

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



**NONO/ p54nrb Geninin Endotel Hücrelerinde Moleküler  
Karakterizasyonu**

**KÜBRA PASPAL EROĞLU**

**201512620002**

**DOKTORA TEZİ**

**Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)**

**Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ**

**Doç. Dr.Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU**

**Doç. Dr. Aylin ŞAHİN ER**

**Dr. Öğr. Üyesi. Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN**

**BALIKESİR, OCAK,2022**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**NONO/ p54NRB GENİNİN ENDOTEL HÜCRELERİNDE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**” 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.

KÜBRA PASPAL EROĞLU

(İmza)



## ÖZET

### **NONO/ P54NRB GENİNİN ENDOTEL HÜCRELERİNDE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ  
KÜBRA PASPAL EROĞLU  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

*Paraspecklelar* oldukça yeni aydınlatılan memeli hücre çekirdeğinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoproteinlerdir. Paraspeckles proteinler, non-POU domain containing octamer binding (non-POU domain içeren oktomer bağlanma proteini), (NONO/p54nrb), paraspeckle protein 1 (PSPC1) ve splicing factor proline and glutamine rich (PSF/SFPQ)'i içeren memeli DBHS (*Drosophila melanogaster* behavior, human splicing) protein ailesi proteinleridir. Ayrıca paraspeckle yapısında kodlanmayan RNA, NEAT1 bulunmaktadır. NONO/p54nrb kanserleşme, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, inflamasyon, splicing, DNA sentezi ve onarımı, mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya geçişinin kontrolü de dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Bu tez çalışmasıyla ilk defa NONO/p54nrb geninin anjiyogenez ile ilişkisi aydınlatılmıştır. NONO/p54nrb geninin ve diğer paraspeckle üyelerinin anjiyogenezin en önemli regülatörleri olan VEGF sitokini ve hipoksi ile ilişkili olduğu ilk defa bu çalışmada Real Time PCR ve western blot deneyleriyle mRNA ve protein seviyesinde doğrulanmıştır. Hem normal koşullarda hemde hipoksik koşullarda VEGF sitokini uygulanan deney gruplarında mRNA ve protein seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Bu veriler VEGF yolağı inhibisyon deneyleri ile de desteklenmiştir. Ayrıca NONO/p54nrb promotörünün da VEGF yolağı ve hipoksi ile ilişkili olduğu lüsiferaz reporter deneyleri ile doğrulanmıştır. NONO/p54 nrb geninin paraspeckle genleri için önemli ve gerekli olduğu NONO/p54nrb ifadesinin baskılanmasından ve aşırı ekspresyonundan diğer paraspeckle genlerinin de etkilendiği ilk defa bu tez çalışmasında overekspresyon ve knockdown deneyleri ile doğrulanmıştır. Overekspresyon ve knockdown deneyleri sonrasında gerçekleştirilen MTT, çizik testi ve koloni formasyon deneyleri ile NONO/p54nrb geninin hücre sağkalımı, poliferasyonu, göçü gibi hücresel süreçlerde rol oynadığı doğrulanmıştır. Tüm bu çalışmalar NONO/p54nrb geninin anjiyogenezde önemli rolü olduğunu ve kanserleşme sürecinde görev aldığını göstermiştir. Bu verilerin daha ileri kanser araştırmalarında araştırmacılara ışık tutacağı öngörülmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** NONO/p54nrb, Paraspeckles, VEGF, Hipoksi, HUVEC, Overekspresyon, Knockdown

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NONO/ P54NRB GENE IN ENDOTHELIAL CELLS**

**PH.D THESIS  
KÜBRA PASPAL  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY  
(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR )**

**BALIKESİR, DECEMBER - 2021**

Paraspeckles are ribonucleoproteins found in the interchromatin space of the mammalian cell nucleus that has been recently enlightened. Paraspeckles proteins are mammalian DBHS protein family proteins consisting of non-POU domain containing octamer binding (NONO/p54nrb), paraspeckle protein 1 (PSPC1) and splicing factor proline and glutamine rich (PSF/SFPQ) proteins. In addition, there is an uncoded RNA, NEAT1, in the paraspeckle structure. NONO/p54 nrb is involved in a variety of biological processes. With this thesis study, the relationship of NONO / p54nrb gene with angiogenesis has been elucidated. The association of NONO / p54 nrb gene and other paraspeckle members with VEGF cytokine and hypoxia, which are the most important regulators of angiogenesis, was confirmed by Real Time PCR and western blot experiments. In both normal and hypoxic conditions, an increase in mRNA and protein levels was observed in experimental groups. These data are supported with VEGF pathway inhibition assays. Luciferase reporter experiments confirmed that the NONO / p54nrb promoter is also associated with the VEGF pathway and hypoxia. The fact that the NONO / p54 nrb gene is important and necessary for paraspeckle genes has been confirmed by overexpression and knockdown experiments. It was confirmed that NONO / p54nrb gene plays a role in cellular processes. All these studies have shown that the NONO / p54nrb gene has an important role in angiogenesis and plays a role in the cancer process.

**KEYWORDS:** NONO/p54nrb, Paraspeckles, VEGF, Hypoxia, HUVEC, Over Expression, Knockdown

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Paraspeckles .....	1
1.2 NONO/p54nrb Geni .....	2
1.2.1 NONO/p54nrb Geninin Görevleri.....	4
1.3 Anjiyogenez .....	8
1.4 VEGF .....	9
1.4.1 VEGF TİPLERİ .....	9
1.4.1.1 VEGF-A .....	9
1.4.1.2 VEGF-B.....	11
1.4.1.3 Placenta Growth Factor (Placenta Büyüme Faktörü) .....	12
1.4.1.4 VEGF-C.....	12
1.4.1.5 VEGF-D .....	12
1.4.1.6 VEGF-E (viral VEGF) .....	13
1.4.1.7 Endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF) .....	13
1.4.2 Anjiyogenez ve VEGF / VEGFR Yolağı .....	14
1.5 HİPOKSİ.....	15
1.5.1 HIF-1'in Oksijene Bağlı Regülasyonu .....	16
1.5.2 Hipoksi Oluşturma Teknikleri.....	18
1.5.2.1 Kimyasal Bileşikler Tarafından Prolil Hidroksilazların İnhibisyonu ile HIF-1 $\alpha$ Stabilizasyonu .....	18
1.5.2.2 Fiziksel Olarak Hücre Kültüründe Hipoksik Koşul Oluşturma .....	19
<b>2. TEZ ÇALIŞMASININ PLANI VE KAPSAMI</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>24</b>
3.1 Materyal .....	24
3.1.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri.....	24
3.1.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları .....	29
3.1.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları .....	30
3.1.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler .....	30
3.1.1.5 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları .....	32
3.2 Yöntemler .....	32
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu.....	32
3.2.1 Hücre Tabanlı Teknikler .....	33
3.2.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması .....	33
3.2.1.1.1 Hücre Kültürü Besi Yerinin Hazırlanması .....	33

3.2.1.1.1.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.2.2 Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması.....	33
3.2.2.1 Hücrelerin Pasajlanması .....	34
3.2.2.2 Hücrelerin Dondurulması .....	34
3.2.2.3 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı .....	35
3.2.2.4 Hücre Soylarının Deney Kaplarına Alınması ve Hipoksik Koşul Oluşturulması ..	35
3.2.2.5 Sitokin ve Yolak İnhibitörlerinin Uygulanması .....	35
3.2.2.6 Geçici Transfeksiyon Çalışmaları .....	36
3.2.2.7 Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü.....	38
3.2.2.8 IFC (immünofloresans) Deneyi.....	38
3.2.2.9 Sitotoksite Deneyleri (MTT) .....	39
3.2.2.10 Çizik Testi .....	40
3.2.2.11 Koloni Formasyon.....	40
3.2.3 Klonlama Çalışmaları.....	40
3.2.3.1 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması .....	40
3.2.3.2 NONO/p54nrb Geninin pGFP Vektörüne Klonlanması .....	41
3.2.3.2.1.1 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	41
3.2.3.2.1.2 Agaroz Jel Elektroforezi ve DNA Pürifikasyonu .....	41
3.2.3.2.1.3 T: A Klonlama .....	41
3.2.3.3 Ligasyon Ürününün Kompetant Hücrelerine Transformasyonu .....	42
3.2.3.4 Küçük Ölçekli (Mini-Prep) Plazmit DNA İzolasyonu .....	42
3.2.3.5 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi .....	42
3.2.3.6 pEGFP-C1 Vektörüne Alt Klonlama .....	43
3.2.3.7 NONO/p54nrb Geni sh-RNA Oligolarının pLKO.1 Vektörüne Klonlanması.....	44
3.2.3.7.1.1 NONO/p54nrb Genine Özgü sh-RNA Oligolarının Belirlenmesi.....	44
3.2.3.7.1.2 shRNA Oligolarının Birleştirilmesi.....	44
3.2.3.7.1.3 pLKO.1 TRC Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi.....	44
3.2.3.7.1.4 pLKO.1 TRC Vektörü ve sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi.....	45
3.2.3.8 Çok Kopyalı Plazmid DNA İzolasyonu (Maxiprep).....	45
3.2.4 RNA ile İlgili Teknikler .....	46
3.2.4.1 RNA İzolasyonu .....	46
3.2.4.2 RNA Miktar Tayini .....	46
3.2.4.3 RNA Jel Elektroforezi .....	46
3.2.4.4 <i>qRT-PCR Reaksiyonu</i> .....	47
3.2.4.5 Real Time PCR.....	47
3.2.5 Protein ile İlgili Teknikler.....	49
3.2.5.1 Western Blotting Metodu ile Protein Tayini .....	49
3.2.5.1.1.1 Total Hücre Ekstraktının Hazırlanması .....	49
3.2.5.1.1.2 Protein Miktarının Belirlenmesi .....	49
3.2.5.1.1.3 SDS-PAGE.....	50
3.2.5.1.1.4 SDS Jelinin PVDF Membrana Blotlanması ve Antikorlarla Muamele İşlemi ...	50
3.3 İstatiksel Analiz .....	51
<b>4. BULGULAR VE SONUÇLAR.....</b>	<b>52</b>

4.1 VEGF Sitokinin İnsan NONO/p54nrb Geni ve Diğer Paraspeckles Bileşenlerinin Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Belirlenmesi.....	52
4.1.1 VEGF Sitokinin İnsan NONO/p54nrb Geni ve Diğer Paraspeckles Bileşenlerinin Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi .....	52
4.2 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Belirlenmesi .....	65
4.2.1 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi.....	65
4.2.2 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	70
4.2.3 VEGF Yolağı İnhibitörlerinin NONO/p54nrb Geni Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi .....	72
4.3 NONO/p54nrb Geninin Aşırı İfade Ettirilmesi Çalışmaları .....	77
4.3.1 Klonlama Çalışmaları.....	77
4.3.1.1 Primerlerin Dizayn Edilmesi .....	77
4.3.1.2 İnsan NONO/p54nrb Geninin pGEMT-easy Vektörüne Klonlanması .....	80
4.3.1.3 İnsan NONO/p54nrb Geninin p GFP-C1 Vektörüne Klonlanması.....	82
4.3.2 Transfeksiyon Çalışmaları .....	84
4.3.2.1 NONO/p54 nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesi Çalışmaları .....	84
4.3.2.1.1 NONO/p54 nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesinin hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması ve Diğer Paraspeckle Bileşenlerinin mRNA seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi.....	84
4.3.2.1.2 NONO/p54 nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesinin hipoksik ve normoksik koşullar altında Protein Seviyesinde Doğrulanması .....	87
4.3.2.1.3 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesinin hipoksik ve normoksik koşullar altında IFC Deneyi ile Doğrulanması ve NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	90
4.3.2.2 Hücresel Karakterizasyonun Belirlenmesi .....	93
4.3.2.2.1.1 Sitotoksite Deneyleri (MTT) .....	93
4.3.2.2.1.2 Çizik Testi.....	94
4.3.2.2.1.3 Koloni Formasyon Deneyi .....	98
4.4 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanması Çalışmaları	100
4.4.1 Klonlama Çalışmaları.....	100
4.4.2 Transfeksiyon Çalışmaları .....	102
4.4.2.1 NONO/p54 nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanması Çalışmaları .....	102
4.4.2.1.1 NONO/p54 nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması ve Diğer Paraspeckle Bileşenlerinin m RNA seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi.....	102
4.4.2.1.2 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanmasının Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinde Doğrulanması .....	105
4.4.2.2 Hücresel Karakterizasyonun Belirlenmesi .....	106
4.4.2.2.1.1 Sitotoksite Deneyleri (MTT) .....	106



4.4.2.2.1.2 Çizik Testi.....	107
4.4.2.2.1.3 Koloni Formasyon Deneyi .....	111
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>113</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>123</b>
EK A Kullanılan Büyüklük Markerları .....	136
EK B Sekans Sonuçları .....	138
B3.pKLO. TRC Plazmidi Sekans Sonuçları.....	142
B4.İnsan NONO/p54nrb Promotor Bölgesi.....	142



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 :NONO/p54nrb 'nin X kromozomu üzerindeki lokasyonu [10].....	3
Şekil 1.2:VEGF sinyal yolağının şematik gösterimi [90]. ....	15
Şekil 1.3: Oksijen düzeyine bağlı HIF-1 $\alpha$ stabilizasyonu ve transaktivasyonu [110]. ....	18
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılacak basamakları özetleyen akış diyagramı. ....	23
Şekil 3.1:p EGFP-C1, p GEMT-easy, pLKO.1- TRC vektörlerinin şematik gösterimi. ....	31
Şekil 3.2: HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial cells) hücre hattı mikroskop görüntüsü. ....	32
Şekil 3.3:MTT metodu ile oluşan kimyasal değişim .....	39
Şekil 3.4:Bradford Yöntemi Standart Eğri Grafiği .....	50
Şekil 4.1:RNA jel görüntüsü ( 1-normoksi kontrol 2-normoksi 1.saat 3- normoksi 6.saat 4-normoksi 24. Saat 5- normoksi 48.saat 6-hipoksi kontrol 7- hipoksi 1.saat 8-hipoksi 6.saat 9- hipoksi 24. Saat 10- hipoksi 48.saat).....	52
Şekil 4.2: H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M:Marker 1-normoksi kontrol 2-hipoksi kontrol 3- hipoksi 1.saat 4- hipoksi i 6.saat 5- hipoksi 24. Saat 6- hipoksi 48.saat 7-pozitif kontrol 8-negatif kontrol) .....	53
Şekil 4.3:H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1-normoksi kontrol 2-normoksi 1.saat 3- normoksi 6.saat 4-normoksi 24. Saat 5-normoksi 48.saat 6-pozitif kontrol 7-negatif kontrol) .....	54
Şekil 4.4:Normoksik koşullarda VEGF sitokinin NONO/p54 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.....	54
Şekil 4.5: Hipoksik koşullarda VEGF sitokinin NONO/p54 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.....	55
Şekil 4.6:Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF-1 $\alpha$ geni ekspresyonunun değişimi..	56
Şekil 4.7:Normoksik koşullarda VEGF sitokinin PSF/SPFQ geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.....	56
Şekil 4.8:Normoksik koşullarda VEGF sitokinin PSpC1 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.....	57
Şekil 4.9:Normoksik koşullarda VEGF sitokinin NEAT1 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.....	57
Şekil 4.10:Normoksik ve hipoksik koşullar altında NONO/P54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi. a) Normoksik koşullar altında NONO/P54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi. b) Hipoksik koşullar altında NONO/P54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi. ....	60
Şekil 4.11: Promotor parçalarının restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. (M=marker, 1: -159/+529,2: -336/+529,3: -516/+529,4: -730/+529).....	62
Şekil 4.12:NONO/p54nrb P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçaları temsili diyagramı. ....	63
Şekil 4.13:NONO/p54nrb P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçalarının normoksik ve hipoksik koşullarda HUVEC hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri.....	64
Şekil 4.14:NONO/p54nrb P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçalarının normoksik ve hipoksik koşullarda HUVEC hücrelerinde	

bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve VEGF in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.....	65
<b>Şekil 4.15:</b> RNA jel görüntüsü (1-Normoksi Kontrol 2- Normoksi VEGF 3- Normoksi VEGF +Mek İn. 4- Normoksi VEGF +Wortmannin İn. 5- Normoksi VEGF +SP600125 İn. 6- Normoksi VEGF +PD169136).....	66
<b>Şekil 4.16:</b> RNA jel görüntüsü (1-Hipoksi Kontrol 2- Hipoksi VEGF 3- Hipoksi VEGF +Mek İn. 4- Hipoksi VEGF +Wortmannin İn. 5- Hipoksi VEGF+SP600125 İn. 6- Hipoksi VEGF +PD169136).....	66
<b>Şekil 4.17:</b> H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M:Marker 1-Normoksi Kontrol 2- Normoksi VEGF 3- Normoksi VEGF +Mek İn. 4- Normoksi VEGF + Wortmannin 5- Normoksi VEGF +SP600125 İn. 6- Normoksi VEGF +PD169136 7-Pozitif Kontrol 8-Negatif Kontrol). ....	67
<b>Şekil 4.18:</b> H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M: Marker1-Hipoksi Kontrol 2- Hipoksi VEGF 3- Hipoksi VEGF +Mek İn. 4- Hipoksi VEGF + Wortmannin İn. 5- Hipoksi VEGF+SP600125 İn. 6- Hipoksi VEGF +PD169136 7-Pozitif Kontrol 8-Negatif Kontrol).....	67
<b>Şekil 4.19:</b> Normoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin NONO/p54 nrb ekspresyonuna m RNA seviyesinde etkisi grafiğı. ....	68
<b>Şekil 4.20:</b> Hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin NONO/p54 nrb ekspresyonuna m RNA seviyesinde etkisi grafiğı. ....	69
<b>Şekil 4.21:</b> VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik ve hipoksik koşullar altında insan NONO/p54 nrb geni üzerine protein düzeyinde etkisi. ....	71
<b>Şekil 4.22:</b> NONO/p54nrb P1: -730/+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.....	73
<b>Şekil 4.23:</b> NONO/p54nrb P2: -516 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.....	74
<b>Şekil 4.24:</b> NONO/p54nrb P3: -336 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.....	75
<b>Şekil 4.25:</b> NONO/p54nrb P4: -159 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.....	76
<b>Şekil 4.26:</b> İnsan NONO/p54nrb gradient PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker 1-50 oC 2-52 oC 3- 54 oC 4- 55oC, 5- 57 oC,6- 60 oC, 7-63 oC 8- 65 oC 9-pozitif kontrol 10-negatif kontrol).....	81
<b>Şekil 4.28:</b> Kontrol kesim görüntüsü ((M: Marker 1-2 XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş plazmid).....	82
<b>Şekil 4.29:</b> XhoI ve HindIII Restriksiyon enzimi kesim görüntüsü (M: Marker 1-3 NONO/p54 nrb geni içeren kesilmiş p GEMT- easy plazmidi,4-7 linner hale getirilmiş boş p GFP-C1 plazmidi. ....	83
<b>Şekil 4.30:</b> XhoI ve HindIII Restriksiyon enzimi kontrol kesim görüntüsü (M: Marker1-2 NONO/p54 nrb geni içeren kesilmiş p GFP-C1 plazmidi).....	84
<b>Şekil 4.31:</b> NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NONO/p54nrb geni mRNA seviyesine etkisi. ....	85
<b>Şekil 4.32:</b> NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin PSF/SPFQ geni mRNA seviyesine etkisi. ....	86
<b>Şekil 4.33:</b> NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin PSPC1 geni mRNA seviyesine etkisi.....	86
<b>Şekil 4.34:</b> NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NEAT1 geni mRNA seviyesine etkisi.....	87
<b>Şekil 4.35:</b> NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NONO/p54nrb geni protein seviyesine etkisi. ....	89

<b>Şekil 4.36:</b> Normoksi Koşullarda Transfeksiyon Sonrası IFC Deneyi Sonuçları.....	91
<b>Şekil 4.37:</b> Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası IFC Deneyi Sonuçları. ....	92
<b>Şekil 4.38:</b> NONO/p54 nrb geni içeren p- EGFP C1 transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra MTT sonuçları.....	93
<b>Şekil 4.39:</b> Normoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Çizik Testi Sonuçları. ....	96
<b>Şekil 4.40:</b> Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Çizik Testi Sonuçları .....	98
<b>Şekil 4.41:</b> Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Koloni Formasyon Deneyi Sonuçları .....	99
<b>Şekil 4.42:</b> pLKO.1-TRC plazmitinin EcorI ve AgeI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü (M:marker 1-6 p KLO vektörünün restriksiyon enzimi kesim görüntüsü).....	101
<b>Şekil 4.43:</b> EcoRI ve NcoI Restriksiyon enzimi kesim görüntüsü (M: Marker 1-5 NONO/p54 nrb ShRNA oligolarını içeren kesilmiş pLKO.1 TRC plazmidi). ....	101
<b>Şekil 4.44:</b> NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NONO/p54nrb geni mRNA seviyesine etkisi. ....	103
<b>Şekil 4.45:</b> NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının PSF/SPFQ geni mRNA seviyesine etkisi. ....	104
<b>Şekil 4.46:</b> NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının PSPC1 geni mRNA seviyesine etkisi. ....	104
<b>Şekil 4.47:</b> NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NEAT1 geni mRNA seviyesine etkisi. ....	104
<b>Şekil 4.48:</b> NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NONO/p54nrb geni protein seviyesine etkisi. ....	106
<b>Şekil 4.49:</b> NONO/p54 nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan 24 ,48 ve 72 saat sonra MTT sonuçları .....	107
<b>Şekil 4.50:</b> Normoksik koşullarda NONO/p54 nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra çizik testi sonuçları .....	109
<b>Şekil 4.51:</b> Hipoksik koşullarda NONO/p54 nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra çizik testi sonuçları .....	111
<b>Şekil 4.52:</b> NONO/p54 nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra koloni formasyon testi sonuçları.....	112

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1:</b> Hücre kültürü deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.....	24
<b>Tablo 3.2 :</b> Sitokin ve yolak inhibisyon deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi .....	25
<b>Tablo 3.3:</b> Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.....	25
<b>Tablo 3.4:</b> RNA eldesi ve kontrolü deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.	26
<b>Tablo 3.5:</b> DNA eldesi ve kontrolü deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.....	27
<b>Tablo 3.6:</b> Protein çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.....	28
<b>Tablo 3.7:</b> Çalışmada kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	29
<b>Tablo 3.8:</b> Çalışmada kullanılan inhibitörler.....	36
<b>Tablo 3.9:</b> Real time PCR koşulları.....	47
<b>Tablo 3.10:</b> HIF-1 $\alpha$ , NONO/P54nrb, H- $\beta$ -2 Microglobulin, NEAT1, PSF-SPFQ, PSPC1 ekspresyon primeri.....	48
<b>Tablo 4.1:</b> H $\beta$ 2 geni ekspresyon primerleri için PCR şartları .....	53
<b>Tablo 4.2:</b> NONO/p54nrb Geni primerleri için PCR şartları .....	80

## SEMBOL LİSTESİ

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

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve tezimin her aşamasında çalışmalarına ışık tutan ve bana her konuda destek olan, tecrübelerinden faydalanırken hoşgörü ve sabrını hiç esirgemeyen Değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Üniversite eğitimime ilk başladığım andan itibaren bütün eğitimim boyunca özveriyle bilgisini, sabrını ve insani ilgisini esirgemeyen, beni yönlendiren, destekleyen hocam Prof.Dr. Sezai TÜRKEL'e,

Tez izleme komitesinde bulunarak değerli fikirleriyle tezime katkıda bulunan Doç. Dr. Aylin ŞAHİN ER ve Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN'e,

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman katkıda bulunan hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM ve Doç.Dr.Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na,

Doktora eğitimim boyunca bana hocadan öte bir abla gibi yaklaşan Dr. Öğr. Üyesi Meltem ALPER'e

Doktora eğitimim süresince her zaman samimiyetlerine inandığım ve beni destekleyen Arş.Gör.Dr. Nelin HACIOĞLU, Uzm.Dr. Esra Tokay, Dr. Öğr. Üyesi Derya OKUYAN ve Dr. A.Tuğşen AYDEMİR'e ,

Doktora eğitimim süresince ve özel hayatımda yanımda olan bir çok güzel anı biriktirdiğim, kardeşlerim Uzm.S. Derya KESKİN ve Uzm. Candan ALTUNTAŞ'a,

Eve geldiğimde beni enerjisiyle dinlendiren ev arkadaşım kardeşim Fikriye ŞAHİN'e

Dostluklarına güvendiğim laboratuvar arkadaşlarım Dr.Merve KAHRAMAN, Uzm. Kamil TOK, Uzm. M.Ehed AYMAZ, Uzm. Mesut ACAR, Uzm. Serhad ONAT, Uzm. Emre YANIK, Uzm. Burcu EFE, Uzm. Fatma POYRAZLI, Feyza Nur SAV ve Yasemin KELEŞ'e Bugünlere gelmemde emeği olan, maddi ve manevi desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen, yorulduğumda bana güç veren, varlıklarından ve desteklerinden sonsuza kadar minnettar kalacağım annem Hatice Deniz PASPAL, babam Dr.Kamil PASPAL ve kardeşim Dr.Büşra PASPAL'a

Hayatıma girdiği günden beri beni her şartta destekleyen her zaman yanımda olduğunu hissettiğim varlığından mutluluk ve huzur duyduğum can yoldaşım Erdal EROĞLU'na Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2021**

**KÜBRA PASPAL EROĞLU**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Paraspeckles

*Paraspeckles* oldukça yeni aydınlatılan memeli hücre çekirdeğinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoproteinlerdir. Bunlar nükleusta bulunan bir proteinin belli bir bölgede biriktiği ve bilinen herhangi nükleer yapı markerı ile eşleşmediğinin keşfi ile bulunmuşlardır. Paraspeckleler sadece memeli hücrelerinde bulunur. Sağlıklı ve kanserli hücrelerde görülmüştür.

Paraspecklelerin ilk keşfinden sonra, protein ile birlikte RNA içerdikleri anlaşılmıştır. Paraspeckleler RNAaz ile inkübe edildikten sonra degrades olmuş fakat DNaz 1 bu yapıyı bozmamıştır. Ayrıca tüm Paraspeckle proteinleri RNA-bağlanma domaini içerir. Aktif pol II yokluğunda birbirinden ayrılırlar varlığında tekrar birleşirler. Paraspeckle oluşumu RNA üretimine bağlı olarak oluşur [1].

Paraspeckles proteinler, non-POU domain içeren oktomer bağlanma proteini, (NONO/p54nrb; non-POU domain containing octamer binding), paraspeckle protein 1 (PSPC1) ve glutamine zengin splicing faktör proline (PSF/SFPQ; splicing factor proline and glutamine rich) içeren memeli DBHS (*Drosophila melanogaster* behavior, human splicing) protein ailesi proteinleridir.

Bu üç proteinin iki RNA tanıma motifi (RRM; RNA Recognition Motif) ve karboksil ucunda %50 sekans benzerliği vardır. HeLa hücre hattında yüksek seviyede eksprese olan iki DBHS proteininin (NONO/P54nrb ve PSF/SFPQ) ifadesinin azalması paraspeckles formasyonunun bozulmasına sebep olur.

Genomda protein kodlamayan çok sayıda RNA bulunur. Bu RNA'ların çok çeşitli rolleri vardır. 2007 yılında Hutchinson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 3 tane uzun protein kodlamayan RNA bulunmuştur Birincisi XIST RNA (X-inactive specific transcript), ikincisi NEAT1 (MEN-ε/β veya VINC-1), üçüncüsü MALAT1 (NEAT2) dir. NEAT1 ve MALAT1 çok yakından bağlantılıdır. NEAT1 ve MALAT1 çekirdekte zengin olmalarının yanı sıra, genlerinden uzun RNA olarak transkribe edilip 3' ucundan kesilirler ve küçük taşıyıcı molekül oluştururlar. Her ikisi de paraspecklelerde bulunur. NEAT1 paraspeckle



oluşumu ve sürdürülmesi için zorunludur. NEAT1 transkripsiyon inhibisyonu ve NEAT1 susturulmasından sonra paraspeckle tekrar oluşmaz [1].

NEAT1, insan kromozom 11'de spesifik bir lokustan, alternatif 3' uç işlemenin bir sonucu olarak iki ayrı izoform, NEAT1\_1 (3.7 kb) veya NEAT1\_2 (22.7 kb) halinde transkribe edilir. NEAT1\_2 paraspeckle formasyonu için vazgeçilmezdir. NEAT1\_1, poliadenile edilirken NEAT1\_2, bir poli (A) kuyruğu içermez ve bunun yerine 3' ucunda bir üçlü sarmal (TH) yapı içerir [2]. Elektron mikroskopik (EM) ve süper-çözünürlüklü mikroskopik (SRM) analizler, paraspeckle yapısının son derece düzenli olduğunu ortaya çıkarmıştır. NEAT1\_1'nin 5'ucu ve NEAT1\_2'nin 3'ucu nükleusun dışında yer alırken, NEAT1\_2'nin orta bölgesi çekirdeğin içinde yer alır [3]. NEAT1'in transkripsiyonu, çeşitli koşullar tarafından artar, sonuçta paraspeckle'ların büyüklüğü ve sayısında bir artış olur. Bundan dolayı gen ekspresyonunu kontrol etmek için nükleoplazmadan spesifik RBP (RNA bağlanma proteinleri) ve/veya RNA'ları ayırılabilir [4, 5]. Fizyolojik olarak NEAT1, farelerde korpus luteum gibi spesifik dokuların gelişimi için gereklidir ve çeşitli kanserlerin ilerlemesinde rol oynar [6, 7]. İnsan haploid hücre hattında NEAT1\_2 kısımlarının CRISPR/Cas9 aracılı sistemik delesyonlarını gerçekleştirerek NEAT1\_2 stabilizasyonu, NEAT1 izoform oluşması, paraspeckle kompleksi için önemli olan üç işlevsel açıdan ayrı domain aydınlatılmıştır. Paraspeckle yapısı için gerekli ve yeterli olan orta domain üç fonksiyonel alt domain içermektedir. NEAT1\_2 subdomaini tercihli olarak NONO ve SFPQ'yu bağlanır ve *in vitroda* paraspeckle kompleksinin bir arada durmasını indükler. NEAT1\_2 subdomainleri, diğer PSP'ler (paraspeckle protein) ile oligomerizasyonu başlatmak için, NONO dimerini ile bağlantı kurar, paraspeckle yapısının oluşumunu teşvik eder [8].

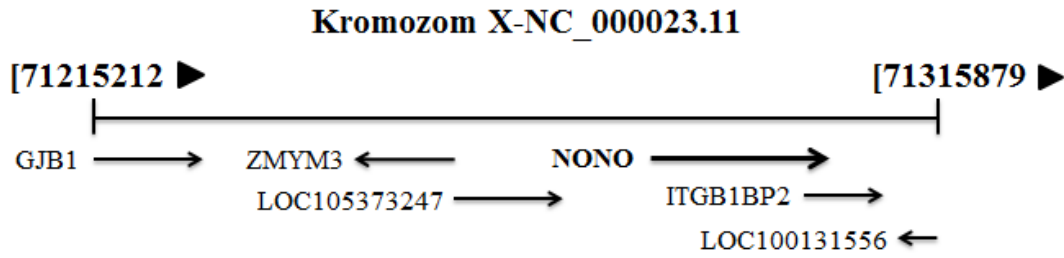
## 1.2 NONO/p54nrb Geni

*S.cerevisiae* splicing factor PRP18 (Retinitis pigmentosa 18)'in insandaki homologu araştırılırken antikora güçlü bağlanan bir polipeptid bulunmuştur. Ayrıca HeLa (Henrietta Lacks) hücrelerinin PRP18 antiserumu ile in direkt immunfloran boyamasında nükleus cisimcikleri boyanmıştır. HeLa hücrelerinden western blot ile purifiye edilmiş 54 kDa büyüklüğünde protein NONO/p54nrb olarak isimlendirilmiştir. NONO/p54nrb kodlayan cDNA klonları oluşturulmuştur. Fakat 5' UTR bölgesindeki alternatif kesim ile birbirinden ayrılırlar. Bu cDNA'lar 471 aminoasitlik protein kodlarlar ve iki RNA tanıma motifi

içerirler. İnsan, NONO/p54nrb maya PRP18 ile ortak epitop hariç homoloji göstermemektedir. Fakat PSF ile %71 (320 aminoasitlik bölge) özdeş amino asit dizisi içermektedir Her ikiside RNA tanıma motifi içermektedir. Ek olarak NONO/p54nrb ve PSF ana homoloji bölgesi dışında (N-terminal ucunda) Pro ve Gln amino asitlerince zengindir.

The Drosophila puff-specific protein BJ6, no-ontransient A gene (nonA) geninin alternatif kesim ile kodlanan proteindir ve aynı 320 amino asitlik bölgeyle NONO/p54nrb proteinine %42 özdeştir. NONO/p54nrb PSF ve NONA/BJ6 arasındaki bu homoloji DBHS domain (Drosophila behavior, human splicing) olarak tanımlanan filogenetik korunmuş protein segmenti olduğunu göstermektedir [9].

NONO/p54nrb geni, insanda, X kromozomunun q13.1 bölgesinde bulunup, 11 intron 13 sahiptir. p54nrb/ NONO geninin, 2. kromozomda ve 16. kromozomda yalancı genleri bulunmaktadır. Veri tabanında, **NRB54**, **NONO/P54NRB**, **P54**, **NMT55**, **PPP1R114** olarak isimlendirilmektedir [10].



**Şekil 1.1** :NONO/p54nrb 'nin X kromozomu üzerindeki lokasyonu [10].

### 1.2.1 NONO/p54nrb Geninin Görevleri

NONO/p54nrb geni H295R insan adrenokortikal hücrelerinde susturulduğunda hücre içinde cAMP üretiminin azaldığı ve aynı zamanda kortizol biyosentezinde görevli olan ACTH (adrenokortikotropin hormon) sitümlasyonunda azalma görülmüştür.

Ayrıca NONO/p54nrb'nin ekzoribonükleaz eXRN2 ile ilişki kurarak PDE transkriptlerinin kararlılığında rol oynadığı bulunmuştur. Bu yüzden, NONO/p54nrb steroid reseptör ko-regülatörü olarak da adlandırılır [11].

NONO/P54nrb proteininin transkripsiyonun pek çok aşamasında görev yaptığı tespit edilmiştir. PSF ve NONO/p54nrb, RNA polimeraz II'nin Karboksi Terminal Domainine (CTD) domainine bağlandığı gösterilmiştir. RNA polimeraz II'nin CTD domaini 3' terminasyon için önemlidir. RNA polimeraz II, transkripsiyonunun sonlandırılması için sıklıkla bir poli (A) sinyali ve kesilme faktörleri gerektirir. Ekzonükleaz XRN2 (5'-3' Exoribonuclease 2) tarafından RNA downstream kırığımı teşvik edilir. Ancak XRN2'nin sonlanmaya neden olan 3' işleme faktörlerini nasıl işlediği açık değildir. NONO/P54nrb siRNA aracılı susturulduğunda, XRN2 aktivitesinde ve transkripsiyonun sonlanmasında kusurlar olmuştur [12].

Major spliceosomal Urasilce (U) snRNA'lar (U1, U2, U4 ve U5) RNA polimeraz II (pol II) ile çekirdekte transkribe edilir ve bir m7G-cap yapısı eklenir. Çok hücrelilerde, U snRNA'lar başlangıçta sitoplazmaya gönderilir. UsnRNA'nın sitoplazmaya aktarımı, RNA'da m7G-cap yapısı ve lösün bakımından zengin nükleer ihraç sinyali (NES) reseptörü *CRM1* (*Chromosomal Maintenance 1*) gerektirir. CRM1 ve UsnRNA arasındaki etkileşim iki adaptöre bağlıdır. Bunlardan ilki, *CBP80* (Nuclear cap-binding protein subunit 1) ve *CBP20*'den (Nuclear cap-binding protein subunit 2) oluşan heterodimerik bir protein kompleksi olan nükleer başlık-bağlama kompleksidir (CBC). CBC, yeni oluşan RNA Pol II transkriptlerindeki m7G-cap yapısına bağlanır. UsnRNA'nın sitoplazmaya aktarımı için gerekli olan diğer adaptör, PHAX (Phosphorylated adapter RNA export protein)'tir. PHAX, CBC'ye ve U snRNA'nın cap-proksimal bölgesine bağlanır ve böylece trimerik 'pre-kompleks' oluşur. Pre-kompleks CRM1 ile RanGTP'ye bağımlı bir şekilde etkileşime geçebilir ve sonuç olarak 'UsnRNA aktarım kompleksi' oluşur.

PHAX'in (Phosphorylated Adaptor For RNA Export), CK2 (Casein kinase II) ile fosforilize olarak CRM1 ile etkileşime girer. Sitoplazmaya geçtikten sonra, hem Ran tarafından hem GTP hidrolizi hem de PP2A (Protein phosphatase 2) tarafından PHAX defosforilasyonunu

olur. HeLa hücrelerde RNA substratlarına PHAX bağlanması RNA-bağlayıcı proteinler olan NONO/p54nrb ve PSF ile düzenlenmektedir. Böylece NONO/p54nrb ve PSF, *in vitro* deneylerde U snRNA'nın sitoplazmaya aktarılmasında uyarıcı faktör olarak görev yaptığı bulunmuştur [13].

Hem NONO/p54nrb hem de PSF, protein fosfataz 1 (PP1) consensüs RVxF motifi bulundurur. PP1, NONO/p54nrb ve PSF genlerinin fosforile olma halini düzenler ve dolayısıyla gen ifadesindeki fonksiyonlarını düzenlemiştir.

NONO/p54nrb ve PSF'nin gen transkripsiyonu üzerindeki etkisi karmaşıktır çünkü gen transkripsiyonunu hem pozitif hem de negatif olarak düzenleyebilirler.

Birçok çalışma, NONO/p54nrb ve PSF'nin gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde fosforilasyon durumuna bir yön verdiğini göstermektedir: 1) NONO/p54nrb ve PSF, kinazlarla ve protein fosfotazlarla etkileşime girmektedir ve bunlar serin, treonin ve tirozin residuellerinden fosforlanmaktadır. 2) Protein kinaz C aktivasyonu NONO/p54nrb ve PSF'yi fosforile eder, RNA ve DNA'ya olan afinitelerini değiştirir. 3) PSF, hücre apoptozu sırasında N-terminalinden hiperfosforile edilmiştir, bu da konformasyonunda ve protein etkileşimlerinde değişikliğe neden olur. 4) cAMP, NONO/p54nrb 'yi ve PSF'yi defosforize eden ve daha sonra Sin3A'nın NONO/p54nrb -PSF kompleksinden ayrılmasına ve steroidojenik faktör1'in (aynı zamanda nükleer reseptör ailesinin bir üyesi olan) transkripsiyonel aktivasyona neden olan bilinmeyen protein fosfatazları aktive eder. Bu gözlemler, NONO/p54nrb ve PSF'nin fosforilasyon durumunun protein bağlantılarını belirlediğini ve daha sonra gen transkripsiyonundaki rollerini değiştirdiğini ortaya koymaktadır [14].

NONO/P54nrb koaktivator olarak görev almakta ve PCDH19 (Protocadherin 19) ve NONO/P54nrb birlikte, östrojen nükleer reseptör alfa (ERa) gen ekspresyonunu arttırmaktadır [15].

NONO/p54nrb, transkripsiyonunu güçlendiren ve muhtemelen RNA işlenmesini de güçlendiren AR'nin (Androgen Receptor) koaktivatörü olarak işlev gördüğü belirlenmiştir [16].

Hem PSF hem de NONO/p54nrb, doğrudan mSin3A (SIN3 Transcription Regulator Family Member A ) ile etkileşime girer ve HDAC (Histone deacetylases) kompleksinin alınması yoluyla AR transaktivasyon baskılamasına aracılık eder [17].

Uzun, kodlayıcı olmayan tekrarlar içeren uzun RNA TERRA, telomerlerde RNA/DNA hibritleri oluşturma eğilimindedir. NONO/p54nrb ve SFPQ, TERRA'ya bağlanarak RNA/DNA hibriti oluşumunu önler. Telomer kararlılığını sağlar [18]. NONO/p54nrb ayrıca, cAMP bağlantılı sinyal yolunca görev aldığı düşünülmektedir. NONO/p54nrb susturulduğunda TORC'lar (regulatory-associated protein of TOR) ve dolayısıyla cAMP sinyal yolu durur [19] .

Farklı bir çalışmada, NONO/p54nrb'nin progesteron reseptörü (PR) için korepresör olduğu ve doğumun başlamasında rol oynadığı anlaşılmıştır[20].

NONO/p54nrb ve/veya hnRNPM knockdown edildiğinde miyoblastlarda miyotüp oluşumunun inhibe edildiği görülmüştür. Susturulma ve aşırı ekspresyon yaklaşımlarıyla, NONO/p54nrb ve hnRNPM'nin, promotöre bağımlı bir şekilde IRES'ye (internal ribosome entry site) bağımlı translasyonun aktive edilmesi için gerektiği sonucuna varılmıştır [21].

Meme kanseri hücrelerinde NONO/p54nrb ve SREBP-1'in (Sterol regulatory element-binding protein 1) birbirleriyle ilişkili olduğu ve birbirlerinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. NONO/p54nrb, *in vitro* ve *in vivo* olarak meme kanseri hücrelerinin SREBP-la'ya bağlı hücre çoğalmasını ve tümör büyümesini uyarır [22].

NONO/p54nrb, replikasyonun geç aşamalarında, HIV-1 gen ekspresyonunu ve viral proteinin üretimini etkilemektedir. NONO/p54nrb, HIV-1 enfeksiyonu için elzem olmamakla birlikte, NONO/p54nrb ekspresyonunun azalması HIV-1 geç revers transkripsiyona artmasına sebep olur. Alternatif olarak NONO/p54nrb, HIV-1 mRNA ile etkileşim kurabilir. Eksojen NONO/p54nrb 'nun bir Jurkat T hücre hattında HIV-1 enfeksiyonunu azaltabildiği over ekspresyon deneyleriyle bulunmuştur. Jurkat hücrelerinde NONO/p54nrb'nun susturulması, HIV-1 enfeksiyonunun (2.4 kat) arttırılmasına sebep olmuştur. NONO/p54nrb'nun RTC (reverse transcription complex)'nin bir parçası olarak davranması, DNA ve RNA bağlama motifleri yoluyla HIV-1 ters transkripsiyonunu olumsuz şekilde etkilemesi olasıdır. Ayrıca NONO/p54nrb ve PIC (Pre-integration complex) arasındaki etkileşimin dolaylı mı ,direkt olarak integras yoluyla mı oluştuğu araştırılmıştır. Virüs DNA'sı oluştuğunda integrasın, RTC'lerle ilişkili olduğu ve sitoplazma yoluyla aktarıldığı ve daha sonra PIC'ye dönüştüğü gösterilmiştir [23].

Son yıllardaki araştırmalar, NONO/p54nrb'nun, yara onarımı, kondrojen oluşumu ve fibröz kapağın stabilitesi gibi durumlarda, kollajen oluşumunda ve fibrozda rol oynadığını göstermektedir [24]. NONO/p54nrb, kollajen oluşumu için gerekli gibi görünmektedir: Bu

durumda fonksiyonel kollajen oluşumu için gerekli olan TNF- $\alpha$  aracılı P4Ha1 (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1) supresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak modüle eden bir düzenleyici görevi görmektedir. NONO/p54nrb'nin işlevini inhibe ederek TNF- $\alpha$  aracılı kollajen destrüktürasyonunun bozulması, aterosklerotik plağın fibröz kapağını güçlendirerek koroner hastalığa karşı daha savunmasız hale getirebilir. Aortic Dissection (AD)'li hastalarda NONO/p54nrb ekspresyonu azalır ve bu azalma, aort duvarında artmış kollajen ve fibroz birikimi ile korelasyon gösterir. AD aortasında NONO/p54nrb ekspresyon seviyelerinin azaldığı görülmüştür [25].

NONO/p54nrb 'nin UV-ile indüklenen DNA hasar cevabında görevi ile ilgili çalışmalarda NONO/p54nrb HeLa hücre hattında susturulmuştur. NONO/p54nrb susturulması morfolojik değişime sebep olmuş ve hücreler ince uzun şekle (fibroblast gibi) dönüşmüştür. HeLa hücrelerinde NONO/P54nrb susturulması, protein kinase C hedefleyen ilaçlar, inhibitörün susturulması, dimethyl sulphoxide uygulaması ile de aynı değişim göstermiştir. Hücre çoğalma oranında azalma gözlemlenmiştir [26].

NONO/p54nrb susturulduğunda fare fibroblast hücrelerinde büyüme oranı artarken, p16 bağımlı senesence azalmaktadır. NONO/p54nrb knockout edilmesi embriyonik fibroblastlarda hücre siklusunu kesintiye uğratmazken, yetişkin knockout fareler yabanıl tipe göre daha küçüktür [26].

ATR, checkpoint kinaz 1'i (CHK1) C terminalinde (Ser317 ve Ser345) fosforillenmekte ve böylece kinaz aktivitesini aktive etmektedir. Ayrıca DNA onarımı ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden diğer faktörlerin fosforilasyonunu teşvik etmektedir. NONO/p54nrb susturulmuş hücreler UV ile muamele edildiğinde DNA sentezinin devam ettiği, kontrol noktasında siklusun durdurulmadığı ve CHK1S345 fosforilasyonunda bozulma gözlemlenmiştir. Bu bulgular kontrol noktası aktivasyonunun hasarlı olduğunun kanıtıdır. NONO/p54nrb, RAD9'un lokalize olduğu UV ile oluşturulan DNA hasarının bulunduğu alanlarda bulunur. DNA-hasarı yanıtta, NONO/p54nrb analiz edilmiştir. NONO/p54nrb'ün, ATM ve Rad3 ile ilgili kinaz aktivitesinin upstream bölgesine bağlanan topoizomeraz II-bağlayıcı protein 1'in bağlanmasını desteklediği bulunmuştur [26].

Hem aşırı ifade ve hem de NONO/p54nrb ve PSF seviyelerinin azaltılması hem kanser hem de primer insan hücrelerinin yaşlanmasına yol açmıştır. PSF eksikliği kromozom kırıkları ve fragmentasyona neden olurken, NONO/p54nrb veya PSF eksikliği DNA onarımını geciktirir [27].

Paraspale ve multifonksiyonel protein, NONO/p54nrb tümörleşme sürecinde ve metastazda rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörü HLXB9, NONO/P54nrb proteini ile etkileşerek insulinoza hücrelerinin poliferasyonunu teşvik etmektedir [28]. Ayrıca NONO/p54nrb'ün meme kanserinde fazla miktarda ifade olduğu tespit edilmiştir [29]. Protoonkogen Spi-1/PU.1 eritrolökositik süreçte NONO/p54nrb'ye bağlanır ve RNA işlenmesinde rol alır. NONO/p54nrb, prostat kanseri ve malign melanomda güçlü şekilde eksprese edilir. Ayrıca artmış NONO/p54nrb seviyesi, insan nevroblastomasında bağımsız bir prognostik faktördür [30].

### **1.3 Anjiyogenez**

Anjiyogenez, oluşmuş kapillerden yeni kapiller damar oluşmasıdır. Embriyonik gelişim aşamasından, tümörleşmeye kadar fizyolojik ve patolojik birçok durumda gelişebilir ve doku hipoksisine adaptif cevap olarak meydana gelir [31]. Embriyonik gelişimin ilk haftalarında çevre dokudan difüzyon ile beslenen embriyo, geliştikçe artan besin ve oksijen ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bu nedenle erken dönemde (üçüncü haftanın başında) anjiyogenez başlar. Anjiyogenez yetişkinlerde ovaryan siklus ve yara iyileşmelerinde de görülmektedir [32]. Yeni damar yapılarının oluşumu genel olarak dört basamakta gerçekleşmektedir; Birincisi, bazal membranın ve ekstra-sellüler matriksin proteazlar tarafından yıkılması; ikincisi, anjiyogenik uyarıya doğru endotel hücrelerinin göçü; üçüncüsü, endotel hücrelerin artması ve sonucusu, kapiller tüp formasyonunun oluşması ve sonucusu endotel hücrelerin olgunlaşmasıdır [33]. Yeni oluşan mikrodamarların olgunlaşması ve yapılandırılması pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır. Bu süreç mikrovasküler düzeyde birden çok pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörün koordinasyonu ile olmaktadır. Bu faktörler tümör hücreleri, monosit ve fibroblast hücreleri gibi ortamdaki hücrelerden veya kollajen matriksin yıkımı sonrasında ortaya çıkabilir [34].

## **1.4 VEGF**

Anjiyogenez, büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı çok faktörlü bir olaydır [35].

Bu faktörler içerisinde en önemli olanı VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dür. İlk bulunduğu vasküler endotelyal permeabilite (geçirgenlik) faktörü (VEPF) olarak adlandırılan bu faktör günümüzde VEGF-A olarak adlandırılmaktadır. VEGF, 46 kDa ağırlığında, homodimerik ve heparine bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür. VEGF A, B, C, D, E, plasental büyüme faktörü (PIGF) ve VEGF-F adı verilen yedi alt grubu ve amino asit sayılarına göre VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> olarak adlandırılan izoformları bulunmaktadır [36]. VEGF anjiyogenezde; nitrik oksit salınımını indükler ve damar geçirgenliğini artırır, bazal membran ve matriks yıkımını artırır, anjiyopietinler sayesinde endotel hücrelerin farklılaşmasında ve maturasyonunda rol oynar. VEGF, erken vasküler gelişimden tüp formasyonun oluşumuna kadar etkili bir maddedir [37].

Mikroçevrede; VEGF salınımını düzenleyen lokal hipoksinin desteği ile parakrin ve otokrin salınımla epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) keratinosit büyüme faktörü, insüline benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1), fibroblast growth factor (FGF) ve platelet-derived growth factor (PDGF); VEGF mRNA ekspresyonunu upregüle eder. Ayrıca; IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler birçok hücrede VEGF ekspresyonunu uyarır. Hormonlar; VEGF'yi uyaran diğer bir faktördür. Tiroit uyarıcı hormon (TSH)'nun tiroit kansinomunda VEGF'yi uyardığı gösterilmiştir [38]. Adrenokortikotropik Hormon (ACTH)'nin insan kültür fetal adrenal kortikal hücrelerde VEGF'yi uyardığı gösterilmiştir. VEGF; adrenal kortikal anjiyogenezde lokal düzenleyici olabilir ve ACTH'ın tropik etkilerinden sorumlu mediatör olabilir [39].

### **1.4.1 VEGF TİPLERİ**

#### **1.4.1.1 VEGF-A**

VEGF olarak da adlandırılan VEGF-A, anjiyogenezin en güçlü uyarıcısıdır. İlk kez Senger ve arkadaşları tarafından VPF (Vascular Permeability Factor; Vasküler Geçirgenlik Faktörü) olarak tanımlanmıştır [40, 41].

