ile Gen Regülasyonu

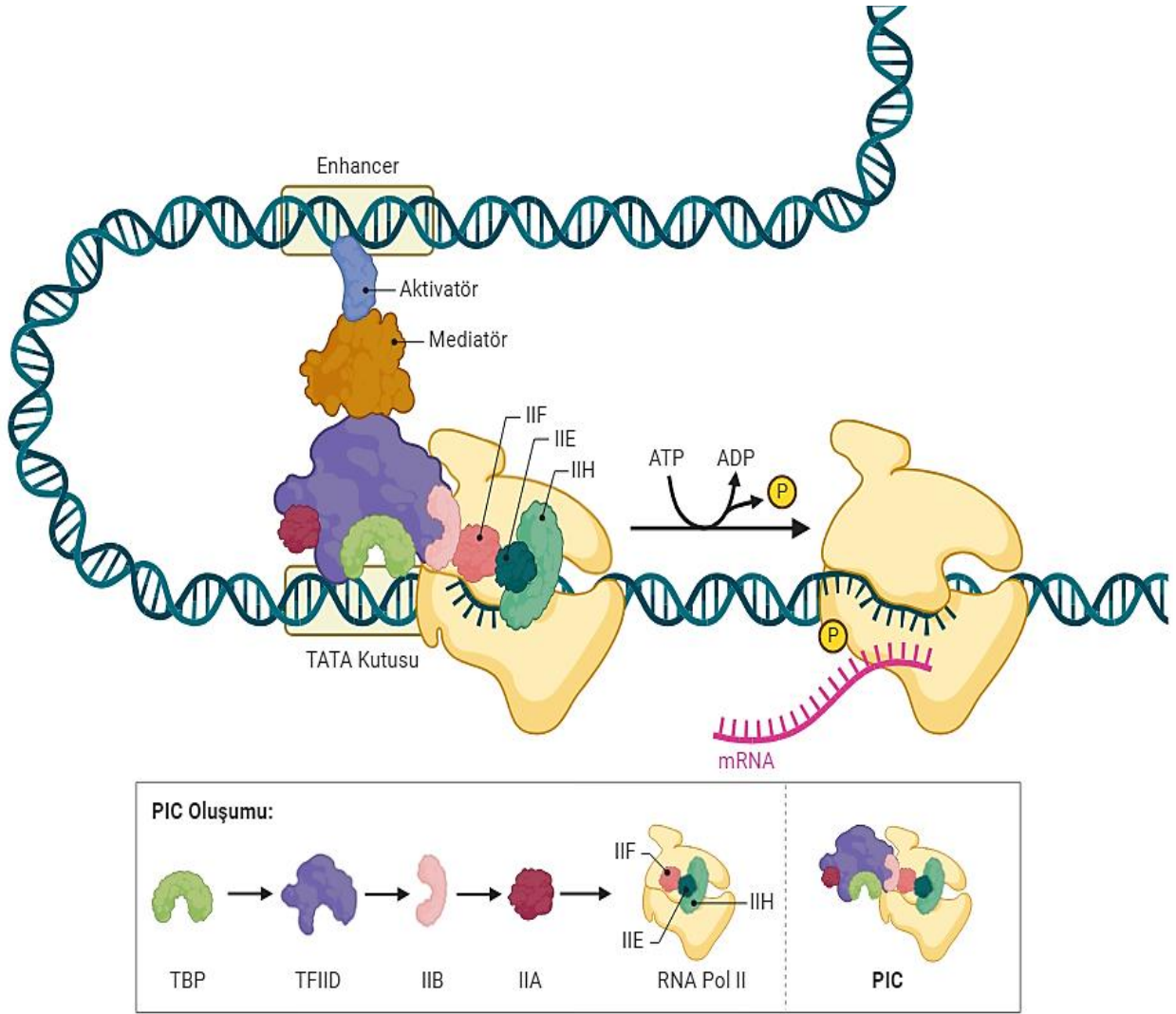
Ökaryotlarda, transkripsiyon, transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) genom üzerindeki düzenleyici elementlere bağlanmasının ardından, RNA polimeraz II'nin kodlayıcı DNA dizisini okuyarak komplementer mRNA'nın üretildiği sürekli olmayan bir süreçtir [61]. Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), DNA diziliminin anlaşılmasındaki ilk adım olan genomu doğrudan yorumlar [62]. Transkripsiyon faktörlerinin çoğu, "ana düzenleyici" ve "seçici genler" olarak işlev görür, hücre türlerini ve gelişimsel örüntülemeyi belirleyen süreçler üzerinde kontrol sağlar [63]. Transkripsiyon faktörleri, hücre farklılaşmasını teşvik edebilir [64].

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), DNA'nın kodlanmayan spesifik bölgelerine bağlanarak genlerin transkripsiyonunu aktive edip veya baskılayarak gen ifadesinde temel bir rol oynarlar. TF bağlanma bölgeleri (TFBS'ler) bazı kısa DNA dizilerinden oluşurlar ve bu diziler uzun süreli evrim sürecinde nispeten korunmuşlardır [65]. Son yıllarda, yüksek verimli dizi çözümleme

teknolojisinin, özellikle de Kromatin İmmünopresipitasyon dizilimi (ChIP-seq) teknolojisinin hızla gelişmesi, gen düzenlenmesine dair yeni bilgiler sağlayan geniş miktarda TF-DNA bağlanma verisinin elde edilmesini sağlamıştır [66].

1.3.1 Transkripsiyonel Aktivasyon

RNA polimerazlar, çoklu protein kompleksleridir ve transkripsiyonu başlatmak için promotoru tanıyacak genel transkripsiyon faktörleriyle birlikte çalışırlar [67]. RNA polimeraz II için genel transkripsiyon faktörleri (GTF'ler), TFIIA, -B, -D, -E, -F ve -H olarak tanımlanmıştır [68]. TFIIB, TFIID ve TFIIH transkripsiyon faktörleri transkripsiyonun başlatılabilmesi için aktivatör proteinler ile etkileşime girerler (bk. Şekil 1.5). Ancak transkripsiyonun etkin bir şekilde başlatılabilmesi için RNA polimeraz II ile doğrudan etkileşerek holoenzim kompleksinin oluşumuna yardımcı olan mediatör proteinlere de ihtiyaç vardır [67]. Mediatör proteinler; genin aktivasyonu ya da baskılanması için enhancer (artırıcı) ve operatör bölgelerden gelen bilgileri promotora entegre eder ve aktarır. Bu proteinler, doğrudan RNA polimeraz II üzerinden işlev görür ve promotor bağımlı transkripsiyonu modüle ederek etkinliğini düzenler [69]. Genel Transkripsiyon Faktörleri (GTF'ler), promotor üzerinde bir araya gelerek Ön-Başlatma Kompleksi'ni (PIC) oluştururlar [70]. TFIID, promotorun tanınmasından sorumludur ve bu tanıma süreci; Ön-Başlatma Kompleksi'nin (PIC) TATA-kutusu bağlayıcı protein (TBP) alt biriminin TATA kutusuyla ve TBP ile ilişkili faktörlerin ise (TAF'lar) yan sekanslarla etkileşim kurmasıyla sağlanır [71, 72]. TBP'nin TATA kutusu DNA'sı etrafında oluşturduğu kıvrım, TFIIB ile etkileşime geçerek promotorun RNA polimeraz II'nin üzerine doğru konumlanmasını sağlar [73, 74]. TFIIH ise, promotorun başlangıç noktasındaki çift sarmallı yapıyı açarak, transkripsiyonun başlatılmasını sağlayan ATP bağımlı helikazları içerir [75].



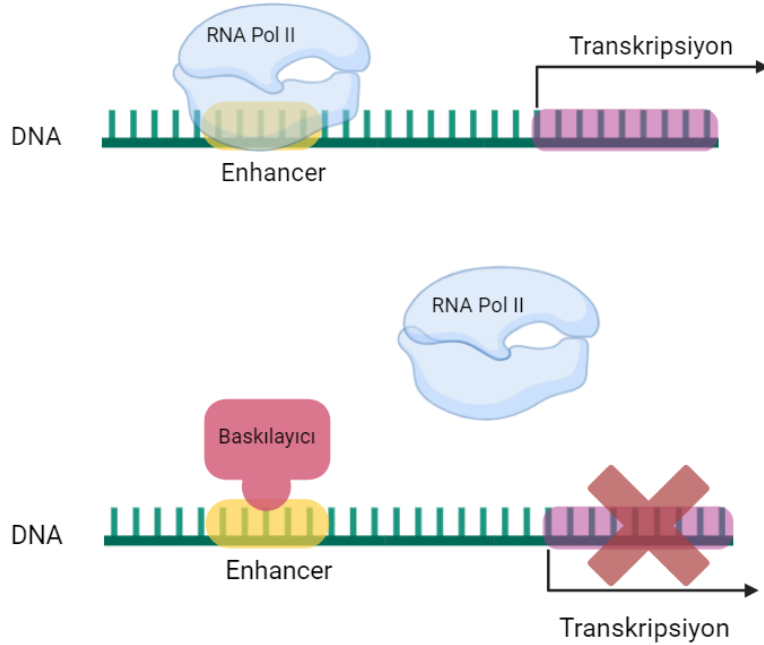
Şekil 1.5: Transkripsiyonel aktivasyon [76].

1.3.2 Transkripsiyonel Baskılama

Transkripsiyonel baskılayıcılar, RNA polimerazın promotora bağlanmasını engelleyecek şekilde işlev gören proteinlerdir. Ancak bazı baskılayıcılar, RNA polimerazın promotora bağlanmasına müdahale etmeyerek, transkripsiyon sürecinin ilerlemesine engel olurlar ve bu da transkripsiyonun başlamasını önler [77]. Transkripsiyonel baskılama; genel baskılama veya gene özgü baskılama olmak üzere iki şekilde gerçekleşir:

Genel baskılama; RNA polimeraz II'ye veya Ön-Başlatma Kompleksi'ne (PIC'e) ait bir bileşenin bir protein ya da kompleks tarafından bloke edilerek veya değiştirilerek etkisiz hale getirilmesiyle gerçekleşir. Bu bileşen kullanılamaz hale gelir ve transkripsiyon sürecinin ilerlemesi engellenir [70].

Gene özgü baskılama ise; bir gene özgü baskılayıcı veya ko-baskılayıcının, belirli bir genin veya genler grubunun transkripsiyonunu yönlendirmesiyle meydana gelir. Bu baskılayıcılar, aktivatör veya ko-aktivatörlerin promotor bölgesindeki işlevlerini önleyerek ya da transkripsiyonu teşvik edici etkilerini dengeleyerek işlev görürler. Ayrıca, baskılayıcılar kromatin yeniden düzenleme proteinleri ile veya Ön-Başlatma Kompleksi'nin (PIC) bileşenleriyle etkileşime girerek genin ifade edilmesini engelleyebilirler [70, 78].



Şekil 1.6: Transkripsiyonel baskılama [77].

1.3.3 Kruppel Benzeri Faktörler (KLF)

Kruppel-benzeri faktör (KLF) ailesi, çinko parmak transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir grup olup farklılaşma, çoğalma, göç ve apoptoz gibi farklı hücrel süreçlere katkı sağlar [79]. KLF ailesi, 17 transkripsiyon faktöründen oluşur. Bu ailenin üyeleri DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak transkripsiyonun aktivasyonunun ve baskılanmasının düzenlenmesinde rol alırlar [80]. KLF proteinleri belirlendikleri veya yüksek düzeyde ifade edildikleri dokulara göre isimlendirilmiştir. Örneğin eritroid KLF (EKLF ya da KLF1), akciğer KLF (LKLF ya da KLF2) ve bağırsak KLF (GKLF/EZF ya da KLF4) olarak bilinirler [81-83].

Kruppel benzeri faktörler (KLF), birçok genin ekspresyonunu artırarak ve/veya baskılayarak bir dizi gelişimsel olayın ve hücrel sürecin düzenlenmesinde rol alırlar [84]. Bu süreçlere kan oluşumu, iskelet ve düz kas gelişimi, glikoneogenez, retinal nöranal rejenerasyon ve yenidoğan akciğer gelişimi gibi biyolojik süreçler örnek verilebilir [85-89]. Ayrıca Kruppel benzeri faktörlerin (KLF), anti-enflamasyon, anti-fibrozis ve anti-tromboz gibi birçok savunma mekanizmasında önemli işlevleri vardır [90-92].

KLF'lerin DNA bağlanma bölgesi, üç adet Cys2/His2 (C2H2) tipi çinko parmak içeren C-terminal bölgesinde bulunmaktadır ve her bir çinko parmağı, amino asitler tarafından dörtgen şekilde koordine edilmiş bir çinko atomu içerir [93]. KLF'lerin ifadesi, CCAT1 gibi uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) ve miR-181a gibi mikroRNA'lar (miRNA) tarafından düzenlenir [94, 95]. Ancak, bu uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA'ların) ifade düzeyleri değiştirilerek KLF'lerin ifadesi azaltılabilir [96].

Kruppel benzeri faktörler (KLF'ler) birçok kanser ile ilişkilidir [97, 98]. KLF'ler kanser oluşumuna katılan hücre altı proteinlerin ifadesini düzenleyebilirler [99]. Ancak KLF'ler ile kanser arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır. Örneğin; bir KLF üyesi, farklı kanser türlerinde tamamen zıt etkilere sahip olabilirken, farklı KLF üyelerinin aynı kanser türü içinde farklı roller üstlendiği görülebilir [100-102]. KLF'lerin birçok kanser türünde sahip oldukları kritik roller sebebiyle simvastatin, sisplatin ve morfin gibi ilaçlar kanser tedavisinde KLF ifadesini düzenlemek için kullanılmıştır [103-105].

1.3.4 Kruppel-Benzeri Faktör 7 (KLF 7)

KLF7, KLF1'in DNA gen dizisine komplementer olan dejeneratif oligonükleotitler kullanılarak, 1998 yılında insan vasküler endotel hücrelerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile klonlanmıştır [106]. İnsanlarda KLF7'yi kodlayan DNA dizisi, 2. kromozomun uzun (q) kolunda (2q33.3) bulunmaktadır ve KLF7'nin 2. intronunda bulunan tek nükleotid polimorfizmi (SNP, rs2302870), Japon nüfusunda Tip 2 Diyabet gelişimi ile ilişkilendirilmiştir [107]. Ayrıca Koroner Arter Hastalığı (KAH) belirteç genlerinin promotörlerinde trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), interlökin-10 (IL-10), IL-12A, matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), leptin (LEP), miyeloperoksidaz (MPO), HSP27 ve HSP60 dahil olmak üzere birçok KLF7 bağlanma bölgesi içermektedir [108].

İnsan KLF7 geni, birden fazla transkripti kopyalar ve farklı boyutlarda en az 4 çeşit protein sentezler [109]. KLF7 geninin sentezlediği en büyük protein 302 amino asit içeren bir transkripsiyon faktörüdür [106]. KLF7'nin transkripsiyonel düzenleme bölgesi N-terminal'de, DNA bağlanma bölgesi ise C-terminal'de bulunmaktadır [109]. KLF7'nin transkripsiyon düzenleme bölgesinde; asidik amino asit bölgesi (aa 1–47) ve serin zengini hidrofobik bölge (aa 76–211) olmak üzere iki işlevsel alt bölge bulunur. KLF7'nin transkripsiyon düzenleme bölgesinde korunmuş bir lösin zinciri de (aa 59–119) yer almaktadır ve bu yapı, KLF7'nin ko-faktörü olarak işlev gören MOKA ile protein etkileşiminde rol oynar [110].

KLF7'nin akciğer kanserinde, gastrik kanserde ve hepatosellüler karsinomada ifade düzeyindeki değişiklikler kanser gelişimiyle ilişkilidir. KLF7'nin baskılanması gastrik kanser hücre metastazını inhibe ederken KLF7'nin ifadesinin artması ise gastrik kanser hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını teşvik eder [111]. KLF7'nin metilasyonunun diffüz gastrik adenokarsinom ile de güçlü bir ilişkisi vardır [112].

Akciğer kanserlerinin bir çeşidi olan NSCLC en yaygın akciğer kanseri türü olarak bilinir ve toplam vakaların en az dörtte üçünü oluşturur [113]. Bağımsız bir prognostik faktör olan, KLF7'nin aşırı ifadesi, sadece kanser hücrelerinin metastazını teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda akciğer adenokarsinomunda tümör boyutunu da artırır [97]. KLF7'nin aşırı ekspresyonu, NSCLC'nin nüksetmesine ve metastazına sebep olan önemli bir risk faktörüdür [114].

HMGB1, non-histon kromatin ile ilişkili bir protein olarak, karaciğer iltihaplanması ve hasarı sırasında immün hücreler tarafından aktif olarak veya nekrotik hücreler tarafından ise pasif olarak salgılanabilir [115]. Karaciğer iltihaplanması sırasında salgılanan HMGB1 proteini, HCC'nin başlatılması, ilerlemesi ve metastazını çeşitli mekanizmalarla destekler [116-118]. Ekstraselüler HMGB1, HCC hücrelerinde TLR4/RAGE-PI3K-AKT-NF- κ B yolu ile KLF7'nin ifadesinin artmasını tetikler. Dolayısıyla KLF7, HMGB1 aracılı HCC ilerlemesinde ve metastazında kritik bir rol oynamaktadır [119]. Ayrıca, KLF7, hepatosellüler karsinoma ve tümör metastazı başlangıcı ile ilişkilendirilen VPS35 proteininin aşırı ifadesini teşvik etmektedir. KLF7 ifade düzeyinin artmasıyla VPS35'in ifade düzeyi de yükselir ve HCC'nin ilerlemesini hızlandıran β -katenin aktivasyonu gerçekleşir [120].

2. TEZİN AMACI

En yaygın görülen primer karaciğer kanseri olan Hepatosellüler karsinom (HCC), küresel olarak kansere bağlı ölümler arasında en üst sırada yer alır ve hastalığın gelişiminde hem genetik hem de epigenetik faktörler etkin rol oynamaktadır. lncRNA'lar ise bu etkin faktörlerden biri olarak; kanser hücrelerinin çoğalmasında, vücutta diğer doku ve organlara yayılmasında (metastaz), çevre dokulara invazyonunda ve tedaviye karşı direnç geliştirmesinde önemli roller üstlenir. Bir lncRNA olan MIR100HG geni ise çeşitli kanserlerde anormal olarak ifade edilir ve tümör hücre biyolojisi ile kanserle bağlantılı birçok yolakta yer alarak onkojenik ya da tümör baskılayıcı bir rol üstlenir. İnsan HCC hücre hatlarındaki (MHCC97L, SMCC-7721, HuH-7 ve MHCC97H) ve bir sağlıklı karaciğer hücre hattındaki (LO2) MIR100HG ekspresyonu karşılaştırıldığında, tüm HCC hücre hatlarında sağlıklı karaciğer hücrelerine kıyasla önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir [121].

İnsan KLF7 geni, birden fazla transkripti kopyalayan, farklı boyutlarda en az 4 çeşit protein sentezleyen bir transkripsiyon faktörüdür. KLF7'nin hepatosellüler karsinomada ifade düzeyindeki değişiklikler kanser gelişiminde etkin bir rol oynamaktadır [119, 120].

Bu tez çalışmasında MIR100HG geninin insan hepatosellüler karsinomundaki (Hep3B) rolü ve MIR100HG geninin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından transkripsiyonel regülasyonuna açıklık getirmek hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması süresince yapılan çalışmalar Şekil 2.1'de bulunan akış diyagramında özetlenmiştir ve iki basamak altında toplanabilir.

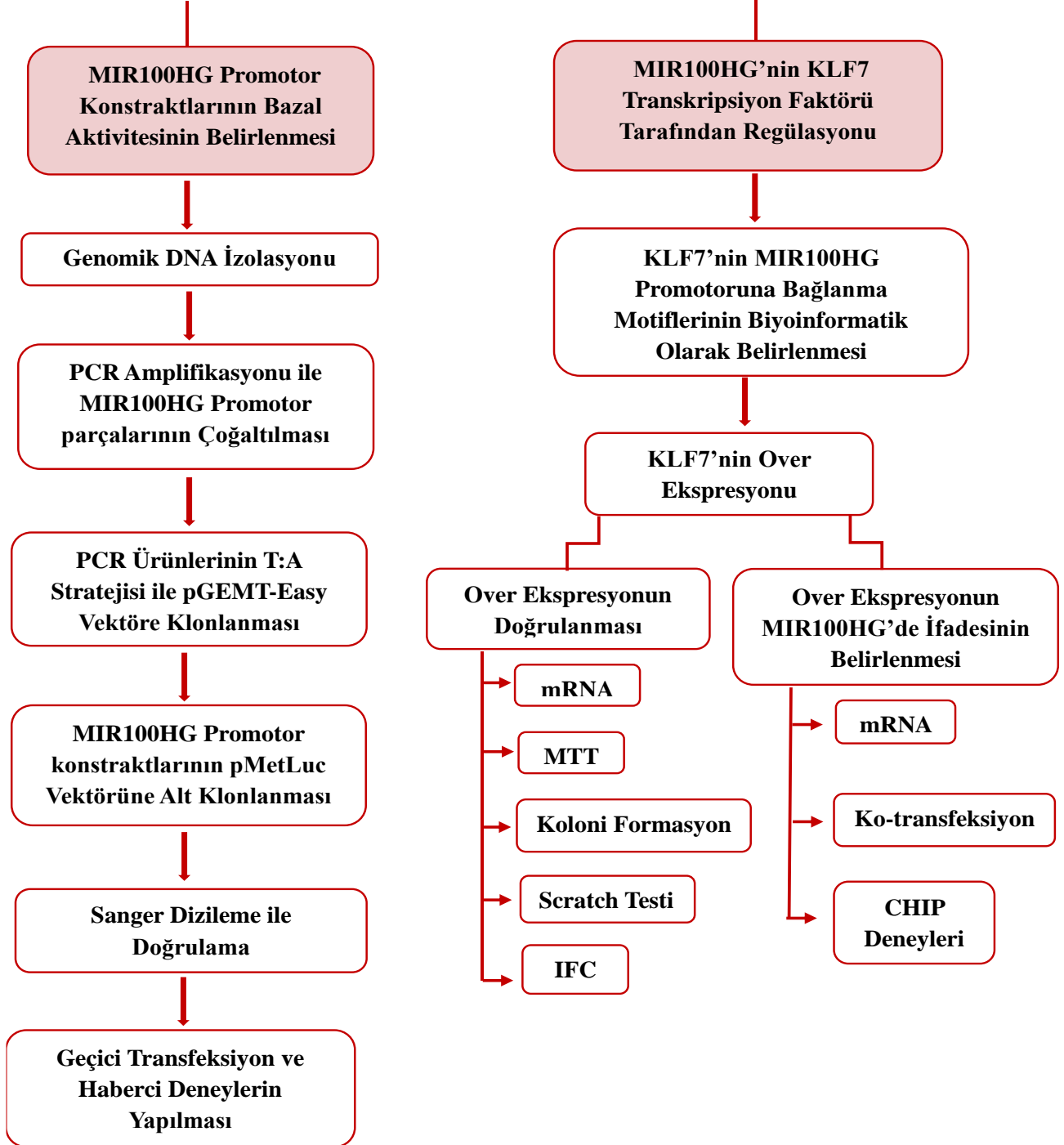
Birinci basamakta insan MIR100HG geninin promotor bölgesinin klonlanması ve klonlanan parçaların transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla;

- MIR100HG genine ait promotor konstraktları T:A klonlama stratejisi ile pGEMT-Easy vektöre klonlandı.
- pGEMT-Easy vektöre klonlanan promotor konstraktları restriksiyon endonükelaz kesimi ile vektörün içerisinden çıkarılarak pMetLuc Reporter vektöre alt klonlama yapıldı.
- pMetLuc Reporter vektöre klonlanan konstraktlar, bazal aktivitelerinin belirlenmesi için geçici transfeksiyon ile Hep3B hücrelerine aktarıldı.

İkinci basamakta ise insan MIR100HG geninin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından transkripsiyonel regülasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

- Hep3B hücrelerinde KLF7 transkripsiyon faktörünün normoksik ve hipoksik koşullarda aşırı ekspresyonu (overekspresyonu) mRNA düzeyinde, MTT testi, Koloni formasyon deneyi, Scratch (Migrasyon) testi ve IFC deneyi ile doğrulandı.
- Hep3B hücrelerinde KLF7 transkripsiyon faktörünün normoksik ve hipoksik koşullarda aşırı ekspresyonu doğrulandıktan sonra, KLF7 transkripsiyon faktörünün MIR100HG geninin üzerindeki etkisi mRNA düzeyinde belirlendi.
- KLF7 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotor konstraklarının bazal aktiviteleri üzerindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla, promotor konstraklarının ve KLF7 plazmitinin Hep3B hücrelerine ko-transfeksiyonu yapıldı.
- KLF7 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotorundaki muhtemel bağlanma bölgelerini belirleyebilmek için Kromatin İmmunopresipitasyon (ChIP) deneyi yapıldı.

Hepatosellüler Kanserde MIR100HG'nin KLF7 Transkripsiyon Faktörü Tarafından Regülasyonu



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaları özetleyen akış diyagramı.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat

Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar ve markası Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar ve markası.

KULLANILAN CİHAZ	MARKASI
Saf Su Cihazı	Human Corporation
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Sonikasyon Cihazı	PlusLab
%5 CO ₂ İnkübatör	Nuaire / ABD
Laminar Kabin	Telstar Bio II / İspanya
Inverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	N ikon/ Japonya
Etüv	WTB / Almanya
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Santrifüj	Thermo / ABD
Otoklav	Hirayama / Japonya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga	Arçelik / Türkiye
Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Isıtmalı Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Hassas Terazı	Sartorius / Almanya
-80°C Dondurcu	Nikon / Japonya
Yatay Çalkalayıcı	GFL / Almanya
pH Metre	Hanna / ABD

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması esnasında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar Tablo 3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6 ve Tablo 3.7’de sunulmuştur.

Tablo 3.2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar.

KULLANILAN MADDE	TEMİN EDİLEN FİRMA
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
DMEM	EuroClone
RPMI Medium	EuroClone
PBS (Phosphate Buffered Saline)	VWR Life Science
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
MTT	Sigma
HCL, İzopropanol	Sigma
Paraformaldehit	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma
Antifade Reagent	Prolong Invitrogen
Metanol, Kristal Viyole	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
CaCl ₂ (Kalsiyum klorür)	Sigma
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Thermo Scientific
Tripsin-EDTA	Sigma
15 mL ve 50 mL Falcon	IsoLab
10 ml ve 25 ml Serolojik pipetler	IsoLab

Tablo 3.2: (devam)

KULLANILAN MADDE	TEMİN EDİLEN FİRMA
KLF7 Mouse Monoklonal Antikor	Santa Cruz
m-IgGK BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
100 mm'lik petri kabı	IsoLab
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon (100X)	Gibco

Tablo 3.3: RNA çalışmalarında kullanılan bileşenler.

BİLEŞEN	TEMİN EDİLEN FİRMA
Oligo dT	Thermo Scientific
Ribolock İnhibitörü	Thermo Scientific
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo Scientific
innuPREB RNA Kiti	analytik-jena
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Sigma
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific

Tablo 3.4: DNA çalışmalarında kullanılan bileşenler.

