

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



**HEPATOSELLÜLER KANSERDE ÖNEMLİ BİR LncRNA OLAN
MIR100HG'NİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

AYLİN TÜRKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Berrin TUNCA
Doç. Dr. Esra TOKAY

BALIKESİR, HAZİRAN-2024

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Hepatosellüler Kanserde Önemli Bir LncRNA Olan Mir100hg'nin Transkripsiyonel Regülasyonu**” başlıklı tezde;

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

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

Aylin TÜRKÖĞLU

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

Aylin TÜRKOĞLU 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

**HEPATOSELLÜLER KANSERDE ÖNEMLİ BİR LncRNA OLAN
MIR100HG'NİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYLİN TÜRKÖĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, HAZİRAN-2024**

Son çalışmalar, uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) çeşitli hastalıklarda önemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. MIR100HG ilk olarak bir insan transkriptom analizinde nöronal hücrelerde aşırı ekspresyon yoluyla tanımlanmıştır. Biyoinformatik ve ekspresyon çalışmaları, MIR100HG'nin nöroblastoma, lösemi, meme kanseri dahil olmak üzere insan kanserlerinde bir tümör promoteri olarak rolünü ortaya çıkarmıştır. Ancak literatürde MIR100HG geninin hepatoselüler karsinomdaki (HCC) rolüne ilişkin sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu tez çalışması normoksik ve hipoksik koşullar altında, farklı hepatosellüler kanser hücre hatlarında MIR100HG'nin ekspresyon seviyelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla epitel hücre hatları (Hep3B ve HUH-7), mezenşimal hücre hatları (SNU-398 ve SNU-475) ve sağlıklı bir karaciğer modeli (Clone-9) seçilmiştir. Hipoksik bir ortam oluşturmak için kobalt klorür kullanılmıştır. Gerçek Zamanlı PCR analizleri, spesifik MIR100HG primerleri kullanılarak yapılmıştır. Tez çalışmasının sonucunda, normoksik ve hipoksik koşullar altında MIR100HG'nin en yüksek Hep3B hücre hattında eksprese edildiği, bu sonucu SNU-398 hücre hattının takip ettiğini gösterilmiştir. Hipoksi oluşumu, HIF-1 α ifadesinin mRNA ve protein seviyelerine bakılarak doğrulanmıştır. MIR100HG promotörünün transkripsiyonel regülasyonu beş farklı uzunlukta promotor parçasının Hep3B hücrelerine geçici transfeksiyonu ile hipoksik ve normoksik koşullar altında araştırılmıştır. Transfeksiyon sonucunda, en aktif promotor parçalarının -397/+231, -815/+231 ve -1031/+231 olduğu ve hipoksik koşullarda aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Hep3B hücrelerinde hipoksik şartlar altında HIF-1 α 'nın MIR100HG promotöründe bulunan HRE bölgelerine fonksiyonel olarak bağlandığı kromatin immunopresipitasyonu (ChIP) analiziyle doğrulanmıştır. MIR100HG geninin hücrelerin karakterizasyonu için önemli ve gerekli olduğu, Clone-9 hücrelerinde MIR100HG ifadesinin susturulması ve overekspresyonunun neden olduğu sonuçlar ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir. Overekspresyon ve susturma deneyleri sonrasında gerçekleştirilen Real Time analizi, MTT, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri ile Clone-9 hücrelerinde MIR100HG'nin hücre sağkalımı, proliferasyonu, göçü gibi hücresel süreçlerde rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu tez kapsamında elde edilen verilerin, daha ileri kanser araştırmalarında, araştırmacılara yol göstereceği öngörülmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: MIR100HG, HIF-1 α , Hipoksi, Hep3B, SNU-398, Clone-9, Susturma, Overekspresyon

Bilim Kod / Kodları: 20603, 20606, 20610

Sayfa Sayısı: 187

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MIR100HG, AN IMPORTANT LncRNA, IN HEPATOCELLULAR CANCER

MSC THESIS

AYLİN TÜRKÖĞLU

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JUNE - 2024

Recent studies have revealed the significant role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in various diseases. MIR100HG was initially identified through its over-expression in neuronal cells in a human transcriptome analysis. Bioinformatics and expression studies have elucidated the role of MIR100HG as a tumor promoter in human cancers including neuroblastoma, leukemia, and breast cancer. However, limited information exists in the literature regarding the role of the MIR100HG gene in hepatocellular carcinoma (HCC). This thesis aims to investigate the expression levels of MIR100HG in different hepatocellular cancer cell lines under normoxic and hypoxic conditions. Epithelial cell lines (Hep3B and HUH-7), mesenchymal cell lines (SNU-398 and SNU-475), and a healthy liver model (Clone-9) were selected for this purpose. Cobalt chloride was used to induce a hypoxic environment. Real-time PCR analyses were performed using specific MIR100HG primers. The results of the thesis study showed that MIR100HG was most highly expressed in the Hep3B cell line under both normoxic and hypoxic conditions, followed by the SNU-398 cell line. Hypoxia induction was confirmed by examining the mRNA and protein levels of HIF-1 α . The transcriptional regulation of the MIR100HG promoter was investigated under hypoxic and normoxic conditions through the transient transfection of five different lengths of promoter fragments into Hep3B cells. The most active promoter fragments were found to be -397/+231, -815/+231, and -1031/+231, with increased activity observed under hypoxic conditions. The functional binding of HIF-1 α to the HRE regions of the MIR100HG promoter in Hep3B cells under hypoxic conditions was confirmed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis. The importance and necessity of MIR100HG in cell characterization were determined for the first time in this thesis study through the silencing and over-expression of MIR100HG in Clone-9 cells. Real-time analysis, MTT assay, colony formation assay, scratch assay, and Matrigel assay performed after over-expression and silencing experiments demonstrated the role of MIR100HG in cellular processes such as cell survival, proliferation, and migration in Clone-9 cells. It is anticipated that the data obtained in this thesis will guide researchers in further cancer research.

KEYWORDS: MIR100HG, HIF-1 α , Hypoxia, Hep3B, SNU-398, Clone-9, Silencing, Over-expression

Science Code / Codes : 20603, 20606, 20610

Page Number : 187

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SEMBOL LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Hepatosellüler Kanser (HCC)	1
1.2 Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA)	3
1.3 Uzun kodlanmayan RNA'lar (Non-coding RNA; lncRNA).....	5
1.4 microRNA (miRNA) Genleri	7
1.5 MIR100HG Geni ve Kanserlerdeki Rolü	9
1.6 Hipoksi	14
1.7 Hipoksi ve lncRNA	18
1.8 Hipoksi Oluşturma Teknikleri	19
1.8.1 Kimyasal İndükleme ile Hipoksi Oluşturma Teknikleri	19
1.8.2 Fiziksel Hipoksi Oluşturma Teknikleri	20
2. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI VE KAPSAMI	21
3. MATERYAL-YÖNTEM	26
3.1 Materyaller	26
3.1.1 Kullanılan Materyaller	26
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	28
3.1.3 Kullanılan Vektör Sistemleri	30
3.2 Yöntem.....	35
3.2.1 Klonlama Teknikleri	35
3.2.1.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA İzole Edilmesi	35
3.2.1.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	36
3.2.1.3 Agaroz Jel Elektrofrezinde DNA'nın Görüntülenmesi	36
3.2.1.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	37
3.2.1.5 Jelden DNA'yı Geri Saflaştırma.....	37
3.2.1.6 Ligasyon	38
3.2.1.7 Kanamisinli veya Ampisilinli, Luria Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması	38
3.2.1.8 DH5α Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi ve Kontrolü.....	39
3.2.1.8.1 Kompetan Hücrelerin Etkinliğinin Belirlenmesi	39
3.2.1.9 Transformasyon	40
3.2.1.10 Gliserol Stok Hazırlanması	40
3.2.1.11 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi	41
3.2.1.12 Küçük Ölçekli Plazmid İzolasyonu	41
3.2.1.13 Büyük Ölçekli (Midi Prep) Plazmid İzolasyonu	42
3.2.1.14 MIR100HG Geni sh-RNA Oligolarının pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması .	42

3.2.1.14.1 MIR100HG Genine Ait sh-RNA Oligolarının Belirlenmesi	42
3.2.1.14.2 Sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi (Annealing)	43
3.2.1.14.3 pLKO.1-TRC Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi	43
3.2.1.14.4 pLKO.1-TRC Vektörü ve MIR100HG sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi	44
3.2.1.14.5 pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlamanın Kontrolü	44
3.2.1.15 MIR100HG-pcDNA3.1 (Aşırı ifade) Vektörlerinin Hazırlanması	45
3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları	46
3.2.2.1 Steril Çalışma Alanının Oluşturulması	46
3.2.2.2 Ekipmanların Sterilizasyonu	46
3.2.2.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları	47
3.2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Besiyerinin Hazırlanması	47
3.2.2.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması	48
3.2.2.6 Donmuş Halde Saklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürün Başlatılması	49
3.2.2.7 Hücrelerin Pasajlanması	49
3.2.2.8 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripan Mavi Boyaması) ve Hücre Sayımı	50
3.2.2.9 Hücrelerin Dondurulması	51
3.2.2.10 Hücre Soyları ile Deney Kurulması	51
3.2.2.11 Kimyasal İndüklenmiş Hipoksi Oluşturulması ve Doğrulanması	51
3.2.2.11.1 Kimyasal Hipoksi Oluşturmak için Kobalt Klorür Solüsyonunun Hazırlanması ..	52
.....	52
3.2.2.12 Sitotoksosite Deneyleri (MTT)	52
3.2.2.13 Çizik Testi	53
3.2.2.14 Koloni Formasyon	54
3.2.2.15 Matrijel	54
3.2.2.15.1 Matrijel Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Analizi	55
3.2.2.16 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları	57
3.2.2.16.1 Bazal Aktivitenin Belirlenmesi için Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon	57
3.2.2.16.2 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü	59
3.2.2.17 MIR100HG Genini Susturma Çalışmaları	60
3.2.2.17.1 HEK293-T	60
3.2.2.17.2 MIR100HG Geninin Susturma Çalışmaları için Turbofect Reagent™ ile Gerçekleştirilen Kalıcı Transfeksiyon	61
3.2.2.17.3 Lentiviral Sıvının Uygulanması (Transdüksiyon)	62
3.2.2.17.4 Promisin Uygulaması ve Uygun Promisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ...	62
3.2.2.17.5 Tek Koloni Seçimi	62
3.2.2.17.6 Tek Koloni Seçiminin Doğrulanması	63
3.2.2.18 MIR100HG Geninin Overekspresyon Çalışmaları	63
3.2.3 RNA Tabanlı Teknikler	64
3.2.3.1 Hücrelerden RNA İzolasyonu	64
3.2.3.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	64
3.2.3.3 RNA Jel Elektroforezi	65
3.2.3.4 cDNA sentezi	66
3.2.3.5 Semi Quantitative (Sq) RT-PCR	67
3.2.3.6 Real Time PCR	67

3.2.4 Protein Tabanlı Teknikler	69
3.2.4.1 Western Blot Tekniği Kullanılarak Proteinlerin Belirlenmesi	69
3.2.4.1.1 RIPA Tamponu Kullanılarak Hücrelerin Lizisi ve Proteinlerin Ekstraksiyonu ...	72
3.2.4.1.2 Bradford Tekniği Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi	73
3.2.4.1.3 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	74
3.2.4.1.4 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi ..	75
3.2.4.1.5 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmünoblot Tekniği ile Tespiti	76
3.2.4.1.6 Protein Bantlarının Görselleştirilmesi ve Analiz Edilmesi.....	77
3.2.4.2 IFC (İmmünofloresans) Deneyi	77
3.2.5 DNA-Protein Etkileşim Teknikleri	78
3.2.5.1 EMSA Tekniği.....	78
3.2.5.1.1 Nükleer Ekstrakt Hazırlanması.....	78
3.2.5.1.2 EMSA Reaksiyonu	80
3.2.5.1.3 Oligoların Etiketlenmesi.....	80
3.2.5.1.4 Oligoların Bağlanması.....	81
3.2.5.1.5 Poliakrilamid Jel Hazırlanması.....	81
3.2.5.1.6 Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması	81
3.2.5.1.7 Jelin Membrana Transferi ve Crosslink Aşaması.....	82
3.2.5.1.8 Membranın Görüntülenmesi.....	82
3.2.5.2 Kromatin İmmüno Presipitasyonu (ChIP).....	83
3.2.5.2.1 Kromatin İmmünopresipitasyonunda Fiksasyon	84
3.2.5.2.2 Kromatin İmmünopresipitasyonunda Çapraz Bağlı DNA/Protein İmmünopresipitasyonu	85
3.2.5.2.3 Kromatin İmmünopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu .	86
3.2.5.2.4 Kromatin İmmünopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi.....	86
3.2.5.2.5 Kromatin İmmünopresipitasyonunda DNA'nın Saflaştırılması	86
3.2.5.2.6 Sonuçların Analiz Edilmesi	88
4. BULGULAR.....	89
4.1 Bioinformatik Analizler	89
4.1.1 MIR100HG Geninin Bioinformatik Analizleri ve Varyant Seçimi	89
4.1.2 MIR100HG Ekspresyon Primerlerinin Tasarlanması	91
4.1.3 MIR100HG Ekspresyon Primerlerinin PCR ile Denenmesi	92
4.1 MIR100HG Geninin Farklı Hücre Hatlarında Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları	93
4.2 Hücre Hatlarında Kimyasal İndüklenmiş Hipoksik Modelin Oluşturulması.....	94
4.2.1 Hipoksik Model Oluşturulması	94
4.2.2 Hipoksi Oluşumu İçin Gereken CoCl ₂ Miktarının MTT Analizi ile Belirlenmesi	99
4.2.3 MIR100HG Geni Ekspresyonunun Hipoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	102
4.2.4 Hipoksi Oluşumunun Protein Düzeyinde Doğrulanması.....	105
4.2.4.1 Western Blot	105
4.2.4.2 IFC	107
4.2.4.1 EMSA	110
4.3 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlanması	111

4.3.1 MIR100HG Promotorunun Biyoinformatik Analizi ve Promotor Primerlerinin Tasarlanması	111
4.3.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	114
4.3.3 MIR100HG Promotorunun PCR ile Çoğaltılması	115
4.3.4 Kompetan Hücrenin Hazırlanması ve Etkinliğinin Belirlenmesi	119
4.3.5 MIR100HG Geninin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	120
4.3.6 MIR100HG Promotor Parçalarının pMETluc Haberci Vektör Sistemine Alt Klonlanması	123
4.3.7 Sanger Dizileme ile Doğrulama	126
4.3.8 Klonlanan Promotor Parçalarının Midiprep ile Büyük Ölçekte İzolasyonu ve Kontrol Kesimi	128
4.4 MIR100HG Geninin Bazal Aktivitesini Belirleme Çalışmaları	130
4.4.1 MIR100HG Geninin Hipoksik Koşullarda Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi	132
4.5 MIR100HG Promotorunda Bulunan HIF-1 α Bağlanma Bölgelerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi ve Doğrulanması.....	133
4.5.1 HRE Bağlanma Bölgelerinin Bioinformatik Analizleri ve MIR100HG Genine Özgü ChIP Primerlerinin Tasarlanması.....	133
4.5.2 Kromatin İmmünopresipitasyon (ChIP) Deneyi.....	137
4.6 Clone-9 Hücrelerinde MIR100HG Geninin Hücrel Etkilerinin Belirlenmesi.....	138
4.6.1 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde İfade Baskılanması Çalışmaları	138
4.6.1.1 MIR100HG sh-RNA Oligolarının Tasarlanması.....	138
4.6.1.2 MIR100HG sh-RNA Oligolarını pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlama Çalışmaları....	139
4.6.1.3 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması.....	142
4.6.1.4 MIR100HG Geninin İfadesinin Baskılandığı Clone-9 Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi.....	143
4.6.1.4.1 MTT.....	143
4.6.1.4.2 Koloni Formasyon	145
4.6.1.4.3 Çizik Testi	146
4.6.1.4.4 Matrijel	149
4.6.2 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları	150
4.6.2.1 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması	150
4.6.2.2 MIR100HG Geninin Aşırı İfade Edildiği Clone-9 Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücrel Karakterizasyonunun Belirlenmesi.....	151
4.6.2.2.1 MTT.....	151
4.6.2.2.2 Koloni Formasyon	153
4.6.2.2.3 Çizik Testi	154
4.6.2.2.4 Matrijel	157
5. TARTIŞMA-SONUÇ.....	159
6. KAYNAKLAR (IEEE)	168
EKLER	175
EK A: MIR100HG Geni Varyant Analizleri.....	175
EK B: Ekspresyon Primerlerinin Tasarlanması.....	178
EK C: Promotor Primerlerinin Tasarlanması	179
ÖZGEÇMİŞ	187

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: LncRNA'ların beş genel kategorisinin şematik şekilde gösterilmesi [14].....	6
Şekil 1.2: MiR-99 ailesi üyelerinin ekspresyonunun düzenlenmesi [22].	8
Şekil 1.3: miRNA'ların biyosentezinin şematik gösterimi.	8
Şekil 1.4: 11. Kromozom üzerinde bulunan MIR100HG'nin genomik bağlamı (NCBI)....	9
Şekil 1.5: MIR100HG geninin içerdiği miRNA genleri [22].	9
Şekil 1.6: Çeşitli insan kanserlerinde MIR100HG'nin bilinen birçok düzenleyici mekanizması [27].	13
Şekil 1.7: MIR100HG'nin malignitelere temel fonksiyonlarının, kritik hücre içi sinyal yollarına etkisinin şematik gösterimi [24].	13
Şekil 1.8: HIF-1 α mekanizması.	16
Şekil 1.9: Normoksi ve Hipoksi şartlarda HIF-1 α mekanizması [57].....	16
Şekil 1.10: HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kanserde rolü [57].	17
Şekil 1.11: Hipoksi ve lncRNA ilişkisi [57].	19
Şekil 1.12: Kobalt klorür ile kimyasal indüklenmiş hipoksi oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.1: Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaları özetleyen iş-akış diyagramı.	25
Şekil 3.1: pGEM-T®Easy vektör haritasının şematik gösterimi.	30
Şekil 3.2: pMetLuc Reporter vektör haritasının şematik gösterimi.	31
Şekil 3.3: pMetLuc Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.4: pSEAP2-Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.	32
Şekil 3.5: pLKO.1 TRC (Plasmid #10878) vektör haritasının şematik gösterimi.	32
Şekil 3.6: pLKO.1 SCR (Plasmid #1864) vektör haritasının şematik gösterimi.	33
Şekil 3.7: pMD2.G (Plasmid #12259) vektör haritasının şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.8: psPAX2 (Plasmid #12260) vektör haritasının şematik gösterimi.....	34
Şekil 3.9: pcDNA3.1 vektör haritasının şematik gösterimi.	34
Şekil 3.10: pcDNA3.1-LincNed125-1 γ (MIR100HG) vektörü; Dr. Elisa Caffarelli [33]..	45
Şekil 3.11: Hep3B Hücre Hattı.	47
Şekil 3.12: SNU-398 Hücre Hattı.	47
Şekil 3.13: Clone-9 Hücre Hattı.....	47
Şekil 3.14: Thoma Lamı.....	50
Şekil 3.15: MTT metodu sırasında gerçekleşen kimyasal değişim.....	53
Şekil 3.16: Matrijel deneyinde uygulanan basamaklar.	56
Şekil 3.17: HEK293-T hücrelerinin mikroskop görüntüleri.	60
Şekil 3.18: Bradford eğrisi ve denklemi.	73
Şekil 3.19: Western-blot: transfer işlemi sırasında hazırlanan katmanlar.....	76
Şekil 4.1: Varyant 1'in şematik gösterimi.	89
Şekil 4.2: MIR100HG Genomu ve varyantları.	90
Şekil 4.3: MIR100HG Varyant 1 CDC (mRNA transkript) dizisi, ekzonları ve seçilen ekspresyon primerleri.	91
Şekil 4.4: MIR100HG ekspresyon primerlerinin Hep3B normoksi ve hipoksi cDNA'ları ile kontrolü.....	93
Şekil 4.5: MIR100HG mRNA ifadesinin farklı hepatosellüler kanser hücre hatlarında ve sağlıklı karaciğer hücre hattında normoksi şartlarda belirlenmesi.	94
Şekil 4.6: Epitelial kökenli Hep3B hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.	95
Şekil 4.7: Mezenşimal kökenli SNU-398 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.	96

Şekil 4.8: Sağlıklı karaciğer hücre hattı Clone-9 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.....	97
Şekil 4.9: Epitelial kökenli HUH-7 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.....	98
Şekil 4.10: Mezenşimal kökenli SNU-475 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.....	99
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda CoCl ₂ uygulamalarının Hep3B hücre canlılığı üzerine etkisi.....	100
Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda CoCl ₂ uygulamalarının SNU-398 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	101
Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlarda CoCl ₂ uygulamalarının Clone-9 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	102
Şekil 4.14: Hep3B hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.....	103
Şekil 4.15: SNU-398 hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.....	104
Şekil 4.16: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.....	105
Şekil 4.17: Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde HIF-1 α ifadesinin Western Blot yöntemi analizi ve hipoksi oluşumunun protein düzeyinde doğrulanması.....	106
Şekil 4.18: Hep3B hücre hattında HIF-1 α antikoruna ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.....	107
Şekil 4.19: SNU-398 hücre hattında HIF-1 α antikoruna ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.....	108
Şekil 4.20: Clone-9 hücre hattında HIF-1 α antikoruna ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.....	109
Şekil 4.21: Hep3B nükleer ekstraktı kullanılarak yapılan EMSA deneyi ile HIF-1 α 'nın doğrulanması.....	110
Şekil 4.22: 11. Kromozomda yer alan MIR100HG genomu üzerinde Varyant 1'e ait ekzon 1'in gösterimi.....	112
Şekil 4.23: Klonlama (Promotor) Primeri olarak seçilen; 6 Forward, 1 Reverse primerin MIR100HG genomu üzerinde gösterimi.....	112
Şekil 4.24: Hep3B hücrelerinden elde edilen genomik DNA'nın %0.8'lik Agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: İzole edilen genomik DNA, M: 500bp Marker....	114
Şekil 4.25: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-8: 1244 bp büyüklüğündeki promotor parçası, M: 250 bp Marker.....	117
Şekil 4.26: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-8: 628 bp büyüklüğündeki promotor parçası, M: 250 bp Marker.....	119
Şekil 4.27: Etkinlik kontrolü için sırasıyla 0,1 (A) μ g, 1 μ g (B) ve 10 μ g (C) plazmid transforme edilen DH5 α kompetan hücrelerinin oluşturduğu koloniler.....	119
Şekil 4.28: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 1: Rekombinant olmayan kesim sonucu. 2: Rekombinant pGEM-T Easy-[-1013/+231] promotor parçası. M: 250 bp Marker.....	122
Şekil 4.29: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 1: Rekombinant pGEM-T Easy-[-397/+231] promotor parçası. M: 100 bp Marker.....	122
Şekil 4.30: 1-4: pGEM-T Easy vektörüne klonlaması yapılan 1244 bp'lik promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi, 5-12: pMETLuc vektörün ligasyon hazırlığı için gerçekleştirilen XhoI/HindIII kesimi DNA jel elektroforez görüntüsü, M: 500 bp Marker.....	124

Şekil 4.31: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 3-4: pMetLuc vektöre klonlanmış rekombinant [-1031/+231] promotor parçası, M: 500 bp Marker.	125
Şekil 4.32: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 5: pMetLuc vektöre klonlanmış rekombinant [-397/+231] promotor parçası, M: 500 bp Marker.	126
Şekil 4.33: 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotörü ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması.	127
Şekil 4.34: 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotörü ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması.	128
Şekil 4.35: pMetLuc vektöre klonlanmış MIR100HG promotor parçalarının midiprep kontrol kesim jel görüntüsü.	129
Şekil 4.36: 5' Delesyonlu MIR100HG promotor parçalarının gösterimi.	130
Şekil 4.37: Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz/SEAP aktiviteleri.	131
Şekil 4.38: MIR100HG geni promotor parçalarının bazal aktivitelerinin gösterilmesi.	131
Şekil 4.39: Normoksi ve hipoksi koşullarda MIR100HG promotor konstraktlarına ait Lusiferaz/SEAP değerleri.	133
Şekil 4.40: MIR100HG promotörü üzerinde olası HRE bölgeleri ve ChIP3, ChIP4, ChIP5 ve ChIP6 primerlerinin gösterimi.	134
Şekil 4.41: MIR100HG promotörü üzerinde olası HRE bölgeleri ve ChIP1, ChIP2 ve ChIP3 primerlerinin gösterimi.	135
Şekil 4.42: Tasarlanan ChIP primerlerinin PCR ile kontrolü.	136
Şekil 4.43: Hep3B hücrelerinde HIF-1 α antikoru kullanılarak gerçekleştirilen ChIP deneyinin analizi.	137
Şekil 4.44: pLKO.1-TRC klonlama vektörünün AgeI ve EcorI restriksiyon enzimleri ile hazırlanması.	139
Şekil 4.45: Rekombinant M1, M2 ve M4 MIR100HG-sh-RNA-pLKO.1-TRC vektörlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: 500bp Marker.	140
Şekil 4.46: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesi baskılanan kolonilerin Real-Time PCR ile belirlenmesi.	142
Şekil 4.47: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.	143
Şekil 4.48: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.	144
Şekil 4.49: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.	145
Şekil 4.50: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi.	147
Şekil 4.51: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi.	148
Şekil 4.52: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda matrijel analizi.	149
Şekil 4.53: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.	151
Şekil 4.54: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.	152