VEGF-A, vaskülogenez ve neoanjiyogenezde önemli bir rol oynayarak hücre proliferasyonuna, apoptoz inhibisyonuna, artmış vasküler geçirgenliğe, vazodilatasyona,



enflamatuar hücrelerin yaralanma bölgesine toplanmasına neden olur [42-46]. VEGF, oksijen yoksunluğuna yanıt olarak yalnızca endotel hücreler tarafından değil, diğer hücreler tarafından da salgılanır [43, 44, 47, 48]. Bu hücreler; tümör hücreleri [44, 47], makrofajlar [43, 44, 47], trombositler [44], keratinositler [44, 47], böbrek mezanjiyal hücreleri [44, 47], aktive edilmiş T hücreleri [43, 44, 47], lökositler [48], dendritik hücreler [49], retina pigmenter epitel hücreleri [50], müller retinadaki hücreler [51], astrositler, osteoblastlar [47], bronşiyal ve alveolar epitel hücreleri [52], perisitler [53], vascular smooth muscle cells VSMC'lerdir [54].

Duffy ve arkadaşların yaptığı bir araştırmada, VEGF'nin miyokardiyumda bulunan miyofibroblastlarda eksprese edildiği bulunmuş olup, bu ekspresyonun infarktüs sonrası doku onarımı ve yeniden şekillenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir [44].

İnsan VEGF-A, yedi intron ile ayrılmış sekiz ekson içerir [42] ve alternatif kesim farklı uzunluklarda izoformlar oluşturur: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> [43, 45, 48, 55-57]. Bu izoformların farklı biyolojik özellikleri içerdiği amino asitlerin yapısına ve sayısına [56], ve ECM'nin heparin ve heparan-sülfat proteoglikanlarına (HSPG'ler) olan afinitelerine de bağlı olarak değişiklik göstermektedir [43, 45, 58]. Tüm izoformlar, 1-5 eksonları tarafından kodlanan ortak bir alana sahiptir [8]. Ekson 6 ve 7'nin (bazı izoformlarda bulunmayabilir) heparin afinitesinden sorumlu olduğu, ekson 8'in (tüm izoformlarda mevcuttur) endotel hücre proliferasyonunu sağladığı bulunmuştur [57].

En çok ifade edilen VEGF-A proteinleri izoformlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> ve VEGF<sub>189</sub> dur [13, 43, 57, 58]. Bunlardan VEGF<sub>165</sub>, baskın izoformdur [43] ve en çok vaskülogenezde aktiftir [55]. Ekson 6 tarafından kodlanan amino asitleri içermez, bu nedenle heparin ve HSPG'ler için orta derecede afiniteye sahiptir [43, 45, 55, 58]. Bu nedenle VEGF<sub>165</sub>'in çoğu hücre yüzeyine bağlı kalır [43, 45, 56, 59].

VEGF<sub>121</sub>, eksonlar 6 ve 7 tarafından kodlanan amino asitleri yoktur ve heparin veya HSPG'ler için afinitesi yoktur, serbest form olarak bulunmaktadır [45, 55, 56]. VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub>, heparin için güçlü bir afiniteye sahiptir, tamamen ECM yapılarına bağlı ve hücre yüzeyine en az bağlı olan en uzun izoformlardır [43, 45, 58, 60]. Bu nedenle VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub>'nın VEGF<sub>121</sub> ve VEGF<sub>165</sub>'ten daha az aktif olduğu düşünülmektedir [45]. Proteolitik enzimler (örn., plazmin, ürokinaz) VEGF ve ECM elemanları arasındaki bağı

kırabilir, sonuç olarak VEGF, ECM'de çok aktif olan serbest, çözünür bir formda salınır [43, 45, 56].

VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>162</sub> ve VEGF<sub>165b</sub> izoformları az yaygındır; özellikle VEGF<sub>165b</sub>'nin anti-anjiyojenik bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur [8, 43, 55].

VEGF-A'nın embriyonik vaskülojenez üzerindeki güçlü pro-anjiyojenik etkisi, vasküler sistemde yetersiz gelişim nedeniyle gebeliğin 10. veya 11. günlerinde ölen, heterozigotik VEGF-A gen nakavt fareleri (VEGF-A +/- fareler) ile yapılan deneylerle ortaya konmuştur [47, 60].

#### **1.4.1.2 VEGF-B**

1995 yılında keşfedilen VEGF-B, erken embriyonik yaşamda ifade edilir; yetişkinlerde çeşitli dokularda, özellikle miyokard, iskelet kası ve pankreasta bulunur [41, 43, 61]

Alternatif gen kesimi, iki izoforma yol açar:

- Baskın izoform olan VEGF-B<sub>167</sub>, 21 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve hücre yüzeyine veya ECM elemanlarına bağlanır. VEGF-B<sub>167</sub>, vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) [41, 60, 61] için afiniteye sahiptir ve neuronal pentraxin 1 NP-1[41, 61] ile kolayca etkileşir.
- 32 kDa moleküler ağırlığa sahip VEGF-B<sub>186</sub>, VEGFR-1 [41, 60, 61] için bir afiniteye sahip, serbest formda bulunur ve ancak proteolitik bölünmeye maruz kalırsa NP-1 ile etkileşime girebilir. [41, 61].

VEGF-B embriyonik evrelerde kardiyovasküler sistemin gelişmesine ve miyokardiyum oluşumuna katkıda bulunur [43]. VEGF-B'nin vaskülogenezdeki rolü hayati değildir, VEGF-B -/- homozigotik fareler kardiyovasküler sistemde sadece orta derecede kusurlarla doğumda yaşayabilir [60].

VEGF-B, anjiyojenezden çok düz kas hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, nöronlar (omurilik, korteks veya retinadaki motor nöronlar), kardiyomiyositler gibi belirli hücre tiplerinin hayatta kalmasında daha fazla rol oynamaktadır [60, 62].

#### **1.4.1.3 Placenta Growth Factor (Plasenta Büyüme Faktörü)**

Plasenta büyüme faktörü (PIGF) ayrıca VEGF ailesinin bir büyüme faktörüdür ve ilk olarak insan plasental dokularında tanımlanmıştır [8, 56, 63, 64]. Trofoblast büyümesi ve farklılaşmasında, invazyonunda ve blastosist implantasyonunda rol oynar [8, 64, 65]. Daha sonra, PIGF uterus mukozasında maternal stromal desidual hücrelerde [63], uterin glandüler ve luminal epitelde [66], glandüler sekresyonlarda, uterus döngüsünün sekretuar fazındaki desidual stromal hücrelerde [66] ve ayrıca kalp [8, 65], akciğerler [8, 65] , deri (keratinositler, dermal damarlar endotel) bulunmuştur [65].

PIGF geninin alternatif kesim ile moleküler yapı ve biyolojik özellikler bakımından farklılık gösteren dört izoform ortaya çıkar. Bunlar PIGF-1 (PIGF<sub>131</sub>), PIGF-2 (PIGF<sub>152</sub>), PIGF-3 (PIGF<sub>203</sub>) ve PIGF-4 (PIGF<sub>224</sub>)'tür [8, 65]. Tüm izoformlar VEGFR-1 [2, 17, 24] için bir afiniteye sahiptir, ancak PIGF-2 ECM'de [8, 43, 65] NP-1, NP-2 ve heparine bağlanır. Direkt mitojenik etkisi yoktur ve vasküler geçirgenliği artırmaz [48], ancak patolojik durumlarda VEGFR-1'e bağlanır, VEGF-A'yı VEGFR-1'den ayırır ve VEGF-A'nın VEGFR-2'ye bağlanmasına izin verir. Dolaylı olarak VEGF-A'nın (artan vasküler geçirgenlik, hücre göçü ve proliferasyon) etkilerini arttırmaktadır [8, 56, 67, 68]. PIGF embriyonik vaskülojenezde önemli bir rol oynamaz, VEGF-A ile sinerjizm yoluyla patolojik anjiyogeneze (iskemi, inflamasyon, kanser) müdahale eder [8, 43, 60, 67].

#### **1.4.1.4 VEGF-C**

VEGF-C, lenfatik damarların gelişiminin başladığı embriyonik dokularda bol miktarda eksprese edilir. Yetişkinlerde ise kalp, yumurtalık, plasenta, bağırsak ve tiroide eksprese edilir [41]. Endotelyal lenfatik hücrelerde eksprese edilen VEGFR-3'e afinitesi yüksektir ve lenf anjiyogenezi teşvik eder [60]. Ayrıca VEGFR-2 için zayıf bir afinite tanımlanmıştır [8]. Deneysel olarak, homozigotik VEGF-C -/- farelerde, lenfatik damarların gelişimi, ilk aşamalardan beri değişir, bunun sonucunda dokularda bazen ölümcül olabilen interstisyel sıvının birikmesi olmaktadır [60].

#### **1.4.1.5 VEGF-D**

VEGF-D, VEGF-C'ye benzer özellikler gösterir [41] , ayrıca lenfanjiyogeneze merkezi bir role sahiptir, ancak anjiyogeneze önemli bir rolü yoktur [8, 60]. Embriyoda, lenfatik damarların gelişiminde rol aldığı akciğerde yüksek seviyede ekspresyona sahiptir [41];

yetişkinlerde kalpte, akciğerlerde, iskelet kaslarında, ince bağırsakta bulunur [41]. VEGFR-3 ve ayrıca NP-2 için afinitesi vardır [69]. Deneysel olarak, VEGF-D gen inaktivasyonu, diğer önemli değişiklikler olmaksızın, lenfatik dolaşımında orta derecede atrofi üretir [8].

#### **1.4.1.5 VEGF-E (viral VEGF)**

Ektima kontagiozum (Orf) virüsü, keçi ve koyunlardan insanlara bulaşabilen enfeksiyonlara neden olan ve lokal ödem, vazodilatasyon, keratinositler ve endotel hücre proliferasyonu ile karakterize püstülöz dermatit tipi [60, 70] deri lezyonları üreten bir parapoksvirüstür. VEGF-E, Orf virüsünün farklı türlerinden viral proteinler içerir: VEGF-ENZ-2 (viral tür NZ-2) [43, 71], VEGF-ENZ-7 (viral tür NZ-7) [43, 72], VEGF-ENZ-10 (viral suş NZ-10) [43, 71]. VEGF-ED1701 (viral suş D1701) [43, 73] ve ayrıca VEGF-EVR 634 (psödocowpox virüsünün viral suşu VR 634) [43, 71].

VEGF-E proteinini kodlayan gen (viral suşlar D1701, NZ-2 ve NZ-7') insan genomunda bulunmaz [74]. Ancak bir viral enfeksiyondan sonra etkilenen bireylerin genomuna dâhil edilebilir ve pro-anjiyojenik bir faktör gibi davranmaktadır [60].

VEGF-E, VEGFA<sub>165</sub>'e benzer şekilde vasküler geçirgenliği önemli ölçüde artırır ve ayrıca endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkiye sahiptir [72].

#### **1.4.1.6 Endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF)**

Prokineticin 1 (PK1) [75] olarak da adlandırılan EG-VEGF, LeCouter ve ark. tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir [89]. Steroid hormonu üreten endokrin bezlerde ve plasental dokularda, fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde rol almaktadır [76].

Testis, adrenal bez, yumurtalık, plasental dokularda [75, 76] 88-91] eksprese edilen EG-VEGF, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, büyümesini, göçünü ve hayatta kalmasını indükler, artmış vasküler geçirgenlik ve parasellüler taşınmayı mümkün kılar [75-77]. İlginç bir şekilde, EG-VEGF'nin anjiyojenik etkisi, yalnızca belirtilen bezlerde bulunan endotel hücreleri üzerindedir [78], endotel hücreleri üzerinde örneğin serebral damarlar, aort ve kornea gibi başka lokasyonlarda etkisi görülmemiştir [77, 79].

Plasentada, koryonik villus [insan plasental mikrovasküler endotel hücreleri (HPEC'ler)] içindeki fetal kapillerde bulunur ve gebeliğin ilk trimesterinde (8-10. Haftalar) yoğun bir şekilde eksprese edilir [77], Damar gelişimini ve vasküler geçirgenliği artırarak parasellüler taşınmayı teşvik eder. Bunun sonucunda maternal-fetal değişimler oluşmaktadır [75, 77].

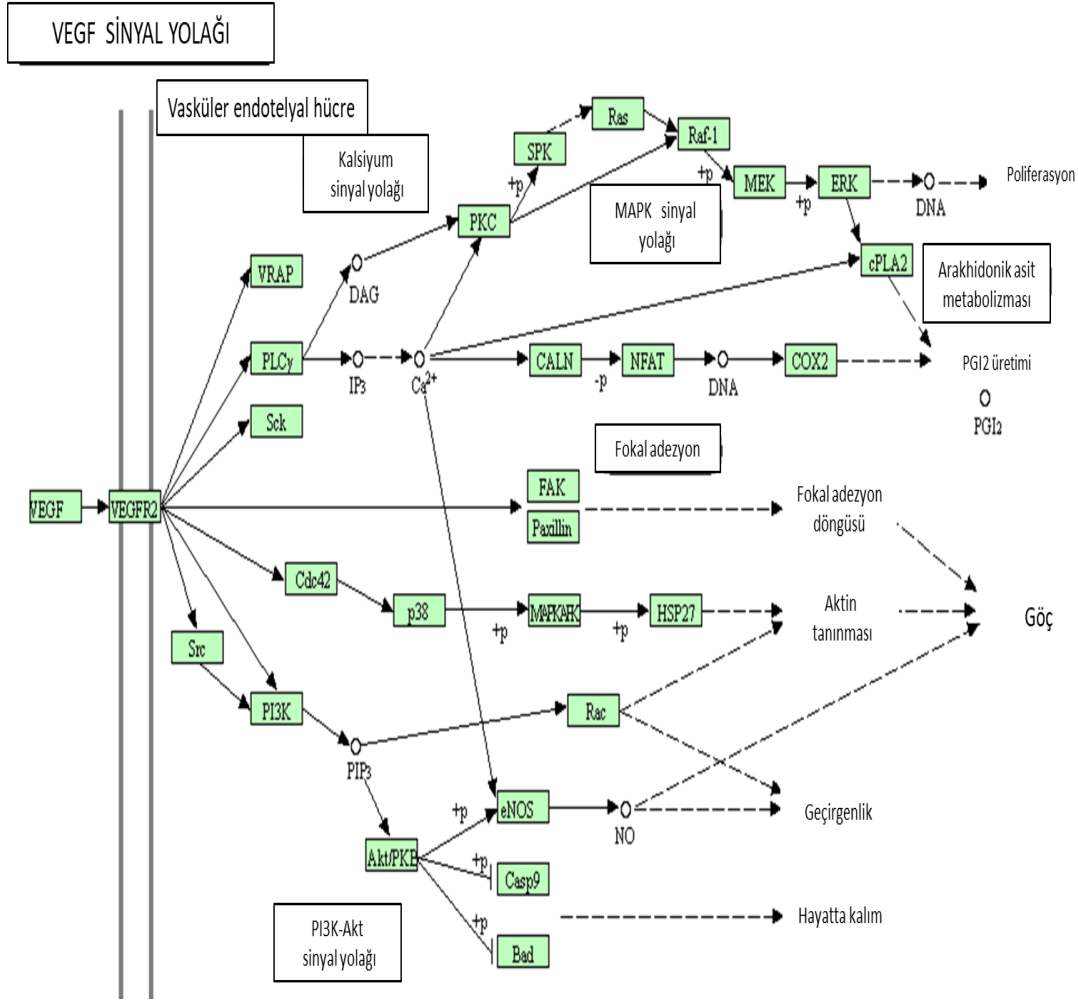
EG-VEGF ayrıca umbilikal kan damarlarını [makrovasküler insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC'ler)] sıralayan endotel hücrelerinde ve plasental büyüme sırasında trofoblast invazyonunu ve maternal lakuna oluşumunu düzenleyen sinsityotrofoblastlarda bulunmuştur [75, 77]

Preeklampside çok yüksek serum EG-VEGF seviyeleri bildirilmiştir, erken gebelik kaybı ile ilişkilidir [75, 79, 80].

EG-VEGF, gebeliğin ilk trimesterinde yoğun şekilde eksprese edilen prokinetisin reseptörü-1 (PROKR-1) ve -2 (PROKR-2) olarak adlandırılan iki reseptör tipine bağlanır [75, 77]. Birkaç çalışma, PROKR-1'e bağlanırken EG-VEGF'nin proanjiyojenik etkilere aracılık ettiğini, PROKR-2'nin ise vasküler geçirgenlikte artışa aracılık ettiğini göstermiştir [75].

#### **1.4.2 Anjiyogenez ve VEGF / VEGFR Yolağı**

VEGF başlangıçta fizyolojik ve patolojik anjiyogenezi indüklemeye kabiliyetine sahip endotel hücreye özgü bir mitojen olarak tanımlanmıştır [81, 82]. Bu bulgudan bu yana, VEGF sinyalleşmesinin doğası ve anjiyogenezdeki rolü hakkında çok şey öğrenilmiştir. VEGF, VEGFR tirozin kinazlara bağlanan bir ligand ailesini (VEGF-A'dan -D'ye ve plasental büyüme faktörü [PlGF]) içerir [83-85]. VEGF-A, VEGF-B ve PlGF, anjiyogenezde belirleyici rollere sahiptir. VEGF-A ve -B, VEGFR-1 ve -2 için en büyük bağlanma afinitesine sahip olmasına rağmen, anjiyojenik etkilerin çoğu VEGF-A'nın VEGFR-2 ile etkileşimine atfedilir [85]. VEGFR-1'in, VEGFR-2'yi aktive etmek için mevcut olan serbest VEGF-A miktarını düzenleyerek baskın olarak bir tuzak reseptör olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Çünkü VEGFR-1, VEGF-A / VEGFR-2 etkileşimini negatif olarak düzenlemektedir [86]. PlGF'nin anjiyogenezdeki rolü tartışmalıdır; bununla birlikte, işlev kazanımı ve kaybı deneyleri, damar büyümesini ve olgunlaşmasını doğrudan uyarabileceğini ve pro-anjiyojenik kemik iliğinden türetilmiş progenitörleri ve monosit-makrofaj soy hücreleri ile işbirliği yapabileceğini göstermiştir [67]. VEGF-C ve -D, lenfanjiyogenezde en önemli faktörler gibi görünmektedir ve VEGFR-3 için en büyük bağlanma afinitesine sahiptir [87]. VEGF'ler, fibroblastlar, inflamatuvar hücreler ve birçok tümör hücresi dahil olmak üzere birkaç hücre tipi tarafından sıklıkla artan doku hipoksisine yanıt olarak üretilir [88, 89].



Şekil 1.2: VEGF sinyal yolağının şematik gösterimi [90].

## 1.5 HIPOKSI

Birçok organizma hipoksik koşullara uyum sağlayacak mekanizmalar geliştirmiştir. Değişen oksijen seviyeleri, belirli homeostatik düzenleyici genlerin aktivasyonu veya baskılanması ile sonuçlanabilir ve değişen çevresel şartlarda hücre ve dokuların hayatta kalması sağlanır. Hipoksik şartlar tarafından aktive edilen Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) geni bunlardan biridir ve doku büyümesi ile damarlanmayı kontrol etmek için diğer transkripsiyon faktörleri ve enzimlerle ilişkiye girebilmektedir [91, 92]. HIF-1 ilk olarak hipoksiye cevaben eritropoietinin (EPO) artmasına sebep olan transkripsiyonel kompleksi olarak tanımlanmıştır. Semenza ve Wang 1992’de EPO’nun 3’ Hipoksi Response Elementi (HRE) ile oksijene bağımlı şekilde etkileştiği bir çekirdek faktörünü keşfetmişlerdir. Bu DNA bağlayan kompleksi “Hypoxia-inducible factor-1” ya da ‘HIF-1’olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki çalışmalar hipoksik koşullar altında HIF-1’in bağlama aktivitesinin çeşitli

eritropoietin üretmeyen hücre serilerinde de bulunduğunu göstermiştir. Bu durum HIF-1'in hipoksiye cevap olarak gen ekspresyonu aktivitesinde genel bir role sahip olduğunu göstermiştir [93]. HIF-1 heterodimer yapıdadır. HIF-1, sürekli eksprese olan HIF-1 $\beta$  ve hipoksi ile ilişkili HIF-1 $\alpha$  alt ünitelerini içerir. Temel olarak hipoksi tarafından ekspresyonu kontrol edilen HIF-1 birçok genin düzenlenmesinde rol alır [94]. Bu proteinin etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerinde diferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma ve tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir [95, 96]. Hipoksi ile HIF-1 protein sentezi Phosphoinositide 3-kinases (PI3K) ve mitogen-activated protein kinase (MAPK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenir. PI3K, Reseptör Tirozin Kinaz ve G-protein bağımlı reseptörlerin aldığı uyarılarla aktive olur. Hipoksi sonrası aktive olan bu sinyal yolağı ile aktive olan HIF-1 VEGF ile anjiogenezi, siklin G2 ile büyümeyi, glucose transporter (GLUT) ekspresyonuna etki ederek glukoz metabolizmasını ve EPO üzerinden de eritropoezi arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [97].

### 1.5.1 HIF-1'in Oksijene Bağlı Regülasyonu

Hücreler, O<sub>2</sub>'ye bağlı bir posttranslasyonel modifikasyon yoluyla düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonunu, artan HIF-1 aktivitesine dönüştürür. Üç prolil hidroksilaz (prolil hidroksilaz domain proteini (PHD) 1–3 veya alternatif olarak HIF-1 prolil hidroksilaz (HPH) 1–3 olarak bilinir), HIF-1 $\alpha$ 'nın prolin (Pro) -402 ve -564'ünü değiştirir [98, 99]. Bu proteinler, *Caenorhabditis elegans*'taki HIF-1 prolil hidroksilaz olan EGL9'a sekans homolojisi temelinde orijinal olarak (EGLN1-3) olarak adlandırıldı. HIF-1 $\alpha$ 'nın von Hippel – Lindau (VHL) tümör baskılayıcı protein ile etkileşimi için Pro-402 ve Pro-564'ün hidroksilasyonu gereklidir [100, 101]. VHL, proteazomal degradasyon için HIF-1 $\alpha$ 'yı hedefleyen bir E3 ubiquitin-protein ligazın tanıma bileşenidir [102].

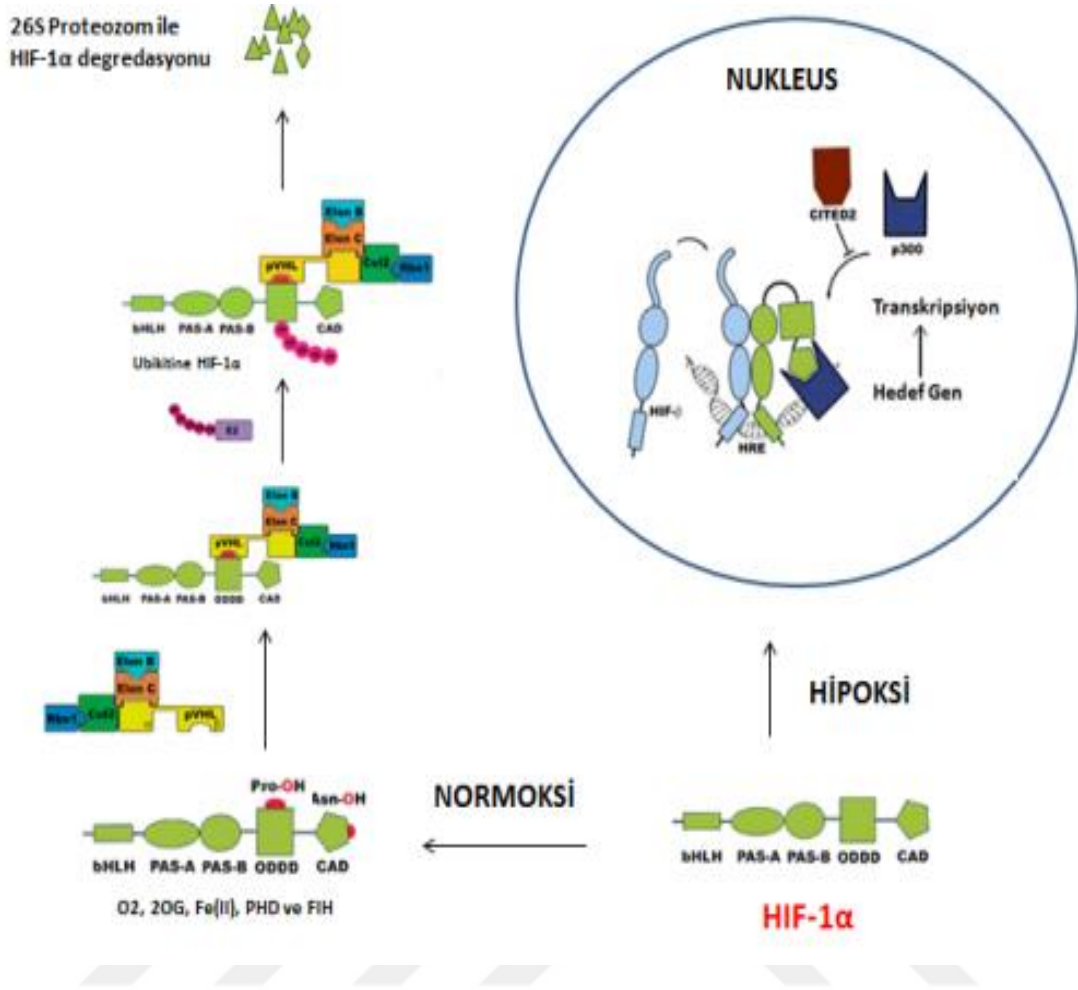
Prolil hidroksilazlar, prolil hidroksile HIF-1 $\alpha$  ve süksinat üreten bir reaksiyonda substratlar olarak moleküler O<sub>2</sub> ve 2-oksoglutarat ( $\alpha$ -ketoglutarat) kullanır. Fizyolojik koşullar altında O<sub>2</sub>, sınırlayıcı bir substrattır [99], bu nedenle HIF-1'a ekspresyonunun O<sub>2</sub>'ye bağlı regülasyonu için bir mekanizma sağlar [104]. HIF-1 $\alpha$ 'nın lizin-532'de ARD1 asetiltransferaz tarafından asetilasyonu, VHL'nin HIF-1 $\alpha$  ile etkileşimini artırarak, onun ubiquitülasyonunu ve degradesyonunu teşvik eder [105].

HIF-1 $\alpha$  transaktivasyon domain işlevi de FIH-1'in (Faktör İnhibe edici HIF-1) etkisiyle O<sub>2</sub> ile düzenlenir [103, 106]. FIH-1, bu etkiye, HIF-1 $\alpha$ 'nın ko-aktivatörler p300 ve CREB-binding protein (CBP) ile etkileşimini önleyen, asparajin (Asn) -803'ün hidroksilasyonu ile aracılık eder. VHL veya p300 / CBP ile etkileşime giren HIF-1 $\alpha$  domainlerinin yapısal analizi, hidroksilasyonun bu etkileşimlerin afinitesini önemli ölçüde değiştiren moleküler bir anahtar olduğunu göstermiştir [107, 108]. Hidroksilasyon, protein-protein etkileşimlerini düzenleme işlevi görmesi açısından diğer translasyon sonrası modifikasyonlara benzer, ancak diğer modifikasyonların aksine, doğal olarak O<sub>2</sub> tarafından düzenlenen bir süreçtir.

Normoksik koşullarda, bir E3 ubiquitin-protein ligazının tanıma bileşeni olan VHL tümör baskılayıcı proteinin bağlanması için HIF-1 $\alpha$ 'daki prolin (P) 402 ve 564'ün PHD (prolin hidroksilaz domain proteini) 1-3 tarafından O<sub>2</sub>'ye bağlı hidroksilasyonu gereklidir. VHL bağlanması aynı zamanda lizin532'nin ARD1 asetiltransferaz tarafından asetillenmesi ile desteklenir. HIF-1 $\alpha$ 'nın ubiquitinilasyonu, proteini 26S proteazomu tarafından degrade edilmesi için hedefler. FIH-1 enzimi tarafından HIF-1 $\alpha$  'daki asparajin 803'ün O<sub>2</sub>'ye bağlı hidroksilasyonu, p300 ve CBP'nin HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanmasını bloke eder ve dolayısıyla HIF-1 aracılı gen transkripsiyonunu inhibe eder.

Hipoksik koşullar altında, asparajin ve prolin hidroksilasyon oranı azalır. VHL, prolin hidroksile olmayan HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanamaz, bu da HIF-1 $\alpha$  bozunmasının azalmasına neden olur. Bunun tersine, p300 ve CBP, asparajinil hidroksile olmayan HIF-1 a'ya bağlanarak HIF-1 hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna izin verebilir [109].





Şekil 1.3: Oksijen düzeyine bağlı HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonu ve transaktivasyonu [110].

## 1.5.2 Hipoksi Oluşturma Teknikleri

### 1.5.2.1 Kimyasal Bileşikler Tarafından Prolil Hidroksilazların İnhibisyonu ile HIF-1 $\alpha$ Stabilizasyonu

Co<sup>+2</sup> ile birlikte dimetiloksaloglisin (DMOG) ve deferoksamin (DFO), HIF-1 $\alpha$  alt biriminin stabilizasyonuna dayanan en iyi hipoksik taklitçiler olarak kabul edilmiştir. HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilizasyonu ve birikmesi, tüm bu kimyasal ajanların PHD'lerin aktivitesini bloke etmesi, HIF-1 $\alpha$ 'nın hidroksilasyonunu bozması ve ubikitine bağımlı 26S proteazomal bozunma yolağını inhibe etmesi nedeniyle oluşur. Ayrıca, HIF-1 faktörlerinin transkripsiyonel aktivitesini artırarak FIH üzerinde inhibe edici etkileri vardır [111]. PHD'nin DMOG, DFO ve Co<sup>+2</sup> tarafından inhibisyonu farklı mekanizmalarla gerçekleşir. DMOG, üç PHD izoformunun ve FIH'nin yarışmalı bir inhibitörüdür. DMOG'nin, enzimatik aktiviteyi bloke etmek için katalitik bölgeye yerleştirilen 2-oksoglutaratın (PHD'lerin yardımcı substratı) bir analogu olarak hareket ettiği öne sürülmüştür. DFO, PHD aktivitesinde önemli bir kofaktör

olan  $Fe^{+2}$  şelatördür.  $Fe^{+2}$  yokluğu, PHD'lerin ve FIH'nin aktivitesinin inhibisyonuna neden olarak HIF-1 $\alpha$  birikimine ve aktivitede bir artışa neden olur [111, 112]. İki değerlikli iyonlarla ilgili olarak, en çok kabul gören hipotez, PHD'lerin aktif bölgesinde  $Fe^{+2}$  yerine geçmeleri ve böylece PHD aktivitesini bloke etmeleridir. DMOG ve DFO'nun aksine  $Co^{+2}$ , HIF-1 $\alpha$  ve -2 $\alpha$  stabilizasyonu üzerinde daha iyi bir etki göstermiştir [113]. Bu nedenle  $Co^{+2}$ , hipoksik transkripsiyon yanıtını taklit eden HIF-1 ve HIF-2 faktörleri tarafından modüle edilen genetik yanıt çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca, PHD reaksiyonunda, demir ( $Fe^{+2}$ ), demir  $Fe^{+3}$ 'e oksitlenir. Askorbik asit veya askorbat,  $Fe^{+2}$  'yı indirgenmiş halde tutan temel bir kofaktördür. Okside askorbat, PHD ve FIH'nin katalitik bölgelerinde  $Fe^{+3}$  'i  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyemez, böylece her bir enzimin aktivitesini inhibe eder. Salnikow vd. (2004),  $Ni^{+2}$  veya  $Co^{+2}$  'ya maruz kalan hücrelerde  $Fe^{+2}$  düzeylerinden ziyade askorbat düzeylerinin PHD aktivitesini sınırladığını görülmüştür [114].

Ek olarak,  $Co^{+2}$  'nin askorbat taşıyıcılarını bloke ederek hücrel askorbat alımını inhibe ettiği öne sürülmüştür [114, 115].

### **1.5.2.2 Fiziksel Olarak Hücre Kültüründe Hipoksik Koşul Oluşturma**

Hipoksik koşul oluşturmak için hücre kültüründe hipoksik bir ortam yaratabilen ve koruyabilen güvenilir bir deneysel cihaz çok önemlidir. Bunun için birkaç model mevcuttur. Biri, % 1  $O_2$ , % 5  $CO_2$  ve % 94  $N_2$  içeren düşük  $O_2$  gazı ile doldurulabilen modüler inkübatör çemberidir. Bu çember, sabit bir şekil ve boyutta katı malzemelerden yapılmıştır ve araştırma laboratuvarlarında en yaygın kullanılan hipoksi çemberidir. Araştırmacılar bu çemberin ortak kusurlarından birinin sızıntı olduğunu ve sızıntının deneysel süreçleri bozduğunu, bazen gerçek iç hazne hava bileşenleri hakkında belirsizliğe neden olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir hipoksi modeli, harici bir yüksek basınçlı sıvı nitrojen tankı tarafından sağlanan  $N_2$  infüzyonu ile  $O_2$ 'nin yerini alan bir hücre kültürü inkübatörüdür [116].

Üçüncüsü,  $O_2$  ve  $CO_2$ 'nin yanı sıra sıcaklık ve bağıl nemin hassas kontrolünü sağlayabilen bir hipoksi istasyonudur [117, 118]. Eğer hücre kültüründe hipoksik koşul uzun süreli olarak oluşturulması gerekiyorsa araştırmacılar bu istasyonu tercih etmektedir. İkinci ve üçüncü modeller oldukça pahalıdır ve günlük olarak hipoksi deneyleri yapmayan küçük laboratuvarlar için uygun olmayabilmektedir.

Bu yöntemlere ek olarak, şeffaf plastik materyalden üretilmiş, şişirilebilir çember geliştirilmiştir. Bu çember, hipoksinin neden olduğu HIF-1 $\alpha$  birikiminde ve HIF-1 ile düzenlenen gen ifadesinde tekrarlanabilir ve karşılaştırılabilir sonuçlar vermiştir. Şişirilebilir olduğu için, çember kullanımı sırasında basınçlı bir ortam yaratması pek olası değildir. Uzun süreli deneyler sırasında bile uygun maliyetli, kullanımını kolay sızıntı içermemekte ve boyutu ayarlanabilmektedir [119].



## 2. TEZ ÇALIŞMASININ PLANI VE KAPSAMI

Yaptığımız literatür çalışmalarında NONO/p54nrb geni transkripsiyon regülasyonunda, RNA işleme mekanizmasında, kanserde, mRNA'nın nükleustan sitoplazmaya çıkışında, DNA tamir mekanizmasında rol oynamaktadır. Bu çalışmada NONO/p54nrb geninin anjiyogenez ile ilişkisi araştırılacaktır.

Bu tez çalışmasında yapılması amaçlanan basamaklar üç basamak altında toplanabilir. Bu basamakları özetleyen akış diyagramı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

➤ **Birinci basamakta NONO/P54nrb proteininin hücrel ve moleküler düzeydeki karakterizasyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir.**

- İnsan NONO/P54nrb genin ifadesi hipoksik ve normoksik koşullar altında Real Time PCR analizi yapılarak belirlenmiştir.
- İnsan NONO/P54nrb genin ifadesi hipoksik ve normoksik koşullar altında Western Blot deneyi yapılarak belirlenmiştir

➤ **İkinci basamakta NONO/P54nrb proteini aşırı ifade ettirilmiştir, normal ve hipoksik koşullar altında anjiogenik özelliği belirlenmiştir.**

- NONO/p54nrb geni pEGFP-C1 vektörüne klonlanmıştır.
- Normal ve hipoksik koşullar altında NONO/p54nrb geni içeren pEGFP-C1 vektörü transfeksiyonu yapıp NONO/p54nrb geninin aşırı ifade olup olmadığı mRNA seviyesinde Real Time PCR analizi ile ve protein seviyesinde Western Blot deneyi ile doğrulanmıştır.
- Normal ve hipoksik koşullar altında NONO/p54nrb geni aşırı ifade olduğunda diğer parametrelerin mRNA seviyelerindeki değişiklikleri Real Time PCR analizi ile belirlenmiştir.
- Normal ve hipoksik koşullar altında NONO/p54nrb proteini lokalizasyonu pEGFP-C1 vektörü transfeksiyonu yapıp İmmun Floresans (IFC) mikroskobik deneyi ile belirlenmiştir.
- MTT deneyi ile hücre canlılığı ölçülüp, koloni formasyon testi ile hücrelerin invazyon yeteneğindeki değişiklikler belirlenmiştir.

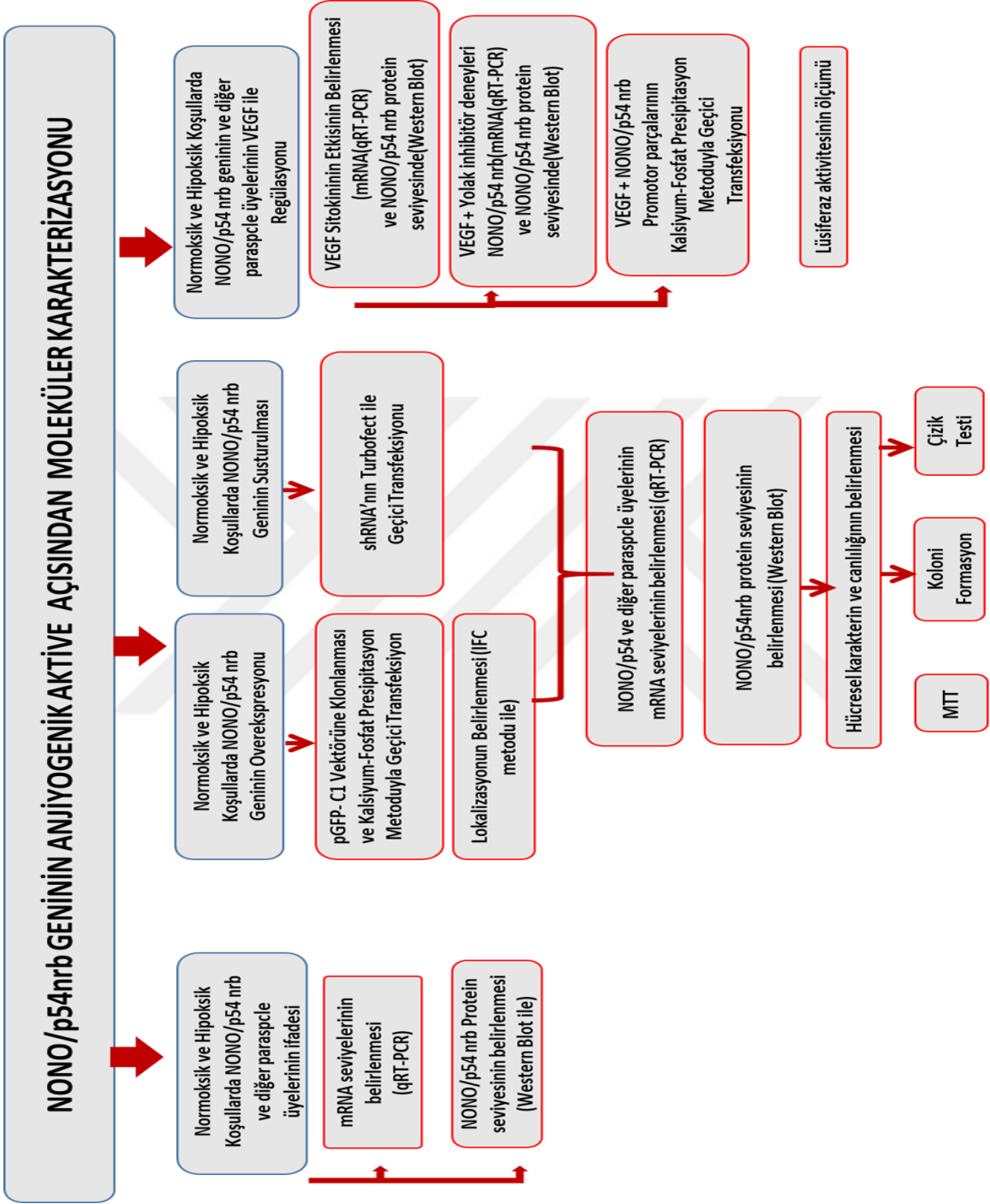
➤ **Üçüncü basamakta NONO/P54nrb proteini shRNA ile ifadesi baskılanmıştır, normal ve hipoksik koşullar altında anjiogenik özelliği belirlenmiştir.**

- NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligoları pKLO.TRC vektörüne klonlanmıştır.

- Normal ve hipoksik koşullar altında NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligoları içeren pKLO-TRC vektörü transfeksiyonu yapıp NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanıp baskılanmadığı mRNA seviyesinde Real Time PCR analizi ile, protein seviyesinde Western Blot deneyi ile doğrulanmıştır.
- Normal ve hipoksik koşullar altında NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılandığında diğer paraspce üyelerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikleri Real Time analizi ile belirlenmiştir.
- MTT deneyi ile hücre canlılığı ölçülüp, koloni formasyon testi ile hücrelerin invazyon yeteneğindeki değişiklikler belirlenmiştir.

• **Dördüncü basamakta NONO/p54nrb geninin normal ve hipoksik koşullarda VEGF sitokini ile regülasyonu incelenmiştir.**

- HUVEC hücrelerine farklı zamanlarda belirli dozda VEGF sitokini uygulanıp NONO/p54nrb genine mRNA seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizi yapılmıştır.
- VEGF sitokinin protein seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Western Blot analizleri yapılmıştır.
- Normal koşullar altında HUVEC hücrelerine farklı zamanlarda belirli dozda VEGF sitokini uygulandığında, diğer paraspce üyelerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikleri Real Time PCR analizi ile belirlenmiştir.
- HUVEC hücrelerine VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolağı inhibitörleri uygulanmış ve NONO/p54nrb genine mRNA seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizi yapılmıştır. VEGF yolağı inhibitörlerinin protein seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Western Blot analizleri yapılmıştır.
- pMET-Luc haberci vektöründeki NONO/p54nrb promotor parçaları HUVEC hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarılmıştır.
- Farklı promotor parçalarının transfekte edildiği hücrelere VEGF sitokini farklı zamanlarda belirli dozda uygulanarak transkripsiyonel aktiviteler belirlenmiştir.
- Farklı promotor parçalarının transfekte edildiği hücrelere VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolağı inhibitörleri uygulanmış transkripsiyonel aktiviteler belirlenmiştir.



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılacak basamakları özetleyen akış diyagramı.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1.1 DeneY Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri

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

**Tablo 3.1:** Hücre kültürü deneY çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.

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

**Tablo 3.2 :** Sitokin ve yolak inhibisyon deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi

<b>Sitokin ve Yolak İnhibisyon Deneyleri İçin Kullanılan Malzemeler</b>	
Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)	PeptoTech
Aktinomisin D	Biochemica
Sikloheksimid (Protein sentezi İnh.)	Sigma
MAP2K1 İnhibitörü (MEKI)	Cell Signaling
PI3K İnhibitörü (Wortmannin)	Cell Signaling
JNK İnhibitörü (SP600125)	Santa Cruz Biyoteknoloji
p38 MAPK İnhibitörü(PD169316)	Sigma

**Tablo 3.3:** Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.

<b>Transfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	
HEPES	Sigma
SEAP ve Lusiferaz Substratları	Takara Clontech
Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assay	Takara Clontech
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
TurboFect™	Thermo Fisher Scientific™



**Tablo 3.4:** RNA eldesi ve kontrolü deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.

<b>RNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler</b>	
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma
2 X RNA yükleme boyası	Thermo scientific
GeneJET RNA Pürifikasyon Kit	Thermo scientific
Steril İnsülin Enjektörü	Bd Micro-Fine
Agaroz	Sigma,Prona
%99 Formaldehit	Sigma
2-Beta Merkaptotanol	Merck
MOPS	Sigma
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma
NaAc	Sigma
%37'lik (12.3M) Formaldehit	Fluka
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
Etidyum bromür (Et-Br )	Fisher BioReagent
Etanol	Merck

**Tablo 3.5:** DNA eldesi ve kontrolü deney çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.

<b>DNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler</b>	
Oligo dT	Thermo scientific
Deoksiniükleotid(dNTP <sub>mix</sub> ) mix solüsyon	NEB
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo scientific
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo scientific
RiboLock RNaz İnhibitör	Thermo scientific
Taq DNA Polimeraz (rekombinant)	Thermo scientific
10X Taq Tamponu (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Thermo scientific
MgCl <sub>2</sub>	Thermo scientific
Agaroz	Sigma, Prona
GeneRuler 1 kb DNA belirteç	Fermantas
1 kb DNA belirteç	NEB
(6X) jel yükleme boyası	NEB
6X DNA Yükleme Boyası	Thermo scientific
RealQ Plus 2X Master Mix	Ampliqon
96 kuyulu plaka	LightCycler480
96 kuyulu plaka seal	Thermo scientific
<i>NucleoBond® Xtra Midi Plus</i> kit	Macharey-Nagel

**Tablo 3.6:** Protein çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi.

<b>Western Blot Analizi (DNA-Protein) Çalışmaları için Kullanılan Malzemeler</b>	
4x Laemmli Örnek Tamponu (4XLSB)	Bio-Rad
Protein Belirteci (Rainbow Marker)	Thermo scientific
PVDF Membran 0.45 µm	Millipore
Akrilamid Bis-Akrilamid (37.5:1)	Sigma
Akrilamid Bis-Akrilamid (19:1)	Sigma
Amonyum Persülfat (APS)	Fisher Scientific
%90'lık İzopropanol	Merck
2-Beta Merkaptotanol	Merck
TEMED (1,2-bis- (dimetilamino) etan)	Bio-Rad
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma
2-Beta Merkaptotanol	Sigma
TWEEN® 20	Sigma
Yağsız Süt Tozu (non-fat dry Milk)	Santa Cruz
NONO/p54nrb Monoklonal Antikor	Thermo scientific
Monoklonal Anti-Beta-Aktin Antikor	Sigma
beta-Actin Mouse mAb	Cell Signaling
Yabanturpu peroksidaz (HRP)	Santa cruz Biyoteknoloji
m-IgGκ BP ( Beta-aktin Sekonder Antikor)	
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa cruz Biyoteknoloji
Pierce™ ECL	Thermo Scientific

### 3.1.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Deneyisel işlemler gerçekleştirilirken çeşitli cihazlardan yararlanılmıştır. Cihazların gerekli periyodik temizlikleri yapılmıştır. Kullanılan laboratuvar cihazları Tablo 3.6'da verilmiştir.

**Tablo 3.7:** Çalışmada kullanılan Laboratuvar Cihazları.

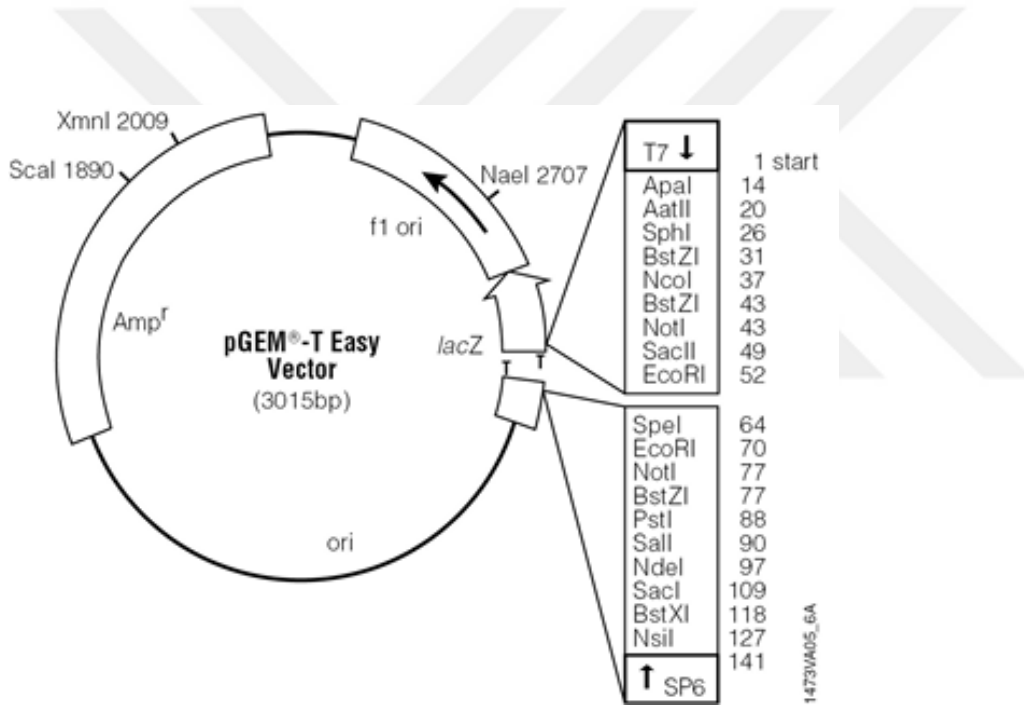
<b>Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları</b>	
Laminar Flow Kabin (Hava filtreli)	TelStar BIOII, İspanya
CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör	Nuaire, ABD
-80 ° C Derin Dondurucu	Wise Cryo
+4 ve -20 Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Su Banyosu	PolyScience
Ultrasonik su banyosu	PlusLab
Isıtıcı Blok	Major Science
Santrifüj (15 ml'lik Falkona uygun)	Nüve
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Vorteks	Velp Scientifica
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Masa Tipi pH metre	Hanna
İnkübatör (Sterilizasyon için)	Memmert
Otoklav	HMC HIRAMAYA
Elektroforez Güç Kaynağı (DNA-RNA)	Thermo Scientific
Tank Blot Sistemi	Bio-Rad
PCR Thermocycler	Thermo
Light- Cycler 480 Real-Time PCR	Roche Life Science
µDrop™ Plate	Thermo Fisher Scientific, Multiskango
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific, Multiskango
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
SDS-PAGE Araçları	Bio-Rad
UV Görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat
Otomatik Pipet	Thermo, Eppendorf, Finnpiette
Elektronik Pipet Kontrolörü	IsoLab
Döner Hareketli (Rotating) Çalkalayıcı	Thermo Scientific
Hassas terazi	Sartorius

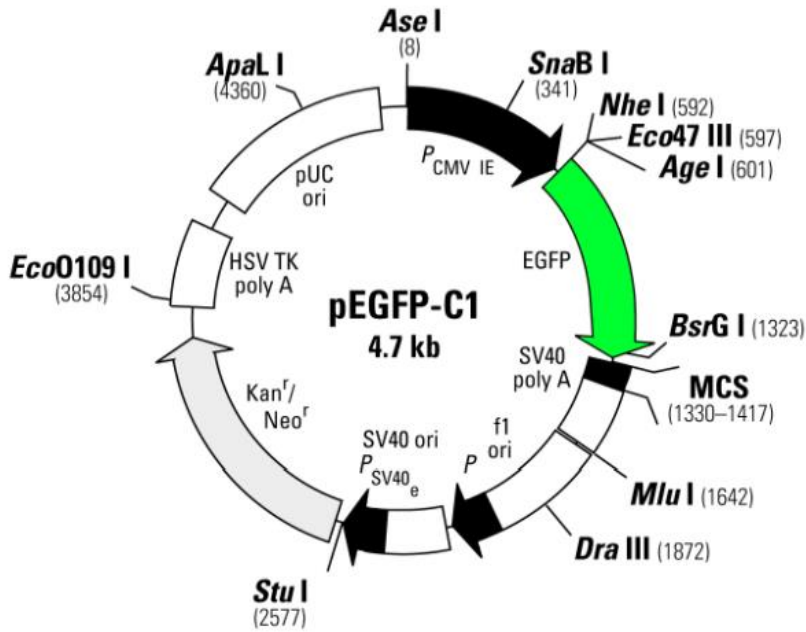
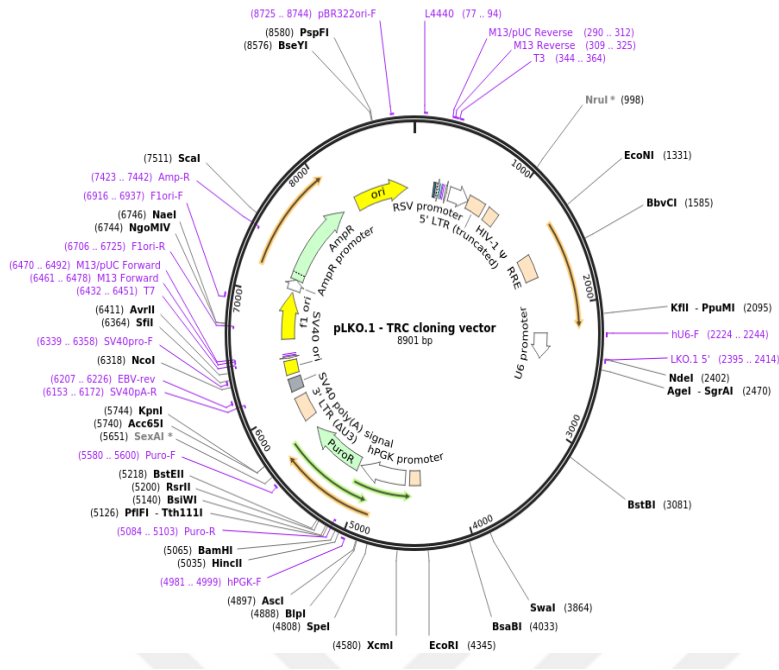
### 3.1.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları

Klonlama çalışmalarındaki transformasyon aşamasında ve klonların stok hücrelerinin oluşturulmasında *E. coli JM109 soyu* (Genotip: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZ $\Delta$ M15] ve *E. coli DH5 $\alpha$  soyu* (Genotip: SupE44 $\Delta$  lacU169 ( $\Phi$ 80 LacZ  $\Delta$ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rl A1) kullanılmıştır.