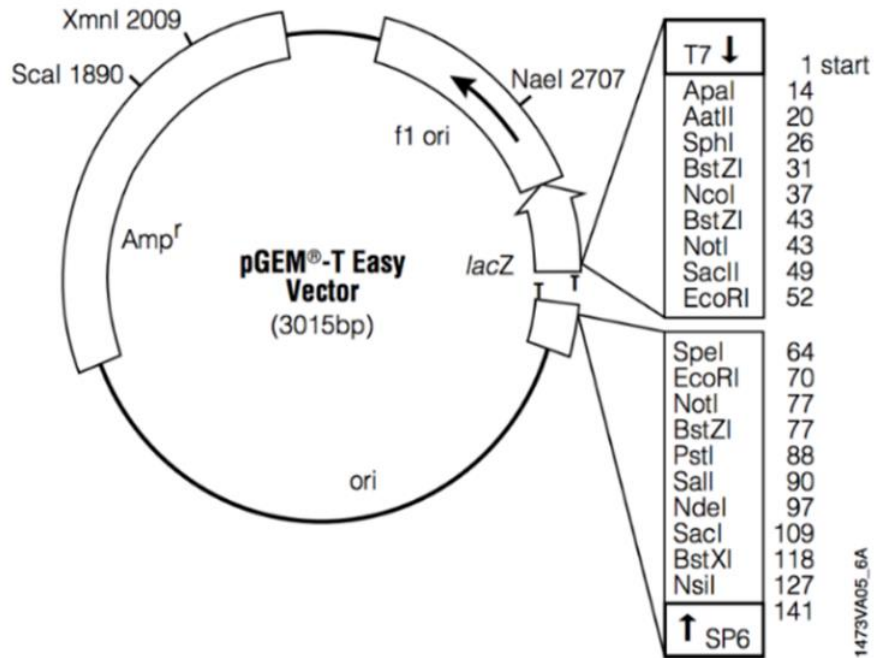
BİLEŞEN	TEMİN EDİLEN FİRMA
T4 DNA ligaz	Thermo Scientific
Ligaz Tamponu	Thermo Scientific
Restriksiyon Endonükleazlar (XhoI, HindIII)	Thermo Scientific

Tablo 3.4: (devam)

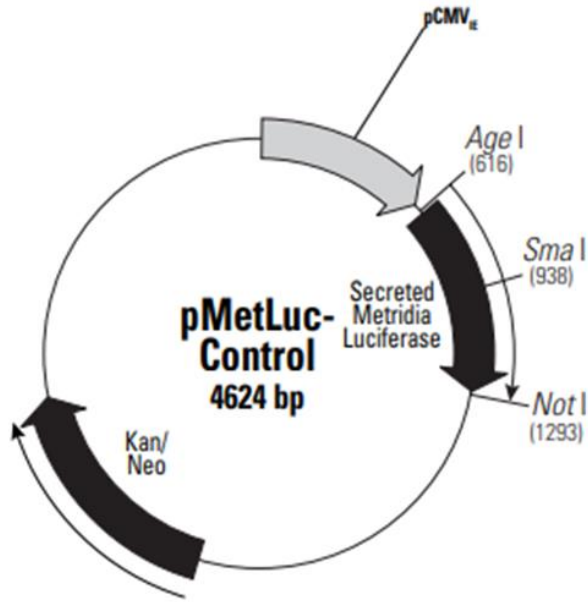
BİLEŞEN	TEMİN EDİLEN FİRMA
Tris Base	Sigma
Etidyum Bromür (EtBr)	Thermo Scientific
FastDigest Tampon	Thermo Scientific
Ampisilin	Sigma
Kanamisin	Sigma
LB broth	Miller
Agar	Caisson
Miniprep İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel
Midiprep İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel
Proteinaz K	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
EDTA	Sigma
Agaroz	BIOMAX
GeneJet Gel Extraction™ Kiti	Thermo Scientific
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo Scientific
MgCl ₂	Thermo Scientific
Taq Tamponu (10X)	Thermo Scientific
dNTP Karışımı	Thermo Scientific
Taq DNA Polimeraz Enzimi	Thermo Scientific
Sodyum asetat (NaAc)	Sigma

Tablo 3.5: Klonlama çalışmalarında kullanılan vektörler.

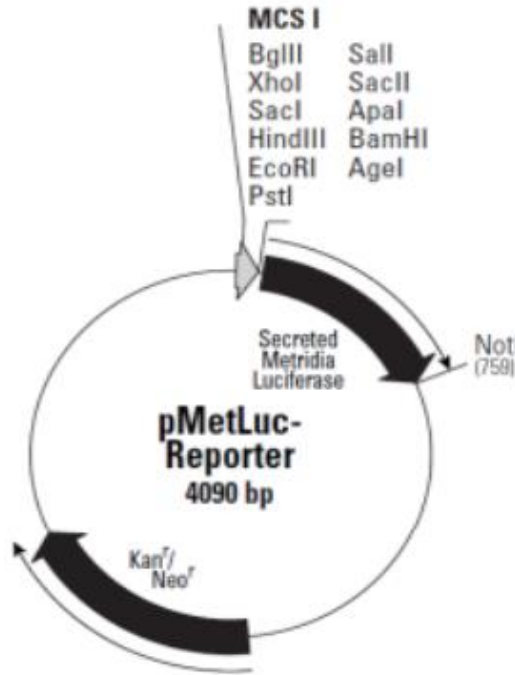
VEKTÖR	TEMİN EDİLEN FİRMA
pGEMTeasy	Promega
pMetLuc Kontrol	Clontech Laboratories
pMetLuc Reporter	Clontech Laboratories
Seap-2 Kontrol	Clontech Laboratories



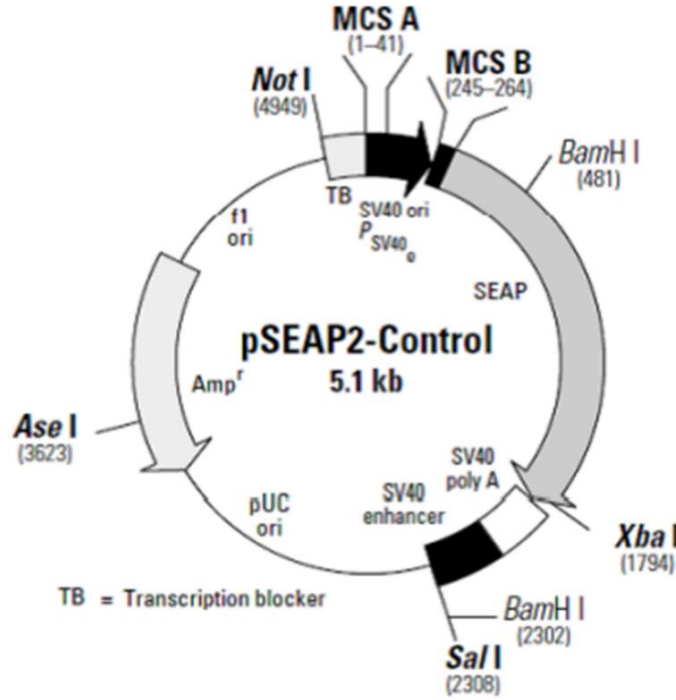
Şekil 3.1: pGEM-T Easy vektörün şematik gösterimi.



Şekil 3.2: pMetLuc Kontrol vektörün şematik gösterimi.



Şekil 3.3: pMetLuc Reporter vektörün şematik gösterimi.



Şekil 3.4: Seap-2 Kontrol vektörün şematik gösterimi.

Tablo 3.6: Transformasyon çalışmalarında kullanılan bakteri suşu ve genotipi.

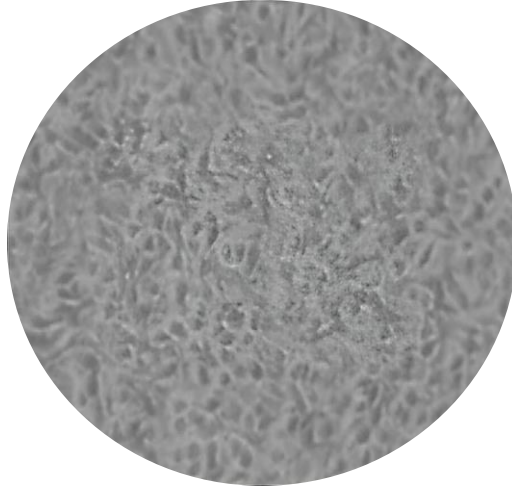
BAKTERİ SUŞLARI	GENOTİP
DH5- α	DlacZ AM15 A(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gryA96 re1A1

Tablo 3.7: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan bileşenler.

BİLEŞEN	TEMİN EDİLEN FİRMA
Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase	Takara Clontech
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Scientific
CaCl ₂ , Na ₂ HPO ₄ , NaCl,	Sigma
SEAP ve Lusiferaz Substratları	Takara Clontech
HEPES	Sigma

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu

Tez çalışmasında karaciğer kanseri hücre hattı olan Hep3B hücreleri kullanıldı.



Şekil 3.5: Çalışmada kullanılan Hep3B hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (20X).

3.2 METOD

3.2.1 Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Her deney aşamasında, çalışma alanı titizlikle %70 alkol ile dezenfekte edilmiş, kullanılan tüm plastik ve cam malzemeler özenle steril edilmiştir. Isıya dayanıklı tamponlar ve çözeltiler, pipet uçları, eppendorf tüpleri, PCR tüpleri ve bakteri kültür ortamları 121°C'de 20 dakika otoklavlanmış ve ardından 80°C'de 24 saat etüvde bekletilmiştir. Isıya duyarlı çözeltiler ise 0.22 µm'lik filtreler kullanılarak sterilize edilmiştir. RNA çalışmaları sırasında RNaz enzimini inaktive etmek için %0.1 DEPC'li su kullanılmış ve tüm işlemler sırasında tek kullanımlık nitril eldivenler tercih edilmiştir.

Laboratuvarın rutin temizliği için çamaşır suyu, %70 alkol ve Virkon gibi dezenfektanlar kullanılarak haftalık temizlik yapılmıştır. Bu temizleyiciler, laboratuvar yüzeyleri ve ekipmanları üzerindeki bakteri, virüs, mantar ve sporları etkili bir şekilde inaktive etmek için seçilmiştir. Laboratuvarın havası ve çalışma alanı, haftalık olarak Ultra Viyole (UV) ışığı kullanılarak sterilize edilmiş, laminar flow kabin içi UV lambası ile de iç sterilizasyon sağlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce, çalışma ortamının %70 alkol ile temizlenmesi ve laminar

flow ile hava sterilizasyon cihazının sürekli çalıştırılması ve odanın düşük sıcaklıkta tutulması sayesinde mikrobiyal gelişim önlenmiştir.

3.2.2 MIR100HG Promotor Klonlama Çalışmaları

3.2.2.1 Biyoinformatik Analizler ve Primer Tasarımı

MIR100HG geninin promotör bölgesinin klonlanması amacıyla ilk olarak MIR100HG genine ait olası promotör bölgesi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinde bulunan verilerden yararlanılarak belirlendi. Belirlenen muhtemel promotör bölgesinden 5 adet ileri ve 1 adet geri primer olacak şekilde 6 adet primer tasarlandı. Tasarlanmış primerlerin spesifik olup olmadığını kontrol etmek amacıyla <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresinde Blast analizi yapıldı. Tasarlanan primerlerin %GC oranını belirleyebilmek için https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ adresi, restriksiyon haritasını belirleyebilmek için ise Restriksiyon mapper version 3 programı kullanıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapabilmek için, pGEMT-Easy vektörü kesmeyen ancak pMetLuc vektörün kesim bölgeleri içerisinde bulunan enzimlerin seçilmesine dikkat edildi ve çalışmada kullanılacak restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII enzimleri olarak belirlendi. Belirlenen enzimlerin dizileri primerlerin uç kısımlarına eklendi. MIR100HG promotöründe transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin belirlenmesinde PROMO TF search programı kullanıldı [122].

3.2.2.2 Genomik DNA İzolasyonu

Hücrelerdeki genomik DNA'yı izole etmek amacıyla, hücre pelletleri hazırlanarak 1.5 mL'lik ependorf tüplerine alındı. Üzerlerine 1 mL dH₂O eklenip 5 dakika boyunca çalkalandı. Ardından, 13500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelletlerine 20 µL %10 SDS, 20 µL proteinaz K ve 250 µL Nüklei Lizis tamponu eklenip 5 dakika boyunca çalkalanarak homojenize edildi ve 72°C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, tüplere 175 µL doymuş amonyum asetat eklenerek 3-5 kez çalkalanıp oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 13500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatanta, hacminin iki katı saf etanol eklenip çalkalandı. DNA'nın çökmesi için 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, 250 µL %75 etanol ile yıkandı ve tekrar 13000 rpm'de

10 dakika santrifüj edildi. Ependorfların içerisindeki DNA çökeltisinden etanolün tamamen uzaklaşması için ependorflar hava ortamında kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonrasında 50 µL dH₂O eklenerek DNA pelletinin tamamı çözüldü. Elde edilen genomik DNA'nın konsantrasyonunu ve saflığını belirleyebilmek amacıyla ölçüm yapıldı. Genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, µDrop™ Plate Cihazı kullanılarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlendi. Ölçüm sonucunda DNA saflığı ve konsantrasyonu aşağıda verilen formüller ile belirlendi. Elde edilen genomik DNA -20°C'de muhafaza edildi.

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

$$\text{DNA Miktarı (ng/ µL)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/µL} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm}) \quad (3.1)$$

3.2.2.3 MIR100HG Promotor Primerleri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tasarlanan MIR100HG promotör primerleri primerleri (bk. Tablo 4.1) ve hazırlanan genomik DNA kullanılarak hedeflenen dizilerin amplifikasyonu amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.8 ve Tablo 3.9'da belirtilmiştir.

Tablo 3.8: MIR100HG promotör PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
İleri Primer (100 pmol/µL)	1 µL
Geri Primer (100 pmol/µL)	1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
Taq Tamponu (10X)	5 µL
Genomik DNA (250 ng/µL)	1 µL
dNTP karışım (10mM)	1 µL
dH ₂ O	38.5 µL
Taq Polimeraz (5 U/µL)	0.5 µL
Total Hacim	50 µL

Tablo 3.9: PCR reaksiyon koşulları.

Bölüm	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	1	95 °C	5 dk.
2	35	94 °C	45 sn.
		58 °C	45 sn.
		72 °C	45 sn.
3	1	72 °C	10 dk

3.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi ve Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması

Agaroz jel dökme işlemi için, 100 mL 0.5X TBE tamponunun içerisinde 1 gram agaroz çözülerek homojen bir karışım elde edilene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Çözelti 50°C'ye soğuduktan sonra, içine 0.5 µg/mL Etidyum-Bromür (Et-Br) eklendi. Bu karışım, taraklar yerleştirilmiş elektroforez kasetine dökülerek jelin donması beklendi. Jel donduktan sonra, elektroforez tankına yerleştirildi ve 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu. Örnekler 6X örnek yükleme boyası ile karıştırılıp agaroz jele yüklendi. Elektroforez, 90 voltluk bir gerilim altında 40 dakika boyunca çalıştırılarak örneklerin ayrışması sağlandı. Ayrışan jel UV ışık altında incelenip fotoğraflandı. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler Tablo 3.10'da listelenmiştir.

Tablo 3.10: Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	20 mL 0,5 M EDTA , 54 g Tris Base ve 27,5 g Borik Asit 1 L dH ₂ O içerisinde çözüldü. pH 8,00 ayarlandı ve otoklavlanarak kullanıldı.
Et-Br Stok Çözelti	Konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve ışık geçirmeyen bir şişede +4°C'de muhafaza edildi.
1 kb DNA Marker	1:1 oranında Yükleme boyası ve dH ₂ O karıştırılarak hazırlandı.

Agaroz jelden geri kazanılmak istenilen DNA bantları UV ışığa uzun süre maruz bırakılmadan ince bir jel hacmi elde edecek şekilde kesildi. Kesilen DNA bantları öncesinde boş ağırlıkları tartılmış olan ependorfların içerisine alındı ve hassas terazide dolu ağırlık belirlendi. Kesilen DNA bantlarının net ağırlığını belirleyebilmek amacıyla ependorfun boş ağırlığı dolu ağırlığından çıkarıldı. Jelden DNA'nın saflaştırılması GeneJet Gel Extraction™ kitinin önerdiği şekilde yapıldı. Ependorfun içerisinde bulunan DNA bantlarının üzerine hacimce 1:1 Bağlama Tamponu eklendi. Önceden 60°C'ye ısıtılan su banyosunun içerisinde koyuldu ve 10 dakika inkübasyon süresince jelin tüm miktarının erimesi sağlandı. Eriyen karışımın içerisinden 700 µL alınarak kit içeriğinde bulunan saflaştırma kolonunun üzerine eklenerek 13500 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süzüntü atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne konuldu. Bu basamak, jel-bağlama tamponu karışımı bitene kadar tekrarlanmıştır. Karışımın tamamı kolondan geçirildikten sonra, kolon 700 µL yıkama tamponu ile yıkandı ve 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon altındaki süzüntü döküldü ve kolon 13.500 rpm'de 2 dakika boş olarak santrifüj edildi. Ardından, kolonun ortasına 50 µL dH₂O eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi ve 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemten sonra kolondaki DNA çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanmış oldu.

3.2.2.5 Bakteriye Katı ve Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

Luria Broth (LB), sıvı besiyeri olarak temin edilen firmanın belirlediği oranlarda dH₂O içerisinde çözülerek hazırlandı. Sterilize edilmek amacıyla 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Soğutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi. LB Agar ise katı besiyeri olarak, temin edilen firmanın belirlediği oranlarda dH₂O içerisinde çözülerek hazırlandı. 1 Sterilize edilmek amacıyla 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Otoklav sonrasında sıcaklığı 50°C'ye düşen karışımın içerisine, 50 µg/mL Kanamisin veya 100 µg/mL Ampisilin stoğu eklendi. Karışım, köpürmeyi engelleyecek şekilde karıştırıldı ve ardından bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmeye bırakıldı. Petriler, parafilm ile kaplandı ve ters çevrilerek ışık almayacak şekilde +4°C'de stoklandı.

3.2.2.6 DH5 α Hücre Soyunun Kompetent Hücre Haline Getirilmesi

Kompetent hücreler, özellikle moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılan, DNA alımına açık, yani transformasyona uygun hale getirilmiş hücrelerdir. Kompetent hücreler, genetik materyalin hücreye kolayca alınmasını sağlayan yapılarıyla, gen klonlama çalışmalarında kritik bir rol oynar. MIR100HG geninin promotorunun klonlanması amacıyla, antibiyotik içermeyen LB agar petri kaplarında DH5 α hücreleri tek koloni oluşturacak şekilde ekildi ve 37 °C'de bir gece boyunca inkübasyon yapıldı. Ertesi gün, petri kabından tek bir koloni seçildi ve 10 mL LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece (16 saat) boyunca inkübasyon yapıldı. Bir gece inkübasyon sonrasında, 100 mL LB besiyerinin içerisine, inkübatörden alınan kültürden 5 ml eklendi. Kültürün büyüüp çoğalması amacıyla 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi ve OD600 değeri 0.5/0.6 arasında olana kadar belirli aralıklarla absorbans ölçümleri yapıldı. OD600 değeri istenen aralığa ulaştığında, bakteri süspansiyonu 50 mL'lik falkon tüplerine bölüştürüldü ve 4 °C'de 6000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü ve başlangıç hacminin yarısı kadar 0.5 M CaCl₂ solusyonu eklendi. Hafif hareketlerle pipetaj yapılarak 0.5 M CaCl₂ içerisinde hücre pelleti çözüldü ve homojen olması sağlandıktan sonra 25 dakika buz üzerinde inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun bitiminde 4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant döküldü ve pelletin üzerine başlangıç hacminin 1/10'u kadar 0.5 M CaCl₂ eklendi. Nazıkçe pipetaj yaparak hücre pelleti çözüldü ve homojen olması sağlandıktan sonra 1-4 saat arasında buz üstünde inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler ependorflara paylaştırıldı ve üzerlerine 1:1 oranında % 40'lık steril gliserol ilave edildi. Ependorflar etiketlenerek -80 °C buzdolabında saklandı.

3.2.2.7 Ligasyon

Ligasyon için iki vektör sistemi kullanılmıştır: pGEM-T Easy ve pMetLuc-reporter. pGEM-T Easy vektörü, T:A klonlama stratejisiyle DNA fragmanlarının kolayca klonlanmasını sağlayan bir vektördür. Bu strateji, PCR amplifikasyonu ile elde edilen DNA ürünlerini vektöre hızlı ve etkili bir şekilde klonlamak için kullanılır. pGEM-T Easy vektör aşağıda belirtilen özelliklere sahiptir;

- T uzantısı: Vektör klonlama bölgesinde (MCS) 3'-uçlarında tekli T (timidin) uzantıları içerir. Bu uzantılar, PCR ile amplifiye edilen DNA ürünlerine, Taq Polimeraz'ın eklemiş olduğu A (adenin) uzantıları ile kolayca eşleşebilir.
- Multiple Cloning Site (MCS): Vektörün klonlama bölgesi (MCS) ayrıca çoklu restriksiyon bölgelerini içerir ve bu sayede klonlanan DNA'nın doğrulanması ve çıkarılması için çeşitli restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılmasına olanak tanır.
- LacZ Raporlayıcı Gen: MCS, LacZa geni içinde yer alır, bu da klonlamanın doğrulanması için mavi-beyaz tarama yapmayı mümkün kılar.

Jelden saflaştırılan, MIR100HG promotor parçalarının klonlanması amacıyla son hacim 20 µL olacak şekilde ligasyon kuruldu. Steril PCR tüplerinin içerisine jelden kazanılmış olan 100 ng/µL DNA 'dan 15 µL, 2 µL 1X T4 DNA Ligaz tamponu, 50 ng/µL pGEM-T Easy vektörden 2 µL ve 1 U/µL T4 DNA ligaz enziminden 1 µL eklendi ve reaksiyon tüpü 16 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. MIR100HG promotor parçalarının, bazal aktivitesinin belirlenmesi ve haberci gen vektörü olan pMetLuc'a alt klonlama yapmak için pGEM-T Easy vektörden restriksiyon endonükleazlarla kesilen promotör fragmentleri ile ligasyon kuruldu. Steril PCR tüplerinin içerisine son hacim 20 µL olacak şekilde; MIR100HG promotör fragmenti (insert), pMetLuc vektörü, 2 µL 1X T4 DNA Ligaz tamponu, 1 U/µL T4 DNA ligaz enziminden 1 µL eklendi ve 16 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elde edilen ligasyon ürünü, DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi.

3.2.2.8 Transformasyon

Her bir promotor konstraktı için ligasyon reaksiyonu kuruldu. -80 °C'de stoklanan DH5α kompetent hücreleri çıkarılarak buza konuldu ve çözünmesi beklendi. Çözünmesi sağlanan kompetent hücrelerin içerisine 5 µL ligasyon ürünü eklendi ve ligasyon-hücre karışımı 40 dakika boyunca buzda inkübe edildi. Ardından hücreler, 42 °C'de su banyosunda 2 dakika boyunca ısı şokuna maruz bırakıldı. Sonra 2 dakika boyunca buzda bekletildi. Süre sonunda hücrelere, önceden 37 °C'ye ısıtılmış 800 µL LB medyum eklendi ve 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitmesine yakın pGEM-T Easy vektör ile kurulan ligasyon ürününün transformasyonu sonrasında, Mavi-Beyaz koloni seçimi yapabilmek amacıyla, oda ısısına gelmiş Ampisilinli petrilere üzerine sırasıyla, 40 µL 40 mg/mL X-gal ve

40 µL 100 mg/mL IPTG eklenerek öze ile petri yüzeyine yayıldı. İnkübasyon bitiminde transformasyon ürünü 5000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi ve pellet 100 µL LB medyum ile çözülerek öze petri yüzeyine yayıldı. Petriler, 37 °C'deki inkübatörde 15 dakika boyunca düz bir şekilde bekletildikten sonra ters çevrilerek kolonilerin büyütülmesi amacıyla 16-24 saat boyunca inkübe edildi. İnokülasyonun ardından, oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığını belirlemek için petri yüzeyinden seçilen beyaz kolonilerden plazmitler izole edildi. Elde edilen plazmitlere, restriksiyon endonükleaz kesimi yapılarak rekombinant koloniler belirlendi. pMetLuc vektör ile yapılan ligasyon reaksiyonları bölüm içerisinde tarif edildiği şekilde DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi. pMetLuc vektör için seçici antibiyotik Kanamisin olduğu için transformasyon kültürlerinin ekimi kanamisinli petrilere yapıldı. Seçilen kolonilerin rekombinant olup olmadığını belirlemek için, petri yüzeyinden alınan kolonilerden izole edilen plazmidler restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek analiz edildi.

3.2.2.9 Gliserol Stok Hazırlanması

100 µg/mL Ampisilin veya 50 µg/mL Kanamisin ilavesi yapılan 10 mL LB medyum içerisine petriden öze ile seçilen bir koloninin ekildi ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, bek alevinin yanında, hazırlanan %40'lık steril gliserol çözeltisinden ve ön kültürden eşit hacimde alınarak 2 mL'lik ependorflara eklendi. Ependorfların üzerine gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı

3.2.2.10 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Transformasyon sonrasında petri yüzeyinden seçilen kolonilerden izole edilen plazmitin rekombinant olup olmadığını belirleyebilmek ve pGEM-T Easy vektör içerisine klonlanmış promotor konstraktlarını vektörden çıkarıp, pMetLuc vektöre alt klonlama yapabilmek için restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Reaksiyon esnasında kullanılan malzemeler ve reaksiyon koşulları Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.11: Restriksiyon endonükleaz kesiminde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktar
Plazmit DNA	1 µg
XhoI (1U/µL)	1 µL
HindIII (1U/µL)	1 µL
Fast Digest 10X Green Buffer	5 µL
Total Hacim	50 µL

37°C’de 60 dakika inkübasyon yapıldı.

3.2.2.11 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Küçük ölçekli plazmit DNA izolasyonu için transformasyon sonrası seçilen tek koloni, antibiyotik içeren 10 mL LB medyumuna ekildi ve 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 16 saat boyunca inkübe edildi. İnkübatörden alınan kültür, 10.000 g’de, +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 250 µL A1 resüspansiyon tamponu eklenerek çözdürüldü. Üzerine 250 µL A2 lizis tamponu eklenip karışım maviye dönene kadar karıştırılarda oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapıldı. Lizis işlemi sonrası 300 µL A3 nötralizasyon tamponu eklendi ve 13.500 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatanttan 700 µL alınarak kolona eklendi ve 13.500 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süzüntü döküldü ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Bu basamak süpernatant bitene kadar tekrarlandı. Ardından kolona 500 µL AW yıkama tamponu eklendi ve 13.500 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Süzüntü döküldü, kolona 600 µL yıkama tamponu A4 eklendi. 13.500 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip süzüntü döküldü ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilerek 13.500 rpm’de 2 dakika boş santrifüj yapıldı. Son olarak kolon üzerine 50 µL dH₂O eklenip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 13.500 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip kolondaki DNA çalışmalarda kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.2.2.12 Orta Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Küçük ölçekli plazmit izolasyonları yapılan ve restriksiyon endonükleaz kesim ile rekombinant olarak belirlenen koloniler, rekombinant olup olmadıklarının doğrulanması amacıyla BM labosis dizi analizi firmasına gönderildi. Rekombinant olduğu doğrulanan kolonilerin büyük miktarda ve geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak saflıkta elde edilebilmesi amacıyla Macherey-Nagel NucleoBond Xtra EF Plasmid Purification orta ölçekli plazmit izolasyon kiti kullanıldı. Transformasyon sonrasında tek koloni seçimi yapıldı ve seçici antibiyotik eklenmiş 10 mL LB medyuma ekimi yapılarak 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında inkübatörden alınan kültür 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik (Kanamisin/ Ampisilin) ihtiva eden 100 mL LB besiyerinin içine eklendi ve 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından OD600’de 0.5 ile 0.6 arasına ulaştığında kültür 50 mL’lik falkonlara paylaştırıldı ve 5000 rpm’de +4°C’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında pelletin üzerine 8 mL RES-EF tamponu eklendi ve pelletin çözülmesi sağlandı. Ardından karışımın üzerine 8 mL Lys-EF, lizis tamponu eklendi ve rengi maviye dönene kadar alt üst edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu esnada kit içeriğinde bulunan Nükleobond Xtra Column ve filtre 50 mL’lik bir falkonun içerisine yerleştirildi ve 15 mL EQU-EF tamponu kullanılarak filtrenin ıslanması sağlandı. İnkübasyon süresi biten karışımın içerisine 8 mL NEU-EF nötralizasyon tamponu eklendi ve karışımın rengi maviden beyaza dönene dek alt üst yapıldıktan sonra 5 dakika buzda bekletildi. Süre bitiminde 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant pellete değmeden dikkatlice ıslatılmış filtrenin üzerine eklendi. Filtrenin altında kalan süzüntü atıldı ve filtrenin üzerine 5 mL FIL-EF, 1. yıkama tamponu eklendi. Yıkama tamponu tamamen süzüldükten sonra altta kalan süzüntü atıldı ve kolonun içerisindeki filtre çıkarıldı. Filtresiz kolona 35 mL ENDO-EF, 2. yıkama tamponu eklendi ve süzülmesi beklendi. Kolonun altındaki süzüntü atıldıktan sonra kolona 15 mL WASH-EF, 3. yıkama tamponu eklenerek süzülmesi beklendi. Kolon temiz bir falkona alındı ve üzerine 50°C’ye ısıtılmış 5 mL ELU-EF, elüsyon tamponu eklendi. Kolondan süzülen 5 mL elüsyon, 3,5 mL izopropanol ile karıştırıldıktan sonra ucuna finalizör takılmış enjektöre aktarıldı ve yavaş kuvvet uygulayarak karışım finalizörden geçirildi. Sonrasında sırasıyla finalizör ve piston çıkarıldı. Finalizör enjektöre tekrar takıldıktan sonra enjektörün içerisine 2 mL Endotoksin Free Etanol eklendi ve piston ile yavaş kuvvet uygulayarak finalizörden geçişi sağlandı. Enjektörden sırasıyla finalizör ve piston çıkarıldıktan sonra finalizör tekrardan takıldı ve piston

ile kuru enjektörden hava çıkışı sağlandı. Etanol uzaklaşana kadar bu basamak tekrar edildi. Etanol tamamen uzaklaştıktan sonra finalizör 1 mL'lik enjektörlere takıldı ve 600 µL dH₂O eklenerek elüsyon alındı. Elde edilen plazmit DNA'nın konsantrasyonunu ve saflığını belirleyebilmek amacıyla Bölüm 3.2.2.2'de tarif edildiği şekilde ölçüm alındı. Ölçüm sonrasında konsantrasyonu ve saflığı belirlenen plazmit DNA geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Teknikler

3.2.3.1 Besiyerinin Hazırlanması

Hep3B hücrelerinin kültüründe kullanılmak üzere ticari olarak Fetal Bovine Serum (FBS) temin edildi. FBS, ana stok olarak -20°C'de muhafaza edildi. Kullanım öncesinde, FBS gece boyunca +4°C'de buzdolabında çözülüp, ardından 56°C'de 1 saat boyunca ısıtılarak inaktive edildi. İnaktivasyon sonrasında kontaminasyon riskini minimize etmek için laminar flow kabini içinde 50 mL'lik steril falkon tüplere bölüştürüldü ve -20°C'de saklanmaya devam edildi.