Şekil 4.55: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.	153
Şekil 4.56: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Çizik testi analizi.	155
Şekil 4.57: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Çizik testi analizi.	156
Şekil 4.58: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda matrijel analizi.	157
Şekil A.1: MIR100HG Varyant 1-4 şematik gösterimi.	175
Şekil A.2: MIR100HG Varyant 5-8 şematik gösterimi.	175
Şekil A.3: MIR100HG Varyant 9-12 şematik gösterimi.	176
Şekil A.4: MIR100HG Varyant 13-16 şematik gösterimi.	176
Şekil A.5: MIR100HG Varyant 17-20 şematik gösterimi.	177
Şekil A.6: MIR100HG Varyant 21-23 şematik gösterimi.	177
Şekil B.1: MIR100HG Forward Ekspresyon Primerinin BLAST Analizi.....	178
Şekil B.2: MIR100HG Reverse Ekspresyon Primerinin BLAST Analizi.	178
Şekil C.1: Tasarlanan MIR100HG promotor primerleri.....	179
Şekil C.2: Restriction Mapper Programı ile uygun restriksiyon kesim enzimlerinin belirlenmesi.	179
Şekil C.3: Seçilen restriksiyon enzimlerinin rotasyonlarının vektörler üzerinde gösterilmesi.....	182
Şekil C.4: Seçilen restriksiyon enzimlerine ait tanıma dizileri.....	182
Şekil C.5: MIR100HG Promotor Forward Primeri 6 BLAST sonucu.	183
Şekil C.6: MIR100HG Promotor Forward Primeri 5 BLAST sonucu.	183
Şekil C.7: MIR100HG Promotor Forward Primeri 4 BLAST sonucu.	184
Şekil C.8: MIR100HG Promotor Forward Primeri 2 BLAST sonucu.	184
Şekil C.9: MIR100HG Promotor Ortak Reverse Primeri BLAST sonucu.	185
Şekil C.10: MIR100HG Promotor Ortak Reverse Primeri BLAST sonucu.	185

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Hepatosellüler kanserde kullanılan tedavi yöntemleri.	2
Tablo 1.2: ncRNA Çeşitleri ve Özellikleri.	4
Tablo 1.3: lncRNA'ların Genetik Sınıflandırması.	6
Tablo 3.1: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.	26
Tablo 3.2: RNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.	27
Tablo 3.3: DNA tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.	27
Tablo 3.4: Protein tabanlı çalışmalarda kullanılan materyaller ve tedarik edildikleri firmalar.	28
Tablo 3.5: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve üretici firmalar.	29
Tablo 3.6: Tez çalışmalarında kullanılan vektörler, kullanım amaçları, büyüklükleri ve temin edilen firma adı.	30
Tablo 3.7: Hep3B hücrelerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilirken kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.	35
Tablo 3.8: Agaroz jel elektroforezi sırasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.	36
Tablo 3.9: PCR döngü şartları.	37
Tablo 3.10: MIR100HG genine özgü tasarlanan sh-RNA oligoları ve dizileri.	43
Tablo 3.11: Plaka tiplerine göre paylaştırılması gereken kuyu başına hücre sayıları ve son hacim.	51
Tablo 3.12: MTT'de kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.	53
Tablo 3.13: Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	58
Tablo 3.14: Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yönteminde hazırlanan çözeltilerin bileşenleri ve miktarları.	58
Tablo 3.15: Bazal aktivite için gerçekleştirilen kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.	59
Tablo 3.16: TurboFect Reagent™ ile gerçekleştirilen kalıcı transfeksiyon bileşenlerinin 6 kuyucuklu plaka için kuyu başına gereken miktarları.	61
Tablo 3.17: 96 kuyucuklu plakaya bölünen hücrelerin soldan sağa doğru kuyulara eklenen hücre sayıları.	63
Tablo 3.18: TurboFect™ ile gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmaları için gerekli bileşenlerin miktarları.	64
Tablo 3.19: RNA jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve hazırlanışı.	65
Tablo 3.20: cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.	66
Tablo 3.21: Semi-Quantitative (Sq) RT-PCR Döngü Şartları.	67
Tablo 3.22: Real Time PCR Döngü Şartları.	68
Tablo 3.23: Tüm PCR'larda ve Real-Time PCR'da kullanılan primerler ve dizileri.	69
Tablo 3.24: Western-blot tekniğinin temel basamakları.	70
Tablo 3.25: Western Blot çözeltileri ve hazırlanma yöntemleri.	71
Tablo 3.26: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve miktarları.	75
Tablo 3.27: Hep3B hücrelerinden nükleer ekstrakt hazırlarken kullanılan çözeltiler ve içeriği.	79
Tablo 3.28: EMSA'da kullanılan kitler, içerikleri ve üretici firma.	80
Tablo 3.29: Poliakrilamid jel hazırlama için gereken malzemeler ve miktarları.	81
Tablo 3.30: EMSA Bağlanma reaksiyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları.	82

Tablo 3.31: ChIP Prosedürüne ait basamaklar.	83
Tablo 3.32: ChIP prosedüründe kullanım amacına göre antikorlar ve miktarları.	85
Tablo 3.33: ChIP prosedüründe kullanılan yıkama tamponları ve yıkama sayıları.	86
Tablo 3.34: ChIP Real Time PCR’ında kullanılan primerlerin lokasyonları, dizileri ve büyüklükleri.	87
Tablo 3.35: ChIP Real Time PCR döngü şartları.	88
Tablo 4.1: Ekspresyon primerlerinin kontrolü için gerçekleştirilen H β -2 ((Sq) RT-PCR) döngü şartları.	92
Tablo 4.2: Tasarlanan MIR100HG Klonlama (Promotor) Primerleri ve Dizileri.	113
Tablo 4.3: MIR100HG genine ait tasarlanan ve restriksiyon enzim bölgeleri eklenen klonlama primerleri, dizi ve Tm sıcaklıkları.	114
Tablo 4.4: -1013/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR reaksiyon bileşenleri.....	116
Tablo 4.5: -1013/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR döngü şartları.	116
Tablo 4.6: -397/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR reaksiyon bileşenleri.....	118
Tablo 4.7: -397/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR döngü şartları... ..	118
Tablo 4.8: Promotor parçaları ile pGem-T Easy ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	120
Tablo 4.9: Rekombinant kolonilerin tespiti için kurulan kesim reaksiyon bileşenleri.	121
Tablo 4.10: PmetLuc Vektör ve MIR100HG promotor parçalarının ligasyon bileşenleri.....	124
Tablo 4.11: Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla kurulan kesim reaksiyon bileşenleri.....	125
Tablo 4.12: Tasarlanan ChIP primerlerinin lokasyon, ürün büyüklüğü ve dizileri.	136
Tablo C. 1: Kesme restriksiyon enzimleri ve kesme pozisyonu.....	180

SEMBOL LİSTESİ

Bç	: Baz Çifti
Bp	: Base Pair
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
cDNA	: Komplementer DNA
Clone-9	: Sağlıklı Karaciğer Hücresi
ChIP	: Kromatin İmmüno Presipitasyonu
Ct	: Cycle Threshold
CO₂	: Karbondioksit
CoCl₂	: Kobalt Klorür
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiniükleoid Trifosfat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMSA	: Electromobility Shift Assay
Et-Br	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal Bovine Serum
Hβ-2	: Human-Beta-2 Microglobulin
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
Hep3B	: İnsan Hepatosellüler Kanser Hücresi
HIF-1α	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör – I
HRE	: Hipoksi Response Element
Kb	: Kilo Baz
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
M	: Molar
Ma	: Moleküler Ağırlık
miRNA	: Küçük Kodlanmayan RNA
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PBS	: Phosphate Buffered Saline
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Revolution Per Minutes
SEAP	: Secreted Alkaline Phosphatase
siRNA	: Susturucu RNA
SNU-398	: İnsan Hepatosellüler Kanser Hücresi
TE	: Tripsin EDTA
UV	: Ultra Viyole
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar

ÖNSÖZ

Tanıdığım ilk günden itibaren bilimin ışığı ile yolumu aydınlatan, öğrettiği her bilgi için minnettar olduğum, kendime örnek aldığım, söylediği her sözcüğün bende iz bıraktığı, karşılaştığım her zorlukta anne şefkatiyle yanımda olarak desteğini esirgemeyen, oluşturduğu tüm imkanları bizimle paylaşan, her çıkmaz yolun bir güzelliğe varacağını, gecenin en karanlık anının şafak sökmeden az önceki zaman olduğunu gösteren, her defasında beni cesaretlendiren, hayranlık duyduğum canım hocam ve danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a yollarımız kesiştiği, hayatımı güzelleştirdiği, sabrı, bana olan inancı, kattıkları ve varlığı için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Akademik kariyerim boyunca bildiklerini paylaşmaktan çekinmeyen, bilinmez soruların cevabı, her zorluğun yanında kolaylaştığı, deney çıktığında sevincini, çıkmadığında hüznünü bizimle birlikte tüm içtenliği ile paylaşan, neşesine, güler yüzüne, çalışma azmine, disiplinine hayran olduğum kıymetli hocam Doç. Dr. Esra TOKAY'a tüm emekleri ve varlığı için teşekkür ederim. Tanıdığım andan itibaren hem karakteri, hem akademik kişiliği ile beni etkileyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hem sevincime hem üzüntüme ortak olan, sevgi dolu güzel kalbine, şefkatine, bilgisine hayran olduğum, biricik hocam Dr. Nelin HACIOĞLU'na, bana öğrettikleri, destekleri, sevgisi, inancı ve varlığı için teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, ilgisini, desteğini, bilgi birikimini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Meltem ALPER'e bana kattıkları ve öğrettikleri için teşekkür ederim.

Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü sorunda desteklerini, güler yüzlerini ve kıymetli bilgilerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM ve Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, sevinçlerimi, üzüntülerimi paylaştığım, yardımlarını esirgemeyen başta kıymetli hocalarım Dr. Kübra PASPAL EROĞLU, Dr. Serhad ONAT, Dr. Fatma POYRAZLI olmak üzere, aynı ekibin üyesi olmaktan gurur duyduğum canım arkadaşlarım ve meslektaşlarım Feyzanur SAV'a, Yasemin KELEŞ'e, Hasan ÇAPRAZ'a, Ufuk MÜLHİM'e, Ghufuran Haqı Ismael ALBAZI, Rümeyza GENEZ ve yolumun kesiştiği, tanıdığım için kendimi şanslı hissettiğim tüm FK Lab. aileme teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her türlü zorluğa birlikte göğüs gerdiğim, omuz omuza çalıştığım, yanımdayken herşeyin kolaylaştığı, ortağım Şevin AVŞAR KOÇ'a dostluğu, ekip arkadaşlığı ve yanımda oluşu için teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden itibaren beraber gülüp, beraber ağladığımız, her zaman, her türlü yanımda olan, arkadaştan öte aile olduğumuz, canım dostlarım Aysu BOZKURT ve Hazal Naz TÜRKMEN yol arkadaşlıkları, sabırları ve sevgileri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana olan güvenlerini, inançlarını, desteklerini eksik etmeyen, sevgileriyle beni sarıp sarmalayan hayatımı güzelleştirenlerim canım annem Emine TÜRKÖĞLU'na, canım babam Vedat TÜRKÖĞLU'na, canım kardeşim, biricğim Koray TÜRKÖĞLU'na, sevgisini, desteğini her zaman hissettiren, varlığına şükrettiğim, moral kaynağı olan, hayat ortağım Mustafa DÜLGER'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Balıkesir, 2024

Aylin TÜRKÖĞLU

1. GİRİŞ

1.1 Hepatosellüler Kanser (HCC)

Memeli vücudunun en büyük organı karaciğer, birçok karmaşık fonksiyona sahiptir. Vücut homeostazında görev alır, süzme işlevinin yanı sıra, çoğu besin maddesini, toksik atıkları, ilaçları ve alkolü metabolize eder, hem dış kaynaklı hem de içsel toksik materyalleri nötralize eder ve uzaklaştırmaya yardımcı olur, doku üretimi ve onarımında görev alır, bağırsağın besin maddelerini emmesine yardımcı olur, kan pıhtılaşması için gereken pıhtılaşma faktörlerinin üretiminde rol oynar [1, 2].

İngiltere Kanser Araştırma Derneğine göre Hepatosellüler Karsinom (HCC), Kolanjiyosarkom (Safra Kanalı Kanseri (CCA)), Fibrolamellar Karsinom (FLC), Hepatoblastom (HBL) ve Karaciğer Anjiyosarkomu olmak üzere beş tür primer karaciğer kanseri vardır. Hepatosellüler karsinom (HCC), tüm primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturan önemli bir küresel sağlık sorunudur [3]. Amerikan Kanser Derneği'ne göre dünya çapında, her yıl bir milyona yakın insanda karaciğer kanseri teşhis edilmektedir ve her yıl yaklaşık 700.000 kişinin ölümü ile sonuçlanmaktadır [2]. GLOBOCAN 2018 istatistiklerine göre karaciğer kanseri, dünya üzerinde altıncı en yaygın görülen kanser türü ve kanser nedeniyle ölümlerin dördüncü en yaygın sebebidir. Karaciğer kanserinin görülme sıklığı ve ölüm oranı erkeklerde kadınlara kıyasla daha yüksektir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre, 2030 yılında karaciğer kanserinden 1 milyondan fazla ölüm beklenmektedir. HCC'nin başlangıcı ve ilerlemesi çok basamaklı bir süreç olarak kabul edilir. Birçok moleküler temelli faktör hepatosellüler kanserde tümörlerin hızla büyümesine neden olur [4, 5].

Karaciğer kanseri tedavisi, birkaç faktöre bağlı olarak değişebilir, hastanın genel sağlık durumu, kanserin evresi ve yayılma durumu gibi faktörler tedavi seçiminde belirleyicidir. Hepatosellüler kanserde kullanılan kısıtlı tedavi yöntemleri ve ilaçlar Tablo 1.1'de özetlenmiştir [6, 7, 8].

Tablo 1.1: Hepatosellüler kanserde kullanılan tedavi yöntemleri.

HCC'de Kullanılan Tedavi Yöntemleri		
Hedefe Tedaviler	Yönelik	Belirli genetik mutasyonlara dayalı olarak kanser hücrelerini hedefleyen ilaçların kullanımına dayanan bir yöntemdir.
Sorafenib (Nexavar)		FDA onaylı, hedefe yönelik ilaçtır. Tümör büyümesini ve yayılmasını engellemeye yardımcı olabilir.
Lenvalerol (Lenvima)		FDA onaylı, hedefe yönelik ilaçtır. Tümör büyümesini yavaşlatabilir.
Regorafenib (Stivarga)		İlerlemiş HCC tedavisinde kullanılan hedefe yönelik ilaçtır.
Immunoterapi		Bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasını teşvik eden ilaçlar kullanılarak kanser hücrelerinin yok edilmesini amaçlar. Karaciğer kanserinin tedavisinde yeni bir yaklaşımdır.
Pembrolizumab (Keytruda)		İmmünoterapide kullanılan HCC ilacıdır. Bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı harekete geçirir.
Nivolumab (Opdivo)		İmmünoterapide kullanılan HCC ilacıdır. Bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı harekete geçirir.
Radyoterapi		İleri HCC tedavisinde kullanılabilir. Yüksek enerjili ışınlar kullanılarak kanser hücrelerini hedefler ve öldürmeye yardımcı olabilir. Ancak bazen karaciğerin normal dokularına zarar verebilir.
Kemoterapi		Kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemeyi amaçlar. Karaciğer kanseri tedavisinde sistemik kemoterapi (tüm vücuda yayılan) veya arteriyel kemoterapi (doğrudan karaciğer arterine ilaç verilmesi) kullanılabilir.
Radyoembolizasyon (SIRT)		Radyoaktif partiküllerin kanser hücrelerine doğrudan enjekte edilmesiyle yapılan bir tedavi yöntemidir. Karaciğer kanserinde metastatik lezyonları küçültmek veya semptomları hafifletmek için kullanılabilir.
Radyofrekans Ablasyon (RFA)		Kanserli dokuyu yüksek ısıya maruz bırakarak yok etmeyi amaçlayan minimal invaziv bir cerrahi prosedürdür. Küçük boyuttaki tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılır.
Semptomatik Tedavi		Ağrı yönetimi, beslenme desteği ve diğer semptomların hafifletilmesi için kullanılan yaklaşımlardır.
Cerrahi Müdahale		Tümörü çıkarmak için cerrahi operasyonlar, kanserin evresine bağlı olarak bir seçenek olabilir. Karaciğer nakli, ileri evre kanserlerde veya karaciğerin büyük bir bölümünü etkileyen tümörlerde bir seçenek olabilir.

Hepatosellüler kanserin insidansının her geçen yıl hızla artması ve kısıtlı tedavi yöntemleri sebebiyle yeni biyobelirteçlere duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Hedefe yönelik tedaviler ve moleküler çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

1.2 Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA; ncRNA)

Ökaryot genomu, biyolojik süreçleri düzenlemek için hem haberci RNA'ları (mRNA), hem de kodlamayan RNA'ları (ncRNA) sürekli olarak transkribe eder. DNA ile protein ürünlerinin arasındaki arabulucular olarak görev yapan mRNA'ların aksine, ncRNA'lar doğrudan RNA formunda fizyolojik ve patolojik süreçlere katılırlar [9]. Genomdaki transkripsiyon süreci, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), microRNA'lar (miRNA), enhansır RNA'lar (eRNA) ve antisense RNA'lar (aRNA) gibi çeşitli alt tiplere sahip kodlamayan RNA'lar (ncRNA) tarafından düzenlenmektedir [10].

ncRNA'lar protein kodlamayan RNA molekülleri olarak tanımlanır. Önceden sadece transkripsiyonel gürültü olarak düşünülürken, şimdilerde fonksiyonlarının tanımlanması ile önemleri ortaya konmuş ve ilgi odağı haline gelmişlerdir. ncRNA'lar; gen ifadesi ve kromatin yapısının önemli düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir. Hücre içinde çeşitli işlevlere sahiptirler. Protein sentezlemek yerine, hücresel süreçleri düzenlemek veya kontrol etmek için kullanılırlar. Epigenetik ve transkripsiyonel düzenlemeyi modüle eder, yapısal ve organizasyonel roller oynarlar. Ayrıca, hücre döngüsü, gelişimi, apoptoz ve metastaz da dahil olmak üzere tümör oluşum süreçlerinde önemlidirler [10, 11, 12]. ncRNA'lar büyüklükleri 200 baz ve üzeri olan uzun kodlamayan RNA'lar ve 200 bazdan küçük olan microRNA'lar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflarda daha sonra alt gruplara ayrılabilir [13]. ncRNA çeşitlerinden bazıları ve özellikleri Tablo 1.2'de verilmiştir.

Tablo 1.2: ncRNA Çeşitleri ve Özellikleri.

ncRNA Türleri	Özellikleri
miRNA (MicroRNA)	Genellikle 21 ila 25 nükleotid uzunluğunda olan ve gen ifadesini düzenleyen ncRNA'lardır. mRNA'ları hedef alarak translasyonlarını engelleyebilirler veya mRNA'yı yıkabilirler. Bu şekilde hücredeki gen ifadesini kontrol ederler.
siRNA (Small interfering RNA)	Susturucu olarak bilinen, 20-24 nükleotid uzunluğunda olan küçük RNA'lardır. Genellikle çift iplikçikli RNA'dan türetilirler ve gen ifadesini baskılayarak virüslere ve transpozonlara karşı savunma sağlarlar. mRNA'ların yıkılmasına veya translasyonlarının engellenmesine yol açarlar.
lncRNA (Long non-coding RNA)	Genellikle 200 nükleotidin üzerinde uzunluğa sahip olan bu RNA molekülleri, çeşitli hücreyel süreçlerde düzenleyici roller üstlenirler. Gen ifadesini modüle edebilir, kromatin yapılarını değiştirebilir veya hücreyel sinyal iletimine katılabilirler.
circRNA (Circular RNA)	Lineer RNA moleküllerine benzemekle birlikte uçları birleşerek dairesel bir yapı oluştururlar. miRNA bağlama ve rekabetçi endojen RNA'lar gibi düzenleyici işlevlere sahip olabilirler.
piRNA (Piwi-interacting RNA)	Gonad hücrelerinde bulunan 26-31 nükleotid uzunluğunda küçük kodlamayan RNA moleküllerinin en büyük sınıfıdır. RNA-protein kompleksleri oluştururlar. Transpozonlar gibi genomik elementlerin epigenetik ve transkripsiyon sonrası gen aktivitesini baskılayarak genom stabilitesini korurlar.
snoRNA (Small nucleolar RNA)	Nükleolusta bulunan ve rRNA'nın modifikasyonu ve işlenmesi gibi görevleri olan RNA molekülleridir.
snRNA (Small nuclear RNA)	Sitoplazmada ve çekirdekte bulunan ve splicing gibi önemli hücreyel süreçleri düzenleyen RNA molekülleridir.

Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların, miRNA'larla etkileşime girebileceğini ve insan kanserlerinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Artan kanıtlar, farklı ncRNA'lar arasındaki

karmaşık etkileşimlerin ve bu etkileşimlerin kanserdeki rollerinin daha fazla aydınlatılmaya ihtiyaç duyduğunu göstermiştir.

1.3 Uzun kodlanmayan RNA'lar (Non-coding RNA; lncRNA)

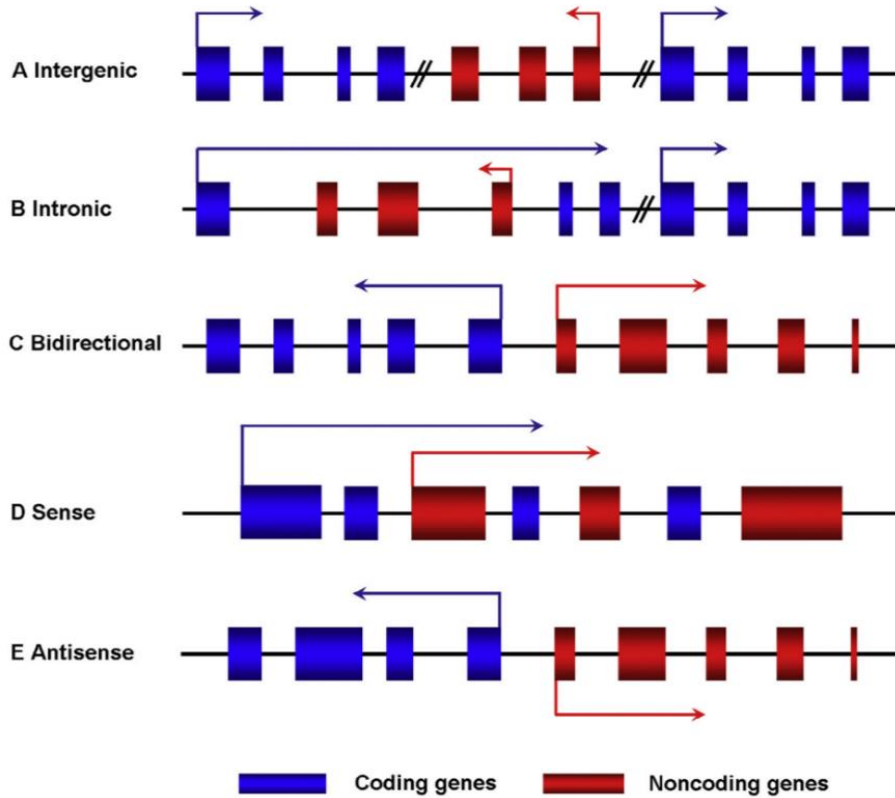
ncRNA'ların bir çeşidi olan lncRNA'lar; büyüklükleri genelde 200 baz ve üzeri olan (bazıları binlerce baz olabilir), protein kodlama kapasitesine sahip olmayan uzun RNA molekülleridir. İnsan genomundaki tanımlanan lncRNA'ların sayısı zamanla önemli ölçüde artmış olup, tahminler 7.000 ila 23.000 arasında değişmektedir ve protein kodlayan gen sayısını aşması beklenmektedir. LncRNA'lar, RNA polimeraz II veya III tarafından genomun herhangi bir bölgesinde transkribe edilir ve poliadenilleştirilmiş veya poliadenilleştirilmemiş olabilirler [14].

İşlevsel olarak çeşitlilik gösterirler ve genellikle çeşitli hücresel süreçlerde düzenleyici rollere sahiptirler. Protein kodlama kapasiteleri olmadığından, protein sentezine katılmazlar ancak; RNA, DNA ve proteinlere bağlanarak RNA-RNA, RNA-DNA, RNA-Protein komplekslerini oluşturarak gen ifadesinin farklı basamaklarında transkripsiyonu, translasyonu ve mRNA kararlılığını düzenlerler [10, 15]. Bunun yanı sıra, çeşitli tiplerde bulunarak kromatin yapısını modifiye etme, hücre döngüsü düzenleme, hücre farklılaşması, hücre sinyalizasyonu gibi işlevlere de sahip olabilirler [16]. Bazıları çekirdekte bulunurken, bazıları sitoplazmada yer almaktadır. Bu değişken lokalizasyonlar, lncRNA'ların hangi işleve sahip olacağını ve hedeflerini belirler. En yaygın bilinen işlevi gen düzenlemedir. Bazı lncRNA'lar transkripsiyonel düzenleme yoluyla DNA'yı etkilerken, diğerleri post-transkripsiyonel düzenleme yoluyla mRNA'ların stabilitesini ve çevirisini etkileyebilir. Kromatin modifikasyonlarını düzenleyerek epigenetik kontrollerde rol alır; örneğin histon deasetilazları veya metiltransferazları redükte ederek gen ifadesini etkileyebilirler. Transkriptom profilleri dokuya özgü ifadeye sahiptir [17, 18].

Yapılan çalışmalar sonucunda, kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, nöral dejeneratif hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği bulunmuştur. Genetik açıdan, lncRNA'lar 5 kategoride sınıflandırılmaktadır (Tablo 1.3) [19].

Tablo 1.3: lncRNA'ların Genetik Sınıflandırması.

lncRNA Türleri	Özellikleri
Intergenik lncRNA'lar	Ayrı transkripsiyon birimlerine sahip protein kodlayan genlerden ayrı olan lncRNA'lardır. Bir tanım, protein kodlayan genlerden 5 kb uzakta olmasını gerektirir.
İntronik lncRNA'lar	Bir protein kodlayan genin intronundan başlayan ve ekzonları örtüşmeden sona eren lncRNA'lardır.
İki yönlü lncRNA'lar	Bir protein kodlayan genin promotöründen iki yönlü şekilde başlayan transkriptlerdir; iki yönlülüğü oluşturan kesin mesafe sınırı tanımlanmamıştır, ancak genellikle birkaç yüz baz çifti içinde yer alır.
Anlamsal lncRNA'lar	Dizilerinin bir protein kodlayan genin anlamlı ipliğine denk geldiği lncRNA'lardır.
Antisens lncRNA'lar	Bir protein kodlayan genin içinde veya 3' ucundan başlayan, protein kodlayan genlerin karşı yönünde transkripte edilen ve en az bir kodlayan ekzon ile örtüşen transkriptlerdir.