### 3.1.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler

NonO/p54<sup>nr</sup>b geni klonlama çalışmalarında pGEM-T Easy vektörü, pGFP-C1 vektörü ve pLKO.1 TRC vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.1).

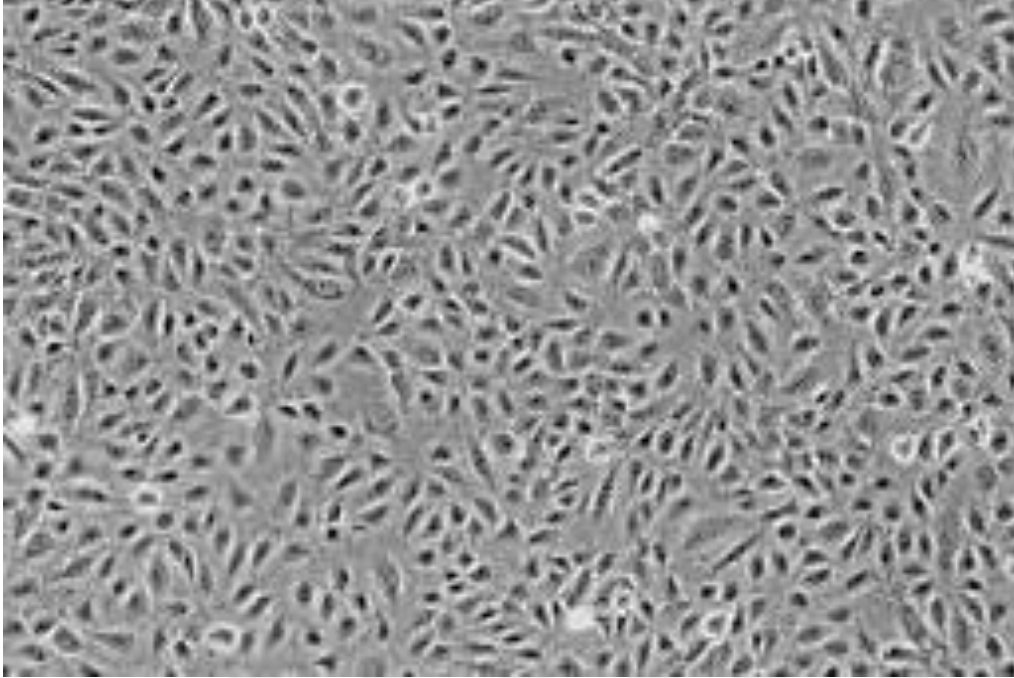




Şekil 3.1:p EGFP-C1, p GEMT-easy, pLKO.1- TRC vektörlerinin şematik gösterimi.

### 3.1.1.5 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada insan kordon vein endotelial hücre hattı HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial cells) kullanılmıştır.



**Şekil 3.2:** HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial cells) hücre hattı mikroskop görüntüsü.

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanklı plastik malzemeler ve protein, vitamin vb. ısı ile denatüre olmayan solüsyonlar 121 °C’de 20 dk.dk.. otoklavlanmıştır. Isı ile steril edilmeye uygun olmayan solüsyonlar ise 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır. Hücre kültürü laboratuvarında çalışmaya başlanmadan önce ortam, en az 30 dk. UV ışığa maruz bırakılarak steril olması sağlanmıştır.

### 3.2.1 Hücre Tabanlı Teknikler

#### 3.2.1.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

##### 3.2.1.1.1 Hücre Kültürü Besi Yerinin Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerinde ticari olarak temin edilen DMEM High Glucose (Yüksek Glukoz, (Dulbecco's Modified Eagles Medium) kullanılmıştır. Bu besiyerine FBS (Fetal Bovine Serum) final konsantrasyonu %10 olacak biçimde ilave edilmiştir.

##### 3.2.1.1.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması işlemleri sırasında aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır.

- **PBS Tamponunun Hazırlanması;** Tablet şeklinde temin edilen PBS (Phosphate-Buffered Salin), her tableti 500 mL saf su ile hazırlanmıştır ve otoklavlanarak 2-8 °C'de muhafaza edilmiştir.
- **Trypsin-EDTA çözeltisinin Hazırlanması;** 0,5 mM EDTA ve %0,05 tripsin otoklavlanmış PBS (1X) içerisinde çözülmüş ve 0.22 µm'luk filtre ile steril edilerek-20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2 Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması

-80°C buzdolabında saklanan 1 mL HUVEC hücre süspansiyonu -80 °C'den alınıp hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hücre süspansiyonunun 37 °C'de erimesi sağlandıktan sonra eriyen hücre süspansiyonu içinde 6 mL DMEM-%10 FBS (Dulbecco's Modified Eagle Medium), yüksek glukoz, pirüvat besiyeri bulunan 15 mL hacmindeki falkona konulmuş ve hücreler çözdürülmüştür.

Çözünen hücreler santrifüj cihazında 1000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp geriye kalan pelet 4 mL DMEM-%10 FCS, yüksek glukoz, pirüvat besiyerinde pipetaj ile çözdürülmüştür.

Çözdürülen hücreler içinde 11 mL DMEM, yüksek glukoz, pirüvat mediumu bulunan 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmıştır. Hazırlanan kültürler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C etüvde inkübe edilmiştir.



### 3.2.2.1 Hücrelerin Pasajlanması

37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde büyüyen hücrelerin yoğunluğu %70-80 olduğunda pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi şu şekilde yapılmıştır:

Flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp DMEM, yüksek glukoz, pirüvat besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır. Flasktaki hücreler 5 mL PBS ile yıkanmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 3 mL tripsin tripsin-EDTA eklenip, 37 °C , %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 6 dk. bekletilmiştir. Etüvden çıkarılmış hücre kültürü, hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin-EDTA oranınının 2 katı olacak şekilde 6 mL DMEM-%10 FCS, (yüksek glukoz) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 9 mL olan hücre süspansiyonu 15 mL hacmindeki falkona alınarak, hücreler ile DMEM-%10 FCS (yüksek glukoz) ve Tripsin- EDTA karışımını ayırmak için 1000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pellet 8 mL DMEM-%10 FCS (yüksek glukoz) besiyerinde pipetaj ile çözdürülmüştür.

Çözdürülen hücrelerin 2 mL'si alınarak 1/4, seyreltme olacak şekilde içinde 13 mL DMEM-%10 FCS (yüksek glukoz) mediumu bulunan 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmıştır. (Duruma göre 1/2, 1/5 vb. seyreltmeler de yapılmıştır). Hazırlanan kültürler %5 CO<sub>2</sub>'li 37 °C etüvde saklanmıştır.

### 3.2.2.2 Hücrelerin Dondurulması

Kullanılmayacak hücreler dondurmak için medyumdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelere 3 mL Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca 6 mL DMEM-%10 FCS(yüksek glukoz) mediumu eklenip falkona alınarak 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj ile hücreler çöktülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1 mL %10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözülüp ve cryovial tüplerine konulmuştur. Tüpler etiketlenerek -80°C'deki dolaba konulup saklanmıştır.

### **3.2.2.3 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı**

Deneylerde kullanılacak yeterli miktardaki hücreyi alabilmek için tripan mavisi ve hemositometre lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Bu işlem için flasklardan kaldırılan hücreler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra 10 mL %10 FCS içeren medyunda homojen halde çözülmüştür. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi (1:1 seyreltme oranında) ile 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilecektir. Bu işlem sonunda ölü hücreler mavi renge boyanırken canlı hücreler boyanmaz ve bu boyanmayan hücreler sayılarak mL'deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Mililitredeki toplam canlı hücre sayısı; hemositometre sayım sonucu ile  $2 \times 10^4$  sabitinin çarpılması ile hesaplanır.

### **3.2.2.4 Hücre Soylarının Deney Kaplarına Alınması ve Hipoksik Koşul Oluşturulması**

Belli zamanlarda (24, 48 ve 72 sa.) ve hipoksik normoksik koşullarda RNA ve protein hücre pelleti almak için plate out yapılmıştır. Bunun için 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda büyütülen hücreler 4 kere pasajlandığında hücre sayımı yapılmıştır. 25cm<sup>2</sup> lik flasklara %10 FCS' li DMEM içeren ortamda her flaska 2 milyon hücre olacak şekilde hücreler yayılmış ve yirmidört saat inkübasyona bırakılmıştır. Yirmidört saat sonunda hipoksik ortam oluşturulacak flasklara son konsantrasyonu 150 µMolar CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturulmuştur.

### **3.2.2.5 Sitokin ve Yolak İnhibitörlerinin Uygulanması**

Flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp DMEM, yüksek glukoz, pirüvat besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır. Flasktaki hücreler 5mL PBS (Phosphate-Buffered Saline) kere yıkanmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 3 mL tripsin tripsin-EDTA eklenip 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 5 dk. bekletilmiştir. Etüvden çıkarılmış hücre kültürü, hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin-EDTA oranının 2 katı olacak şekilde 6 mL DMEM-%10 FCS, (yüksek glukoz) besiyeri eklenmiştir. Flaskın içinde 9 mL olan hücre süspansiyonu 15mL hacmindeki falkona alınarak, hücreler ile DMEM-%10 FCS (yüksek glukoz) ve tripsin-EDTA karışımını ayırmak için 1000rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Hücreler santrifüj edildikten sonra 10 mL %10 FCS içeren medyunda homojen halde çözülmüştür. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi (1:1 seyreltme oranında) ile 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda ölü

hücreler mavi renge boyanırken canlı hücreler boyanmamış ve bu boyanmayan hücreler sayılarak mL'deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. %90 canlı olduğu karar verilen hücrelerle deney kurulmuştur. %10 FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25cm<sup>2</sup> 'lik küçük flaslara 2.000.000 hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. 1 gece hücrelerin yüzeye yapışması beklenmiş ve sonrasında hücrelerin yüzeye yapıştığı mikroskopta kontrol edilmiştir. Yüzeye yapıştığından emin olunan hücrelerin besi yeri %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirilmiştir. 1 sa. beklendikten sonra 20 ng/ml olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır.

Yolak inhibasyon deneyi için; Yüzeye yapıştığından emin olunan hücrelerin besi yeri %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirilmiştir. 45 dk. sonra inhibitörler (JNK (20µM), PD169 (20µM), WORTMANNIN (2 µM), MEK (20 µM)) eklenip 1 sa. inkübasyondan sonra 20 ng/ml olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır.

**Tablo 3.8:** Çalışmada kullanılan inhibitörler

Çalışmada kullanılan inhibitörler	
Wortmannin	PI3K inhibitörü
Mek inhibitörü	MEK inhibitörü
PD169125	P38/MAPK inhibitörü
SP600	JNK inhibitörü

### 3.2.2.6 Geçici Transfeksiyon Çalışmaları

NONO p54nrb genine ait promotor parçalarının transfeksiyonu için hücreler 25 cm<sup>2</sup> flaslara 2x10<sup>6</sup> hücre/flask olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hipoksik ortam oluşturulacak flaslara son konsantrasyonu 150 µM CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. 315 µL son hacimde; 2 M CaCl<sub>2</sub> solüsyonu transfekte edilecek DNA(10µg) ile karıştırılıp 315 µL 2X HEPES üzerine damla damla eklenip presipitasyonun oluşması için 1 sa. beklenmiştir. DNA: Kalsiyum fosfat presipitasyonu oluşuktan sonra karışım damla damla flaslara eklenip hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlanmıştır. 1 gece 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyondan sonra transfeksiyon medyumunu değiştirip PBS ile flasklar yıkanarak taze %10'luk FCS'li medyum eklenmiştir. 1-2 sa. etüvde beklendikten

sonra hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeyden kaldırılıp sayılarak 96 kuyucuklu plakaya 30.000 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırılmıştır ve 48 sa. 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 48 sa. sonra besi yeri %0.1 BSA içeren DMEM ile değiştirilmiştir. Yolak inhibasyon deneyi için 45 dk. sonra inhibitörler (JNK (20 µM), PD169 (20 µM), WORTHMANIN(2 µM), MEK (20 µM)) eklenip 1 sa. inkübasyondan sonra 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. Eğer sadece sitokinin etkisi incelenecekse besi yeri %0.1 BSA içeren DMEM ile değiştirildikten sonra inhibitör uygulanmadan 1 sa. beklenip 20ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. 6sa.'lik inkübasyon sonunda kuyulardan 100 µL medyum çekilerek -20 °C'de lusiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçümü yapılanaya kadar bekletilmiştir.

NONO/p54nrb geninin hücrelerde aşırı ifadesini incelemek için, pGFP-C1 vektörüne klonlanmış halde bulunan NONO/p54nrb geninin transfeksiyonu gerçekleştirilmesi için hücreler 25 cm<sup>2</sup> flasklara 2x10<sup>6</sup> hücre/flask olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hipoksik ortam oluşturulacak flasklara son konsantrasyonu 150 µM CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. 315 µL son hacimde; 2 M CaCl<sub>2</sub> solüsyonu transfekte edilecek DNA ile karıştırılıp 315 µL 2X HEPES üzerine damla damla eklenip presipitasyonun oluşması için 60 dk. beklenmiştir. DNA: Kalsiyum fosfat presipitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla flasklara eklenip hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlanmıştır. 1 gece 37°C %5 CO<sub>2</sub> li etüvde inkübasyondan sonra transfeksiyon medyumunu değiştirip PBS ile flasklar yıkanarak taze %10'luk FCS'li medyum eklenmiştir.1-2 sa. etüvde beklendikten sonra hücreler Tripsin- EDTA solüsyonu ile yüzeyden kaldırılıp sayılarak MTT, koloni formasyon, çizik testi, floresans görüntüleme deneyleri kurulmuştur.

NONO/p54 nrb geninin hücrelerde ifadesinin baskılanmasını incelemek için, pLKO.1 TRC vektörüne klonlanmış halde bulunan NONO/p54nrb geni shRNA oligolarının transfeksiyonu gerçekleştirilmesi için hücreler 6 kuyucuklu plakalara 5x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hipoksik ortam oluşturulacak flasklara son konsantrasyonu 150 mikromolar CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. 4 µg DNA'yı 400 µL serumsuz DMEM ile seyreltilmiştir. Transfeksiyon reaktifi (TurboFect™ Transfection Reagent) seyreltilmiş DNA'ya 6 µL eklenmiştir. Karışım 15 dk.. oda sıcaklığında bekletildikten sonra damla damla kuyucuklara eklenip hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlanmıştır. 1 gece 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyondan sonra transfeksiyon medyumunu değiştirip PBS ile flasklar yıkanarak taze %10'luk FCS'li medyum

eklenmiştir. 1-2 sa. etüvde beklendikten sonra hücreler Tripsin- EDTA solüsyonu ile yüzeyden kaldırılıp sayılarak MTT, koloni formasyon, çizik testi, floresans görüntüleme deneyleri kurulmuştur.

### **3.2.2.7 Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü**

96 kuyucuklu plakalardan alınan medyumlar -20 °C buzdolabından çıkarılarak çözünmesi sağlanmıştır. 10x lusiferaz substratı reaksiyon tamponu ile 1x olacak şekilde dilue edilmiştir. Hücre kültürü medyumundan 9 µL alınarak 384 kuyucuklu plakalara koyulup üzerine 1 µL 1X Substrat/Reaksiyon tamponu eklenmiştir. Sonuçlar hızlıca luminometrede okunmuştur.

SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesinin ölçümü için 384 kuyucuklu plakalara transfeksiyon medyumundan 5 µL konularak üzerine 1X seyreltme bufferından 15 µL eklenmiştir. Plakanın üstü kapatılarak 65 °C’de yarım saat bekletilmiş, 2-3 dk. buz üzerine konularak oda sıcaklığına getirilmiştir. Oda sıcaklığındaki SEAP substrat solusyonundan her bir örneğe 20 µL eklenerek örnekler oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiştir İşlem sonunda plaka luminometrede okunmuş ve elde edilen değerler Microsoft Excel programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.8 IFC (immünofloresans) Deneyi**

İmmünofloresans deney, hücredeki belirli antijenleri, floresan boyalar ile bağlanmış antikolarla işaretleyerek floresan ışık veren ışık kaynağına sahip mikroskoplar ile inceleme prensibine dayanmaktadır.

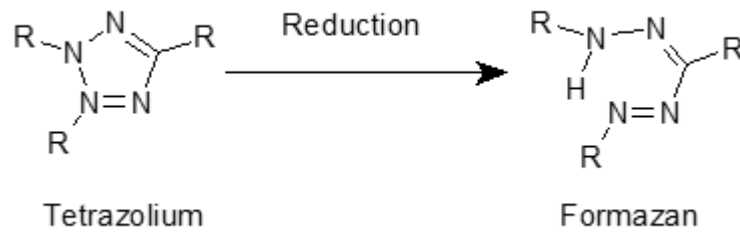
Transfeksiyondan 1 gün sonra hücreler TE ile kaldırılarak çöktürülmüştür. Hücre sayımı hemositometre ile yapılmış ve 1 mL’deki hücre sayısı belirlenmiştir. Daha sonra hücreler cover glass lamel eklenmiş 24 kuyucuklu plakalara 125.000 hücre/kuyu olacak şekilde alınıp bir gece 37°C %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübe edilmiştir. 24 sa. sonra hücrelerden DMEM uzaklaştırılıp 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücreler PBS içerisinde çözülmüş %4 paraformaldehid ile oda sıcaklığında 15 dk. bekletilerek fikse edilmiştir. Bu işlemden sonra fiksatif kuyucuklardan uzaklaştırılıp PBS’te çözülmüş %0.1’lik Triton X-100 eklenerek 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanıp, %1 BSA içeren PBS ile 1 sa. oda sıcaklığında bloklanmıştır. 1 sa. sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırılmıştır. 1/100 oranında dilüye edilmiş primer antikor (NONO/p54nrb anti-rabbit) eklenmiştir ve gece

boyunca karanlık ortamda +4 °C’de bekletilmiştir. Ertesi gün hücreler PBS ile 3 kez 5 dk. yıkanmıştır ve 1/2000 oranında dilüye edilmiş Alexa Flour 594 Floroform konjugatı sekonder antikor eklenmiş ve karanlıkta 1 sa. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından hücreler karanlık ortamda PBS ile 3 kez 5 dk. yıkanmıştır. Son yıkamada her kuyuya 5 µL DAPI boyası eklenmiştir ve ardından PBS ile beraber uzaklaştırılmıştır. Lamaların üzerine antifade solüsyonu damlatılıp kuyucukların içerisindeki cam lameller ısıtılmış iğne yardımıyla çıkartıldıktan sonra lamellerin üzerine kapatılmıştır. Örnekler floresans mikroskopunda görüntülenmiştir.

### 3.2.2.9 Sitotoksisite Deneyleri (MTT)

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisite ölçümü için kullanılan ve kantitatif klorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT’yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır.

Transfeksiyondan 1 gün sonra hücreler TE ile kaldırılarak çöktürülmüştür. Hücre sayımı hemositometre ile yapılmış ve 1 mL’deki hücre sayısı belirlenmiştir. Daha sonra hücreler 96 kuyucuklu plakalara 30.000 hücre/kuyu olacak şekilde alınıp bir gece 37°C %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübe edilmiştir. Ertesi gün üzerine 20 µL MTT boyası uygulanmıştır. Daha sonra 4 sa. 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılmış ve 0.004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözülmüştür. Daha sonra UV spektro ile 550 nm dalga boyunda absorbans alınmış ve sonuçlar Microsoft excel programı ile grafik haline getirilmiştir.



Şekil 3.3:MTT metodu ile oluşan kimyasal değişim

### **3.2.2.10 Çizik Testi**

Transfeksiyondan bir gün sonra hücreler sayılarak 500.000 hücre/kuyu olacak şekilde 6'lı plakalara paylaştırılarak 1 gece 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Ertesi gün kuyular pipet ucuyla çizilerek hücreler arası düzenli bir boşluk oluşturulmuştur. Çizik oluşturulduktan sonra 0, 6 ve 24. sa.'lerde hücreler fotoğraflanıp boşluğun kapanması kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır.

### **3.2.2.11 Koloni Formasyon**

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 500 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün hipoksik ortam oluşturulacak kuyulara son konsantrasyonu 150 µMolar CoCl<sub>2</sub> ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. Her bir kuyu için 100 µL son hacimde; X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) solüsyonu transfekte edilecek DNA ile karıştırılıp 30 dk. beklenmiştir. 30 dk. sonunda karışım damla damla kuyulara eklenip hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlanmıştır. Transfeksiyondan sonra hücrelerin büyümesi mikroskop ile gözlemlenmiştir ve 72 sa.'de bir transfeksiyon yinelenmiştir. 8. günün sonunda koloniler kristal viyole ile 5 dk. boyanmıştır. Saf su ile 5 dk.'lık 3 yıkama yapılmıştır ve fotoğraflandırılmıştır. Kolonilerin sayımı OpenCFU programı ile yapılmıştır. Alandaki koloni sayılarına göre grafikler oluşturulmuştur.

### **3.2.3 Klonlama Çalışmaları**

#### **3.2.3.1 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması**

Sıvı besiyeri olarak Luria Broth (LB) üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH<sub>2</sub>O'da çözülüp edilecektir. Soğuması beklenerek kullanılmıştır.

Katı besiyeri olarak kullanılan LB agar firma tarafından belirtilen miktarda dH<sub>2</sub>O'da çözülüp, 121 °C'de 20 dk. otoklavlanarak steril edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Amfisilin, son konsantrasyonu 100 µg/mL veya Kanamisin, son konsantrasyonu 30 µg/mL olacak şekilde eklenerek karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek katılaşması beklenmiştir. Petriler ters çevrilerek ağızları hava almayacak şekilde parafilmlemeden sonra +4 °C'de buzdolabında ışık almayacak şekilde stoklanmıştır.

### **3.2.3.2 NONO/p54nrb Geninin pGFP Vektörüne Klonlanması**

#### **3.2.3.2.1.1 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Sentezlenen cDNA'ların kalitesinin belirlenmesi için önce H $\beta$ 2 ekspresyon primerleri ile PCR kurulmuştur. Ardından NONO/p54nrb geni için dizayn edilen primerler ile PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu iki PCR çalışmasında bir tüp için: 36,5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ g cDNA, 10X Taq tamponu, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP eklenmiştir. Daha sonra, 1  $\mu$ g ileri ve geri primer eklenip en son Thermo Taq polimeraz enzimi 1  $\mu$ L, eklenerek 50  $\mu$ L' lik son hacim oluşturulmuştur.

#### **3.2.3.2.1.2 Agaroz Jel Elektrofrez ve DNA Pürifikasyonu**

Agaroz jel hazırlanması için son konsantrasyonu %1 olacak şekilde agaroz tartılmış üzerine 0.5X TBE(tris borik asit edta) solüsyonu eklenmiştir. Karışım tamamen homojen hale gelinceye kadar ısıtılmış ardından yeterince soğutulurak son konsantrasyonu 0,5  $\mu$ g/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenebilmesi için ürünlere 1x yükleme boyası eklenmiştir. 1 kb DNA belirteci kullanılarak, PCR ürünleri 95 voltluk elektrik akımında yaklaşık 40 dk. yürütülmüştür. UV ışığı altında DNA örnekleri görüntülenmiştir.

5X TBE hazırlanışı: 0,44 M Borik asit, 0,44 M Trisma base hasas terazi ile tartılmış ve 20 mL 0,5 M EDTA eklenip, solüsyonun pH'ı 8.00'e ayarlanmıştır. Solüsyonun hacmi dH<sub>2</sub>O ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlanmıştır.

PCR sonrası görüntülenen DNA bantları UV görüntüleyici üzerindeyken jelden kesilerek alınmıştır. DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo) ile jelden saflaştırılmıştır. Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda örneklerin absorbansı ölçülerek DNA miktarı ve saflığı hesaplanmıştır.

#### **3.2.3.2.1.3 T: A Klonlama**

T: A klonlama prosedürün önerdiği şekilde jelden geri kazanılan NONO/p54nrb genini pGEM-T Easy vektörüne (Promega) ligasyonu gerçekleştirilmiştir. pGEM-T Easy vektör sistemi T:A klonlama sistemiyle çalışan bir plazmit vektördür. 20  $\mu$ L'lik son hacimde reaksiyon ortamına klonlanmış DNA parçası ve vektör (minimum 1:3 oranında), 1 X



ligasyon tamponu, 0.3 U/ $\mu$ L T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +16°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.2.3.3 Ligasyon Ürününün Kompetant Hücrelerine Transformasyonu**

Ligasyon sonuçları E.coli XL1blue kompetent hücrelerine transforme edilmiştir. Bunun için, XL1blue kompetent hücresi stoğundan 200  $\mu$ L alınarak üzerine 5  $\mu$ L ligasyon ürünü hücreleri sarsmadan eklenmiştir. Karışımın bulunduğu tüp ardından 40 dk. boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda örneklerin bulunduğu ependorf tüp 42°C’deki su banyosunda iki dk. bekletilerek hücrelere ısı şoku yapılması sağlanmıştır. Ardından tüp 2 dk. buzda tutulmuştur. Daha sonra tüp buzdan alınarak antibiyotiksiz LB broth ile 1 mL’ye tamamlanmıştır. Ardından tüp iki saat boyunca 37°C’de 210 rpm çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. İnkübasyon süresi biten transformasyon ürünleri 10000 rpm de 5 dk. santrifüj edilerek Xgal ve IPTG substratları ve ampisilin antibiyotiği içeren LB agar petrilere tek koloni yöntemi ile yayılmıştır. Gece boyu 37°C’ye ayarlanmış inkübatörde ters olarak bekletilen petrilere mavi beyaz koloni oluşumu gözlenmiştir. Beyaz koloniler seçilerek plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır.

### **3.2.3.4 Küçük Ölçekli (Mini-Prep) Plazmit DNA İzolasyonu**

Beyaz koloniler seçilerek Thermo Miniprep DNA isolation kit basamaklarına uygun olarak küçük hacimde plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır.

### **3.2.3.5 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi**

NONO/p54nrb geni için primer dizayn ederken primerlere restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklenmiştir. İzole edilen plazmidler bu kesim bölgelerine göre restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimlerinin çalışması için her iki enzime de uygun olan tampon seçilmiştir. Bu seçim [www.thermoscientificbio.com](http://www.thermoscientificbio.com) adresinden yapılmıştır. Enzimleri ve tamponları üreten üreticinin protokolüne bağlı olarak enzimler ve tampon karıştırılarak son hacim su ile 50  $\mu$ L ye tamamlanmıştır. 37°C sıcaklıktaki inkübatörde 3 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda kesim örnekleri agaroz jel hazırlanarak jelle yüklenmiş, 90 Voltta 40 dk. yürütüldükten sonra UV görüntülenme cihazında görüntülenmiştir. Görüntülenen bantların

marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu anlaşıldığında, klonlamanın doğrulanması örnekler dizi analizine gönderilmiştir.

### 3.2.3.6 pEGFP-C1 Vektörüne Alt Klonlama

NONO/p54nrb geninin kontrol kesimi agaroz jel üzerinde doğru bölgede görüntüledikten sonra restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jele yüklenmiş ardından jelden saflaştırılmıştır. Alt klonlama yapmak amacıyla boş pEGFP-C1 vektörü restriksiyon enzimleri ile reaksiyona girerek düz hale getirilmiştir. Böylece kesilen NONO/p54nrb geni düz olan pEGFP-C1 vektörü ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonundan sonra ürünler kompetant hücrelerine transforme edilmiştir. 20 µL'lik son hacimde reaksiyon ortamına klonlanacak DNA parçası ve vektör (minimum 1:3 oranında), 1X ligasyon tamponu, 0.3 U/µL T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +16°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kompetan hücrelere aktarılan ligasyon ürünleri kanamisin antibiyotiği içeren LB agar üzerine tek koloni yöntemi ile ekilmiştir. Petri kapları gece boyu 37 °C' ye ayarlanmış etüv de ters olarak bekletilmiştir ve koloni oluşumu gözlenmiştir. pEGFP-C1 vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni için koloniler seçilmiş ve üreticinin önerdiği şekilde (Thermo Miniprep DNA isolation kit) plazmid DNA'lar küçük miktarda izole edilmiştir.

NONO/p54nrb geni için primer dizayn ederken primerlere restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklenmiştir. İzole edilen plazmidler bu kesim bölgelerine göre restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimlerinin çalışması için her iki enzime de uygun olan tampon seçilmiştir. Bu seçim [www.thermoscientificbio.com](http://www.thermoscientificbio.com) adresinden yapılmıştır . Enzimleri ve tamponları üreten üreticinin protokolüne bağlı kalarak enzimler ve tampon karıştırılarak son hacim su ile 50 µL ye tamamlanmıştır. 37°C sıcaklıktaki inkübatörde 3 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda kesim örnekleri agaroz jel hazırlanarak jele yüklenmiş, 90 Voltta 40 dk. yürütüldükten sonra UV görüntülenme cihazında görüntülenmiştir.

Görüntülenen bantların marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu anlaşıldığında, klonlamanın doğrulanması örnekler dizi analizine gönderilmiştir.

### **3.2.3.7 NONO/p54nrb Geni sh-RNA Oligolarının pLKO.1 Vektörüne Klonlanması**

#### **3.2.3.7.1.1 NONO/p54nrb Genine Özgü sh-RNA Oligolarının Belirlenmesi**

NONO/p54nrb genine özgü shRNA oligolarının belirlenmesi için Whitehead Institute for Biomedical Research hosts an siRNA Selection (<http://sirna.wi.mit.edu/>) aracı kullanılmıştır. Klonlama için vektör üreticisinin önerdiği protokole göre oligolar sipariş edilmiştir.

Forward oligo:

5' CCGG—21bç sense—CTCGAG—21bç antisense—TTTTTG 3'

Reverse oligo:

5' AATTCAAAAA—21bç sense—CTCGAG—21bç antisense 3'

#### **3.2.3.7.1.2 shRNA Oligolarının Birleştirilmesi**

Sipariş edilen oligolar 20 µM olacak şekilde sulandırılarak 5 µL Forward oligo, 5 µL Reverse oligo, 5 µL 10x NEB buffer 2 son hacim 35 µL olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak birleştirme reaksiyonu kurulmuştur. Kurulan reaksiyon 95 °C'ta 4 dk.. bekletilmiştir. Ardından oligoların birleşmesi için oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

#### **3.2.3.7.1.3 pLKO.1 TRC Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi**

pLKO.1 TRC Vektörüne NONO/p54nrb geninin klonlanması için pLKO.1 TRC Vektörü vektör üreticisinin önerdiği protokole göre AgeI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonu için 6 µg pLKO.1 TRC-klonlama vektörü, 5 µL 10x NEB buffer 1, 1 µL AgeI, 1 µL EcoRI 50 µL olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kurulan reaksiyon 37°C ta 30 dk.. bekletilmiştir.

Reaksiyon ürünü agaroz jel elektroferezi ile yürütülmüştür. UV transilluminator ile görüntülenen 7kb uzunluğundaki DNA bantları UV görüntüleyici üzerindeyken jelden kesilerek alınmıştır. DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo) ile jelden saflaştırılmıştır.

Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda örneklerin absorbansı ölçülerek DNA miktarı ve saflığı hesaplanmıştır.

#### **3.2.3.7.1.4 pLKO.1 TRC Vektörü ve sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi**

Klonlama için hazırlanmış, shRNA oligoları ve lineer hale gelmiş pLKO.1 TRC Vektörü ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürünleri ligasyon reaksiyonundan sonra kompetant hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. 20 µL'lik son hacimde reaksiyon ortamına klonlanacak oligo (2 µL) ve vektör (20 ng), 1 X ligasyon tamponu, 0,3 U/µL T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +16 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kompetan hücrelere aktarılan ligasyon ürünleri ampisilin içeren LB agar üzerine tek koloni yöntemi ile ekilmiştir. Petri kapları gece boyu 37 °C'ye ayarlanmış etüv de ters olarak bekletilmiştir ve koloni oluşumu gözlenmiştir. pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb genine özgü shRNA oligoları için koloniler seçilmiş ve üreticinin önerdiği şekilde (Thermo Miniprep DNA isolation kit) plazmid DNA'lar küçük miktarda izole edilmiştir. İzole edilen plazmidler, EcoRI ve NcoI restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesim reaksiyonuna tabi tutulmuşlardır. Her iki enzimin çalışması için gerekli olan buffer (10x NEB buffer for EcoRI) olarak seçilmiştir. 1 µg izole edilen plazmid, 10x NEB tampon, 1 µL NcoI, 1 µL EcoRI 50 µL olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kurulan reaksiyon 37°C ta 30 dk.. bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında kesim ürünleri agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülenmiştir.

Görüntülenen bantların marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu anlaşıldığında, klonlamanın doğrulanması için örnekler dizi analizine gönderilmiştir.

#### **3.2.3.8 Çok Kopyalı Plazmid DNA İzolasyonu (Maxiprep)**

Plazmidlerin hücrelere aktarılması için plazmid DNA'ların yüksek konsantrasyonda olmaları gerekmektedir. Böylece klonlama yapılan plazmidler, üreticinin önerdiği şekilde MN midi plus kiti ile çok kopyalı ve yüksek saflıkta izole edilmiştir.

### **3.2.4 RNA ile İlgili Teknikler**

#### **3.2.4.1 RNA İzolasyonu**

Pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde dikkatlice çözülmüştür. Thermo Gene Jet RNA izolasyonu kitinin önerdiği şekilde kontrol ve deney grubu pelletlerden izolasyon yapılmış ve elde edilen RNA'lar -80 °C dondurucuda uzun dönemde saklanmıştır.

#### **3.2.4.2 RNA Miktar Tayini**

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayin etmek için RNA, mikrodropta 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alınmıştır.  $A_{260}/A_{280}$  oranından RNA sağlığı belirlenmiştir. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{RNA miktarı} = 40 \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}$$

#### **3.2.4.3 RNA Jel Elektroforezi**

Elektroforez yapılmadan önce kullanılan malzemeler RNaz enzimlerinden etkilenmemesi için gerekli arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elektroforez tankı ve aparatları jel dökülmeden önce %0.5'lik SDS ile yıkandıktan sonra %0.1'lik DEPC'li sudan geçirilip, saf etanolden geçirildikten sonra kuruması için beklenmiştir.

Jelin yapımı için 0.5 g agaroz, 5 mL 10X FA jel tamponunda çözülerek RNaz içermeyen steril dH<sub>2</sub>O ile 50 mL'ye tamamlanıp bu karışım mikrodalgada kaynatılmıştır. Karışım soğuduktan sonra karışıma %37'lik (12.3 M) formaldehitten 0.9 mL eklenip jelin homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra stok Et-Br solüsyonundan (10 mg/mL) 1 µL eklenip tarakları önceden yerleştirilmiş elektroforez kasetine jel dökülüp polimerleşmesi beklenmiştir. RNA örnekleri jele yüklenmeden önce 70 °C'de 10 dk. ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dk. buzda bekletilip örnekler jele yüklenerek 1X FA Jel tamponu içerisinde 80 Volt'da yürütülmüştür. Elektroforez sonucu dijital jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilip ve fotoğraflanmıştır.

#### 3.2.4.4 qRT- PCR Reaksiyonu

Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Son hacim 12.5 µL olacak şekilde; 1 µL oligo dT primer, 1 µg/ µL olacak RNA kalıbı ve dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. 70 °C'de 5 dk. ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir örnek için 4 µL Buffer RT (1X), 2 µL dNTP, 1 µL Revers Transkriptaz ve 0.5 µL Ribolock inhibitörden oluşan karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan her bir tüpe 7.5 µL paylaştırılarak örnekler 42 °C 1 saat ve 72 °C 10 dk. inkübe edilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

#### 3.2.4.5 Real Time PCR

Her deney seti için 3 tekrarlı olmak üzere Real Time PCR yapılmıştır. Son hacim 12.5 µL olacak şekilde; 6.25 µL SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master karışım, Master, 1 µL cDNA, 10 pmol/ µL'lik forward ve reverse primerleri stoğundan 0.5'er µL ve 4.25 µL dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Real Time PCR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. NONO/p54nrb ya da HIF-1α için tekrarlanan 3 grubun Ct değerinin ortalaması alınmıştır. Ayrıca Hβ2 için tekrarlanan 3 grubun Ct değerinin ortalaması alınmıştır. Hβ2 kontrol geninin ortalama değerinden elde edilen NONO/p54nrb genin ortalama değeri çıkarılmıştır. Yeni çıkan değer 2'nin üssü olacak şekilde kuvveti alınıp, kontrol grubu kendine bölünüp, 1 sayısı elde edilmiştir. Daha sonra ilgili zaman aralığında çalışılan deney grubu aynı zaman aralığında çalışılan kontrol grubuna bölünmüştür. Bunun sonucunda 1' in katı şeklinde değerler elde edilmiş ve sütun grafiği oluşturulmuştur.

**Tablo 3.9:**Real time PCR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	10 dk.	1 döngü
95°C	30 s	
55°C	30 s	35 döngü
72°C	30 s	
95°C	5 s	1 döngü
65°C	1 dk.	

**Tablo 3.10:** HIF-1 $\alpha$ , NONO/P54nrb, H- $\beta$ -2 Mikroglobulin, NEAT1, PSF-SPFQ, PSPC1 ekspresyon primeri.

<b>P54nrb/NONOEkspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5'-ATATGCCACTCCGTGGAAAG-3' Tm: 54.8 °C
Geri Primer	5'-GAAGGAGCCTTCACTGCATC-3' Tm: 55.9 °C
<b>H<math>\beta</math>2 Mikroglobulin Ekspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3' Tm: 60 °C
Geri Primer	5'-CATGTCTCCATCCCCTTAAC-3' Tm: 60 °C
<b>NEAT1 Ekspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5'-GATTTTTTGTTCAGGTCTGTC-3' Tm:62 °C
Geri Primer	5'-AGATAAACCCAGGATTCAGG-3' Tm:62 °C
<b>PSF/SPFQ Ekspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5'-AAATGCCTGGCGGGCCGAA-3' Tm:62 °C
Geri Primer	5'-GTCTTTTGAATTCATCCTCCGT-3' Tm:62 °C
<b>PSPC1 Ekspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5'-TTTAGCCCAGCCCCTGCTGGT-3' Tm:64 °C
Geri Primer	5'-AGGACCACCACTCACAGGACC-3' Tm:66 °C
<b>HIF-1<math>\alpha</math> Ekspresyon Primerleri</b>	
İleri Primer	5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT-3' Tm: 56.9 °C
Geri Primer	5'-TGTCCTGTGGTGA CT TGTCC-3' Tm: 56.9 °C

### **3.2.5 Protein ile İlgili Teknikler**

#### **3.2.5.1 Western Blotting Metodu ile Protein Tayini**

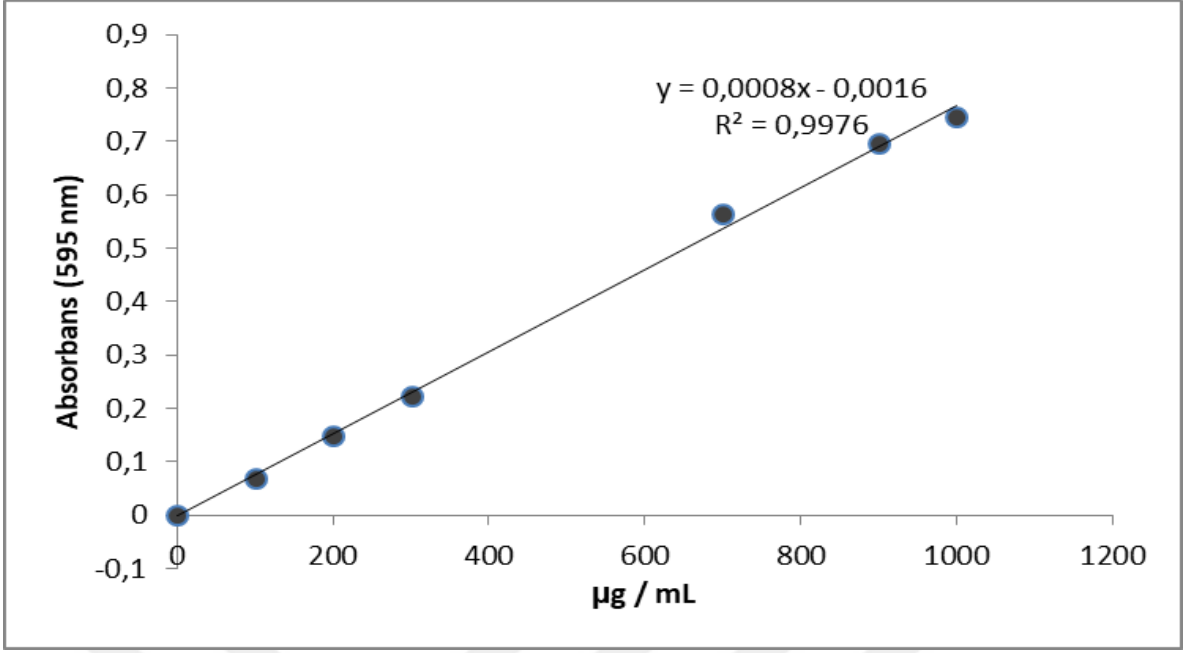
##### **3.2.5.1.1.1 Total Hücre Ekstraktının Hazırlanması**

Çalışmalarımızda deney ve kontrol grubu olarak kullanılan hücrelerin pelletleri ilk olarak soğuk PBS'de çözülerek 4.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 200 µL soğuk Ripa tamponu eklenip pipetaj ile hücrelerin lizis olması sağlanmıştır. Daha sonra 30 dk. buz üzerinde bekletilip son aşamada ise 13.000 rpm'de +4 °C'de 30 dk. santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı alınarak protein analizleri için kullanılmıştır.

##### **3.2.5.1.1.2 Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bradford reaktifinin hazırlanması için; 100 mg (0.1g) Commanse blue, 50 mL %95'lik etanol, 100 mL %95'lik fosforik asit karıştırılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Bradford Standart eğrisinin hesaplanması için stok BSA hazırlanması için; 0.1 g BSA 100 mL Saf suda çözülmüştür. Örnekleri ölçmek için; 96'lık kuyulu plakaya 3 µL örnek 2 µL saf su ve 250 µL reaktif ile karıştırılmıştır. Örnekler ve kör hazırlandıktan sonra 10 dk... karanlıkta bekletilmiştir. 595 nm dalga boyunda spektrometrede ölçüm alınmış ve standart eğri grafiğine göre hesaplama yapılmıştır. 1µL'deki protein konsantrasyonu nanogram cinsinden bulunmuştur.





**Şekil 3.4:**Bradford Yöntemi Standart Eğri Grafiği

#### 3.2.5.1.1.3 SDS-PAGE

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlenerek jel dökmek için hazır hale getirilmiştir. 1.5 M Tris-HCl (pH 8,8), %10 (w/v) SDS içeren ayırma jeli üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde dökülecektir. 10-15 dk.dk.. jelin polimerizasyonu için beklenip 1 M Tris-HCl (pH 6.8), %10 (w/v) SDS içeren yığıma jeli dökülüp taraklar yerleştirilmiştir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra taraklar çıkarılıp jel tank içine yerleştirilecektir. Son hacim 30 µL olacak şekilde; 5 µL'de 2X yükleme boyası ve 30-50 µg protein lizatı koyularak örnekler 95 °C'de 5.dk.. denatüre edilmiştir. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Jelin ilk kuyusuna ise 5 µL protein büyüklük belirteci yüklenmiş (Page Ruler Prestained) ve tank %0.1 (w/v) SDS içeren 1X yürütme tamponu ile doldurularak 90 V üst yığıma jeli 15 .dk.. yürüdüktan sonra 120 volt akımda yaklaşık 2 saat yürütülmüştür.

#### 3.2.5.1.1.4 SDS Jelinin PVDF Membrana Blotlanması ve Antikorlarla Muamele İşlemi

Proteinlerin elektroforetik transferi için Bio-Rad Trans Blot sistemi, proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanılmıştır. SDS-PAGE'de yürütülen jelin yığıma jeli kısmı kesilerek uzaklaştırılmıştır. Jel transfer buffer içine alınarak dengelenmesi için oda

sıcaklığında 15 dk. inkübe edilmiştir. Kurutma kâğıdı ve PVDF membran jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlanmış ve membran metanolde 1 dk. bekletilerek aktive edilmiştir. Transfer kaseti arasına (-) kutuptan başlayarak sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış sünger, kurutma kâğıdı, jel, membran, kurutma kâğıdı ve sünger hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiştir. Daha sonra kaset, transfer tamponu ile dolu olan blot tankına yerleştirilip, 15 volt akımda 12-18 saat transfer yapılmıştır.

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membran %0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS tamponuna, %5 oranında yağsız süt tozu eklenerek hazırlanan bloklama tamponunda 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak membran % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS tamponunda 5'er dk.'lık sürelerle 3 kez yıkanmıştır. Membran sırasıyla primer antikorlarda (HIF-1 $\alpha$  1:500, NONO/p54nrb 1:1000 ve beta-actin 1:1000) 4<sup>0</sup>C'de 12-18 saat, sekonder antikorlar (anti rabbit, anti Mouse (1:5000) ile 1'er saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübasyona bırakılıp görüntülemeye geçilmiştir. Membranlar ilk olarak 2 dk. (Pierce) ECL Western Blotting Substratı ile muamele edilip UVP cihazında görüntülenmiştir. Ayrıca membranlar Poncaue çözeltisi (0.5 gr /25 mL asetik asit 475 mL saf su) ile boyanarak fotoğraflanmıştır.

### 3.3 İstatiksel Analiz

Deneylemlerin tekrarlı olarak çalışılmış verileri MiniTab (One Way ANOVA) ile istatistiksel olarak analiz edilecek ve  $p \leq 0,05$  olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. Real Time PCR'da kontrol ve deneysel gruplar Ct değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu ile değerlendirilmiştir. Western Blot verileri Image J programı kullanılarak değerlendirilmiş ve grafikler oluşturulmuştur.

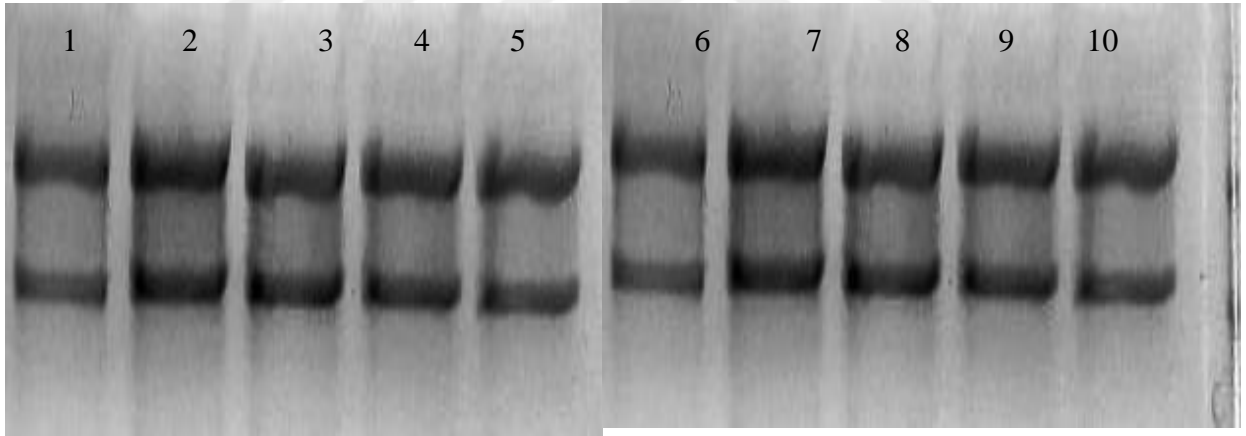
#### 4. BULGULAR VE SONUÇLAR

##### 4.1 VEGF Sitokinin İnsan NONO/p54nrb Geni ve Diğer Paraspeckles Bileşenlerinin Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Belirlenmesi

##### 4.1.1 VEGF Sitokinin İnsan NONO/p54nrb Geni ve Diğer Paraspeckles Bileşenlerinin Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

VEGF sitokinin insan NONO/p54nrb geni üzerine etkisinin hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA düzeyinde belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

Daha sonra Bölüm 3.2.2.5.'te anlatıldığı gibi VEGF sitokini uygulanmıştır. 1, 6, 24 ve 48 saat zaman aralıklarıyla hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.4.1'te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların kalitesi belirlenmek üzere Bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı gibi RNA jel elektroferezi yapılmıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1:**RNA jel görüntüsü ( 1- normoksi kontrol 2- normoksi 1.sa. 3- normoksi 6.sa. 4- normoksi 24. sa. 5- normoksi 48.sa. 6- hipoksi kontrol 7- hipoksi 1.sa. 8- hipoksi 6.sa. 9- hipoksi 24. sa. 10- hipoksi 48.sa.)