Hücre kültürü için gerekli olan medyum ortamı, Hep3B hücreleri için %10 FBS içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) ortamı kullanılarak hazırlandı. %10 FBS içeren DMEM karışımının içerisine gerek duyulan şartlarda son konsantrasyonu 1X olacak şekilde 100X penisilin-streptomisin antibiyotik stok çözeltisinden antibiyotik eklenerek hücrelerin büyümesi için uygun medyum ortamı hazır hale getirildi.

3.2.3.2 Kullanılacak Kimyasal Malzemelerin Hazırlığı

PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Phosphate buffered saline (PBS) tamponunun hazırlanmasında Sigma firması tarafından üretilen PBS tabletleri kullanıldı. Her bir tablet, 100 mL deiyonize su (dH₂O) içinde tamamen çözülene kadar karıştırıldı. Çözeltinin sterilizasyonu, 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak gerçekleştirildi. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, steril PBS çözeltisi 50 mL'lik steril falkon tüplerine dikkatlice bölüştürüldü. Bu tüpler, kontaminasyon riskini minimize etmek için laminar flow kabini içinde hazırlandı. Hazırlanan PBS tamponu, +4°C'de saklanarak deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Tripan Mavisi Boyasının Hazırlanması

Tripan mavisi çözeltisinin hazırlanması için 0.4 g tripan mavisi kullanıldı. 1X PBS (phosphate-buffered saline) çözeltisi içine 0,4 g tripan mavisi eklendi ve tamamen çözünmesi için kaynatıldı. Tripan mavisi tamamen çözüldükten sonra, çözelti oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Soğutulan çözeltinin üzerine 1X PBS eklenerek toplam hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Böylece, %0,4 (w/v) konsantrasyonda tripan mavisi çözeltisi elde edilmiş oldu. Hazırlanan bu boya çözeltisi, hücre boyama işlemlerinde kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Tripsin-EDTA (TE) Tamponunun Hazırlanması

Tripsin-EDTA çözeltisini hazırlamak amacıyla 0.5 mM EDTA ve %0.05 oranında Tripsin kullanıldı. İlk adım olarak, 0.5 mM EDTA ve %0.05 Tripsin hassas terazide gerekli oranlarda tartıldı ve 1X steril PBS (phosphate-buffered saline) çözeltisi içinde çözülerek homojen bir karışım elde edildi. Hazırlanan bu karışım, sterilizasyon amacıyla 0.22 µm gözenek çapına sahip filtrelerden geçirildi. Filtreleme işlemi tamamlandıktan sonra, sterilize edilmiş çözelti, kontaminasyon riskini minimize etmek için laminar flow kabini içinde 50 mL'lik steril falkon tüplerine paylaştırıldı.

Çözeltinin uzun süreli saklanması için, hazırlanan tüpler -20°C'de muhafaza edildi. Çözeltinin kullanıma hazır hale getirilmesi için, çalışmalardan önce +4°C'de buzdolabında çözdürüldü. Kullanım sonrasında ise çözelti, stabilitesini koruması amacıyla tekrar +4°C'de saklandı.

3.2.3.3 Hücre Kültürünün Başlatılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Ependorflar içerisinde -80°C'de saklanan hücreler, büyütülmeleri amacıyla oda sıcaklığında çözdürüldü ve %10 FBS'li medyum içerisine alındı. Çözdürülen hücreler, 1000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek çökeltileri elde edildi. Bu işlem sonucunda oluşan hücre pelletinin zarar görmemesi için süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri, 3 mL taze besiyeri ile çözüldü ve her biri eşit miktarda üç petri kabına bölüştürüldü. Petriler, %10 FBS içeren medyum ile 10 mL'ye tamamlanarak, üzerlerine pasaj numarası ve gerekli bilgiler yazılarak etiketlendi. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ ortamında büyümeleri için inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin pasajlanması sırasında, petri yüzeyinde %80-%90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin medyumları uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Ardından, hücreleri yüzeyden ayırmak için 2 mL Tripsin-EDTA eklendi ve yaklaşık 3 dakika inkübe edildi. Hücrelerin ayrıldığı gözlemlendiğinde, Tripsin-EDTA'nın etkisi %10 FBS içeren medyum eklenerek durduruldu. Karışım, 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı ve yeniden 1000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, falkonlar %70'lik alkol ile sterilize edilerek laminar flow kabine alındı ve medyum uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri, 3 mL taze besiyeri ile çözüldü. Çözeltiden 1 mL alınarak yeni petrilere ekildi ve üzerlerine pasajlama bilgileri yazılarak etiketlendi. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin dondurulması sırasında, elde edilen hücre pelletlerinin üzerine 900 µL FBS eklenerek tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra 100 µL DMSO eklenerek karışım oluşturuldu. Karışım, ependorf tüplere aktarıldı ve gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra -80°C'de muhafaza edildi.

Hücre kültürü çalışmalarında, Hep3B hücrelerinin büyütülmesi için %10 FBS içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) medyum kullanıldı.

3.2.3.4 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Sayımı

Tripsinizasyon sonrasında hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin ardından oluşan hücre pelletleri, 5 mL taze medyum içerisinde çözümlenerek homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmesi sağlandı. Bu hücre süspansiyonundan 1 mL alınarak tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı ve hücre canlılığı kontrol edildi. Karışımdan alınan 10 µL'lik bir örnek, Thoma lamı üzerine yüklendi ve tripan mavisi ile boyanmış hücreler mikroskop altında sayıldı. Hücre sayım sonuçları not edilerek, deneylerde kullanılacak hücre miktarının doğru bir şekilde belirlenebilmesi için ortalama değer alındı ve ortalama hücre sayısı $\times 2 \times 10^4$, formülü yardımıyla 1 mililitredeki hücre sayısı hesaplandı. Hücrelerin eşit koşullarda deneylere katılması sağlanarak, sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği artırıldı. Bu standart hücre hazırlama ve sayım prosedürü, hücre deneylerinin düzenli ve kontrollü bir şekilde yürütülmesine olanak tanıdı.

3.2.3.5 Geçici Transfeksiyon Çalışmaları

Tablo 3.12: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve içerikleri.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
2.5 M CaCl₂ (MW: 147.01)	Homojen bir CaCl ₂ çözeltisi hazırlamak için 36,75 gram CaCl ₂ , 100 mL deiyonize su içinde çözüldü. Bu çözelti, tamamen homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Elde edilen çözelti, kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla 0.22 µm'lik filtre kullanılarak sterilize edildi. Sterilizasyon işleminin ardından, laminar flow kabininde çalışılarak, dikkatlice eppendorf tüplere bölüştürüldü. Bu tüpler, uzun süreli kullanım ve bozulmanın önlenmesi için -20°C'de muhafaza edilerek saklandı.
2X HEPES (2X HeBS) - 50 mM HEPES (MW:238.3) - 280 mM NaCl (MW:58.44) - 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (MW:141.96) (pH 7.05-7.12)	Yaklaşık 90 mL deiyonize suya 1,19 gram HEPES, 1,63 gram NaCl ve 0,02 gram Na ₂ HPO ₄ eklenerek homojen bir çözelti elde edildi. Bu karışımın pH'ı, 7,05'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi, deiyonize su eklenerek 100 mL'ye tamamlandı. Sterilizasyon işlemi için, hazırlanan çözelti, 0,22 µm'lik filtre ile süzülerek sterilizasyon sağlandı. Sterilize edilen çözelti, laminar flow kabininde dikkatlice eppendorf tüplere bölüştürüldü. Bu eppendorf tüpler, çözeltinin uzun süre korunabilmesi için -20°C'de saklandı.
100X Fosfat (PO₄) Tampon	70 mM Na ₂ PO ₄ ve 70 mM NH ₂ PO ₄ 1:1 oranında karıştırılarak 100 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Sonrasında, steril çözelti, laminar flow kabin içerisinde eppendorf tüplere paylaştırıldı ve -20°C'de saklandı.

Tablo 3.12: (devam)

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
SEAP	Büyük ölçekli plazmit izolasyon kiti kullanılarak hazırlandı ve -20°C'de saklandı.
Ready to glow Dual Secreted Reporter Assay Kiti™	Kit içerisindeki 10X lüsiferaz substratı, reaksiyon tamponu ile 1X konsantrasyona seyreltildi. Aynı şekilde, kitin içeriğinde bulunan 5X dilüsyon tamponu da 1X konsantrasyona seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi.

MIR100HG genine ait promotor konstraktlarının bazal aktivitelerini belirlemek amacıyla, Hep3B hücreleri 48 kuyulu plaklara 6×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler, 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Her bir promotor parçası için dört tekrar yapıldı. Bu amaçla, her promotor parçası için ayrı ayrı olmak üzere 250 µL HEPES ve 7.2 µL PO₄, 15 mL'lik 1. falkona alındı. 15 mL'lik 2. falkona ise 4 µL Seap (500 ng/µL), 30 µL CaCl₂ (2.5 M), 8 µL MIR100HG promotor plazmid DNA (500 ng/µL) ve 215.2 µL steril dH₂O eklenerek iki falkonun hacmi eşitlendi. HEPES içeren 2. falkonun içerisinde hava kabarcıkları oluşturulurken, DNA içeren 1. falkondaki karışım, 2. Falkonun içerisine yavaşça eklendi. Karışım, presipitasyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında, laminar flow kabininde bir saat bekletildi. DNA-CaCl₂ kompleksleri homojen hale getirildikten sonra, her bir kuyuya 128.6 µL olacak şekilde hücrelerin üzerine dağıtıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücrelerin medyumunu döküldü ve kuyular steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine yeni hazırlanmış %10 FBS'li medyum eklendi ve plakalar 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinde, kuyulardan 100 µL medyum alınıp ependorflara konuldu. Ependorflar, etiketlendikten sonra, lüsiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

Hep3B hücrelerinde; KLF7 geninin, MIR100HG genine ait promotor parçaları üzerindeki transkripsiyonel etkisini belirleyebilmek için kotransfeksiyon yapıldı. Hep3B hücreleri 48 kuyulu plaklara 6×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler, 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, transfeksiyon yapmak için gerekli malzemeler

(bk. Tablo 3.12) oda sıcaklığına getirildi. Her bir konstrakt için 4 tekrar yapılmış olup bu amaç doğrultusunda her bir promotör parçası için ayrı ayrı olmak üzere 250 µL HEPES ve 7.2 µL PO₄ 15 mL'lik 1. falkonun içerisine alındı. 15 mL'lik 2. falkonun içerisine ise 4 µL Seap (500 ng/µL), 30 µL CaCl₂ (2.5 M), 8 µL MIR100HG promotör plazmid DNA (500 ng/µL), 4 µL KLF7 plazmid DNA (1000 ng/µL) ve son olarak 211.2 µL steril deiyonize su eklenerek iki falkonun son hacmi eşitlendi. HEPES içeren 2. falkonun içerisinde hava kabarcıkları oluşturulurken, DNA içeren 1. falkondaki karışım, 2. Falkonun içerisine yavaşça eklendi Karışım, presipitasyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında, laminar flow kabin içerisinde 1 saat bekletildi. DNA-CaCl₂ kompleksleri homojen hale getirildikten sonra, her bir kuyuya 128.6 µL olacak şekilde hücrelerin üzerine dağıtıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücrelerin medyumunu döküldü ve kuyular steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine yeni hazırlanmış %10 FBS'li medyum eklendi ve plakalar 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinde, kuyulardan 100 µL medyum alınıp ependorflara konuldu. Ependorflar, etiketlendikten sonra, lusiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

KLF7 geninin Hep3B hücrelerinde aşırı ifadesini değerlendirmek ve pEGFP-C1 vektörüne klonlanmış KLF7 geninin geçici transfeksiyonu için TurboFect™ kiti kullanıldı. Hem kontrol grubu hem de deney grubu için 1'er adet 100 mm petri kabına, 1x10⁶ hücre/petri olacak şekilde Hep3B hücreleri ekildi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında bir gece inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu için, Hep3B hücrelerine boş vektör pEGFP-C1 plazmidini transfekte edildi. Serumsuz DMEM ortamına son hacim 2 mL olacak şekilde 10 µg KLF7 plazmid DNA (1000 ng/µL) eklendi. DNA-DMEM karışımının içerisine 30 µL transfeksiyon reaktifi eklendi ve nazikçe karışması sağlandı. Bu karışım, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, transfeksiyon reaktifi-DNA karışımı yavaşça hücrelerin üzerine eklendi. Petri kapları hafif dairesel hareketlerle sallanarak transfeksiyon ürünün petri içerisinde homojen dağılması sağlandı. Petriler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyonun 24. saatinde hücreler, Tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeyden kaldırıldı ve sayıldı. Bu hücreler, MTT, Koloni Formasyon, Scratch (Migrasyon), İmmünofloresan (IFC), Kromatin İmmünopresipitasyonu (ChIP) ve RNA deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı.

3.2.3.6 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi

MIR100HG genine ait promotor parçalarının ve KLF7 geninin bu promotor parçaları üzerindeki transkripsiyonel aktivitesini belirleyebilmek amacıyla Bölüm 3.2.3.5'te tarif edilen şekilde $\text{CaCl}_2\text{-PO}_4$ presipitasyonu ile geçici transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonun etkinliğini belirleyebilmek amacıyla protomotor parçalarının klonlandığı pMetLuc-Reporter, pSEAP2-kontrol ve pMetLuc-kontrol vektörleri de hücrelere transfekte edildi. pMetLuc-Reporter vektör promotor içermeyen boş bir vektördür ve çalışmada negatif kontrol olarak kullanıldı. pSEAP2-kontrol vektörü içerdiği viral promotor bölgesi sayesinde transfeksiyon sonucunda yüksek Alkalen-Fosfataz aktivitesi verir ve çalışmada normalizasyon amacıyla kullanıldı. pMetLuc-kontrol vektörünün de içerdiği viral promotor bölgesi sayesinde yüksek aktivite gösterir bu sebeple çalışmada pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

Lusiferaz aktivitesinin ölçümü QUANTI-luc™ Gold kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Lusiferaz aktivitesini belirlemek amacıyla 384 kuyucuklu plakaya transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinde alınan medyumdan 20 µL eklendi ve üzerine 10 µL Lusiferaz reaktifi eklenerek hızlı bir şekilde luminometrede ölçüm alındı. Ölçüm sonuçları analiz yapmak amacıyla not edildi.

SEAP aktivitesinin ölçümü Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kit içeriğindeki 5X dilüsyon tamponunun hacmi uygun oranlarda dH_2O eklenerek son hacim 1X olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinde alınan medyumdan 5 µL konuldu ve üzerine 15 µL 1X dilüsyon tamponu eklendi. Plaka parafilm ile sarıldı ve üzeri alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra su banyosunda 65°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Ardından 2-3 dakika buzda sonrasında da 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Kuyuların üzerine 20 µL SEAP substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrasında luminometrede ölçüm alındı. Her bir örnek için elde edilen Lusiferaz aktivitesi verileri Seap aktivitesi verilerine oranlanarak relatif Lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi sağlandı. Sonuçlar GraphPad programında grafikleştirildi.

3.2.3.7 Hipoksi Modeli Oluşturma

Hipoksi (düşük oksijen koşulları), tümör mikrositesinde yaygın bir durumdur ve kanser hücrelerinin adaptasyonunu, metastazını ve terapötik direncini etkiler. Kobalt klorür kullanarak hipoksik koşullar oluşturmak, kanser hücrelerinin oksijen eksikliğine nasıl tepki verdiğini incelemek için yaygın bir yöntemdir. Kobalt klorür, hücrelerde Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1-alfa (HIF-1 α) proteinini stabilize eder. Normal oksijen koşullarında, HIF-1 α prolyl hidroksilaz enzimleri tarafından hidroksillenerek yıkıma uğrar. Ancak kobalt klorür, bu enzimlerin aktivitesini inhibe ederek HIF-1 α 'nın yıkımını engeller. Stabilize olan HIF-1 α , hücre çekirdeğine geçerek Hipoksi Yanıt Elementleri (HRE'ler) içeren genlerin ekspresyonunu artırır. Böylece hücreler, oksijen eksikliğine adapte olarak hayatta kalma ve büyüme stratejileri geliştirir. KLF7'nin overekspresyon çalışmalarında, Hep3B hücrelerinde hipoksik koşulları stimüle etmek ve overekspresyonun hipoksik koşullardaki etkisini belirleyebilmek amacıyla, 300 μ M Kobalt klorür (CoCl₂), uygulaması yapıldı.

3.2.3.8 MTT Deneyi

MTT testi, hücre canlılığı ve proliferasyonunu değerlendirmek için kullanılan renkli bir testtir. Bu test, özellikle hücre kültürü çalışmalarında toksikoloji ve kanser araştırmaları gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılır. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) adı verilen bir tetrazolyum tuzu içerir. Bu tuz, canlı hücrelerin mitokondrilerindeki enzimler tarafından sarı renkten mor renge dönüşen formazan kristallerine indirgenir. Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin aşırı ifadesinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla MTT testi kullanıldı. Transfeksiyon işleminin 24. saatinde hücreler, her kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışması için 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 6. saatinde, hücreleri hipoksik koşullara maruz bırakmak için son konsantrasyonu 300 μ M olan CoCl₂ eklendi. Bu işlemden 24, 48 ve 72 saat sonra, kuyucuklara 0.5 mg/ml MTT çözeltisi ilave edildi. MTT çözeltisi eklendikten sonra, plaka 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı ve 4 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda, kuyucuklardaki medyum tamamen uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 0.004 M HCl içeren izopropanol eklendi. Oluşan formazan kristalleri tamamen çözüldükten sonra, 550 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı ve elde edilen sonuçlar kontrol

hücreleri ile karşılaştırıldı. Hücre canlılığı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve veriler GraphPad yazılımı ile analiz edilerek grafikler oluşturuldu.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek hücrelerin absorbanansı}}{\text{Kontrol hücrelerin absorbanansı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.9 Koloni Formasyon Deneyi

Koloni formasyon deneyi, genellikle bir genin aşırı ifadesinin veya genetik manipülasyonun bir hücre hattı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılır. Bu deney, hücrelerin klonal büyümesini ve çoğalma yeteneğini test etmek amacıyla tasarlanmıştır. Koloni formasyon deneyi, hücrelerin sağ kalımı, proliferasyonu ve bir hücreden başlayarak koloniler oluşturma kapasitesini ölçer. KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinin büyüme ve sağ kalımı üzerindeki etkisini belirlemek için, transfeksiyonun 24. saatinde, her bir kuyuda 1×10^3 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara hücreler ekildi. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saatlik inkübasyonun ardından, her bir kuyuda TurboFect™ transfeksiyon ajanı kullanılarak geçici transfeksiyon işlemi yinelendi ve önerilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Transfeksiyonun ardından, hücrelerin büyümesi ve koloni oluşturma süreçleri mikroskop altında düzenli olarak takip edildi. Deneyin 10. gününde, kolonileri hipoksik koşullara maruz bırakmak amacıyla son konsantrasyonu $300 \mu\text{M}$ olan CoCl_2 eklendi. Bu işlemden 24 saat sonra, plakalardaki medyum uzaklaştırıldı ve her bir kuyu 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından, kolonilerin yüzeye sabitlenmesi için kuyulara %80 metanol eklendi ve 30 dakika boyunca bekletildi. Süre sonunda metanol uzaklaştırıldı ve kuyular tekrar 3 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra, koloniler 5 dakika süreyle kristal viyole ile boyandı. Boyama işlemi sonrasında, kuyular 5 dakikalık aralıklarla 3 kez saf su ile yıkandı ve koloniler aydınlık bir ortamda fotoğraflandı. Koloni sayımı, Image J (NIH) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Image J analizinden elde edilen veriler, GraphPad programı ile analiz edilerek sonuçlar grafiksel olarak ifade edildi.

3.2.3.10 Scratch (Migrasyon) Deneyi

Scratch deneyi veya çizik testi, hücrelerin göç kabiliyetini ve yara iyileşme süreçlerini değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu deney, özellikle kanser, yara iyileşmesi ve hücre

göçü üzerine yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılır. KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde, yara iyileşmesi ve hücre göçü üzerine etkisini belirlemek için transfeksiyonun 24. saatinde, her bir kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara hücreler ekildi. Hücrelerin tüm yüzeyi kaplayarak tek katmanlı bir tabaka oluşturması için hücreler, 37°C %5 CO_2 ortamında 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, her kuyucuk için standart hale getirilmiş bir yöntem kullanılarak, $10 \mu\text{L}$ 'lik beyaz pipet ucu ile kuyucukların ortasına bir çizik atıldı. Çizik atma işleminin ardından, serbest kalan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı ve ardından %10 FBS içeren DMEM ortamı eklendi. Hücreleri hipoksik koşullara maruz bırakmak amacıyla, son konsantrasyonu $300 \mu\text{M}$ olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Plakalar inkübatöre konulmadan önce, kuyucuklar 0. saatte inverted mikroskop altında görüntülenip fotoğraflandı. Hücre göçünü ve çizigin kapanma sürecini izlemek amacıyla, inkübasyonun 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde kuyucuklar tekrar inverted mikroskop altında fotoğraflandı. Fotoğraflar, Image J (NIH) yazılımı kullanılarak analiz edildi ve elde edilen veriler GraphPad yazılımı ile değerlendirilerek grafiksel olarak ifade edildi. Hücrelerin göç etme oranları, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Hücre göçü (\%)} = \frac{(\text{0. saat çizik alanı} - \text{İlgili saatin çizik alanı})}{\text{0. saat çizik alanı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.3.11 İmmünofloresan (IFC) Deneyi

İmmünofloresan (IFC) deneyi, hedef antijenleri hücrelerde belirlemek için kullanılan antikorların floresan bir boya etiketlendiği antijen-antikor reaksiyonuna dayanan bir tekniktir. KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde, spesifik KLF7 antikorunu kullanılarak antijen-antikor etkileşimini belirlemek amacıyla Transfeksiyonun 24. saatinde, 125×10^3 hücre, 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve %5 CO_2 ortamında 37°C 'de 16 saat inkübe edildi. Hipoksik koşulları simüle etmek ve HIF-1 α yanıtını değerlendirmek amacıyla için ilgili kuyulara $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 eklendi ve hücreler 6 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, medyum uzaklaştırıldı ve hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücreler, $250 \mu\text{L}$ %4 (w/v) paraformaldehit ile 15 dakika fiksasyon yapıldıktan sonra tekrar üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücre zarlarını geçirgen hale getirmek için $250 \mu\text{L}$ %0,1 (v/v) Triton X-100 içeren PBS eklendi ve 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücreler yine üç kez 1X PBS ile yıkandı. Bloklama için, her kuyucuğa $200 \mu\text{L}$ %1 (w/v) BSA içeren PBS eklendi ve 45 dakika inkübe edildi. Ardından, ilgili kuyulara, $150 \mu\text{L}$, 1:100 oranında

%1 (w/v) BSA içeren PBS içinde seyreltilmiş HIF-1 α ve KLF7 primer antikoru eklendi ve hücreler +4°C'de 16 saat inkübe edildi. Primer antikoru uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Sekonder antikor olarak, her kuyucuğa 150 μ L, 1:100 oranında %1 (w/v) BSA içeren PBS içinde seyreltilmiş Alexa Fluor 488 anti-mouse sekonder antikoru eklendi ve 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Çekirdek boyaması için, 1 μ g/mL DAPI çözeltisi eklendi ve 1-5 dakika inkübe edildi. Hücreler tekrar üç kez 1X PBS ile yıkandı ve yuvarlak lameller üzerine antifade reaktif damlatılarak lamaların üzerine yerleştirildi. Lameller, saydam oje ile sabitlenip 24 saat kurutuldu. Hazırlanan preparatlar, floresan mikroskobu altında 40X ve 100X büyütmelemlerde incelenerek fotoğraflandı. Fotoğraflar, Image J yazılımı ile analiz edilip GraphPad yazılımı ile değerlendirilerek grafiksel olarak ifade edildi.

3.2.4 RNA Çalışmaları

RNA molekülleri, RNaz enzimleri (RNA parçalayan enzimler) tarafından hızla bozulabilir. Bu yüzden, RNA çalışmalarında RNaz kontaminasyonunu önlemek için %0,1 DEPC'li su kullanıldı ve çalışmalarda kullanılacak tamponlar %0,1 DEPC'li su ile hazırlandı. Hacimce %0,1 DEPC'li su hazırlamak için 1 L dH₂O içerisine 1 mL DEPC (dietil pirokarbonat) eklendi ve çözeltinin homojen olmasını sağlamak için birkaç dakika karıştırıldı. Daha sonra DEPC'nin sudaki tüm RNaz'ları inaktive etmesi için 37°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, DEPC'nin suyla reaksiyona girmesi sonucunda açığa çıkan CO₂ ve etanol gibi uçucu yan ürünleri uzaklaştırmak için çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.4.1 Hücreden RNA Eldesi

RNA çalışmaları, belirli bir genin ifade seviyesini doğrudan ölçer. Bir genin mRNA miktarı, genin hücredeki aktivitesinin ve transkripsiyon seviyesinin bir göstergesi olarak kabul edilir. KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde mRNA düzeyindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla transfeksiyonun 24. saatinde 6 kuyucuklu plakalara 5x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırılıp 37°C'de %5 CO₂ ortamında, inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 6. saatinde yüzeye tutunmuş hücreleri hipoksik koşullar için uyarmak amacıyla son konsantrasyon 300 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulaması yapıldı ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün

kuyulardan medyum uzaklaştırıldı ve Bölüm 3.2.3.3'te tarif edilen şekilde hücreler kaldırıldı ve hücre pelletleri elde edildi.

RNA izolasyonu için -80°C'de saklanan hücre pelletleri, buz üzerine alındıktan sonra tamamen çözünene kadar bekletildi. Hücre pelletlerinin tamamen çözülmesinin ardından, RNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uyarak total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon işlemi sırasında, kitin her adımı dikkatlice takip edilerek maksimum RNA verimi elde edilmeye çalışıldı. Özellikle liziz, bağlanma, yıkama ve elüsyon adımları, RNA'nın saf ve yüksek kaliteli olmasını sağlamak için titizlikle uygulandı. İzolasyon işleminin ardından elde edilen RNA örnekleri, bozulmayı önlemek ve daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.2.4.2 RNA'nın Miktar Tayini

RNA izolasyonu sonrasında, RNA örneklerinin saflığını ve konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla μ Drop™ Plate Cihazı kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda, 260 nm ve 280 nm'de ölçüm alındı. Ölçüm sonucunda RNA saflığı ve konsantrasyonu aşağıda verilen formüller ile belirlendi.

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

$$\text{RNA Miktarı (ng/ } \mu\text{L)} = A_{260} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm}) \times 40 \text{ ng/}\mu\text{L} \quad (3.4)$$

3.2.4.3 RNA Agaroz Jel Elektrofrez

RNA molekülleri hassastır ve bozulmaya yatkındır. Formaldehit-agaroz jel elektrofrez, RNA'nın bütünlüğünü koruyarak RNA moleküllerinin denatürasyonunu ve elektrofrez sırasında doğrusal bir şekilde hareket etmesini sağlar. Bu sayede, RNA'nın çeşitli uzunluklardaki moleküler ağırlıklarının net bir şekilde ayrılabilmesi, elde edilen total RNA'da herhangi bir bozulma olup olmadığını ve RNA'nın saflığını değerlendirmek amacıyla formaldehit agaroz jeli hazırlandı. Deney esnasında RNaz (Ribonükleaz) kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüm malzemeler sterilize edildi. Elektrofrez tankı ve aparatları, %0.5 (w/v) SDS çözeltisi ile yıkandı, ardından %0,1'lik DEPC'li su ile durulandı ve saf etanol ile işleme tabi tutularak etüvde kurutuldu. Cam malzemeler ise %0.1 DEPC'li suda 12 saat bekletilip otoklavlandı. Sterilizasyon işlemi sonrası jel hazırlamak için, 0.5 g agaroz 5 mL 10X FA tamponu içinde çözülüp, son hacim %0.1 DEPC'li su ile 50 mL'ye tamamlandı. Homojen bir çözeltinin elde edilmesi için karışım mikrodalgada

kaynatıldı. Çözelti 50°C'ye soğutulup, 900 µL %37 (12.3 M) formaldehit eklenerek karıştırıldı. KarışımA, 0.5 µg/mL Etidyum-Bromür (Et-Br) eklendi ve jel elektroforez kasetine döküldü. Jel polimerleştikten sonra, elektroforez tankı 0.25 M formaldehit içeren 1X FA tamponu ile dolduruldu. Örnekler, 2X örnek yükleme boyası ile karıştırılıp 70°C'de 10 dakika denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler buz üzerinde soğutulduktan sonra, elektroforez işlemi 90 voltluk bir gerilim altında 40 dakika boyunca gerçekleştirildi. Ayırışma tamamlandıktan sonra jel, UV ışık altında görüntülenerek bant profilleri fotoğraflandı.