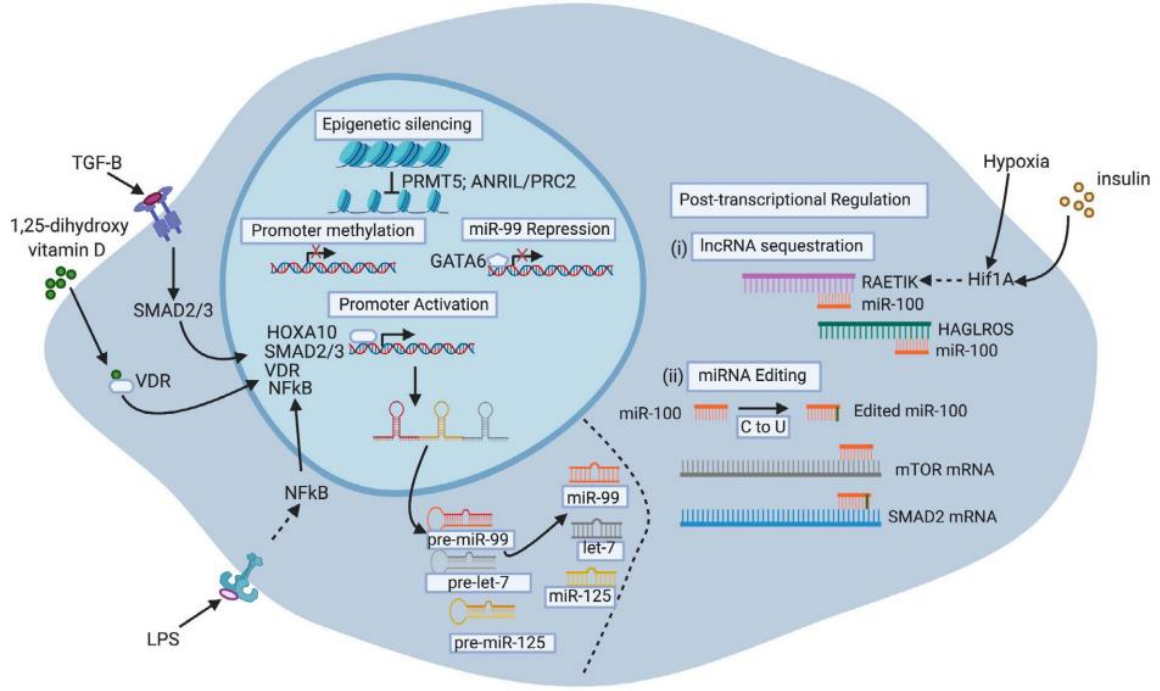
Şekil 1.1: lncRNA'ların beş genel kategorisinin şematik şekilde gösterilmesi [14].

Hücre patolojisinin ve fizyolojisinin önemli düzenleyicileri olan lncRNA'lar, hastalıkların tanı ve tedavisinde yeni potansiyel hedefler olarak değerlendirilirler [20]. Artan kanıtlar, anormal olarak ifade edilen lncRNA'ların, kanserojenez ve malign tümör gelişimine proteinlere bağlanarak veya diğer kısa düzenleyici RNA'ları modüle ederek katıldığını göstermektedir [21]. lncRNA'ların işlevleri ve moleküler mekanizmaları halen aktif olarak çalışılan konulardır ve bu alandaki çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir.

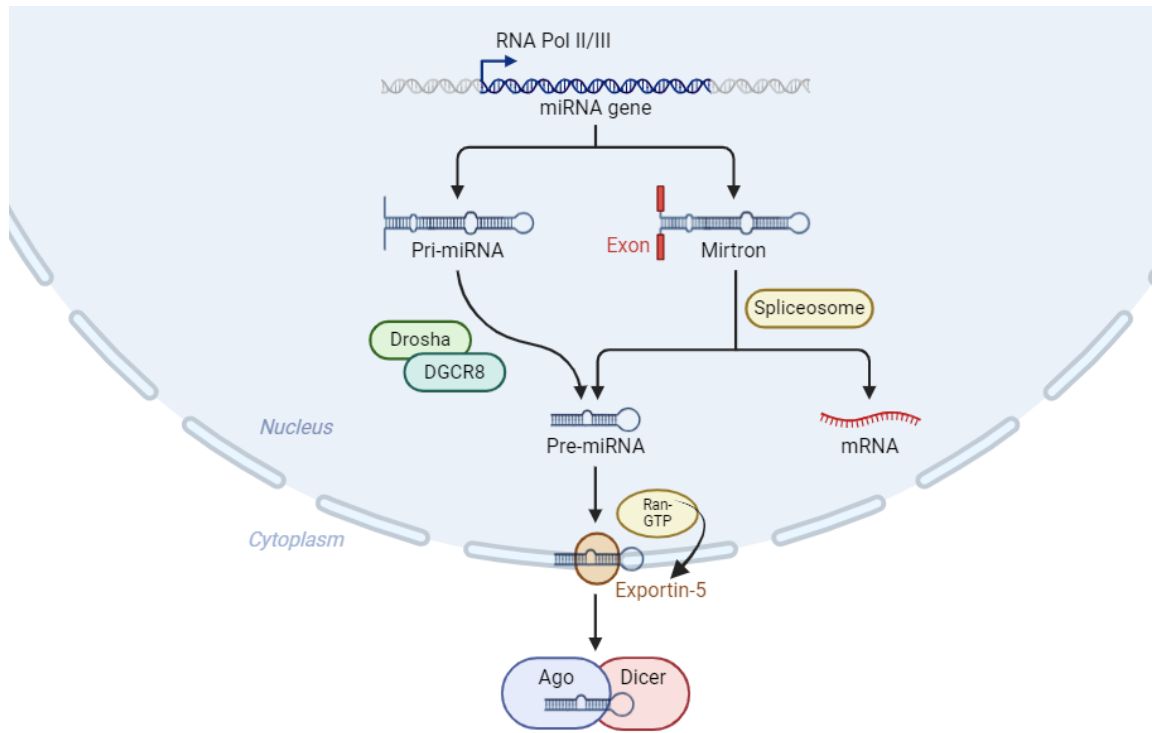
1.4 microRNA (miRNA) Genleri

MicroRNA'lar (miRNA'lar), hedef genlerin ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kısa kodlamayan RNA'lardır. Gen ekspresyonu düzenlemesini, genlerin haberci RNA (mRNA) stabilitesini azaltarak veya mRNA çevirisini baskılayarak gerçekleştirirler. miRNA'lar, olgun miRNA'nın 5' ucunda bulunan yaklaşık olarak 7 nükleotid uzunluğunda olan dizisi ile mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesi (3'-UTR) arasında komplementer bağlanma yoluyla hedeflerini tanırlar. Bir miRNA birden fazla mRNA'yı hedef alabilir ve bir mRNA birden fazla miRNA'nın bağlanma bölgesini içerebilir (Şekil 1.2) [22].

miRNA'ların biyosentezi (Şekil 1.3), miRNA genlerinin RNA Polimeraz II/III aracılı transkripsiyonu ile başlar ve bunun sonucunda primer miRNA (pri-miRNA) transkriptleri oluşur [23]. Oluşan transkriptler Drosha ve DGCR8 içeren nükleer mikroprosesör kompleksi tarafından işlenerek öncü miRNA'lar (pre-miRNA) oluşturulur. Pre-miRNA'lar Ran-GTP bağımlı protein, Exportin 5 (Exp 5) üzerine yüklenir ve sitoplazmaya taşınır. Biyosentezin tamamlanması için Dicer tarafından daha fazla işleme olayı ve miRNA'nın Argonaute (Ago) içerisine yüklenmesi gereklidir [22].



Şekil 1.2: MiR-99 ailesi üyelerinin ekspresyonunun düzenlenmesi [22].

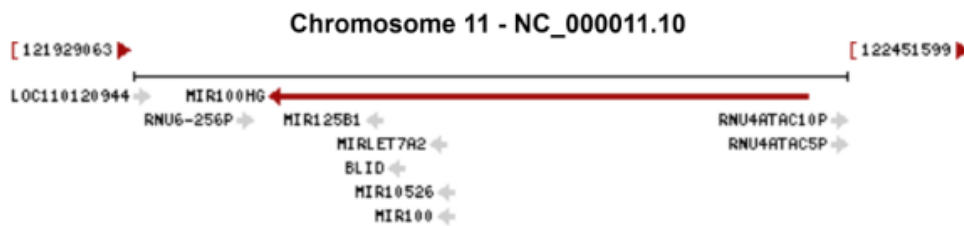


Şekil 1.3: miRNA'ların biyosentezinin şematik gösterimi.

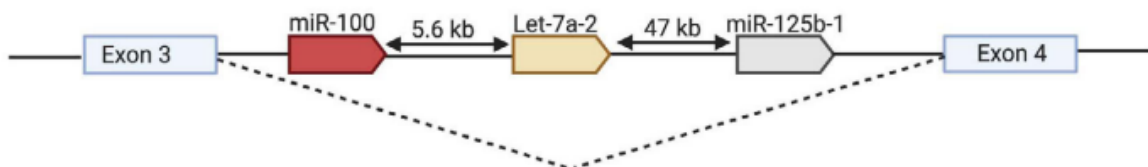
miRNA genleri genellikle genom üzerinde kümeler halinde düzenlenir. Bir kümedeki miRNA'lar aynı yönde transkribe edilir ve bir transkripsiyon ünitesi tarafından kesintiye uğramazlar. Artan kanıtlar, kümeleşmiş miRNA'lar arasında işlevsel bir ilişki olduğunu desteklemektedir; küme üyeleri, hedefler üzerindeki etkilerini iş birliği yaparak güçlendirmektedir. Aynı kümenin üyeleri bazen zıt rolleri de yerine getirebilirler; örneğin, Let-7c Akut Myeloid Lösemi (AML) hücrelerini farklılaşmaya teşvik ederken, aynı kümede yer alan miR-125b-1 hematopoetik kök hücrelerin kendini yenileme özelliğini kolaylaştırması. MiRNA'lar ile tümör oluşumunun teşvik edilmesi veya baskılanması üzerine rollerini karakterize etmek için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bunlar sırasıyla onkogenik miRNA'lar (onkomiR'ler) ve tümör baskılayıcı miRNA'lar (TSmiR'ler) aracılığıyla gerçekleştirilir [22].

1.5 MIR100HG Geni ve Kanserlerdeki Rolü

Yeni keşfedilen bir uzun kodlamayan RNA (lncRNA) olan MIR100HG (Linc-NeD-125) geni, 11. Kromozom üzerinde q24.1 lokusunda yer almaktadır (Şekil 1.4). 3. İntronunda 3 adet kümelenmiş miRNA genine ev sahipliği yapar. Bu miRNA genleri miR-100, Let-7a-2 ve miR-125b-1 genleridir (Şekil 1.5) [22]. İsmi intronunda barındırdığı miR-100 geninden almıştır. İntronunda miRNA genleri taşıyan tek lncRNA MIR100HG değildir, lncRNA'ların bir kısmında bu durum yaygın olarak görülmektedir [24].



Şekil 1.4: 11. Kromozom üzerinde bulunan MIR100HG'nin genomik bağlamı (NCBI).



Şekil 1.5: MIR100HG geninin içerdiği miRNA genleri [22].

Son yıllarda, uzun kodlanmayan RNA mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 küme genlerinin ev sahibi olarak da bilinen MIR100HG, kanserlerde yeni ve kritik bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. MIR100HG, çeşitli kanserlerde düzensizleşir ve onkogenik veya tümör baskılayıcı bir rol oynar, bu da birçok tümör hücre biyolojisi sürecine ve kanserle ilişkili yollara katılır [25, 26]. Birçok çalışma, MIR100HG'nin düzensizleşmiş ifadesinin kötü prognoz ve klinikopatolojik özelliklerle belirgin şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir [27, 28, 29]. MIR100HG ekspresyonunun prognostik önemi, meme kanseri, mesane kanseri, serviks kanseri, osteosarkom ve hepatosellüler karsinom gibi kanser türlerinde araştırılmıştır ve aşağıda kısaca yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Christodoulou ve arkadaşları (2010), miR-100/let-7a/miR-125b-1 kümesini, kordalılarda protostom ve deuterostom alt kategorilerinde bulmuş ve bu kümelenmenin doku kimliğini oluşturmak için önemli olduğunu belirtmiştir [22].

2014 yılında MIR100HG ile ilgili yapılan çalışmalar başlamış, Akut megakaryoblastik lösemi hücre hatlarında ve hastalarda ilk defa MIR100HG'nin fazla miktarda ifade olduğu, MIR100HG ifadesinin susturulmasının AMKL hücre hatlarında hücre büyümesini engellediği rapor edilmiştir [30].

2015 yılında, MIR100HG geni yeni bir sitoplazmik nöronal uyaran uzun kodlamayan RNA (lncRNA) olarak tanımlanmıştır ve nöron hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan retinoik asit uyarımından etkilenmediği, MIR100HG'nin aksine intron içinde bulunan miR-125b-1'in aktive olduğu belirlenmiştir [31].

2016 yılında yapılan çalışma ile servikal kanserli hastalarda RNA-seq dataları analiz edilerek MIR100HG'nin artan ifadesi ortaya konulmuştur [32].

2017 yılında, nöron farklılaşmasında rolü olmayan MIR100HG'nin medullablastomada onkogen lncRNA olduğu ilk olarak öne sürülmüştür. Ayrıca, MIR100HG'nin miRNA'ların hedefe ulaşmasını engelleyen bir ceRNA (miRNA süngeri) olduğu gösterilmiştir. Beyin tümörü hücrelerinde, G4 medullablastoma tümör sürücülerini tanımlanan CDK6, MYCN, SNCAIP ve KDM6A genlerinin ekspresyonu ve degradasyonuna neden olan miR'ler tanımlanmıştır [33].

2018'de kolorektal kanser ve baş-boyun squamaoz kanserinde yapılan bir çalışma, MIR100HG genine ait iki miRNA geninin (miR-100 ve miR-125b-1) Cetuximab ilacına dirençte artmış olduğunu göstermiştir [17, 34]. Başka bir çalışma ile pankreas duktal karsinomlu hasta dokularında MIR100HG ifadesinin arttığı ve TGF- β indüklenmiş MIR100HG'nin pankreas kanserinde ekspresyonunun artmış olduğu belirlenmiştir [35]. Bunun yanı sıra MIR100HG genindeki intronik kodlama bölgesinin, proapoptotik bir molekül olarak, kaspaz bağımlı mitokondriyal sinyal yolunu kullanarak apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen CHIP-seq çalışmaları ile TGF- β 'nin uyarılması durumunda SMAD2 ve 3'ün MIR100HG promotoruna direkt olarak bağlandığı ve MIR100HG ifadesini arttırdığını gösterilmiştir [35]. Yine bu yılda yapılan diğer bir çalışma ile osteosarkom hücrelerinde MIR100HG'nin hücre siklusunda farklı aşamalarında rol oynadığı ve bir RNA-binding protein (RBP's) olan HuR ile bağlandığı gösterilmiştir [36, 37]. Yapılan başka bir çalışmada Triple negatif meme kanserinde (TNBC), MIR100HG'nin proto-onkogen olarak davrandığı ve MIR100HG susturma çalışmaları sonucunda ise meme kanseri hücrelerinde ifadesinde azalma gerçekleşirken, p27 geninin artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bunu da MIR100HG'nin p27 geninin 5'-UTR'sine direkt bağlanarak DNA-RNA yapısını oluşturarak yaptığı kanıtlanmıştır. MIR100HG'nin DNA'ya bağlanarak yapı oluşturduğu bu çalışma ile ilk kez kanıtlanmıştır [15, 19]. 2018'de gerçekleştirilen biyoinformatik bir çalışma ile MIR100HG'nin gastrik kanserlerde ifadesinin artmış olduğu ve gastrik kanserlerde ceRNA rolü oynayabileceği teorik olarak gösterilmiştir [38]. Başka bir çalışmada, Cancer Atlas data setlerindeki 364 Hepatosellüler kanser hastasının lncRNA ekspresyonu analiz edilmiş ve MIR100HG'ninde içinde olduğu HCC ilişkili dört potansiyel lncRNA tanımlanmıştır, MIR100HG'nin susturulması ve koloni formasyon testi yapılarak fonksiyonel analizleri kısıtlı şekilde gerçekleştirilmiştir [19].

2019'da, iki akciğer kanseri mikrodizi veri setinde mikrodizi gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir ve MIR100HG ekspresyonunun tümör dokularında normal akciğer dokularına kıyasla azaldığı bulunmuştur [42]. Bununla birlikte, MIR100HG'nin normal dokularla karşılaştırıldığında, kas invaziv mesane kanserinde aşağı regüle edildiği gözlemlenmiştir [40].

MIR100HG'nin gastrik kanserli hastalarda ve gastrik kanserli hücre hatlarında aşırı ifade olduğu iki bağımsız araştırma grubu tarafından gösterilmiştir. Ayrıca MIR100HG'nin susturulmasının hücre migrasyonu ve hücre sayısını azalttığı kanıtlanmıştır [40, 41].

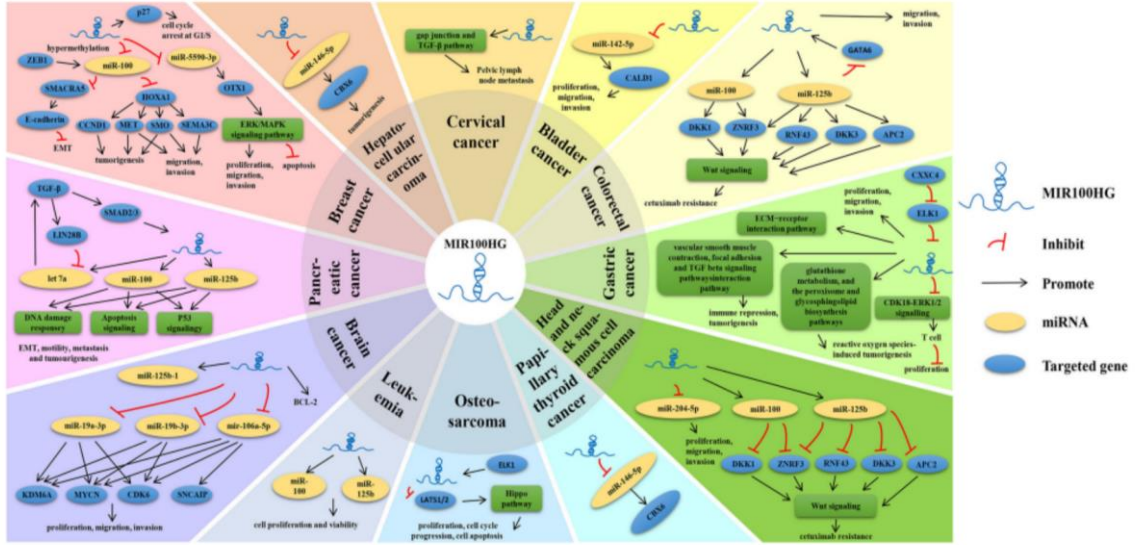
Kolorektal kanser hasta dokularında yaptıkları çalışma ile, MIR100HG ifadesinin fazla olduğu ve arttığı durumlarda hücre metastazını arttırdığını ve *in vivo* deneyler ile MIR100HG susturulmasının farelerde metastazı azalttığı gösterilmiştir [42]. Osteosarkom üzerinde yapılan çalışma ile MIR100HG ifadesinin osteosarkom hücrelerinde artmış olduğu ve susturulması durumunda hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu başlattığı bulunmuştur. Aynı zamanda yapılan ChIP deneyi ile ELK-1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotoruna bağlandığı gösterilmiştir. MIR100HG susturma çalışmalarında Hippo sinyal yolundaki LATS1 ve LATS2'nin epigenetik olarak transkripsiyonel regülasyona katıldığı bulunmuştur. [43, 44].

2020 yılında, mide kanseri dokularında yapılan çalışmada MIR100HG kanserli dokularda, kanserli olmayan dokulara kıyasla daha yüksek bir ifadeye sahip olduğu ve mide kanserli hastalarda pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu kanıtlar, MIR100HG'nin mide kanserinin klinik prognozu üzerinde önemli bir etkisi olduğunu öne sürdü ve MIR100HG ifadesine müdahalenin klinik tedavide potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmüştür [41].

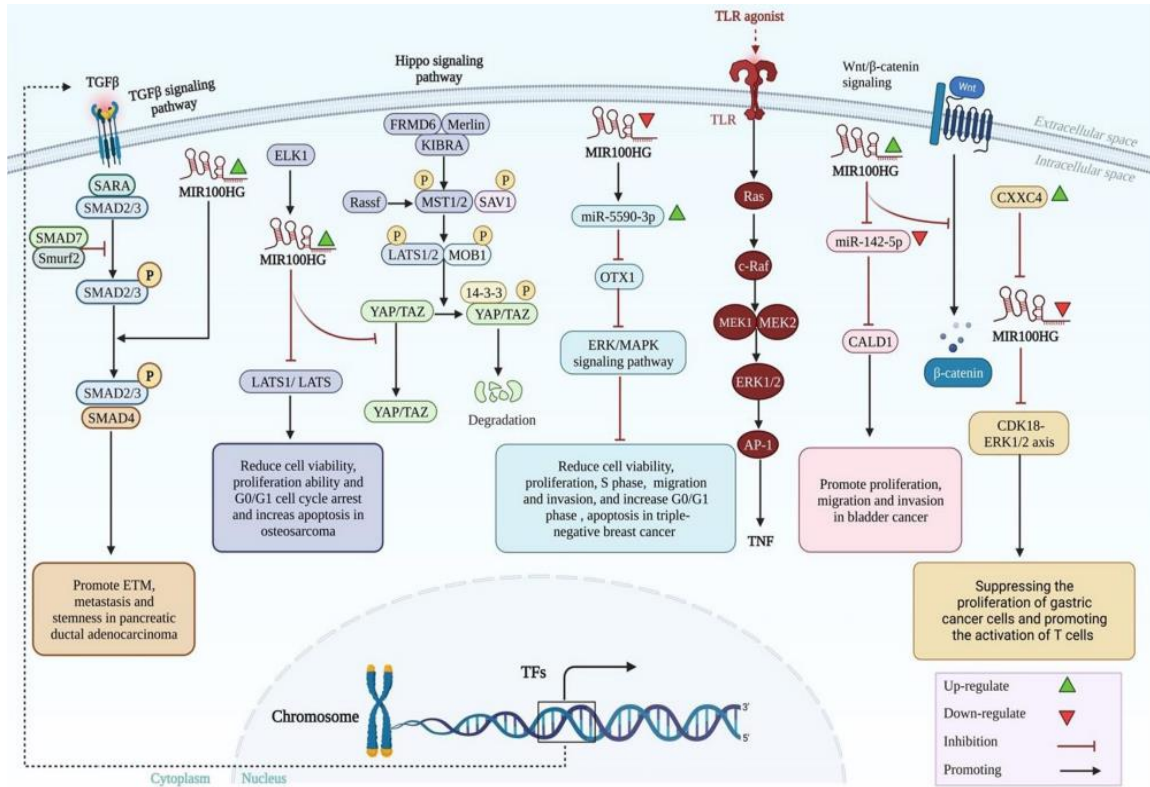
2021 yılında, MIR100HG'nin hepatosellüler karsinomda miR-146b-5p/Chromobox 6 ile olan ilişkisi hasta dokularında ve dört farklı HCC hücre hattında (Hep3B, HepG2, SK-HEP1 ve HUH-7) ekspresyon analizi ve siRNA ile susturma çalışmaları sonucunda gerçekleştirilen MTT, scratch, koloni formasyon testleriyle doğrulanmıştır. Çalışmalar sonucunda biyoinformatik analizler ile MIR100HG'nin HCC'de 1 adet miRNA (miR-146b-5p) ve 1 gen (CBX6) ile ilişkisi belirlenmiştir [18, 27].

2022 yılında transkriptom dizileme yöntemiyle ortaya çıkan verilere göre, MIR100HG; mesane kanseri hücrelerinin ilerlemesini etkilemek için miR-142-5p'yi hedefleyerek CALD1 gen ekspresyonunu düzenlemektedir [45].

Gelecekte, MIR100HG'nin kanserlerdeki rolünün aydınlığa kavuşmasıyla; kanser tanısı, prognozu ve tedavisinde MIR100HG'yi hedefleyen yaklaşımların uygulanması beklenmektedir.



Şekil 1.6: Çeşitli insan kanserlerinde MIR100HG'nin bilinen birçok düzenleyici mekanizması [27].



Şekil 1.7: MIR100HG'nin malignitelerde temel fonksiyonlarının, kritik hücre içi sinyal yollarına etkisinin şematik gösterimi [24].

MIR100HG insan gen ifadesinin ana düzenleyicisi olarak kanıtlanmıştır. Birikmiş kanıtlar, MIR100HG'nin lösemi, baş ve boyun karsinomu, meme karsinomu, pankreatik duktal adenokarsinom, osteosarkom, mide kanseri, kolorektal kanser, hepatosellüler karsinom gibi birçok malign tümörde yükseldiğini göstermiştir ve akciğer kanseri, papiller tiroid kanseri ve servikal kanser gibi birkaç tümörde düşük seviyede olduğu bulunmuştur. MIR100HG, beyin tümörü ve mesane kanserinde yükselmiş veya düşmüş durumdadır [27].

MIR100HG'nin düzenleyici mekanizmaları çok karmaşıktır ve birçok adımı içerir. MIR100HG, genellikle Wnt/ β -katenin, ERK/MAPK, TGF- β , YAP-Hippo ve diğer sinyal yolları aracılığıyla hastalıkların ortaya çıkışını ve gelişimini düzenler [46, 47, 48, 49, 50, 51, 52]. MIR100HG, proliferasyon, hücre döngüsü, apoptoz, migrasyon ve invazyon, metastaz, ilaç direnci ve EMT dahil olmak üzere çeşitli tümör hücre biyolojisi süreçlerinde onkogenik veya baskılayıcı bir rol oynamıştır [25, 53]. Aynı zamanda, MIR100HG'nin düzensiz ifadesi, kötü prognoz ve tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, prognoz ve kemoterapi direnci gibi klinik özelliklerle belirgin şekilde ilişkilidir [54]. Dolayısıyla, MIR100HG'nin umut vadeden bir hastalık tanı ve prognoz biyobelirteci ya da yeni bir tedavi hedefi olarak hizmet etmesi beklenmektedir. MIR100HG üzerine çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır ve birçok temel konunun daha detaylı şekilde ele alınması gerekmektedir [24, 35, 39, 43].