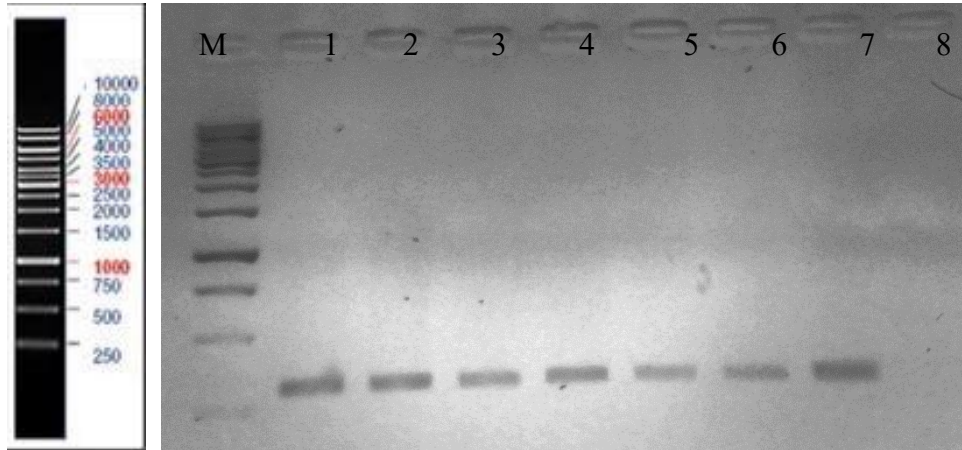
RNA kalitesi belirlendikten sonra Bölüm 3.2.4.4'te anlatıldığı gibi cDNA elde edilmiştir.

Elde edilen cDNA'ların kalitesini kontrol etmek amacı ile H $\beta$ 2 primerleri ile Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı şekilde kontrol PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Tablo 4.1'deki gibidir.

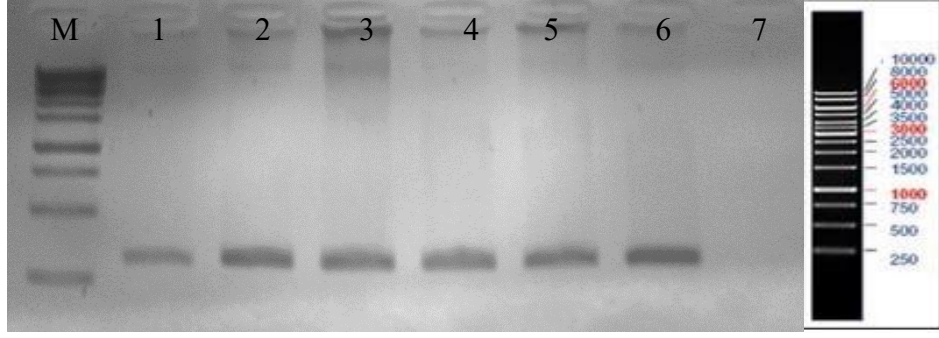
**Tablo 4.1:** H $\beta$ 2 primerleri için PCR koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	94°C	2 dk..	1 döngü
	94°C	60 s	
2	58°C	30 s	22 döngü
	72°C	45 s	
3	72°C	10 dk.	1 döngü
4	4°C		

PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil4.2.ve Şekil4.3)

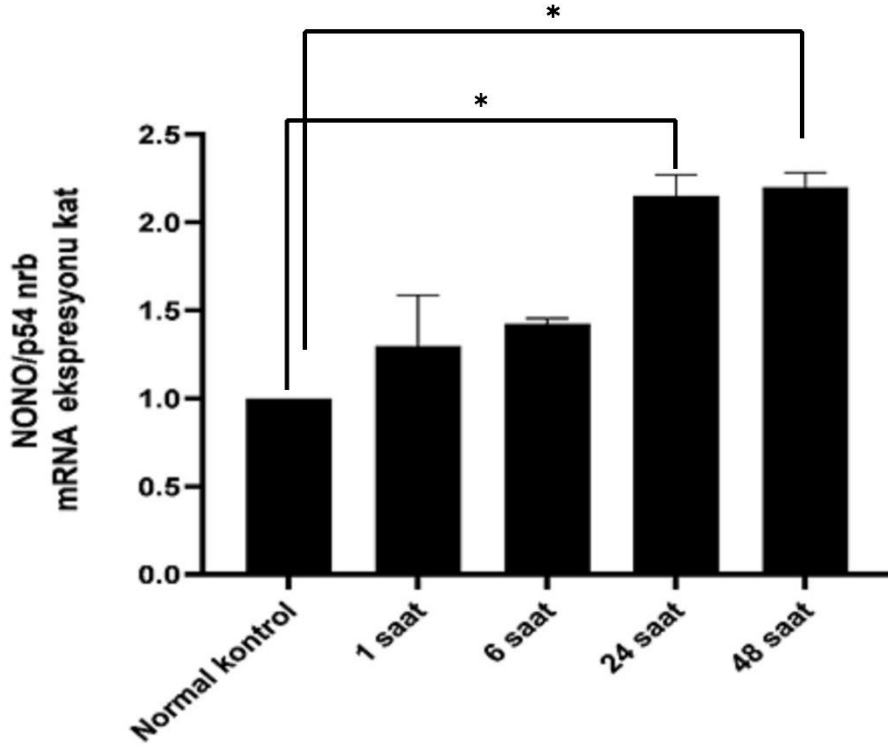


**Şekil 4.2:** H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1- normoksi kontrol 2- hipoksi kontrol 3- hipoksi 1.sa. 4- hipoksi i 6.sa. 5- hipoksi 24. sa. 6- hipoksi 48. sa. 7- pozitif kontrol 8- negatif kontrol)

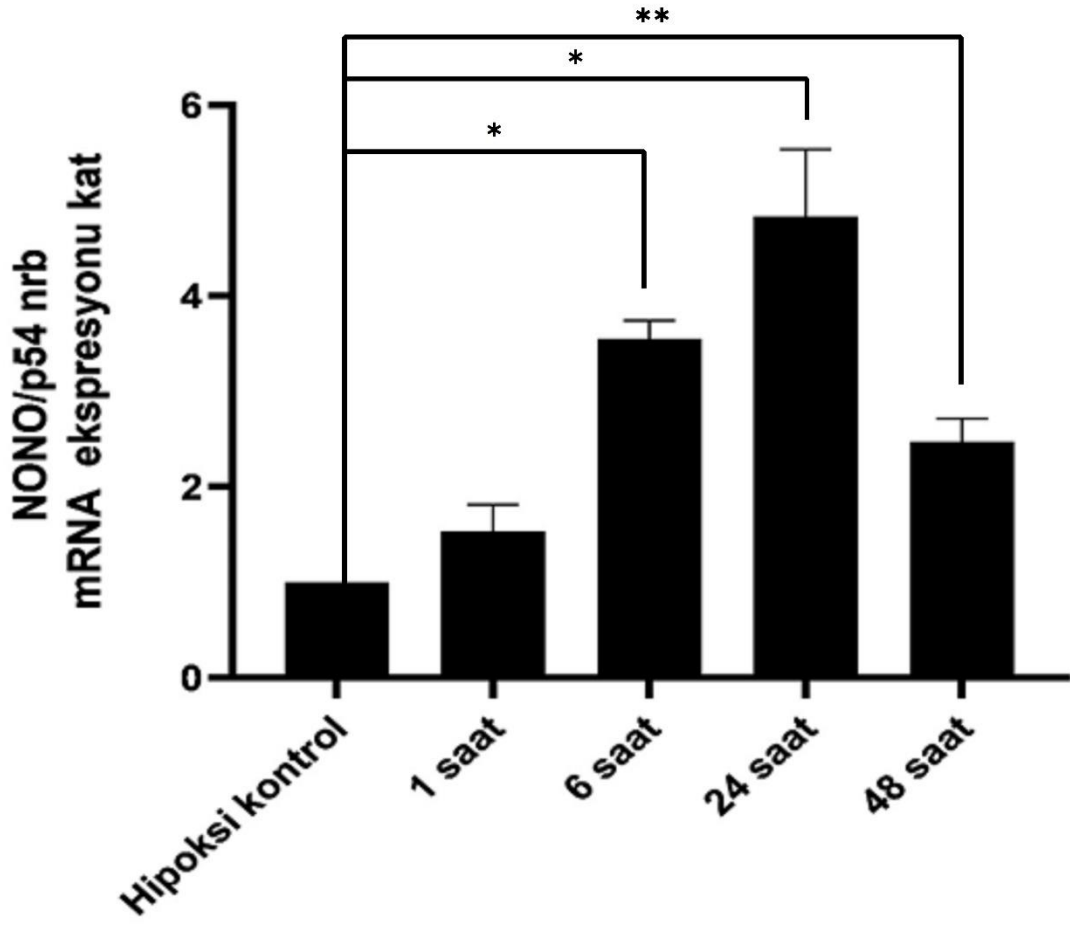


**Şekil 4.3:**H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1- normoksi kontrol 2- normoksi 1.sa. 3- normoksi 6.sa. 4- normoksi 24. sa. 5- normoksi 48.sa. 6- pozitif kontrol 7- negatif kontrol)

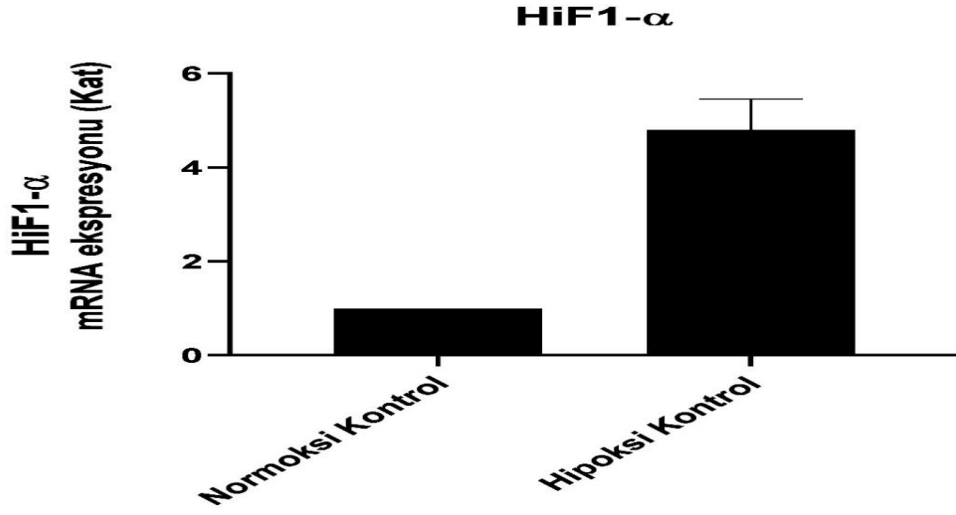
cDNA'ların kalitesi kontrol edilip real time PCR reaksiyonu için kullanılabilir olduğuna karar verildi ve Bölüm 3.2.4.5'te anlatıldığı gibi Real-time PCR reaksiyonu gerçekleştirildi ve analiz edilmiştir (Şekil4.4-Şekil4.9).



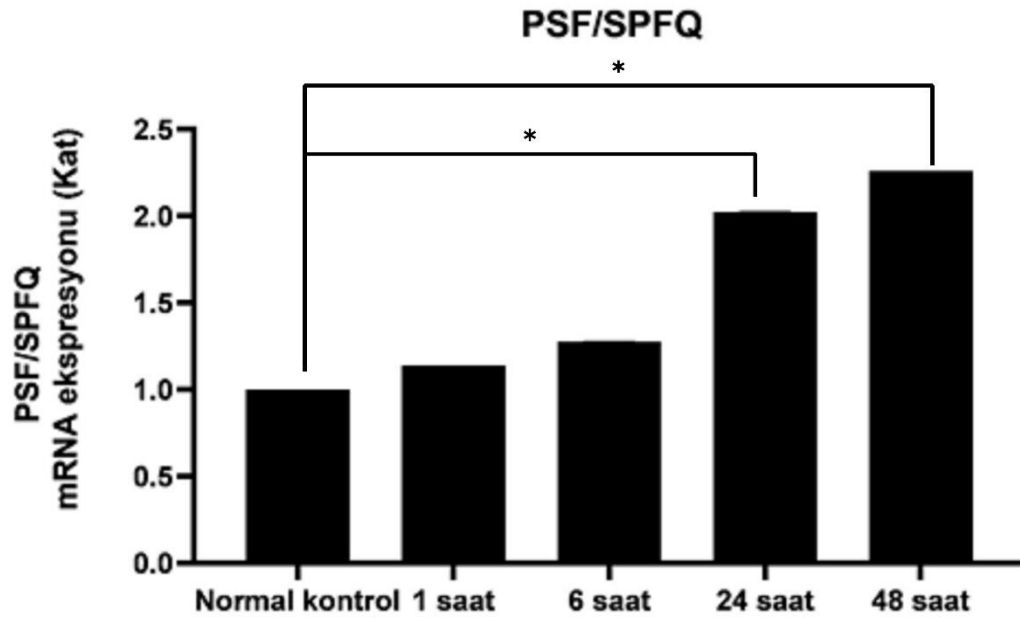
**Şekil 4.4:**Normoksik koşullarda VEGF sitokinin NONO/p54nrb geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.



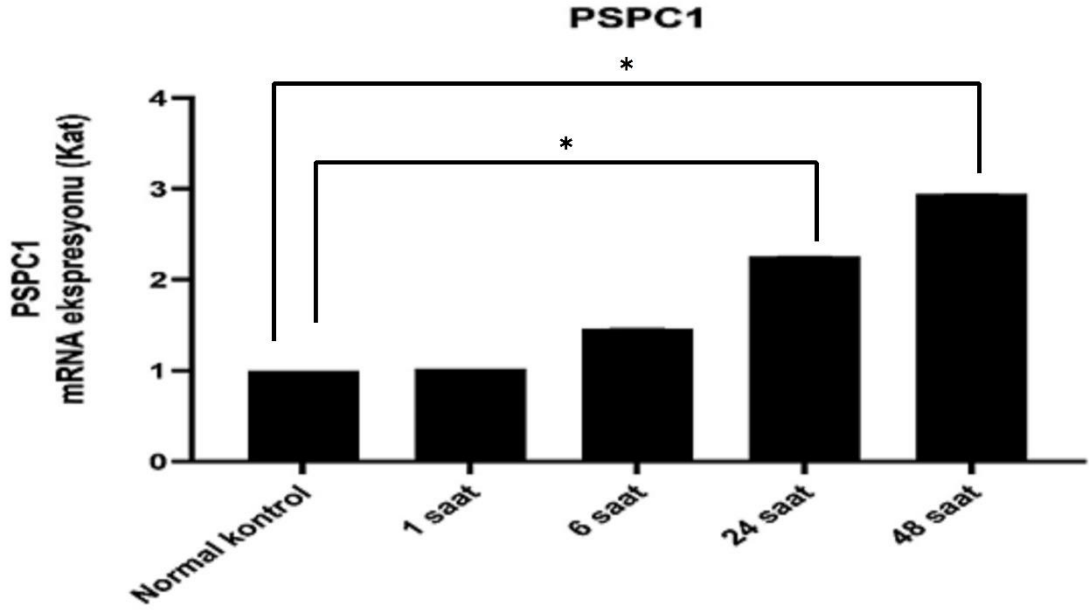
Şekil 4.5: Hipoksik koşullarda VEGF sitokininin NONO/p54nrb geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.



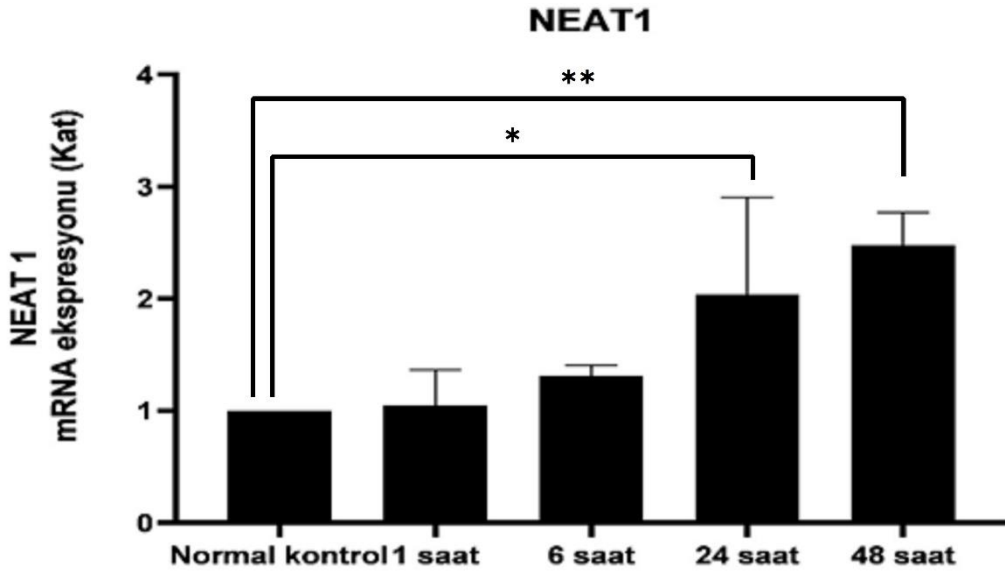
Şekil 4.6: Normoksik ve hiposik koşullar altında HIF-1 $\alpha$  geni ekspresyonunun değişimi.



Şekil 4.7: Normoksik koşullarda VEGF sitokinin PSF/SPFQ geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.



**Şekil 4.8:** Normoksik koşullarda VEGF sitokinin PSpC1 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.



**Şekil 4.9:** Normoksik koşullarda VEGF sitokinin NEAT1 geni ekspresyonuna zamana bağlı etkisi.

Real-time PCR sonuçlarına göre VEGF sitokini normoksik koşullarda koşullarda paraspeckle genlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Hem normoksik koşullarda hem de



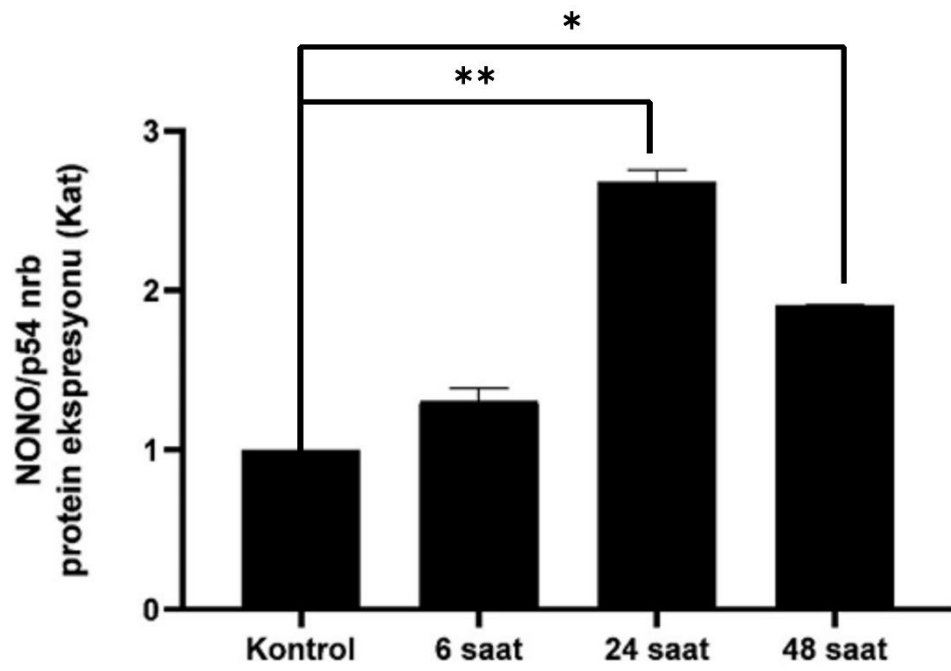
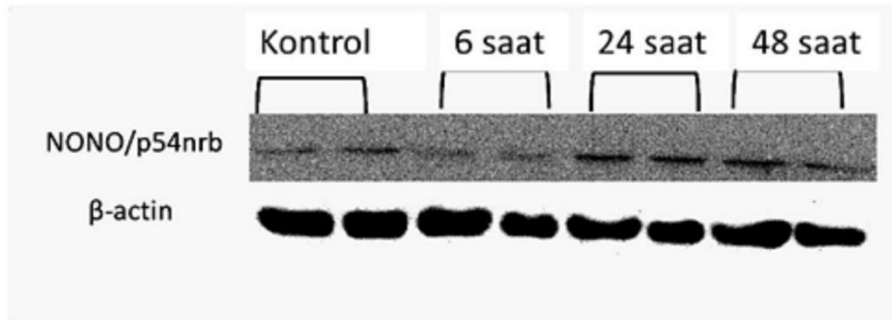
hipoksik koşullarda en çok ekspresyon artışı VEGF sitokini uygulandıktan 24 saat sonra pelleti alınan hücrelerde gözlemlenmiştir.

### **VEGF Sitokinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Düzeyinde Belirlenmesi**

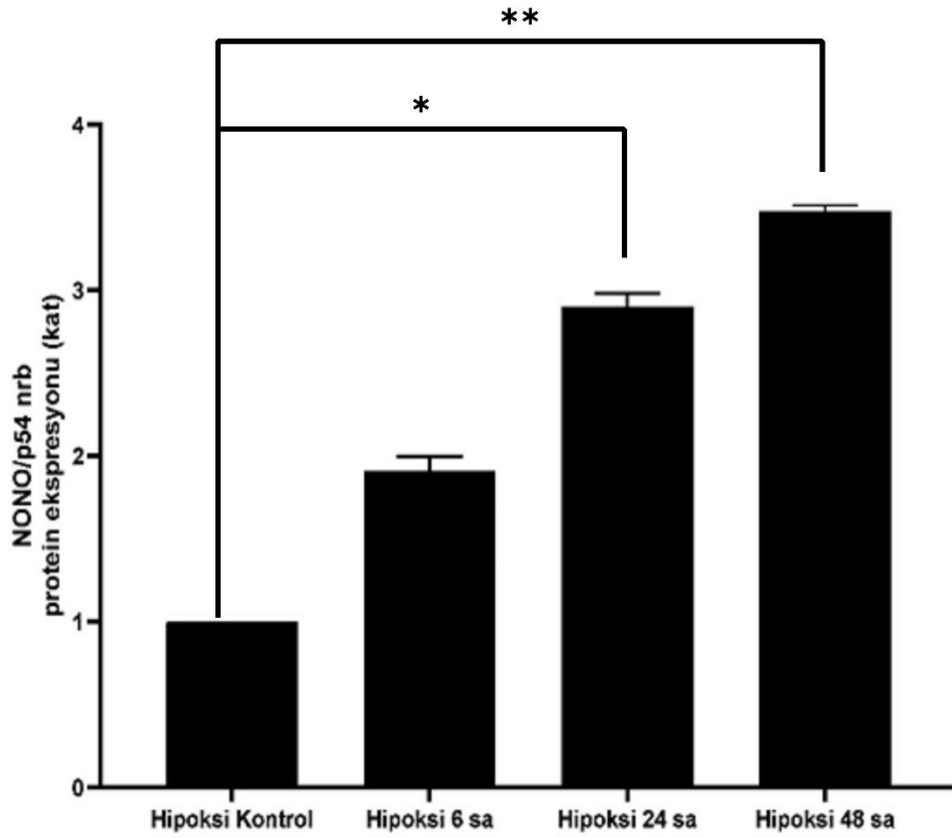
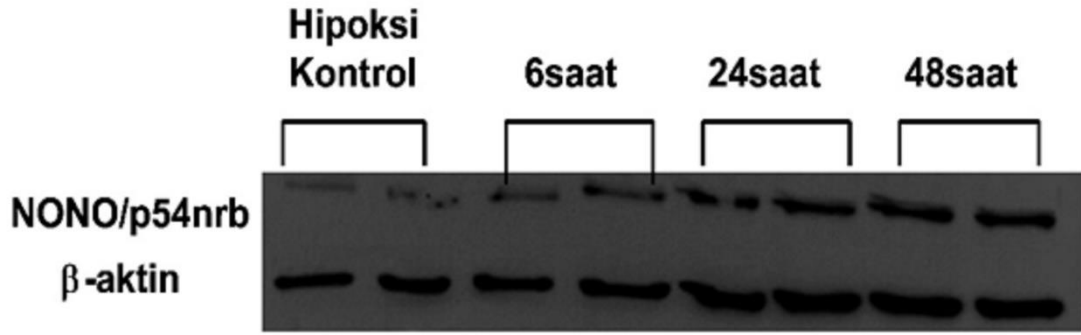
VEGF sitokinin insan NONO/p54nrb geni üzerine etkisinin hipoksik ve normoksik koşullar altında protein düzeyinde belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

Daha sonra, Bölüm 3.2.2.5.'te anlatıldığı gibi VEGF sitokini uygulanmıştır. 1, 6, 24 ve 48 saat zaman aralıklarıyla hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.5.1'te anlatıldığı gibi western blot deneyi yapılmıştır (**Şekil4.10.**)

a)



b)



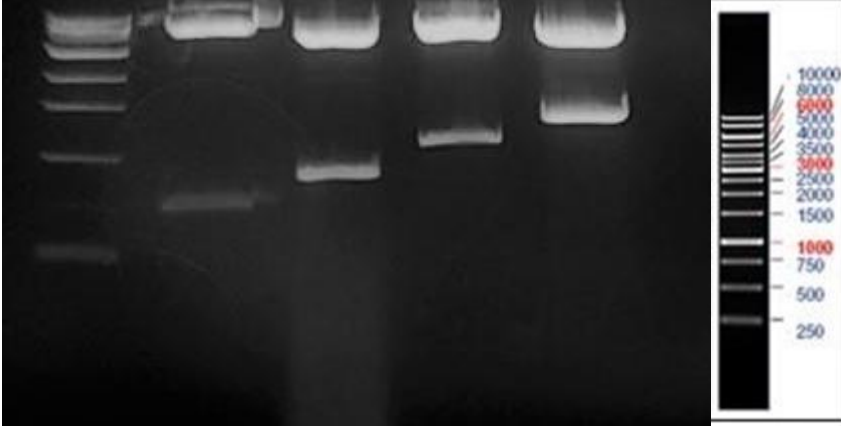
**Şekil 4.10:** Normoksik ve hiposik koşullar altında NONO/p54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi. a) Normoksik koşullar altında NONO/p54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi. b) Hiposik koşullar altında NONO/p54nrb geni protein ekspresyonunun değişimi.

Western blot sonuçlarına göre; VEGF sitokini hem normoksik koşullarda hem de hipoksik koşullarda **NONO/p54nrb** ekspresyonu protein seviyesinde arttırmaktadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NONO/p54 protein düzeyinin normoksik koşullarda 24.saat'te yaklaşık 2 kat, hipoksik koşullarda 48. saatte yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, NONO/p54nrb geni VEGF sitokini ile düzenlenmektedir ve hipoksik koşullar bu düzenlemeyi desteklemektedir.

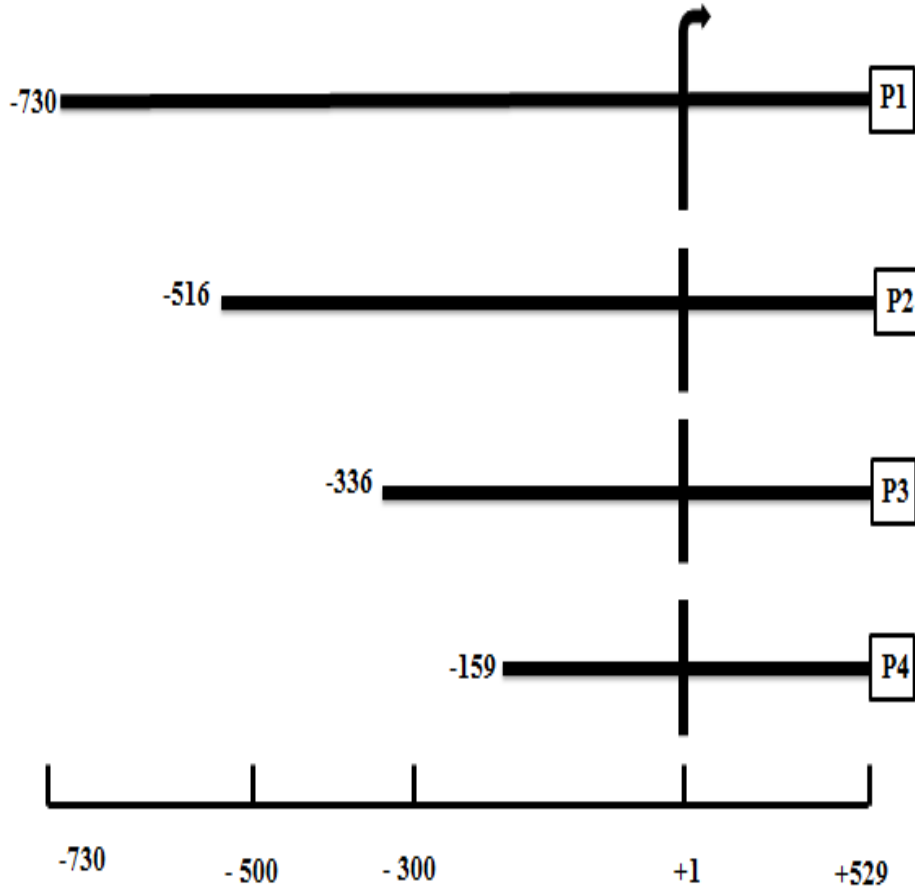
### **NONO/p54nrb Geni Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesinin İncelenmesi**

NONO/p54nrb genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinin araştırılması için pmetLuc vektöründe Uzm. Biyolog Sevgi BAYSAL tarafından klonlanmış halde bulunan promotor parçaları [120] restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimine tabi tutulmuş promotor parçalarının klonlanmış oldukları agaroz jelde görüntülenerek kanıtlanmıştır (**Şekil 4.11.**). Şekil 4.12'de belirtilen promotor parçaları Bölüm 3.2.2.6.'de anlatıldığı gibi Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Olarak Transfekte edilmiştir ve Bölüm 3.2.2.7. Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri değerlendirildiğinde hem normoksik koşullarda hem de hipoksik **P1:730/+529** promotor parçasının en yüksek transkripsiyonel aktivite gösterdiği saptanmıştır (**Şekil 4.13**). Promotor parçaları transfekte edildikten sonra 20ng/μL VEGF sitokini uygulanmış ve promotor aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek artışın hem hipoksik hem de normoksik koşullarda **P1: -730/+529** promotor parçasında olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.14**).

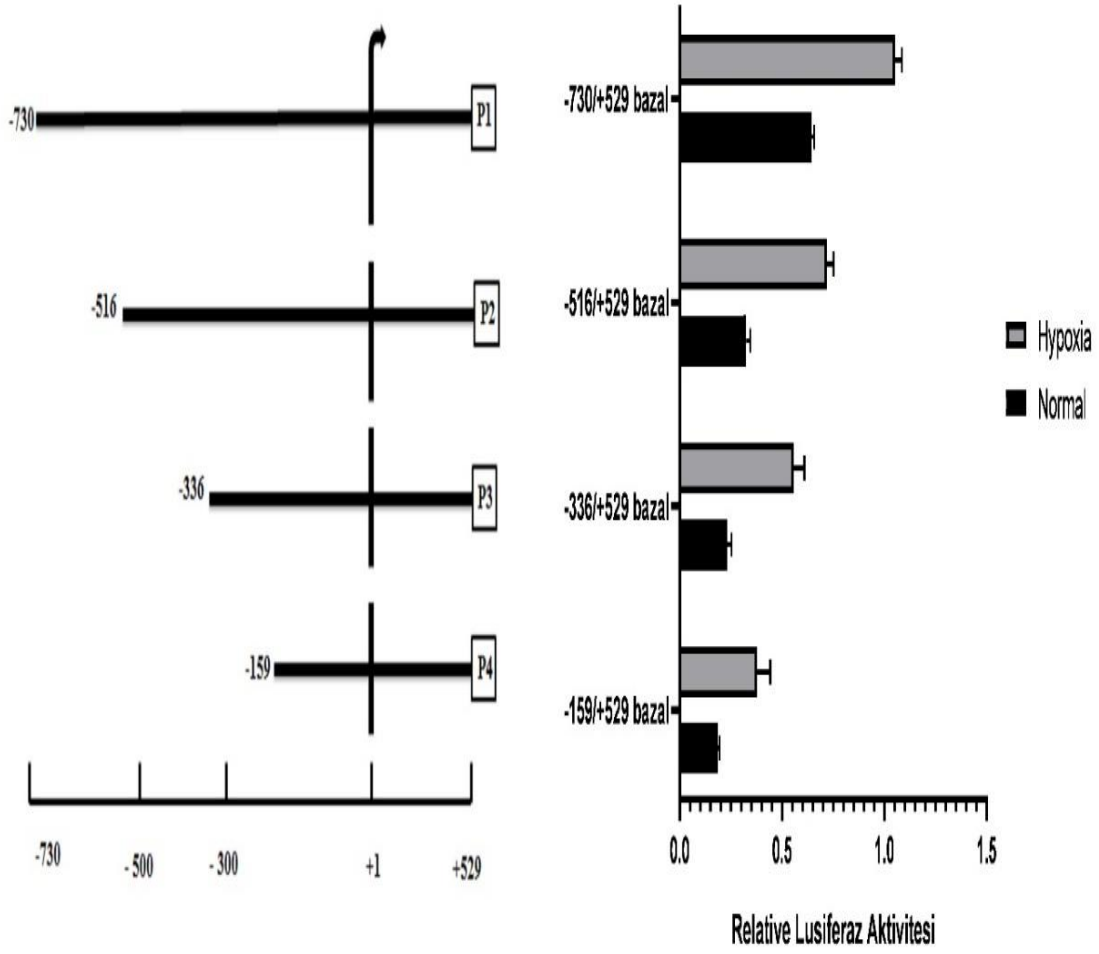
M 1 2 3 4



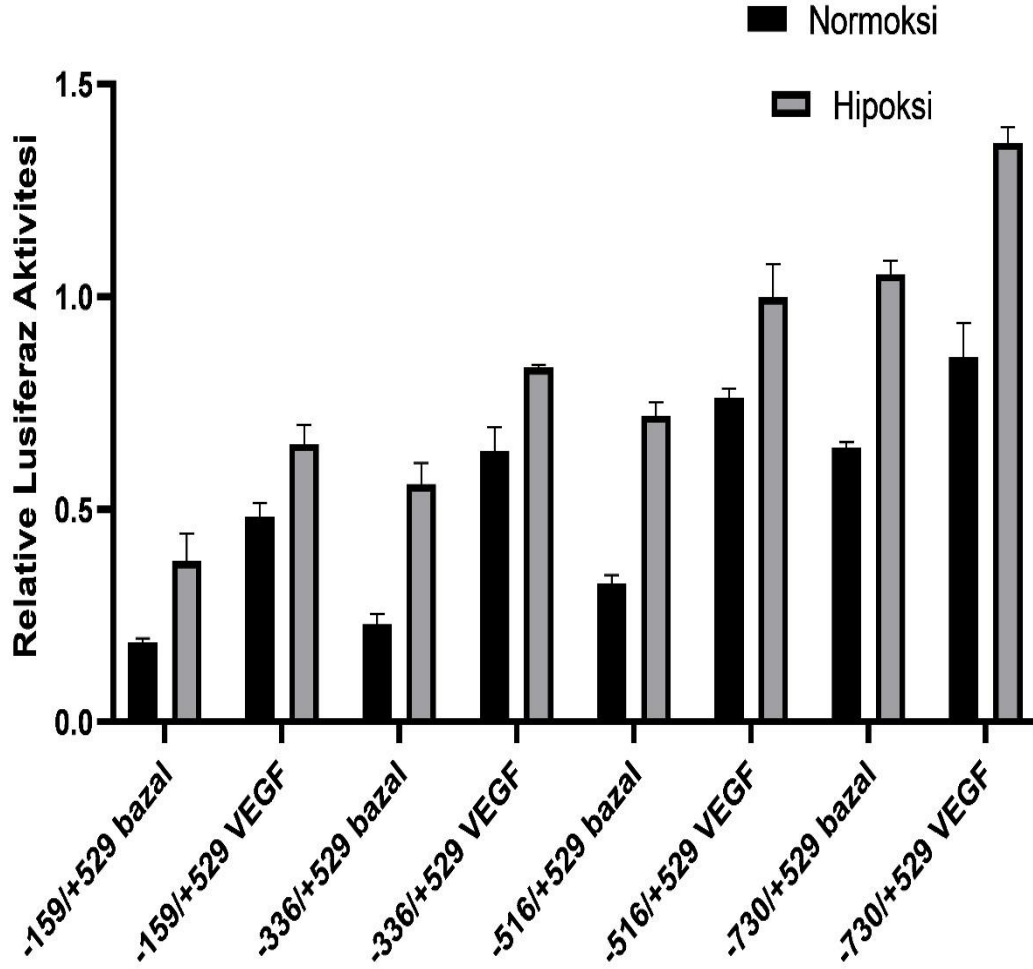
**Şekil 4.11:** Promotor parçalarının restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. (M=marker, 1: -159/+529,2: -336/+529,3: -516/+529,4: -730/+529).



**Şekil 4.12:**NONO/p54nrb P1 -730/+529, P2 -516/+529, P3 -336/+529 ve P4 -159/+529 promotor parçaları temsili diyagramı.



**Şekil 4.13:** NONO/p54nrb P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçalarının normoksik ve hipoksik koşullarda HUVEC hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri.



Şekil 4.14:NONO/p54nrb P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529 promotor parçalarının normoksik ve hipoksik koşullarda HUVEC hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve VEGF in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.

## 4.2 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin

### Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Belirlenmesi

#### 4.2.1 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin

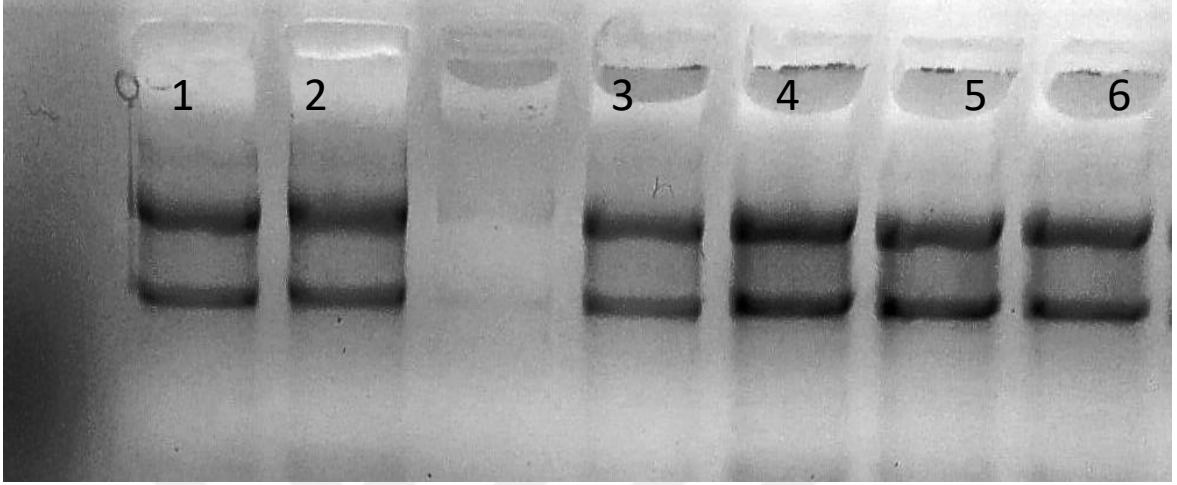
##### Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

VEGF yolak inhibitörlerinin insan NONO/p54nrb geni üzerine etkisinin hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA düzeyinde belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

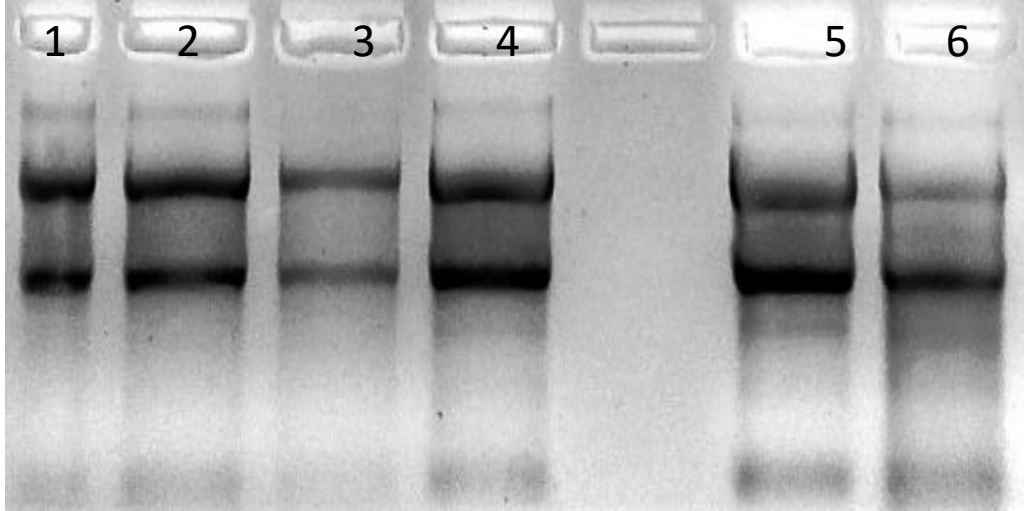
Daha sonra Bölüm 3.2.2.5.'te anlatıldığı gibi önce yolak inhibitörleri uygulanmış 1 saat sonra VEGF sitokini uygulanmıştır. 6 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak



pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.4.1’te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNAların kalitesi belirlenmek üzere Bölüm 3.2.4.3’te anlatıldığı gibi RNA jel elektroferezi yapılmıştır (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

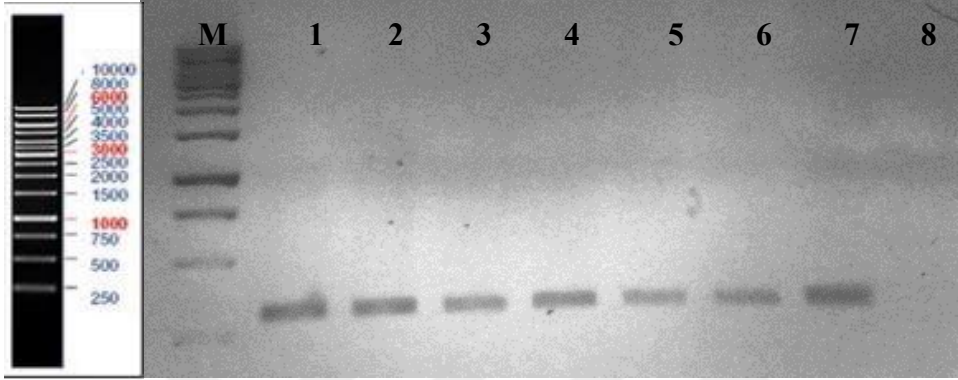


**Şekil 4.15:** RNA jel görüntüsü (1- Normoksi Kontrol 2- Normoksi VEGF 3- Normoksi VEGF +Mek İnh. 4- Normoksi VEGF +Wortmannin İnh. 5- Normoksi VEGF +SP600125 İnh. 6- Normoksi VEGF +PD169136).

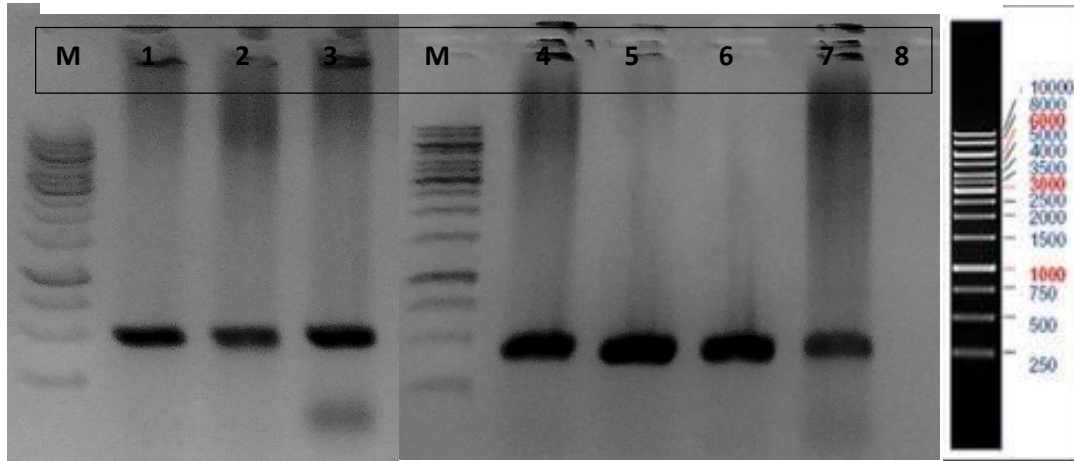


**Şekil 4.16:** RNA jel görüntüsü (1- Hipoksi Kontrol 2- Hipoksi VEGF 3- Hipoksi VEGF +Mek İnh. 4- Hipoksi VEGF +Wortmannin İnh. 5- Hipoksi VEGF+SP600125 İnh. 6- Hipoksi VEGF +PD169136).

RNA kalitesi belirlendikten sonra, Bölüm 3.2.4.4'te anlatıldığı gibi cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'ların kalitesini kontrol etmek amacı ile H $\beta$ 2 primerleri ile Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde kontrol PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Tablo 4.1'deki gibidir. PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18).

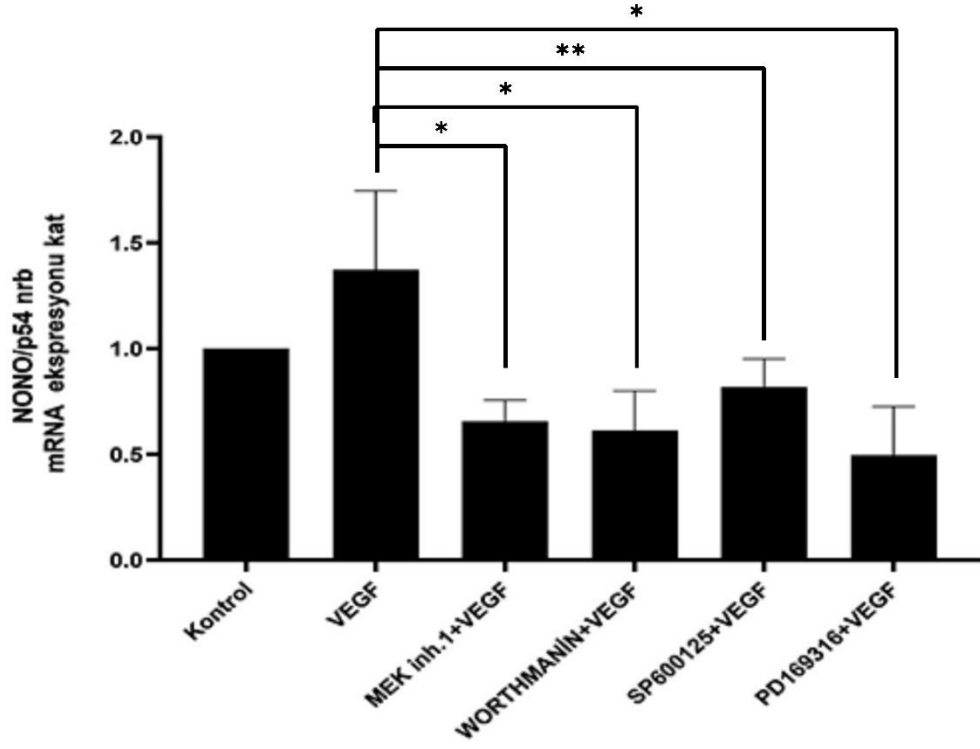


**Şekil 4.17:** H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M:Marker 1- Normoksi Kontrol 2- Normoksi VEGF 3- Normoksi VEGF +Mek İn. 4- Normoksi VEGF + Wortmannin 5- Normoksi VEGF +SP600125 İn. 6- Normoksi VEGF +PD169136 7-Pozitif Kontrol 8-Negatif Kontrol).

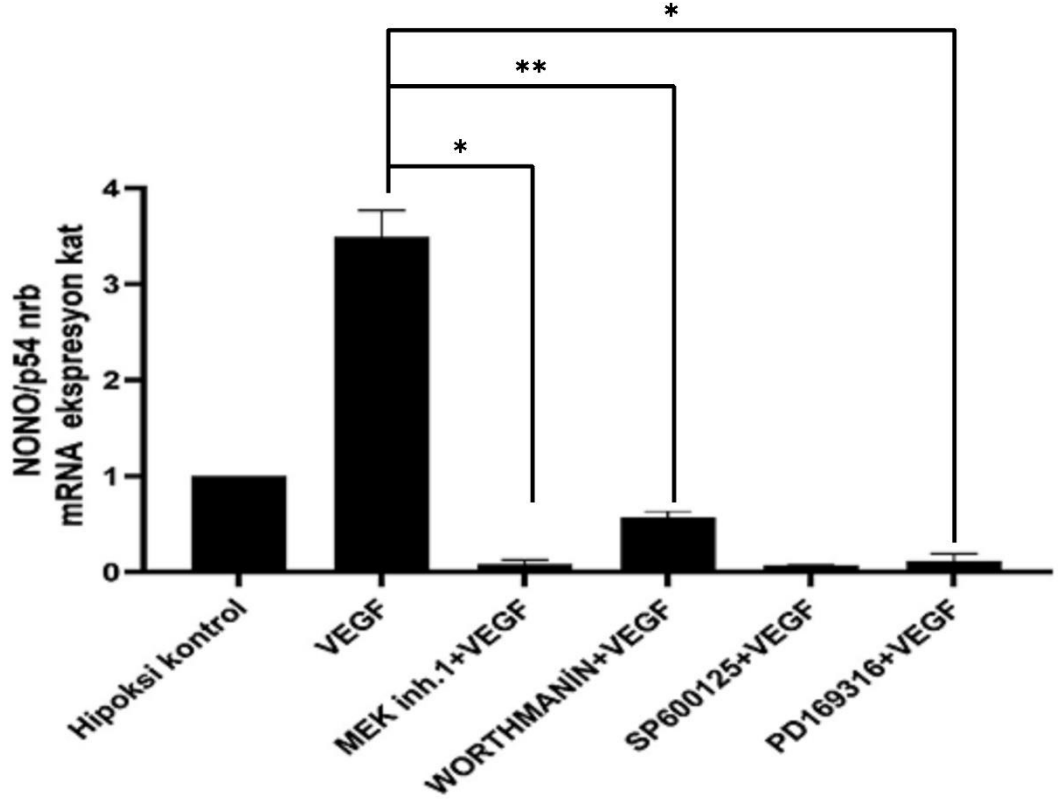


**Şekil 4.18:** H $\beta$ 2 kontrol PCR agaroz jel görüntüsü (M: Marker 1-Hipoksi Kontrol 2-Hipoksi VEGF 3- Hipoksi VEGF +Mek İn. 4- Hipoksi VEGF + Wortmannin İn. 5- Hipoksi VEGF+SP600125 İn. 6- Hipoksi VEGF +PD169136 7- Pozitif Kontrol 8- Negatif Kontrol).

cDNA'ların kalitesi kontrol edilip real time PCR reaksiyonu için kullanılabilir olduğuna karar verildi ve Bölüm 3.2.4.5'te anlatıldığı gibi Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilip analiz edilmiştir (Şekil4.19 ve Şekil4.20.).