Tablo 3.13: Formaldehit-agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların hazırlanışı.

Tampon	Bileşimi ve Hazırlanışı
10X FA -0.05 M NaAc -0.2 M MOPS -0.01 M EDTA (pH 7.0)	20 mL 0.5 M'lık EDTA (pH 8.0) çözeltisi, 41.9 g MOPS (MW: 209.26) ve 6.8 g NaAc (MW: 136.08) DEPC'li su içinde çözüldü. DEPC'li su ilavesi yapılarak hacim 1 L 'ye tamamlandı ve pH 7.0'ye ayarlandı. Oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda saklandı.
0.25 M FA içeren 1X FA	20 mL %37'lik (12.3 M) FA ve 100 mL 10X FA tamponu FA karıştırılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde %0.1'lik DEPC'li su ilavesi yapıldı.

3.2.4.4 cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi, spektrofotometrik ölçümler ve agaroz jel elektroforezi ile belirlendikten sonra, uygun nitelikteki RNA örnekleri Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonuna tabi tutuldu. Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Sentez sonrasında cDNA'lar, qRT-PCR'da kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler reaksiyon basamakları Tablo 3.14'te verilmiştir.

Tablo 3.14: RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve reaksiyon basamakları.

Bileşenler	Miktarları
Oligo-dT (5 µg/mL)	1 µL
RNA Kalıbı	1 µL
dH ₂ O	Son hacim 12.5 µL
65°C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı.	
10 mM dNTP mix	2 µL
Reverse Transkriptaz (200 U/ µL)	1 µL
Reaksiyon Tamponu (5x)	4 µL
RiboLock RNaz İnhibitör (20 U/ µL)	0.5 µL
Total hacim	20 µL
42°C'de 60 dakika ve 72°C'de 10 dakika inkübe edildi.	

3.2.4.5 cDNA Kalitesinin Kontrolü

Sentezlenen cDNA'ların kalitesini değerlendirmek için, Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile elde edilen cDNA'lar ve insan beta-2-mikroglobulin (H β -2-M) genine ait ekspresyon primerleri kullanılarak (bk. Tablo 3.15) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. PCR tamamlandıktan sonra, cDNA'lar agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edildi. Bu işlem, Bölüm 3.2.2.4'te detaylandırıldığı şekilde yapıldı. Jel, UV ışık altında görüntülenerek fotoğraflandı. Kullanılan reaksiyon koşulları ve bileşenler, Tablo 3.16 ve Tablo 3.17'de sırasıyla verilmiştir.

Tablo 3.15: H β -2-M genine ait primer dizileri.

Primer	Nükleotid Dizisi (5'- 3 ')
H β -2-M İleri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
H β -2-M Geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT

Tablo 3.16: H β -2-M PCR reaksiyon koşulları.

Bölüm	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	1	94 °C	2 dk
2	30	94 °C	1 dk
		58 °C	30 sn
		72 °C	30 sn
3	1	72 °C	10 dk

Tablo 3.17: H β -2-M PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
İleri Primer (100 pmol/ μ L)	1 μ L
Geri Primer (100 pmol/ μ L)	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L
Taq Tamponu (10X)	5 μ L
cDNA	1 μ L
dNTP karışım (10mM)	1 μ L
dH ₂ O	38.5 μ L
Taq Polimeraz (5 U/ μ L)	0.5 μ L
Total Hacim	50 μ L

3.2.4.6 Real Time PCR (qRT-PCR)

Çalışmada kullanılan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerini gerçek zamanlı olarak belirleyebilmek için Real Time PCR yapıldı. Öncelikle, sentezlenen her cDNA örneği için, her bir gen için en az üç teknik tekrar olacak şekilde deney planlaması yapıldı. Çalışmada MIR100HG, KLF7 ve HIF-1 α genlerinin ekspresyon primerleri kullanıldı. Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin normalize edilmesi amacıyla H β -2-M (Beta-2-Mikroglobulin) genine ait ekspresyon primerleri de kullanıldı. H β -2-M, hücre içindeki genel RNA seviyelerinin kontrolü için referans gen olarak görev yapar ve sonuçların karşılaştırılabilir olmasını sağlar. Real Time PCR reaksiyonları, Tablo 3.19’da belirtilen bileşenlerin karıştırılması ile hazırlandı. Bu karışım, her bir kuyucuğa, optik okumada parazitlere neden olmaması için hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek eklendi. Çalışmada elde edilen her bir cDNA örneğinden 1 μ L kullanılarak,

toplamda 1 µg cDNA'ya karşılık gelen miktar kullanıldı. Real Time PCR reaksiyonu, LightCycler® 480 cihazında gerçekleştirildi. Tablo 3.20'de belirtilen koşullar altında, cDNA örnekleri amplifiye edildi. Bu koşullar, denatürasyon, bağlanma ve uzama adımlarını içeren termal döngüleri kapsamaktadır.

Tablo 3.18: Çalışmada kullanılan ekspresyon primerleri.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'- 3 ')
Hβ-2-M İleri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
Hβ-2-M Geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT
HIF-1α İleri	CCACCTATGACCTGCTTGGT
HIF-1α Geri	TGTCCTGTGGACTTGTCC
MIR100HG İleri	AACTTGGCTTCCTCGCTTCT
MIR100HG Geri	ACATCTAGATTTTCATGAGCCA
KLF7 İleri	TGGCTAGTTATAGTATATATTCCA
KLF7 Geri	AGAGAGCAAGATGTCCACTG

Tablo 3.19: Real Time PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar (µL)
İleri Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Geri Primer (10 pmol/µL)	1 µL
Master Mix Green	6,25 µL
cDNA	1 µL
dH ₂ O	4,25 µL
Toplam hacim	12.5 µL

Tablo 3.20: Real Time PCR reaksiyon koşulları.

Bölüm	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon	1	95 °C	10 dk.
		95 °C	30 s.
Amplifikasyon	40	55 °C	30 s.
		72 °C	30 s.
Uzama	1	95 °C	5 s.
		65 °C	1 dk.
Soğutma	1	40°C	30 s.

Elde edilen sonuçlar Livak Metoduna göre analiz edildi. Her gen için en az üç tekrarla çalışılan Ct değerlerinin ortalaması alındı ve normalizatör gen olan H β -2-M'in Ct ortalamasından çıkarıldı. Sonuçlar, 2 tabanında logaritmik olarak hesaplandı. Kontrol grubu sonuçları "1" birim olarak kabul edildi ve deney grupları bu referansa göre değerlendirildi. Verilerin kat değerleri, GraphPad programında grafik haline getirildi.

3.2.5 Kromatin İmmüno Presipitasyonu (ChIP) Deneyi

Kromatin İmmünopresipitasyon (ChIP) deneyi, DNA ile birlikte hangi proteinlerin (genellikle transkripsiyon faktörleri veya histonlar gibi) ilişkili olduğunu belirlemek için kullanılan güçlü bir moleküler biyoloji tekniğidir. ChIP, protein-DNA etkileşimlerini in vivo olarak, yani hücrenin doğal durumundayken analiz etmeye olanak tanır. ChIP deneyi aşağıda belirtilen temel adımları içerir;

1. Hep3B hücrelerinin fikse edilmesi: Formaldehit, hücrelerdeki proteinlerin DNA'ya bağlı hallerini korumak için kullanılır. Bu kimyasal, protein-DNA etkileşimlerini stabilize etmek amacıyla çapraz bağlar (cross-link) oluşturur. Bu çapraz bağlar, proteinlerin ve DNA'nın birbirine sıkı sıkıya bağlı kalmasını sağlayarak, sonraki analiz aşamalarında bu etkileşimlerin korunmasını ve incelenmesini mümkün kılar.

2. Kromatin parçalanması: Fikse edilmiş hücreler, sonikasyon yöntemi kullanılarak kromatin parçalarına ayrılır. Bu yöntemde, hücreler yüksek frekanslı ses dalgalarına maruz bırakılır. Bu ses dalgaları, hücre zarlarını ve nükleer zarları parçalayarak DNA'nın serbest kalmasını sağlar. Aynı zamanda, sonikasyon, DNA'yı daha küçük fargmentler halinde parçalar. Bu küçük DNA parçaları, proteinlerle olan etkileşimlerinin daha ayrıntılı incelenebilmesine olanak tanır.
3. Antikor ile immünopresipitasyon: KLF7 proteinine bağlı DNA parçalarını seçici olarak izole edebilmek için 2 µg KLF7 antikorunu kullanılmıştır. Bu antikorlar, kromatinle etkileşime girerek hedef protein-DNA komplekslerine bağlanır. Bu bağlanma işlemi, spesifik protein-DNA komplekslerinin diğer kromatin bileşenlerinden ayrılmasını ve izole edilmesini mümkün kılar.
4. Çapraz Bağların Çözülmesi ve DNA Eldesi: İmmünopresipitasyon işleminin ardından, komplekslerin içindeki protein-DNA çapraz bağlarını çözmek için hem ısı hem de enzimatik sindirim yöntemleri uygulanır. İlk aşamada, numuneler belirli bir süre ve sıcaklıkta inkübe edilerek protein-DNA kompleksleri arasındaki çapraz bağlar gevşetilir ve bu bağlar kısmen kırılır. Bu işlem, ısı uygulamasıyla proteinlerin ve DNA'nın daha sonra ayrışmasını kolaylaştırır. Isı uygulamasının ardından, numunelere proteaz enzimleri eklenir. Proteazlar, proteinleri sindirerek onları DNA'dan ayırır. Bu enzimatik sindirim süreci, proteinlerin peptid bağlarını parçalayarak serbest DNA moleküllerinin elde edilmesini sağlar. Böylece, proteinlerden tamamen arındırılmış DNA izole edilir. Bu izolasyon adımı, DNA'nın saf ve analiz için uygun bir formda elde edilmesini sağlar.
5. Saflaştırılan DNA'nın Analizi: İzole edilen DNA örnekleri, Bölüm 3.2.4.6'da belirtilen şekilde qRT-PCR ile detaylı olarak incelendi. Analiz sonuçları, GraphPad yazılımı kullanılarak görselleştirildi ve grafiksel olarak ifade edildi.

ChIP protokolünün adımları EZChIP™ Milipore kitinin önerdiği prosedüre uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.2.5.1 Hücrelerin Fiksasyonu ve Kromatin Parçalanması

Hep3B hücreleri, 100 mm'lik bir kültür kabında 10 mL büyüme ortamı içinde %80-90 doluluk oranına ulaştığında, Bölüm 3.2.3.5'te açıklanan yöntemle TurboFect™ transfeksiyon reaktifi kullanılarak 10 µg KLF7 plazmidini ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra ChIP protokolü başlatıldı. Hücre medyumuna 366,6 µL %37 formaldehit eklendi ve hücreler oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi. Ardından, 1.3 mL 10X Glisin eklenerek formaldehit uzaklaştırıldı ve hücreler 5 dakika inkübe edildi. Hücreler buz üzerine alındı ve medyum pipetle uzaklaştırıldı. Hücreler üç kez 10 mL 1X PBS ile yıkandı. Sonrasında, hücreleri yüzeyden kazımak için 2 mL 1X PBS içine 6.5 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II eklendi. Hücreler kazınarak soğutulmuş ependorf tüplerine aktarıldı ve 4°C'de 700 g'de 8 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. Santrifüjleme sırasında, 3.3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli II, 666 µL SDS Lizis Tamponu içine eklendi ve lizis tamponu hazırlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücre pelletleri 666 µL SDS Lizis Tamponu içinde çözüldü ve karışım santrifüj tüplerine paylaştırıldı. Çapraz bağlı DNA'yı parçalamak için hücre lizatları ultrasonik sonikasyon cihazında beş kez 10 saniye sonikasyon ve 10 saniye buzda bekletme ile işleme tabi tutuldu. Sonikasyon sonrası, lizatlar 4°C'de 13,500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant 100 µL'lik alikotlar halinde santrifüj tüplerine dağıtıldı. Bu aşamadan sonra santrifüj tüplerine paylaştırılan hücre lizatları en fazla 2 ay olacak şekilde -80°C'de 2 aya kadar saklanabilmektedir.

3.2.5.2 Antikor ile İmmünopresipitasyon

Her immünopresipitasyon (IP) örneğine 3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli II ve 600 µL Dilüsyon Tamponu eklendi ve karışım buzda tutuldu. 600 µL Dilüsyon Tamponu, 100 µL hücre lizatı üzerine eklenerek toplam 700 µL hacim elde edildi. IP örnekleri, KLF7 antikorunu (1 µg), negatif kontrol olarak Normal Mouse-IgG (1 µg) ve pozitif kontrol olarak Anti-RNA Polimeraz II (1 µg) içerecek şekilde hazırlandı. Antikor eklenmeden önce, non-spesifik proteinleri uzaklaştırmak için her IP örneğine 42 µL Protein G Agaroz eklendi ve 4°C'de 1 saat rotasyona tabi tutuldu. İnkübasyon tamamlandığında, numuneler 5000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Antikor eklenmemiş süpernatanttan 7 µL (%10 input) ayrıldı. Yaklaşık 700 µL süpernatant örneklerine uygun antikorlar eklendi ve gece boyunca 4°C'de rotasyona bırakıldı. Sonrasında, antijen/antikor/DNA kompleksinin bağlanması için 42 µL Protein G Agaroz eklendi

ve 1 saat 4°C'de rotasyona tabi tutuldu. Numuneler tekrar 5000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin kompleksi içeren örnekler, 700 µL soğuk tamponda süspansiyon haline getirilip yıkandı. Yıkama adımları Tablo 3.22'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

3.2.5.3 Çapraz Bağların Çözülmesi

Her bir IP tüpü için, 14 µL 1 M NaHCO₃, 119 µL steril distile su ve 7 µL %20 SDS ile Elüsyon Tamponu hazırlandı. Bölüm 3.2.5.2'de alınan input tüplerine 140 µL Elüsyon Tamponu eklendi ve oda sıcaklığında bekletildi. 70 µL Elüsyon Tamponu, antikor/agaroz kompleksi içeren tüplere eklenip hafifçe çalkalandı ve 15 dakika oda sıcaklığına inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından tüpler 5000 g'de 1 dakika santrifüj edilip süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Bu işlem tekrar edilerek agaroz pelletleri toplandı ve +4°C'de saklandı.

IP ve elüsyon tamponu eklenmiş %10 input tüplerine 5.6 µL 5 M NaCl ilave edilerek DNA'nın çapraz bağlarını çözmek için gece boyunca 65°C'de bekletildi. Bu işlem, DNA ve proteinler arasındaki bağları kırarak, DNA'nın serbest hale gelmesini sağladı. Ardından, DNA ve RNA hibritlerini ve serbest RNA moleküllerini parçalamak için her tüpe 0.7 µL RNase eklendi ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. RNase A'yı inaktifleştirmek için her bir tüpe 0.7 µL Proteinaz K, 2.8 µL 0.5 M EDTA ve 5.6 µL 1 M Tris-HCl eklenerek, karışım 45°C'de ısıtılmış su banyosunda 1-2 saat bekletildi. Bu adımlar, proteinlerin tamamen sindirilmesini ve saf DNA'nın elde edilmesini sağladı.

3.2.5.4 Saflaştırılmış DNA Eldesi

Her bir tüpte bulunan 140 µL DNA numunesine 700 µL Bind Reagent "A" eklenerek karıştırıldı ve DNA presipitasyonu gözlemlendi. Karışımdan 600 µL alınarak toplama tüpündeki kolona aktarıldı ve 3.500 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Kolon çıkarıldı, tüpteki süzöntü atıldı ve kolon tekrar yerine yerleştirildi. Aynı işlem kalan 600 µL için tekrarlandı. Ardından, kolona Yıkama Reaktif "B" den 350 µL eklendi ve 13.500 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki süzöntü dökülerek, kolon tekrar tüpe yerleştirildi ve 13.500 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Kolon temiz bir toplama tüpüne alındı, 35 µL Elüsyon Tamponu "C" eklendi ve 5 dakika oda

sıcaklığında bekletildi. Daha sonra, 13.500 g'de 30 saniye santrifüj yapılarak saflaştırılmış DNA elde edildi. Tablo 3.21'de verilen primerler ve Bölüm 3.2.4.6'da açıklanan koşullar doğrultusunda Real Time PCR yapılarak saflaştırılmış DNA analiz edildi.

Tablo 3.21: ChIP qRT-PCR'ında kullanılan MIR100HG ChIP primerleri ve dizileri.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Lokasyon	Ürün Büyüklüğü
ChIP İLERİ 1	CAACTCACACAGAGGCTGTTCTT	+51/-155	206 bç
ChIP GERİ 1	AACTTCTGCGCTTCCAAAATTCC		
ChIP İLERİ 2	CAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGA	-260/-465	205 bç
ChIP GERİ 2	CTGCATGGCTTACGCGCTGCAT		
ChIP İLERİ 3	GATAGGTATCGAGTCTAGATCTG	-748/-941	193 bç
ChIP GERİ 3	ACGTATGGTTCAGTATAGAGCTG		
ChIP İLERİ 4	CAGGAGAAAACCTGGTCATGATGT	-1046/-1229	183 bç
ChIP GERİ 4	ATGGCAGAATGAAATAATACGTCA		

4. BULGULAR

4.1 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlama Çalışmaları

4.1.1 MIR100HG Genine Ait Promotor Bölgesinin Biyoinformatik Analizi

İnsan MIR100HG geni, 11. kromozomun uzun (q) kolunda lokalize olan bir lncRNA'dır ve NCBI veri tabanında kaydedilmiş 23 varyantı bulunmaktadır. MIR100HG genine ait promotor bölgesinin analizi Bölüm 3.2.2.1'de bahsedildiği üzere <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi kullanılarak NR_024430.2 kodlu diğer 22 varyantı da içerisinde barındıran varyant 1 üzerinden gerçekleştirildi. MIR100HG geni uzun kodlanmayan RNA olduğu için başlama kodunu (ATG) içermemektedir bu amaçla promotor bölgesi, 1. ekzonun ön kısmından yaklaşık olarak 1500 bp geri gidilerek seçildi. İlgili gen bölgesinin restriksiyon haritalaması yapılarak, pGEMT-Easy vektörü kesmeyen ancak pMetLuc vektörün kesim bölgeleri içerisinde bulunan enzimlerin seçilmesine dikkat edildi ve çalışmada kullanılacak restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII enzimleri olarak belirlendi. Klonlanmak istenilen konstraktların vektörün içerisine 5'-3' yönde düz bir şekilde girmesi amacıyla pMetLuc vektör haritasında klonlama bölgesi içerisinde üst kısımda yer alan XhoI enzimi gen dizisi, ileri primerlerin başına, alt kısımda yer HindIII enzimi gen dizisi ise ortak geri primerin başına eklendi. Ortak geri primerin 1. ekzon içerisinden tasarlanmasına dikkat edildi. Belirlenen promotor bölgesinden 5 adet ileri primer ve 1 adet ortak geri primer tasarlandı. Tasarlanan primerlerin spesifikliğini ve klonlama çalışmalarında kullanılabilirliğini test amacıyla Bölüm 3.2.2.1'de bahsedildiği üzere primerlerin saç tokası, %GC oranı ve NCBI BLAST analizleri yapıldı. Şekil 4.1'de MIR100HG geni varyant 1 içerisinden seçilen primerler dizi üzerinde gösterilmiştir. Tasarlanan primerlerin 5' uçlarına ilgili restriksiyon enzim dizisi eklenerek Tablo 4.1'de verilmiştir.

1244 bp (-1013/+231) ve 628 bp (-397/+231) promotor konstraktlarının klonlama çalışmaları Aylin TÜRKOĞLU, 419 bp (-188/+231) promotor konstraktının klonlama çalışmaları ise Şevin AVŞAR KOÇ tarafından yapıldı. Bu tez çalışması kapsamında; MIR100HG genine ait 909 bp (-678/+231) ve 1046 bp (-815/+231) promotor konstraktlarının öncelikle pGEMT-Easy vektöre T:A klonlanması ve sonrasında da pMetLuc vektöre alt klonlanması yapıldı.

CGTATGTCTAGACTATGTCTGTCTCTGGAGAAAAGTGGGAGTGACACTCACTGATCATCCTCA
 GTACAGGGCATTGAGCCACACCATTAAAGGAGTATTGATTGGCTCCCCCTCTGTGAGAACAGTAT
 GCTGGGTGTGACACAGACAGAGAGACCCAGACCGAGTCTGCAGGAGAAAAGTGGTATGATGTC
 AAACGTGGAGGAAACAACCAATAGGCCTAGTGGGATGCTCTCTATTTATCAGCACAGTTACTGG
 AATCCAAACAAAGAACTTTCCAGAATGACAACCGTGTCTGCCACTGAACTGTAGGTGAGCAT
 GTGGTTTGTGACGTATTATTTTCATTCTGCCATCATACCAGTTGTGAGATCTTGCTTGTGAAACT
 1244 bp -1013/+231
AAGTTAACTCCATTTTATGGACAAAGAACTGAGGTGAGAGTAGTTAATTGAGCATAAAAATAAG
 TAGCAGAGATAGGTATCGAGTCTAGATCTGTTGAAGCCTAGAGCTTGTTTTGCCACGTATATT
 GTCTCATTGACTCTTCCAGCAGTCTGGCAAGGGAGTCTTAATTTAGCAAAAACAAATCTCAG
 1048 bp -815/+231
ACCAATTTCCACTGGACTCTATTTAAACTCCACTACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACT
 GAACCATACGTGAAGATTGAACTTGGAAATAAATAATAAAGCTCCATTTGTTAAAAACACAGC
 909 bp -678/+231
TACTTCATGAGCTGTTCTCCATAAGCAACATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAAA
 ACAATAATAACCGTAAGCAAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAT
 GACAGTGATACTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAAAGATACT
 ATTTGGACATACAGTCTGTTTTCACTAAGGTGGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGA
 828 bp -397/+231
CCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACCATCAAGTCTTTTACT
 CAGAGACTGGAGACCACGCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTGAACCTCCGACTTTATGATA
 CGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCTTATTACTCACAC
 CACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCACTGAGGACTGCGTCTCCCGGAAGTATTTCCCT
 419 bp -188/+231
GAGAAATTGCAGAGGACCTCAGTCTGCAACTCACACAGAGGCTGTTCTTCGTGGCCGGAACCG
 GACCCACGCCCCTCTGGGGCACATCCCTGAGTGCAGCACTCTTCTCTCGCCCTCCTCCCACCC
 AGGCACCGTCCCAACTGGGCACTGCCTTGCTATGCCCCACATCTCCACAAGGGGGGAGCCGCC
 ↪ 1. Ekzon Başlangıcı
 GGAGGGCAGCTGGGGCTGCGGAATTTTGAAGCGCAGAAGTTTTCTCCTCCTGTCTGTAAGT
 GTTTCACTCACTCAACTGAGAGATTTCTTTGTTGCAATGATGGGTCTAAGATAACACTTCTG
 GAGGCTGCAGGCGAGAAACACAGCTGATATCATCTTTTATTGTGTGTTGTTATTTGCCTAGCAT
 Ortak Geri Primer ↪ +231
TATAAATTAAGGAGGAATAGTAACAAAGAGCTTGAAGACATGCACAGCTCACAGGCCCGGGTG
 GAGGCTGGCGACATCAGACAGACAGAACCAAGACATCTGAGGGGCAACCAGGAGGTGCGTGTGG
 CTGCAGAGCACACAG

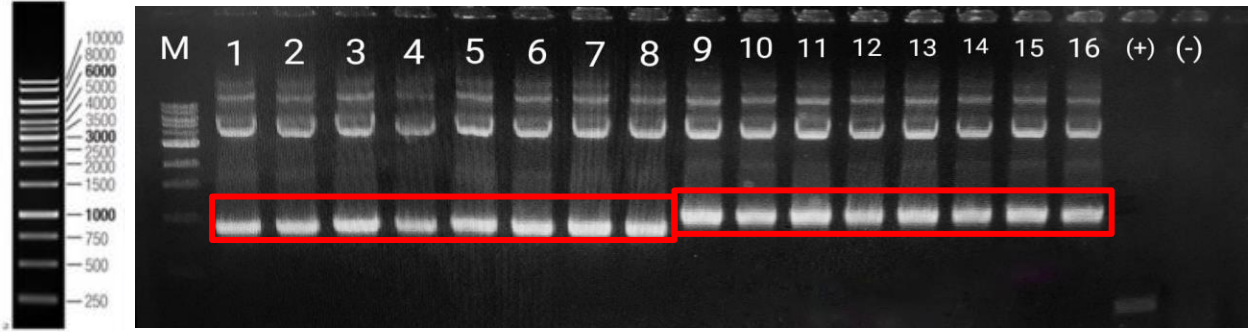
Şekil 4.1: MIR100HG promotor bölgesi içerisinde tasarlanan primerlerin promotor üzerinde gösterimi.

Tablo 4.1: MIR100HG promotor primerleri.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5' - 3 ')	Ürün Büyüklüğü ve Lokasyon
MIR100HG İleri 1	ACTCGAGAAGTTAACTCCATTTTATGGAC	1244 bç -1013/+231
MIR100HG İleri 2	ACTCGAGTTCCACTGGACTCTATTAAC	1046 bç -815/+231
MIR100HG İleri 3	ACTCGAGTTCTCCATAAGCAACATAGAC	909 bç -678/+231
MIR100HG İleri 4	ACTCGAGTTTCCCTGAGAAATTGCAGA	628 bç -397/+231
MIR100HG İleri 5	ACTCGAGTTTCCCTGAGAAATTGCAGA	419 bç -188 /+231
MIR100HG Geri	AAAGCTTCTTTGTTACTATTCCTCCTTAAT	

4.1.2 909 bç (-678/+231) ve 1046 bç (-815/+231) Promotor Parçalarının T:A Stratejisi ile pGEMT-Easy Vektöre Klonlanması

MIR100HG genine ait 909 bç ve 1046 bç promotor bölgelerini çoğaltmak amacıyla Bölüm 3.2.2.3'te belirtilen şekilde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kuruldu. PCR esnasında çoğaltılması istenilen bölgeler için kalıp olarak Genomik DNA kullanıldı ancak tekrarlı denemelere rağmen reaksiyon sonucunda amplifikasyon elde edilemedi. Bu sebeple 909 bç ve 1046 bç promotor bölgelerini çoğaltmak amacıyla Genomik DNA yerine, pGEMT-Easy vektöre klonlanmış 1244 bç promotor parçasına ait plazmit DNA (pGEMT-Easy-1244 bç) kalıp olarak kullanıldı. Konsantrasyonu 250 ng/ μ L olan pGEMT-Easy-1244 bç plazmit DNA'dan 1 μ L alındı ve Tablo 3.8'de verilen PCR bileşenleri ile Tablo 3.9'da verilen reaksiyon koşullarında PCR gerçekleştirildi. Şekil 4.2'de 909 bç ve 1046 bç promotor bölgelerini çoğaltmak amacıyla kurulan PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir.



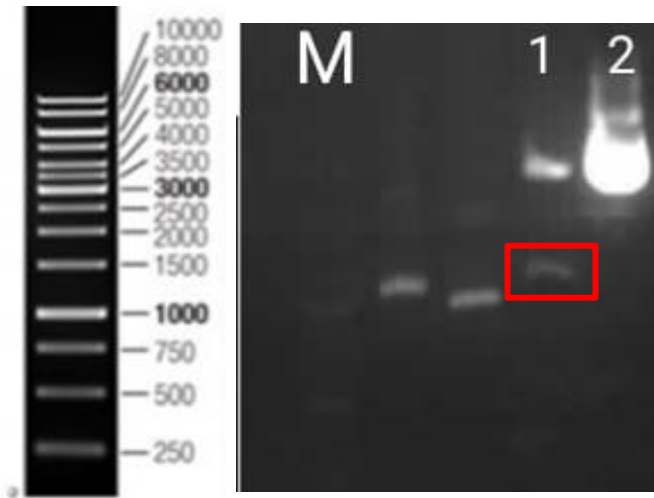
Şekil 4.2: M: 1 kb Marker, 1-8: MIR100HG 909 bç, 9-16: 1046 bç promotor parçalarının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü.