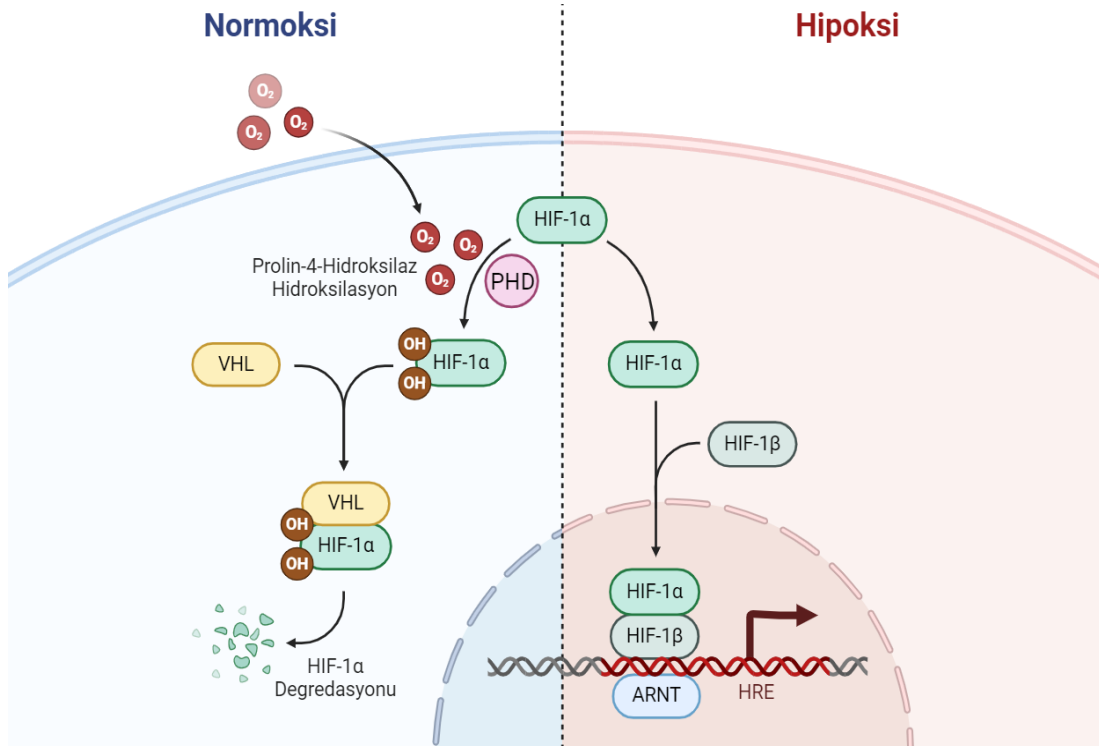
1.6 Hipoksi

Tümör mikro çevresinde kanser hücreleri anormal seviyede çoğalma, anjiyogenez, metastaz ve ilaç dirençliliği gibi özellikler gösterirler. Bu özellikleri nedeniyle hızlı şekilde çoğalma eğilimi, kanın ortamda azalmasına ve dolayısıyla oksijen miktarının düşmesine sebep olur. Katı tümör ortamları bu nedenle hipoksiktir ve hipoksi ortam, daha agresif, metastaz potansiyeli yüksek hücre gruplarını oluşturur [55].

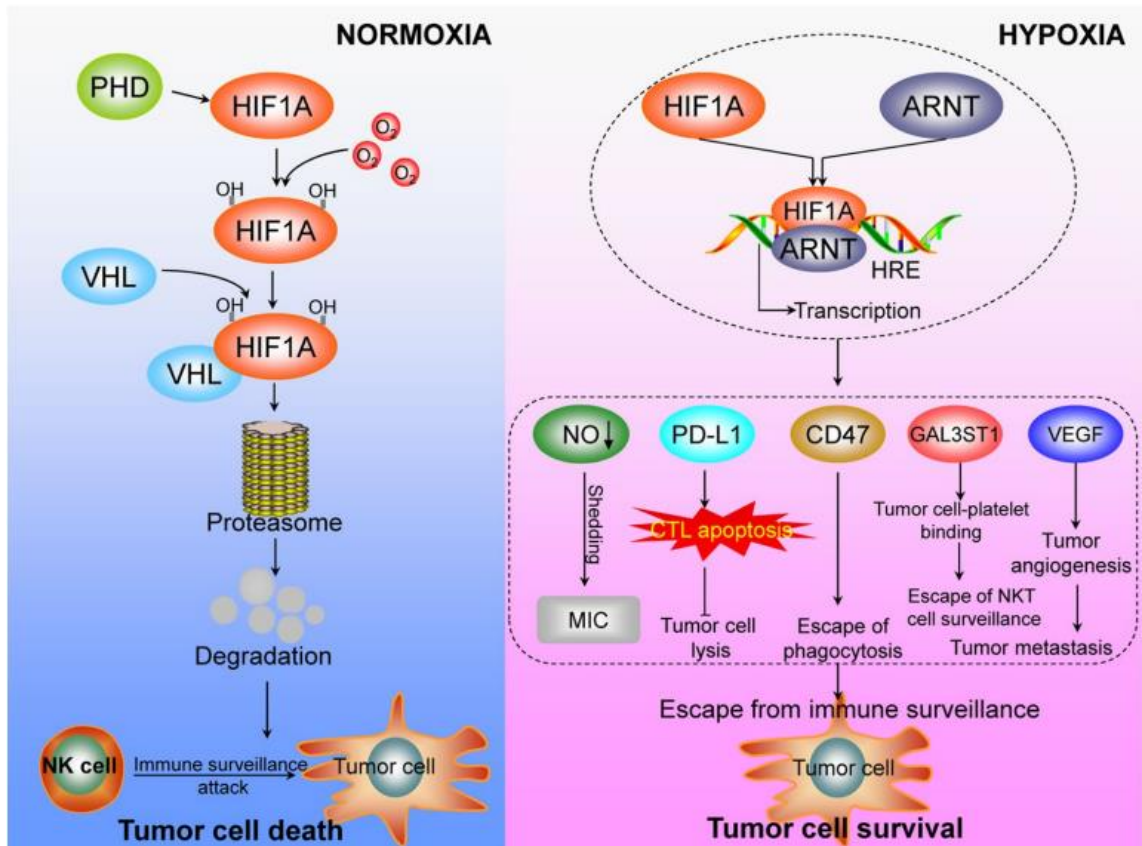
Hipoksik şartlar, kanser hücresinin yaşamaya adaptasyonu için zorunludur. Tümör hücrelerinin hayatta kalması için mikro çevresel stresine sağladığı moleküler uyum hipoksi indüklenebilir faktörlerinin (HIF-1 α ve HIF-2 α) stabilizasyonu yoluyla gerçekleşir. Yapılan çalışmalar ekspresyonlarındaki değişiklikler ile ncRNA'ların, hipoksida kanser oluşumu ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu ve tümör mikro çevresinde önemli roller oynadığını göstermiştir [13]. Hipoksik şartlar altında hücreler; programlanmış hücre ölümü mekanizmasına direnç gösterir ve aynı zamanda hücrelerin epitelden mezenseyal karaktere

geçiş (EMT), anjiyogenez, hareketlilik, invaziv ve metastatik özellikleri hızlanmaktadır [55].

Hipoksi ortamda tümör hücresinde önemli transkriptomik değişiklikler gerçekleşir ve farklı hücreyel yollar aktive olmakta ya da devre dışı kalmaktadır. Hipoksizde, Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 (HIF-1 α) ve Hipoksi İndüklenebilir Faktör II (HIF-2 α) önemli rol oynayarak hipoksik cevabın oluşmasında önemlidir. Oksijene duyarlı HIF-1 α / HIF-2 α ile sürekli sentezlenen ve hazır halde olan HIF-1 β (ARNT) alt ünitesinden oluşur [56]. Düşük oksijen koşullarında HIF yolağı aktive olur. Normal oksijen koşullarında HIF-1 α / HIF-2 α sürekli olarak degrade veya düşük ekspresyon seviyesindedir. Normal oksijen koşullarında HIF-1 α / HIF-2 α 'nın hidrosilasyonundan Prolin-4-hidroksilaz (PHD) sorumludur, düşük oksijen varlığında çalışmazlar. Von Hippel-Lindau (VHL) HIF-1 α / HIF-2 α yı tanır ve bağlanır, bu da HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın hızlı bir şekilde proteazomal parçalanmasına yol açar, böylece tümör hücrelerini bağışıklık gözetimine duyarlı hale getirir [57, 58]. Hipoksik koşullarında aktifleşen HIF-1 α / HIF-2 α , parçalanmadan korunur, çekirdeğe taşınarak HIF-1 β ile dimerize olur ve genlerin promotorlarında bulunan HRE (Hipoksik Yanıt Elementleri) bölgelerine bağlanırlar. Hedefledikleri genleri aktifleştirerek hipoksik çevrede farklı gen regülasyonlara sebep olurlar [59]. Hipoksi mekanizması Şekil 1.8'de gösterilmiştir. HIF-1 α ayrıca, bağışıklık hücrelerinin gözetiminden kaçınmayı sağlar, Nitrik Oksit (NO) sinyalini bozarak MIC (Microbial Cell Surface Components) dökülmesine neden olur. HIF-1 α -GAL3ST1-sulfatid sinyal eksenini, tümör hücre-pıhtılaşma bağlanmasını artırarak bağışıklık kaçışını teşvik eder. HIF-1 α ayrıca fagositozdan kaçışı teşvik etmek için CD47 ekspresyonunu düzenler ve tümör anjiyogenezini vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunun artırılmasıyla teşvik eder, bu da metastazı mümkün kılarak bağışıklık kaçışını kolaylaştırır [57]. HIF-1 α mekanizmasının görevleri, Şekil 1.9'da özetlenmiştir.



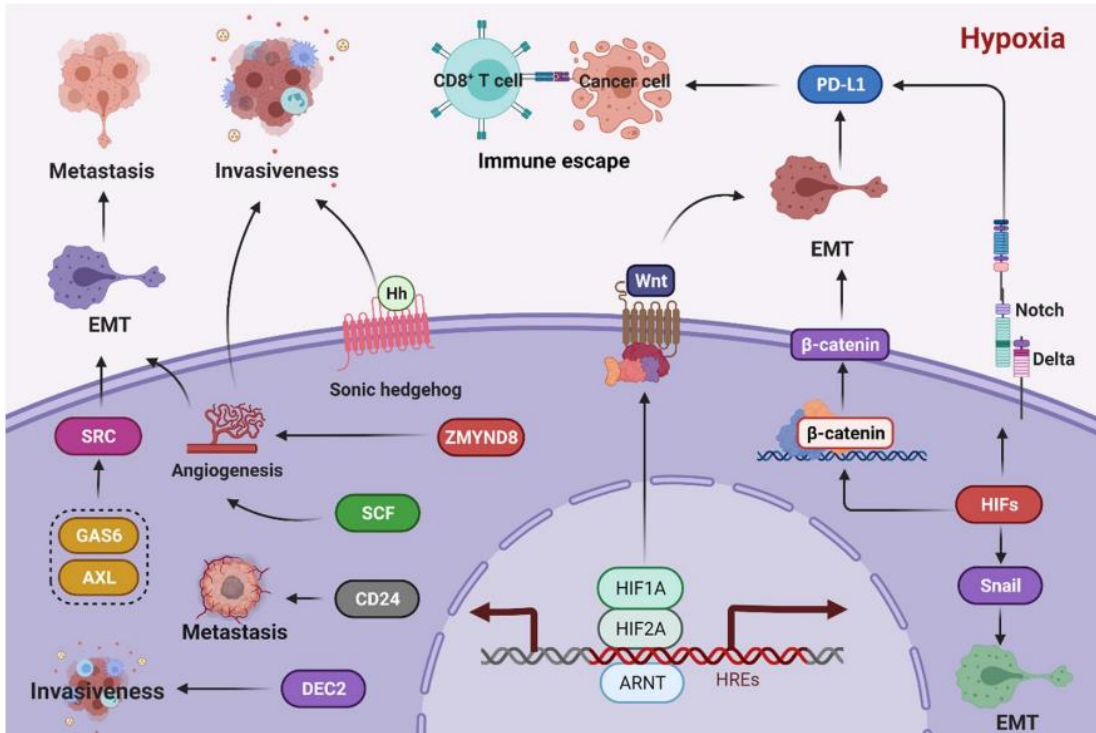
Şekil 1.8: HIF-1α mekanizması.



Şekil 1.9: Normoksi ve Hipoksi şartlarda HIF-1α mekanizması [57].

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda HIF-1 α ve hipoksik ortamın prostat, akciğer, meme kanserleri ve diğer malignan tümör tiplerinde metastaz ve tümör anjiyogenezini arttırdığı bildirilmiştir [60].

Hipoksik koşullar altında HIF-1 α , kanser hücrelerinin invaziv yeteneklerini artırmak için Sonic Hedgehog sinyal yolunu düzenler, Farklılaşmış Embriyonik Kondrosit Geni 2 (DEC2) 'ni transkripsiyonel düzeyde yukarı regüle eder ve bu da HIF-1 α aktivasyonunu teşvik ederek kanser hücresinin metabolik programlamasını, anjiyogenezini ve invazivliğini artırır. Hipoksiye bağlı HIF-1 α /2 α , β -katenin, Wnt ve Notch sinyallemesini artırarak EMT'yi teşvik eder, bu da kanser hücresi hayatta kalımını, metastazını ve immün kaçışı indükler. EMT, PD-L1'in ekspresyonunu artırarak tümör hücrelerinin immün hücreler tarafından tanınma ve saldırıdan kaçmasını kolaylaştırmaktadır. HIF-1 α /2 α 'nın bir diğer hedef geni ise ZMYND8'dir ve meme tümörünün gelişmesini artırır, kanser hücrelerinin ölümünü azaltarak kanser metastazını teşvik eder. GAS6/AXL genleri HIF-1 α /2 α tarafından aktive edilir ve düzenlenir. HIF-1 α 'nın aşırı ekspresyonu, CD24 üretimini teşvik ederek tümör büyümesi ve metastazına sebep olur. HIF-2 α , Kök Hücre Faktörü (SCF) geninin ekspresyonunu yukarı regüle ederek anjiyogenezini ve metastazını teşvik eder. [25, 53, 56].

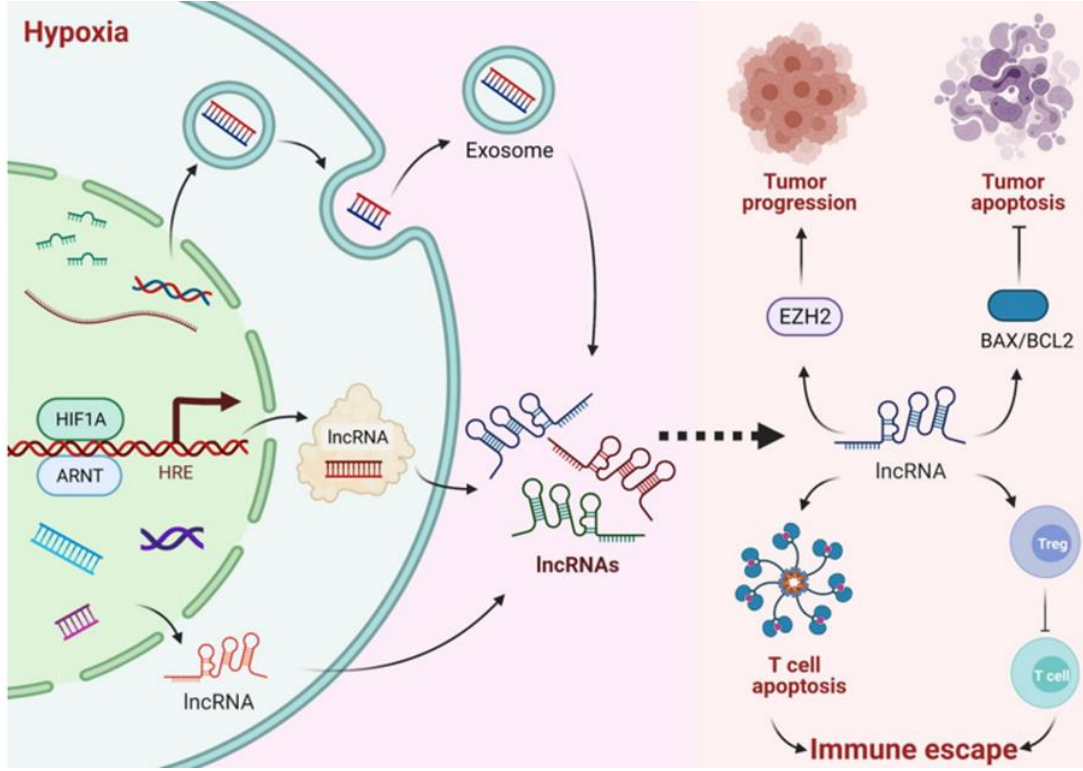


Şekil 1.10: HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kanserde rolü [57].

1.7 Hipoksi ve lncRNA

Artan alışmalar, lncRNA'ların tümör ilerlemesinin her aşamasında belirleyici roller oynadığını ve proliferasyon, g ve invazyon gibi olumsuz davranışları teşvik ettiğini göstermektedir [57]. miR-31 lncRNA geni, ağızda skuamöz hücreli karsinomda aşırı ekspresyon gösterir ve bir HIF-1 koaktivatörü olarak hareket ederek HIF-1 hedef genlerini indükler ve tümör gelişimine katkıda bulunurlar [61].

Osteosarkom (OS) hücrelerinde, HIF-1, promotor bölgeye bağlanarak lncRNA FOXD2 yanıtı karşısındaki karşılıklı zincir RNA 1 (FOXD2-AS1)'nin aşırı ekspresyonunu aracılık eder. FOXD2-AS1, Enhancer of Zeste 2 Polikompleks Baskılayıcı Kompleks 2 alt birimi (EZH2)'yi çekerek Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (CDKN1A) ekspresyonunu inhibe ederek tümör ilerlemesini hızlandırır. NEAT-1, meme kanseri hücrelerinde hipoksik koşullarda regüle olan lncRNA'lardan bir tanesidir. MALAT-1 lncRNA'sıda meme kanseri hücrelerinde metastaz, anjiyogenez ve hücre döngüsünü arttırmaktadır. H-19 lncRNA'sının hepatosellüler karsinom hücreleri ve mesane kanseri hücrelerinde hipoksik Şartlarda up-regüle olarak HIF-1 aracılığı ile metastaz ve anjiyogenezi etkilediği belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda regüle olan bir diğer lncRNA Linc-ROR'dur ve hepatosellüler kanserde hücre-hücre etkileşimini etkileyerek hipoksik koşullarda hücre canlılığını arttırmakta olduğu tespit edilmiştir. LncRNA-LET'in ise kolorektal kanser, hepatosellüler kanser, akciğer kanseri ve mesane kanseri hücrelerinde down-regüle olduğu belirlenmiştir [13].

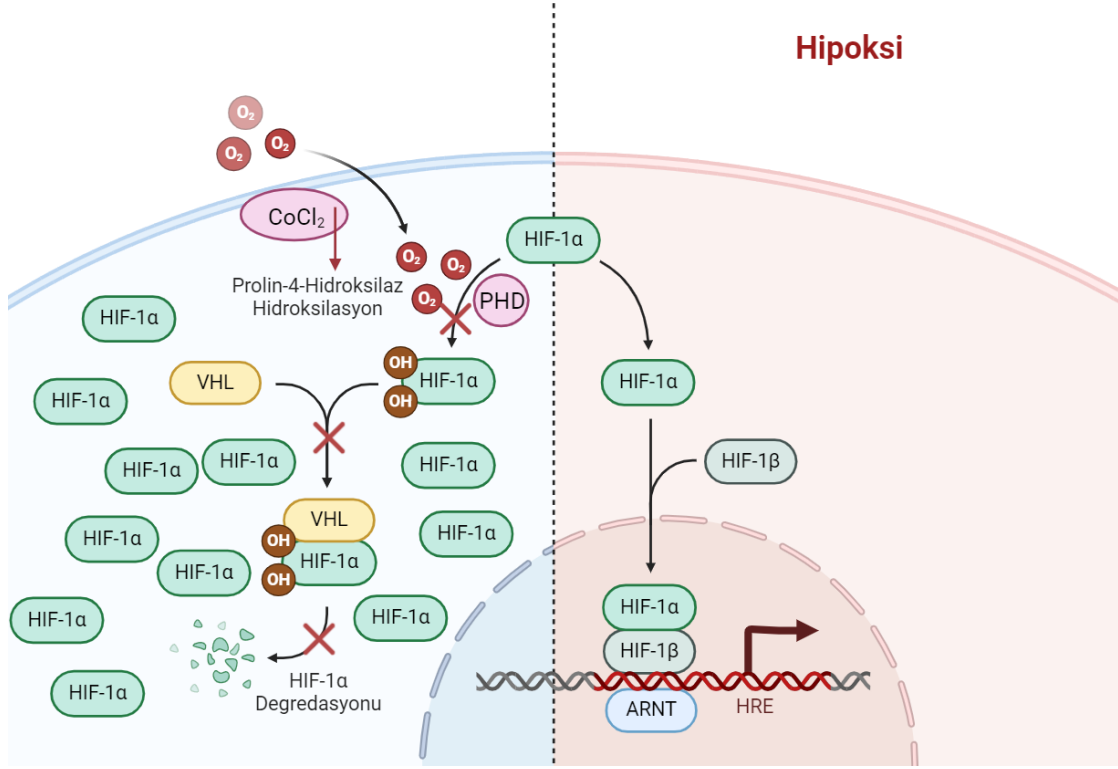


Şekil 1.11: Hipoksi ve lncRNA ilişkisi [57].

1.8 Hipoksi Oluşturma Teknikleri

1.8.1 Kimyasal İndükleme ile Hipoksi Oluşturma Teknikleri

Kobalt klorür (CoCl_2), Dimetiloksaloglisin (DMOG) ve Deferoksamin (DFO), HIF-1 α 'nın stabilizasyonunu sağlayan en etkili hipoksik taklitçiler olarak tanımlanmıştır. Bu kimyasal ajanlar, Prolin Hidroksilazların (PHD) aktivitesini engelleyerek HIF-1 α 'nın hidroksilasyonunu bozar, bu da onun stabilizasyonunu ve birikmesini sağlar (Şekil 1.12). Aynı zamanda, ubiquitine bağımlı 26S proteazomal bozunma yolağını inhibe ederler. DMOG, enzimatik aktiviteyi engellemek için 2-oksoglutaratın (PHD'lerin yardımcı substratı) bir analogu olarak hareket eder. DFO ise PHD aktivitesinde önemli bir rol oynayan Fe^{+2} 'yi şelatör olarak bağlar. Fe^{+2} eksikliği, PHD'lerin inhibisyonuna yol açar ve HIF-1 α birikiminde ve aktivitesinde artışa neden olur. DMOG ve DFO'nun aksine, Kobalt klorür daha güçlü bir HIF-1 α ve HIF-2 α stabilizasyonu sağlar. Bu nedenle, Kobalt klorür, HIF-1 α ve HIF-2 α faktörleri tarafından modüle edilen genetik yanıt çalışmalarında ve laboratuvarımızda yaygın olarak kullanılan bir kimyasal hipoksi indükleyici ajandır [62, 63].



Şekil 1.12: Kobalt klorür ile kimyasal indüklenmiş hipoksi oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi.

1.8.2 Fiziksel Hipoksi Oluşturma Teknikleri

Fiziksel hipoksik ortam oluşturmak için kullanılan teknikler; modüler inkübatörler kullanılarak %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ gibi belirli gaz karışımları ile düşük oksijen seviyeleri sağlanabilir, nitrojen infüzyonu yöntemi ile yüksek basınçlı sıvı nitrojen tanklarından gelen nitrojenin, ortamdaki oksijen ile verimli bir şekilde yer değiştirmesiyle hipoksik ortam sağlanabilir veya özel tasarlanmış hipoksi istasyonları kullanılarak, oksijen seviyesi, karbon dioksit seviyesi, sıcaklık ve bağıl nem gibi çevresel faktörler hassas bir şekilde ayarlanarak hipoksi oluşturulabilir [64]. Bu teknikler, hücre kültürü çalışmalarında hipoksik koşulların fiziksel olarak, güvenilir bir şekilde oluşturulmasına olanak sağlar.

2. TEZ ÇALIŞMASININ AMACI VE KAPSAMI

Uzun kodlanmayan RNA'lar (LncRNA'lar) kanser hücreleri içerisinde farklı basamaklarda görev almaktadır. LncRNA'ların epigenetik regülasyon, RNA splayısını düzenlemek, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu sağlamak, hücre içinde proteinlerle etkileşimlerde bulunarak protein aktivitesini kontrol etmek, protein kararlılığını arttırmak gibi görevleri oldukları bildirilmiştir. MIR100HG şimdiye kadar yapılan çalışmalarla çok sayıda çeşitli kanser tiplerinde çalışılmış, kanser gelişiminde tümör promotörü olarak rol oynadığı çeşitli ekspresyon çalışmaları ve biyoinformatik analizlerle kanıtlanmıştır. Ancak, hepatosellüler kanser hakkında literatürde yer alan mevcut çalışmalar sınırlıdır. Bu tez çalışmasında son yıllarda ilgi odağı haline gelen önemli bir lncRNA olan MIR100HG'nin hepatosellüler kanserde transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması hedeflenmiştir.

MIR100HG geninin insan hepatosellüler kanser (Hep3B ve SNU-398) ve sağlıklı karaciğer hücre modeli (Clone-9) hücrelerindeki rolü incelenmiştir. Hepatosellüler kanserde MIR100HG geninin normoksi ve hipoksi şartlardaki transkripsiyonel regülasyonu konusunda literatürde bilgi bulunmamaktadır. HCC'de MIR100HG'nin hipoksik durumlarda fonksiyonel analizleri bu tez çalışması ile ilk defa gerçekleştirilmiştir. Literatürde MIR100HG'nin susturulmasının metastatik potansiyele etkisi (susturulması sonrası invazyon ve hücre ölümü) araştırılmıştır. Ancak bu tezde yapılan çalışmalarda, daha kapsamlı bir hücre analizi gerçekleştirilmiştir (MTT, koloni formasyon, yaralanma, migrasyon–invazyon). Aynı zamanda susturma çalışmalarını doğrulamak için overekspresyon çalışmaları da yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar iki genel basamak altında toplanabilir. Bu basamakları özetleyen akış diyagramı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Birinci basamakta, MIR100HG geninin transkripsiyonel regülasyonu çalışmaları yapılmıştır.