**Şekil 4.19:** Normoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin NONO/p54nrb ekspresyonuna mRNA seviyesinde etkisi grafiği.



**Şekil 4.20:** Hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin NONO/p54nrb ekspresyonuna mRNA seviyesinde etkisi grafiği.

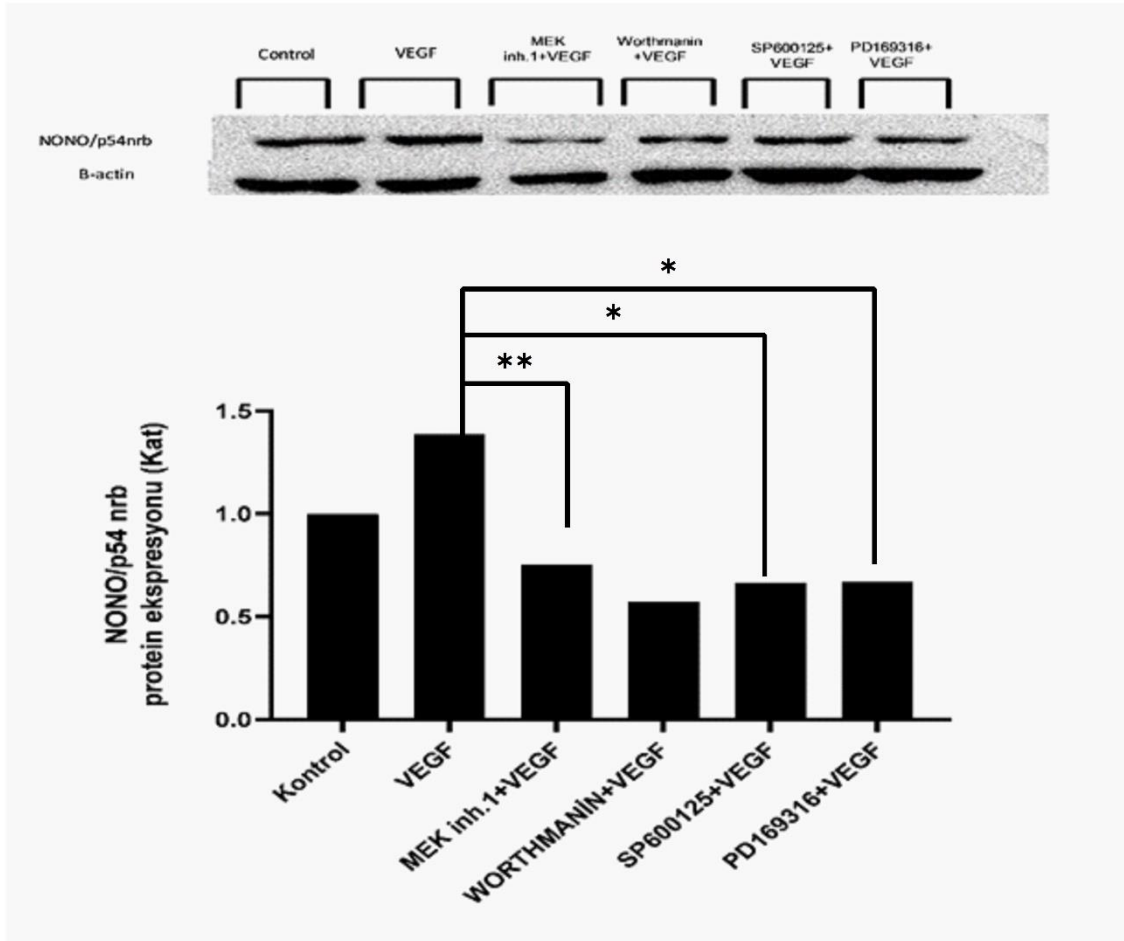
Gerçekleştirilen Real Time PCR sonuçlarına göre NONO/p54nrb geni hem normoksik hemde hipoksik koşullarda VEGF yolağını kullanmaktadır. HUVEC hücrelerine VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolağı inhibitörleri uygulandığında NONO/p54geni mRNA seviyelerinde azalma görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normoksik koşullarda 6.saat'te sadece VEGF uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb mRNA seviyesinde yaklaşık 1,5 kat artış olurken VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolak inhibitörü uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb mRNA seviyelerinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Hipoksik koşullarda CoCl<sub>2</sub> uygulanan hipoksi kontrol grubuna göre 6.saat'te sadece VEGF uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb mRNA seviyesinde yaklaşık 3,5 kat artış olurken VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolak inhibitörü uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb mRNA seviyelerinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir.

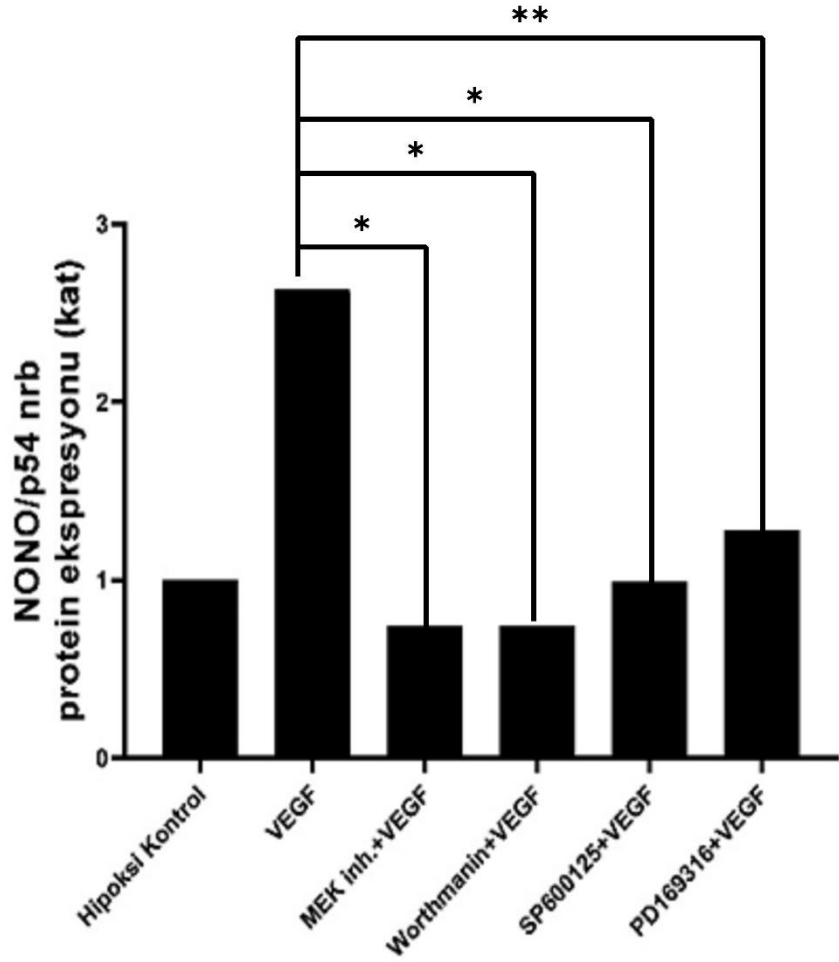
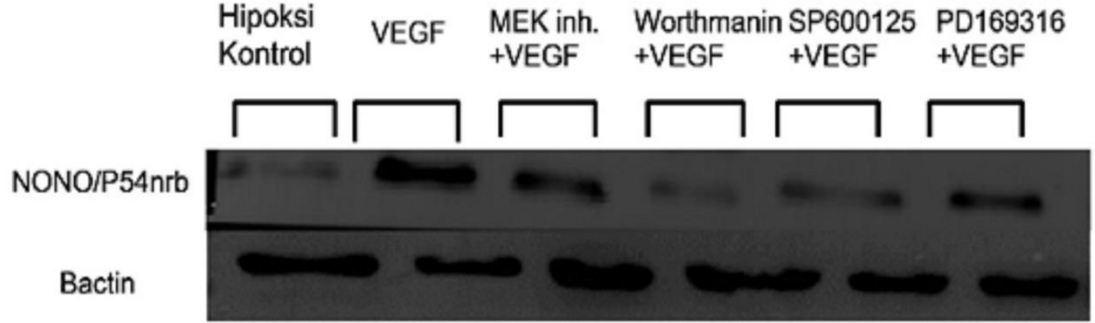
#### 4.2.2 VEGF Yolak İnhibitörlerinin İnsan NONO/p54nrb Geni Üzerine Etkisinin

##### Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Düzeyinde Belirlenmesi

VEGF yolak inhibitörlerinin insan NONO/p54nrb geni üzerine etkisinin hipoksik ve normoksik koşullar altında protein düzeyinde belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

Daha sonra Bölüm 3.2.2.5.'de anlatıldığı gibi önce yolak inhibitörleri uygulanmış 1 saat sonra VEGF sitokini uygulanmıştır. 6 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.5.1'te anlatıldığı gibi western blot deneyi yapılmıştır (Şekil4.21).





**Şekil 4.21:** VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik ve hipoksik koşullar altında insan NONO/p54nrb geni üzerine protein düzeyinde etkisi.

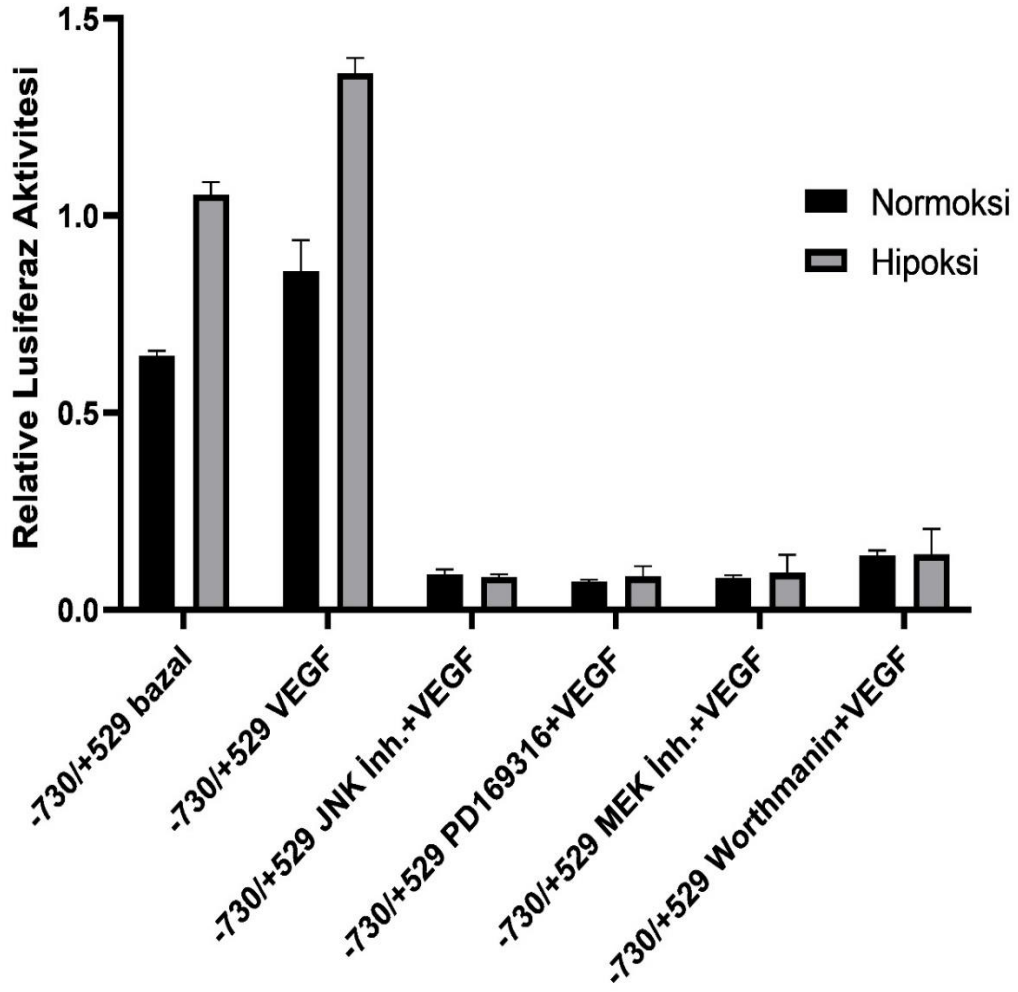
Gerçekleştirilen Western Blot deneyine göre; Normoksik koşullarda NONO/p54nrb geni VEGF Yolağı ile ilişkilidir. HUVEC hücrelerine VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolağı inhibitörleri uygulandığında NONO/p54 geni protein seviyelerinde azalma görülmüştür. . Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normoksik koşullarda 6.saat'te sadece VEGF uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb protein seviyesinde yaklaşık 1,5 kat artış olurken VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolak inhibitörü uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb protein seviyelerinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Hipoksik koşullarda CoCl<sub>2</sub> uygulanan hipoksi kontrol grubuna göre 6.saat'te sadece VEGF uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb protein seviyesinde yaklaşık 2,5 kat artış olurken VEGF sitokini ile birlikte VEGF yolak inhibitörü uygulanan hücrelerde NONO/p54nrb protein seviyelerinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir.

#### **4.2.3 VEGF Yolağı İnhibitörlerinin NONO/p54nrb Geni Promotor Parçalarının**

##### **Transkripsiyonel Aktivitesine Etkisinin İncelenmesi**

NONO/p54nrb genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinin araştırılması için pmetLuc vektöründe klonlanmış halde bulunan promotor parçaları restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimine tabi tutulmuş promotor parçalarının klonlanmış oldukları agaroz jelde görüntülenerek kanıtlanmıştır (**Şekil 4.14.**). Şekil 4.15'te belirtilen promotor parçaları Bölüm 3.2.2.6.'de anlatıldığı gibi Kalsiyum-Fosfat Prespitasyon Metoduyla Geçici Olarak transfekte edilmiştir. Promotor parçalarına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisinin araştırılması amacıyla yapılan deneylerde önce VEGF yolağı inhibitörleri uygulanmış (JNK (20 µM), PD169 (20 µM), WORTMANNIN (2 µM), MEK (20 µM)) bu uygulamadan 45 dk. Sonra 20 ng/µL VEGF sitokini uygulanmıştır. Bölüm 3.2.2.7 'de anlatıldığı gibi Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü yapıp sonuçlar değerlendirildikten sonra yolak inhibitörü uygulanan hücrelerde promotorların transkripsiyonel aktiviteleri düştüğü belirlenmiştir (**Şekil4.22-25**).

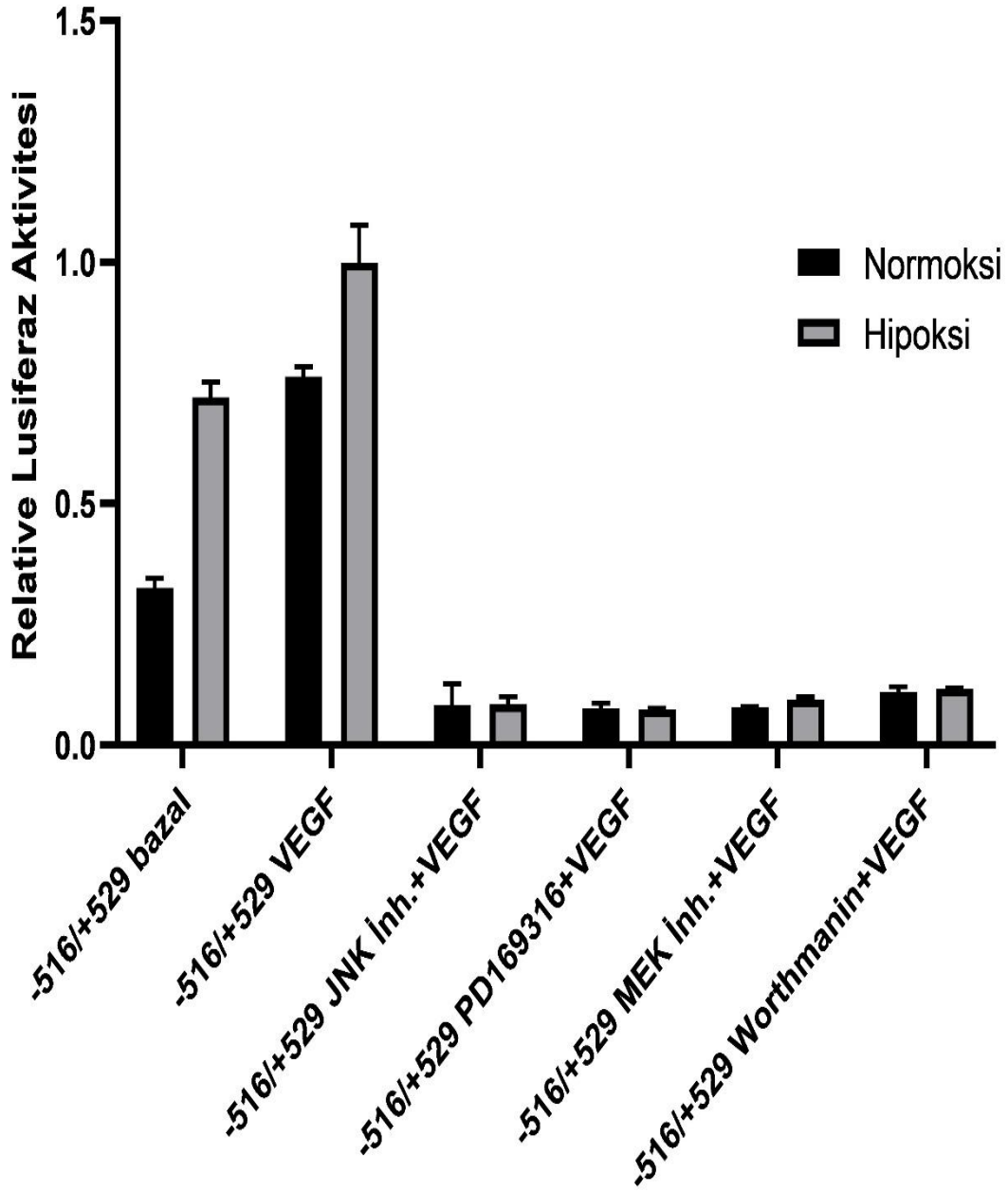
-730/+529



Şekil 4.22: NONO/p54nrb P1: -730/+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.

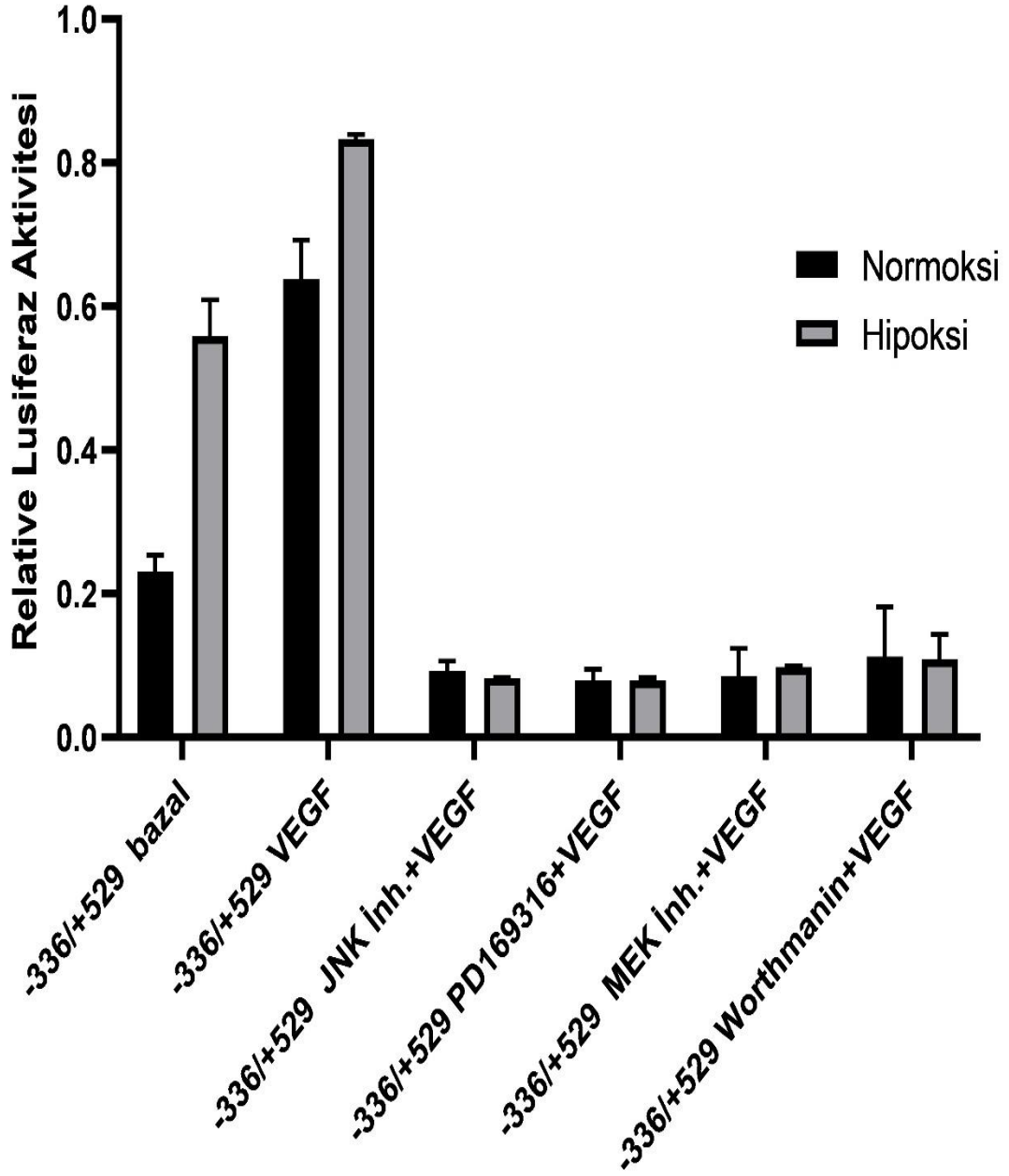


-516/+529



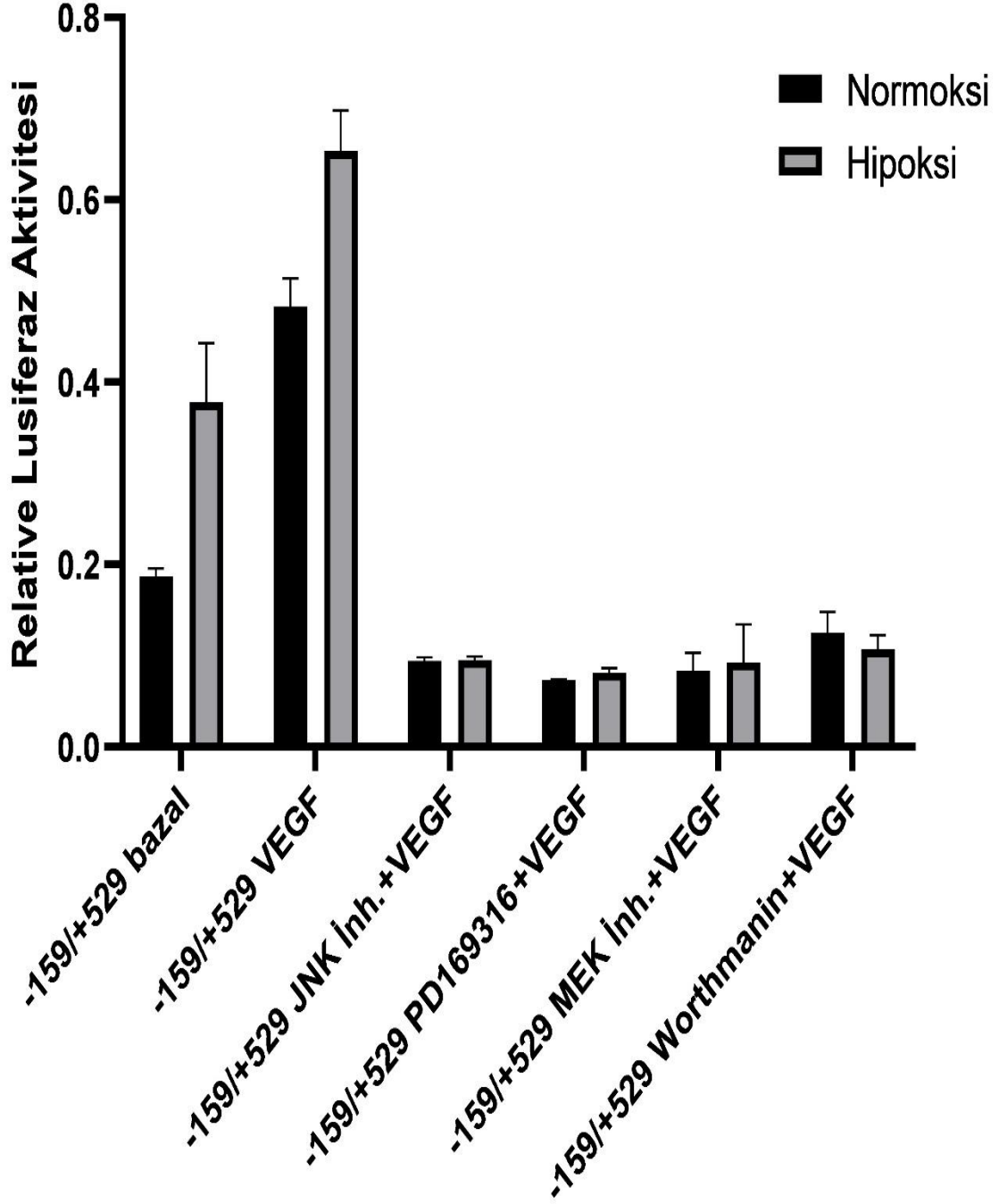
Şekil 4.23: NONO/p54nrb: -516 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.

-336/+529



Şekil 4.24: NONO/p54nrb P3: -336 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yoluğı inhibitörlerinin etkisi.

-159/+529



Şekil 4.25: NONO/p54nrb P4: -159 /+529 promotor parçasının tanskripsiyonel aktivitesine normoksik ve hipoksik koşullarda VEGF yolağı inhibitörlerinin etkisi.

### 4.3 NONO/p54nrb Geninin Aşırı İfade Ettirilmesi Çalışmaları

#### 4.3.1 Klonlama Çalışmaları

##### 4.3.1.1 Primerlerin Dizayn Edilmesi

İnsan NONO/p54nrb geninin CDS (mRNA)dizisi üzerinden başlangıç ve bitiş kodonları belirlenerek primerler tasarlanmıştır.

### Homo sapiens non-POU domain containing octamer binding (NONO), transcript variant 1, isoform 1 mRNA

[CDS](#) 711..2126 (1415 bç)

#### ORIGIN

```
1 caggcgagcgt gcaggactgc tccgagcacg cctacgcgcg cattttctcc ccttctctc
61 cctctttcca ctttctctc cctttttc ctctctcttc ccctccca cacttggct
121 ttcagcttt cagtcagtc gtttaggtct ctcttccga cccccccc cagctctct
181 cctttcctt ttccccctc cctttcctt tcccgtctca cgcgccaggc cgcttgaca
241 tgcgcattag gtacaaagcc tcgctcttg tcccattctg tcgtcacac gaactcaag
301 ctttggcatt cggcagccaa tagaatctaa gaaatggcgg aaaaatgatt cgcctcggg
361 agctaaacct tgattggcag ttagctaac caatcgagaa cgccatttg tacccttgg
421 caggcaccca gctccgtcgt ctggttccg gcggtcgcgc gctctttct cgggacggga
481 gaggccgtgt agcgtcggc ttactccgag gagataaccag tcggtagagg agaagtcgag
541 gttagaggga actgggagcc actttgctgt ctgcaatga agttgagagg cccagtatt
601 aggcgacagt gaatttatta ctctgaagag ggttctgcac atattccaa attatattg
661 tggctcatcag aagtaggtga taggaagaaa tacttctcaa ggtgcaaaa atgcagagta
721 ataaaacttt taacttggag aagcaaaacc atactccaag aaagcatcat caacatcacc
781 accagcagca gcaccaccag cagcaacagc agcagccgcc accaccgcca atacctgcaa
841 atgggcaaca ggccagcagc caaaatgaag gcttgactat tgacctgaag aattttagaa
901 aaccaggaga gaagacctc acccaacgaa gccgtctttt tgtgggaaat cttctcccg
961 acatcactga ggaagaaatg aggaaactat ttgagaata tggaaaggca ggcgaagtct
1021 tcattcataa ggataaagga tttggcttta tccgcttga aaccggaacc ctacgggaga
1081 ttgcaaaagt ggagctggac aatatgccac tccgtggaaa gcagctcgt gtgcgcttg
1141 cctgcatag tgatccctt acagtcgaa accttctca gtatgttcc aacgaactgc
1201 tggagaagc cttttctgt tttggccagg tagagagggc ttagtcatt ttggatgatc
1261 gaggaagccc ctcaggaaaa ggcattgtt agttctcagg gaagccagct gctoggaag
1321 ctctggacag atgcagtga ggtccttcc tgtaaccac atttctcgt cctgtgactg
1381 tggagcccat ggaccagta gatgatgaag agggacttcc agagaagctg gttataaaa
1441 accagcaatt tcacaaggaa cgagagcagc caccagatt tgcacagcct ggctccttg
1501 agtataaata tgcatgcgc tggaaaggac tcattgagat ggagaagcag cagcaggacc
1561 aagtggaccg caacatcaag gaggctcgtg agaagctgga gatggagatg gaagctgcac
```

1621 gccatgagca ccaggtcatg ctaatgagac aggattgat gaggcgcaa gaagaactc  
 1681 ggaggatgga agagctgcac aaccaagagg tgcaaaaacg aaagcaactg gagctcaggc  
 1741 aggaggaaga gcgcaggcgc cgtgaagaag agatgcggcg gcagcaagaa gaaatgatgc  
 1801 ggcgacagca ggaaggattc aagggaacct tccctgatgc gagagagcag gagattcgga  
 1861 tgggtcagat ggctatggga ggtgctatgg gcataaaca cagaggtgcc atgccccctg  
 1921 ctctgtgcc agctggtacc ccagtcctc caggacctgc cactatgatg ccggatggaa  
 1981 cttgggatt gacccacca acaactgaac gctttggtca ggctgtaca atggaaggaa  
 2041 ttggggcaat tgggtggaact cctctgcat tcaaccgtgc agctcctgga gctgaattg  
 2101 ccccaaaaacaa acgtcgccga tacaataag ttgcagtgc tagtttctca aaaccttaa  
 2161 aagaaggacc cttttggac tagccagaat tctacctgg aaaagtgtta gggattcctt  
 2221 ccaatagta gatctacct gcctgtacta ctctaggag tatgctggag gcagagggca  
 2281 agggagggtt ggtattaaac aagtcaattc tgtgtggtat attgtttaat cagtctgtg  
 2341 tgggtcattc ctgaagtctc taatgtgact gttgagggcc tggggaaacc atggcaaagt  
 2401 ggatccagt agageccatt aatcttgatc attccggttt tttttttt tgtccatctt  
 2461 gtttcattg cttgccccgc ccccgagacg gactctact ctgtcgcca ggctggagtg  
 2521 tagtggcatg atctggctc actgcaatct ctgctcccg ggtcaagct tgtccaggtt  
 2581 gatcttgaac tctgacctc gtgatctacc cacctcgcc tcccaaatg ctgggattac  
 2641 aggggtgagc caccgtgccc aacctcactt gcttctatc cttactec cccagccca  
 2701 gagaaactgc cacatacacc acaaaaacca aacatcccc aatgacctta gccccattg  
 2761 tccattcact ccagggtgag aattcaggca aacgtccaca aaggtcacag gcagcgtaca  
 2821 tacggtctg ttataccca tatattacc cttcatgtcc taaagaagac atttctctt  
 2881 agagatttc attttagtg atcttaaaa aaaaatctg tgtaactg cctccatctt  
 2941 tttctgggt gaggacacc aggaatgacc cttttgtgc tatgatgtg ctgttcacag  
 3001 cttttctga tagcctagt acaatctgg gaacagggtt actgtatact gaaggtctga  
 3061 cagtagctct tagactcgc tatcttaggt agtcatgctg tgcattttt tttcattgg  
 3121 tgtactgtg ttgattgtc tcatatatt ggagttttc tgaaaaatgg agcagtaatg  
 3181 cagcatcaac ctattaaat acatttaag cttttaaaa aaaaaaaa

Tasarlanan primerlere restriksiyon kesim enzimlerinin eklenmesi amacıyla RestrictionMapper version 3 programı kullanıldı. Vektör haritalarından vektörleri kesen enzimler belirlendi. NONO/p54nrb genini kesmeyen ancak kullanılan vektörleri kesen enzimler seçilmiştir.

**Geni kesmeyen enzimler:** AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflII, AflIII, AgeI, AlfI, AloI, ApaI, ApaLI, ArsI, AscI, AvaI, AvrII, BaeI, BamHI, BarI, BbvCI, BciVI, BclI, BdaI, BfiI, BglI, BglII, BplI, BsaAI, BsaBI, BsePI, BseSI, Bsp1407I, BspHI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Esp3I, FauI, FseI, FspAI, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, MauBI, MluI, NaeI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, Pasi, PleI, PmaCI,

PmeI, PpiI, PshAI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, RsrII, SacII, SalI, SanDI, ScaI, PI-SceI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI, XhoII

XhoI kesim bölgesi

5'...CTCGAG...3'  
3'...GAGCTC...5'

HindIII kesim bölgesi

5'...AAGCTT...3'  
3'...TTCGAA...5'

Bu aşamaların ardından enzimlerin dizileri eklenmiş haliyle oluşturulan primerlerin Tm değerleri kontrol edilmiştir.

$$TM = (4 * (G+C)) + (2 * (A/T))$$

$$\text{İleri Primer } Tm(^{\circ}C) = (4 * 9) + (2 * 19) = 74$$

$$\text{Geri Primer } Tm(^{\circ}C) = (4 * 11) + (2 * 15) = 74$$

İleri (XhoI) 5' - AA**CTCGAG**AA**ATG**CAGAGTAATAAACT -3'

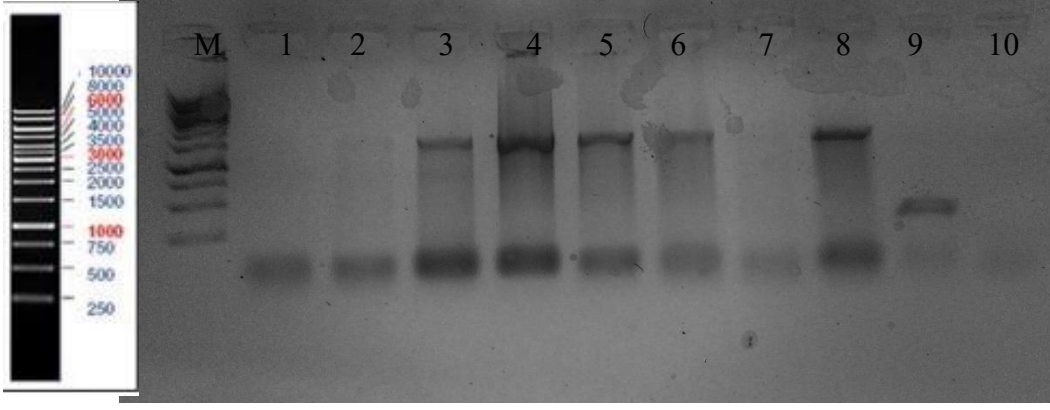
Geri (HindIII) 5' - AA**AAGCTT**TTAGTATCGGCGACGTTTGT -3'

#### 4.3.1.2 İnsan NONO/p54nrb Geninin pGEMT-easy Vektörüne Klonlanması

Tasarlanan primerlerle birlikte primerlerin optimum çalışma sıcaklığının bulunması amaçlı gradiyent sıcaklık PCR (50°C – 65 °C) Bölüm 3.2.3.2.'te anlatıldığı gibi kuruldu. PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi agaroz jelde görüntülenmiş ve bantlar purifiye edilmiştir. En güçlü bandın bağlanma sıcaklığı 55 °C 'ta olduğu saptanmıştır (**Şekil4.26**).

**Tablo 4.2:**NONO/p54nrb Geni primerleri için PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
1	94°C	2 dk	1 döngü
	94°C	60 s	
2	50-65	30 s	Gradient
	72°C	45 s	
3	72°C	5 dk	1 döngü



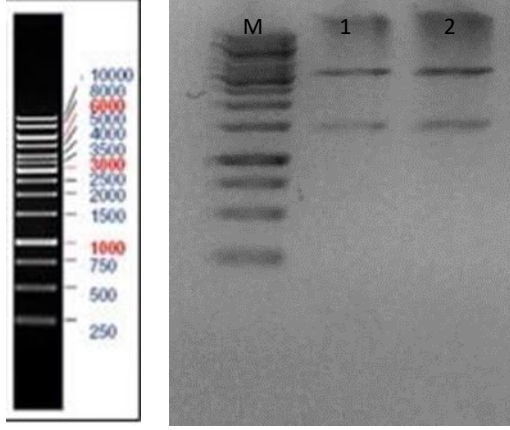
**Şekil 4.26:** İnsan NONO/p54nrb gradient PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker 1- 50 °C 2 -52 °C 3- 54 °C 4- 55°C, 5- 57 °C,6- 60 °C, 7- 63 °C 8- 65 °C 9- pozitif kontrol 10- negatif kontrol)

Ardından Bölüm 3.2.3.4.'te anlatıldığı gibi T: A klonlama için pGEM-T Easy vektörüyle ligasyon yapılmıştır.

Ligasyon ürünleri Bölüm 3.2.3.5.' te anlatıldığı gibi kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Beyaz koloniler seçilerek Bölüm 3.2.3.6.'da anlatıldığı gibi plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmid agaroz jele yüklenerek UV ışığına görüntülenmiştir (Şekil4.27).

NONO/p54nrb geni için primer dizayn ederken primerlere kesim bölgeleri eklenmiştir. Bu enzimler ile izole edilen plazmidler Bölüm 3.2.3.7'de anlatıldığı gibi kontrol kesimine bırakılıp ve agaroz jelde görüntülenmiştir. İzole edilen plazmid sanger sekanslama için Sentebiolab firmasına gönderilmiştir. Yapılan bioinformatik hizalama analizi sonucu NONO/p54nrb mRNA dizisinin pGEMT-easy plazmidi içerisine klonlandığı doğrulanmıştır (Ek B1) (Şekil4.28.).





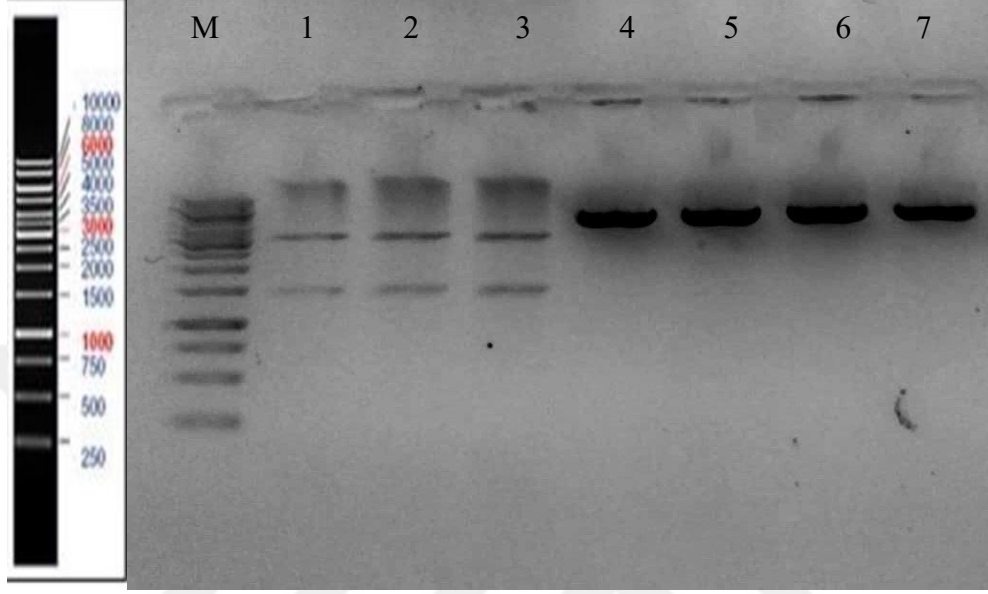
**Şekil 4.27:** Kontrol kesim görüntüsü ((M: Marker 1-2 XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş plazmid).

#### 4.3.1.3 İnsan NONO/p54nrb Geninin pGFP-C1 Vektörüne Klonlanması

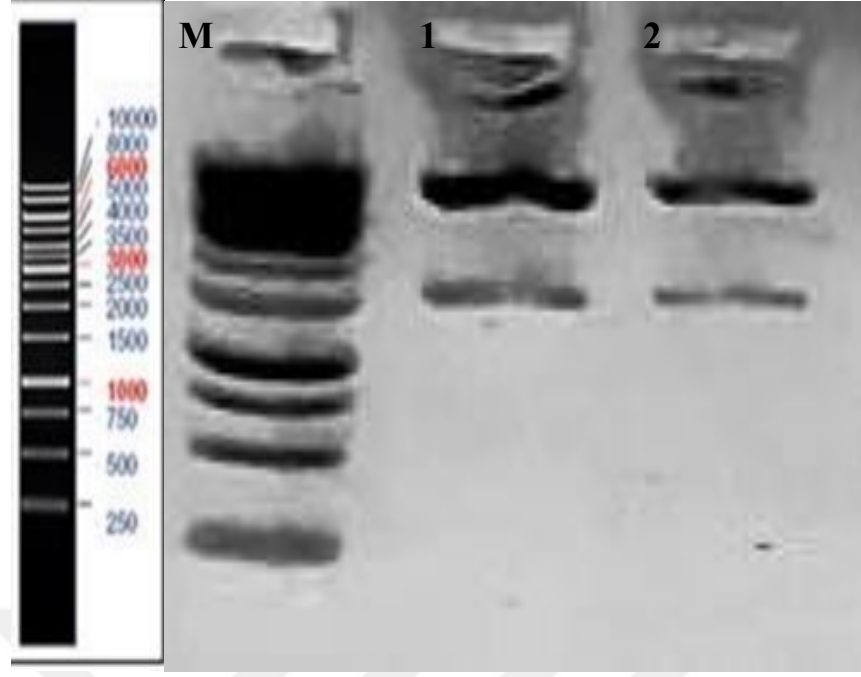
NONO/p54nrb geninin kontrol kesimi agaroz jel üzerinde doğru bölgede görüntülendikten sonra restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jele yüklenmiş ardından jelden saflaştırılmıştır. Alt klonlama yapmak amacıyla boş pEGFP-C1 vektörü restriksiyon enzimleri ile reaksiyona girerek düz hale getirilmiştir. Uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek jelden geri kazanılmıştır (**Şekil4.29**). Bu şekilde pGEM-T Easy vektöründen elde edilen NONO/p54nrb gen parçasıyla düz olan pGFP-C1 vektörü Bölüm 3.2.3.8’de anlatıldığı gibi ligasyona bırakılmış ve ligasyon ürünleri kompetant hücrelere transforme edilmiştir. Koloniler seçilerek Bölüm 3.2.3.6.’da anlatıldığı gibi plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidler, Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı gibi kontrol kesim işlemine tabi tutularak agaroz jele yüklenmiş ve UV ışığında görüntülenmiştir. (**Şekil4.30**).

Görüntülenen bantların marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu anlaşıldığında, klonlamanın doğrulanması için örnekler dizi analizine gönderilmiştir. Dizileme sonucunda NONO/p54nrb geninin pGFP-C1 vektörüne klonlandığı belirlenmiştir. Plazmidlerin hücrelere aktarılması için plazmid DNA’ların yüksek konsantrasyonda olmaları gerekmektedir. Böylece klonlama yapılan plazmidler, Bölüm 3.2.3.8’de anlatıldığı gibi üreticinin önerdiği şekilde MN midi plus kiti ile çok kopyalı ve yüksek saflıkta izole edilmiştir.

İzole edilen plazmid sanger sekanslama için Sentebiolab firmasına gönderilmiştir. Yapılan bioinformatik hizalama analizi sonucu NONO/p54nrb mRNA dizisinin pGFP-C1 plazmidini içerisine klonlandığı doğrulanmıştır (**Ek B2**).



**Şekil 4.28:** XhoI ve HindIII Restriksiyon enzimi kesim görüntüsü (M: Marker 1-3 NONO/p54nrb geni içeren kesilmiş pGEMT-easy plazmidini, 4-7 linner hale getirilmiş boş pGFP-C1 plazmidini).



**Şekil 4.29:** XhoI ve HindIII Restriksiyon enzimi kontrol kesim görüntüsü (M: Marker 1-2 NONO/p54nrb geni içeren kesilmiş pGFP-C1 plazmidini).

### 4.3.2 Transfeksiyon Çalışmaları

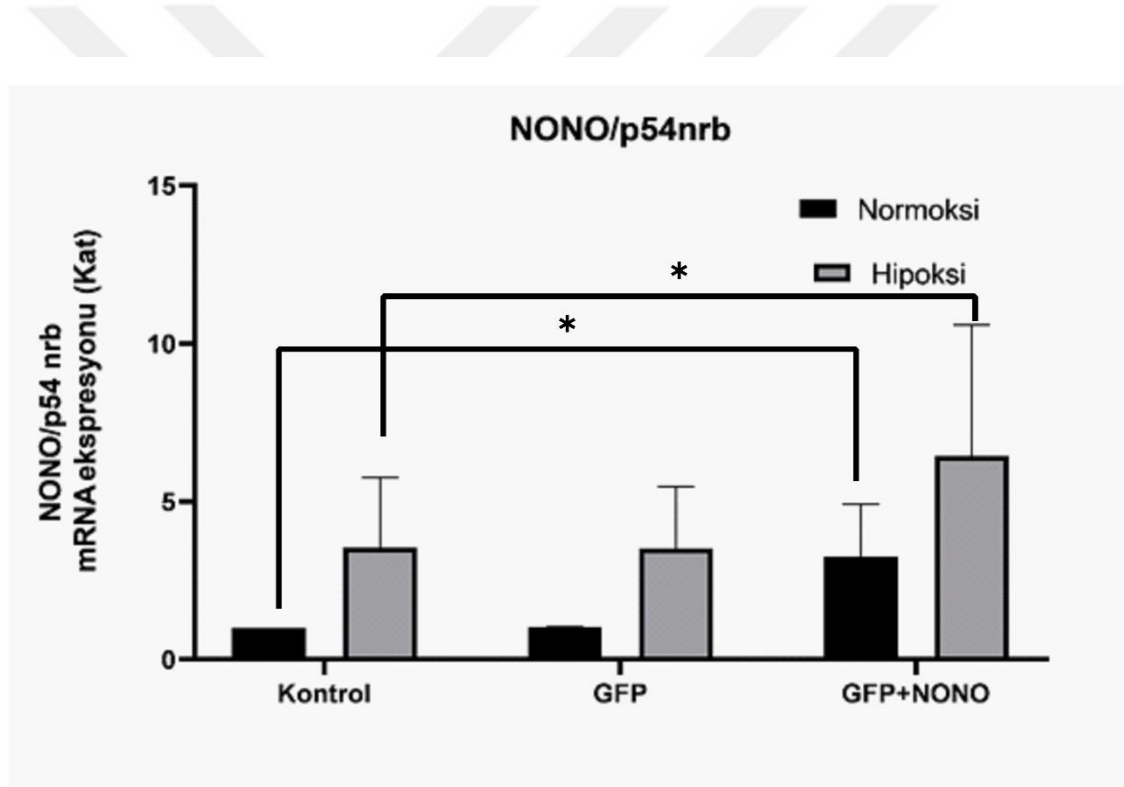
**4.3.2.1 NONO/p54nrb geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesi Çalışmaları**  
pGFP-C1 vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni Bölüm 3.2.2.6'da anlatıldığı gibi kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile HUVEC hücrelerine aktararak NONO/p54nrb geninin hücrelerde aşırı ifade olması sağlanmıştır.