PCR ile çoğaltılan 909 bç ve 1046 bç promotor bölgeleri (bk. Şekil 4.2) agaroz jel elektroforezi sonrasında Bölüm 3.2.2.4'te tarif edilen şekilde jelden saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında elde edilen 909 bç ve 1046 bç promotor bölgelerine ait DNA fragmentleri ve pGEMT-Easy vektör ile Bölüm 3.2.2.7'de anlatılan şekilde ligasyon reaksiyonu yapıldı. Ligasyon ürünü Bölüm 3.2.2.8'de anlatılan şekilde DH5 α kompetent hücrelerine transforme edildi. pGEM-T Easy vektör ile kurulan ligasyon ürünlerinin transformasyonu sonrasında, Mavi-Beyaz koloni seçimi yapabilmek amacıyla, oda ısısına gelmiş Ampisilinli petrilerin üzerine sırasıyla, 40 μ L 40 mg/mL X-GAL ve 40 μ L 100 mg/mL IPTG eklenerek öze ile petri yüzeyine yayıldı. X-GAL laktoz analogudur ve IPTG β -galaktozidaz enziminin uyarıcısıdır. Klonlanmak istenilen promotor parçaları, pGEM-T Easy vektörün klonlama bölgesinde bulunan LacZ geninin içerisine girmediyse β -galaktozidaz IPTG uyarısı ile X-GAL'i parçalar ve rekombinant olmayan koloniler mavi renk verir. Eğer klonlanmak istenilen promotor parçaları, LacZ geni içerisine girdiyse LacZ tarafından β -galaktozidaz salgılanamaz ve rekombinant koloniler beyaz renkte görünür. Bu amaçla transformasyon sonrasında petri yüzeyinden beyaz koloni seçimi yapıldı ve 100 μ g/mL ampisilin eklenmiş 10 mL LB besiyerine ekimi yapılarak 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında Bölüm 3.2.2.11'de anlatılan şekilde beyaz kolonilerden elde edilen ön kültürlerden küçük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit izolasyonu sonrasında seçilen beyaz kolonilerin rekombinant olup olmadığını doğrulamak amacıyla Bölüm 3.2.2.10'da anlatılan şekilde XhoI/HindIII enzimleri restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı ve kesim ürünleri ile Bölüm 3.2.2.4'te tarif edilen şekilde agaroz jel elektroforezi

yapıldı. Şekil 4.3'te 909 bç ve Şekil 4.4'te 1046 bç promotor parçalarının pGEM-T Easy vektöre klonlanmasının restriksiyon endonükleazlarla (XhoI/HindIII) kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.3: M: 1 kb Marker, 1: 909 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 909 bç 1. koloniye ait kesilmemiş plazmit, 3: 909 bç 2. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 909 bç 2. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü.



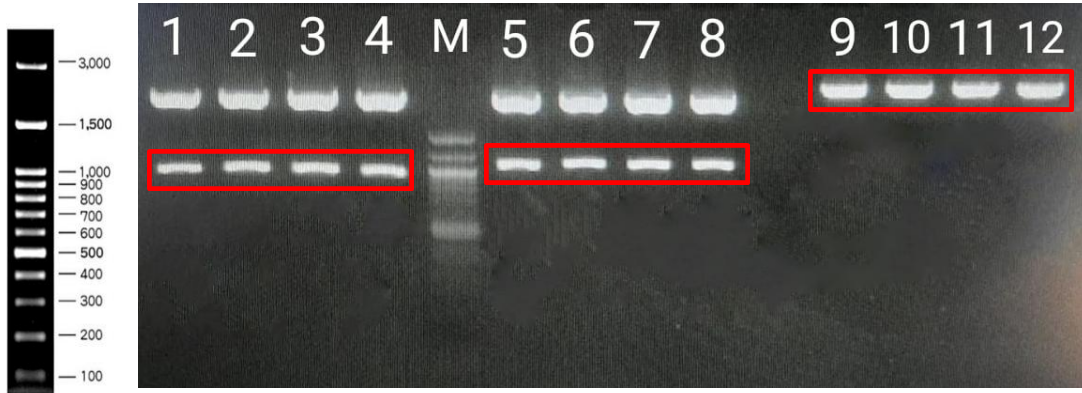
Şekil 4.4: M: 1 kb Marker, 1: 1046 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 1046 bç 1. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü.

MIR100HG genine ait 909 bç (-678/+231) (bk. Şekil 4.3) ve 1046 bç (-815/+231) (bk. Şekil 4.4) promotor parçalarının pGEM-T Easy vektöre klonlanması restriksiyon endonükleazlar

(XhoI/HindIII) ile kesimleri sonucunda doğrulanmıştır. Rekombinant olduğu doğrulanan kolonilerden Bölüm 3.2.2.9’da belirtilen şekilde gliserol stok hazırlandı ve -80°C’de muhafaza edildi.

4.1.3 909 bç (-678/+231) ve 1046 bç (-815/+231) Promotor Parçalarının pMetLuc-reporter Vektöre Alt Klonlanması

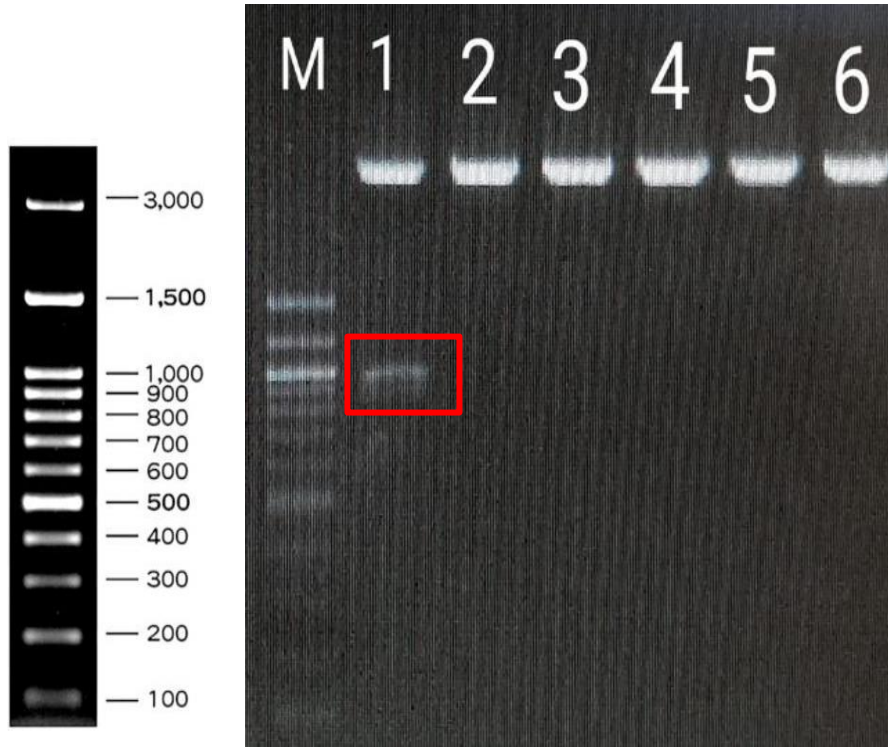
pGEM-T Easy vektöre klonlanan 909 bç ve 1046 bç promotor parçalarını pGEM-T Easy vektörün içerisinde çıkararak ve pMetLuc vektörü lineer hale getirmek için Bölüm 3.2.2.10’da anlatılan şekilde restriksiyon endonükleazlarla (XhoI/HindIII) kesim reaksiyonu kuruldu. Bölüm 3.2.2.4’te tarif edilen şekilde agaroz jel elektroforezi yapıldı. Şekil 4.5’te 909 bç, 1046 bç promotor parçalarının ve alt klonlama yapmak amacıyla pMetLuc vektöre ait restriksiyon endonükleaz (XhoI/HindIII) kesimi agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



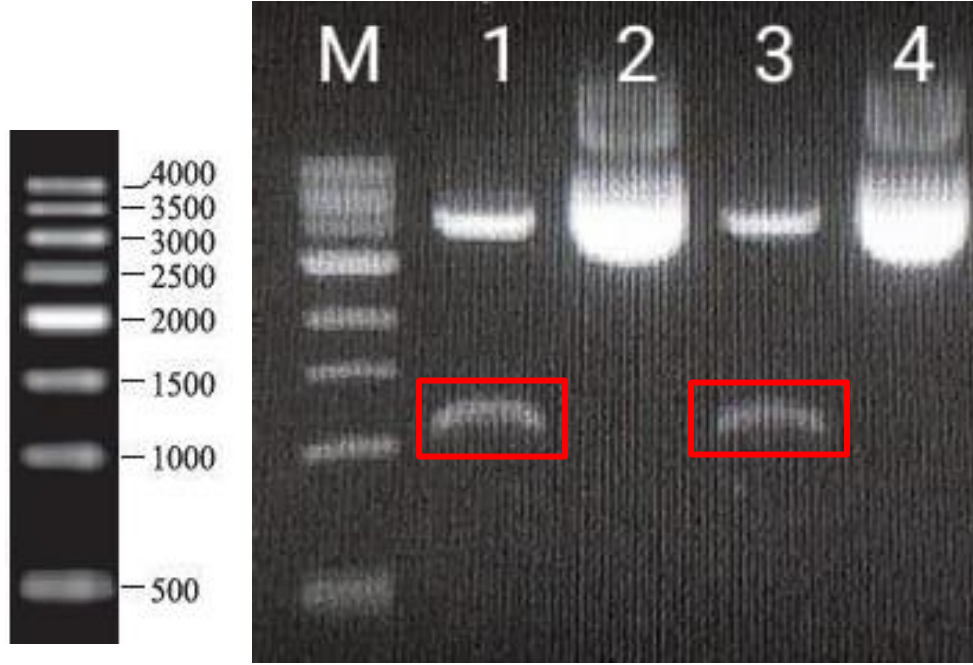
Şekil 4.5: M: 100 bç Marker **1,2,3,4:** MIR100HG 909 bç, **5,6,7,8:** 1046 bç promotor parçalarının ve **9, 10, 11, 12:** pMetLuc vektörün XhoI/HindIII restriksiyon endonükleaz kesim jel görüntüsü.

Restriksiyon endonükleazlarla (XhoI/HindIII) kesimi yapılan 909 bç ve 1046 bç promotor parçalarına ve pMetLuc vektöre ait bantlar Bölüm 3.2.2.4’te tarif edilen şekilde jelden saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında elde edilen 909 bç ve 1046 bç promotor bölgelerine ait DNA fragmentleri ve pMetLuc vektör ile Bölüm 3.2.2.7’de anlatılan şekilde ligasyon reaksiyonu yapıldı. Ligasyon ürünü Bölüm 3.2.2.8’de anlatılan şekilde DH5 α kompetent hücrelerine transforme edildi. pMetLuc-reporter vektör ile kurulan ligasyon ürünlerinin transformasyonu sonrasında, petri yüzeyinden beyaz koloni seçimi yapıldı ve 50 μ g/mL kanamisin eklenmiş 10

mL LB besiyerine ekimi yapılarak 37°C’de çalkalamalı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon Bölüm 3.2.2.11’de anlatılan şekilde beyaz kolonilerden elde edilen ön kültürlerden küçük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit izolasyonu sonrasında seçilen beyaz kolonilerin rekombinant olup olmadığını doğrulamak amacıyla Bölüm 3.2.2.10’da anlatılan şekilde XhoI/HindIII enzimleri restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı ve kesim ürünleri ile Bölüm 3.2.2.4’te tarif edilen şekilde agaroz jel elektroforezi yapıldı. Şekil 4.6’da 909 bç ve Şekil 4.7’de 1046 bç promotor parçalarının pMetLuc vektöre alt klonlanmasının restriksiyon endonükleazlarla (XhoI/HindIII) kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.6: M: 100 bç Marker, 1: 909 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 909 bç 2. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 3: 909 bç 3. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 909 bç 4. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 5: 909 bç 5. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 6: 909 bç 6. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi jel görüntüsü.

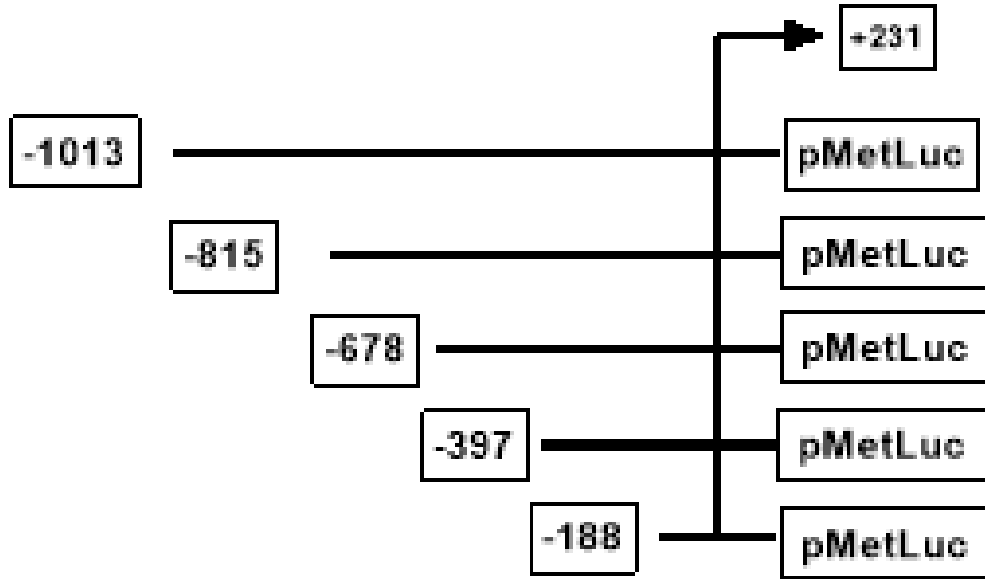


Şekil 4.7: M: 500 bç Marker, 1: 1046 bç 1. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 2: 1046 bç 1. koloniye ait kesilmemiş plazmit, 3. 1046 bç 2. koloni XhoI/HindIII kontrol kesimi, 4: 1046 bç 2. koloniye ait kesilmemiş plazmit jel görüntüsü.

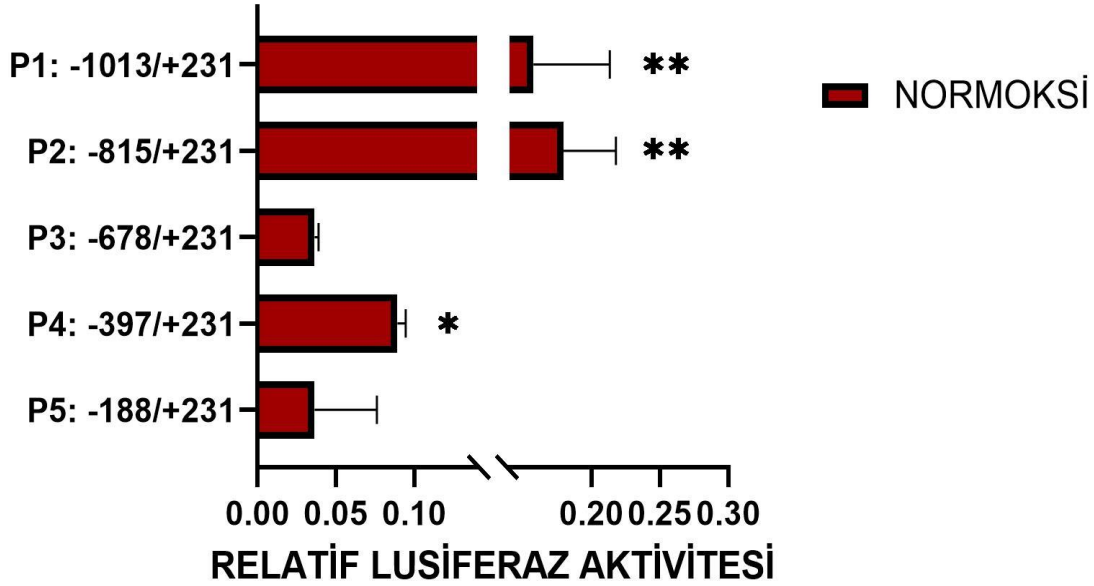
MIR100HG genine ait 909 bç (-678/+231) (bk. Şekil 4.6) ve 1046 bç (-815/+231) (bk. Şekil 4.7) promotor parçalarının pMetLuc vektöre alt klonlanması çalışmalarında her iki konstrakt için de taranan koloniler arasında restriksiyon endonükleazlar (XhoI/HindIII) ile kesimleri sonucunda rekombinant koloniler tespit edilmiştir. Tespit edilen kolonilerin rekombinant koloniler olduğunun doğrulanması için plazmitler BM Labosis firmasına dizi analizine gönderildi. Dizilemeden gelen sonuçlar Bioedit programında hizalandı ve MIR100HG dizisiyle NCBI Blast yapılarak 909 bç (-678/+231) ve 1046 bç (-815/+231) promotor parçalarının pMetLuc vektöre alt klonlanması doğrulandı (bk. EK A ve EK B). Rekombinant olduğu doğrulanan kolonilerden Bölüm 3.2.2.9’da belirtilen şekilde gliserol stok hazırlandı ve -80°C’de muhafaza edildi. Hazırlanan stoklardan geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanmak amacıyla Bölüm 3.2.2.12’de tarif edilen şekilde orta ölçekli plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmitler restriksiyon endonükelaz kesimi ile tekrardan doğrulandı ve -20°C’de muhafaza edildi.

4.1.4 MIR100HG Genine Ait Promotor Parçalarının Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyonu

MIR100HG genine ait 1244 bç (-1013/+231), 1046 bç (-815/+231), 909 bç (-678/+231), 628 bç (-397/+231) ve 419 bç (-188/+231) promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.3.5'te belirtilen şekilde Kalsiyum-Fosfat yöntemi ile geçici transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyonun 48. ve 72. Saatlerinde kuyulardan 100'er µL medyum çekilerek endodorflara alındı ve transfeksiyon etkinliğini belirleyebilmek amacıyla Bölüm 3.2.3.6'da belirtilen şekilde luminometrede Lusiferaz-Seap ölçümleri yapıldı. Her bir örnek için elde edilen Lusiferaz aktivitesi verileri Seap aktivitesi verilerine oranlanarak (Luc/SEAP) relatif Lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi sağlandı. Sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi ve MIR100HG promotor kontrastraktlarına ait Luc/SEAP değerleri analiz edildiğinde 628 bç, 1046 bç ve 1244 bç promotor parçalarının bazal aktivitelerinde anlamlı bir artış olduğu tespit edildi (bk. Şekil 4.9).



Şekil 4.8: pMetLuc vektörü içerisine klonlanmış MIR100HG promotor konstraktlarının şematik gösterimi.

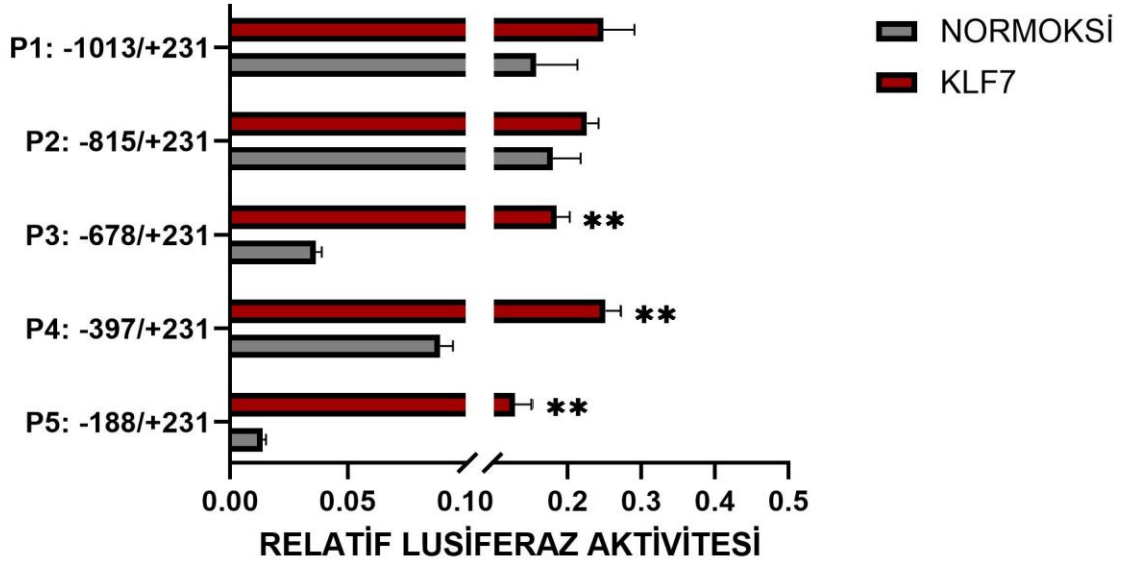


Şekil 4.9: MIR100HG promotor kontrastraktlarına (P1, P2, P3, P4 ve P5) ait Luc/SEAP değerleri (p değeri $< 0,05$ (*) ve $< 0,01$ (**)) ile gösterildi.

4.1.5 MIR100HG Genine Ait Promotor Parçalarının KLF7 Transkripsiyon Faktörü ile Ko-Transfeksiyonu

KLF7 transkripsiyon faktörü pEGFP-C1 ekspresyon vektörüne Şevin AVŞAR KOÇ tarafından klonlanmıştır. KLF7 transkripsiyon faktörünün, MIR100HG genine ait 1244 bç (-1013/+231), 1046 bç (-815/+231), 909 bç (-678/+231), 628 bç (-397/+231) ve 419 bç (-188/+231) promotor parçalarına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla öncelikle Bölüm 3.2.3.5'te belirtilen şekilde Kalsiyum-Fosfat yöntemi ile ekspresyon vektörü ile birlikte ko-transfeksiyonu gerçekleştirildi ve promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini belirlemek amacıyla Transfeksiyonun 48. ve 72. Saatlerinde kuyulardan 100'er μ L medyum çekilerek ependorflara alındı ve transfeksiyon etkinliğini belirleyebilmek amacıyla Bölüm 3.2.3.6'da belirtilen şekilde luminometrede Lusiferaz-Seap ölçümleri yapıldı. Her bir örnek için elde edilen Lusiferaz aktivitesi verileri Seap aktivitesi verilerine oranlanarak (Luc/SEAP) relatif Lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi sağlandı. Sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.10). Normoksik koşullarda MIR100HG promotor parçalarının bazal aktiviteleri, KLF7 transkripsiyon faktörüne ait transkripsiyonel aktivite ile karşılaştırıldı ve KLF7 transkripsiyon faktörünün transfekte

edilmesinin MIR100HG 909 bç (-678/+231), 628 bç (-397/+231) ve 419 bç (-188/+231) promotor parçalarının bazal aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi.



Şekil 4.10: KLF7 transkripsiyon faktörünün, MIR100HG promotor kontrastraktlarının (P1, P2, P3, P4 ve P5) transkripsiyonel aktivitesi üzerine etkisi (p değeri $< 0,01(**)$ ile gösterildi).

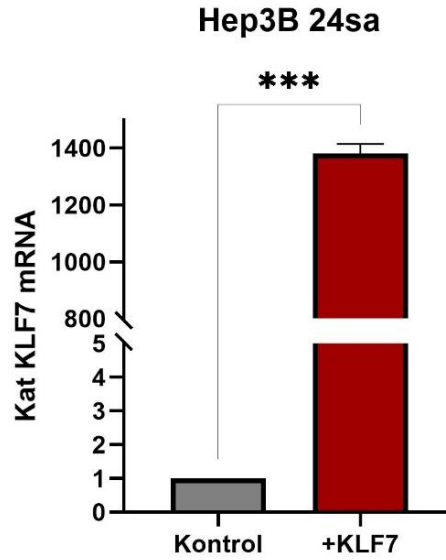
KLF transkripsiyon faktörlerinin bağlanma motifi -CACCC- olarak tanımlanmıştır. MIR100HG promotorunda +231/-1397 bç'lik bölgesinde, 4 adet potansiyel bağlanma bölgesi bulunmuştur (bk. EK C). MIR100HG promotorunda Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin belirlenmesinde PROMO TF search programı kullanılmıştır [122].

4.2 KLF7 Geninin Hep3B Hücrelerinde Aşırı Ekspresyonu

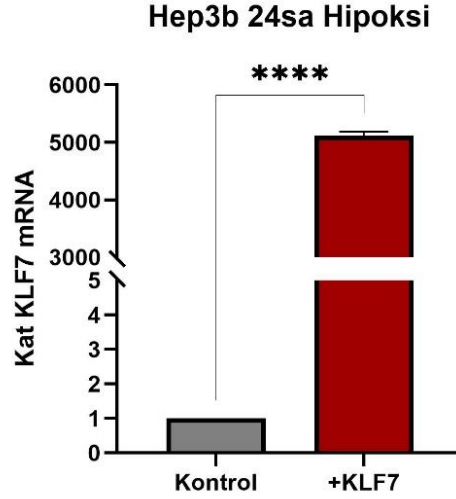
4.2.1 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

KLF7 geninin aşırı ifadesinin Hep3B hücrelerinde mRNA düzeyindeki etkisini belirlemek için Bölüm 3.2.3.5'te tarif edildiği üzere Hep3B hücrelerine, kontrol grubu olarak boş pEGFP-C1 vektörü, deney grubu olarak da pEGFP-C1 vektörü içerisine klonlanmış olan KLF7 plazmitinin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonun 24. saatinde, 6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde dağıtılıp, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 6. saatinde, hücrelere son konsantrasyonu $300 \mu\text{M}$ olacak şekilde CoCl_2 uygulandı

ve gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, kuyulardan medyum uzaklaştırıldı ve Bölüm 3.2.3.3'te açıklanan şekilde hücreler toplanarak pellet elde edildi. Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu, Bölüm 3.2.4.1'de belirtildiği gibi yapıldı. RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı belirlendikten sonra, Bölüm 3.2.4.4'te tarif edilen RT reaksiyonu ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'ların kalitesi kontrol edildi. Kaliteli cDNA'lar kullanılarak, Bölüm 3.2.4.6'da belirtilen KLF7 ve MIR100HG genlerine özgü ekspresyon primerleri ile Real-Time PCR kuruldu. Aynı zamanda bu cDNA'larla hipoksik koşul oluşumunu doğrulamak amacıyla HIF1 α ekspresyon primerleri ve normalizasyon amacıyla da H β -2-M ekspresyon primerleri de çalışıldı. Real-Time PCR kullanılacak her cDNA için en az 3 tekrar olacak şekilde kuruldu. Real-Time PCR sonuçları, Livak yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve elde edilen veriler GraphPad programı ile grafik haline getirildi.

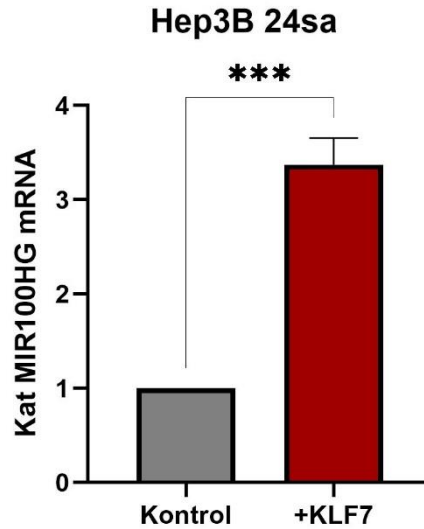


Şekil 4.11: Normoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi (p değeri $< 0,001$ (***) ile gösterildi).

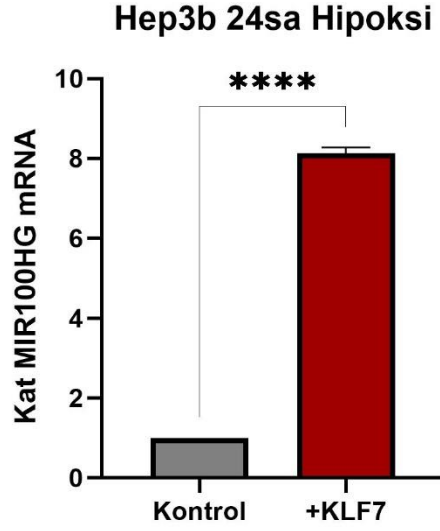


Şekil 4.12: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi (p değeri $< 0,0001$ (****) ile gösterildi).

KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin mRNA düzeyindeki değişim kontrol grubuna göre kıyaslandığında, istatistiksel olarak, KLF7 transfekte edilmiş grupların normoksik koşullarda (bk. Şekil 4.11) mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 1400 kat, hipoksik koşullarda (bk. Şekil 4.12) ise mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 5000 kat daha fazla ekspresyon artışı belirlendi.

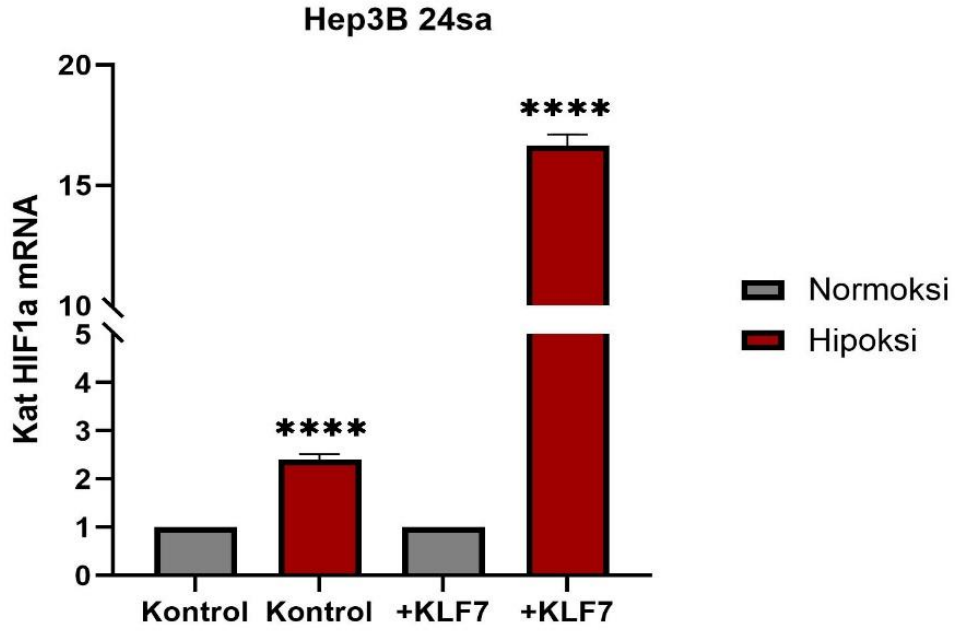


Şekil 4.13: Normoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi (p değeri $< 0,001$ (***) ile gösterildi).