1. MIR100HG Geninin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
 - ✓ MIR100HG geninin biyoinformatik analizleri yapılmıştır.
 - ✓ Varyant seçimi yapılmıştır ve çalışmalar Varyant 1 ile gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Varyant 1 mRNA transkripti üzerinden, forward ve reverse ekspresyon primerleri tasarlanmıştır.
 - ✓ Ekspresyon primerleri kullanılarak farklı hepatosellüler kanser hücre hatlarında (Hep3B, Huh-7, SNU-398, SNU-475) ve sağlıklı karaciğer hücre hattında mRNA düzeyinde MIR100HG ekspresyonunu belirlemek için Real-Time PCR analizi yapılmıştır.
 - ✓ Ana model, yan model ve sağlıklı model seçilmiştir.
2. Hücre hatlarında kimyasal indüklenmiş hipoksik modelin oluşturulması çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Hepatosellüler kanser hücre hatlarında (Hep3B, SNU-398) ve sağlıklı karaciğer hücre hattında (Clone-9) kimyasal indüklenmiş hipoksi modeli oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda kobalt klorür uygulaması yapılarak MTT testi ile hipoksi oluşumu için gereken konsantrasyon belirlenmiştir.
 - ✓ Belirlenen konsantrasyonda kobalt klorür uygulanan hücrelerde Real-Time PCR ile mRNA düzeyinde hipoksi oluşumu doğrulanmıştır.
 - ✓ Belirlenen konsantrasyonda kobalt klorür uygulanan hücrelerde Western Blot, IFC ve EMSA ile protein düzeyinde hipoksi oluşumu doğrulanmıştır.
3. MIR100HG geni promotor çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
- ✓ MIR100HG Promotorunun biyoinformatik analizi yapılmıştır.
 - ✓ MIR100HG Promotor primerleri tasarlanmıştır.
 - ✓ MIR100HG Promotorunun çoğaltılması ve pGEM-T Easy vektörüne PCR tabanlı klonlaması gerçekleştirilmiştir.
 - ✓ MIR100HG geni 5' delesyon mutantları oluşturulmuş ve pMetLuc vektörüne alt klonlama gerçekleştirilmiştir.
 - ✓ Sanger dizileme ile klonlama doğrulanmıştır.
 - ✓ Klonlanan promotor parçaları, büyük ölçekte üretilmiştir.
4. MIR100HG geninin transkripsiyonel regülasyonunun belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
- 4.1. MIR100HG geninin bazal aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

- ✓ Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon yöntemi kullanılarak Hep3B hücrelerinde geçici transfeksiyon yapılmıştır.
- ✓ Lusiferaz/SEAP aktivitesinin ölçülmesi ile normoksi bazal aktivite belirlenmiştir.

4.2. Hipoksinin transkripsiyonel aktiviteye etkisinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon yöntemi kullanılarak Hep3B hücrelerinde geçici transfeksiyon yapılmıştır.
- ✓ Kimyasal indüklenmiş hipoksi oluşturulmuştur.
- ✓ Lusiferaz/SEAP aktivitesinin ölçülmesi ile hipoksi bazal aktivite belirlenmiştir.

5. Hipoksik koşullarda MIR100HG geninin DNA-Protein etkileşimlerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- ✓ MIR100HG promotorunda HRE Bağlanma bölgelerinin biyoinformatik analizi gerçekleştirilmiştir.
- ✓ ChIP primerlerinin tasarlanması ve PCR ile kontrolü gerçekleştirilmiştir.
- ✓ ChIP deneyi ile DNA saflaştırılmıştır.
- ✓ ChIP ile saflaştırılan DNA'nın, Real-Time PCR analizi ile MIR100HG promotorunda HRE bağlanma bölgelerinin varlığının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

İkinci basamakta, MIR100HG geninin, Clone-9 hücrelerinde hücrel etkilerinin belirlenmesi için susturma ve overekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

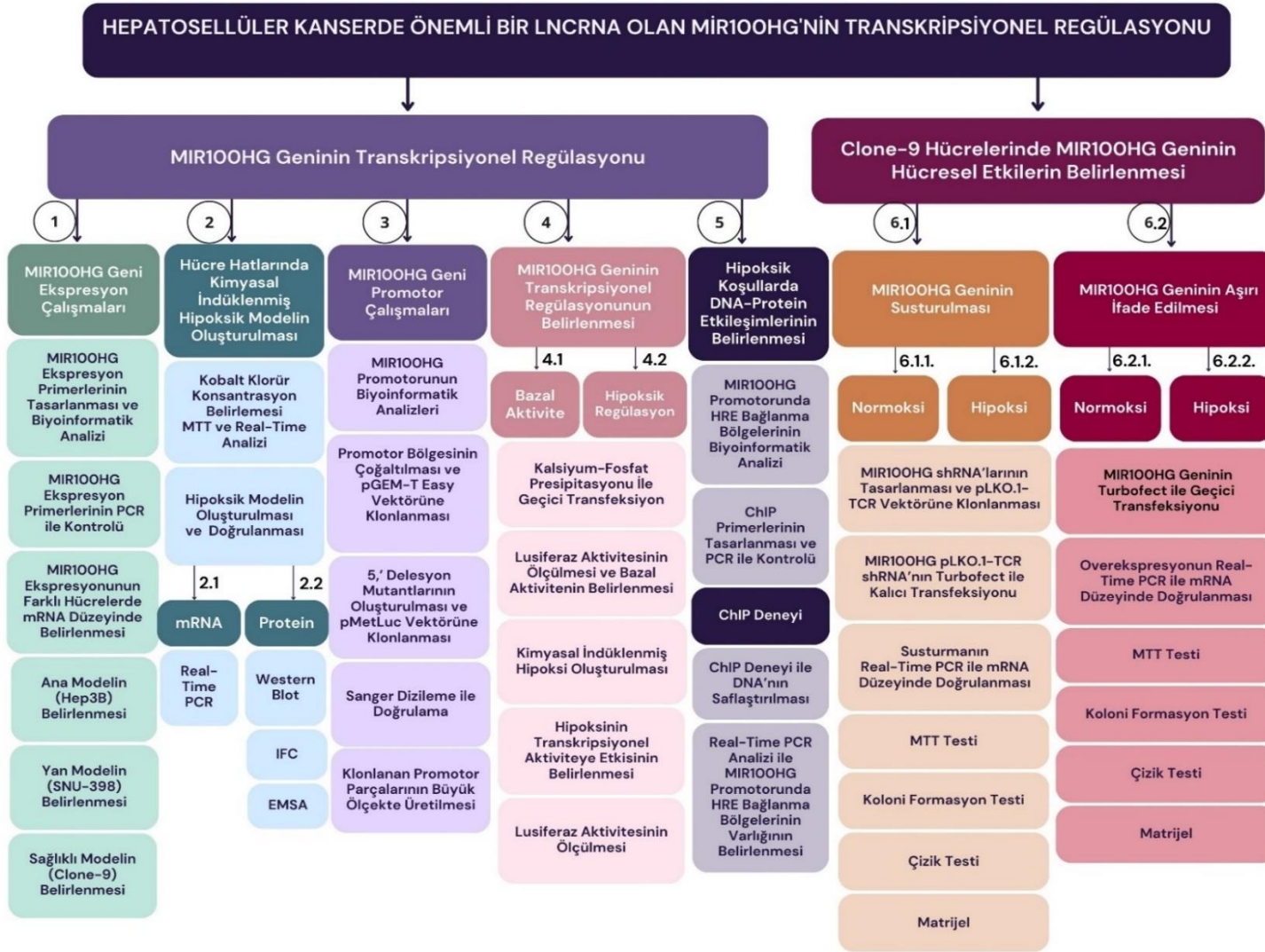
6.1 Clone-9 hücrelerinde MIR100HG geninin susturulması ile moleküler ve hücrel düzeyde karakterizasyon yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- ✓ MIR100HG genlerini hedef alan shRNA oligoları pLKO.1-TRC vektörüne klonlanmıştır.
- ✓ Kontrol olarak kullanılan pLKO.1-SCR ve pLKO.1-TRC vektöründeki MIR100HG shRNA oligoları Clone-9 hücrelerine kalıcı transfeksiyon ile aktarılmıştır.
- ✓ Deneyler hem normoksi hem de hipoksi şartlarda gerçekleştirilmiştir.

- ✓ MIR100HG geninin susturulması mRNA düzeyinde Real-Time PCR ile belirlenmiştir.
- ✓ Clone-9 hücre hattındaki MIR100HG geninin susturulmasının hücrelerin canlılığına etkisi MTT testi, göç etme yeteneğine etkisi Çizik testi, koloni oluşturma yeteneğine etkisi Koloni-Formasyon testi ve migrasyon-invazyon kabiliyetine etkisi Matrijel testi ile normoksi ve hipoksi ortamda araştırılmıştır.

6.2 Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifade çalışmaları gerçekleştirilerek moleküler ve hücresel düzeyde karakterizasyon yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- ✓ pcDNA3.1 Boş vektör ve pcDNA3.1-MIR100HG overekspresyon vektörü Clone-9 hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarılmıştır.
- ✓ Deneyler hem normoksi hem hipoksi şartlarda gerçekleştirilmiştir.
- ✓ MIR100HG geninin overekspresyonu mRNA düzeyinde Real-Time PCR ile belirlenmiştir.
- ✓ Clone-9 hücre hattındaki MIR100HG overekspresyonunun hücrelerin canlılığına etkisi MTT testi, göç etme yeteneğine etkisi Çizik testi, koloni oluşturma yeteneğine etkisi Koloni-Formasyon testi ve migrasyon-invazyon kabiliyetine etkisi Matrijel testi ile normoksi ve hipoksi ortamda araştırılmıştır.



Şekil 2.1:Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaları özetleyen iş-akış diyagramı.

3. MATERYAL-YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Materyaller

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

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

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

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

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

Kullanılan Madde	Tedarik Edilen Firma
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/mL)	Thermo Fisher Scientific
10X Taq DNA Polimeraz Tamponu	Thermo Fisher Scientific
MgCl₂ (25 mM)	Thermo Fisher Scientific
Agaroz	Sigma Aldrich
Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma Aldrich
1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
6X Yükleme Boyası	Thermo Fisher Scientific
Tris Base, Borik Asit, EDTA	Sigma Aldrich
NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit	Macharey-Nagel
NucleoBond Xtra Midi Plus Kit	Macharey-Nagel
Jelden Geri Kazanım Kiti	Thermo Scientific

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

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

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması esnasında kullanılan cihazlar ve üretici firmalar Tablo 3.5’te belirtilmiştir.

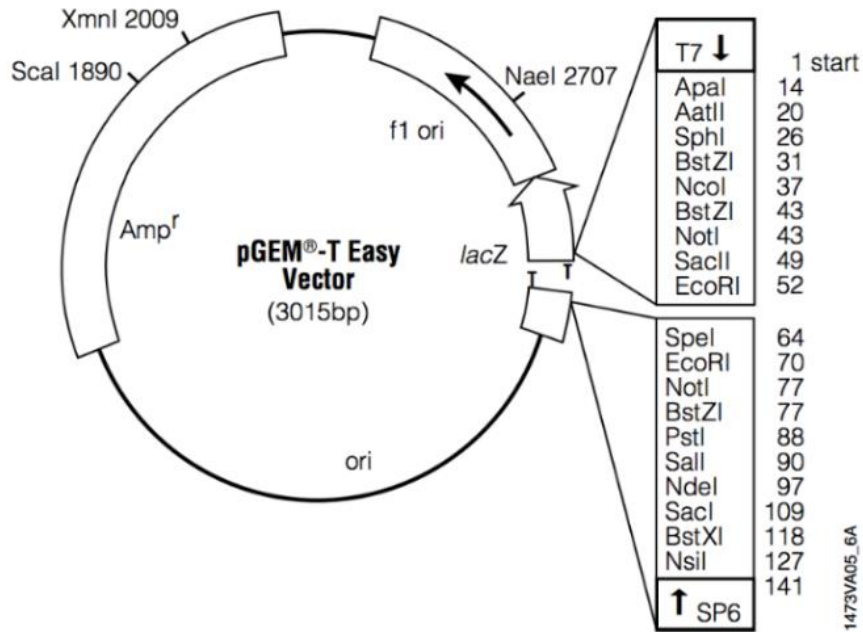
Tablo 3.5: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve üretici firmalar.

Kullanılan Cihaz	Üretici Firma
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya
CO ₂ 'li İnkübatör	Bioair
İnverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80 °C Buzdolabı	Nikon / Japonya
Buzdolabı (+4 °C / -20 °C)	Arçelik / Türkiye
Mikrodalga Fırın	Arçelik / Türkiye
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Vorteks	Velp Scientifica / İtalya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica / İtalya
Isıtıcı Blok	Major Science
Hassas Terazi	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
Saf Su Cihazı	Human Corporation
UV Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Elektrikli Pipet Pompası	IsoLab
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS Page Aparatları	BioRad
Tank- Blot Sistemi	BioRad
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific / ABD
Luminometre (Luminoskan TM Microplate)	Thermo Scientific / ABD

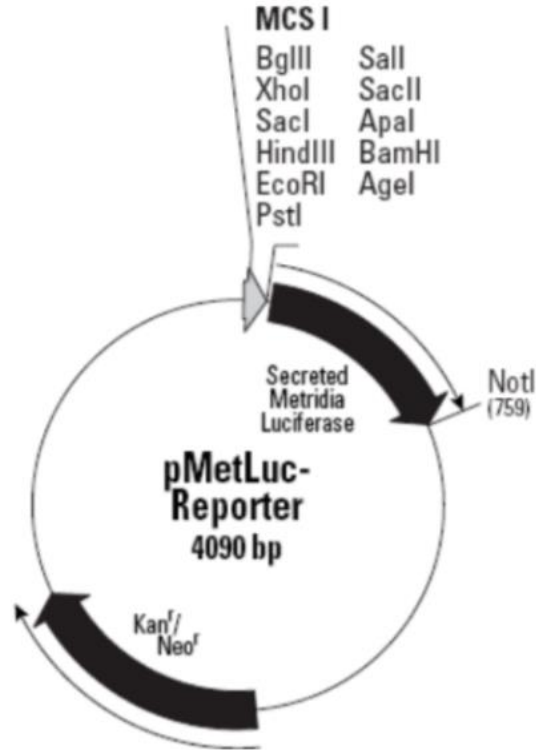
3.1.3 Kullanılan Vektör Sistemleri

Tablo 3.6: Tez çalışmalarında kullanılan vektörler, kullanım amaçları, büyüklükleri ve temin edilen firma adı.

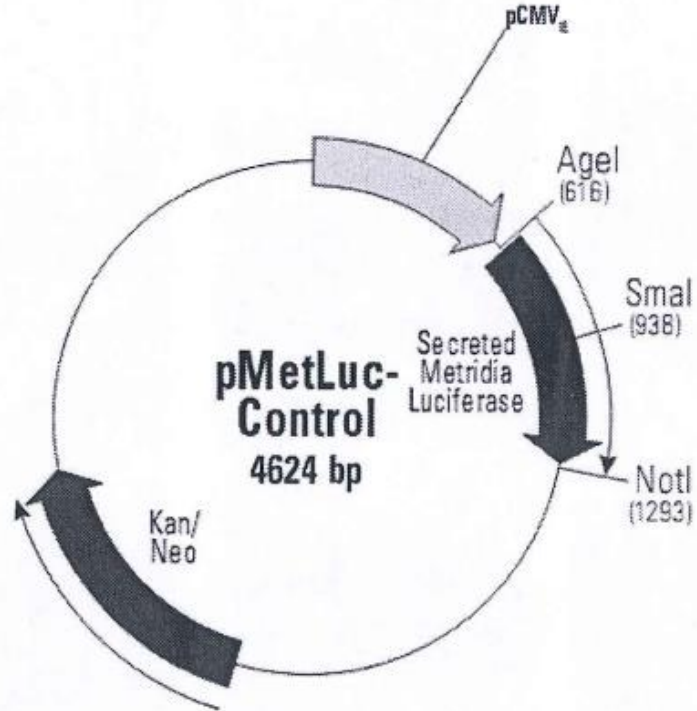
Vektörün Adı	Kullanım Amacı	Büyükük	Temin Edilen Firmanın Adı
pGEM-T® Easy	Klonlama	3015 bp	Promega
pMetLuc Reporter	Transfeksiyon	4090 bp	Clontech Laboratories
pMetLuc Kontrol	Transfeksiyon	4624 bp	Clontech Laboratories
pSEAP-2 Kontrol	Transfeksiyon	5.1 kb	Clontech Laboratories
pLKO.1-TRC	Sh-RNA	7032 bp	Addgene
pLKO.1-SCR	Sh-RNA	7064 bp	Addgene
pMD2.G	Transdüksiyon	5824 bp	Addgene
PsPAX2	Transdüksiyon	10703 bp	Addgene
pcDNA3.1	Overekspresyon	5428 bp	İnvitrogen



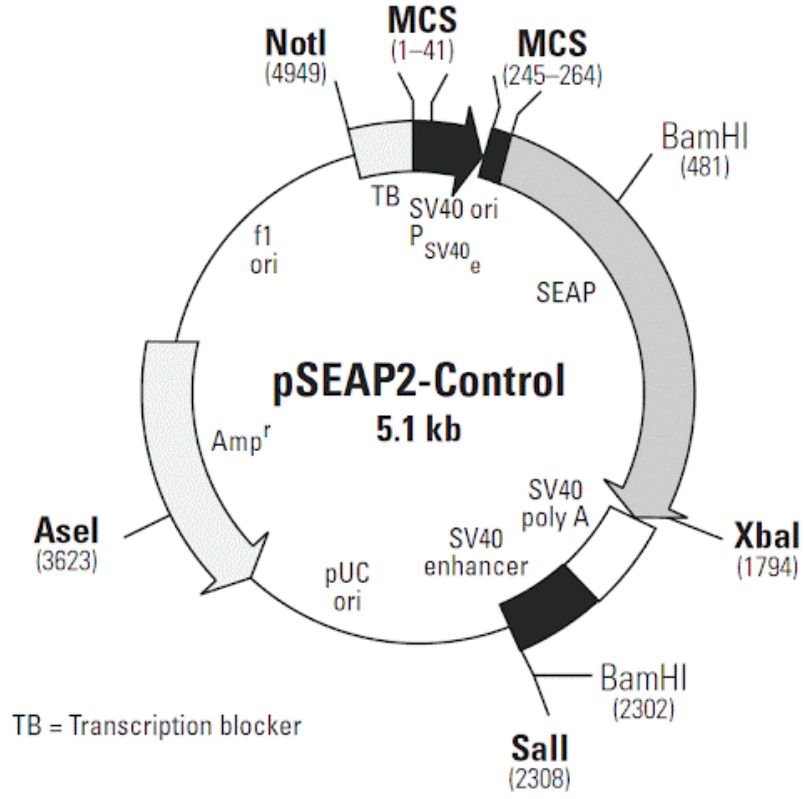
Şekil 3.1: pGEM-T®Easy vektör haritasının şematik gösterimi.



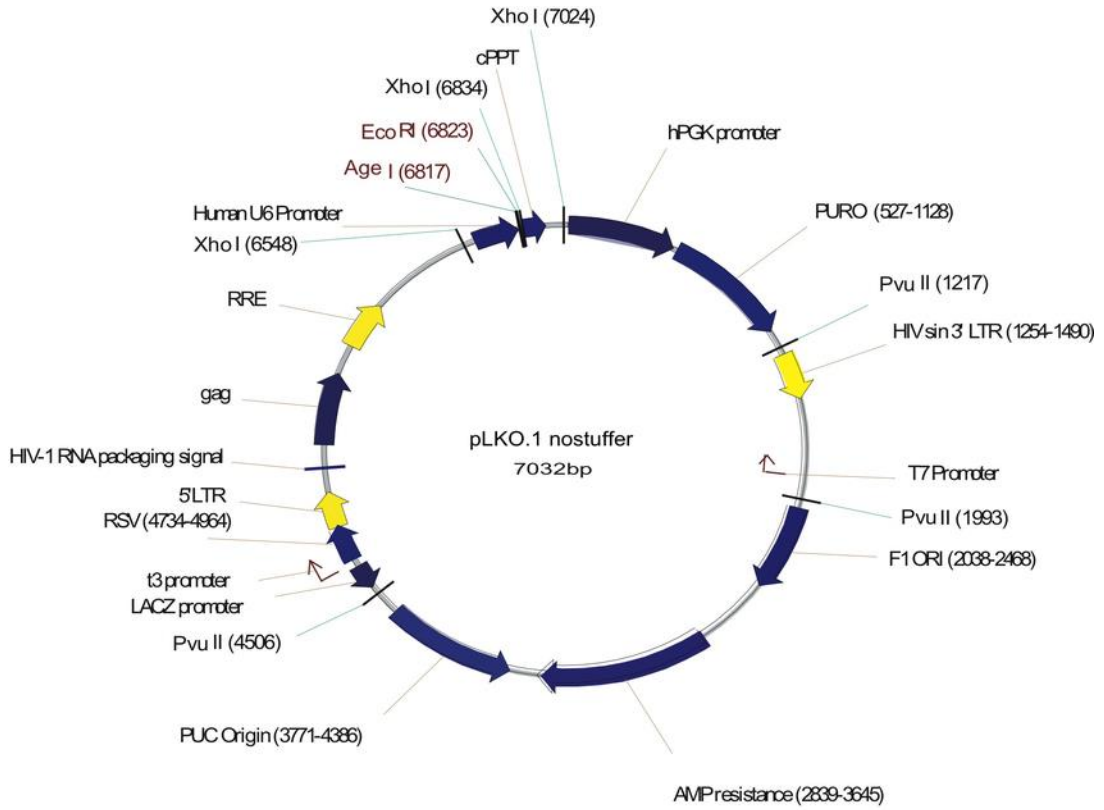
Şekil 3.2: pMetLuc Reporter vektör haritasının şematik gösterimi.



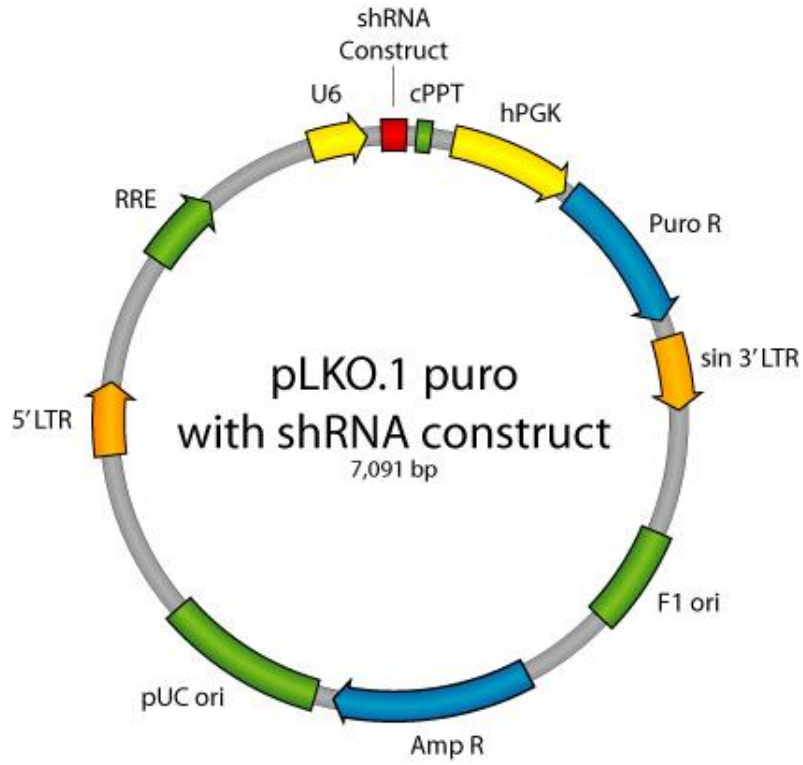
Şekil 3.3: pMetLuc Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.



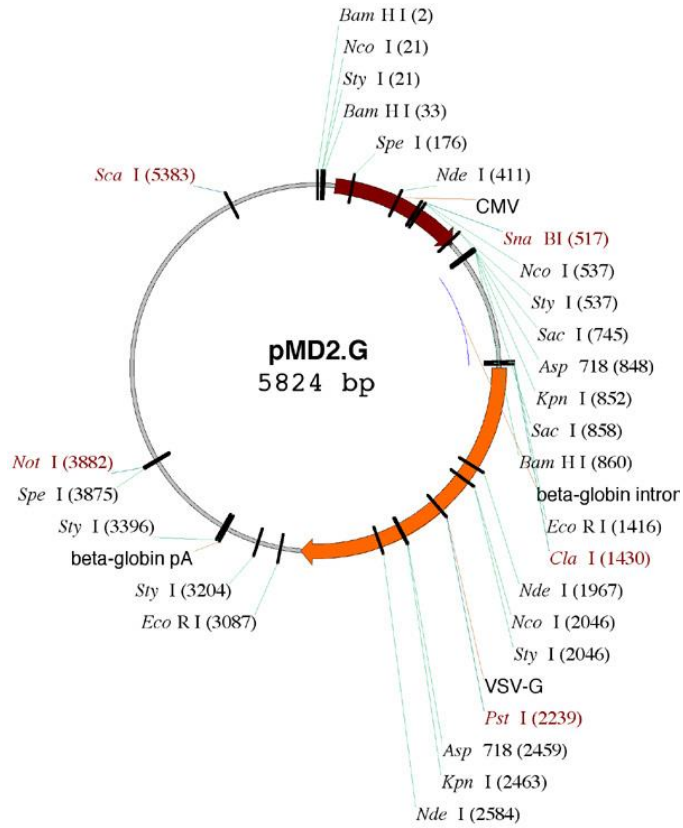
Şekil 3.4: pSEAP2-Kontrol vektör haritasının şematik gösterimi.