#### 4.3.2.1.1.1 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade

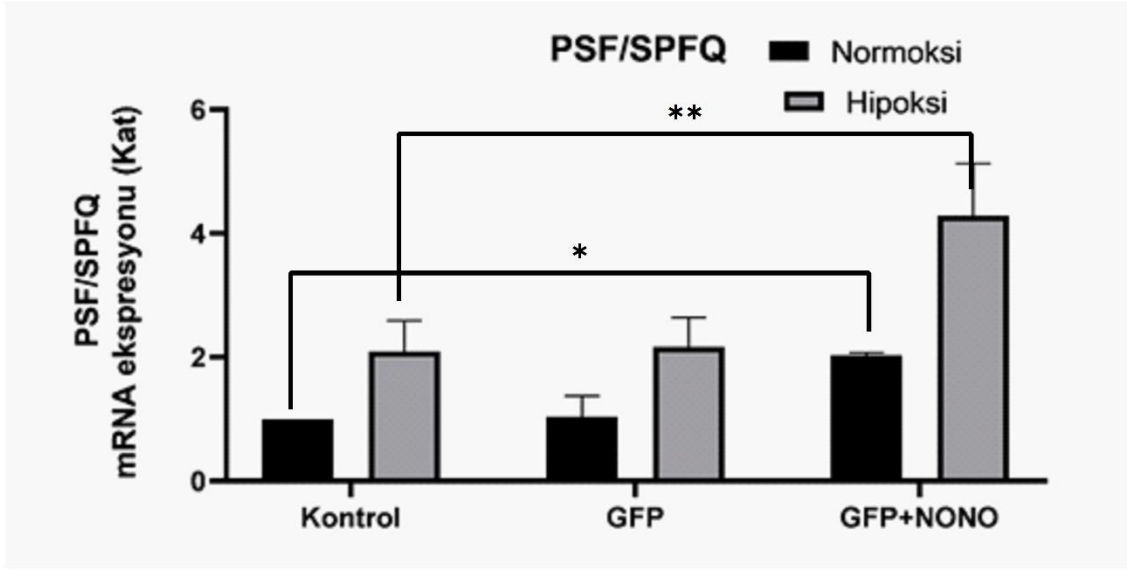
##### **Ettirilmesinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması ve Diğer Paraspeckle Bileşenlerinin mRNA seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi**

NONO/p54nrb Geninin HUVEC hücrelerinde aşırı ifade ettirilmesinin hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA Seviyesinde doğrulanması ve diğer paraspeckle Bileşenlerinin mRNA seviyelerine etkisinin belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4.'de anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

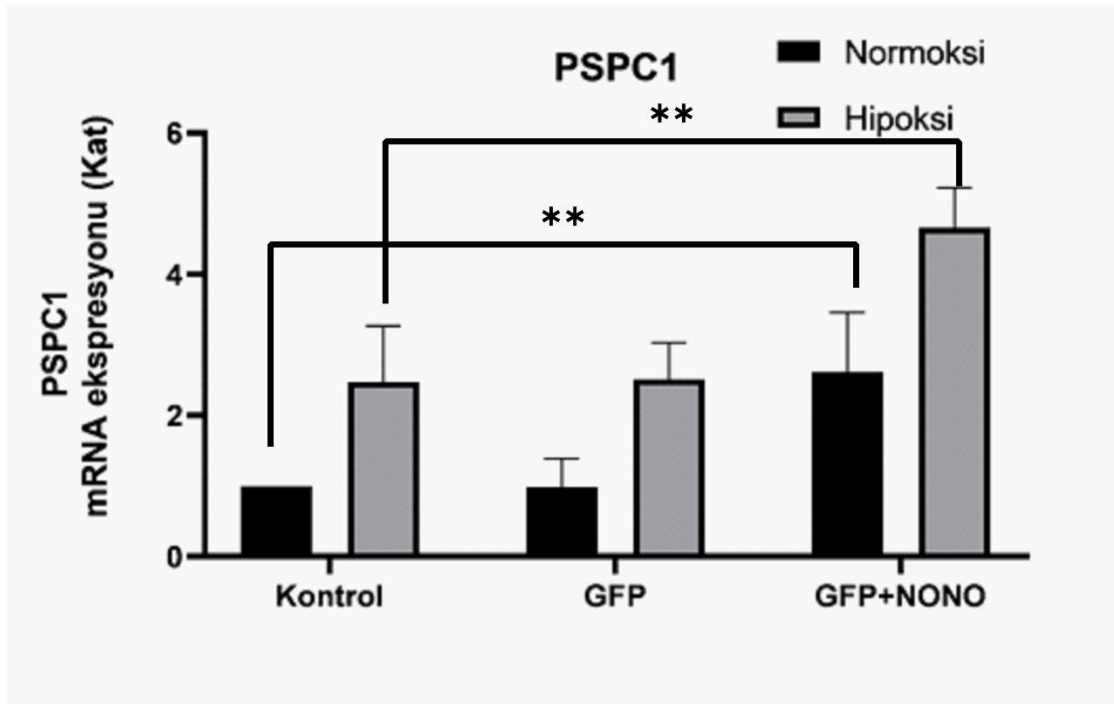
pGFP-C1 vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni Bölüm 3.2.2.6'da anlatıldığı gibi kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile HUVEC hücrelerine aktararak NONO/p54nrb geninin hücrelerde aşırı ifade olması sağlanmıştır. 48 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. Sonra Bölüm 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'ların kalitesini kontrol etmek amacı ile H $\beta$ 2 primerleri ile Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde kontrol PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Tablo 4.1'deki gibidir. PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi agaroz jelde görüntülenmiştir. cDNA'ların kalitesi kontrol edilip Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılabilir olduğuna karar verildi ve Bölüm 3.2.4.5'te anlatıldığı gibi real time reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve analiz edilmiştir (Şekil 4.31-34).



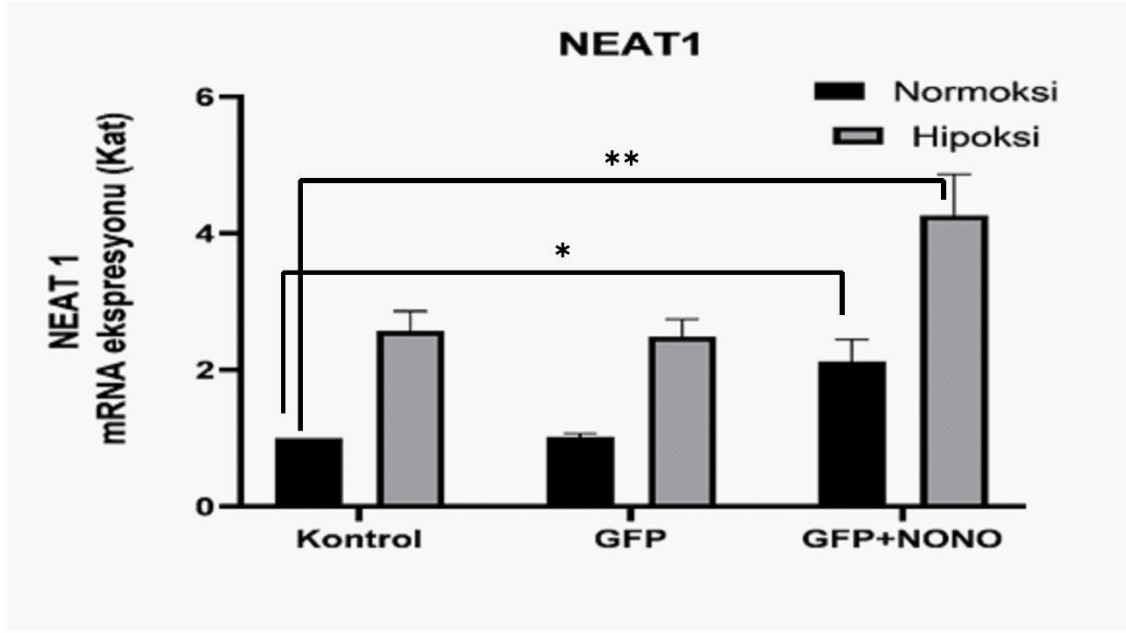
**Şekil 4.30:** NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NONO/p54nrb geni mRNA seviyesine etkisi.



Şekil 4.31:NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin PSF/SPFQ geni mRNA seviyesine etkisi.



Şekil 4.32:NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin PSPC1 geni mRNA seviyesine etkisi.



**Şekil 4.33:**NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NEAT1 geni mRNA seviyesine etkisi.

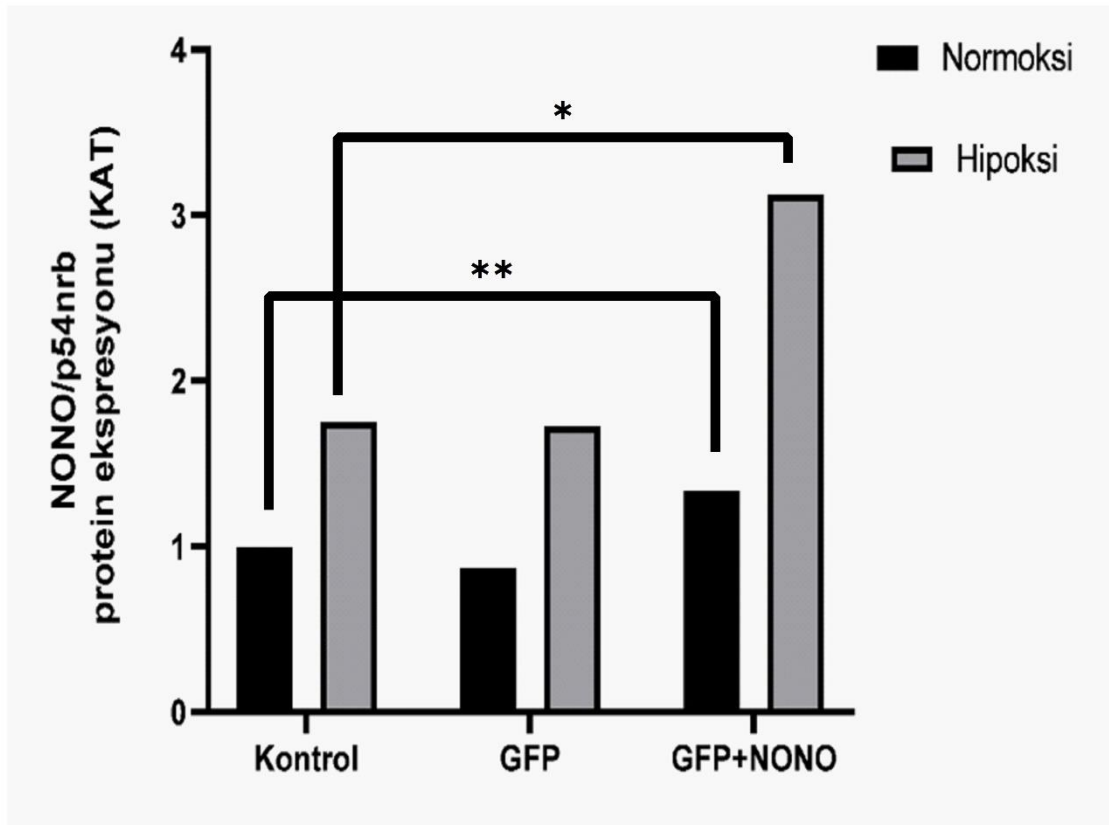
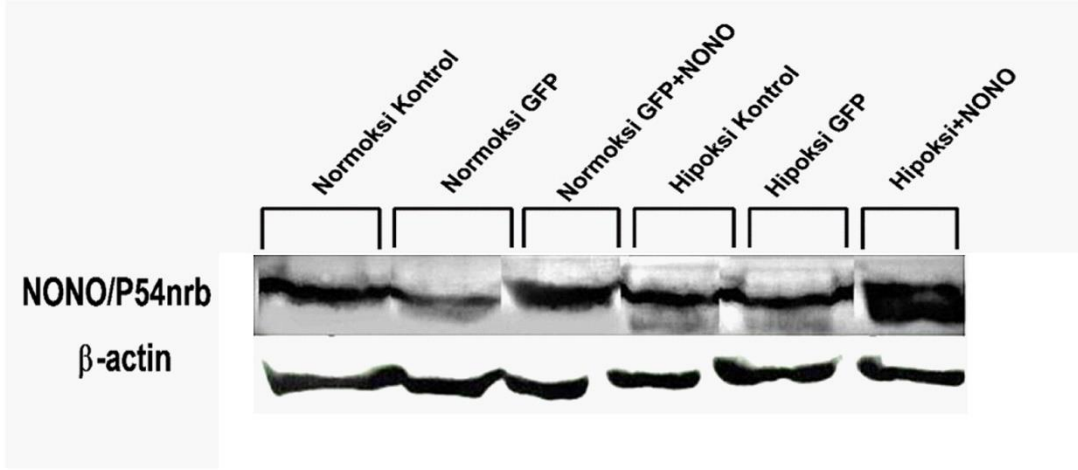
Real-Time PCR analizlerine göre; pGFP plazmidine klonlanan NONO/p54nrb geni plazmidin HUVEC hücrelerine transfekte edilmesi ile aşırı ifade edilmiş ve mRNA seviyesinde transfekte edilmeyen normal hücrelerle karşılaştırıldığında normoksida yaklaşık 3 kat, hipoksida yaklaşık 6 kat artış gözlemlenmiştir. NONO/p54nrb geni mRNA seviyesindeki artışa bağlı olarak diğer DHBS protein ailesi üyelerinin ve paraspeckle yapısında bulunan uzun kodlanmayan RNA özelliği taşıyan NEAT1 geninin mRNA seviyelerinde normoksida 2 kat hipoksida 4 kat artış görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak NONO/p54nrb geni aşırı ifade olduğunda diğer DHBS protein ailesi üyeleri ve NEAT1 geninin bu aşırı ifade etkisinden etkilendiği söylenebilir.

#### **4.3.2.1.1.2 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinde Doğrulanması**

NONO/p54nrb Geninin HUVEC hücrelerinde aşırı ifade ettirilmesinin hipoksik ve normoksik koşullar altında protein seviyesinde doğrulanması deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. de anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

pGFP-C1 vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni Bölüm 3.2.2.6’da anlatıldığı gibi kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile HUVEC hücrelerine aktararak NONO/p54nrb geninin hücrelerde aşırı ifade olması sağlanmıştır. 48 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.5.1’te anlatıldığı gibi western blot deneyi yapılmıştır (**Şekil 4.35.**).





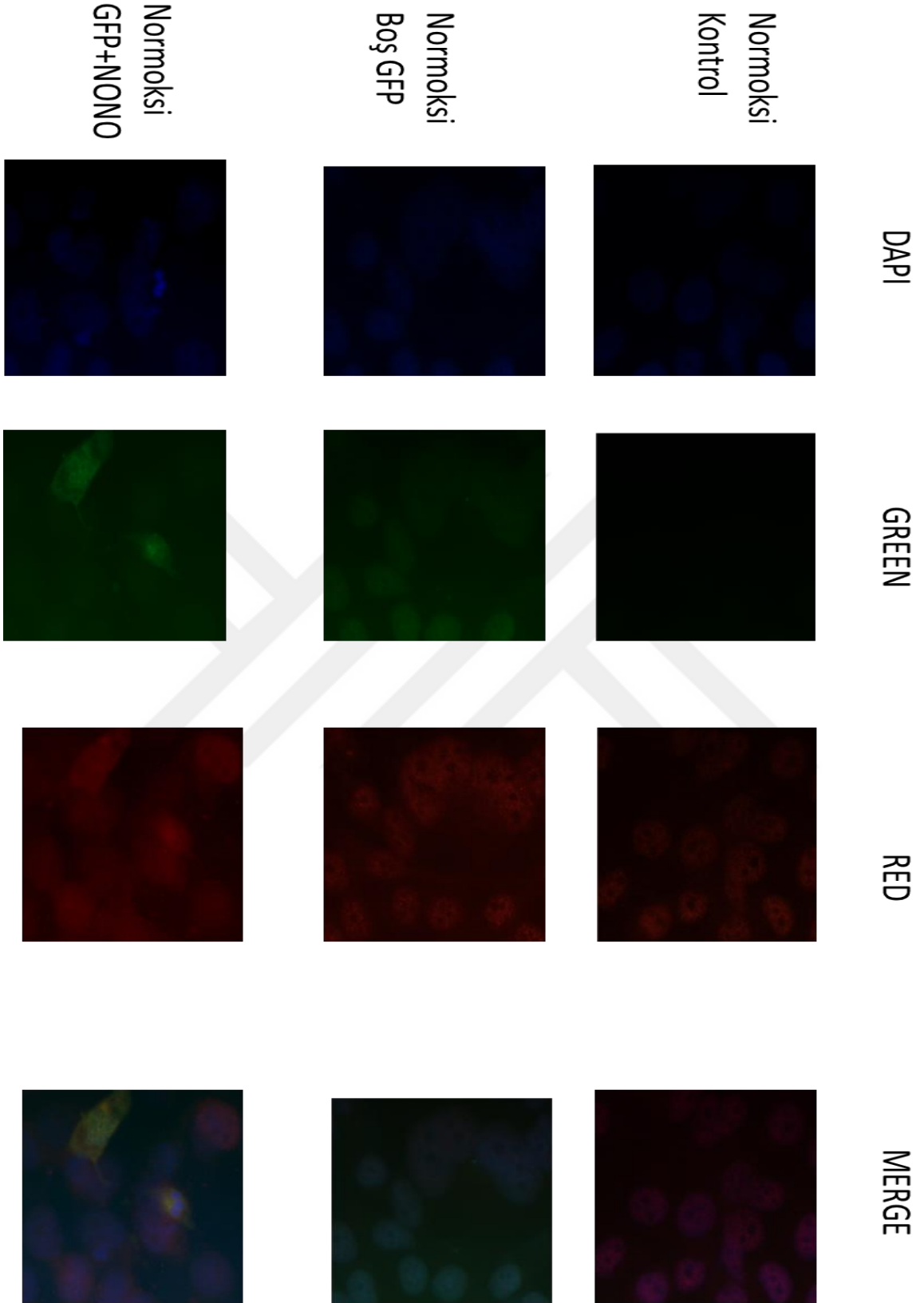
**Şekil 4.34:** NONO/p54nrb geninin aşırı ifade ettirilmesinin NONO/p54nrb geni protein seviyesine etkisi.



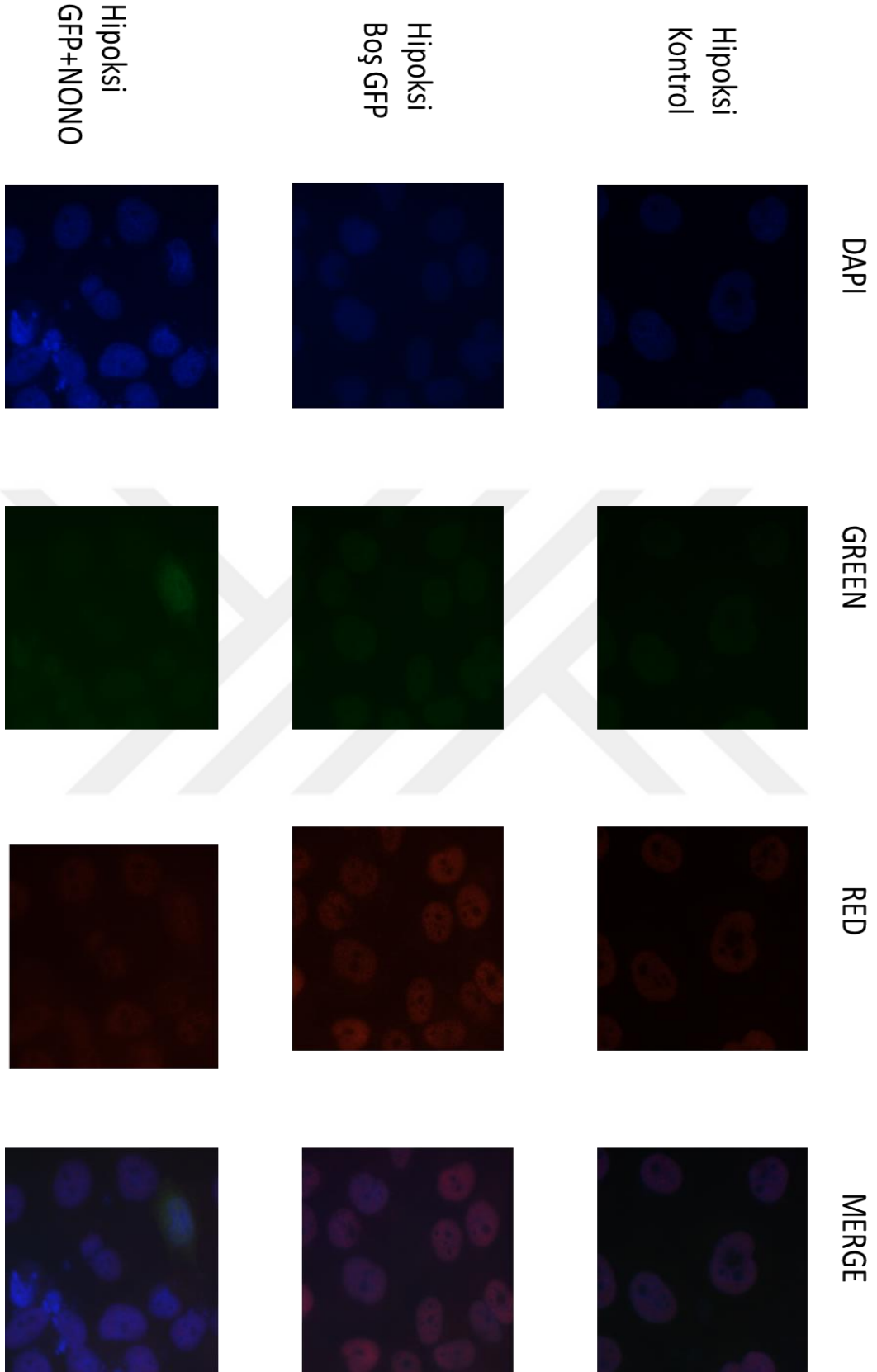
Western blot analizlerine göre; pGFP plazmidine klonlanan NONO/p54nrb geni plazmidin HUVEC hücrelerine transfekte edilmesi ile aşırı ifade edilmiş ve protein seviyesinde transfekte edilmeyen normal hücrelerle karşılaştırıldığında normoksida yaklaşık 1.5 kat, hipoksida yaklaşık 3 kat artış gözlemlenmiştir.

#### **4.3.2.1.1.3 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Aşırı İfade Ettirilmesinin Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında IFC Deneyi ile Doğrulanması ve NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde Lokalizasyonunun Belirlenmesi**

Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 24 kuyucuklu plaklara 125.000 hücre/kuyu olacak şekilde alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur. Her bir kuyucuğa cover glass lamel konulmuştur. Hücreler yüzeye tutunması için bir gece beklendikten sonra pEGFP-C1 vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni Bölüm 3.2.2.6’da anlatıldığı gibi kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile HUVEC hücrelerine aktararak NONO/p54nrb geninin hücrelerde aşırı ifade olması sağlanmıştır. 48 saat sonra Bölüm 3.2.2.8’de anlatıldığı gibi immüno Floresans deneyi gerçekleştirilmiş ve lam ile lamel arasında kalan örnekler Floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir (**Şekil 4.36 ve Şekil 4.37**).



**Şekil 4.35:** Normoksi Koşullarda Transfeksiyon Sonrası IFC Deneyi Sonuçları (x100lük büyütme oranı).

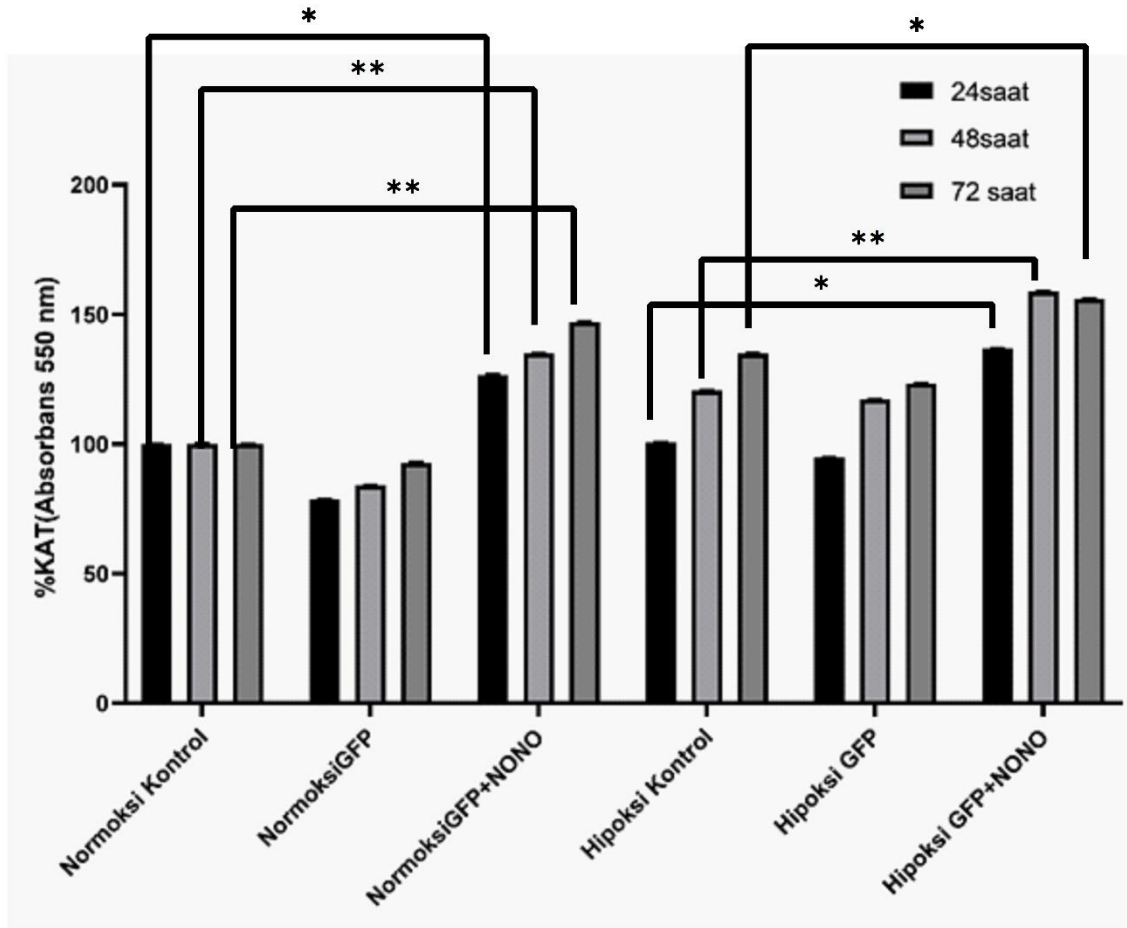


**Şekil 4.36:** Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası IFC Deneyi Sonuçları (x100lük büyütme oranı).

### 4.3.2.2 Hüresel Karekterizasyonun Belirlenmesi

#### 4.3.2.2.1.1 Sitotoksite Deneyleri (MTT)

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksiste ölçümü için Bölüm 3.2.2.9.'da anlatıldığı gibi MTT deneyleri yapılmıştır. Transfeksiyondan hem 24 saat hem de 48 saat sonra gerçekleştirilen deneylerde NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre absorbans artmıştır. Bu artış hipoksik koşullarda daha fazladır. 48 saatte NONO/p54nrb geni transfekte edilmiş hücrelerde kontrol grubuna göre %134 kat canlılık artmıştır, hipoksik durumda ise bu artış %160'tır. Sadece vektörün transfekte edildiği deney gruplarında hücre canlılığında azalış gözlemlenmiştir (Şekil 4.38).

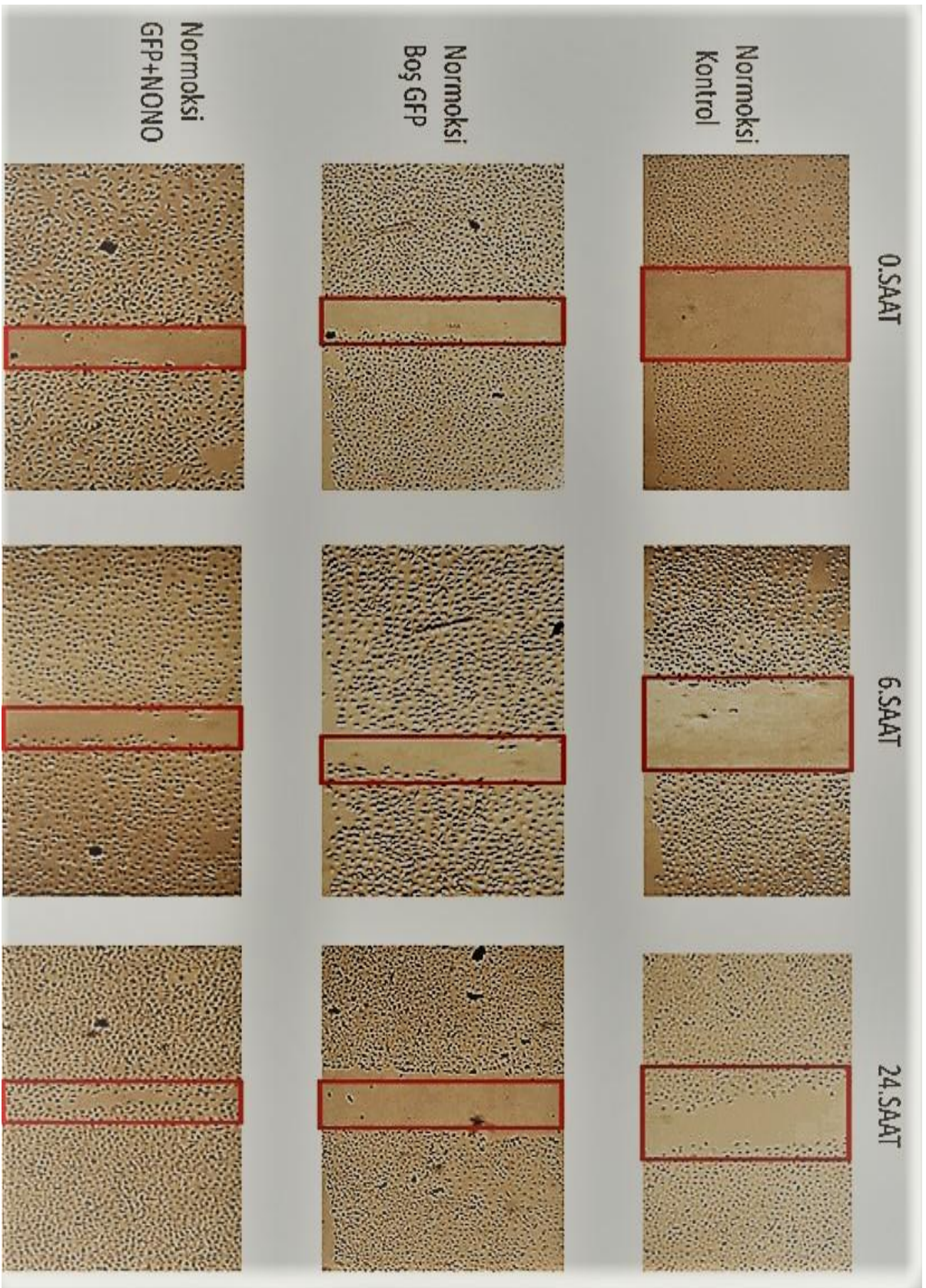


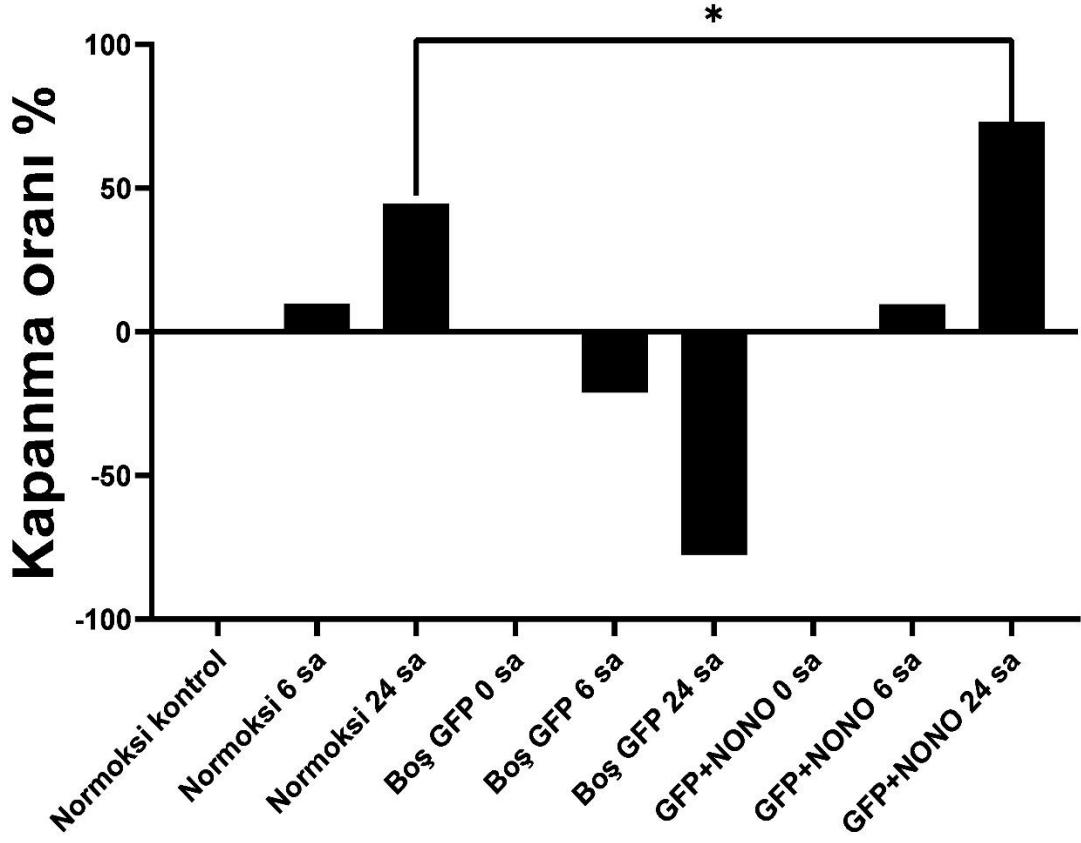
Şekil 4.37: NONO/p54nrb geni içeren pEGFP C1 transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra MTT sonuçları.

#### 4.3.2.2.1.2 izik Testi

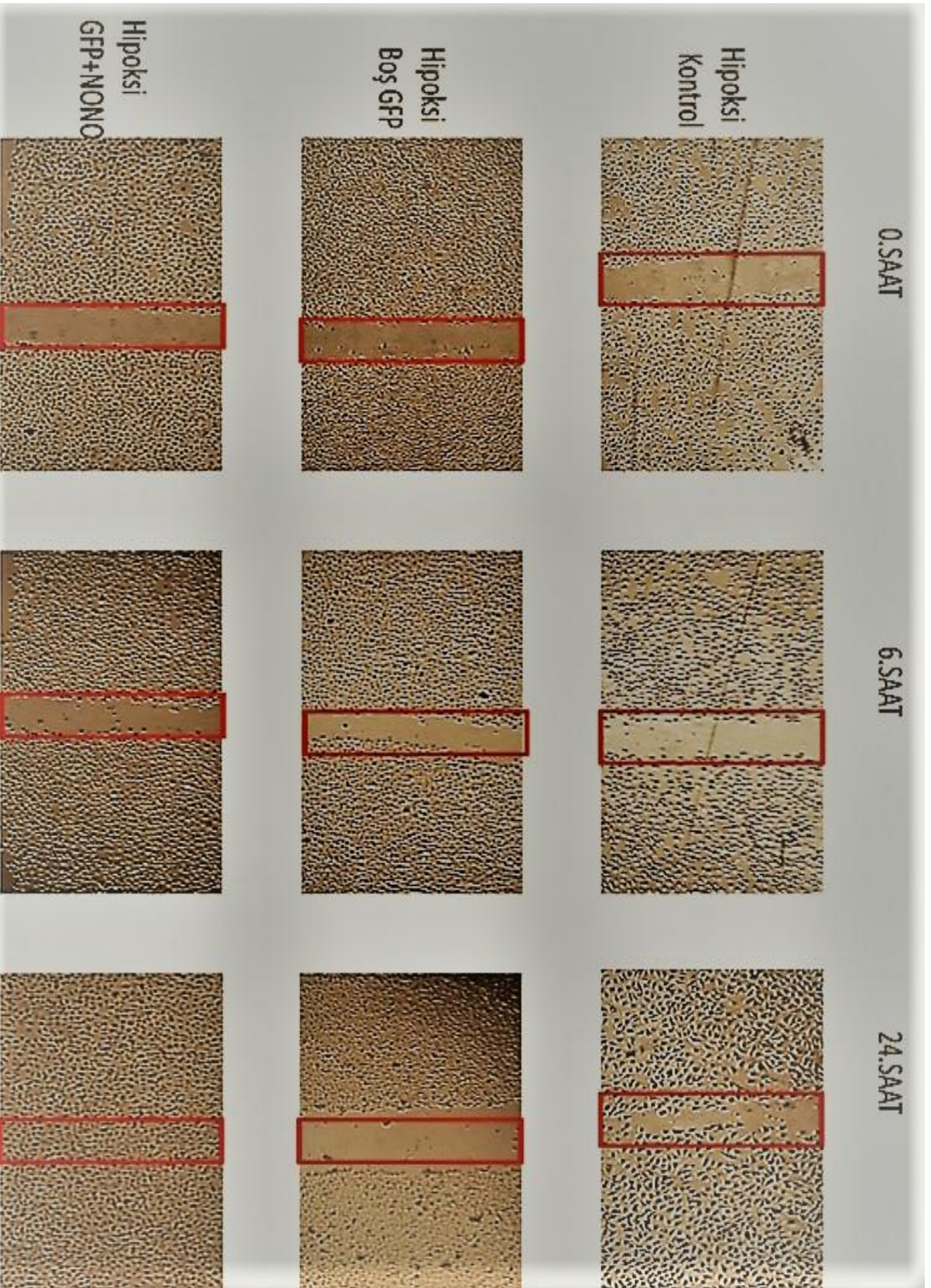
Transfeksiyondan sonra hücrelerin invazyon yeteneğini karşılaştırmak için Bölüm 3.2.2.10 ‘da anlatıldığı gibi çizik testi gerçekleştirilmiştir. pEGFP-C1 plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre çizik atılan aralık azalmıştır. Bu azalış hipoksik koşullarda daha fazladır. NONO/p54nrb genini içeren pEGFP-C1 plazmitinin transfekte edildiği hcrelerinlerin invazyon yeteneğinde artış olmuştur (şekil 4.39 ve şekil 4.40).



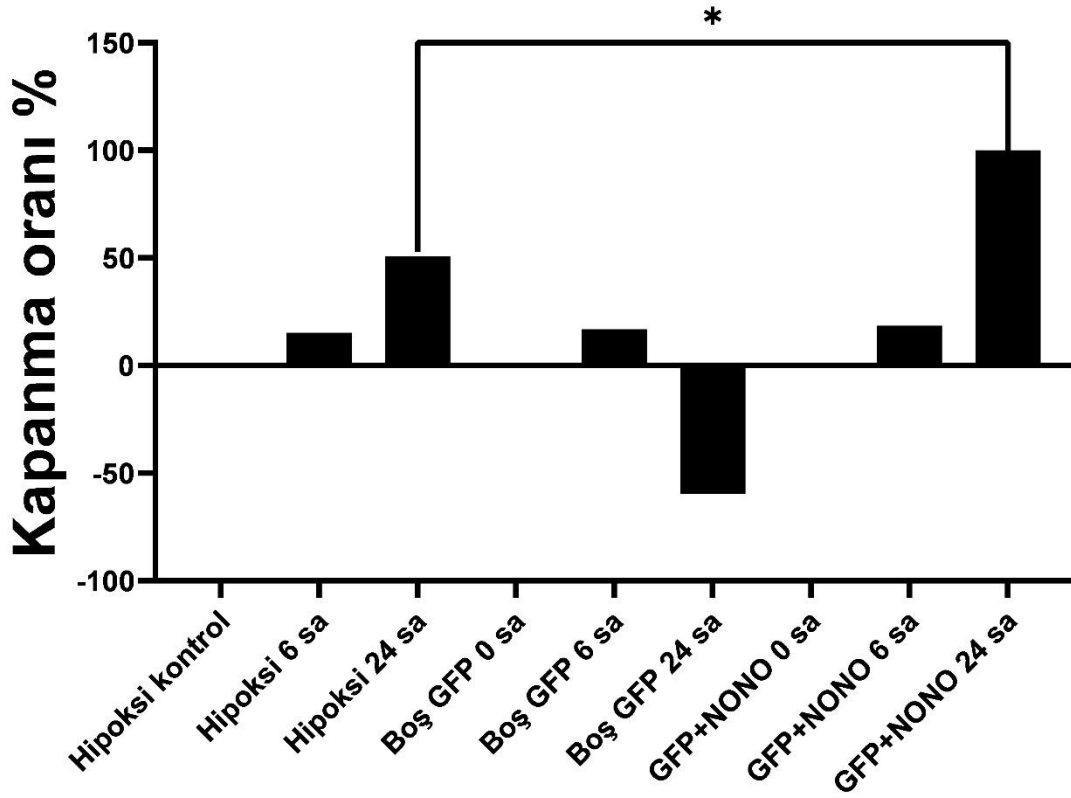




Şekil 4.38: Normoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Çizik Testi Sonuçları.



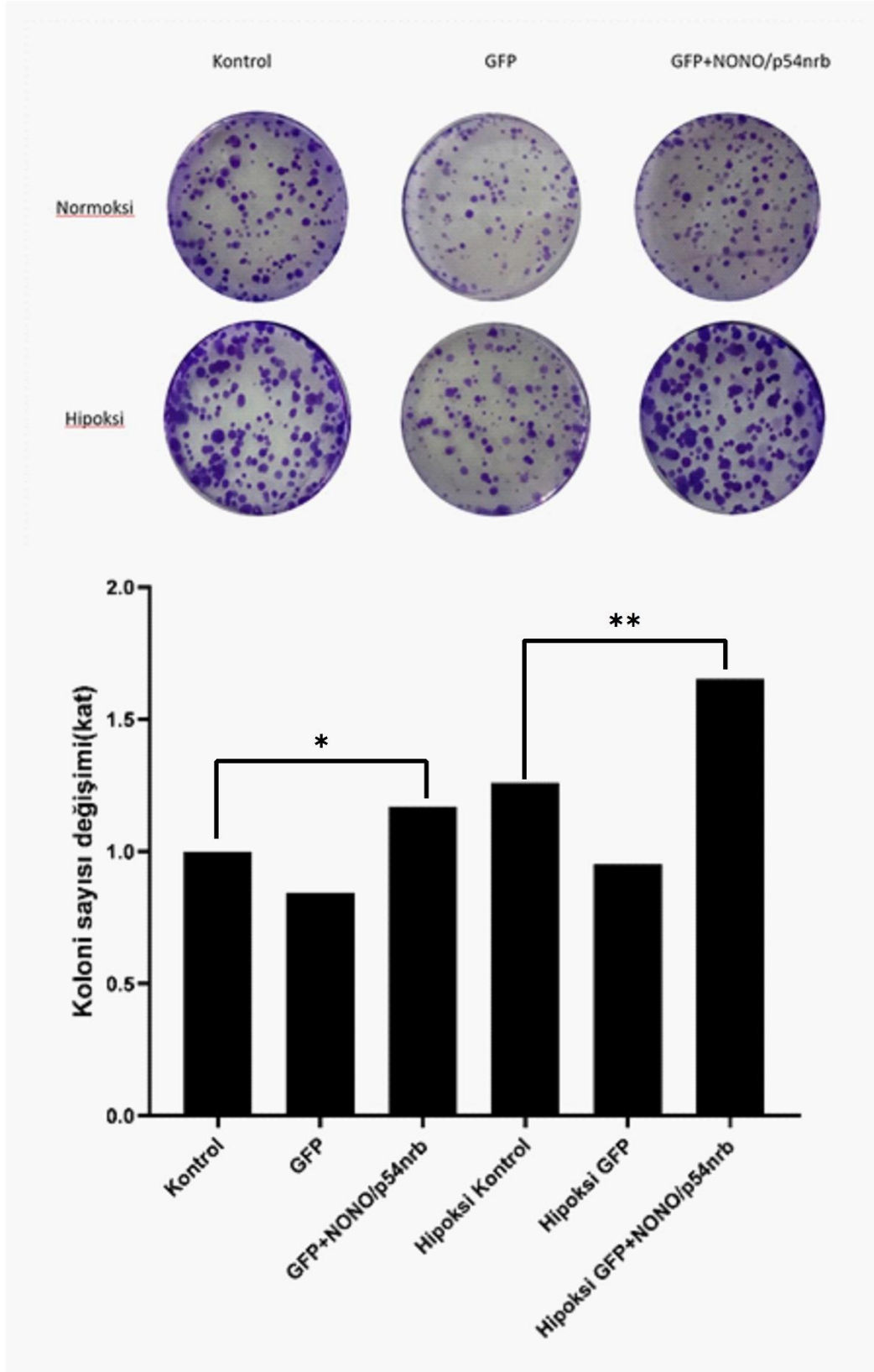




Şekil 4.39: Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Çizik Testi Sonuçları.

#### 4.3.2.2.1.3 Koloni Formasyon Deneyi

Transfeksiyondan sonra hücrelerin invazyon yeteneğini karşılaştırmak için Bölüm 3.2.2.11'de anlatıldığı gibi koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb genini içeren EGFP-C1 plazmidinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha çok koloni gözlemlenmiştir. Bu artış hipoksik koşullarda daha fazladır. NONO/p54nrb genini içeren EGFP-C1 plazmidinin transfekte edildiği hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinde artış olmuştur (Şekil 4.41).



Şekil 4.40: Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Transfeksiyon Sonrası Koloni Formasyon Deneyi Sonuçlar

## 4.4 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanması

### Çalışmaları

#### 4.4.1 Klonlama Çalışmaları

NONO/p54nrb genine özgü shRNA oligolarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.3.7.1.1'de anlatıldığı gibi Whitehead Institute for Biomedical Research hosts an siRNA Selection (<http://sirna.wi.mit.edu/>) aracı kullanılmıştır. Klonlama için vektör üreticisinin önerdiği protokole göre oligolar sipariş edilmiştir.

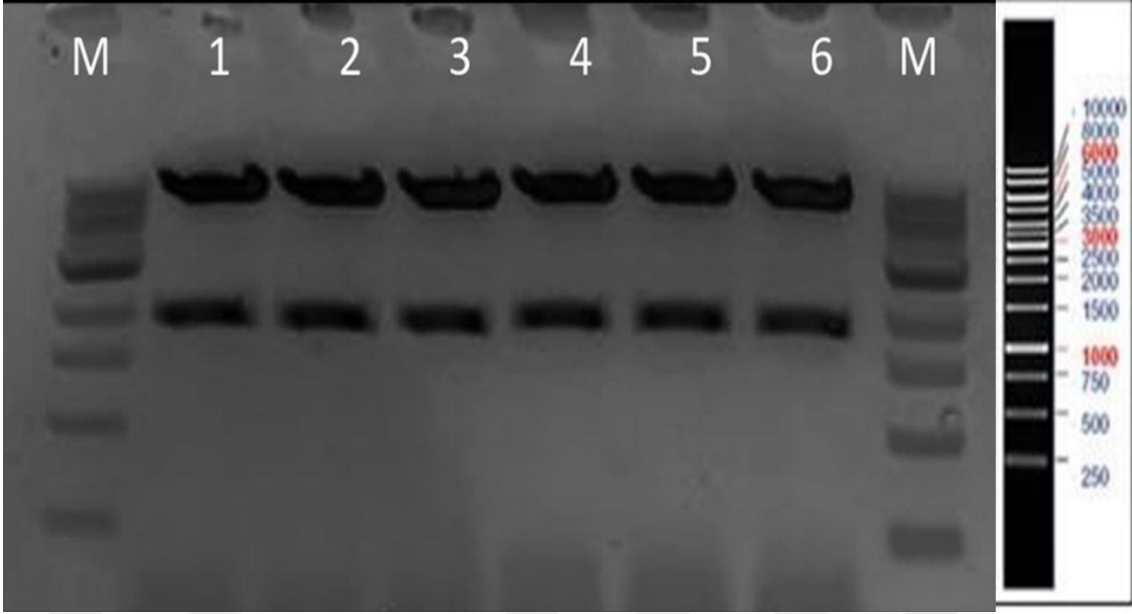
Forward oligo:

5'CCGGAAAGGATTTGGCTTTATCCGCCTCGAGGCGGATAAAGCCAAATCCT  
TT TTTTGTG- 3'

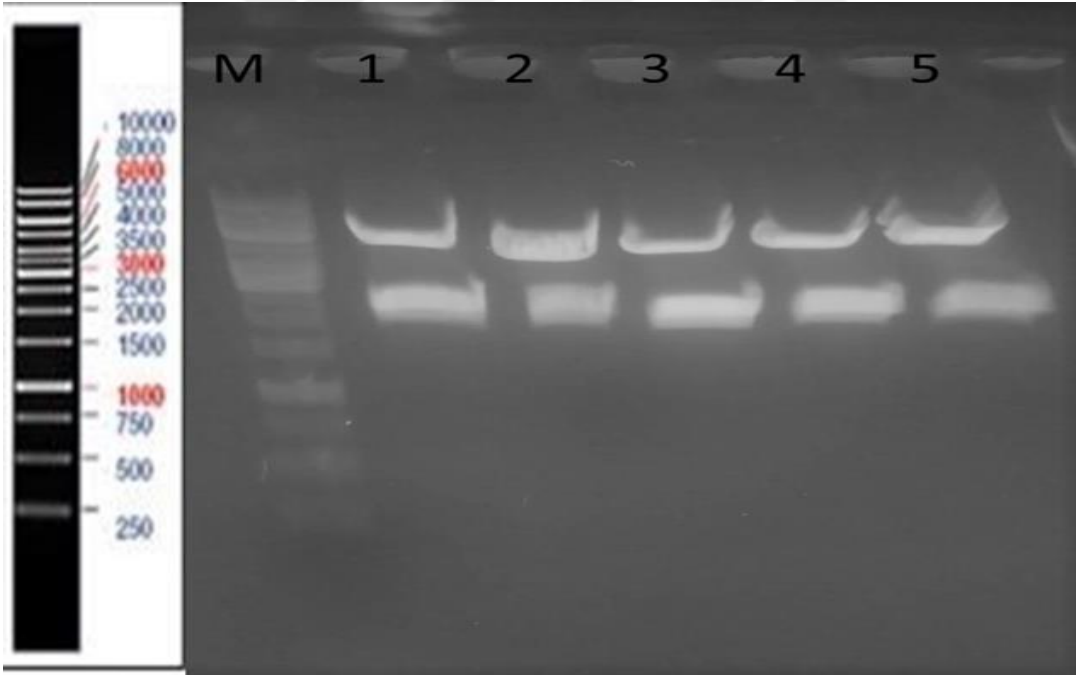
Reverse Oligo:

5'AATTCAAAAAAAAAAGGATTTGGCTTTATCCGCCTCGAGGCGGATAAAGCCA  
AATCCT TT -3'

Ticari olarak temin edilen sh-RNA Oligoları Bölüm 3.2.3.7.1.2 de anlatıldığı gibi birleştirilme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Birleştirme reaksiyonu ile birleştirilen oligolar ile Bölüm 3.2.3.7.1.3'de anlatıldığı gibi restriksiyon enzimleri ile kesilen pLKO.1 TRC vektörü (**Şekil 4.42**) Bölüm 3.2.3.7.1.4.'de anlatıldığı gibi ligasyon reaksiyonu ile birleştirilmiştir ve kompetant hücelere aktarılmıştır. Koloniler seçilerek plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmidler, EcoRI ve NcoI restriksiyon enzimleri ile kontrol kesim işlemine tabi tutularak agaroz jele yüklenmiş ve UV ışığında görüntülenmiştir (**Şekil4.43**).



**Şekil 4.41:** pLKO.1-TRC plazmitinin EcorI ve AgeI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü (M:marker 1-6 p KLO vektörünün restriksiyon enzimi kesim görüntüsü).



**Şekil 4.42:** EcoRI ve NcoI Restriksiyon enzimi kesim görüntüsü (M: Marker 1-5 NONO/p54nrb shRNA oligolarını içeren kesilmiş pLKO.1 TRC plazmidi).

Görüntülenen bantların marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu anlaşıldığında, klonlamanın doğrulanması için örnekler dizi analizine gönderilmiştir.

Dizileme sonucunda NONO/p54nrb genine ait shRNA oligolarının pLKO.1 TRC vektörüne klonlandığı belirlenmiştir.