Şekil 4.14: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişimi (p değeri $< 0,0001$ (****) ile gösterildi).

KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin mRNA düzeyindeki değişim kontrol grubuna göre kıyaslandığında, istatistiksel olarak, KLF7 transfekte edilmiş grupların normoksik koşullarda (bk. Şekil 4.13) mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 3 kat, hipoksik koşullarda (bk. Şekil 4.14) ise mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 8 kat daha fazla ekspresyon artışı belirlendi.

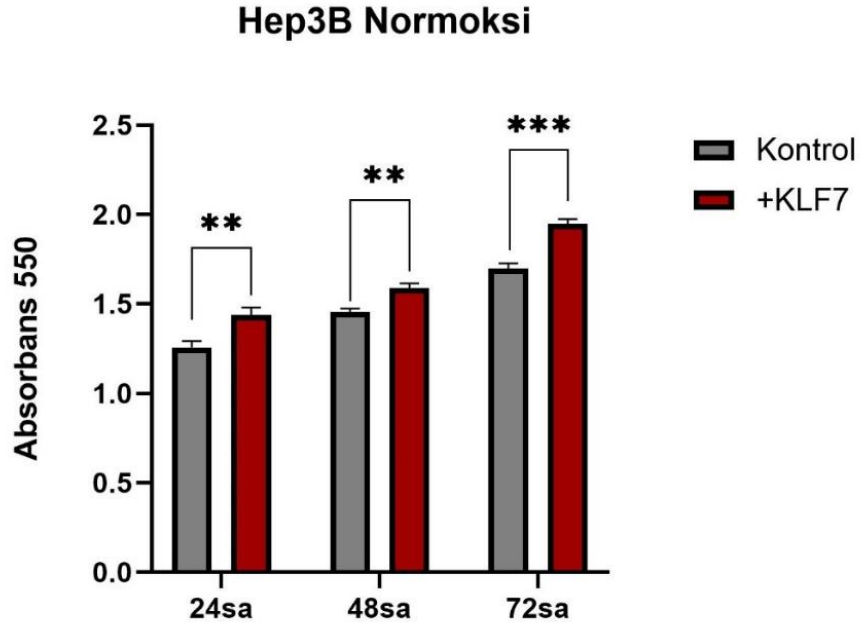


Şekil 4.15: Hipoksik koşullarda KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonunun mRNA düzeyindeki değişimi ile (p değeri $< 0,0001$ (****) ile gösterildi).

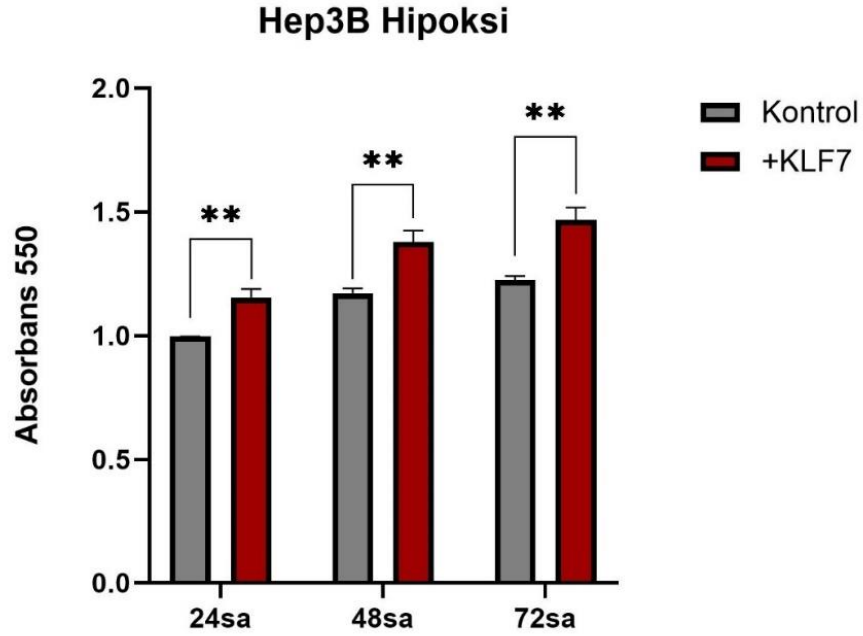
Hipoksik koşullarda, KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonunun mRNA düzeyindeki değişimi, normoksik koşullara göre kıyaslandığında, istatistiksel olarak, kontrol gruplarının mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 2,5 kat, KLF7 transfekte edilmiş grupların mRNA seviyesinde ise yaklaşık olarak 16 kat daha fazla ekspresyon artışı belirlendi (bk. Şekil 4.15) Bu sonuçlardan yola çıkarak hipoksik koşul oluşumu doğrulandı.

4.2.2 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin MTT Testi ile Belirlenmesi

KLF7 geninin aşırı ifadesinin Hep3B hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için MTT testi yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3.5'te tarif edildiği üzere Hep3B hücrelerine, kontrol grubu olarak boş pEGFP-C1 vektörü, deney grubu olarak da pEGFP-C1 vektörü içerisine klonlanmış olan KLF7 plazmitinin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonun 24. saatinde, hücreler MTT testi için 96 kuyucuklu plakalara 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde da ve 37°C %5 CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 6. saatinde, hücrelere $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 uygulandı ve normoksik ile hipoksik koşullar için dört tekrarlı çalışıldı. Uygulamanın 24., 48. ve 72. saatlerinde MTT analizi, Bölüm 3.2.3.8'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Sonuçlar GraphPad programı ile grafiklendirildi.



Şekil 4.16: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda zamana bağlı hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi (p değeri $< 0,01(**)$ ile gösterildi).



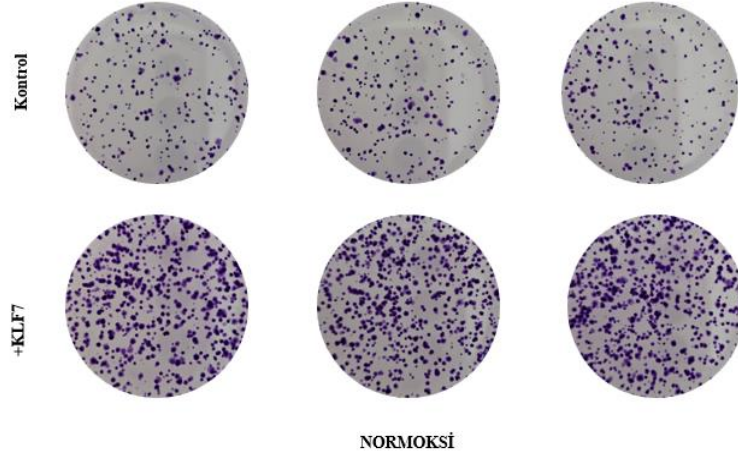
Şekil 4.17: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda zamana bağlı hücre proliferasyonuna etkisinin MTT analizi (p değeri $< 0,01(**)$ ile gösterildi).

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'deki grafiklere göre, kontrol grubuna göre kıyaslandığında KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi.

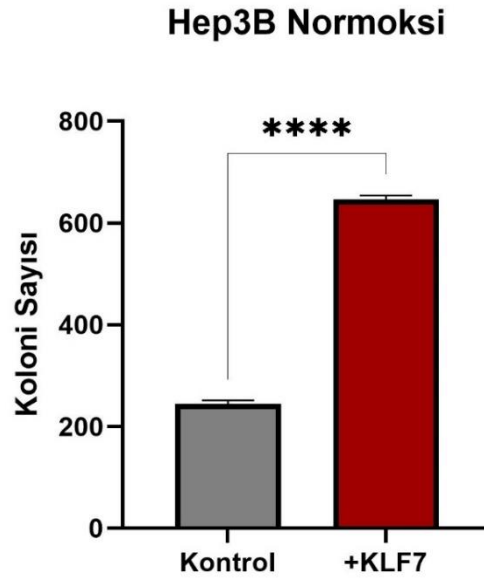
4.2.3 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

KLF7 geninin aşırı ifadesinin Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Koloni Formasyon deneyi yapıldı. Bölüm 3.2.3.5'te tarif edildiği gibi, kontrol grubuna boş pEGFP-C1 vektörü ve deney grubuna pEGFP-C1 vektörüne klonlanmış KLF7 plazmidini transfekte edildi. Transfeksiyonun 24. saatinde, hücrelerin normoksik ve hipoksik koşullar altında koloni oluşturma yeteneklerini değerlendirmek amacıyla 6 kuyucuklu plakalara 1×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı ve 37°C %5 CO_2 ortamında 72 saat inkübe edildi. 72 saat sonra, TurboFect™ transfeksiyon ajanı kullanılarak geçici transfeksiyon işlemi yinelenildi. Hücreler mikroskop ile takip edilerek, 10. günün sonunda kolonileri hipoksik koşullar için

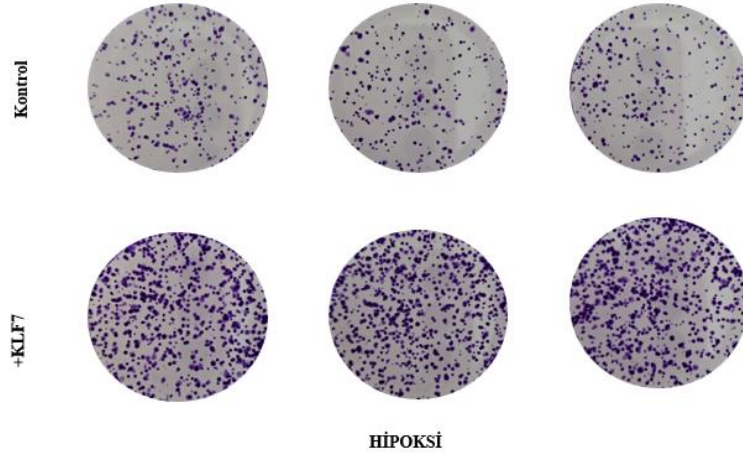
uyarmak amacıyla 300 μ M CoCl₂ uygulandı. 24 saat sonra, Koloni Formasyon deneyi Bölüm 3.2.3.9'da açıklanan şekilde gerçekleştirildi. Kolonilerin sayımı Image J (NIH) programı ile yapıldı ve sonuçlar GraphPad programı ile grafiklendirildi.



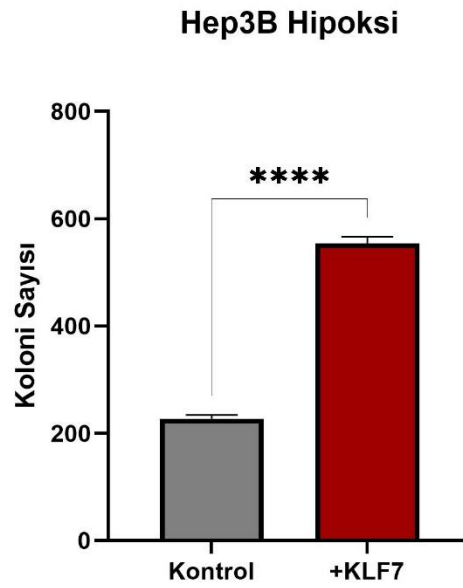
Şekil 4.18: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda koloni formasyon görüntüleri.



Şekil 4.19: KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturmaya üzerindeki etkisi (p değeri $<0,0001$ (****) ile gösterildi).



Şekil 4.20: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda koloni formasyon görüntüleri.



Şekil 4.21: KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğindeki etkisi (p değeri $<0,0001$ (****) ile gösterildi).

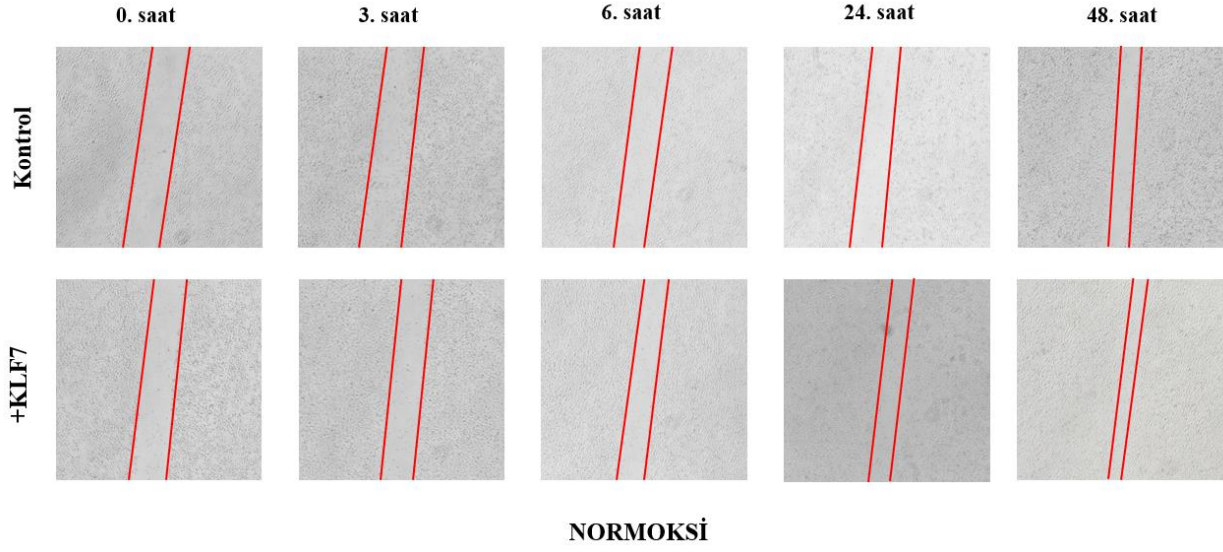
Şekil 4.19 ve Şekil 4.21'deki grafiklere göre, kontrol grubuna göre kıyaslandığında KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi.

4.2.4 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

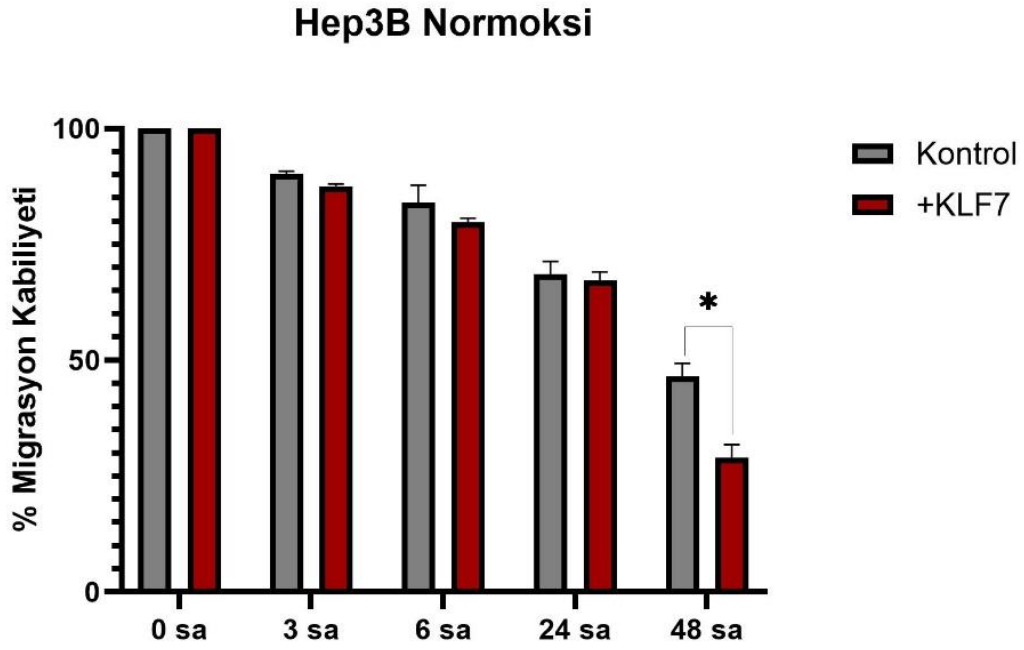
KLF7 geninin aşırı ifadesinin Hep3B hücrelerinde yara iyileşmesi ve hücre göçü üzerine etkisini belirlemek için Scratch (Migrasyon) deneyi yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3.5'te tarif edildiği üzere Hep3B hücrelerine, kontrol grubu olarak boş pEGFP-C1 vektörü, deney grubu olarak da pEGFP-C1 vektörü içerisine klonlanmış olan KLF7 plazmitinin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonun 24. saatinde, normoksik ve hipoksik koşullar için ayrı ayrı 6 kuyulu plakalara kuyu hacmine 5×10^5 düşecek şekilde hücreler dağıtıldı ve 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 16-24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, her kuyuya 10 μL 'lik beyaz pipet ucu ile çizik atıldı. Çizme işleminden sonra, hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı ve %10 FBS içeren DMEM eklendi. Hipoksik koşulları stimüle etmek için, son konsantrasyonu 300 μM olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Uygulamanın 0., 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde kuyucuklar inverted mikroskop ile fotoğraflandı ve çizimin kapanması takip edildi. Fotoğraflar, Image J (NIH) programı ile analiz edildi ve sonuçlar GraphPad programı ile grafiklendirildi.

KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde, normoksik koşullarda kontrol grubuna göre kıyaslandığında, KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda yara iyileşmesi ve hücre göçü yeteneğinde artış olduğu gözlemlendi (bk. Şekil 4.22) ve 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. (bk. Şekil 4.23).

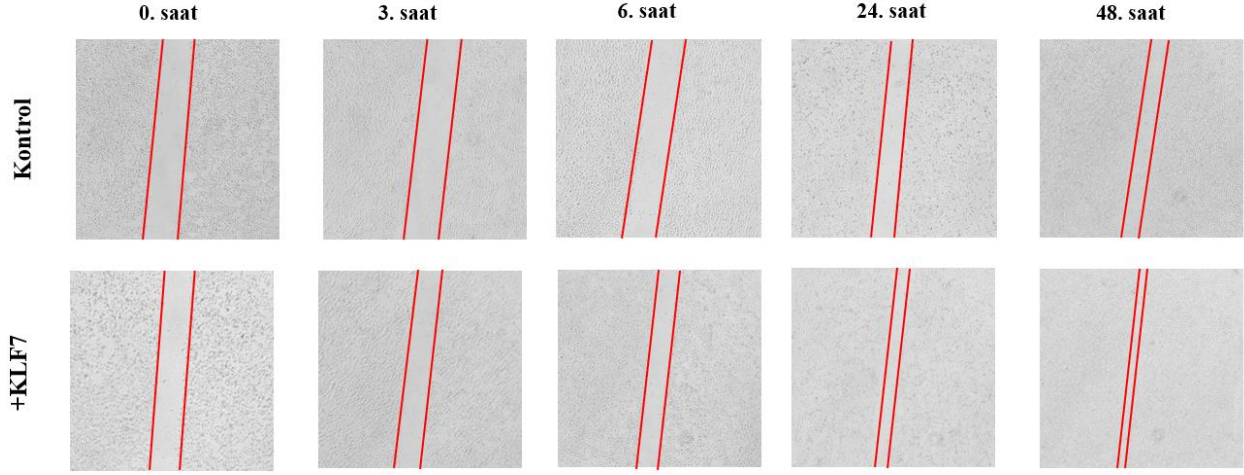
KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde, hipoksik koşullarda kontrol grubuna göre kıyaslandığında KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda yara iyileşmesi ve hücre göçü yeteneğinde artış olduğu gözlemlendi (bk. Şekil 4.24). İlave olarak 3., 6, 24. ve 48. saat dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (bk. Şekil 4.25).



Şekil 4.22: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda migrasyon deneyi görüntüleri.

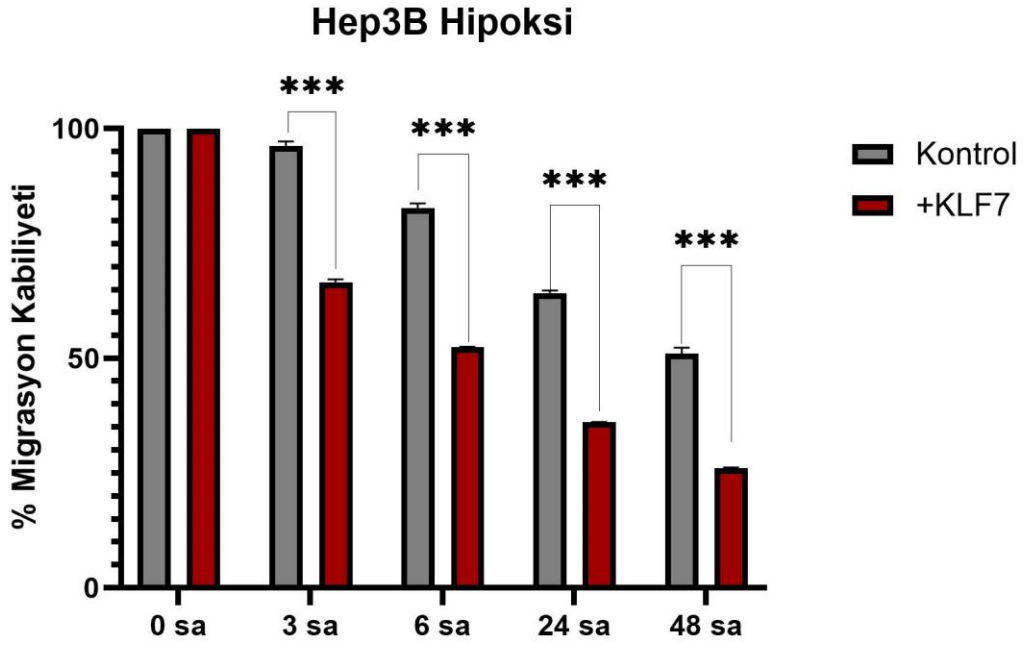


Şekil 4.23: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin normoksik koşullarda yara iyileşmesi ve hücre göçüne etkisi (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi).



HİPOKSİ

Şekil 4.24: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda migrasyon deneyi görüntüleri.



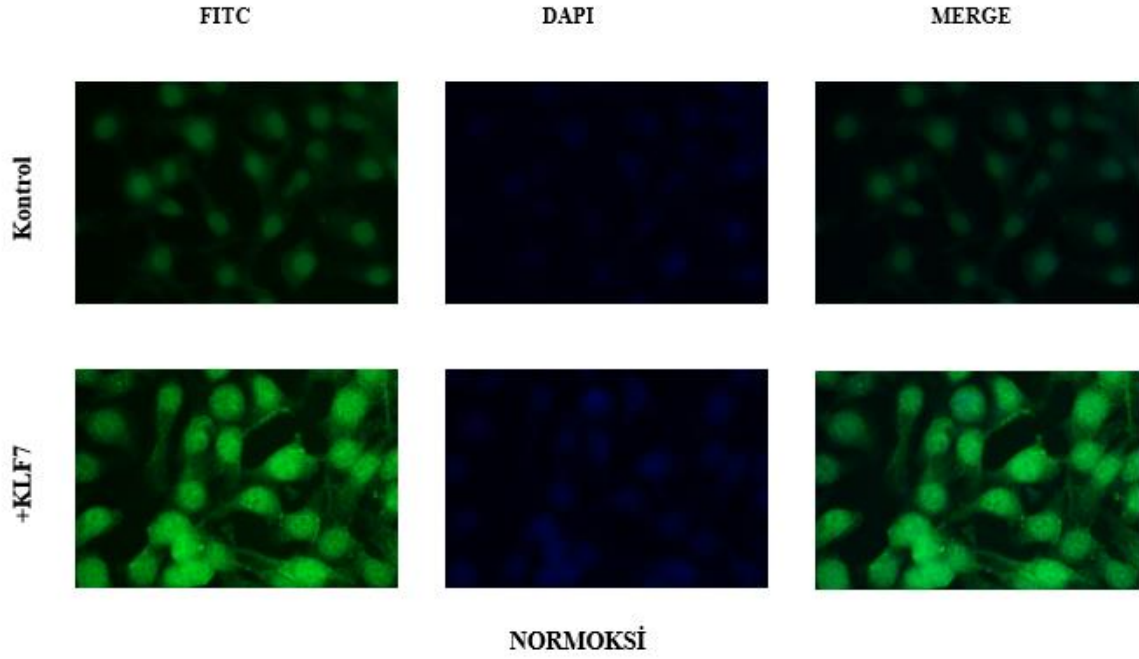
Şekil 4.25: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda yara iyileşmesi ve hücre göçüne etkisi (p değeri $< 0,001$ (***) ile gösterildi).

4.2.5 KLF7 Geninin Aşırı İfadesinin Hep3B Hücrelerinde Protein Düzeyinde IFC ile Belirlenmesi

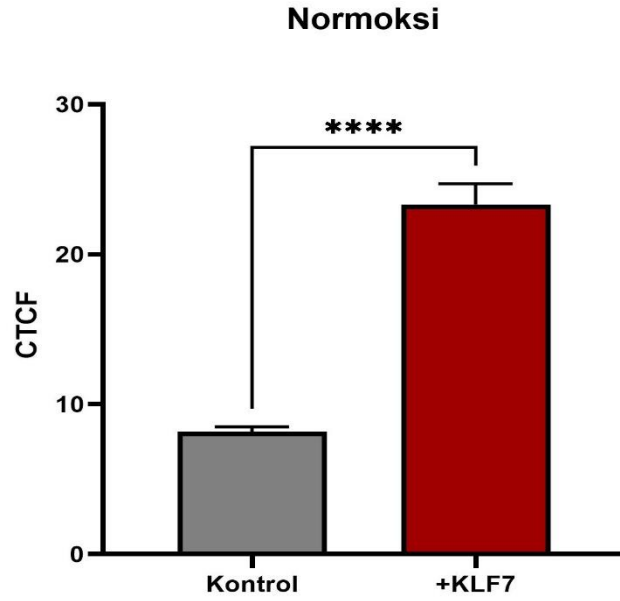
KLF7 geninin aşırı ifadesinin Hep3B hücrelerinde, spesifik KLF7 antikoru kullanılarak antijen-antikor etkileşimini belirlemek amacıyla IFC deneyi yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3.5'te tarif edildiği üzere Hep3B hücrelerine, kontrol grubu olarak boş pEGFP-C1 vektörü, deney grubu olarak da pEGFP-C1 vektörü içerisine klonlanmış olan KLF7 plazmitinin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonun 24. saatinde hücreler, steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plakaya 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. Hücreler, %80-90 doluluğa ulaşmaları için 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 16 saat inkübe edildi. Ertesi gün, hücreleri hipoksik koşulları stimüle etmek ve HIF-1 α yanıtı incelemek için $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 uygulaması yapıldı. Bölüm 3.2.3.11'de tarif edilen şekilde IFC deneyi gerçekleştirildi. Deney sonrasında, fotoğraflardaki floresan miktarı Image J (NIH) programı ile analiz edilip, sonuçlar GraphPad programı ile grafiklendirildi.

KLF7 geninin aşırı ifadesinin, Hep3B hücrelerinde, normoksik koşullarda (bk. Şekil 4.26) KLF7 antikoru uygulandığında, kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak yaklaşık 20 kat daha fazla anlamlı bir artış belirlendi (bk. Şekil 4.27).

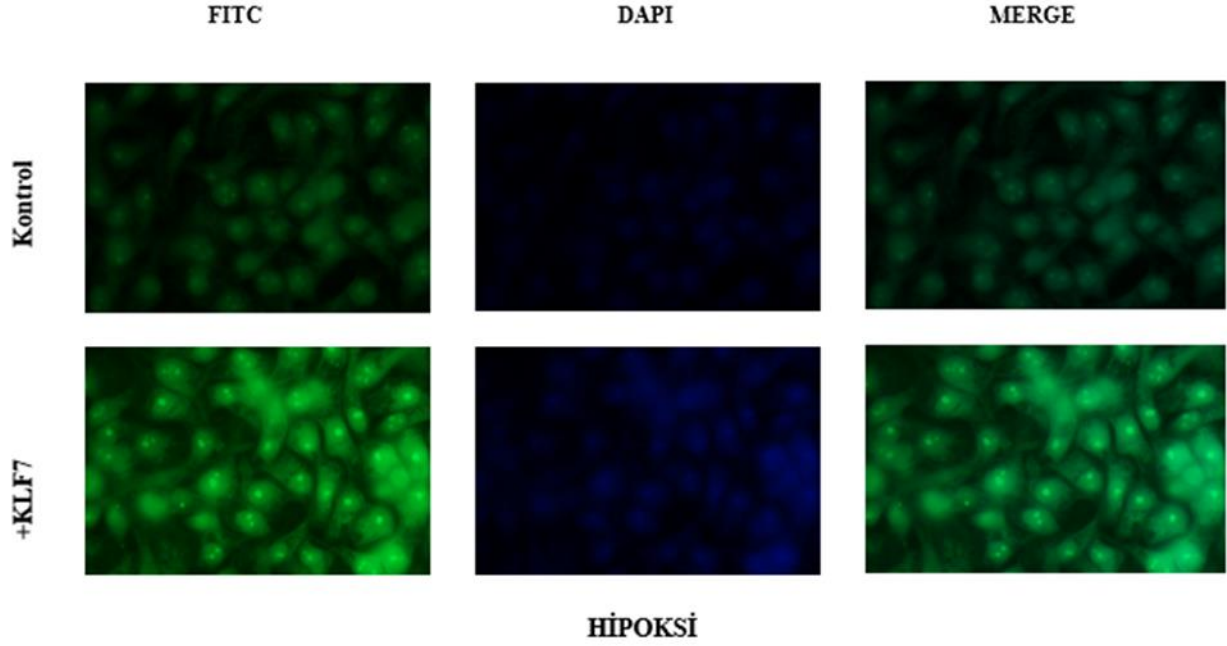
Hipoksik koşullarda (bk. Şekil 4.28) KLF7 antikoru uygulandığında da, kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak yaklaşık 30 kat daha fazla anlamlı bir artış belirlendi (bk. Şekil 4.29). Aynı zamanda hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru uygulandığında ise (bk. Şekil 4.30) kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunun istatistiksel olarak yaklaşık 20 kat daha fazla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ve hipoksik koşul oluşumu doğrulandı (bk. Şekil 4.31).