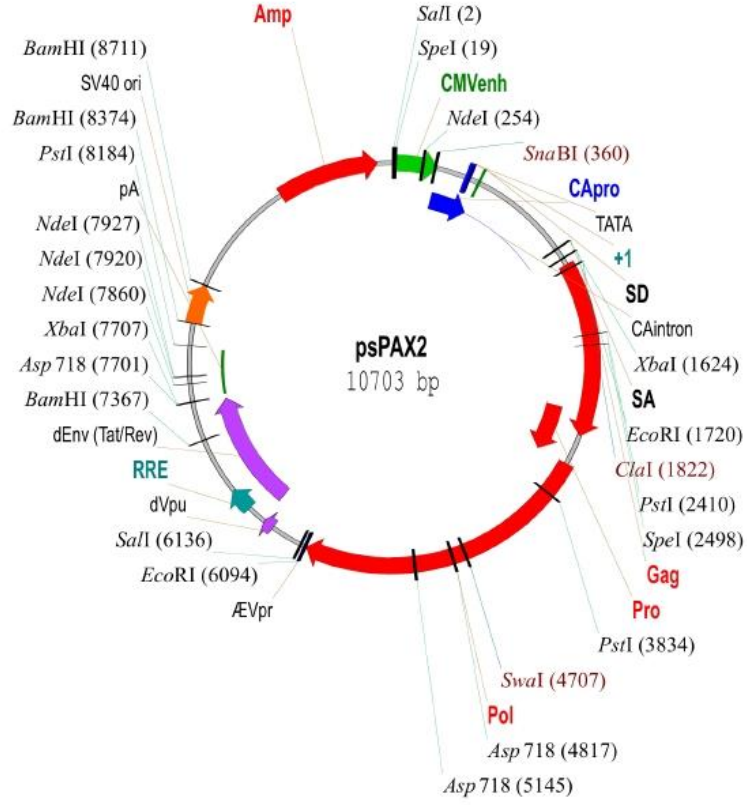
Şekil 3.5: pLKO.1 TRC (Plasmid #10878) vektör haritasının şematik gösterimi.



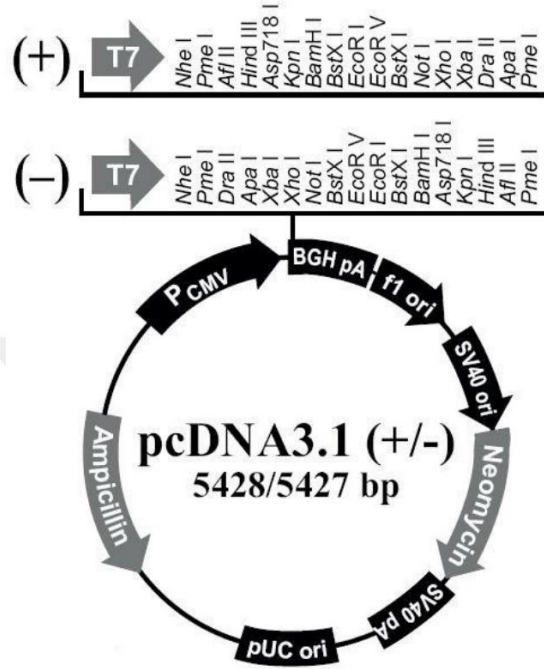
Şekil 3.6: pLKO.1 SCR (Plasmid #1864) vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.7: pMD2.G (Plasmid #12259) vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.8: psPAX2 (Plasmid #12260) vektör haritasının şematik gösterimi.



Şekil 3.9: pcDNA3.1 vektör haritasının şematik gösterimi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Klonlama Teknikleri

3.2.1.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA İzole Edilmesi

Tablo 3.7: Hep3B hücrelerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilirken kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

Çözelti	İçerik
Proteinaz K (10 mg/mL)	0.01 g Proteinaz K, 1 mL dH ₂ O ile çözülür. -20 C'de muhafaza edilir.
Sature Amonyum Asetat (NH₄Ac)	74 g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda 40 °C'de çözülür. 0.22 µM'lik filtreden geçirilir. +4 °C'de saklanır.
Nüklei Lizis Buffer	10 mM Tris-base, 400 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA (pH: 8.2). Otoklavlanır. +4 °C'de saklanır.

100 mm kültür kabında %80-90 doluluğa ulaşan Hep3B hücreleri, Tripsin-EDTA çözeltisi ile kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı. Tripsin-EDTA miktarının iki katı şeklinde %10 FBS'li medyum eklenerek 1.000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü. Medyum dökülerek uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 250 µL nüklei lizis tamponu, 20 µL %10 SDS ve 20 µL proteinaz K eklenerek süspansiyon edildi. Yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı. 10 dakika, 72 °C'ye ısıtılmış su banyosunda inkübe edildi. 175 µL amonyum asetat çözeltisi eklenerek 30 saniye boyunca çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 20 dakika, 4.500 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan süpernatant, steril bir ependorfa alındı. Alınan süpernatant miktarının 2 katı miktarda %96'lık etanol eklendi. Ependorf yavaşça alt-üst edilerek alkol ile örneğin karışması sağlandı. Bu aşamada DNA'nın belirdiği gözlemlendi. 10 dakika, 3.000 rpm'de santrifüjlendikten sonra pelet üzerine 250 µL %75'lik etanol eklenerek DNA yıkama işlemi gerçekleştirildi. 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra oluşan pelet (DNA), temiz bir peçete üzerine konuldu ve açık havada kurumaya bekletildi. Bu aşamada etanolün iyice uzaklaşması gerekir, aksi takdirde saf bir DNA elde edilemez. İyice kurutulduktan sonra pelet üzerine 100 µL dH₂O eklenerek pipetaj ile DNA çözüldü. DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrede belirlendi. Elde edilen genomik DNA, -20 °C'de sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edildi.

3.2.1.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA'nın miktarının tespit edilmesi ve saflığının tayini için Thermo Multiskan Go μ DropTM Plate Reader kullanılmıştır. Bunun için DNA örneğinden 2 μ L ve kör olarak 2 μ L dH₂O konularak DNA'nın 260 ve 280 nm absorbansları ölçüldü. A₂₆₀/A₂₈₀ oranından DNA saflığı belirlendi. DNA derişimi hesaplanırken aşağıda verilen formül kullanılmıştır:

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times (10\text{mm}/0.49\text{mm})$$

3.2.1.3 Agaroz Jel Elektrofrezinde DNA'nın Görüntülenmesi

Tablo 3.8: Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

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

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %0.8'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 0.8 g agaroz tartıldı, 100 mL 0.5X TBE tamponu içerisinde çözüldü. Mikrodalga fırında 1-2 dakika kaynatıldı. 40-45 °C'ye soğutulduktan sonra 2.5 μ L Et-Br (son konsantrasyon 0.5 μ g/mL) solüsyonu eklendi. Jel karışımı hafifçe çalkalandı. Önceden hazırlanan agaroz jel elektrofrez aparatına jel döküldü. Oda sıcaklığında jelin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra, taraklar çıkarıldı. Jel, elektrofrez tankına yerleştirildi. Tankın içi,

yürütme tamponu; 0.5X TBE ile dolduruldu. Örnekler, yükleme boyası ile karıştırılarak boyandı. Hava kabarcıklarının önlenmesi için örneklerin bulunduğu tüplere 13.500 rpm’de 10 saniye santrifüj yapıldı. Örnekler jele yüklendi. 40 dakika, 90 V’ta yürütülerek UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve değerlendirildi. Klonlama ve diğer çalışmalarda gerçekleştirilen PCR denemeleri de aynı şekilde agaroz jel elektroforezi kullanılarak yürütüldü.

3.2.1.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çoğaltılan bölgeye özel olarak tasarlanmış ve 100 pmol/ μ L’ye sulandırılmış olan ileri ve geri primerler 1’er μ L, 2 μ L 25 mM MgCl₂, 5 μ L 10X Taq Buffer (KCl), 1 μ L dNTP mix (10mM), 0.5 μ L 5 U/ μ L Taq Polimeraz Enzimi (Thermo), 1 μ L DNA (250-500 ng) PCR tüpüne miktarı çok olandan, az olana doğru eklendi ve karışım hazırlandı. Son hacim 50 μ L’ye dH₂O ile tamamlandı. Kullanılan PCR döngü şartları Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9: PCR döngü şartları.

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

3.2.1.5 Jelden DNA’yı Geri Saflaştırma

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin oluşturduğu bantlar kesilerek ağırlığı önceden belirlenen steril 2 mL ependorf tüplerine aktarıldı. Kesilen jel ependorfa konulduktan sonra, hassas terazide tartıldı. Jelden geri kazanımları gerçekleştirmek için GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) kullanıldı. Kitin içerisinde bulunan bağlanma tamponu, önerilen miktarda (100 mg jel için 100 μ L bağlanma tamponu) olacak şekilde eklendi. Tüpler, jelin eritilmesi amacıyla 55-60 °C sıcak su banyosunda inkübe edildi. Jeller tamamen eritildikten sonra, solüsyonun 700 μ L’si (Kolon hacmi) kolona yüklendi. 1 dakika 13.500 rpm’de santrifüj yapılarak kolondan geçirildi. Bu işlem erimiş jel-bağlanma tamponundan oluşan solüsyon tamamen kolondan geçirilene dek tekrarlandı. Toplama tüpünde biriken süzüntü uzaklaştırıldı. Aynı kolona, kit içeriğinde bulunan yıkama

tamponundan 500 µL eklendi. 1 dakika 13.500 rpm'de santrifüjlenerek süzüntü uzaklaştırıldı. Yıkama solüsyonu içerisinde, DNA safsızlığına neden olabilecek etanol bulunmaktadır. Solüsyonun ve içerdiği etanolün, kolon membranına tutunan DNA örneğinden iyice uzaklaştırılması için son santrifüj 2 defa daha hiçbir şey eklenmeden tekrarlandı. Kolon temiz bir 1.5 mL'lik ependorfa yerleştirildi. DNA örneğinin kolon membranından serbest bırakılması ve elüsyon alınması için önceden ısıtılmış steril dH₂O kolonun içerisinde bulunan membran üzerine 50 µL eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Jelden geri kazanımı gerçekleştirilen elüant, etiketlenerek -20 °C'de ileriki çalışmalar için muhafaza edildi.

3.2.1.6 Ligasyon

Jelden geri kazanımları gerçekleştirilen promotor konstraktlarının 3' uç kısmında Taq polimeraz enzimi tarafından eklenen Adenin bazı bulunması nedeniyle, lineer bir vektör olan ve 3' ucunda Timin kuyruğu barındıran pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlama işlemi, ligasyon aracılığı ile gerçekleştirildi (T:A klonlama stratejisi). PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektörü ile ligasyonu için PCR tüpü içerisine, 10X ligasyon tamponundan 2 µL (1X), 50 ng/µL pGEM-T Easy vektöründen 1 µL, yaklaşık 1000 ng/µL jelden geri kazanımı yapılan DNA (16 µL) ve 3U/µL'lik T4 DNA Ligaz enziminden 1 µL eklendi. Enzim eklendikten sonra, malzemelerin iyice karıştırılması amacıyla pipetaj yapıldı.

Alt klonlama için, pMetLuc (Clontech) vektörüne ligasyon işlemi, spesifik enzimlerle kesilmiş ve jelden geri saflaştırılmış DNA'lar miktarları değiştirilerek, 30 µL son hacimde, 10X ligasyon tamponundan 3 µL (1X), pMetLuc vektöründen 10 µL, 2 U/ µL'lik T4 DNA Ligaz enziminden 1 µL gerçekleştirildi.

Ligasyonlar, gece boyu 16 °C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.7 Kanamisinli veya Ampisilinli, Luria Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması

LB Agar, üretici firma tarafından önerilen prosedüre uygun şekilde tartılıp dH₂O ile son hacme tamamlanıp çözülerek hazırlandı. 20 dakika, 121 °C'de otoklavlanarak steril hale getirilip, yaklaşık 50 °C'ye getirildikten sonra içerisine, 50 mg/mL kanamisin stoğundan, son konsantrasyonu 30 µg/mL veya 100 mg/mL ampisilin stoğundan 100 mg/mL olacak şekilde eklendi. Köpürtmeden yavaşça karıştırıldıktan sonra, bek alevi etrafında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Sterilizasyonu korumak amacıyla petriler

parafilmledi. Petrilerin içerisine eklenen antibiyotiklerin ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra petriler, +4 °C buzdolabına ters çevrilerek yerleştirildi.

Luria Broth üretici firmanın önerdiği şekilde tartılıp, dH₂O ile 1L'ye tamamlanıp çözülene dek çalkalandı. 20 dakika, 121 °C'de otoklavlanarak steril hale getirildi. Ardından, parafilmlelenerek +4 °C'de saklandı.

3.2.1.8 DH5α Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi ve Kontrolü

DH5α, laboratuvarında sık olarak kullanılan bir *E. Coli* suşudur. Klonlamada yaygın olarak kullanılma nedenleri olarak; Taşıdığı *Lac Z* geni sayesinde mavi/beyaz koloni taramasına olanak tanır, *RecA1* (Rekombinasyon ve DNA onarımı için gerekli olan DNA'ya bağımlı ATPaz'daki mutasyon) mutasyonu nedeni ile yüksek kesici uç stabilitesine sahiptir, *endA* (Endonükleaz I mutasyonu) mutasyonu nedeniyle yüksek DNA verimi ve kalitesi sunar, yüksek dönüşüm verimliliğine sahiptir, kalsiyum klorür (CaCl₂) yöntemi kullanılarak alıcı hale kolayca getirilebilmesi sayılabilir.

Klonlamada kullanılacak DH5α hücreleri, antibiyotik içermeyen 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yöntemiyle ekildi ve 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Ertesi gün, antibiyotik içermeyen 100 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine, 5 mL ön kültür inoküle edilerek, gece boyunca 37 °C çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Spektrofotometrede optik yoğunluk ölçümü yapıldı. OD₆₀₀=0.5-0.6 değerleri arasına ulaştığında, bakteri süspansiyonu +4 °C'de 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant pipetle alınarak başlangıç hacminin yarısı kadar olacak şekilde 0.5M CaCl₂ solüsyonu ile nazikçe çözüldü. Buz üzerinde 25 dakika inkübe edildikten sonra, 5.000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Başlangıç hacminin 1/10'u olacak şekilde 0.5M CaCl₂ eklenerek pelet nazikçe çözüldü. 1-4 saat buz üzerinde sessiz bir ortamda bekletildi. Daha sonra eşit hacimde %40'lık steril gliserol ile karıştırılarak buz üzerinde önceden soğutulmuş olan ependorflara 200'er µL'lik alikotlar yapıldı. -80 °C'de saklandı.

3.2.1.8.1 Kompetan Hücrelerin Etkinliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan DH5α kompetan hücrelerinin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kontrol transformasyonu yapıldı. Bu amaçla; 0.1 ng, 1 ng ve 10 ng olacak şekilde farklı konsantrasyonda hazırlanan kontrol vektörleri Bölüm 3.2.1.9'da anlatıldığı şekilde kompetan hücrelerine transforme edildi. 1-4 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe

edildi. Transformasyon kültürü 1.5 mL'lik ependorfa alındı. 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet 100 µL LB Broth ile çözelerek petriye damla damla eklendi ve tek kullanımlık steril öze yardımıyla yayıldı. Petriler ters bir şekilde 37 °C inkübatöre yerleştirilip gece boyu inkübe edildi. Gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi ve ertesi gün petrilere oluşan koloniler sayıldı. Aşağıda verilen formül kullanılarak, hazırlanan DH5α kompetan hücrelerinin etkinliği hesaplandı:

$$\text{Kompetan Etkinliği} = \frac{\text{Sayılan Koloni Sayısı (CFU)}}{\text{Petriye ekilen kontrol DNA konsantrasyonu}} \times \frac{1 \times 1000}{\mu\text{g}}$$

3.2.1.9 Transformasyon

Hazırlanıp -80 °C'de muhafaza edilen DH5α kompetan hücreleri, çıkarılıp eriyik hale gelene dek buz üzerinde inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 5 µL ligasyon örneği yavaşça eklendi. 40 dakika buz üzerinde, 2 dakika önceden 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda sonrasında tekrar buz üzerinde 2 dakika olacak şekilde ligasyon ürünü eklenen kompetan hücrelerine geçirgenliklerini arttırmak için (porların açılıp-kapanmasını sağlamak) ısı şoku uygulandı. Bek alevi yanında, önceden 15 mL'lik falkona 800 µL olacak şekilde bölünen ve 37 °C'ye ısıtılan LB Broth içerisine kompetan hücreler eklendi. 45°'lik açıyla ve falkonun ağzı hafif açık olacak şekilde çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi; oksijen girişı ve oksijen ile temas edilen yüzeyin arttırılması amacıyla açı önemlidir. 1-4 saat kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Transformasyon kültürü 1.5 mL'lik ependorfa alındı. 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet 100 µL LB Broth ile çözümlenerek petriye damla damla eklendi ve tek kullanımlık steril öze yardımıyla yayıldı. Petriler ters bir şekilde 37 °C inkübatöre yerleştirilip gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün gözlenen kolonilerin rekombinant olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, seçilen koloniler tek koloni ekim yöntemiyle ekilerek büyütüldü. Büyütülen kolonilerden izole edilen plazmit DNA'lar, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesildi ve jel elektroforezinde görüntülemesi gerçekleştirildi.

3.2.1.10 Gliserol Stok Hazırlanması

30 µg/mL Kanamisin veya 100 mg/mL Ampisilin antibiyotiği içeren LB sıvı besiyeri içerisine tek koloni ekimi gerçekleştirilerek ön kültür hazırlandı. Bek alevi yanında ependorflara ön kültür ile eşit hacimde steril %40'luk gliserol eklenerek elde edilen gliserol stoklar -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1.11 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kontrol Kesimi

Kesim işlemleri için pGEM-T Easy vektörün, promotör DNA parçalarının ve pMetLuc vektörün kesim bölgelerine dikkat edilerek en uygun restriksiyon enzimleri olan XhoI ve HindIII enzimleri seçildi (Bakınız Ek C). Restriksiyon enzimlerinin çalışabilmesi için her iki enzime de uygun olan tamponun belirlenmesi, www.thermoscientificbio.com adresinden gerçekleştirilmiştir.

Son hacmi 50 µL olacak şekilde, 1 µg DNA/Plazmit, FastDigest (Thermo) XhoI ve HindIII enzimleri 1U/µL, 5 µL 10X FastDigest Green Buffer (Thermo) karışımı hazırlandı. Karışım dH₂O ile 50 µL'ye tamamlandı. Kesim işlemi 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Süre sonunda, kesim örnekleri boya ile karıştırılarak jele yüklenmiş, %1'lik Agaroz jel elektroforezinde 90 V'ta 40 dakika yürütülmüştür. UV görüntüleme cihazında görüntüledikten sonra doğru büyüklükte banta sahip olduğu düşünülen örnekler, klonlamaların doğrulanması amacıyla dizi analizine gönderilmiştir. Dizileme sonuçları Bioedit 7.2 Programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.1.12 Küçük Ölçekli Plazmid İzolasyonu

İzole edilecek plazmidi içeren bakteri stoklarından 10 mL'lik ön kültür hazırlandı. Hazırlanan kültür 5 dakika, 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst kısımda bulunan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Bakteri pelletinden Miniprep Kit (NucleoSpin Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel) protokolünde belirtilen işlem basamakları uygulanarak izolasyon gerçekleştirildi. Ön kültürden elde edilen pelet kit içerisinde bulunan 250 µL Resüspanسیون tamponunda çözüldü. 250 µL Lizis tamponu eklenerek viskoz ve sümüksü bir yapının oluşması sağlandı. 350 µL nötralizasyon tamponu eklenerek 13.500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant dikkatlice kolona aktarıldı. 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem süpernatant bitinceye dek tekrar edildi. Kolona 500 µL yıkama tamponu eklendi. 1 dakika 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı. Yıkama bir kez daha tekrarlandı. Etanol kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla kolon boş olarak santrifüjlendi. Kolon temiz bir ependorfa alındı. 40 µL önceden ısıtılmış dH₂O eklenerek elüsyon alındı. İzole edilen plazmidin, spektrofotometrik miktarı belirlendi ve örnekler agaroz jel elektroforezinde görüntüledi.

3.2.1.13 Büyük Ölçekli (Midi Prep) Plazmid İzolasyonu

Transfeksiyon çalışmalarında endotoksinlerden uzaklaştırılmış ve yüksek konsantrasyonda plazmit DNA'nın saflaştırılmasında kullanılan büyük ölçekli plazmit izolasyonu stratejisi kullanıldı. Midi prep Kit (NucleoBond® Xtra Midi Plus, Macherey-Nagel) protokolünde belirtilen işlem basamakları uygulanarak izolasyon gerçekleştirildi. Spektrofotometrik miktar belirlendi ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Elde edilen büyük ölçekli plazmid izolasyonları sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.1.14 MIR100HG Geni sh-RNA Oligolarının pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması

MIR100HG geninin ifadesinin baskılanmasının hücreler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla proje kapsamında Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında MIR100HG genini susturma çalışmaları gerçekleştirildi. Bu tez kapsamında, Clone-9 hücre hattında gerçekleştirilen deneyler yapılmıştır. Bu amaçla MIR100HG geni pLKO.1-TRC vektörü içerisine Addgene protokolüne göre klonlanacaktır. Prosedür için uygulanması gereken adımlar aşağıda verilmiştir.

3.2.1.14.1 MIR100HG Genine Ait sh-RNA Oligolarının Belirlenmesi

Öncelikle MIR100HG genindeki optimal 21-mer hedeflerini belirleme çalışmaları Whitehead Biyomedikal Araştırma Enstitüsü'sünün sunmuş olduğu siRNA Seçim Programı kullanılarak (http://sirna.wi.mit.edu/siRNA_search.cgi?tasto=243146683) yapılmıştır. MIR100HG genine özgü shRNA oligolarının belirlenmesi için BLAST analizleri gerçekleştirilmiştir. Dört sh-RNA oligo belirlenmiş ve sipariş edilmiştir. Belirlenen sh-RNA oligo primerleri Tablo 3.10'da belirtilmiştir.

Tablo 3.10: MIR100HG genine özgü tasarlanan sh-RNA oligoları ve dizileri.

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

3.2.1.14.2 Sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi (Annealing)

Sipariş edilen oligolar, dH₂O içerisinde 20 µM olacak şekilde sulandırılarak yeniden süspansiyon edildi. Ardından 5'şer µL Forward ve Reverse Oligo, 5 µL 10X NEB tamponu-2, bir PCR tüpüne eklenerek, son hacim 35 µL dH₂O ile tamamlandı ve birleştirme reaksiyonu kuruldu. Kurulan reaksiyon, 4 dakika 95 °C'de inkübe edildi. Ardından 10 dakika 70 °C'de inkübe edilerek birkaç saat oda sıcaklığında yavaşça soğutuldu. Bu işlem sonunda sh-RNA oligolarının birleştirilmesi sağlandı.

3.2.1.14.3 pLKO.1-TRC Vektörünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Birleştirme basamağından sonra, pLKO.1-TRC klonlama vektörünün hazırlanması için üreticinin önerdiği şekilde AgeI ve EcoRI enzimleri ile kesim gerçekleştirildi. Kesim reaksiyonu için 6 µL pLKO.1-TRC klonlama vektörü, 5 µL 10X NEB Buffer-1, 1 µL AgeI enzimi, 1 µL EcoRI enzimi eklenerek bir karışım hazırlandı. Karışımın son hacmi 50 µL ye dH₂O ile tamamlanarak kesim reaksiyonu kurulmuştur. Kurulan reaksiyon 37 °C'de iki saat inkübe edildi. Reaksiyon ürünü, agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Biri 7 kb, biri 1,9

kb olmak üzere iki bant gözlemlendi. 7 kb'de görüntülenen bantlar kesilerek, GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) ile geri kazanıldı. Spektrofotometrede 260 nm'de absorbans ölçülerek DNA miktarı belirlenmiştir.

3.2.1.14.4 pLKO.1-TRC Vektörü ve MIR100HG sh-RNA Oligolarının Birleştirilmesi

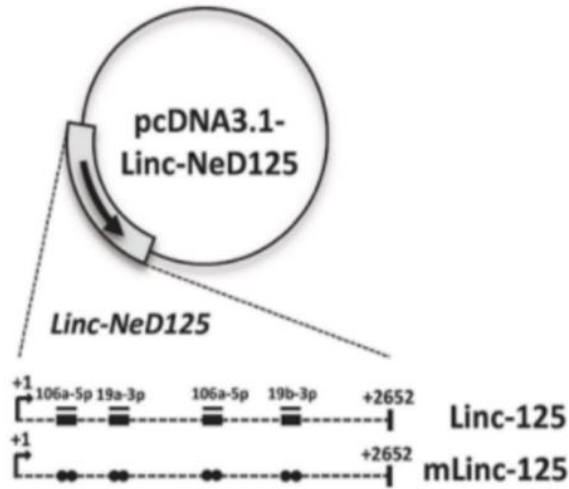
Klonlama için hazırlanan MIR100HG shRNA oligoları ve pLKO.1-TRC Vektörü ile ligasyon reaksiyonu kurulmuştur ve kompetant hücrelerine transformasyon gerçekleştirilmiştir. 2 µL annealing ve 1 µL pLKO.1-TRC vektörü, 2 µL 10X NEB T4 ligasyon tamponu, 1 U/µL T4 DNA Ligaz enzimi, 14 µL dH₂O eklenerek 16 °C'de bir gece inkübe edilerek ligasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ligasyon ürününün 5 µL'si DH5α kompetan hücrelerine transforme edilmiştir ve ampisilin içeren petriye, tek koloni yöntemi ile ekilmiştir, 37 °C'de gece boyu ters olarak etüvde bekletilmiştir ve koloni oluşumu gözlenmiştir. pLKO.1-TRC vektörüne klonlanan MIR100HG genine özgü shRNA oligo kolonileri ve NucleoSpin Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel) kitinin önerdiği şekilde plazmid DNA izolasyonu küçük miktarda gerçekleştirilmiştir. DNA miktarı spektrofotometrik ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.14.5 pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlamanın Kontrolü

Plazmit izolasyon kitinin (NucleoSpin Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel) önerdiği şekilde izolasyon gerçekleştirildikten sonra plazmidler, EcoRI ve NcoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim kurulmuştur. 1 µg izole edilen miniprep DNA, 2 µL 10x NEB tamponu, 0.8'er µL NcoI ve EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ve dH₂O eklenerek reaksiyonun son hacmi 50 µL'ye tamamlanmıştır ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülenmiş ve rekombinant kolonilerde, 2 kb ve 5 kb'de iki bant gözlenmiştir. Görüntülenen sonuçların marker ile karşılaştırılmasından sonra doğru boyutta olduğu tespit edilen bantlara sahip örnekler, klonlamanın doğrulanması için dizi analizine gönderilmiştir. Dizileme sonuçları Bioedit 7.2 Programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.1.15 MIR100HG-pcDNA3.1 (Aşırı ifade) Vektörlerinin Hazırlanması

İçerisine MIR100HG geni klonlanan pcDNA3.1-LincNed125-1y (MIR100HG) vektörü; Dr. Elisa Caffarelli, CNR, Moleküler Biyoloji ve Patoloji Enstitüsü, Roma, İtalya'dan plazmid halinde temin edilmiştir. Plazmid, transformasyon ile DH5α hücrelerine verilmiştir, ardından ampisilinli LB agar besiyerine yayılarak, petriler 37 °C etüv de ters bir şekilde gece boyu inkübe edilmiştir ve koloni oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen kolonilerden ampisilinli LB brotha ekim yapılmıştır ve gliserol stokları hazırlanarak -80 °C'de stoklanmıştır. MIR100HG aşırı ifade deneylerinde kontrol olarak gen içermeyen pcDNA3.1 (Invitrogen) vektörü kullanılmıştır.