Plazmidlerin hücelere aktarılması için plazmid DNA'ların yüksek konsantrasyonda olmaları gerekmektedir. Böylece klonlama yapılan plazmidler, Bölüm 3.2.3.8'de anlatıldığı gibi üreticinin önerdiği şekilde MN midi plus kiti ile çok kopyalı ve yüksek saflıkta izole edilmiştir.

#### **4.4.2 Transfeksiyon Çalışmaları**

##### **4.4.2.1 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanması Çalışmaları**

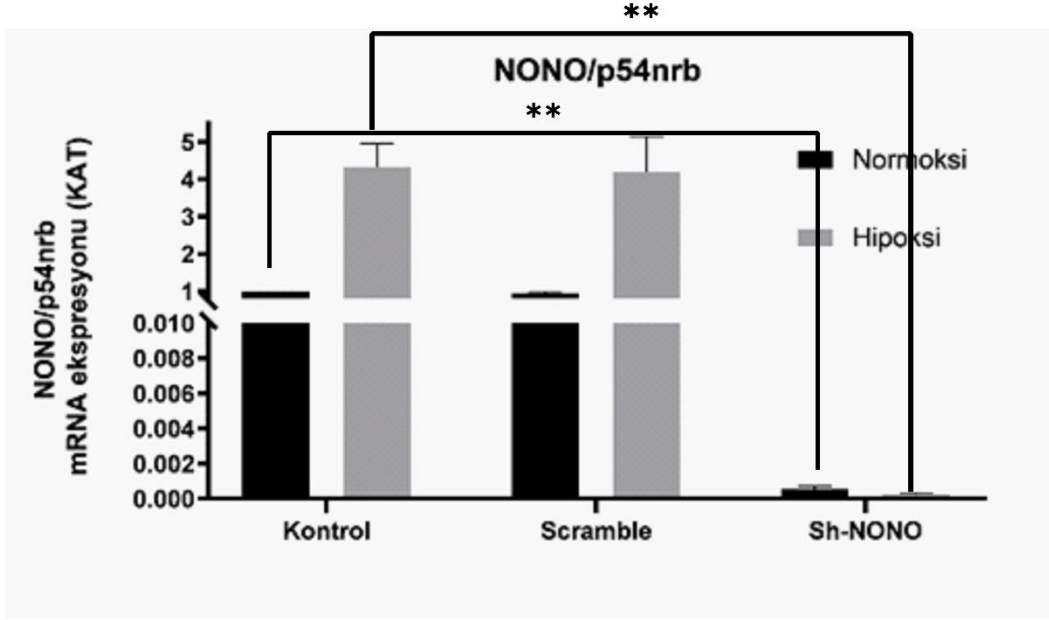
pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni shRNA oligoları Bölüm 3.2.2.6'da anlatıldığı gibi TurboFect™ Transfection Reagent ile HUVEC hücrelerine aktarılarak NONO/p54nrb geninin hücrelerde ifadesinin baskılanması sağlanmıştır.

##### **4.4.2.1.1.1 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanmasının Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması ve Diğer Paraspeckle Bileşenlerinin mRNA Seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi**

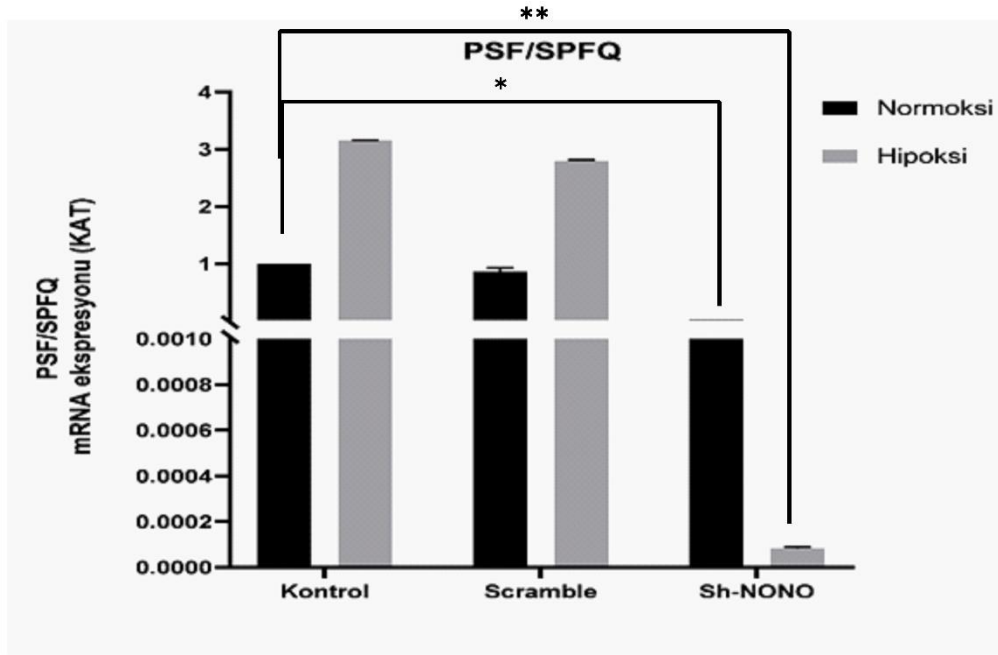
NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullar altında mRNA seviyesinde doğrulanması ve diğer Paraspeckle bileşenlerinin mRNA seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4.'de anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni shRNA oligoları Bölüm 3.2.2.6 'da anlatıldığı gibi TurboFect™ Transfection Reagent ile HUVEC hücrelerine aktarılarak NONO/p54nrb geninin hücrelerde ifadesinin baskılanması sağlanmıştır. 48 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.4.1'te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. Sonra Bölüm 3.2.4.4'te anlatıldığı gibi cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'ların kalitesini kontrol etmek amacı ile H $\beta$ 2 primerleri ile Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde kontrol PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Tablo 4.1'deki gibidir. PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi agaroz jelde

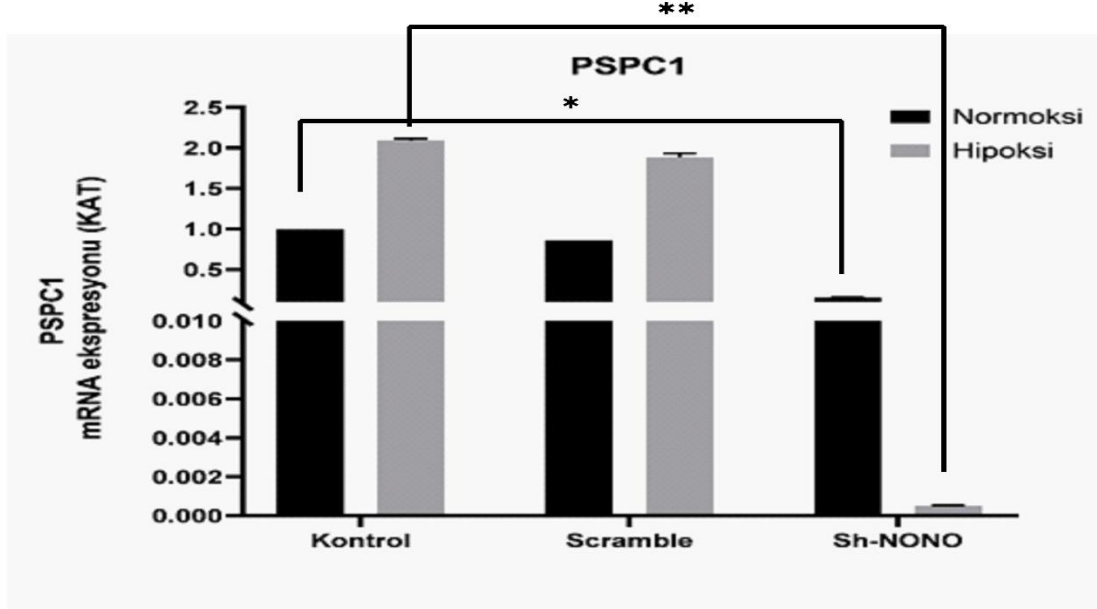
görüntülenmiştir. cDNA'ların kalitesi kontrol edilip Real-Time PCR reaksiyonu için kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir ve Bölüm 3.2.4.5'te anlatıldığı gibi real time reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve analiz edilmiştir (Şekil 44-47)



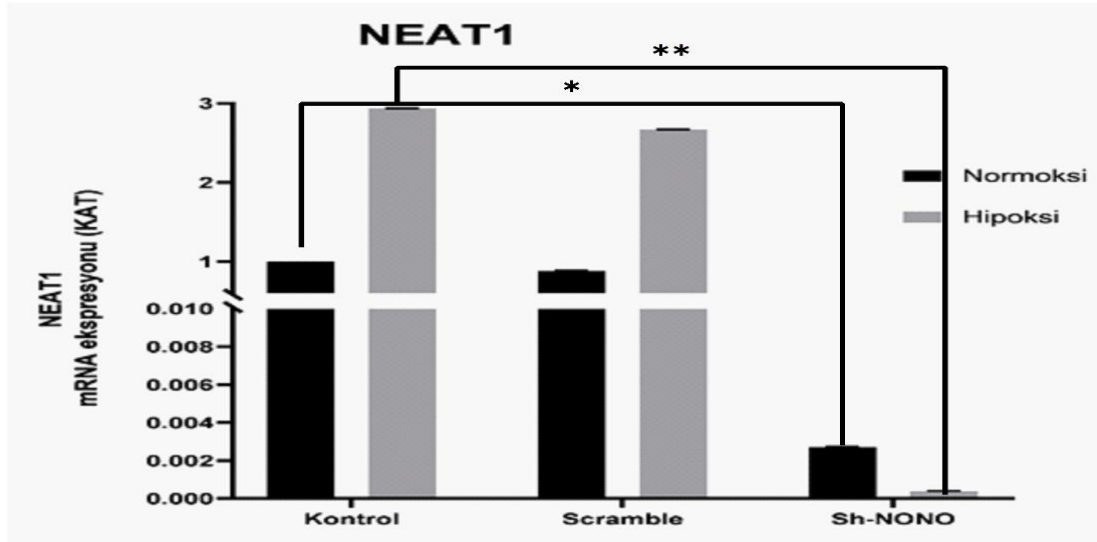
Şekil 4.43: NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NONO/p54nrb geni mRNA seviyesine etkisi.



Şekil 4.44: NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının PSF/SPFQ geni mRNA seviyesine etkisi.



Şekil 4.45: NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının PSC1 geni mRNA seviyesine etkisi.



Şekil 4.46: NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NEAT1 geni mRNA seviyesine etkisi.

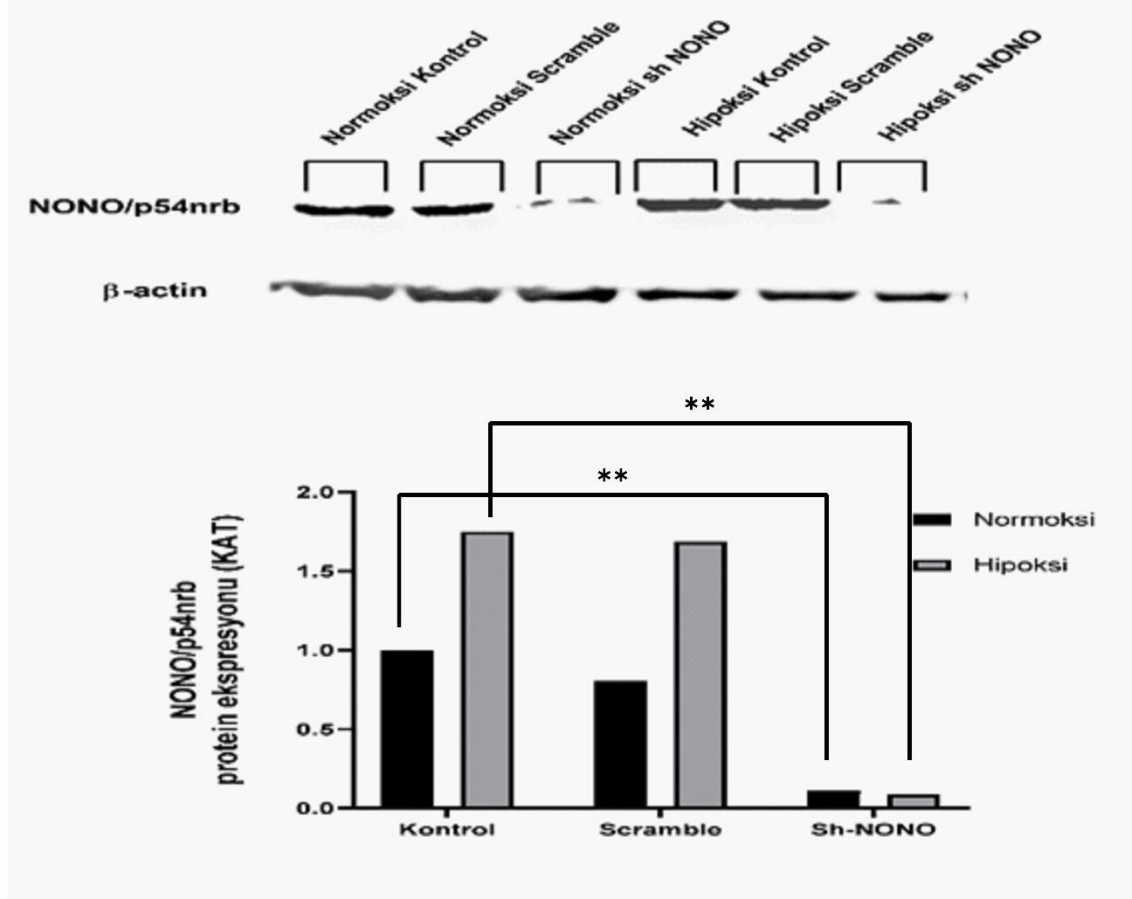
Real Time PCR analizlerine göre; pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni sh RNA oligolarının HUVEC hücrelerine transfekte edilmesi ile NONO/p54nrb geninin ifadesi baskılanmış ve mRNA seviyesinde transfekte edilmeyen normal hücrelerle karşılaştırıldığında normoksida ve hipoksik durumda belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. NONO/p54 geni mRNA seviyesindeki azalışa bağlı olarak diğer DHBS protein ailesi üyelerinin ve paraspeckle yapısında bulunan uzun kodlanmayan RNA özelliği taşıyan NEAT1 geninin mRNA seviyelerinde normoksida ve hipoksida azalış görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak NONO/p54nrb genin ifadesi azaldığında diğer DHBS protein ailesi üyeleri ve NEAT1 geninde bu baskılanmadan etkilendiği söylenebilir.

#### **4.4.2.1.1.2 NONO/p54nrb Geninin HUVEC Hücrelerinde İfadesinin Baskılanmasının Hipoksik ve Normoksik Koşullar Altında Protein Seviyesinde Doğrulanması**

NONO/p54nrb Geninin HUVEC hücrelerinde aşırı ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullar altında protein seviyesinde doğrulanması deneyleri kapsamında Bölüm 3.2.2.4. te anlatıldığı gibi HUVEC hücreleri sayılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmış ve hipoksik koşullar oluşturulmuştur.

Real-time PCR analizine göre; pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni sh-RNA oligoları Bölüm 3.2.2.6 'da anlatıldığı gibi TurboFect™ Transfection Reagent ile HUVEC hücrelerine aktararak NONO/p54nrb geninin hücrelerde ifadesinin baskılanması sağlanmıştır. 48 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet alındıktan sonra Bölüm 3.2.5.1'te anlatıldığı gibi western blot deneyi yapılmıştır (**Şekil 4.48**).





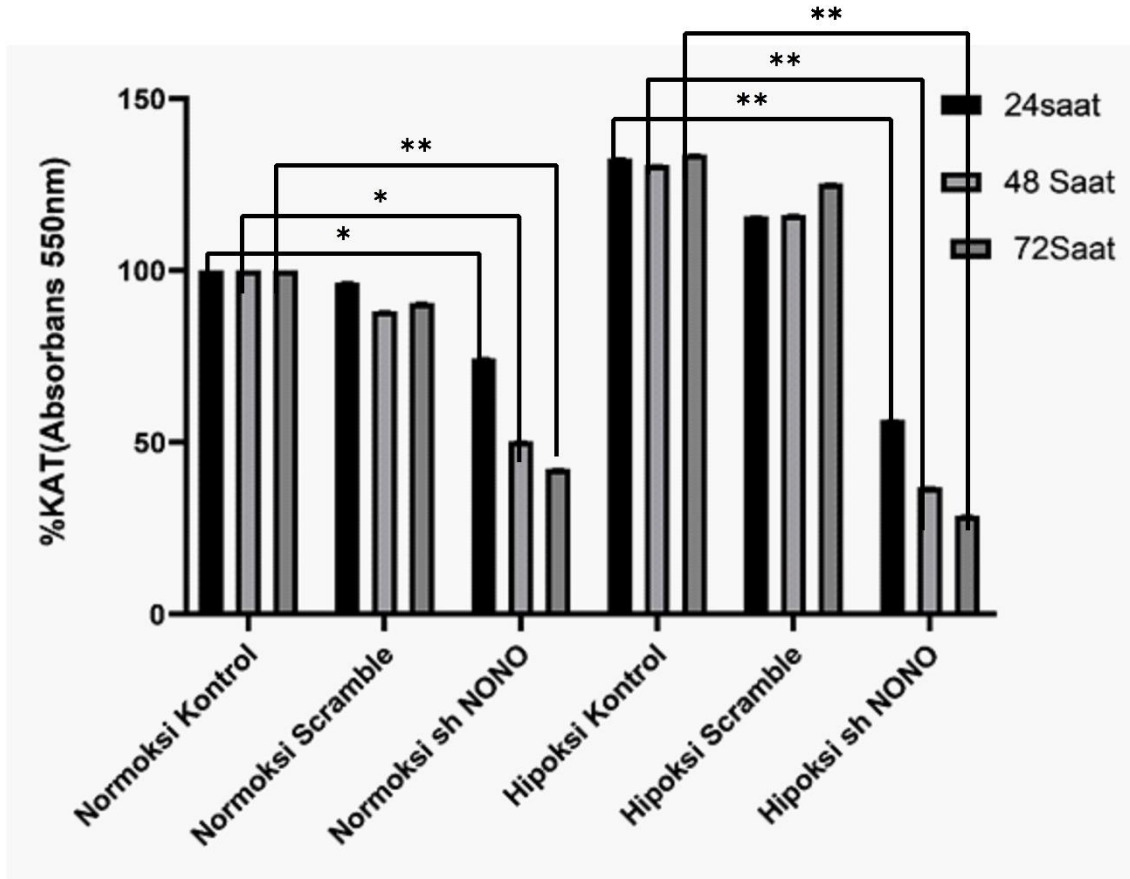
**Şekil 4.47:** NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanmasının NONO/p54nrb geni protein seviyesine etkisi.

Western blot analizlerine göre; pLKO.1 TRC vektörüne klonlanan NONO/p54nrb geni shRNA oligolarının HUVEC hücrelerine transfekte edilmesi ile NONO/p54nrb geni protein seviyesinde transfekte edilmeyen normal hücrelerle karşılaştırıldığında normoksi ve hipoksi durumunda belirgin bir azalış gözlemlenmiştir.

#### 4.4.2.2 Hücresel Karakterizasyonun Belirlenmesi

##### 4.4.2.2.1.1 Sitotoksite Deneyleri (MTT)

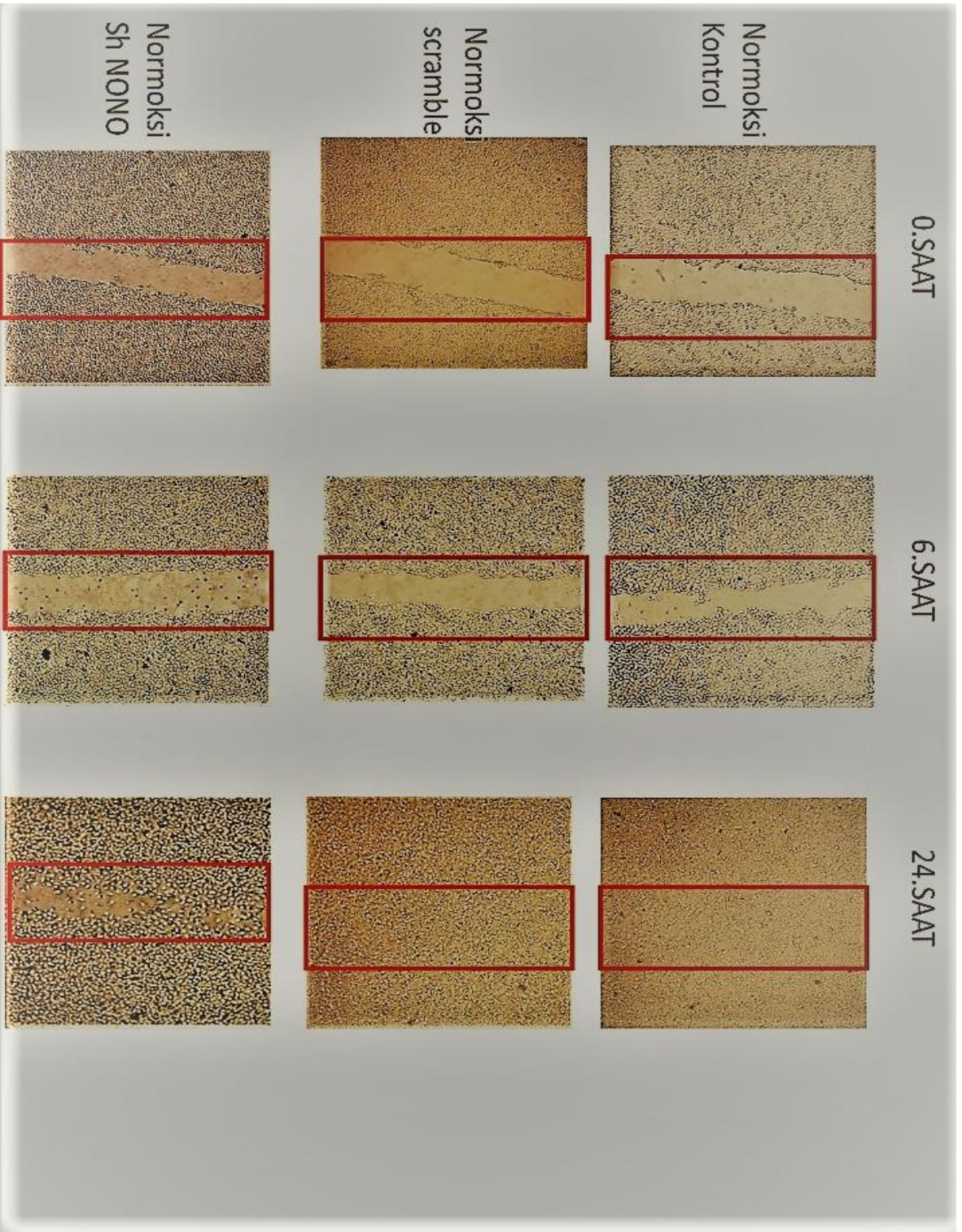
Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksite ölçümü için Bölüm 3.2.2.8.'da anlatıldığı gibi MTT deneyleri yapılmıştır. Transfeksiyondan hem 24, 48 ve 72 saat sonra gerçekleştirilen deneylerde NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre absorbans azalmıştır. Bu azalış hipoksik koşullarda daha fazladır (Şekil 4.49).

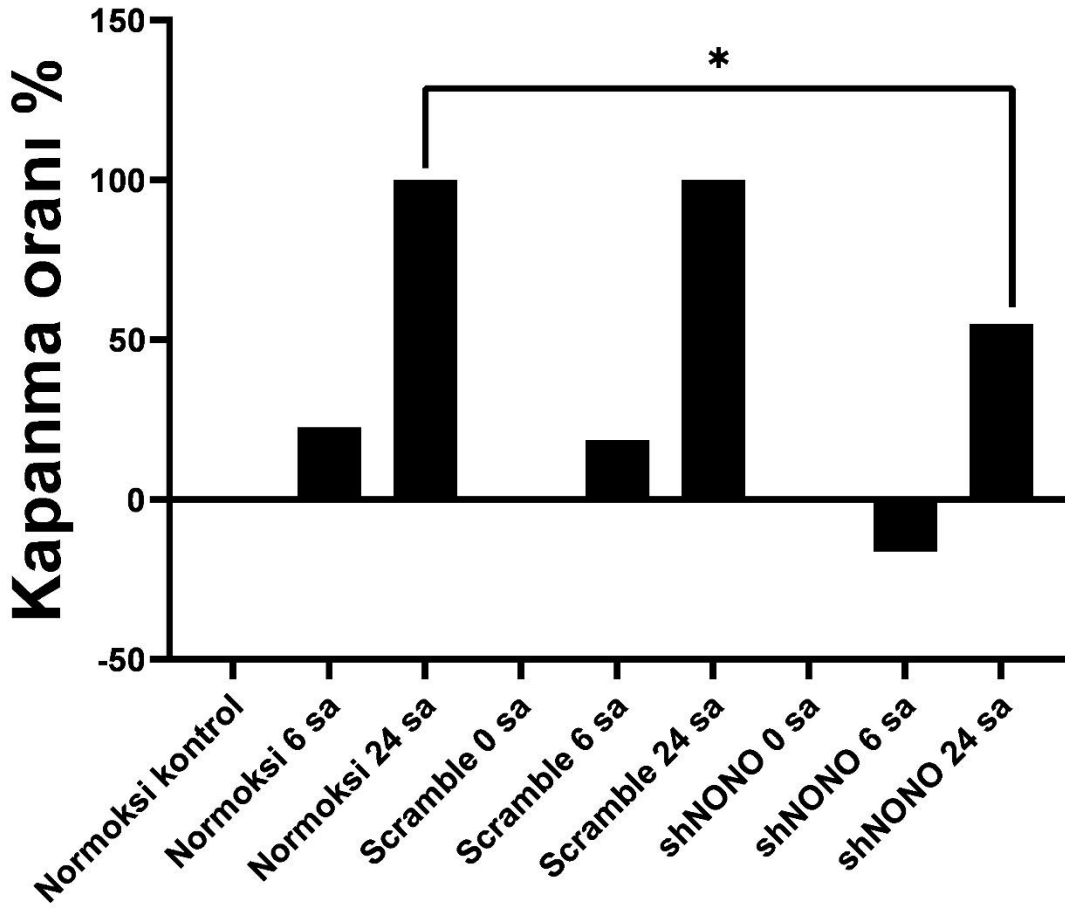


**Şekil 4.48:** NONO/p54nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra MTT sonuçları.

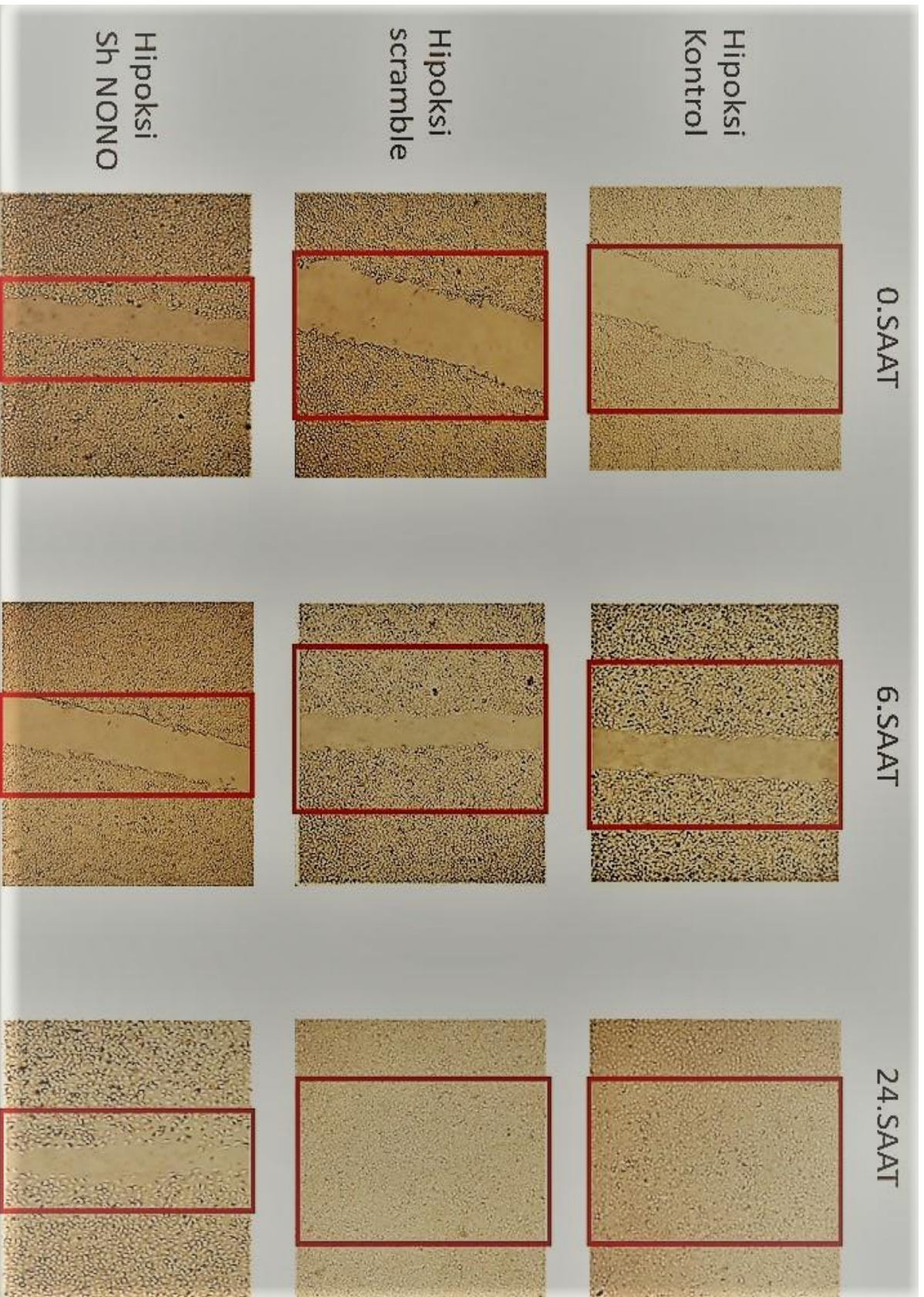
#### 4.4.2.2.1.2 Çizik Testi

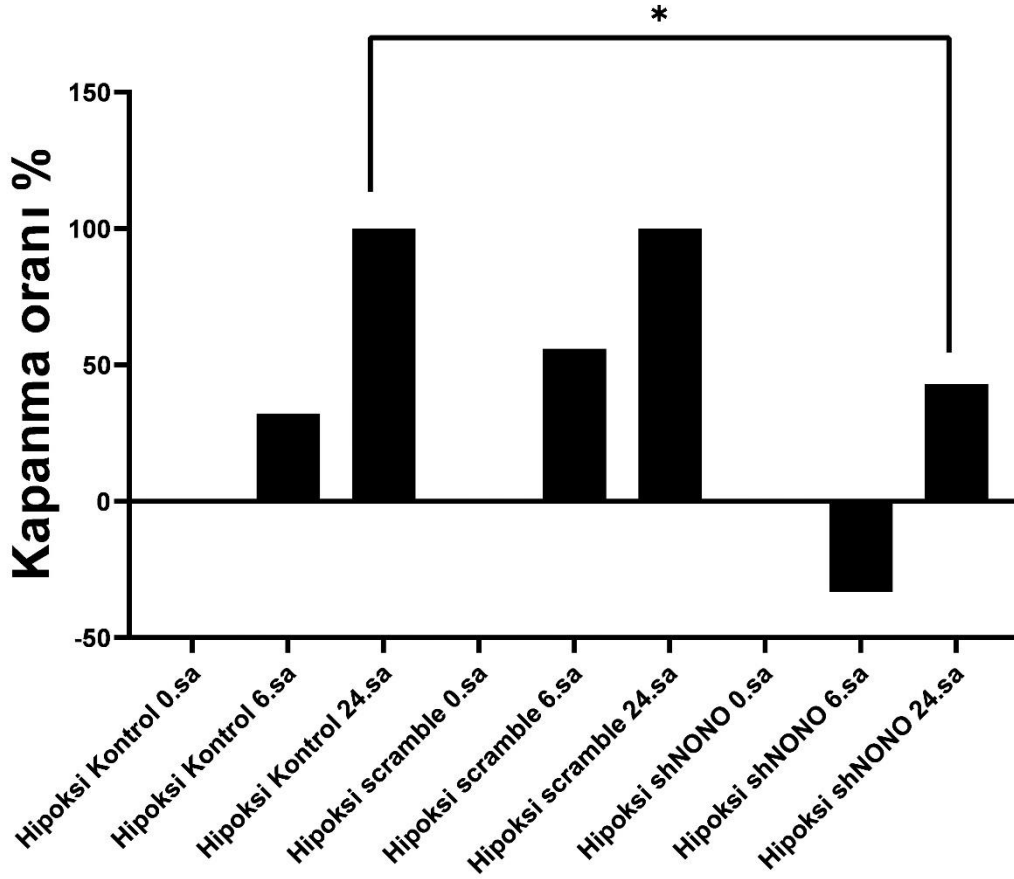
Transfeksiyondan sonra hücrelerin invazyon yeteneğini karşılaştırmak için Bölüm 3.2.2.10 'da anlatıldığı gibi çizik testi gerçekleştirilmiştir pLKO.1 TRC plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni hedeflenmiş shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında 24 saat sonra yaklaşık %50 oranında kapanma gözlemlenirken, kontrol gruplarında çizik tamamen kapanmıştır. Hipoksik koşullarda da aynı sonuç gözlemlenmiştir. NONO/p54nrb geni hedeflenmiş shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında 24 saat sonra yaklaşık %30 oranında kapanma gözlemlenirken, kontrol gruplarında çizik tamamen kapanmıştır. Bu sonuçlara bakılarak NONO/p54nrb geni hedeflenmiş shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği hücrelerde invazyon yeteneğinde azalış olduğu kanısına varılmıştır (**Şekil 4.50** ve **Şekil 4.51**).





Şekil 4.49: Normoksik koşullarda NONO/p54nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra çizik testi sonuçları.

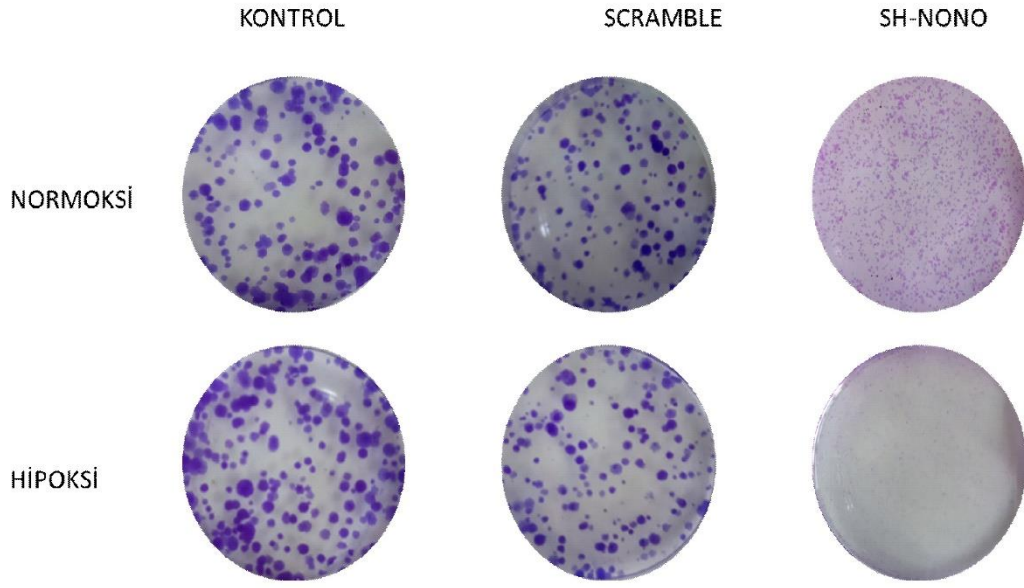




**Şekil 4.50:** Hipoksik koşullarda NONO/p54nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra çizik testi sonuçları.

#### 4.4.2.2.1.3 Koloni Formasyon Deneyi

Transfeksiyondan sonra hücrelerin invazyon yeteneğini karşılaştırmak için Bölüm 3.2.2.10.'da anlatıldığı gibi koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb geni hedeflenmiş sh oligolarını genini içeren pLKO.1 TRC plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni hedeflenmiş sh oligolarını genini içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha az koloni gözlemlenmiştir. Bu azalış hipoksik koşullarda daha fazladır. NONO/p54nrb geni hedeflenmiş sh oligolarını genini içeren pLKO.1 TRC plazmitinin transfekte edildiği hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinde belirgin bir azalış olmuştur (Şekil 4.52).



**Şekil 4.51:** NONO/p54nrb shRNA oligoları içeren pLKO.1 TRC transfeksiyonundan sonra koloni formasyon testi sonuçları.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

*Paraspeckles* oldukça yeni aydınlatılan memeli hücre çekirdeğinin interkromatin boşluğunda bulunan ribonükleoproteinlerdir. Bunlar nükleusta bulunan bir proteinin belli bir bölgede biriktiği ve bilinen herhangi nükleer yapı markerı ile eşleşmediğinin keşfi ile bulunmuşlardır. Paraspeckleler sadece memeli hücrelerinde bulunur. Sağlıklı ve kanserli hücrelerde görülmüştür.

Paraspeckles proteinler, non-POU domain containing octamer binding (non-POU domain içeren oktomer bağlanma proteini) (NONO/p54nrb), paraspeckle protein 1 (PSPC1) ve Splicing Factor Proline and Glutamine Rich (PSF/SFPQ) içeren memeli DBHS (*Drosophila melanogaster* behavior, human splicing) protein ailesi proteinleridir.

Paraspeckle yapısında uzun kodlanmayan RNA bulunur ve bu RNA NEAT1 olarak isimlendirilmiştir. NEAT1 paraspeckle oluşumu ve sürdürülmesi için zorunludur. NEAT1 transkripsiyon inhibisyonu ve NEAT1 susturulmasından sonra paraspeckle tekrar oluşmaz [1].

Literatürdeki bu bilgilere bakılarak NONO/p54nrb geninin shRNA aracılığıyla ifadesi baskılanıp transkripsiyonel olarak diğer paraspeckle üyelerinde nasıl bir değişiklik olduğu araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalara göre NONO/p54nrb geninin ifadesi shRNA vektörü olan pKLO.TRC vektörüne klonlanıp baskılanmıştır. Bu amaçla NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligoları pKLO.TRC vektörüne klonlanıp, geçici transfeksiyon ile HUVEC hücrelerine aktarılmıştır. NONO/p54nrb geninin HUVEC hücrelerinde ifadesinin baskılandığı mRNA seviyesinde Real-Time PCR ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerine göre; NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren pKLO.TRC vektörünün transfekte edildiği hücrelerde mRNA seviyesinde normokside ve hipokside belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. NONO/p54nrb geninin HUVEC hücrelerinde ifadesinin baskılandığı protein seviyesinde Western Bot deneyi ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerine göre; NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren pKLO.TRC vektörünün transfekte edildiği hücrelerde protein seviyesinde normokside ve hipokside belirgin bir azalış gözlemlenmiştir.

NONO/p54nrb geni HUVEC hücrelerinde ifadesi baskılandığında mRNA seviyesinde diğer paraspeckle proteinler olan, paraspeckle protein 1 (PSPC1), splicing factor proline and glutamine rich (PSF/SFPQ) ve kodlanmayan RNA, NEAT1, mRNA seviyesinde de belirgin



azalış olmuştur. Bu sonuçlar NONO/p54 nrb'nin paraspeckle yapısında önemli bir rol oynadığı ve paraspeckle genlerini de etkilediğini düşündürmüştür.

Paraspeckle ve multifonksiyonel protein, NONO/p54nrb tümörleşme sürecinde ve metastazda rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörü HLXB9, NONO/P54nrb proteini ile etkileşerek insulinoma hücrelerinin poliferasyonunu teşvik etmektedir.[28]. Ayrıca NONO/p54nrb 'ün meme kanserinde fazla miktarda ifade olduğu tespit edilmiştir [29]. Protoonkogen Spi-1/PU.1 eritrolökomik süreçte NONO/p54nrb 'ye bağlanır ve splicing işleminde rol alır. NONO/p54nrb, prostat kanseri ve malign melanomda güçlü şekilde eksprese edilir. Ayrıca artmış NONO/p54nrb seviyesi, insan neuroblastomasında bağımsız bir prognostik faktördür[30].

Bu tez kapsamında yapmış olduğumuz NONO/p54nrb geninin ifadesinin baskılanması sonucunda hücre canlılığında azalma olduğu MTT deneyleri ile belirlenmiştir. Transfeksiyondan hem 24, 48 ve 72 saat sonra gerçekleştirilen deneylerde NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre absorbans belirgin şekilde azalmıştır. Bu azalış hipoksik koşullarda daha belirgindir. HUVEC hücrelerinin invazyon ve koloni oluşturma yeteneğinde azalış olduğu çizik testi ve koloni formasyon deneyi ile belirlenmiştir. Koloni formasyon deneyine göre; Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren pKLO.TRC plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre koloni oluşturma yeteneklerinde azalış gözlemlenmiştir. Bu koloni oluşturma yeteneği hipoksizde daha çok azalmıştır. Çizik testi sonuçlarına göre; Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren pKLO.TRC plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb genini hedefleyen shRNA oligolarını içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre çizik atılan aralık kapanmamıştır. Bu kapanmama hipoksik koşullarda daha fazladır. Transfeksiyondan 24 saat sonra kontrol hücrelerde hiçbir aralık gözükmezken, normal ve hipoksik durumda belirgin bir şekilde aralık gözükmektedir. Bu sonuçlara bakılarak NONO/p54nrb geninin ifadesi baskılandığında HUVEC hücrelerinin hücresel karakterinde değişiklik olduğu saptanmıştır.

Hem aşırı ifade ve hem de NONO/p54nrb ve PSF seviyelerinin azaltılması hem kanser hem de primer insan hücrelerinin yaşlanmasına yol açmıştır. PSF eksikliği kromozom kırıkları ve fragmantasyona neden olurken, NONO/p54nrb veya PSF eksikliği DNA onarımını geciktirir [27].

Literatürdeki bu bilgilere bakılarak NONO/p54nrb geni HUVEC hücrelerinde aşırı ifade ettirilmiştir. Bu amaçla NONO/p54nrb geni pEGFP-C1 vektörüne klonlanıp, geçici transfeksiyon ile HUVEC hücrelerine aktarılmıştır. NONO/p54nrb geninin HUVEC hücrelerinde aşırı ifade olduğu mRNA seviyesinde Real-Time PCR ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerine göre; NONO/p54nrb geni içeren pEGFP-C1 vektörünün transfekte edildiği hücrelerde mRNA seviyesinde normoksida yaklaşık 3 kat, hipoksida yaklaşık 6 kat artış gözlemlenmiştir. NONO/p54nrb geninin HUVEC hücrelerinde aşırı ifade olduğu protein seviyesinde Western Bot deneyi ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerine göre; NONO/p54nrb geni içeren pEGFP-C1 vektörünün transfekte edildiği hücrelerde protein seviyesinde normoksida yaklaşık 1.5 kat, hipoksida yaklaşık 3 kat artış gözlemlenmiştir.

NONO/p54nrb geni HUVEC hücrelerinde aşırı ifade edildiğinde mRNA seviyesinde diğer paraspekle proteinler olan, paraspekle protein 1 (PSPC1), splicing factor proline and glutamine rich (PSF/SFPQ) ve kodlanmayan RNA, NEAT1, mRNA seviyelerinde normoksida 2 kat hipoksida 4 kat artış görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak NONO/p54nrb geni aşırı ifade olduğunda diğer DHBS protein ailesi üyeleri ve NEAT1 geninin bu aşırı ifade etkisinden etkilendiği söylenebilir.

Tez kapsamında gerçekleştirmiş olduğumuz NONO/p54nrb geninin aşırı ifade olması sonucunda hücre canlılığının normal hücrelere göre arttığı MTT deneyleri ile belirlenmiştir. Transfeksiyondan hem 24 saat hem de 48 saat sonra gerçekleştirilen deneylerde NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre absorbans artmıştır. Bu artış hipoksik koşullarda daha fazladır. 48 saatte NONO/p54nrb geni transfekte edilmiş hücrelerde kontrol grubuna göre %134 kat canlılık artmıştır, hipoksik durumda ise bu artış %160'tır. Sadece vektörün transfekte edildiği deney gruplarında hücre canlılığında azalış gözlemlenmiştir HUVEC hücrelerinin invazyon ve koloni oluşturma yeteneğinde artış olduğu çizik testi ve koloni formasyon deneyi ile belirlenmiştir. Koloni formasyon deneyine göre; Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb genini içeren EGFP-C1 plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte

edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha çok koloni gözlemlenmiştir. Bu artış hipoksik koşullarda daha fazladır. Çizik testi sonuçlarına göre; Kontrol, gen içermeyen plazmidin transfekte edildiği hücreler ve NONO/p54nrb genini içeren EGFP-C1 plazmitinin transfekte edildiği hücreler karşılaştırıldığında NONO/p54nrb geni içeren plazmidin transfekte edildiği deney gruplarında kontrol gruplarına göre çizik atılan aralık azalmıştır. Bu azalış hipoksik koşullarda daha fazladır. Bu sonuçlar, NONO/p54nrb geninin aşırı ifade edildiğinde HUVEC hücrelerinin hücresel karakterinde değişiklik olduğunu göstermektedir.

Anjiyogenez, oluşmuş kapillerden yeni kapiller damar oluşmasıdır. Embriyonik gelişim aşamasından, tümörleşmeye kadar fizyolojik ve patolojik birçok durumda gelişebilir ve doku hipoksisine adaptif cevap olarak meydana gelir [31]. Anjiyogenez büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı çok faktörlü bir olaydır [35].

Bu faktörler içerisinde en önemli olanı vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF). İlk bulunduğu vasküler endotelial permeabilite (geçirgenlik) faktörü (VEPF) olarak adlandırılan bu faktör günümüzde VEGF-A olarak adlandırılmaktadır. VEGF, 46 kDa ağırlığında, homodimerik ve heparine bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür. VEGF A, B, C, D, E, plasental büyüme faktörü (PIGF) ve VEGF-F adı verilen yedi alt grubu ve amino asit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF<sub>206</sub> olarak adlandırılan izoformları bulunmaktadır [36].

VEGF-A ve reseptörleri damar morfogenezinde görev almaktadır. VEGF-A sinyali, anjiyogenezin düzenlenmesi yoluyla embriyonik gelişimde çok önemli bir rol oynar. VEGF-A, endotelial hücrelerin proliferasyonu ve göçü, vasküler geçirgenlik gibi endotel yanıtının çoğunu düzenler. VEGF-A sinyali yetişkinlerde organ homeostazını da düzenler. Bir organ ciddi yaralanmaya maruz kalırsa, VEGF-A, organın yenilenme oranını artıran endotel hücrelerinden parakrin faktörlerin salınmasına neden olur. VEGF-A sinyallemesi ayrıca anjiyogenez ile ilgili hastalıkların, özellikle kanserin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. VEGF-A'yı bloke eden birçok ajan, tümörlerin büyümesinin ve metastatik yayılmasının inhibisyonu için faydalı araçlar olarak geliştirilmiş ve rapor edilmiştir [121].

VEGF gen ekspresyonunun düzenlenmesine katılan çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir. Bunlar arasında oksijen miktarının değişimi hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak önemli bir rol oynar. VEGF mRNA ekspresyonunun, çeşitli normal ve transforme edilen kültürlenmiş hücre tiplerinde düşük O<sub>2</sub>'ye maruz bırakılarak hızlı ve geri dönüşümlü olarak indüklendiği görülmüştür [122].

Birçok organizma hipoksik koşullara uyum sağlayacak mekanizmalar geliştirmiştir. Değişen oksijen seviyeleri, belirli homeostatik düzenleyici genlerin aktivasyonu veya baskılanması ile sonuçlanabilir ve değişen çevresel şartlarda hücre ve dokuların hayatta kalması sağlanır. Hipoksik şartlar tarafından aktive edilen HIF-1 geni bunlardan biridir ve doku büyümesi ile damarlanmayı kontrol etmek için diğer transkripsiyon faktörleri ve enzimlerle ilişkiye girebilmektedir [91, 92].

HIF-1'in biyolojik aktivitesi, HIF1- $\alpha$  alt biriminin ekspresyonu ve aktivitesi ile belirlenir. HIF1- $\alpha$  ekspresyonunun ve aktivitesinin *in vivo* düzenlenmesi, mRNA ekspresyonu, protein ekspresyonu, nükleer lokalizasyon ve transaktivasyon dahil olmak üzere birçok seviyede gerçekleşir. Bunlar arasında en yoğun olarak çalışılan, kararlı durumdaki HIF1- $\alpha$  protein seviyelerinin düzenlenmesi olmuştur. Hipoksik olmayan koşullar altında, HIF1- $\alpha$  'nın her yerde bulunduğu ve proteazomal bozunmaya maruz kaldığı görülmektedir. Hipoksi gibi, HIF1- $\alpha$  ekspresyonunu da indükleyen demir şelatörleri, HIF-1 $\alpha$ 'nın her yerde bulunmasını önler. Hipoksik hücrelerde HIF1- $\alpha$  'nın azalmış ubiquitinasyonu da gösterilmiştir [123].

Yapılan literatür çalışmalarına göre; NONO/p54nrb geni ile anjiyogenez arasındaki bağlantıyı hem normal hem de hipoksik koşullarda açıklayan herhangi bir çalışma yoktur. Bu verilere bakılarak bu tez çalışmasında HUVEC hücrelerinde NONO/p54nrb geninin anjiyogenezde en önemli düzenleyici olan VEGF sitokini uygulandığında ve hipoksi durumunda nasıl değiştiğini araştırdık.

Bu amaçla HUVEC hücreleri büyütülerek 25 cm<sup>2</sup> lik flaslara 2 milyon hücre/flask olacak şekilde sayılarak dağıtılmıştır. Ertesi gün kontrol grubu hariç tüm deney gruplarına 20 ng/ $\mu$ L olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. Hipoksi oluşturulacak deney gruplarına 150 mM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklenip kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. Belirli zaman aralıklarında tripsinizasyon ile elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonu ve protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar dan cDNA sentezi gerçekleştirilip gerekli kontroller yapıldıktan sonra Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. HUVEC hücre pelletlerinden yapılan protein ekstraksiyonu sonucunda western blot deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR sonuçlarına göre; normokside VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni mRNA seviyesinde artış olduğu görülmüştür. mRNA seviyesinde en çok artış VEGF uygulanmasından 24 ve 48 saat sonra pelleti alınmış HUVEC hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 2 kat olarak belirlenmiştir.