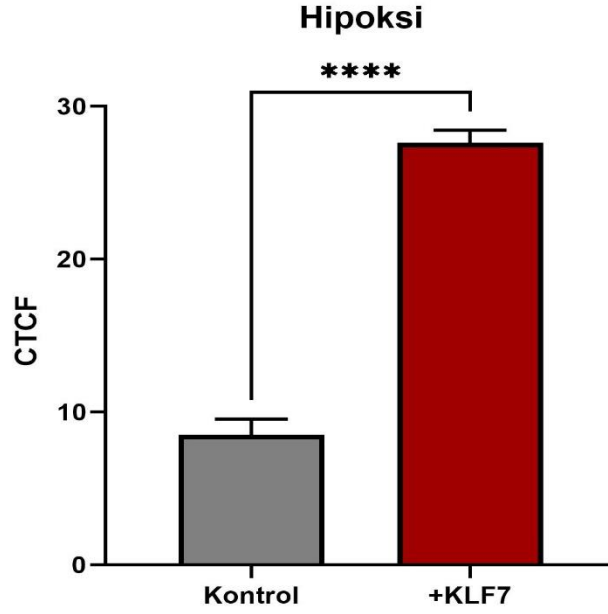
Şekil 4.26: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, normoksik koşullarda KLF7 antikoruna uygulanmış IFC deneyi görüntüleri (100 µm).



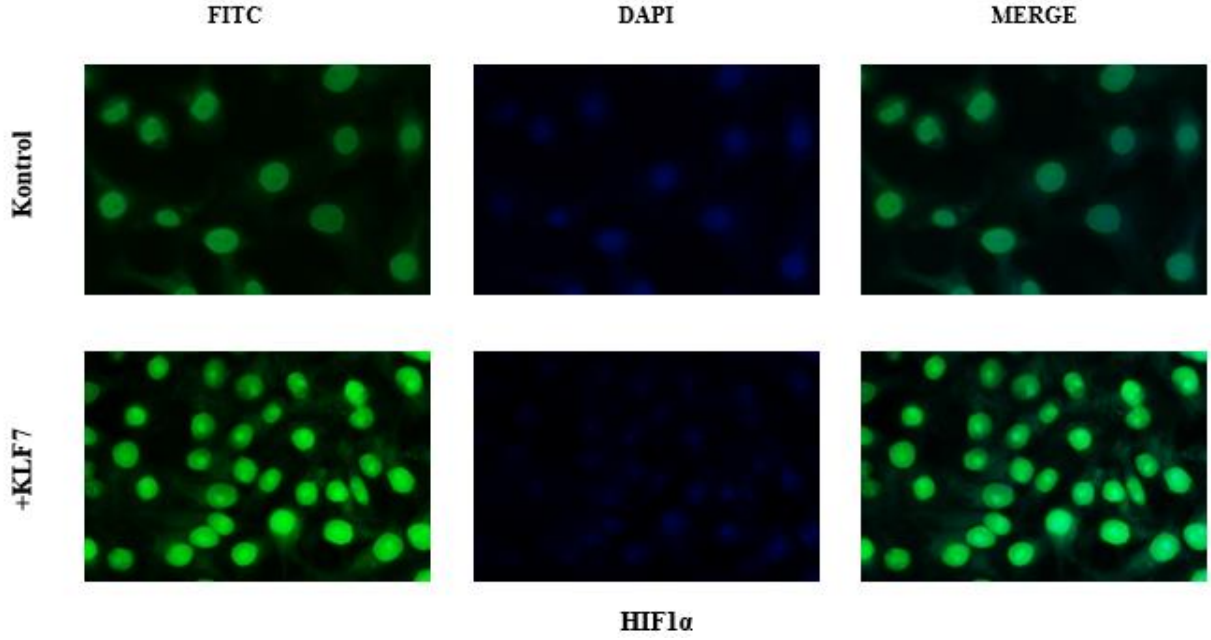
Şekil 4.27: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, normoksik koşullarda KLF7 antikoruna ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi (p değeri $<0,0001$ (****) ile gösterildi).



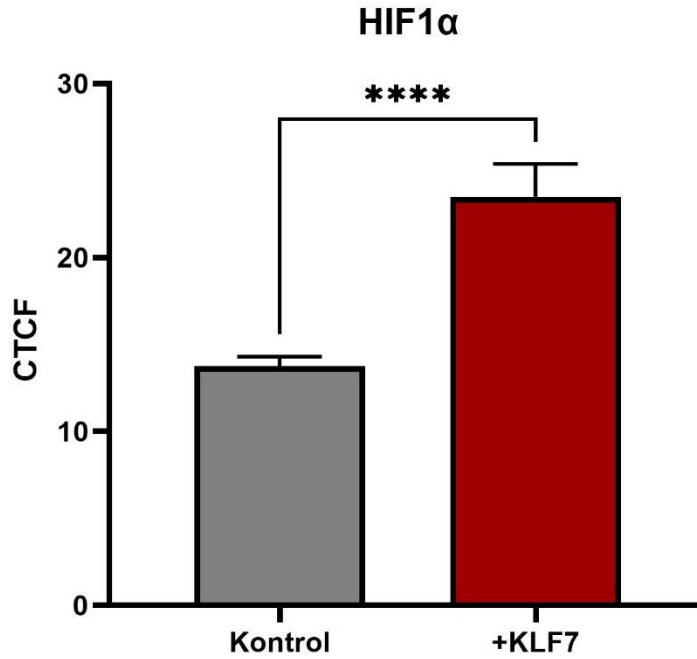
Şekil 4.28: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda KLF7 antikorunu uygulanmış IFC deneyi görüntüleri (100 µm).



Şekil 4.29: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda KLF7 antikorunu ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi (p değeri $<0,0001$ (****) ile gösterildi).



Şekil 4.30: Hep3B hücrelerinde, KLF7 geninin aşırı ifadesinin, hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru uygulanmış IFC deneyi görüntüleri (100 μ m).

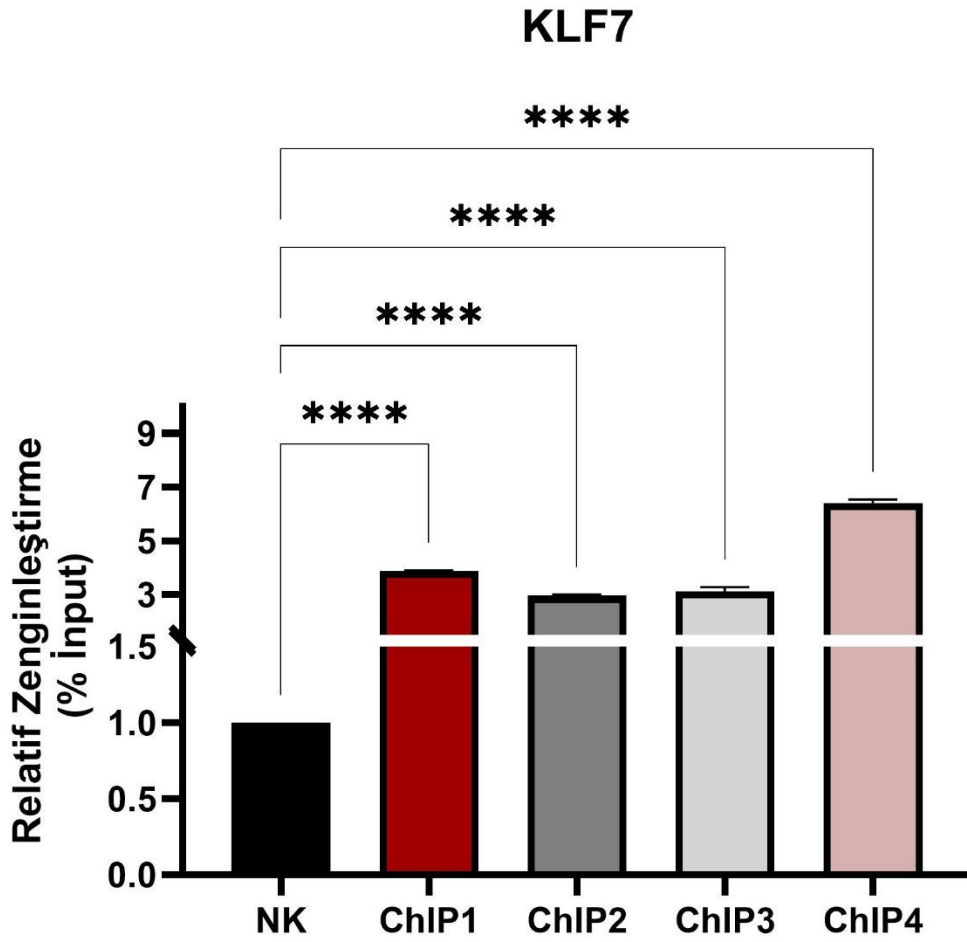
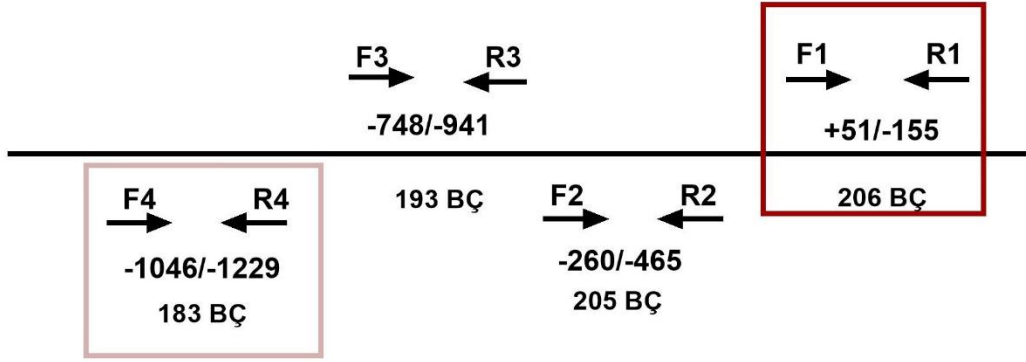


Şekil 4.31: Hep3B hücrelerinde, KLF7 aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru ile antijen-antikor etkileşiminin belirlenmesi (p değeri $<0,0001$ (****) ile gösterildi).

4.2.6 KLF7 Aşırı Ekspresyonu Sonucunda Spesifik KLF7 Antikoru ile ChIP Deneyi

MIR100HG promotor bölgesinde KLF7 transkripsiyon faktörünün muhtemel bağlanma bölgelerini tespit edebilmek amacıyla Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı üzere ChIP deneyi yapıldı. %80-90 doluluk oranına ulaşan Hep3B hücreleri, 10 µg KLF7 plazmidi ve TurboFect™ transfeksiyon reaktifi kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyonun 24. saatinde ChIP protokolü başlatılarak %37 formaldehit ile fiksasyon yapıldı. DNA sonikasyon ile kısa fragmentlere parçalanarak hücre lizatları elde edildi. Hücre lizatları, KLF7 antikoru ile immünopresipitasyon işlemine tabi tutularak protein-DNA kompleksleri izole edildi. Elüsyon işlemi ve DNA saflaştırma adımları takip edildi. Real Time PCR ile MIR100HG promotor bölgesine spesifik primerler kullanılarak Saflaştırılmış DNA analiz edildi.

ChIP deneyi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda MI100HG ChIP 1, ChIP 2, ChIP 3 ve ChIP 4 promotor parçalarının %input oranları kontrole göre kıyaslandığında, KLF7 transkripsiyon faktörü ile istatistiksel olarak anlamlı bir bağlanma olduğu tespit edilmiştir (bk. Şekil 4.32).



Şekil 4.32: KLF7 antikorunun KLF7 aşırı ifadesine bağlı ChIP deneyi analizi (p değeri <0,0001(****) ile gösterildi).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser heterojenliği, dinamik olarak genetik, epigenetik ve hücrel mikroçevre faktörlerinden etkilenir [5]. HCC oluşumu moleküler düzeyde de incelendiğinde hem genetik hem de epigenetik faktörlerin hastalığın gelişiminde etkili faktörler olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle, HCC'de görülen bazı epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyon paternlerinde bozulma, histon modifikasyonları ve mikroRNA (miRNA) düzenlemesindeki anormallikler yer alır [7].

lncRNA'ların anormal ekspresyonu ise HCC'nin gelişiminde etkin faktörlerden biri olarak; kanser hücrelerinin çoğalmasında, vücutta diğer doku ve organlara yayılmasında (metastaz), çevre dokulara saldırmasında (invazyon) ve tedaviye karşı direnç geliştirmesinde önemli roller üstlenir.

İnsan HCC hücre hatlarında bir lncRNA olan MIR100HG geninin artan ekspresyon düzeyi hastalığın gelişiminde etkin bir faktördür [121]. Kruppel benzeri faktörler (KLF) ise birçok genin ekspresyonunu artırarak ve/veya baskılayarak bir dizi gelişimsel olayın ve hücrel sürecin düzenlenmesinde rol alırlar [84]. Kruppel benzeri faktörler (KLF) ailesinin bir üyesi olan KLF7 transkripsiyon faktörünün ifade düzeyindeki değişikliklerin de KLF7'nin HCC gelişiminde etkin bir faktör olduğunu göstermektedir [119, 120]. Literatürde MIR100HG geninin ve KLF7 transkripsiyon faktörünün HCC gelişimiyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak hepatosellüler karsinomda MIR100HG'nin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından transkripsiyonel regülasyonuna dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında MIR100HG geninin hepatosellüler karsinomdaki rolüne ve MIR100HG geninin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından transkripsiyonel regülasyonuna açıklık getirmek hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar iki basamak altında toplanabilir. Birinci basamakta insan MIR100HG geninin promotor bölgesinin klonlanması ve klonlanan parçaların transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk basamağında MIR100HG geninin detaylı biyoinformatik analizi yapılmış olup gene ait promotor bölgesinden spesifik 5 adet ileri 1 adet de geri primer tasarlandı. Tasarlanan primerler polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak, PCR ürünleri ile agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel elektroforezinden sonra PCR ile çoğaltılan promotor konstraktları jelden geri kazanılarak T:A klonlama stratejisi ile pGEM-T Easy vektöre

klonlamaları gerçekleştirildi. pGEM-T Easy vektöre klonlanan promotor konstraktları restriksiyon endonüklazlar (XhoI/HindIII) ile kesilerek haberci pMetLuc Reporter vektöre alt klonlamaları yapıldı. pMetLuc vektöre klonlanan MIR100HG promotor parçalarına ait plazmitler Sanger Dizileme ile analiz edilerek klonlamanın doğrulanması sağlandı. Klonlamanın doğrulanmasının ardından pMetLuc vektöre klonlanan MIR100HG promotor parçalarının orta ölçekli plazmit izolasyonları yapıldı. Endotoksinlerden arınan ve miktarca çoğaltılan MIR100HG promotor konstraktları geçici transfeksiyon ile Hep3B hücrelerine aktarıldı. MIR100HG promotor konstraktlarına ait Luc/SEAP değerleri analiz edildiğinde 628 bç, 1046 bç ve 1244 bç promotor parçalarının bazal aktivitelerinde anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$).

Tez çalışmasının ikinci basamağında ise KLF7 geninin Hep3B hücrelerinde overekspresyonunu gerçekleştirmek için transfeksiyon çalışması yapıldı. Kontrol grubu olarak boş-pEGFP-C1 vektörü, overekspresyon grubu olarak da pEGFP-C1 vektörüne klonlanmış halde bulunan KLF7 geni TurboFect™ transfeksiyon reaktifi kullanılarak geçici transfeksiyonla Hep3B hücrelerine aktarıldı. Transfeksiyonun 24. Saatinde hücreler mRNA, MTT, Koloni Formasyon, Scratch (Migrasyon) ve IFC deneylerini yapmak üzere deney protokollerine uygun şekilde plakalara paylaştırıldı ve deneysel protokoller başlatıldı.

KLF7 geninin overekspresyonu mRNA düzeyinde Real Time PCR ile doğrulandı:

- ✓ KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde KLF7 geninin mRNA düzeyindeki değişim kontrol grubuna göre kıyasla, KLF7 transfekte edilmiş grupların normoksik koşullarda mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 1400 kat ($p < 0,001$), hipoksik koşullarda ise mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 5000 kat ($p < 0,0001$) daha fazla ekspresyon artışı tespit edildi.
- ✓ KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde MIR100HG geninin mRNA düzeyindeki değişim kontrol grubuyla kıyaslandığında ise KLF7 transfekte edilmiş grupların normoksik koşullarda mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 3 kat ($p < 0,001$), hipoksik koşullarda ise mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 8 kat ($p < 0,0001$) daha fazla ekspresyon artışı tespit edildi.
- ✓ Hipoksik koşullarda, KLF7 transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinde HIF-1 α ekspresyonunun mRNA düzeyindeki değişimi, normoksik koşullara göre kıyaslandığında, kontrol gruplarının mRNA seviyesinde yaklaşık olarak 2,5 kat ($p < 0,0001$), KLF7 transfekte edilmiş grupların

mRNA seviyesinde ise yaklaşık olarak 16 kat ($p < 0,0001$) daha fazla ekspresyon artışı belirlendi ve hipoksik koşul oluşumu doğrulandı.

KLF7 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotor konstraklarının bazal aktiviteleri üzerindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla, promotor konstraklarının ve KLF7 plazmitinin Hep3B hücrelerine ko-transfeksiyonu yapıldı.

- ✓ Normoksik koşullarda MIR100HG promotor parçalarının bazal aktiviteleri, KLF7 transkripsiyon faktörüne ait transkripsiyonel aktivite ile karşılaştırıldı ve KLF7 transkripsiyon faktörünün transfekte edilmesinin MIR100HG 909 bç (-678/+231), 628 bç (-397/+231) ve 419 bç (-188/+231) promotor parçalarının bazal aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi ($p < 0,01$).

Hep3B hücre hattındaki KLF7 overeskpresyonunun hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde MTT analizi gerçekleştirildi. KLF7 transfekte edilmiş deney grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,01$) belirlendi.

Hep3B hücre hattındaki KLF7 overeskpresyonunun hücrelerin koloni oluşturması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Koloni Formasyon deneyi yapıldı. KLF7 transfekte edilmiş deney grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda hem normoksik hem de hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,0001$) belirlendi.

Hep3B hücre hattındaki KLF7 overeskpresyonunun hücrelerin üzerindeki yara iyileşmesi ve hücre göçü üzerine etkisini belirlemek için Scratch (Migrasyon) deneyi yapıldı.

- ✓ Normoksik koşullarda; KLF7 transfekte edilmiş deney grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda yara iyileşmesi ve hücre göçü yeteneğinde artış olduğu gözlemlendi ve 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0,05$).
- ✓ Hipoksik koşullarda; KLF7 transfekte edilmiş deney grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, KLF7 geninin transfekte edildiği gruplarda yara iyileşmesi ve hücre göçü yeteneğinde artış olduğu gözlemlendi. İlave olarak 3., 6, 24. ve 48. saat dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0,001$).

KLF7 geninin overekspresyonunun Hep3B hücrelerinde, spesifik KLF7 antikoru kullanılarak antijen-antikor etkileşimini belirlemek amacıyla IFC deneyi yapıldı.

- ✓ Normoksik koşullarda, KLF7'nin overekspresyonunun, Hep3B hücrelerinde, KLF7 antikoru uygulandığında, kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak yaklaşık 20 kat ($p < 0,0001$) daha fazla anlamlı bir artış olduğu görüldü.
- ✓ Hipoksik koşullarda, KLF7 antikoru uygulandığında da, kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak yaklaşık 30 kat ($p < 0,0001$) daha fazla anlamlı bir artış belirlendi. Aynı zamanda hipoksik koşullarda HIF1 α antikoru uygulandığında ise kontrol grubuna kıyasla KLF7 geninin transfekte edildiği grupların sinyal yoğunluğunun istatistiksel olarak yaklaşık 20 kat ($p < 0,0001$) daha fazla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ve hipoksik koşul oluşumu doğrulandı.

MIR100HG promotor bölgesinde KLF7 transkripsiyon faktörünün muhtemel bağlanma bölgelerini tespit edebilmek amacıyla ChIP deneyi yapıldı. ChIP deneyi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda MIR100HG ChIP 1, ChIP 2, ChIP 3 ve ChIP 4 promotor parçalarının %input oranları kontrole göre kıyaslandığında, KLF7 transkripsiyon faktörü ile istatistiksel olarak anlamlı bir bağlanma olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar bize KLF7'nin MIR100HG promotorunda bağlanma bölgeleri olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, hepatosellüler kanserde, KLF7 transkripsiyon faktörünün artan ifadesinin, MIR100HG geninin de ifadesinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında bir lncRNA olan MIR100HG geninin KLF7 transkripsiyon faktörü tarafından regüle olan bir gen olduğu belirlenmiştir. Ancak MIR100HG'nin hepatosellüler karsinomadaki rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR (IEEE)

- [1] Balogh, J., Victor, D., 3rd, Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R. M., & Monsour, H. P., Jr (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 3, 41–53. <https://doi.org/10.2147/JHC.S61146>
- [2] Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2023). WNT/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma: The aberrant activation, pathogenic roles, and therapeutic opportunities. *Genes & diseases*, 11(2), 727–746. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.050>
- [3] Hepatocellular carcinoma. (2021). *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00245-6>
- [4] Alawyia, B., & Constantinou, C. (2023). Hepatocellular Carcinoma: a Narrative Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Current treatment options in oncology*, 24(7), 711–724. <https://doi.org/10.1007/s11864-023-01098-9>
- [5] You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012;22:9-20.
- [6] Calvisi D.F, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee J.S, Conner E.A, Schroeder I, Factor V.M, Thorgeirsson S.S. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Invest.* 2007;117:2713–2722.
- [7] Wolinska, E., & Skrzypczak, M. (2021). Epigenetic changes affecting the development of hepatocellular carcinoma. *Cancers*, 13(16), 4237.
- [8] Braghini, M. R., Lo Re, O., Romito, I., Fernandez-Barrena, M. G., Barbaro, B., Pomella, S., ... & Alisi, A. (2022). Epigenetic remodelling in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 107.
- [9] Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes & cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
- [10] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- [11] DOĞAN, R., & AKTAŞ, R. G. (2016). Epigenetik Mekanizmalar ve Hepatosellüler Karsinoma. *Maltepe Tıp Dergisi*, 8(3), 29-35.
- [12] Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., Wu, C., & Allis, C. D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 442(7098), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature04815>
- [13] Abolghasemi, M., Yousefi, T., Maniati, M., & Qujeq, D. (2019). The interplay of Klotho with signaling pathway and microRNAs in cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14306-14317.
- [14] Zhang, R., Xia, L. Q., Lu, W. W., Zhang, J., & Zhu, J. S. (2016). LncRNAs and cancer. *Oncology letters*, 12(2), 1233-1239.
- [15] Çoşan, D. T., Yağcı, E., & Kurt, H. (2018). Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 40(3), 114-121.
- [16] Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer cell*, 29(4), 452-463.
- [17] Chen, Q. N., Wei, C. C., Wang, Z. X., & Sun, M. (2017). Long non-coding RNAs in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget*, 8(1), 1925.
- [18] Xing, C., Sun, S. G., Yue, Z. Q., & Bai, F. (2021). Role of lncRNA LUCAT1 in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 134, 111158. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111158>
- [19] Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., ... & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature genetics*, 47(3), 199-208.
- [20] Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., ... & Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*, 337(6099), 1190-1195.
- [21] Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., ... & Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*, 22(9), 1775-1789.

- [22] Li, L., Liu, B., Wapinski, O. L., Tsai, M. C., Qu, K., Zhang, J., ... & Chang, H. Y. (2013). Targeted disruption of Hotair leads to homeotic transformation and gene derepression. *Cell reports*, 5(1), 3-12.
- [23] Venkatraman, A., He, X. C., Thorvaldsen, J. L., Sugimura, R., Perry, J. M., Tao, F., ... & Li, L. (2013). Maternal imprinting at the H19–Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 500(7462), 345-349.
- [24] Chen, D., Zhang, Z., Mao, C., Zhou, Y., Yu, L., Yin, Y., ... & Zhu, Y. (2014). ANRIL inhibits p15INK4b through the TGFβ1 signaling pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cellular immunology*, 289(1-2), 91-96.
- [25] Jiang, W., Liu, Y., Liu, R., Zhang, K., & Zhang, Y. (2015). The lncRNA DEANR1 facilitates human endoderm differentiation by activating FOXA2 expression. *Cell reports*, 11(1), 137-148.
- [26] Li, M., Gou, H., Tripathi, B. K., Huang, J., Jiang, S., Dubois, W., ... & Zhou, M. (2015). An Apela RNA-containing negative feedback loop regulates p53-mediated apoptosis in embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 16(6), 669-683.
- [27] Chu, C., Zhang, Q. C., Da Rocha, S. T., Flynn, R. A., Bharadwaj, M., Calabrese, J. M., ... & Chang, H. Y. (2015). Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell*, 161(2), 404-416.
- [28] Giovarelli, M., Bucci, G., Ramos, A., Bordo, D., Wilusz, C. J., Chen, C. Y., ... & Gherzi, R. (2014). H19 long noncoding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), E5023-E5028.
- [29] Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., ... & Pandolfi, P. P. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), 344-357.
- [30] Kong, Y. L., Wang, H. D., Gao, M., Rong, S. Z., & Li, X. X. (2024). LncRNA XIST promotes bladder cancer progression by modulating miR-129-5p/TNFSF10 axis. *Discover Oncology*, 15(1), 65.
- [31] Xing, Z., Lin, A., Li, C., Liang, K., Wang, S., Liu, Y., ... & Yang, L. (2014). lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell*, 159(5), 1110-1125.

- [32] Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsiganos, A., & Aifantis, I. (2014). Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell*, *158*(3), 593-606.
- [33] Zhang, A., Zhao, J. C., Kim, J., Fong, K. W., Yang, Y. A., Chakravarti, D., ... & Yu, J. (2015). LncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer. *Cell reports*, *13*(1), 209-221.
- [34] Takayama, K. I., Horie-Inoue, K., Katayama, S., Suzuki, T., Tsutsumi, S., Ikeda, K., ... & Inoue, S. (2013). Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *The EMBO journal*, *32*(12), 1665-1680.
- [35] Hung, T., Wang, Y., Lin, M. F., Koegel, A. K., Kotake, Y., Grant, G. D., ... & Chang, H. Y. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics*, *43*(7), 621-629.
- [36] Abdelmohsen, K., Panda, A., Kang, M. J., Xu, J., Selimyan, R., Yoon, J. H., ... & Gorospe, M. (2013). Senescence-associated lncRNAs: senescence-associated long noncoding RNAs. *Aging cell*, *12*(5), 890-900.
- [37] Yu, W., Gius, D., Onyango, P., Muldoon-Jacobs, K., Karp, J., Feinberg, A. P., & Cui, H. (2008). Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*, *451*(7175), 202-206.
- [38] Hudson, W. H., Pickard, M. R., De Vera, I. M. S., Kuiper, E. G., Mourtada-Maarabouni, M., Conn, G. L., ... & Ortlund, E. A. (2014). Conserved sequence-specific lincRNA-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate. *Nature communications*, *5*(1), 5395.
- [39] Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., & Chrousos, G. P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling*, *3*(107), ra8-ra8.
- [40] Mourtada-Maarabouni, M., Pickard, M. R., Hedge, V. L., Farzaneh, F., & Williams, G. T. (2009). GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*, *28*(2), 195-208.
- [41] Wahlestedt, C. (2013). Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nature reviews Drug discovery*, *12*(6), 433-446.