Şekil 3.10: pcDNA3.1-LincNed125-1y (MIR100HG) vektörü; Dr. Elisa Caffarelli [33].

pcDNA3.1-LincNed125- 1y aşırı ifade vektörü ve kontrol olarak kullanılan gen içermeyen pcDNA3.1 vektörü (Invitrogen) -80 °C'de muhafaza edilen gliserol stoklarından, ampisilinli LB agara tek koloni yöntemi kullanılarak ekim yapıldı. Petriler 37 °C'de ters bir şekilde gece boyu inkübe edildi ve koloni oluşumu gözlendi. Plazmidlerin transfeksiyon ile hücrelere aktarılması için plazmid DNA'ların yüksek konsantrasyonda olmaları gerekmektedir. Bu nedenle, tek koloni ekimi yapılan vektörlerden, 1'er koloni seçilerek ampisilinli LB brotha ekildi ve 37 °C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Kültürlerden büyük hacimde plazmid izolasyonu, üreticinin önerdiği şekilde (NucleoBond® Xtra Midi Plus, Macherey-Nagel) ve yüksek saflıkta gerçekleştirildi. Hazırlanan midiprep plazmid izolasyonları ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1 Steril Çalışma Alanının Oluşturulması

Hücre kültürü çalışmaları öncesinde, düzenli olarak haftalık hücre kültürü temizliği gerçekleştirildi. Laboratuvar yüzeylerinin temizliği ve dezenfeksiyonu için çamaşır suyu kullanıldı. Bu, virüsler, bakteriler, mantarlar ve sporlar üzerinde etkili bir temizlik sağlar. Mikroorganizmaların inaktivasyonunu sağlamak amacıyla %70'lik alkol de kullanıldı.

Geniş spektrumlu bir dezenfektan olan Virkon, laboratuvar yüzeyleri ve ekipmanların dezenfeksiyonunu sağlamak için kullanıldı. Temizlik ürünleri, üretici firmaların protokollerine uygun olarak ve belirtilen yönergeler doğrultusunda kullanıldı. Bu adımlar, laboratuvar ortamının hijyenini ve çalışma koşullarının güvenliğini sağlamak için önemlidir.

Hücre kültüründe kullanılan cihazların ve yüzeylerin steril edilmesi amacıyla laboratuvar UV ışığı ve Laminar Flow kabininin UV ışığı kullanıldı. Çalışma sırasında kullanılan malzemeler %70 alkol ile silinerek kabin içine alındı.

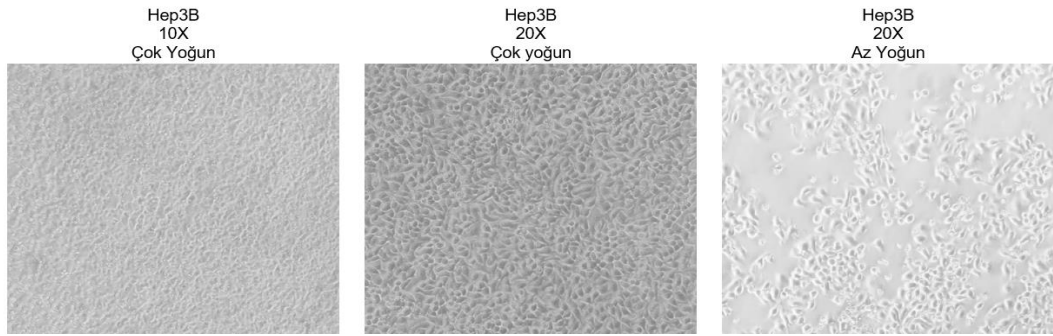
RNA çalışmalarında ise, %70'lik alkol ile %1'lik DEPC'li su kullanılarak sterilizasyon ve RNaz enziminin etkisiz hale getirilmesi sağlandı. Bu önlem, RNA'nın doğru analiz edilmesi için kritiktir. Ayrıca, çalışma sırasında nitril eldivenler tek kullanımlık olarak düzenli aralıklarla değiştirilerek kullanıldı. Bu yöntemler, kontaminasyon riskini azaltmakta ve deney sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır.

3.2.2.2 Ekipmanların Sterilizasyonu

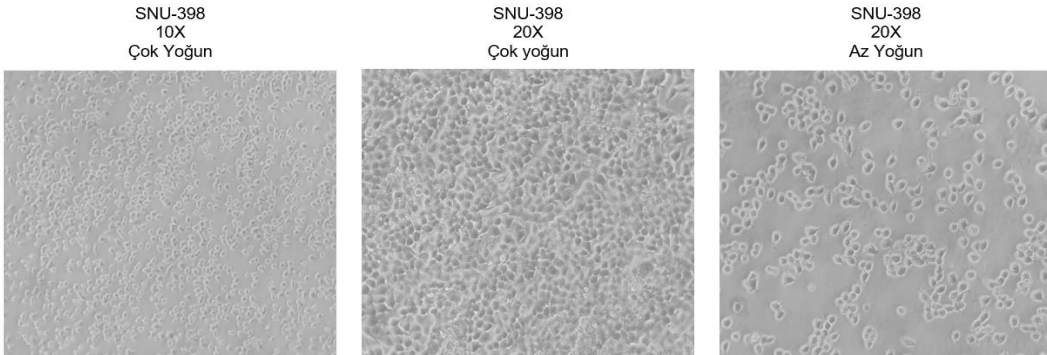
Hücre kültüründe kullanılan falkonlar ve hücre büyütme petrileri ticari olarak steril edilmiş şekilde satın alındı. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ependorflar, solüsyon şişeleri, pipet uçları, ısıya dayanıklı tamponlar ve solüsyonlar 121 °C yüksek sıcaklık ve basınç altında otoklavlanarak steril edildi. Otoklav sonrasında malzemeler etüve yerleştirilerek 80 °C'de kurutuldu. Isıya dayanıklı olmayan çözeltilerin sterilizasyon işlemi için Laminar Flow kabininde 0.22 µm'lik filtreden geçirme işlemi uygulanmıştır.

3.2.2.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

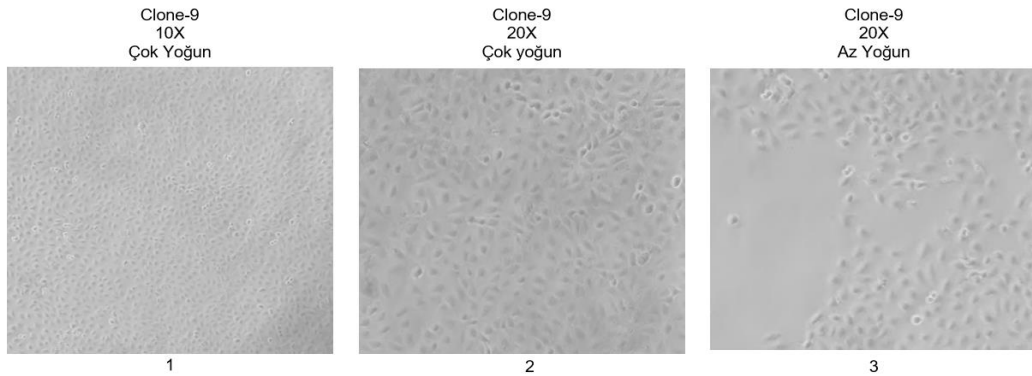
Çalışmada kullanılan epitelyal hücre hattı Hep3B (İnsan Hepatosellüler Karsinomu), ATCC'den elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan mezenşimal benzeri hücre hattı SNU-398 (Pleomorfik Hepatosellüler Karsinom) Prof. Dr. Mehmet Öztürk, Tınaz Tepe Üniversitesi Galen Araştırma Merkezi/ İzmir 'den temin edilmiştir. Çalışmada karşılaştırmalarda kullanılacak olan Clone-9 (Sağlıklı Karaciğer Hücre Hattı) Prof. Dr. Ayşe Tansu Kopardal, Anadolu Üniversitesi'nden sağlanmıştır (Şekil 3.11-3.13).



Şekil 3.11: Hep3B Hücre Hattı.



Şekil 3.12: SNU-398 Hücre Hattı.



Şekil 3.13: Clone-9 Hücre Hattı.

Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücre hatlarının büyütülmesi için Fetal Bovine Serum (FBS) kullanıldı. FBS, ticari olarak EuroClone firmasından temin edildi. -20 °C’de muhafaza edilen ana stok, kullanımdan bir gece önce gece boyu +4 °C buzdolabında çözülmesi sağlandı. Ardından çözünen FBS, inaktive edilmek üzere 56 °C’de yarım saat boyunca sıcak su banyosunda ısı ile işlem gördü. Yarım saat süresince 10’ar dakika ara ile çalkalanarak inaktivasyon işlemi sağlandı. İnaktivasyonu sağlanan FBS, steril Laminar flow kabini içerisinde steril 50 mL’lik falkonlara paylaştırılarak alikotlandı ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı.

Hep3B hücrelerinin büyütülmesi ve çoğalması için gerekli olan tam besiyeri, DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium, Gibco) içerisine %10 FBS eklenerek hazırlandı. SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinin büyütülmesi ve çoğalması için gerekli olan tam besiyeri ise RPMI (RPMI 1640 Medium, Euro-Clone) içerisine %10 FBS eklenerek hazırlandı. FBS/medyum karışımlarına 100X penisilin-streptomisin antibiyotik ana stoğundan, son konsantrasyon 1X olacak şekilde eklendi.

3.2.2.5 Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması

PBS: Ticari olarak temin edilen PBS tabletlerinin her biri, 100 mL deiyonize su içinde Sigma üretici firma tarafından önerilen talimatlara uygun olarak hazırlandı. 121 °C’de otoklavlandı. +4 °C’de saklandı.

Tripsin EDTA: 1X PBS çözeltisi içerisine, 0.53 mM EDTA ve %0.25 (w/v) Tripsin (Sigma) ilavesiyle hazırlanan çözelti, steril laminar flow kabini içinde, 0.22 µm filtre kullanılarak sterilize edildi. Sterilize edilen çözelti, steril 50 mL falkonlara bölündü ve sonraki deneyler için -20 °C’de saklandı. Kullanılmadan önce +4 °C’ye çıkarıldı.

Tripan Mavisi: Tripan mavisi, hücre sayımları için 0.4 g tartıldı ve 1X PBS çözeltisinde kaynatılarak çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında soğutuldu ve ardından 1X PBS ile 100 mL’lik son hacme tamamlandı. Hazırlanan çözelti, hücreleri boyamak için kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklandı.

%1 Kristal Viyole: 0.5 g kristal viyole (Carlo Erba) tartıldı ve 10 mL saf metanol içine aktarıldı. Daha sonra dH₂O eklenerek toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Çözelti çalkalanarak homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

3.2.2.6 Donmuş Halde Saklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürün Başlatılması

Cryoviyal tüp içinde -80 °C'de muhafaza edilen Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücreleri 37 °C su banyosunda yavaş bir şekilde çözülerek %10 FBS eklenerek hazırlanmış medyum içerisine aktarıldı. Ardından hücre-medyum karışımı 1.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek, canlı olan hücreler pellet haline getirildi böylece dondurma işlemi esnasında kullanılan DMSO kalıntıları ve ölü hücreler süpernatant kısmında kalarak uzaklaştırıldı. Hücre peleti 2 mL taze medyum ile çözülerek, içerisinde 8 mL %10 FCS'li medyum içeren 100 mm steril petri kaplarına ekim yapıldı. Petrilere hücre soyunun ismi, pasaj numarası ve tarih yazılarak etiketlendi. Hücre petrilere, hücrelerin tutunması ve büyütülmesi için %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de bekletildi.

3.2.2.7 Hücrelerin Pasajlanması

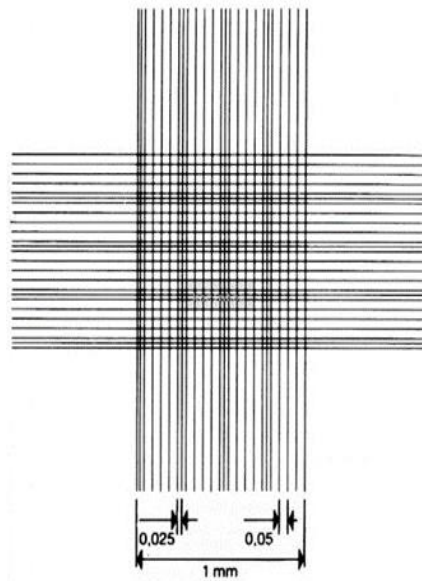
Petri yüzeyinin %80-90'ını dolduran hücreler, Laminar Flow içerisinde besiyerinden uzaklaştırıldı. Steril 1X PBS solüsyonu ile yıkanarak ölü hücreler, medyum kalıntıları ve istenmeyen metabolitler uzaklaştırıldı. Ardından, yüzeye yapışık halde bulunan Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinin petri yüzeyinden enzimatik aktivite ile ayrılması için 2 mL Bölüm 3.2.2.5'te hazırlanan Tripsin-EDTA eklendi. Enzimin işlevini yerine getirebilmesi için 37 °C inkübatörde 2-3 dakika kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldü. Yüzeyden ayrılan hücrelerin toplanması ve Tripsin enziminin inaktivasyonu için Tripsin-EDTA solüsyonunun iki katı miktarda hazırlanan %10 FBS'li medyum petriye ilave edilerek karışması sağlandı. Hücreler 15 mL'lik falkon içerisine steril pastör pipeti yardımıyla alınarak 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Falkonlar, santrifüj sonrasında %70'lik alkol ile silinerek sterilizasyonu sağlandı ve Laminar Flow içerisine alındı. Santrifüj sonrasında oluşan pelete dikkat edilerek üst kısımdaki sıvı kısım dökülerek uzaklaştırıldı. Pelet; 6 mL taze %10 FBS'li medyum ile çözülerek 2'şer mL olacak şekilde 3 petri kabına eşit hacimde bölündü. Petri kaplarının total hacmi, 8 mL taze %10 FBS'li medyum ile 10 mL'ye tamamlandı. Petri kaplarının üzerine hücre soyunun ismi, pasaj sayısı, tarih ve isim yazılarak etiketleme yapıldı. Bu işlemin sonunda hücrelerin bulunduğu petrilere, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.2.2.8 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripın Mavi Boyaması) ve Hücre Sayımı

Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü deneylerinin optimize şartlarda yapılabilmesi ve yeterli miktarda hücreyi alabilmek amacıyla sağlıklı durumda olan ve yeterli doluluğa ulaşan hücrelerin, tripan mavisini ile boyanıp, hücre sayım lamı (Thoma Lamı, Şekil 3.14) ile hücre sayımı yapılarak eşit şekilde bölünmesi gerekmektedir. Bu amaçla canlı ve ölü hücrelerin tespiti ve hücrelerin sayılması amacıyla tripan mavi boyaması yöntemi kullanıldı. Tripsin enzimi ile kaldırılan hücreler 5 dakika 1.000 rpm’de santrifüjlenerek pelet haline getirildi. Daha sonra pelet 5 mL taze %10 FBS’li medyum ile homojen hale getirilerek, elde edilen homojen hücre süspansiyonundan pastör pipeti ile 1 mL alındı. Steril ependorf içerisinde 1 mL süspansiyonda bulunan hücre sayısı belirlendi. Bu amaçla, tripan mavi boyası ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırıldı. Bu işlem sonucunda ölü hücreler, membranlarında seçici geçirgenlik özelliği bulunmadığı için boyayı içine alarak mavi renge boyanmış olacaktır, canlı olan hücreler ise boyanmayacaktır. Hazırlanan hücre süspansiyonu-boya karışımından 10 µL alınarak Thoma lamına koyuldu. İverted mikroskopta, beyaz hücreler sayılarak mL’deki canlı hücre sayısı hesaplandı. Aşağıda verilen formül ile süspansiyonun içerdiği hücre sayısı belirlenerek deneyler kurulmuştur.

1 mL süspansiyon hücrenin toplam sayısı:

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



Şekil 3.14: Thoma Lamı.

3.2.2.9 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Bölüm 3.2.2.7’de anlatıldığı gibi tripsinizasyonla kaldırıldı ve santrifüj işlemi ile çöktürülerek pelet haline getirildi. Pelete dikkat edilerek sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 900 µL FBS eklenerek çözüldü. Hücre süspansiyonuna, -80 °C de hücrelerin osmoz basıncından korunması ve kademeli donması için 100 µL DMSO eklenerek yavaşça alt-üst edildi. Hazırlanan karışım, steril pastör pipeti ile cryoviyal tüpe aktarıldı. Tüplerin üzerine hücre soyunun ismi, pasaj sayısı, tarih ve isim yazılarak etiketleme yapıldı. Parafilmlenerek -80 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.2.10 Hücre Soyları ile Deney Kurulması

Hücreler, sağlıklı bir şekilde büyütülüp pasaj 2 ve üzerine ulaştıklarında ve petri kaplarında yeterli doluluğa ulaştıklarında deneyler kuruldu. Deneylerin kurulması için gereken hücre sayımı bölüm 3.2.2.8’de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. %10 FBS’li medyum içeren ortamda, her deney için uygun olarak seçilen plakalara, gerekli miktarda hücre paylaştırıldı. Plaka kuyucuk sayısına göre paylaştırılması gereken hücre sayıları aşağıda Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11: Plaka tiplerine göre paylaştırılması gereken kuyu başına hücre sayıları ve son hacim.

Plaka Tipi	Hücre Sayısı	Hacim
6-Kuyucuklu Plaka	500.000 Hücre/Kuyu	2 mL
12-Kuyucuklu Plaka	250.000 Hücre/Kuyu	1 mL
24-Kuyucuklu Plaka	125.000 Hücre/Kuyu	500 µL
48-Kuyucuklu Plaka	60.000 Hücre/Kuyu	250 µL
96-Kuyucuklu Plaka	50.000 Hücre/Kuyu	200 µL

3.2.2.11 Kimyasal İndüklenmiş Hipoksi Oluşturulması ve Doğrulanması

CoCl₂ kimyasal indüklemeye ile dört farklı karaciğer kanseri modelinde (Hep3B, SNU-398, SNU-475, Huh-7) ve bir sağlıklı karaciğer hücre modelinde (Clone-9) hipoksi ortam oluşturuldu. Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücreleri için, hücrelere belirli zamanlarda (1, 3, 6, 24 ve 48 saat) 300 µM CoCl₂ uygulaması yapıldı. Proje kapsamında belirlenen diğer karaciğer kanser hücreleri olan Huh-7 ve SNU-475 hücrelerinde 600 µM CoCl₂ uygulandı.

RNA peleti almak için hücreler, tripsinizasyonla kaldırılıp, çöktürüldü. Hipoksik koşulların doğrulanması için mRNA düzeyinde HIF-1 α ifadesini belirlemek amacıyla Real-Time PCR analizi, protein düzeyinde HIF-1 α ifadesini belirlemek amacıyla EMSA, Western Blot ve IFC teknikleri kullanıldı.

3.2.2.11.1 Kimyasal Hipoksi Oluşturmak için Kobalt Klorür Solüsyonunun Hazırlanması

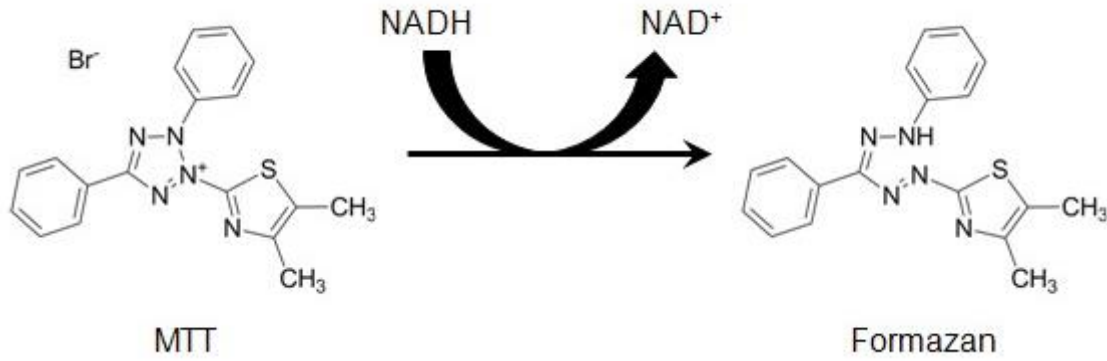
Deneylerde kimyasal hipoksi oluşturmak için kullanılacak olan kobalt klorür (CoCl₂, Cobalt (II) Chloride Hexahydrate, Ma:237.93 g/mol, FlukaTM), 25 mM ana stok olacak şekilde hesaplanarak tartıldı, dH₂O ile çözülerek hazırlandı. Hücre çalışmalarında kullanılacağı için sterilizasyon sağlamak amacıyla 0.22 μ m'lik filtreden geçirildi. Steril ependorflara alikot edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi. Uygulamalar sırasında, 300 μ M konsantrasyona dilüe edilerek kullanıldı.

3.2.2.12 Sitotoksisite Deneyleri (MTT)

Kantitatif kolorimetrik bir teknik olan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür) metodu canlı hücrelerin Tetrazolium tuzu olan sarı renkli MTT'yi, mor renkli formazana dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır ve hücrelerin proliferasyon, canlılık ve sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 3.15). Hücreler her kuyucukta 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. Gece boyu 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilen hücreler tutunduktan sonra kimyasal hipoksi indüklemek için hazırlanan CoCl₂ uygulandı ve hücrede bir sitotoksik etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bunun için hücrelere farklı dozlarda (150-300-600 μ M) CoCl₂ uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra 24, 48 ve 72 saatlerde, son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT stok solüsyonu eklendi. 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda yaklaşık 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerde morarma gözlemlendi. İnkübasyondan sonra medyum uzaklaştırıldı. Hazırlanan 0.004 M HCl içeren izopropanol solüsyonu ile pipetaj yapılarak çözüldü. Spektrofotometre ile 550 nm dalga boyunda absorbans alındı. Sonuçlar Graphpad Prism programında analiz edilerek grafiklendirildi. Kullanılan çözeltiler ve nasıl hazırlandıkları Tablo 3.12 'de verilmiştir.

Tablo 3.12: MTT’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
MTT solüsyonu	5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde, 25 mL steril PBS içinde çözündürülür. Çözelti, 0.22 µm'lik filtre kullanılarak steril edilir. Steril ependorflara alikotlanır. -20 °C’de muhafaza edilir.
0.004 M HCl İçeren İzopropanol	500 mL İzopropanol (2- Propanol) son hacim içerisine 166.6 µL HCl eklenir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.



Şekil 3.15: MTT metodu sırasında gerçekleşen kimyasal değişim.

3.2.2.13 Çizik Testi

Hücrelerin yara kapanmasını izlemek için, tripsinizasyonla kaldırılıp, sayılarak 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6'lı plakalara paylaştırılan hücreler, tüm yüzeye tutunup, yüzey kaplanana kadar %5 CO₂ içeren 37 °C ortamda inkübe edildi. Tüm kuyulara standart olacak şekilde beyaz pipet ucuyla artı şekli çizilerek hücreler arası bir boşluk oluşturuldu. Çizik atıldıktan sonra kalkan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla hücreler 1 kez PBS ile yıkandı ve ardından taze %10 FBS'li medyum eklenerek son hacim tamamlandı. Hipoksi oluşturulacak kuyulara, 300 µM CoCl₂ uygulaması taze medyum eklendikten sonra yapılarak kimyasal hipoksi oluşturuldu. Çizik oluşturulduktan sonra ilk uygulama süresi 0. Saat fotoğraflanarak kaydedildi. Ardından hücrelerin mikro-göç oranının hesaplanması için 3, 6, 24, 48. saatlerde hücreler fotoğraflandırılıp boşluğun kapanması kontrol hücreleri ile

karşılaştırıldı. Sonuçlar Image J programı ve MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edilip Graphpad Prism programıyla grafiklendirildi.

3.2.2.14 Koloni Formasyon

Hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalara optimizasyon deneyleri ile belirlenen sayıda; 5×10^2 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı ve gece boyu 37 °C de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Sonraki gün hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM son konsantrasyonda CoCl₂ ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturuldu. 6 kuyucuklu plakalar %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C de inkübe edildi. Hücreler, büyümeleri mikroskopla gözlemlenerek 10 gün büyütüldü. 10. Günün sonunda kolonileri gözlemek için kuyucuklarda bulunan medyum uzaklaştırıldı. Steril PBS solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Ardından her bir kuyuya hücreleri fikse etmek amacıyla 500 µL %80 metanol eklendi. 6 kuyucuklu plakaların kapağı kapatılarak buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, 3 kez steril PBS ile yıkama tekrarlandı. Bölüm 3.2.2.5'te anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan %1'lik kristal viyole boyasından 100 µL eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında 6 kuyucuklu plakalar inkübe edildi. Sürenin sonunda boya giderilene dek saf su ile yıkama yapıldı. Gözlenen koloniler, beyaz bir arka plan üzerine konularak fotoğraflandırıldı. Image J programına ait bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter programı kullanılarak kolonilerin sayımı gerçekleştirildi. Graphpad Prism programında analiz yapılarak sonuçlar grafiklendirildi.