Ayrıca VEGF sitokini uygulamasının diğer paraspeckle üyesi proteinler ile kodlanmayan RNA olan NEAT1 mRNA seviyelerini nasıl etkilediği araştırılmıştır. HUVEC hücrelerine VEGF sitokini uygulandığında diğer paraspeckle proteinler olan, paraspeckle protein 1 (PSPC1), splicing factor proline and glutamine rich (PSF/SFPQ) ve kodlanmayan RNA, NEAT1, mRNA seviyelerinde artış görülmüştür. mRNA seviyelerinde en çok artış VEGF uygulanmasından 24 saat sonra pelleti alınmış HUVEC hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 2 kat olarak belirlenmiştir. Hipoksizde ise; VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni mRNA seviyesinde artış olduğu görülmüştür. mRNA seviyesinde en çok artış VEGF uygulanmasından 24 saat sonra pelleti alınmış HUVEC hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 5 kat olarak belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde hipoksik durumun gerçekleşip gerçekleşmediği HIF1- $\alpha$  mRNA seviyelerine bakılarak doğrulanmıştır. CoCl<sub>2</sub> uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre HIF1- $\alpha$  geni mRNA seviyesinde yaklaşık 5 kat artış olduğu görülmüştür.

Western Blot deneylerine göre; normoksizde VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni protein seviyesinde artış olduğu görülmüştür. Protein seviyesinde en çok artış VEGF uygulanmasından 24 saat sonra pelleti alınmış HUVEC hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 2.5 kat olarak belirlenmiştir. Hipoksizde ise; VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni protein seviyesinde artış olduğu görülmüştür. Protein seviyesinde en çok artış VEGF uygulanmasından 48 saat sonra pelleti alınmış HUVEC hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 3.5 kat olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara bakılarak; VEGF sitokininin NONO/p54nrb ve diğer paraspeckle üyeleri üzerinde arttırıcı bir düzenleyici olduğu görülmektedir. Buna ek olarak paraspeckle genlerinin ekspresyon seviyeleri hipoksi ile daha da artış göstermektedir. Bu veriler anjiyogenezin en önemli düzenleyicisi olan VEGF sitokini ve hipoksinin paraspeckle genlerinin ekspresyonunu arttırdığından paraspeckle genlerin anjiyogenez ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir.

Sheng-Yi Lin ve arkadaşları, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücresi (NSCLC) hattında NONO/p54nrb fonksiyonunu ve NONO/p54nrb promoterinin transkripsiyonel regülasyonunu karakterize etmek için. NONO/p54nrb transkripsiyon başlangıç bölgesini bulmuştur ve -1671/+1261 (2952 bç) NONO/p54nrb promotorunu PCR teknolojisini klonlamışlardır. Daha sonra p54nrb promoter 5' ucunun delesyonu ile lusiferaz reporter deneyi ile NONO/p54nrb promoter bölgesini analiz etmişlerdir. Lusiferaz deneyi

sonuçlarına göre, NONO/p54nrb promotör + 311/+ 414 fragmanında önemli bir düzenleme bölgesi olduğunu göstermişlerdir. NONO/p54nrb +109/+203 promotör bölgesinin delesyonu, lusiferaz aktivitesinin bir kısmının azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir [124].

Uzman Biyolog Sevgi Baysal tarafından gerçekleştirilen tez çalışmasında NONO/p54nrb promotörünün 1259 bç'lik bölgesi kullanılarak (-730/+529 bç) NONO/p54nrb promotöründe delesyonlar meydana getirilmiştir. Delesyon ile oluşturulan promotör parçaları PC3 hücrelerine geçici transfeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Promotör parçalarının bazal aktivitesi belirlenmiştir. NONO/p54nrb 730/+529 ve -516/+529 promotör parçalarının bazal aktivitesinin diğer parçalara göre fazla olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak transfeksiyondan sonraki 48. saatte hipoksik durumda promotör fragmentlerinin aktivitesi normal koşullar ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu veriler ışığında HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünün NONO/p54nrb promotörüyle ilişkisi olabileceği düşünülmüştür ve HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi analizi EMSA deneyleri ile yapılmıştır. EMSA deneyleri ile HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörünün NONO/p54nrb promotör bölgesine bağlandığı doğrulanmıştır [120].

Literatür analizine göre; HUVEC hücrelerine VEGF sitokini uygulandığında promotör aktivitesinin nasıl değiştiği bilinmemektedir. Bu tez kapsamında Uzman Biyolog Sevgi Baysal tarafından klonlanan promotör parçaları **P1: -730/+529, P2: -516/+529, P3: -336/+529 ve P4: -159/+529** HUVEC hücrelerine kalsiyum fosfat geçici transfeksiyon yoluyla transfekte edilmiştir. Daha sonra HUVEC hücrelerine 20 ng/ $\mu$ L olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. Promotör parçalarının bazal aktivitesi ve VEGF sitokini ile regülasyonun belirlenmesi için lusiferaz reporter deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlere göre en küçük promotör bölgesinden en büyük promotör parçasına doğru karşılaştırıldığında bazal aktivitenin en büyük promotör bölgesi olan P1: -730/+529 bölgesinde en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bazal aktiviteler bu sonuçlarla doğru orantılı olarak hipoksik durumda daha da artmış olduğu görülmüştür. Promotör parçalarının transfekte edildiği hücrelere VEGF sitokini uygulanıp lusiferaz reporter deneyleri yapıldığında VEGF sitokini uygulanan hücrelerdeki lusiferaz aktivitesinin bazal aktiviteye göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Hipoksi durumunda ise benzer veriler elde edilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak; NONO/p54nrb promotörünün VEGF sitokini ve hipoksi ile düzenlendiği düşünülmüştür. HUVEC hücrelerinde NONO/p54nrb geninin promotör bölgesi ile HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü ve VEGF sitokini etkileşim halinde olabilir.

VEGF'nin *in vitro* ve *in vivo* modellerde birkaç endotel hücresinde hayatta kalmayı desteklediği gösterilmiştir. *In vitro*'da, VEGF'nin PI3K-Akt yolunu aktive ederek apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. VEGF, endotel hücreleri için bir mitojendir. Endotel hücre proliferasyonu, MAP kinaz ailesinin bir üyesi olan JNK/SAPK'ye ek olarak hücre dışı kinazlar Erk1/2'nin VEGFR-2 aracılı aktivasyonunu içerir. VEGF'nin artan endotel hücre göçüne yol açtığı hücre içi mekanizmaları aktin filaman organizasyonuna ve ayrıca p38 MAPK ile indüklenen aktin yeniden organizasyonuna yol açan FAK ile ilişkili sinyalleme içerir [125].

Literatür çalışmalarına göre VEGF sitokini birçok hücre içi sinyal yollağı ile birlikte çalışmaktadır. Bu verilerin ışığında yapılan tez çalışmasında PI3K yollağı inhibitörü olarak wortmannin, MEK yollağı inhibitörü, p38 MAPK inhibitörü olarak PD169125 ve JNK yollağı inhibitörü olarak SP600 kullanılarak NONO/p54nrb geninin VEGF yollağı ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla HUVEC hücreleri büyütülerek 25 cm<sup>2</sup> lik flaslara 2 milyon hücre/flask olacak şekilde sayılarak paylaştırılmıştır. Ertesi gün kontrol grubu ve sadece sitokin uygulanacak hücreler hariç diğer flaslara inhibitörler uygulanmış (JNK (20 µM), PD169 (20 µM), WORTMANNIN( 2µM), MEK (20 µM)) 45 dk.dk.. beklenip ardından kontrol grubu hariç tüm deney gruplarına 20 ng/µL olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. Hipoksi oluşturulacak deney gruplarına 150 mM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklenip kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. VEGF sitokini uygulamasından 6 saat sonra tripsinizasyon ile elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonu ve protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar dan cDNA sentezi gerçekleştirilip gerekli kontroller yapıldıktan sonra Real Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. HUVEC hücre pelletlerinden yapılan protein ekstraksiyonu sonucunda westernblot deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR sonuçlarına göre; normoksida VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni mRNA seviyesinde artış olduğu görülmüştür. İnhibitör ve VEGF sitokininin birlikte uygulandığı deney gruplarında kontrol ve yalnızca VEGF sitokini uygulanan deney gruplarına göre NONO/p54nrb mRNA seviyesinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Hipoksida ise; VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni mRNA seviyesinde artış olduğu görülmüştür. İnhibitör ve VEGF sitokininin birlikte uygulandığı deney gruplarında kontrol ve yalnızca VEGF sitokini uygulanan deney gruplarına göre

NONO/p54nrb mRNA seviyesinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Bu azalış normoksiye göre daha belirgindir.

Western Blot deneylerine göre; normokside VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni protein seviyesinde artış olduğu görülmüştür. İnhibitör ve VEGF sitokininin birlikte uygulandığı deney gruplarında kontrol ve yalnızca VEGF sitokini uygulanan deney gruplarına göre NONO/p54nrb protein seviyesinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Hipoksizde ise; VEGF sitokini uygulanmış HUVEC hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre NONO/p54nrb geni protein seviyesinde artış olduğu görülmüştür. İnhibitör ve VEGF sitokininin birlikte uygulandığı deney gruplarında kontrol ve yalnızca VEGF sitokini uygulanan deney gruplarına göre NONO/p54nrb protein seviyesinde belirgin bir azalış gözlemlenmiştir. Bu azalış normoksiye göre daha belirgindir.

Bu verilere göre; NONO/p54nrb geninin VEGF sinyal yolağında PI3K yolağı, MEK yolağı, p38 MAPK ve JNK yolağı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu ilişki Real Time PCR ve Western blot deneyleri ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlara bakılarak endotelial bir hücre hattı olan HUVEC hücre hattında NONO/p54nrb geninin hücre sağkalımı, hücre poliferasyonu, hücre göçü ve anjiyogenez gibi hücrel süreçlerde görev aldığı düşünülmektedir.

Bu verilere göre NONO/p54nrb promotörünün VEGF yolağı ile ilişkisi merak konusu olmuştur. Bu amaçla tez kapsamında Uzman Biyolog Sevgi Baysal tarafından klonlanan promotör parçaları **P1: -730/+529**, **P2: -516/+529**, **P3: -336/+529** ve **P4: -159/+529** HUVEC hücrelerine kalsiyum fosfat geçici transfeksiyon yoluyla transfekte edilmiştir. Ertesi gün kontrol grubu ve sadece sitokin uygulanacak hücreler hariç diğer flasklara inhibitörler uygulanmış (JNK(20 µM), PD169 (20 µM), WORTMANNIN (2 µM), MEK(20 µM)) 45 dk.dk.. beklenip ardından kontrol grubu hariç tüm deney gruplarına 20 ng/µL olacak şekilde VEGF sitokini uygulanmıştır. Hipoksi oluşturulacak deney gruplarına 150 mM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklenip kimyasal hipoksi oluşturulmuştur. Sitokin uygulanmasından 6 sa. sonra hücre medyumları toplanıp VEGF yolağı ile promotör fragmanlarının ilişkisinin belirlenmesi için lusiferaz reporter deneyleri gerçekleştirilmiştir. VEGF sitokini uygulanan hücrelerdeki lusiferaz aktivitesinin bazal aktiviteye göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık inhibitörlerin uygulandığı deney gruplarında kontrol ve sadece VEGF sitokini uygulanan gruba göre dört promotör parçasında da lusiferaz aktivitesinde azalış gözlemlenmiştir. Hipoksi durumunda ise benzer veriler elde edilmiştir.



Bu sonuçlara göre; NONO/p54nrb geni promotorunun VEGF yolağı ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. VEGF yolağı pek çok yönden inhibe edildiğinde promotor aktivitesinde de azalma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak endotelial bir hücre hattı olan HUVEC hücre hatında NONO/p54nrb geninin hücre sağkalımı, hücre poliferasyonu, hücre göçü ve anjiyogenez gibi hücreyel süreçlerde görev aldığı düşünölmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla ilk defa NONO/p54nrb geninin anjiyogenez ile ilişkisi aydınlatılmıştır. NONO/p54 nrb geninin ve diğler paraspeckle üyelerinin anjiyogenezin en önemli regölatörleri olan VEGF sitokini ve hipoksi ile ilişkili olduğu ilk defa bu çalışmada doğrulanmıştır. Ayrıca NONO/p54nrb promotorunun da VEGF yolağı ve hipoksi ile ilişkili olduğu lüsiferaz reporter deneyleri ile doğrulanmıştır. Ek olarak NONO/p54nrb geninin paraspeckle genleri için önemli ve gerekli olduğu NONO/p54nrb ifadesinin baskılanmasından veya aşırı ekspresyonundan diğler paraspeckle genlerinin de etkilendiğı ilk defa bu tez çalışmasında overekspresyon ve knockdown deneyleri ile doğrulanmıştır. Buna ek olarak overekspresyon ve knockdown deneyleri ile NONO/p54nrb geninin hücre sağkalımı, poliferasyonu, göçü gibi hücreyel süreçlerde rol oynadığı gözlemlenmiştir. Tüm bu çalışmalar NONO/p54nrb geninin anjiyogenezde önemli bir rolü olduğunu ve kanserleşme sürecinde görev aldığını göstermiştir. Bu verilerin daha ileri kanser araştırmalarında araştırmacılara ışık tutacağı öngörülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] C. S. Bond and A. H. Fox, "Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 186, no. 5, pp. 637-44, Sep 7 2009.
- [2] J. E. Wilusz, H. Sunwoo, and D. L. Spector, "Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world," (in eng), *Genes Dev*, vol. 23, no. 13, pp. 1494-504, Jul 1 2009.
- [3] S. Souquere, G. Beauclair, F. Harper, A. Fox, and G. Pierron, "Highly ordered spatial organization of the structural long noncoding NEAT1 RNAs within paraspeckle nuclear bodies," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 21, no. 22, pp. 4020-7, Nov 15 2010.
- [4] L. L. Chen and G. G. Carmichael, "Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA," (in eng), *Mol Cell*, vol. 35, no. 4, pp. 467-78, Aug 28 2009.
- [5] T. Hirose *et al.*, "NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 25, no. 1, pp. 169-83, Jan 2014.
- [6] C. Adriaens and J. C. Marine, "NEAT1-containing paraspeckles: Central hubs in stress response and tumor formation," (in eng), *Cell Cycle*, vol. 16, no. 2, pp. 137-138, Jan 17 2017.
- [7] S. Nakagawa *et al.*, "The lncRNA *Neat1* is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice," *Development*, vol. 141, no. 23, pp. 4618-4627, 2014.
- [8] T. Yamazaki *et al.*, "Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation," (in eng), *Mol Cell*, vol. 70, no. 6, pp. 1038-1053.e7, Jun 21 2018.
- [9] B. Dong, D. S. Horowitz, R. Kobayashi, and A. R. Krainer, "Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 21, no. 17, pp. 4085-92, Aug 25 1993.
- [10] NCBI. (14-Feb-2021). *NONO non-POU domain containing octamer binding [ Homo sapiens (human) ]*.

- [11] J. Y. Lu and M. B. Sewer, "NONO/p54nrb regulates cyclic AMP-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mRNA splicing and degradation," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 35, no. 7, pp. 1223-37, Apr 2015.
- [12] S. Kaneko, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, and J. L. Manley, "The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination," (in eng), *Genes Dev*, vol. 21, no. 14, pp. 1779-89, Jul 15 2007.
- [13] H. Izumi, A. McCloskey, K. Shinmyozu, and M. Ohno, "NONO/p54nrb and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 42, no. 6, pp. 3998-4007, Apr 2014.
- [14] L. Liu *et al.*, "Consensus PP1 binding motifs regulate transcriptional corepression and alternative RNA splicing activities of the steroid receptor coregulators, p54nrb and PSF," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 25, no. 7, pp. 1197-210, Jul 2011.
- [15] D. H. Pham *et al.*, "Protocadherin 19 (PCDH19) interacts with paraspeckle protein NONO to co-regulate gene expression with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )," (in eng), *Hum Mol Genet*, vol. 26, no. 11, pp. 2042-2052, Jun 1 2017.
- [16] K. Ishitani, T. Yoshida, H. Kitagawa, H. Ohta, S. Nozawa, and S. Kato, "p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 306, no. 3, pp. 660-5, Jul 4 2003.
- [17] X. Dong, J. Sweet, J. R. Challis, T. Brown, and S. J. Lye, "Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA splicing factors, PSF and p54nrb," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 13, pp. 4863-75, Jul 2007.
- [18] E. Petti *et al.*, "SFPQ and NONO suppress RNA:DNA-hybrid-related telomere instability," (in eng), *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 1001, Mar 1 2019.
- [19] A. L. Amelio *et al.*, "A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 51, pp. 20314-9, Dec 18 2007.
- [20] X. Dong, C. Yu, O. Shynlova, J. R. Challis, P. S. Rennie, and S. J. Lye, "p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gja1)," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 23, no. 8, pp. 1147-60, Aug 2009.

- [21] N. Ainaoui *et al.*, "Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation," (in eng), *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0136466, 2015.
- [22] Z. Zhu *et al.*, "p54(nrb)/NONO regulates lipid metabolism and breast cancer growth through SREBP-1A," (in eng), *Oncogene*, vol. 35, no. 11, pp. 1399-410, Mar 17 2016.
- [23] C. St Gelais, J. Roger, and L. Wu, "Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein Negatively Regulates HIV-1 Infection in CD4(+) T Cells," (in eng), *AIDS Res Hum Retroviruses*, vol. 31, no. 8, pp. 806-16, Aug 2015.
- [24] E. Kowalska *et al.*, "NONO couples the circadian clock to the cell cycle," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 5, pp. 1592-9, Jan 29 2013.
- [25] Z. Ren *et al.*, "Decreased expression of P54(nrb) /NonO correlates with collagen deposition and fibrosis in human aortic dissection," (in eng), *Histopathology*, vol. 65, no. 4, pp. 570-80, Oct 2014.
- [26] L. Alfano *et al.*, "NONO regulates the intra-S-phase checkpoint in response to UV radiation," (in eng), *Oncogene*, vol. 35, no. 5, pp. 567-76, Feb 4 2016.
- [27] C. J. Huang, U. Das, W. Xie, M. Ducasse, and H. O. Tucker, "Altered stoichiometry and nuclear delocalization of NonO and PSF promote cellular senescence," (in eng), *Aging (Albany NY)*, vol. 8, no. 12, pp. 3356-3374, Dec 13 2016.
- [28] S. S. Desai, S. S. Kharade, V. I. Parekh, S. Iyer, and S. K. Agarwal, "Pro-oncogenic Roles of HLXB9 Protein in Insulinoma Cells through Interaction with Nono Protein and Down-regulation of the c-Met Inhibitor Cblb (Casitas B-lineage Lymphoma b)," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 290, no. 42, pp. 25595-608, Oct 16 2015.
- [29] D. Hof, K. Cheung, H. E. Roossien, G. J. Pruijn, and J. M. Raats, "A novel subtractive antibody phage display method to discover disease markers," (in eng), *Mol Cell Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 245-55, Feb 2006.
- [30] M. Hallier, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin, "The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 271, no. 19, pp. 11177-81, May 10 1996.
- [31] V. Djonov, O. Baum, and P. H. Burri, "Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis," *Cell and Tissue Research*, vol. 314, no. 1, pp. 107-117, 2003/10/01 2003.

- [32] M. E. Daly, A. Makris, M. Reed, and C. E. Lewis, "Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment?," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 95, no. 22, pp. 1660-73, Nov 19 2003.
- [33] P. Carmeliet, "Angiogenesis in health and disease," (in eng), *Nat Med*, vol. 9, no. 6, pp. 653-60, Jun 2003.
- [34] G. M. ERDEM F., "ANGIOGENESIS AND ANTIANGIOGENIC THERAPY " *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 37, pp. 1-6, 2005.
- [35] T. M. S. Konukoğlu D., "ANJİYOGENEZİN TEMEL MOLEKÜLER MEKANİZMALARI VE TÜMÖR ANJİYOGENEZİ," *CERRAHPAŞA TIP DERGİSİ*, vol. 36, pp. 42-48, 2005.
- [36] M. Clauss, F. Pipp, K. Issbrücker, H. Weich, M. Heil, and W. Schaper, "Dissection of monocyte and endothelial activities by using VEGF-receptor specific ligands," (in eng), *Adv Exp Med Biol*, vol. 522, pp. 75-82, 2003.
- [37] A. Saaristo, T. Karpanen, and K. Alitalo, "Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis," (in eng), *Oncogene*, vol. 19, no. 53, pp. 6122-9, Dec 11 2000.
- [38] E. Y. Soh *et al.*, "Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines," (in eng), *Surgery*, vol. 120, no. 6, pp. 944-7, Dec 1996.
- [39] J. L. Shifren, S. Mesiano, R. N. Taylor, N. Ferrara, and R. B. Jaffe, "Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 83, no. 4, pp. 1342-7, Apr 1998.
- [40] D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, and H. F. Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," (in eng), *Science*, vol. 219, no. 4587, pp. 983-5, Feb 25 1983.
- [41] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom, and E. A. De Bruijn, "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis," (in eng), *Pharmacol Rev*, vol. 56, no. 4, pp. 549-80, Dec 2004.
- [42] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 25, no. 4, pp. 581-611, Aug 2004.

- [43] H. Takahashi and M. Shibuya, "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions," (in eng), *Clin Sci (Lond)*, vol. 109, no. 3, pp. 227-41, Sep 2005.
- [44] B.-H. D. Duffy AM, Harmey JH. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF [Online].
- [45] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," (in eng), *Faseb j*, vol. 13, no. 1, pp. 9-22, Jan 1999.
- [46] S. Koch and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 7, p. a006502, Jul 2012.
- [47] L. S. Rosen, "Clinical Experience with Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers," *Cancer Control*, vol. 9, no. 2\_suppl, pp. 36-44, 2002.
- [48] Y. Yamazaki and T. Morita, "Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors," (in eng), *Mol Divers*, vol. 10, no. 4, pp. 515-27, Nov 2006.
- [49] N. Krishnamoorthy, T. Oriss, M. Paglia, M. Fei, A. Ray, and P. Ray, "A critical role for VEGF secreted by Dendritic cells (DCs) in priming T helper 2 (Th2) development in response to specific stimuli," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. S1, pp. 670.8-670.8, 2008.
- [50] A. Klettner, D. Westhues, J. Lassen, S. Bartsch, and J. Roeder, "Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures: p38, nuclear factor  $\kappa$ B, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway," (in eng), *Mol Vis*, vol. 19, pp. 281-91, 2013.
- [51] J. J. Wang, M. Zhu, and Y. Z. Le, "Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy," (in eng), *World J Diabetes*, vol. 6, no. 5, pp. 726-33, Jun 10 2015.
- [52] J. P. Maloney and L. Gao, "Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells," (in eng), *Mediators Inflamm*, vol. 2015, p. 387842, 2015.

- [53] A. Raza, M. J. Franklin, and A. Z. Dudek, "Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis," (in eng), *Am J Hematol*, vol. 85, no. 8, pp. 593-8, Aug 2010.
- [54] A. Ishida *et al.*, "Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 188, no. 3, pp. 359-68, Sep 2001.
- [55] T. Arcondéguy, E. Lacazette, S. Millevoi, H. Prats, and C. Touriol, "VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. 17, pp. 7997-8010, Sep 2013.
- [56] M. Tjwa, A. Luttun, M. Autiero, and P. Carmeliet, "VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis," (in eng), *Cell Tissue Res*, vol. 314, no. 1, pp. 5-14, Oct 2003.
- [57] A. R. Medford *et al.*, "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) isoform expression and activity in human and murine lung injury," (in eng), *Respir Res*, vol. 10, no. 1, p. 27, Apr 9 2009.
- [58] Y. S. Ng, D. Krilleke, and D. T. Shima, "VEGF function in vascular pathogenesis," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 312, no. 5, pp. 527-37, Mar 10 2006.
- [59] G. Niu and X. Chen, "Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy," (in eng), *Curr Drug Targets*, vol. 11, no. 8, pp. 1000-17, Aug 2010.
- [60] M. Shibuya, "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies," (in eng), *Genes Cancer*, vol. 2, no. 12, pp. 1097-105, Dec 2011.
- [61] M. Shibuya, "Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis," (in eng), *J Biochem Mol Biol*, vol. 39, no. 5, pp. 469-78, Sep 30 2006.
- [62] X. Li *et al.*, "VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor?," (in eng), *Cell Adh Migr*, vol. 3, no. 4, pp. 322-7, Oct-Dec 2009.
- [63] A. Khaliq *et al.*, "Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta," (in eng), *Growth Factors*, vol. 13, no. 3-4, pp. 243-50,color plates I-II,pre.bk cov, 1996.

- [64] D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M. G. Persico, "Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 20, pp. 9267-71, Oct 15 1991.
- [65] H. Oura, J. Bertoncini, P. Velasco, L. F. Brown, P. Carmeliet, and M. Detmar, "A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation," (in eng), *Blood*, vol. 101, no. 2, pp. 560-7, Jan 15 2003.
- [66] N. K. Binder, J. Evans, L. A. Salamonsen, D. K. Gardner, T. J. Kaitu'u-Lino, and N. J. Hannan, "Placental Growth Factor Is Secreted by the Human Endometrium and Has Potential Important Functions during Embryo Development and Implantation," (in eng), *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0163096, 2016.
- [67] S. De Falco, "The discovery of placenta growth factor and its biological activity," (in eng), *Exp Mol Med*, vol. 44, no. 1, pp. 1-9, Jan 31 2012.
- [68] P. Carmeliet *et al.*, "Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions," (in eng), *Nat Med*, vol. 7, no. 5, pp. 575-83, May 2001.
- [69] T. Kärpänen *et al.*, "Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors," (in eng), *Faseb j*, vol. 20, no. 9, pp. 1462-72, Jul 2006.
- [70] D. I. Holmes and I. Zachary, "The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease," (in eng), *Genome Biol*, vol. 6, no. 2, p. 209, 2005.
- [71] L. M. Wise *et al.*, "Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 278, no. 39, pp. 38004-14, Sep 26 2003.
- [72] S. Ogawa, A. Oku, A. Sawano, S. Yamaguchi, Y. Yazaki, and M. Shibuya, "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 273, no. 47, pp. 31273-82, Nov 20 1998.
- [73] M. Meyer *et al.*, "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases," (in eng), *Embo j*, vol. 18, no. 2, pp. 363-74, Jan 15 1999.



- [74] A. K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh, "VEGF receptor signalling - in control of vascular function," (in eng), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, no. 5, pp. 359-71, May 2006.
- [75] S. Brouillet *et al.*, "Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells," (in eng), *Mol Biol Cell*, vol. 21, no. 16, pp. 2832-43, Aug 15 2010.
- [76] M. Samson, F. V. Peale, Jr., G. Frantz, N. Rioux-Leclercq, E. Rajpert-De Meyts, and N. Ferrara, "Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 89, no. 8, pp. 4078-88, Aug 2004.
- [77] A. S. Corlan, A. M. Cîmpean, A. A. Jitariu, E. Melnic, and M. Raica, "Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor/Prokineticin-1 in Cancer Development and Tumor Angiogenesis," (in eng), *Int J Endocrinol*, vol. 2017, p. 3232905, 2017.
- [78] J. LeCouter *et al.*, "Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium," (in eng), *Nature*, vol. 412, no. 6850, pp. 877-84, Aug 30 2001.
- [79] N. Alfaidy *et al.*, "The multiple roles of EG-VEGF/PROK1 in normal and pathological placental angiogenesis," (in eng), *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 451906, 2014.
- [80] P. Hoffmann, J.-J. Feige, and N. Alfaidy, "Expression and Oxygen Regulation of Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor/Prokineticin-1 and Its Receptors in Human Placenta during Early Pregnancy," *Endocrinology*, vol. 147, no. 4, pp. 1675-1684, 2006.
- [81] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen," (in eng), *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1306-9, Dec 8 1989.
- [82] E. Tischer *et al.*, "Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 165, no. 3, pp. 1198-206, Dec 29 1989.
- [83] M. W. Kieran, R. Kalluri, and Y. J. Cho, "The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 12, p. a006593, Dec 1 2012.

- [84] Y. Cao, "Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands," (in eng), *Sci Signal*, vol. 2, no. 59, p. re1, Feb 24 2009.
- [85] H. F. Dvorak, "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy," (in eng), *J Clin Oncol*, vol. 20, no. 21, pp. 4368-80, Nov 1 2002.
- [86] C. Fischer, M. Mazzone, B. Jonckx, and P. Carmeliet, "FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?," (in eng), *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 942-56, Dec 2008.
- [87] T. Tammela and K. Alitalo, "Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise," (in eng), *Cell*, vol. 140, no. 4, pp. 460-76, Feb 19 2010.
- [88] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," (in eng), *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 298-307, May 19 2011.
- [89] Y. Zhao and A. A. Adjei, "Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor," (in eng), *Oncologist*, vol. 20, no. 6, pp. 660-73, Jun 2015.
- [90] KEGG. VEGF signaling pathway [Online]. Available: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ngi04370](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ngi04370)
- [91] P. Carmeliet *et al.*, "Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis," (in eng), *Nature*, vol. 394, no. 6692, pp. 485-90, Jul 30 1998.
- [92] K. R. Laderoute *et al.*, "5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 14, pp. 5336-47, Jul 2006.
- [93] G. L. Wang and G. L. Semenza, "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 268, no. 29, pp. 21513-8, Oct 15 1993.
- [94] G. L. Semenza, "Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1," (in eng), *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 15, pp. 551-78, 1999.
- [95] S. Patiar and A. L. Harris, "Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer therapy target," (in English), *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer*, vol. 13, no. Supplement\_1, p. S61, 01 Dec. 2006 2006.
- [96] G. L. Semenza, "Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents," (in eng), *Drug Discov Today*, vol. 12, no. 19-20, pp. 853-9, Oct 2007.

- [97] J. Paez and W. R. Sellers, "PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling," (in eng), *Cancer Treat Res*, vol. 115, pp. 145-67, 2003.
- [98] R. K. Bruick and S. L. McKnight, "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF," (in eng), *Science*, vol. 294, no. 5545, pp. 1337-40, Nov 9 2001.
- [99] A. C. Epstein *et al.*, "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation," (in eng), *Cell*, vol. 107, no. 1, pp. 43-54, Oct 5 2001.
- [100] P. Jaakkola *et al.*, "Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation," (in eng), *Science*, vol. 292, no. 5516, pp. 468-72, Apr 20 2001.
- [101] F. Yu, S. B. White, Q. Zhao, and F. S. Lee, "HIF-1 $\alpha$  binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 17, pp. 9630-5, Aug 14 2001.
- [102] M. E. Cockman *et al.*, "Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 33, pp. 25733-41, Aug 18 2000.
- [103] P. C. Mahon, K. Hirota, and G. L. Semenza, "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity," (in eng), *Genes Dev*, vol. 15, no. 20, pp. 2675-86, Oct 15 2001.
- [104] B. H. Jiang, G. L. Semenza, C. Bauer, and H. H. Marti, "Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension," (in eng), *Am J Physiol*, vol. 271, no. 4 Pt 1, pp. C1172-80, Oct 1996.
- [105] J. W. Jeong *et al.*, "Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation," (in eng), *Cell*, vol. 111, no. 5, pp. 709-20, Nov 27 2002.
- [106] B. H. Jiang, J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe, and G. L. Semenza, "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 272, no. 31, pp. 19253-60, Aug 1 1997.
- [107] S. A. Dames, M. Martinez-Yamout, R. N. De Guzman, H. J. Dyson, and P. E. Wright, "Structural basis for Hif-1  $\alpha$  /CBP recognition in the cellular hypoxic response," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 8, pp. 5271-6, Apr 16 2002.
- [108] W. C. Hon *et al.*, "Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1  $\alpha$  by pVHL," (in eng), *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 975-8, Jun 27 2002.

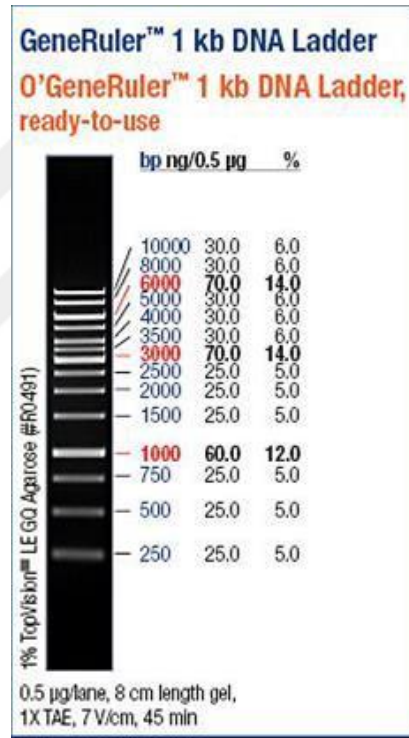
- [109] G. L. Semenza, "Targeting HIF-1 for cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 10, pp. 721-732, 2003/12/01 2003.
- [110] N. Calapoglu, "Hipoksiye Karşı Hücreyel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 Regulator of Cellular Response to Hypoxia," *Smyrna Tıp Dergisi*, pp. 48-53, 2016 .
- [111] Z. Zhang, J. Yan, Y. Chang, S. ShiDu Yan, and H. Shi, "Hypoxia inducible factor-1 as a target for neurodegenerative diseases," (in eng), *Curr Med Chem*, vol. 18, no. 28, pp. 4335-43, 2011.
- [112] K. S. Hewitson, L. A. McNeill, and C. J. Schofield, "Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer," (in eng), *Curr Pharm Des*, vol. 10, no. 8, pp. 821-33, 2004.
- [113] A. Borcar, M. A. Menze, M. Toner, and S. C. Hand, "Metabolic preconditioning of mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase," (in eng), *Cell Tissue Res*, vol. 351, no. 1, pp. 99-106, Jan 2013.
- [114] K. Salnikow, S. P. Donald, R. K. Bruick, A. Zhitkovich, J. M. Phang, and K. S. Kasprzak, "Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 279, no. 39, pp. 40337-44, Sep 24 2004.
- [115] J. Muñoz-Sánchez and M. E. Cháñez-Cárdenas, "The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model," (in eng), *J Appl Toxicol*, vol. 39, no. 4, pp. 556-570, Apr 2019.
- [116] D. E. Post and E. G. Van Meir, "A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy," (in eng), *Oncogene*, vol. 22, no. 14, pp. 2065-72, Apr 10 2003.
- [117] N. J. Edin, D. R. Olsen, J. A. Sandvik, E. Malinen, and E. O. Pettersen, "Low dose hyper-radiosensitivity is eliminated during exposure to cycling hypoxia but returns after reoxygenation," (in eng), *Int J Radiat Biol*, vol. 88, no. 4, pp. 311-9, Apr 2012.
- [118] M. A. Esteban and P. H. Maxwell, "Manipulation of oxygen tensions for in vitro cell culture using a hypoxic workstation," (in eng), *Expert Rev Proteomics*, vol. 2, no. 3, pp. 307-14, Jun 2005.
- [119] R. Wang, F. Jin, and H. Zhong, "A novel experimental hypoxia chamber for cell culture," (in eng), *Am J Cancer Res*, vol. 4, no. 1, pp. 53-60, 2014.

- [120] S. Baysal, "NONO/p54nrb promotorunun klonlanması ve fonksiyonel analizi," Yüksek Lisans, Biyoloji, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 2016.
- [121] K. Matsumoto and M. Ema, "Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours," *The Journal of Biochemistry*, vol. 156, no. 1, pp. 1-10, 2014.
- [122] N. Ferrara and T. Davis-Smyth, "The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor," *Endocrine Reviews*, vol. 18, no. 1, pp. 4-25, 1997.
- [123] G. L. Semenza, "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia," (in eng), *J Appl Physiol (1985)*, vol. 88, no. 4, pp. 1474-80, Apr 2000.
- [124] S.-Y. Lin *et al.*, "Abstract 749: Characterization of NONO/p54nrb promoter in NSCLC," *Cancer Research*, vol. 73, no. 8 Supplement, pp. 749-749, 2013.
- [125] D. J. Hicklin and L. M. Ellis, "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis," (in eng), *J Clin Oncol*, vol. 23, no. 5, pp. 1011-27, Feb 10 2005.

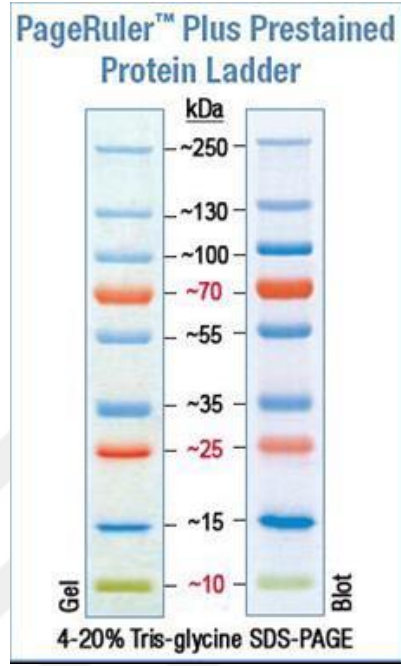


# EKLER

## EK A Kullanılan Büyüklük Markerları



Şekil. A.1. Thermo 1 kb DNA ladderı.



**Şekil. A.2.** PageRuler Prestained Protein ladderi.



## EK B Sekans Sonuçları

### B.1 p GEMT- easy Plazmidi Sekans Sonuçları

Homo sapiens non-POU domain containing octamer binding (NONO), transkript varyant 3, mRNA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1507 bits(1670)	0.0	898/926(97%)	13/926(1%)	Plus/Plus
Query 53	AAATGCAGAGTAATAAAACTTTTAACTTGGAGAAGCGAAACCATACTCCAAGAAAGCATC	112		
Sbjct 538	AAATGCAGAGTAATAAAACTTTTAACTTGGAGAAGCAAAACCATACTCCAAGAAAGCATC	597		
Query 113	ATCAACATCACCACCAGCAGCAGCACCACCAGCAGCAACAGCAGCAGCCACCACCACCGC	172		
Sbjct 598	ATCAACATCACCACCAGCAGCAGCACCACCAGCAGCAACAGCAGCAGCCGCCACCACCGC	657		
Query 173	CAATACCTGCAAATGGGCAACAGGCCAGCAGCCAAAATGAAGGCTTGACTATTGACCTGA	232		
Sbjct 658	CAATACCTGCAAATGGGCAACAGGCCAGCAGCCAAAATGAAGGCTTGACTATTGACCTGA	717		
Query 233	AGAATTTTAGAAAACCAGGAGAGAAGACCTTCACCCAACGAAGCCGTCTTTTGTGGGAA	292		
Sbjct 718	AGAATTTTAGAAAACCAGGAGAGAAGACCTTCACCCAACGAAGCCGTCTTTTGTGGGAA	777		
Query 293	ATCTTCCTCCCGACATCACTGAGGAAGAAATGAGGAAACTATTTGAGAAATATGGAAAGG	352		
Sbjct 778	ATCTTCCTCCCGACATCACTGAGGAAGAAATGAGGAAACTATTTGAGAAATATGGAAAGG	837		
Query 353	CAGGCGAAGTCTTCATTCATAAGGATAAAGGATTTGGCTTTATCCGCTTGAAACCCGAA	412		
Sbjct 838	CAGGCGAAGTCTTCATTCATAAGGATAAAGGATTTGGCTTTATCCGCTTGAAACCCGAA	897		

Query 413 CCCTAGCGGAGATTGCCAAAGTGGAGCTGGACAATATGCCACTCCGTGGAAAGCAGCTGC 472  
 |||  
 Sbjct 898 CCCTAGCGGAGATTGCCAAAGTGGAGCTGGACAATATGCCACTCCGTGGAAAGCAGCTGC 957

Query 473 GTGTGCGCTTTGCCAGCCATAGTGCATCCCTTACAGTTCGAAACCTCCCTCAGTATGTGT 532  
 |||  
 Sbjct 958 GTGTGCGCTTTGCCTGCCATAGTGCATCCCTTACAGTTCGAAACCTTCCTCAGTATGTGT 1017

Query 533 CCAACGAACTGCTGGAAGAAGCCTTTTCTGTGTTTGGCCAGGTAGAGAGGGCTGTAGTCA 592  
 |||  
 Sbjct 1018 CCAACGAACTGCTGGAAGAAGCCTTTTCTGTGTTTGGCCAGGTAGAGAGGGCTGTAGTCA 1077

Query 593 TTGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTCACGAAAAGGCATTGTTGAGTTCTCAGGGAAGCCAG 652  
 |||  
 Sbjct 1078 TTGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTCAGGAAAAGGCATTGTTGAGTTCTCAGGGAAGCCAG  
 1137

Query 653 CTGCTCGGAAAGCTCTGGACGGATGCAGTGAAAGCTCCTTCCTGCTAACCACATTCCTC 712  
 |||  
 Sbjct 1138 CTGCTCGGAAAGCTCTGGACAGATGCAGTGAAGGCTCCTTCCTGCTAACCACATTCCTC 1197

Query 713 GTCCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAGTTAGATGATGAAGAGGGACTTCCAGAGAAGC 772  
 |||  
 Sbjct 1198 GTCCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAGTTAGATGATGAAGAGGGACTTCCAGAGAAGC  
 1257

Query 773 TGGGTTATaaaaaaCCAGC-ATTCACAAGGAACGAGAGCAGCCACCCAGATTTGCACA 831  
 | |||  
 Sbjct 1258 T-GGTTAT-AAAAAACCAGCAATTCACAAGGAACGAGAGCAGCCACCCAGATTTGCACA 1315

Query 832 GCCTGGCTCCTTTGAGTATGAATATGCCATGCGCTGGGAAGGCACTCATTGGAGATGGAG 891  
 |||  
 Sbjct 1316 GCCTGGCTCCTTTGAGTATGAATATGCCATGCGCT-GGAAGGCACTCATT-GAGATGGAG 1373

Query 892 AAGCAGCAGCAG---ATAGTGGACCGCCAACATCCATGA-GCTCGTGGAAAGCTGGAAAA 947

||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||

Sbjct 1374 AAGCAGCAGCAGGACCAAGTGGACCG-CAACATCAAGGAGGCTCGTGAGAAGCTGG-AGA  
1431

Query 948 TGGA-ATGGAAGCTGCAC-TCATGAG 971

|||| ||||| |||||

Sbjct 1432 TGGAGATGGAAGCTGCACGCCATGAG 1457

## B2. p GFP-C1 Plazmidi Sekans Sonuçları

Homo sapiens non-POU domain containing octamer binding (NONO), transkript varyant 3, mRNA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1490 bits(1652)	0.0	846/854(99%)	4/854(0%)	Plus/Plus

Query 16 CCATACTCCAAGAA-GCATCATCAACATcaccaccagcagcagcaccaccagcagcaaca 74

||||| ||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 578 CCATACTCCAAGAAAGCATCATCAACATCACCACCAGCAGCAGCACCACCAGCAGCAACA 637

Query 75 gcagcagccaccaccaccGCCAATACCTGCAAATGGGCAACAGGCCAGCAGCCAAAATGA 134

||||| ||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 638 GCAGCAGCCGCCACCACCGCCAATACCTGCAAATGGGCAACAGGCCAGCAGCCAAAATGA 697

Query 135 AGGCTTGACTATTGACCTGAAGAATTTAGAAAACCAGGAGAGAAGACCTTCACCCAACG 194

||||| ||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 698 AGGCTTGACTATTGACCTGAAGAATTTAGAAAACCAGGAGAGAAGACCTTCACCCAACG 757

Query 195 AAGCCGTCTTTTTGTGGGAAATCTTCCTCCCGACATCACTGAGGAAGAAATGAGGAAACT 254

||||| ||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 758 AAGCCGTCTTTTTGTGGGAAATCTTCCTCCCGACATCACTGAGGAAGAAATGAGGAAACT 817

Query 255 ATTTGAGAAATATGGAAAGGCAGGCGAAGTCTTCATTCATAAGGATAAAGGATTTGGCTT 314

|||||

Sbjct 818 ATTTGAGAAATATGGAAAGGCAGGCGAAGTCTTCATTCATAAGGATAAAGGATTTGGCTT 877

Query 315 TATCCGCTTGGAAACCCGAACCCTAGCGGAGATTGCCAAAGTGGAGCTGGACAATATGCC 374

|||||

Sbjct 878 TATCCGCTTGGAAACCCGAACCCTAGCGGAGATTGCCAAAGTGGAGCTGGACAATATGCC 937

Query 375 ACTCCGTGGAAAGCAGCTGCGTGTGCGCTTTGCCAGCCATAGTGCATCCCTTACAGTTCG 434

|||||

Sbjct 938 ACTCCGTGGAAAGCAGCTGCGTGTGCGCTTTGCCAGCCATAGTGCATCCCTTACAGTTCG 997

Query 435 AAACCTCCCTCAGTATGTGTCCAACGAACTGCTGGAAGAAGCCTTTTCTGTGTTTGGCCA 494

|||||

Sbjct 998 AAACCTCCCTCAGTATGTGTCCAACGAACTGCTGGAAGAAGCCTTTTCTGTGTTTGGCCA 1057

Query 495 GGTAGAGAGGGCTGTAGTCATTGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTCAGGAAAAGGCATTGT 554

|||||

Sbjct 1058 GGTAGAGAGGGCTGTAGTCATTGTGGATGATCGAGGAAGGCCCTCAGGAAAAGGCATTGT  
1117

Query 555 TGAGTTCTCAGGGAAGCCAGCTGCTCGGAAAGCTCTGGACGGATGCAGTGAAGGCTCCTT 614

|||||

Sbjct 1118 TGAGTTCTCAGGGAAGCCAGCTGCTCGGAAAGCTCTGGACAGATGCAGTGAAGGCTCCTT 1177

Query 615 CCTGCTAACCACATTTCTCGTCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAGTTAGATGATGA 674

|||||

Sbjct 1178 CCTGCTAACCACATTTCTCGTCTGTGACTGTGGAGCCCATGGACCAGTTAGATGATGA 1237

Query 675 AGAGGGACTTCCAGAGAAGCTGGTTATAAAAAACCAGCAATTTACAAGGAACGAGAGCA  
734

|||||

Sbjct 1238 AGAGGGACTTCCAGAGAAGCTGGTTATAAAAAACCAGCAATTTCCACAAGGAACGAGAGCA1297

Query 735 GCCACCCAGATTTGCACAGCCT-GCTCCTTTGAGTATG-ATATGCCATGCGCTGGAAGGC 792

|||||

Sbjct 1298 GCCACCCAGATTTGCACAGCCTGGCTCCTTTGAGTATGAATATGCCATGCGCTGGAAGGC 1357

Query 793 ACTCATTGAGATGGAGAAGCAGCAGCA-GACCAAGTGGACCGCAACATCAAGGAGGCTCG 851

|||||

Sbjct 1358 ACTCATTGAGATGGAGAAGCAGCAGCAGGACCAAGTGGACCGCAACATCAAGGAGGCTCG  
1417

Query 852 TGAGAAGCTGGAGA 865

|||||

Sbjct 1418 TGAGAAGCTGGAGA 1431

### B3.pKLO. TRC Plazmidi Sekans Sonuçları

Range 1: 1 to 14 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Query 171 CCGGAAAGGATTTG 184

|||||

Sbjct 1 CCGGAAAGGATTTG 14

### B4.İnsan NONO/p54nrb Promotor Bölgesi

#### İnsan NONO/p54nrb Promotor Bölgesini P1 (-730/+529) Kesmeyen Enzimler

PvuI, PvuII, RsrII, SacII, Sall, SanDI, SapI, P1-Scel, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, Swal, TaqII, Tth111I, XcmI, XhoI, XhoII, XmnIAarI, AatII, AbsI, Accl, AclI, Acyl, AflIII, AgeI, AjuIEam1105I, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Fall, FseI, HaeII, HaeIV, HindIII, HphI, KpnI, MauBI, MbolI, MluI, NaeI, NarI, NdeI, NheI, NotI, NruI, OliI, PaeI, PfoI, PleI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PstI, P1-PspI, PspXI, PstI, , AlfI, Alol, ApaI, ApaLI, Arsl, AscI, AsuII, BaeI, BamHI, BbvCI, BclI, BclII, BclIII, BglI, BglII, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrBI, BstXI, BtgZI, BtrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI.

**İnsan NONO/p54nrb Promotor Bölgesi P1 (730/+529)**

AGGTTCTCAGTTGCATTAGTCATATTTCAATGGCCACTTATAGTTAGTAGCTGCCATATTGAACACAGCAGA  
CATAGGACCTTTCCATCATTGCACACAGTTCTATTGAACAGCCCAAGTCTAGATCATTGTGTCCCCACATAA  
GGTGGTGCCATTGGGATACCCTGCAACCCTGAGTGTGAATTAATTAATGGGAATTAACACATACTTATCA  
ATTGATCCTTGTAGTCCTTGGTTAACCACGGGGGCGGGGCGAGTTAGGCATTACTGAAACAATGAAGGTT  
AGTTACTGATAGGCCTCCTATGGAATATACAGTCTGATCTAGAGGCCTACAATATATCCATGGCAATGATG  
ACACCTGTTGAATCTCTCAGTAAATCATAGGAACAATAGTGATGTTTGGACTGCTAGGTTTTCTGGTTACCA  
TGGAAATGAGGGTGCTGGTTACAATTCTGTGTAATCACGCAGAGCCTAAGGTATGATGCACCCCTCCTCC  
CCCACCCCGTCTGTAACCATGACCAAAGAGTTGACTATTTAGTTGCGTTTTCCCGAGTAGCCCCAGCAACAG  
GAGAAGCATCTAGAAATATGATTAAGTATGGGGTGTGAGGATGCAAGCCCTAACAAGGAAGTGTGAAAAA  
AGAAACATGGCGGGGCATTTTTTTTTCAGTAGGAAAAGGCCAAATCTATTCCATTGAATACAATGACATTGTT  
ACTCTTGCTTCTTGCACAGGCGCAGTGCAGGACTGCTCCGAGCACGCCTACGCGCGCATTTTTCTCCCCTTCC  
TCTCCCTCTTCCACTTTCCTCTCCCTTTTTCTCCTCTCCTTTCCCCTCCCACCACTTGGTCTTTCAGTCTTCA  
GTCAGTTCGTTTAGGTCTCTCCTTCCGACCCCCACCCCACTCCTCTCCCTTTCTTTTTCCCCCTCCCCCTTTC  
CTTTCCCGTCTCACGCGCCAGGCCGCTTGCACATGCGCATTAGGTACAAAGCCTCGCTCTTTGTCCCCATCT  
GTCGTTACACGAACTCAAGCCTTTGGCATTGGCAGCCAATAGAATCTAAGAAATGGCGGAAAAATGATT  
CCGCCTCGGGAGCTAAACCTTGATTGGCAGTTTAGCTAACCAATCGAGAACGCCATTTTGTACCCCTTGGCA  
GGCACCGAGCTCCGTCGTCTCGTTTCCGGCGGTGCGCGCTCTTTTCTCGGGACGGGAGAGGCCGTGTAGC  
GTCGCCGTTACTCCGAGGAGATACCAGTCGGTAGA