- [42] Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer research*, 77(15), 3965-3981.
- [43] Vallacchi, V., & Rodolfo, M. (2018). miR-100 and miR-125b regulate epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumors. *Non-coding RNA Investigation*, 2.
- [44] Ghafouri-Fard, S., Harsij, A., Farahzadi, H., Hussien, B. M., Taheri, M., & Mokhtari, M. (2023). A concise review on the role of MIR100HG in human disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 27(16), 2278-2289.
- [45] Laneve, P., Po, A., Favia, A., Legnini, I., Alfano, V., Rea, J., ... & Caffarelli, E. (2017). The long noncoding RNA linc-NeD125 controls the expression of medulloblastoma driver genes by microRNA sponge activity. *Oncotarget*, 8(19), 31003.
- [46] Imanishi, T., Itoh, T., Suzuki, Y., O'donovan, C., Fukuchi, S., Koyanagi, K. O., ... & Okubo, K. (2004). Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS biology*, 2(6), e162.
- [47] Ng, S. Y., Johnson, R., & Stanton, L. W. (2012). Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *The EMBO journal*, 31(3), 522-533.
- [48] Kikuchi, K., Fukuda, M., Ito, T., Inoue, M., Yokoi, T., Chiku, S., ... & Aizawa, Y. (2009). Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation. *Nucleic acids research*, 37(15), 4987-5000.
- [49] Chen, F. Y., Zhou, Z. Y., Zhang, K. J., Pang, J., & Wang, S. M. (2020). Long non-coding RNA MIR100HG promotes the migration, invasion and proliferation of triple-negative breast cancer cells by targeting the miR-5590-3p/OTX1 axis. *Cancer cell international*, 20, 1-15.
- [50] Wang, S., Ke, H., Zhang, H., Ma, Y., Ao, L., Zou, L., ... & Jiao, B. (2018). LncRNA MIR100HG promotes cell proliferation in triple-negative breast cancer through triplex formation with p27 loci. *Cell death & disease*, 9(8), 805.
- [51] Shang, C., Zhu, W., Liu, T., Wang, W., Huang, G., Huang, J., ... & Yao, S. (2016). Characterization of long non-coding RNA expression profiles in lymph node metastasis of early-stage cervical cancer. *Oncology Reports*, 35(6), 3185-3197.
- [52] Noordhuis, M. G., Fehrmann, R. S., Wisman, G. B. A., Nijhuis, E. R., van Zanden, J. J., Moerland, P. D., ... & Schuring, E. (2011). Involvement of the TGF- β and β -catenin

- pathways in pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(6), 1317-1330.
- [53] Wu, Y., Wang, Z., Yu, S., Liu, D., & Sun, L. (2022). LncmiRHG-MIR100HG: A new budding star in cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 997532.
- [54] Li, W., Yuan, F., Zhang, X., Chen, W., Tang, X., & Lu, L. (2019). Elevated MIR100HG promotes colorectal cancer metastasis and is associated with poor prognosis. *Oncology letters*, 18(6), 6483-6490.
- [55] Huang, Y., Zhang, C., & Zhou, Y. (2019). LncRNA MIR100HG promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma through the downregulation of miR-204-5p. *OncoTargets and therapy*, 2967-2973.
- [56] Li, F., Sun, X., Liu, Q., Liu, X., & Zhang, J. (2021). Long Noncoding RNA MIR100HG Knockdown Attenuates Hepatocellular Carcinoma Progression by Regulating MicroRNA-146b-5p/Chromobox 6. *Gastroenterology research and practice*, 2021, 6832518. <https://doi.org/10.1155/2021/6832518>
- [57] Li, J., Xu, Q., Wang, W., & Sun, S. (2019). MIR100HG: a credible prognostic biomarker and an oncogenic lncRNA in gastric cancer. *Bioscience reports*, 39(4), BSR20190171.
- [58] Peng, J., Ma, Y., Zhao, X., Yang, X., & Wang, H. (2022). Constitutive β -catenin overexpression represses lncRNA MIR100HG transcription via HDAC6-mediated histone modification in colorectal cancer. *Molecular Cancer Research*, 20(6), 949-959.
- [59] Ottaviani, S., & Castellano, L. (2018). microRNAs: Novel regulators of the TGF- β pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular & Cellular Oncology*, 5(6), e1499066.
- [60] Ottaviani, S., Stebbing, J., Frampton, A. E., Zagorac, S., Krell, J., de Giorgio, A., ... & Castellano, L. (2018). TGF- β induces miR-100 and miR-125b but blocks let-7a through LIN28B controlling PDAC progression. *Nature communications*, 9(1), 1845.
- [61] Mazzocca, M., Colombo, E., Callegari, A., & Mazza, D. (2021). Transcription factor binding kinetics and transcriptional bursting: What do we really know?. *Current opinion in structural biology*, 71, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.08.002>
- [62] Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., ... & Weirauch, M. T. (2018). The human transcription factors. *Cell*, 172(4), 650-665.

- [63] Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237-1251.
- [64] Fong, A. P., & Tapscott, S. J. (2013). Skeletal muscle programming and reprogramming. *Current opinion in genetics & development*, 23(5), 568-573.
- [65] Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., & Luscombe, N. M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 252-263.
- [66] Furey, T. S. (2012). ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature Reviews Genetics*, 13(12), 840-852.
- [67] Kornberg, R. D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends in cell biology*, 9(12), M46-M49.
- [68] Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annual review of biochemistry*, 62(1), 161-190.
- [69] Myers, L. C., & Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry*, 69, 729-749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.729>
- [70] Gaston, K., & Jayaraman, P. S. (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(4), 721-741. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2260-3>
- [71] Shen, W. C., & Green, M. R. (1997). Yeast TAFII145 functions as a core promoter selectivity factor, not a general coactivator. *Cell*, 90(4), 615-624.
- [72] Burley, S. K., & Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual review of biochemistry*, 65(1), 769-799.
- [73] Li, Y., Flanagan, P. M., Tschochner, H., & Kornberg, R. D. (1994). RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science*, 263(5148), 805-807.
- [74] Leuther, K. K., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIB-and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell*, 85(5), 773-779.
- [75] Svejstrup, J. Q., Vichi, P., & Egly, J. M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends in biochemical sciences*, 21(9), 346-350.

- [76] Cooper, G. M. (2000). Regulation of transcription in eukaryotes. *The cell: A molecular approach*, 374-378.
- [77] Rojo, F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Current opinion in microbiology*, 4(2), 145-151.
- [78] Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., & Levine, M. (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science*, 284(5414), 606-609.
- [79] Zakeri, S., Aminian, H., Sadeghi, S., Esmailzadeh-Gharehdaghi, E., & Razmara, E. (2022). Krüppel-like factors in bone biology. *Cellular signalling*, 93, 110308. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110308>
- [80] Yuce, K., & Ozkan, A. I. (2024). The kruppel-like factor (KLF) family, diseases, and physiological events. *Gene*, 895, 148027. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.148027>
- [81] Miller, I. J., & Bieker, J. J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Molecular and cellular biology*.
- [82] Anderson, K. P., Kern, C. B., Crable, S. C., & Lingrel, J. B. (1995). Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family. *Molecular and cellular biology*, 15(11), 5957-5965.
- [83] Shields, J. M., & Yang, V. W. (1998). Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Krüppel-like factor. *Nucleic acids research*, 26(3), 796-802.
- [84] Swamynathan, S. K. (2010). Krüppel-like factors: three fingers in control. *Human genomics*, 4, 1-8.
- [85] Drissen, R., von Lindern, M., Kolbus, A., Driegen, S., Steinlein, P., Beug, H., ... & Philipsen, S. (2005). The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5205-5214.
- [86] Haldar, S. M., Ibrahim, O. A., & Jain, M. K. (2007). Kruppel-like Factors (KLFs) in muscle biology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43(1), 1-10.
- [87] Gray, S., Wang, B., Orihuela, Y., Hong, E. G., Fisch, S., Haldar, S., ... & Jain, M. K. (2007). Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell metabolism*, 5(4), 305-312.

- [88] Moore, D. L., Blackmore, M. G., Hu, Y., Kaestner, K. H., Bixby, J. L., Lemmon, V. P., & Goldberg, J. L. (2009). KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability. *Science*, 326(5950), 298-301.
- [89] Wan, H., Luo, F., Wert, S. E., Zhang, L., Xu, Y., Ikegami, M., ... & Whitsett, J. A. (2008). Kruppel-like factor 5 is required for perinatal lung morphogenesis and function.
- [90] Wen, Y., Lu, X., Ren, J., Privratsky, J. R., Yang, B., Rudemiller, N. P., ... & Crowley, S. D. (2019). KLF4 in macrophages attenuates TNF α -mediated kidney injury and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(10), 1925-1938.
- [91] Nayak, L., Goduni, L., Takami, Y., Sharma, N., Kapil, P., Jain, M. K., & Mahabeleshwar, G. H. (2013). Kruppel-like factor 2 is a transcriptional regulator of chronic and acute inflammation. *The American journal of pathology*, 182(5), 1696-1704.
- [92] Li, Z., Martin, M., Zhang, J., Huang, H. Y., Bai, L., Zhang, J., ... & Shyy, J. Y. J. (2017). Krüppel-like factor 4 regulation of cholesterol-25-hydroxylase and liver X receptor mitigates atherosclerosis susceptibility. *Circulation*, 136(14), 1315-1330.
- [93] Dang, D. T., Pevsner, J., & Yang, V. W. (2000). The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 32(11-12), 1103-1121. [90]
- [94] Yang, H., Peng, M., Li, Y., Zhu, R., Li, X., & Qian, Z. (2019). LINC00703 acts as a tumor suppressor via regulating miR-181a/KLF6 axis in gastric cancer. *Journal of Gastric Cancer*, 19(4), 460.
- [95] Yu, J., Jiang, L., Gao, Y., Sun, Q., Liu, B., Hu, Y., & Han, X. (2019). LncRNA CCAT1 negatively regulates miR-181a-5p to promote endometrial carcinoma cell proliferation and migration. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(5), 4259-4266.
- [96] Li, Z. Y., Zhu, Y. X., Chen, J. R., Chang, X., & Xie, Z. Z. (2023). The role of KLF transcription factor in the regulation of cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114661.
- [97] Niu, R., Tang, Y., Xi, Y., & Jiang, D. (2020). High expression of Krüppel-like factor 7 indicates unfavorable clinical outcomes in patients with lung adenocarcinoma. *Journal of Surgical Research*, 250, 216-223.

- [98] Syafruddin, S. E., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Patel, S. A., Zaini, M. N., Burge, J., ... & Vanharanta, S. (2019). A KLF6-driven transcriptional network links lipid homeostasis and tumour growth in renal carcinoma. *Nature communications*, *10*(1), 1152.
- [99] Gupta, R., Malvi, P., Parajuli, K. R., Janostiak, R., Bugide, S., Cai, G., ... & Wajapeyee, N. (2020). KLF7 promotes pancreatic cancer growth and metastasis by up-regulating ISG expression and maintaining Golgi complex integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(22), 12341-12351.
- [100] Wei, D., Gong, W., Kanai, M., Schlunk, C., Wang, L., Yao, J. C., ... & Xie, K. (2005). Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer research*, *65*(7), 2746-2754.
- [101] Yao, J., Zhang, H., Liu, C., Chen, S., Qian, R., & Zhao, K. (2020). miR-450b-3p inhibited the proliferation of gastric cancer via regulating KLF7. *Cancer Cell International*, *20*, 1-11.
- [102] Zou, H., Chen, H., Zhou, Z., Wan, Y., & Liu, Z. (2019). ATXN3 promotes breast cancer metastasis by deubiquitinating KLF4. *Cancer Letters*, *467*, 19-28.
- [103] Lu, L., Huang, W., Hu, W., Jiang, L., Li, Y., Wu, X., ... & Li, M. (2019). Kruppel-like factor 2 mediated anti-proliferative and anti-metastasis effects of simvastatin in p53 mutant colon cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, *511*(4), 772-779.
- [104] Li, R., Chen, J., Gao, X., & Jiang, G. (2021). Transcription factor KLF2 enhances the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin by suppressing kinase WEE1. *Cancer Biology & Therapy*, *22*(7-9), 465-477.
- [105] Suzuki, S., Chuang, L. F., Doi, R. H., & Chuang, R. Y. (2003). Identification of opioid-regulated genes in human lymphocytic cells by differential display: upregulation of Kruppel-like factor 7 by morphine. *Experimental cell research*, *291*(2), 340-351.
- [106] Matsumoto, N., Laub, F., Aldabe, R., Zhang, W., Ramirez, F., Yoshida, T., & Terada, M. (1998). Cloning the cDNA for a new human zinc finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(43), 28229-28237.
- [107] Kanazawa, A., Kawamura, Y., Sekine, A., Iida, A., Tsunoda, T., Kashiwagi, A., ... & Maeda, S. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Kruppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia*, *48*, 1315-1322.

- [108] Vangala, R. K., Ravindran, V., Ghatge, M., Shanker, J., Arvind, P., Bindu, H., Shekar, M., & Rao, V. S. (2013). Integrative bioinformatics analysis of genomic and proteomic approaches to understand the transcriptional regulatory program in coronary artery disease pathways. *PloS one*, 8(2), e57193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057193>
- [109] Mao, Y., Chen, Y., & Zhang, Z. (2023). Molecular function of Krüppel-like factor 7 in biology. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 55(5), 713–725. <https://doi.org/10.3724/abbs.2023061>
- [110] Smaldone, S., Laub, F., Else, C., Dragomir, C., & Ramirez, F. (2004). Identification of MoKA, a novel F-box protein that modulates Krüppel-like transcription factor 7 activity. *Molecular and cellular biology*.
- [111] Jiang, Z., Yu, T., Fan, Z., Yang, H., & Lin, X. (2017). Krüppel-like factor 7 is a marker of aggressive gastric cancer and poor prognosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 1090-1099.
- [112] Chen, Y. C., Wei, H., & Zhang, Z. W. (2016). Research progress of Krüppel-like factor 7. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, 68(6), 809-815.
- [113] Walker, S. (2008). Updates in non-small cell lung cancer. *Number 4/August 2008*, 12(4), 587-596.
- [114] Song, H., Sun, J., Xu, Z., Liu, X., & Liu, N. (2022). Expression and Clinical Significance of Serum Krüppel-Like Factor 7 (KLF7) in NSCLC Patients. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022.
- [115] Gaskell, H., Ge, X., & Nieto, N. (2018). High-mobility group box-1 and liver disease. *Hepatology communications*, 2(9), 1005-1020.
- [116] Yan, H. X., Wu, H. P., Zhang, H. L., Ashton, C., Tong, C., Wu, H., ... & Ying, Q. L. (2013). p53 promotes inflammation-associated hepatocarcinogenesis by inducing HMGB1 release. *Journal of hepatology*, 59(4), 762-768.
- [117] Yan, W., Chang, Y., Liang, X., Cardinal, J. S., Huang, H., Thorne, S. H., ... & Tsung, A. (2012). High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology*, 55(6), 1863-1875.
- [118] Chen, R., Zhu, S., Fan, X. G., Wang, H., Lotze, M. T., Zeh, H. J., 3rd, Billiar, T. R., Kang, R., & Tang, D. (2018). High mobility group protein B1 controls liver cancer initiation

- through yes-associated protein -dependent aerobic glycolysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(5), 1823–1841. <https://doi.org/10.1002/hep.29663>
- [119] Feng, W., Chen, J., Huang, W., Wang, G., Chen, X., Duan, L., Yin, Y., Chen, X., Zhang, B., Sun, M., Luo, X., Nie, Y., Fan, D., Wu, K., & Xia, L. (2023). HMGB1-mediated elevation of KLF7 facilitates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through upregulating TLR4 and PTK2. *Theranostics*, 13(12), 4042–4058. <https://doi.org/10.7150/thno.84388>
- [120] Guo, Y., Chai, B., Jia, J., Yang, M., Li, Y., Zhang, R., ... & Xu, J. (2021). KLF7/VPS35 axis contributes to hepatocellular carcinoma progression through CCDC85C-activated β -catenin pathway. *Cell & bioscience*, 11, 1-14.
- [121] Ma, Y., Luo, T., Dong, D., Wu, X., & Wang, Y. (2018). Characterization of long non-coding RNAs to reveal potential prognostic biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Gene*, 663, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.053>
- [122] Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Nuñez, O., Martínez, J., & Albà, M. M. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18(2), 333-334.

EKLER

EKLER

EK A: 909 bç (-678/+231) Promotor Konstraktına Ait Dizi Analizi Sonucu

909 bç 14 TCTCCATAAGCAACATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAAAACAATAATAACC 70
|||||
NCBI 2040 TCTCCATAAGCAACATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAAAACAATAATAACC 2099

909 bç 71 GTAAGCAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGATGACAGTGA 130
|||||
NCBI 2100 GTAAGCAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGATGACAGTGA 2159

909 bç 131 TATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAAAGATACTATTT 190
|||||
NCBI 2160 TATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAAAGATACTATTT 2219

909 bç 191 GGACATACAGTCTGTTTTCTACTAAGGTGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGA 250
|||||
NCBI 2220 GGACATACAGTCTGTTTTCTACTAAGGTGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGA 2279

909 bç 251 CCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACCATCAAGTCTTT 310
|||||
NCBI 2280 CCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACCATCAAGTCTTT 2339

909 bç 311 TACTCAGAGACTGGAGACCACGCCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTGAACCTCCGACT 370
|||||
NCBI 2340 TACTCAGAGACTGGAGACCACGCCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTGAACCTCCGACT 2399

909 bç 371 TTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCT 430
|||||
NCBI 2400 TTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCT 2459

909 bç 431 TATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCACTGAGGACTGCGTCTC 490
|||||
NCBI 2460 TATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCACTGAGGACTGCGTCTC 2519

909 bç 491 CCGGAAGTATTTCCCTGAGAAATTGCAGAGGACCTCAGTCCTGCAACTCACACAGAGGCT 550
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

NCBI 2520 CCGGAAGTATTTCCCTGAGAAATTGCAGAGGACCTCAGTCCTGCAACTCACACAGAGGCT 2579

909 bç 551 GTTCTTCGTGGCCGGAACCGGACCCACGCCCTCTGGGGCACATCCCTGAGTGCGAGCAC 610
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

NCBI 2580 GTTCTTCGTGGCCGGAACCGGACCCACGCCCTCTGGGGCACATCCCTGAGTGCGAGCAC 2639

909 bç 611 TCTTCTCTCGCCCTCCTCCCACCCAGGCACCGTCCCAACTGGGCACTGCCTTGCTATGCC 670
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

NCBI 2640 TCTTCTCTCGCCCTCCTCCCACCCAGGCACCGTCCCAACTGGGCACTGCCTTGCTATGCC 2699

909 bç 671 CCACATCTCCCACAAG 686
 ||||||||||||||||

NCBI 2700 CCACATCTCCCACAAG 2715

EK B: 1046 bç (-815/+231) Promotor Konstraktına Ait Dizi Analizi Sonucu

1046 bç 15 GGACTCTATTAAACTCCACTACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACTGAACCATAC 73
|||||

NCBI 1909 GGACTCTATTAAACTCCACTACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACTGAACCATAC 1968

1046 bç 74 GTGAAGATTGAACCTTGAATAAAAATAATAAAGCTCCATTTGTTAAAAACCACAGCTACTT 133
|||||

NCBI 1969 GTGAAGATTGAACCTTGAATAAAAATAATAAAGCTCCATTTGTTAAAAACCACAGCTACTT 2028

1046 bç 134 CATGAGCTGTTTCTCCATAAGCAACATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAAAA 193
|||||

NCBI 2029 CATGAGCTGTTTCTCCATAAGCAACATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAAAA 2088

1046 bç 194 CAATAATAACCGTAAGCAAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAG 253
|||||

NCBI 2089 CAATAATAACCGTAAGCAAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2148

1046 bç 254 GATGACAGTGATATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAA 313
|||||

NCBI 2149 GATGACAGTGATATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAA 2208

1046 bç 314 AGATACTATTTGGACATACAGTCTGTTTTCACTAAGGTGGGAGCAGTATGTGTCCAGAG 373
|||||

NCBI 2209 AGATACTATTTGGACATACAGTCTGTTTTCACTAAGGTGGGAGCAGTATGTGTCCAGAG 2268

1046 bç 374 CTCTAGAGGGACCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACC 433
|||||

NCBI 2269 CTCTAGAGGGACCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACC 2328

1046 bç 434 ATCAAGTCTTTTACTCAGAGACTGGAGACCACGCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTG 493
|||||

NCBI 2329 ATCAAGTCTTTTACTCAGAGACTGGAGACCACGCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTG 2388

1046 bç 494 AACCTCCGACTTTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAG 553
|||||

NCBI 2389 AACCTCCGACTTTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAG 2448

1046 bç 554 CCATGCAGGCTTATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCACTGAG 613
 |||
 NCBI 2449 CCATGCAGGCTTATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCACTGAG 2508

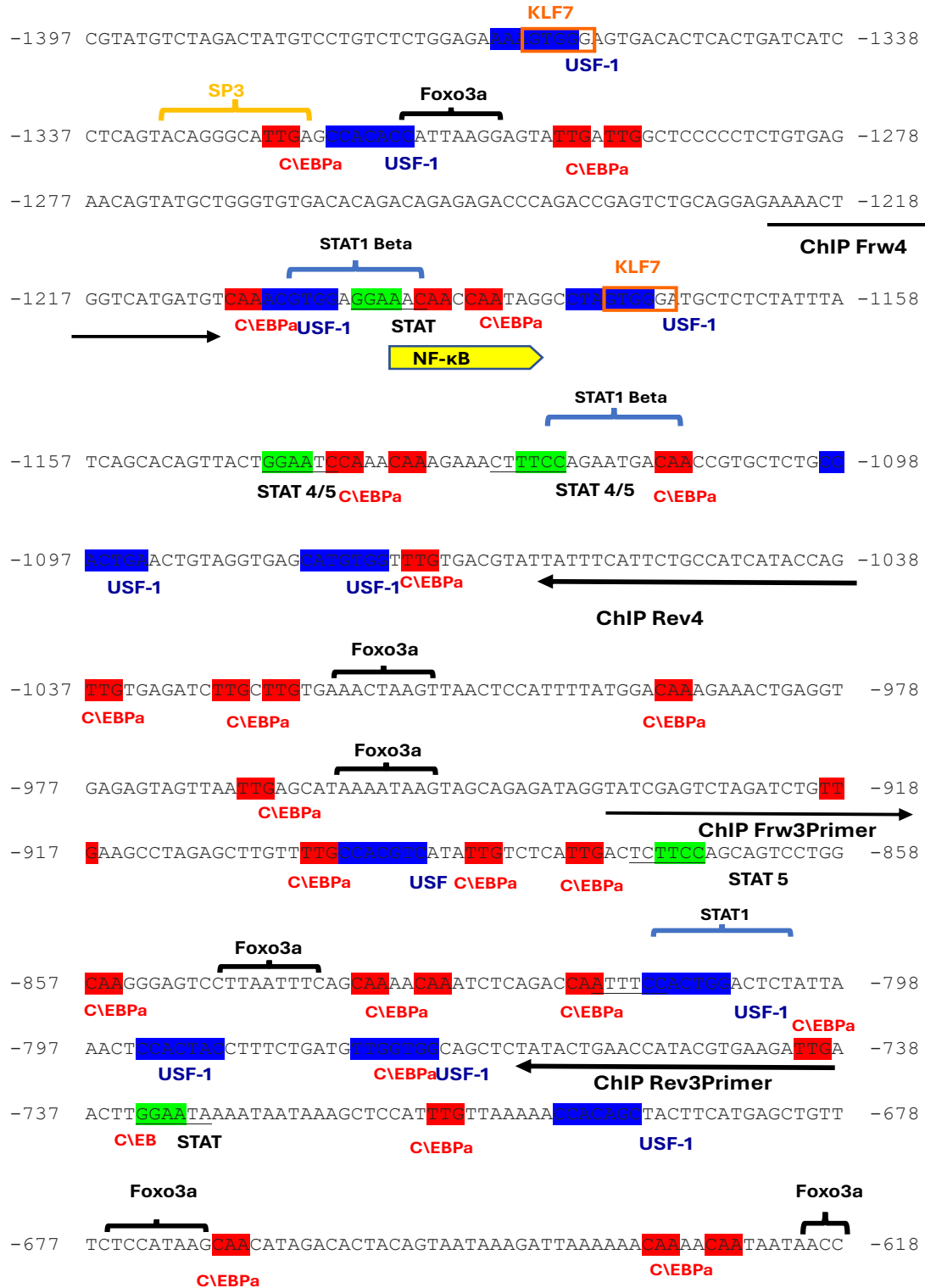
1046 bç 614 GACTGCGTCTCCCGGAAGTATTTCCCTGAGAAATGCAGAGGACCTCAGTCCTGCAACTC 673
 |||
 NCBI 2509 GACTGCGTCTCCCGGAAGTATTTCCCTGAGAAATGCAGAGGACCTCAGTCCTGCAACTC 2568

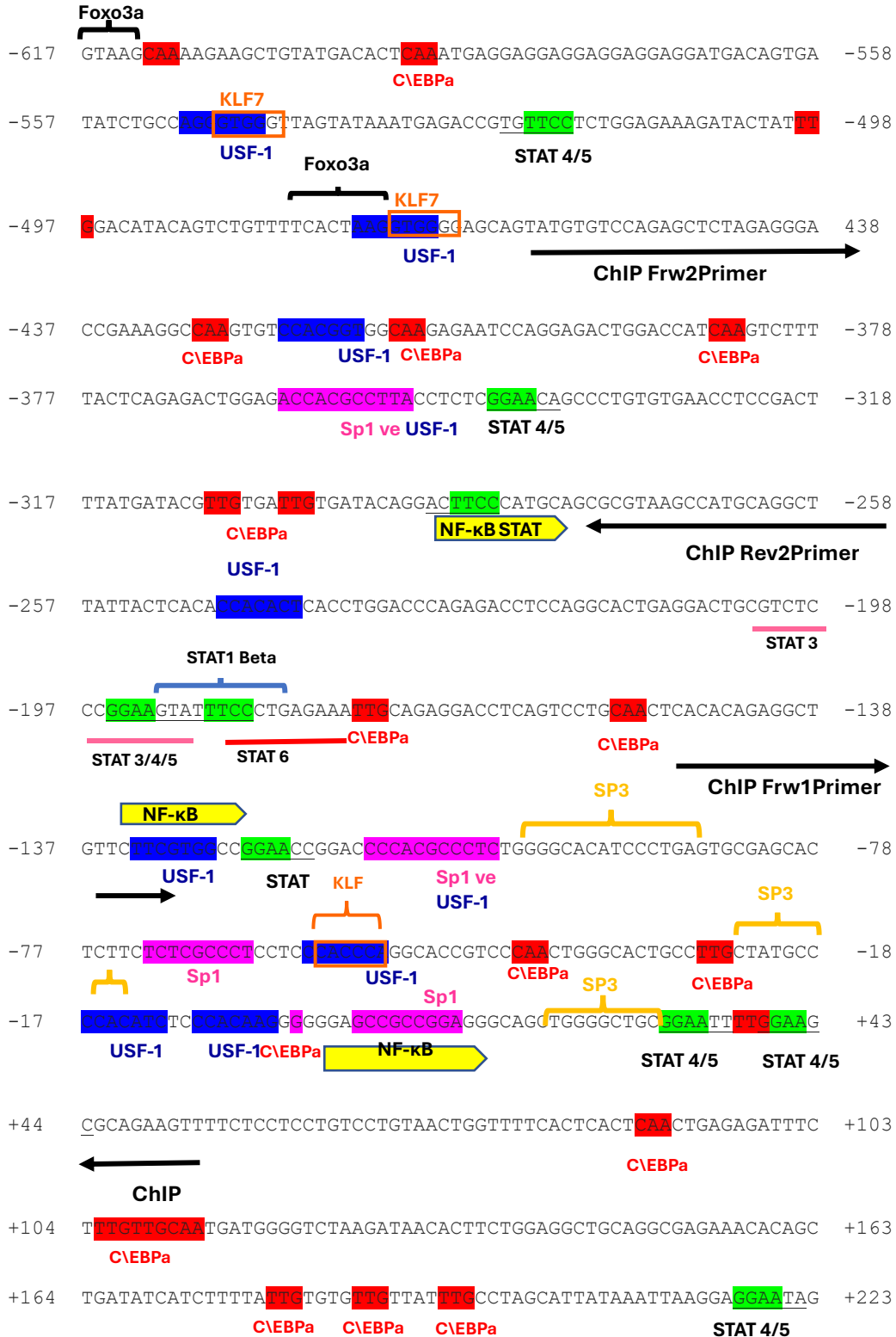
1046 bç 674 ACACAGAGGCTGTTCTTCGTGGCCGGAACCGGACCCACGCCCTCTGGGGCACATCCCTG 733
 |||
 NCBI 2569 ACACAGAGGCTGTTCTTCGTGGCCGGAACCGGACCCACGCCCTCTGGGGCACATCCCTG 2628

1046 bç 734 AGTGCGAGCACTCTTCTCTCGCCCTCTCCCACCCAGGCACCGTCCCAACTGGGCACTGC 793
 |||
 NCBI 2629 AGTGCGAGCACTCTTCTCTCGCCCTCTCCCACCCAGGCACCGTCCCAACTGGGCACTGC 2688

1046 bç 794 CTTGCTATGCCCCACATCTCCACAAG 820
 |||
 NCBI 2689 CTTGCTATGCCCCACATCTCCACAAG 2715

EK C: Transkripsiyon Faktörlerinin MIR100HG Promotoruna Olası Bağlanma Bölgeleri





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Rümeysa Alaçam

Doğum tarihi ve yeri : 11.01.1999/ANKARA

e-posta : rumeysaalacam@hotmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2021
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017
Lise	Özel Sincan Final Temel Lisesi	2013