3.2.2.15 Matrijel

Tümör hücrelerinin ekstrasellüler matrikse doğru invazyonları çok önemli bir rol oynamaktadır. Matrijel yöntemi, *in vitro* sistemlerde malignant ve normal hücrelerin invazyonunu çalışmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Deneyde, Turbofect™ Reagent ile 24 saat aşırı MIR100HG ifadesi sağlanan Clone-9 hücreleri ile boş vektör transfekte edilmiş olan kontrol Clone-9 hücreleri ve MIR100HG ifadesi baskılanan pLKO.1-TRC-shRNA hücreleri ve kontrol olarak kullanılan pLKO.1-SCR Clone-9 hücreleri matrijel deneyine başlamadan önce iki kez PBS ile yıkanarak hücre geçişini arttırmak amacıyla deneye başlamadan 20 saat önce FBS'siz antibiyotikli RPMI medyuma alındı. Hücreler, FBS içermeyen medyumda gece boyu 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

Ertesi gün kullanılacak tüm malzemeler, tüpler ve solüsyonlar -20 °C'ye soğutuldu. +4 °C'ye getirilen matrijel (Geltrex™) buz üzerine alındı. Kullanım öncesinde, soğuk PBS ile 4 kat dilüe edildi. Matrijel deneylerinde özel 24 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Plaka üzerinde 8 µm por büyüklüğüne sahip 12 insert bulunmaktadır. Matrijel deneyi kurulurken izlenecek adımlar sırasıyla şu şekildedir (Şekil 3.16);

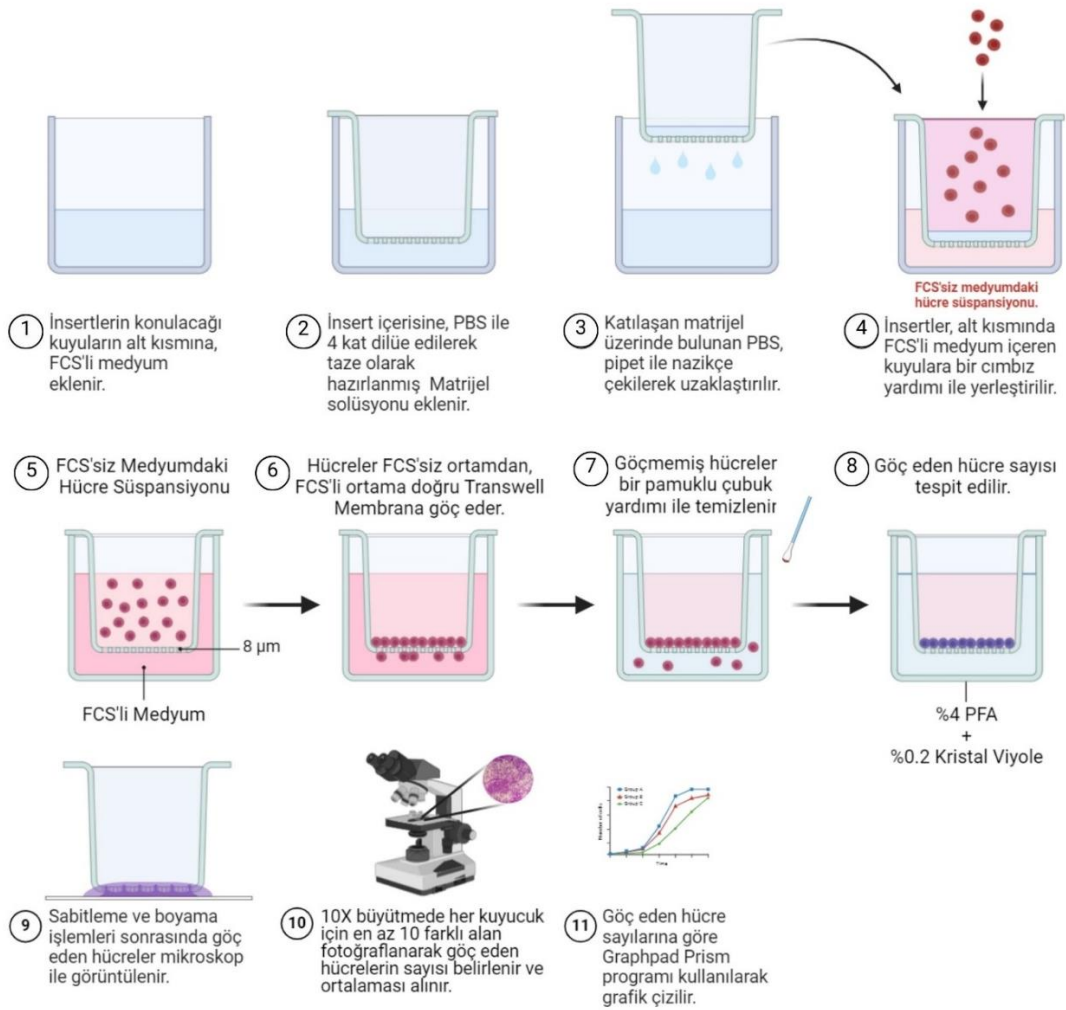
1. İnsertler steril bir cımbız yardımı ile kenardaki boş kuyuların içerisine aktarılır.
2. İnsertlerin yerleştirileceği orta kısımdaki 12 kuyuya %10 FBS'li RPMI 650 µL olacak şekilde eklenir.
3. Cımbız yardımı ile kenardaki kuyulara yerleştirilen insertlere soğuk PBS ile 4 kat dilüe edilerek hazırlanan matrijel solüsyonundan 100 µL eklenir.
4. Matrijel, soğukta sıvı, oda sıcaklığında katı hale geçen bir solüsyondur. Katılaşıp insertlerde geçişin sağlanacağı porları oluşturur. Bu nedenle, matrijelin katılaşması için 24 kuyucuklu plaka, %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de, yaklaşık bir saat inkübe edilir. Süre sonunda insertler, hücreler için hazır hale gelir.
5. Matrijelin katılaşması beklenirken, hücreler tripsinizasyonla kaldırılır. Santrifüj sonrasında FBS içermeyen RPMI ile hücreler süspanse hale getirilir ve mL'deki hücre sayısı sayılır. İnsertlere paylaşılacak üzere 100 µL'de 150.000 hücre olacak şekilde hücre-medyum karışımları hazırlanır.
6. Katılaştıran matrijellerin üzerinde bulunan PBS'li sıvı kısım pipet yardımıyla nazikçe çekilerek uzaklaştırılır ve 100 µL hücre-medyum karışımları 2 tekrarlı olacak şekilde insertlere aktarılır. Ardından insertler cımbız yardımı ile orta kısımda bulunan FBS'li medyum içeren kuyulara dikkatlice yerleştirilir.
7. 24 saat %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de inkübe edilir.

Negatif kontrol olarak; Matrijel içermeyen (serumsuz ortam) ancak hücre eklenen kuyular, pozitif kontrol olarak; FBS'li ancak hücre eklenmeyen kuyular hazırlanır.

3.2.2.15.1 Matrijel Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Analizi

24 saat sonra hem insertler hem de alıcı kuyular steril 1X PBS ile yıkandı. Burada membranların kurmasına izin verilmemelidir. Göçmemiş/istila etmemiş hücrelerin insertlerden uzaklaştırılması pamuklu çubuk yardımıyla nazikçe yapıldı. İnsert içeren kuyucuklara fiksasyon için %4 Formaldehit eklenerek ve 15 dakika boyunca oda

sıcaklığında inkübe edildi. Hücre atıklarını, bağlanmamış hücreleri ve fazla formaldehiti uzaklaştırmak için membranın hem üstü hem de altı steril 1X PBS ile iki kez yıkandı. İnsert içeren her bir kuyuya %0.2 kristal viyole boyası eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular, boyayı uzaklaştırmak için 1X PBS ile iyice yıkandı. Her bir örnek için, 10X objektif mercekle birden fazla alan fotoğraflandı. Hücre sayıları Image J programı ile belirlendi. Her bir örnek için, birden fazla alandan gelen hücre sayılarının ortalaması alınarak sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi.



Şekil 3.16: Matrijel deneyinde uygulanan basamaklar.

3.2.2.16 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları

3.2.2.16.1 Bazal Aktivitenin Belirlenmesi için Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon

MIR100HG genine ait 5' ucu kısaltılarak oluşturulmuş promotör parçalarının normoksik ve hipoksik koşullarda bazal aktivitesini belirlemek için yapılan kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon deneyleri için tripsinizasyonla kaldırılan ve sayılan Hep3B hücrelerinin mL'de bulunan canlı hücre sayıları belirlendi (Bölüm 3.2.2.8). Ardından 48 kuyucuklu plakalara 60.000 kuyu/hücre olacak şekilde paylaştırıldı. İnkübasyon için 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde gece boyu tutuldu. Sonrasında Tablo 3.14'te verilen transfeksiyon için gerekli malzemeler oda sıcaklığına getirildi. 48 kuyucuklu plakadaki her bir kuyu 128.75 µL son hacimde için HEPES içeren çözelti B içerisinde pastör pipeti ile presipitasyonu arttırmak amacıyla hava kabarcığı yapılırken, 128.75 µL son hacimde DNA ve CaCl₂ karışımının bulunduğu çözelti A pastör pipeti yardımıyla damla damla eklenerek karıştırıldı (Karışım son hacmi 257.5 uL/kuyu). Bu işlemde plazmid DNA'sı Ca²⁺ ile çevrilidir. A ve B çözeltilisinin karışımı, presipitasyonun sağlanması amacıyla bir saat oda sıcaklığında, Laminar Flow içerisinde hiç hareket ettirilmeden inkübe edilir. Bu süre sonunda presipitasyon gözle gözlemlenebilir hale gelir ve bulutumsu bir görünüme sahiptir. Transfekte edilecek hücrelere, hazırlanan DNA-Kalsiyum presipitasyonları hafifçe pipetajlanıp damla damla 48 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna karışım 257.5 uL olacak şekilde uygulandı. Plaka hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildikten sonra transfeksiyon medyumunu uzaklaştırıldı. Kuyular PBS ile transfeksiyon medyumundan arındırıldı ve yerine taze %10 FBS'li medyum ilave edildi. Plaka işlem sonrası gece boyu inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Ayrıca MIR100HG promotör parçalarıyla birlikte pSEAP-Control vektörü, pMetLuc-Control Vektörü ve pMetLuc2-Reporter Vektörü normalizasyon amacıyla kalsiyum-fosfat yöntemiyle transfekte edildi (Tablo 3.15). 48 ve 72. saatlerde transfekte edilmiş hücre medyumları elde edildi. Promotör aktivitesi, Lusiferaz ve SEAP aktivitesine bakılarak belirlendi. Hipoksik koşul oluşturmak için transfeksiyondan 24 saat sonra Hep3B hücre hattı için 300 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulaması yapıldı.

Tablo 3.13: Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözelti	İçeriği	Marka
2 M CaCl₂	14.7 g tartılır, 50 mL'ye dH ₂ O ile tamamlanır. Otoklav yapılır. 0.22 µm'lik filtreden geçirilir. -20 °C'de saklanır.	J.T Baker
2X HEPES-Buffered Saline (pH: 7.05-7.12)	1.6 g NaCl, 0.04 g Na ₂ HPO ₄ , 1.3 g Hepes tartılarak 100 mL'ye dH ₂ O ile tamamlanır. Otoklavlanır, 0.22 µm'lik filtreden geçirilir. -20 °C'de saklanır.	Sigma

Tablo 3.14: Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yönteminde hazırlanan çözeltilerin bileşenleri ve miktarları.

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

Tablo 3.15: Bazal aktivite için gerçekleştirilen kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.

Vektör	Kullanım Amacı
pSEAP-Control Vektörü (5.1 kb)	Normalizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Elde edilen Lusiferaz/SEAP değerlerine oranlanarak Relative Lusiferaz aktivitesi elde edilir.
pMetLuc-Control (4624 bp) Vektör	Hücrelerde transfeksiyonun genel durumunun belirlenmesi için pozitif kontrol olarak kullanılır. Güçlü viral promotor ile ifade olur.
pMetLuc2-Reporter Vektör (4250 bp)	Promotor parçası içermez, negatif kontrol olarak kullanılır.

3.2.2.16.2 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü

MIR100HG genine ait 5' ucu kısaltılarak oluşturulmuş promotor konstraktlarının normoksi ve hipoksi koşullarda bazal aktivitesinin ve hipoksik durumdaki regülasyonunun belirlenmesi amacıyla Dual-Core Lusiferaz Reporter Assay KitTM (Clontech) içerisinde temin edilen 10X substrat tamponu, 1:10 oranında reaksiyon tamponu ile sulandırılarak kullanıldı. 384 kuyucuklu plakaya elde edilen transfeksiyon medyumundan 9 µL koyuldu ve 1 µL 1X Substrat/Reaksiyon tamponundan eklenerek ve sonuçlar hızlıca luminometrede ölçüldü.

SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesinin ölçümü için ise öncelikle 96 kuyucuklu plakalara 5 µL elde edilen transfeksiyon medyumundan eklendi. 5X dilüsyon tamponu dH₂O ile 1X'e seyreltildi ve 15 µL örneklerin üzerine ilave edildi. Plaka su geçirmemesi için parafilmelendi, karanlık ortam sağlamak amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak 65 °C'ye ayarlanan su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Ardından 2-3 dakika buzda bekletildi ve oda sıcaklığına ulaşması beklendi. Oda sıcaklığına gelmiş olan örneklere, SEAP substrat solüsyonu 20 µL eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda plaka Luminometre cihazında okutuldu. Sonuçlar, Graphpad Prism programı ile değerlendirildi.

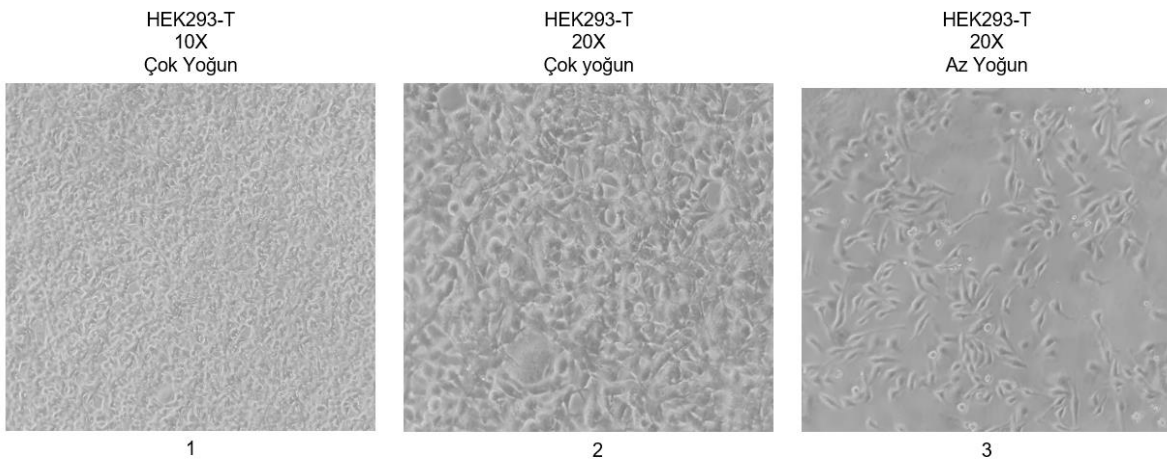
3.2.2.17 MIR100HG Genini Susturma Çalışmaları

RNA susturma, ilgilenilen genlerin işlev kaybının etkilerini araştırmak için gerçekleştirilen yaygın bir yöntemdir. Memeli hücrelerinde, RNA interferansı (RNAi) veya RNA susturma, geçici siRNA transfeksiyonu veya stabil shRNA sistemleri ile sağlanabilir. shRNA'nın verimli bir şekilde iletilmesi için çeşitli vektör sistemleri kullanılır. Lentiviral vektörler, shRNA'nın stabil ve uzun vadeli ekspresyonu için verimli bir dağıtım sistemi sunar.

3.2.2.17.1 HEK293-T

HEK293-T, İnsan embriyonik böbrek hücreleri transforme edilerek üretilmiştir. Transforme edilen hücreler, fetüs hücrelerinden elde edilmiştir. Lentiviral vektör üretimi amacıyla en yaygın tercih edilen HEK293 hücre çeşidi; HEK293-T'dir. HEK293-T hücreleri (Şekil 3.17), *SV40* olarak adlandırılan, büyük T-antijeni taşımaktadır. Bu antijen, amplifikasyon kolaylığı sağlamaktadır. Bu sistem geçici transfeksiyon ile ekspresyon seviyelerini ciddi şekilde arttırmaktadır. Transfeksiyon kolaylığı, bu hücrelerin en dikkat çekici özelliğidir.

HEK293-T hücreleri Prof. Dr. Dilek Balık, Yıldız Teknik Üniversitesi'nden elde edildi. %80-90 doluluğa ulaşan HEK293-T hücreleri, tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve 4×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara bölündü. Kuyuların son hacmi antibiyotik içermeyen %10 FBS'li medyum ile 2 mL'ye tamamlandı. Hücreler tutunması için gece boyu 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü.



Şekil 3.17: HEK293-T hücrelerinin mikroskop görüntüleri.

3.2.2.17.2 MIR100HG Geninin Susturma Çalışmaları için Turbofect Reagent™ ile Gerçekleştirilen Kalıcı Transfeksiyon

MIR100HG geninin hücrelerde ifadesinin baskılanmasını incelemek amacıyla proje kapsamında Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında MIR100HG genini susturma çalışmaları gerçekleştirildi. **Bu tez kapsamında, Clone-9 hücre hattında gerçekleştirilen deneyler yapılmıştır.** MIR100HG ifadesinin baskılanmasını gerçekleştirmek amacıyla HEK293-T hücreleri büyütüldü. Tripsinizasyonla kaldırılan HEK293-T hücreleri, sayılıp 4×10^5 hücre olacak şekilde antibiyotiksiz medyum eklenerek 6 kuyucuklu plakalara eşit şekilde paylaştırıldı. %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de gece boyu inkübe edilen ve tutunan hücrelere ertesi gün transfeksiyon işlemi TurboFect Reagent™ ile gerçekleştirildi. Tablo 3.16'da transfeksiyonda kullanılan bileşenler ve miktarları verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra yarım saat oda sıcaklığında presipitasyon için inkübe edildi. 6 kuyucuklu plakalarda bulunan HEK293-T hücrelerine 400 µL son hacimde damla damla karışım uygulandı. 48 saat %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C 'de inkübe edilen hücrelerden, 48. Saat sonunda medyumlar çekilerek 15 mL'lik steril falkona alındı. Hücrelere taze %10 FBS'li 2 mL medyum eklenerek 72. Saate kadar inkübasyona devam edildi. 72 saat sonunda tekrar medyumlar çekilerek 48. Saat medyumları ile birleştirildi. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Medyumlar, diğer bileşenleri ve hücreleri uzaklaştırıp, virüsleri elde edebilmek için 0.45 µm'lik filtreden geçirildi. Filtreden geçirilen transfeksiyon medyumları 400'er µL olacak şekilde steril ependorflara alikotlandı ve -80 °C'de uzun süre saklanmak üzere kaldırıldı.

Tablo 3.16: TurboFect Reagent™ ile gerçekleştirilen kalıcı transfeksiyon bileşenlerinin 6 kuyucuklu plaka için kuyu başına gereken miktarları.

Bileşenler	Miktarlar
pMD2.G (Zarf Plazmidi)	300 ng
PsPAX2 (Paketleme Plazmidi)	700 ng
pLKO.1-shRNA	1400 ng
TurboFect Reagent™	6 µL
Medyum (RPMI)	400 µL'ye tamamlanır.

3.2.2.17.3 Lentiviral Sıvının Uygulanması (Transdüksiyon)

Clone-9 hücre hattında MIR100HG geninin ifadesinin baskılanmasını gerçekleştirmek amacıyla büyütülen Clone-9 hücreleri tripsinizasyonla kaldırılıp sayılarak 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara bölündü. Kuyuların son hacmi %10 FBS'li antibiyotiksiz RPMI ile 2 mL'ye tamamlandı ve hücreler tutunmaları için gece boyu %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de bekletildi. Hücreler tutunduktan sonra, hücre medyumları uzaklaştırıldı. PBS ile nazikçe bir kez yıkandı. %10 FBS'li DMEM içerisine transfeksiyon etkinliğinin artırılması amacıyla 8 µg Protamin sülfat (Ana stok: 25 mg/mL) eklenerek taze medyum hazırlandı ve iyice karıştırıldıktan sonra hücrelerin medyumları, taze protamin sülfatlı medyum ile değiştirildi. Taze medyum üzerine, -80 °C'de saklanan ve oda sıcaklığına getirilen lentiviral sıvılar, 400 µL /kuyu olacak şekilde damla damla eklendi. Plaka hafifçe çalkalanarak lentiviral sıvının dağılması sağlandı. Ardından hücreler 48 saat %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.

3.2.2.17.4 Promisin Uygulaması ve Uygun Promisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücre medyumları protamin sülfatlı medyum ile değiştirildikten 48 saat sonra ilk promisin uygulaması hem kontrol hem de deney gruplarına yapıldı. Her promisin uygulaması yapılmadan önce, hücrelerin medyumları uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra taze medyum ile değiştirildi. Kontrol grubunda bulunan tüm hücrelerin ölümü gerçekleşene kadar promisin uygulamasına kontrollü şekilde devam edildi. Promisin uygulamaları, 5 mg/mL olan anastoktan, 0.5 mg/mL olacak şekilde sulandırılarak yapıldı. 48 saatte bir doz hatırlatması gerçekleştirildi.

3.2.2.17.5 Tek Koloni Seçimi

Kontrol hücrelerinin tamamı öldükten ve doz hatırlatmaları yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakada bulunan hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve tek koloni seçimi için 96 kuyucuklu plakalara bölündü (Tablo 3.17). Bu aşamada son kuyucuklara tek koloninin düşürülmesi hedeflendi. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara bölünüp tutunmaları beklendikten sonra kontrollü bir şekilde promisin uygulaması yapıldı. 96 kuyucuklu plakadaki hücreler, tek koloni seçimi için büyütüldü.

Tablo 3.17: 96 kuyucuklu plakaya bölünen hücrelerin soldan sağa doğru kuyulara eklenen hücre sayıları.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1

3.2.2.17.6 Tek Koloni Seçiminin Doğrulanması

Tek koloni seçimi gerçekleştirildikten sonra susmuş olduğundan şüphelenilen tek koloni önce 6 kuyucuklu plakaya alınarak büyütüldü. Ardından 100 mm'lik kültür kabına alınarak pasajlandı ve hücreyi kaybetmemek için stok yapıldı. Ardından seçilen tek kolonide MIR100HG ifadesinin baskılandığını doğrulamak amacıyla, büyütülen sh-RNA hücresinden mRNA izolasyonu yapıldı (Bölüm 3.2.3.1).

İzole edilen RNA'lerden cDNA sentezi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.3.4). Ardından cDNA'lar kullanılarak, Real-Time PCR ile mRNA seviyesinde doğrulama çalışmaları için reaksiyon 5 µl Master Mix, 1 µl DNA, 10 ng/µl'lik ileri ve geri primer stoğundan 0.5'er µl ve 3 µl dH₂O kullanılarak 10 µl son hacimde gerçekleştirildi. Her bir cDNA en az üç tekrarlı olarak MIR100HG ve internal kontrol olarak GAPDH primerleri ile çalışıldı (Bölüm 3.2.3.6).

Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Belirlenen Ct değerlerinin ortalama değeri hesaplandı, internal kontrol geninin belirlenen Ct ortalama değerinden, ilgilenilen genin belirlenen Ct ortalama değeri çıkarıldı. Bulunan değer, 2'nin üssü olacak şekilde kuvveti hesaplandı. Bu aşamada MIR100HG'ye spesifik ekspresyon primerleri kullanılarak Roche Light Cycler 480 cihazı ile PCR gerçekleştirildi. Sonuçlar GraphPad Prism programı ile analiz edildi.

3.2.2.18 MIR100HG Geninin Overekspresyon Çalışmaları

MIR100HG geninin hücrelerde aşırı ifadesini incelemek amacıyla proje kapsamında Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında MIR100HG overekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi. **Bu tez kapsamında, Clone-9 hücre hattında gerçekleştirilen deneyler yapılmıştır.** pcDNA3.1 vektörüne klonlanmış halde bulunan MIR100HG geninin ve kontrol olarak kullanılacak olan boş pcDNA3.1 vektörünün Clone-9 hücre hattına transfeksiyonunun gerçekleştirilmesi için 100 mm kültür

kabında bulunan %80-90 doluluğa ulaşmış Clone-9 hücreleri için, transfekte edilecek DNA'lar olan MIR100HG-pcDNA3.1 vektörü ve kontrol olarak kullanılacak olan boş pcDNA3.1 vektörü 10 µg olacak şekilde hazırlandı. Üzerine her bir tüp için 24 µL TurboFect Reagent™ (Thermo) eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Karışım son hacmi 2 mL'ye RPMI ile tamamlandı. Yarım saat oda sıcaklığında Laminar Flow içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası presipitasyon gözlemlendi. Kültür kabında bulunan Clone-9 hücrelerine 2 mL son hacimde TurboFect Reagent™/DNA karışımından damla damla eklendi. 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda 1 gece inkübe edildikten sonra hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve Clone-9 hücre hattına ait overekspresyon deneyleri kuruldu. Hipoksik ortam oluşturulacak kuyulara CoCl₂ uygulaması, hücreler tutunduktan sonra 300 µM olacak şekilde uygulandı.

Tablo 3.18: TurboFect™ ile gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmaları için gerekli bileşenlerin miktarları.

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

3.2.3 RNA Tabanlı Teknikler

3.2.3.1 Hücrelerden RNA İzolasyonu

Hücrelerden mRNA düzeyinde gen ifadesini belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip pellet haline getirildi. GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar -80 °C buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.3.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Elde edilen RNA'ların, miktarlarının tespit edilmesi ve saflıklarının tayini için Thermo MultiskanGo µDrop™ Plate Reader cihazında absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Bunun için her bir RNA örneğinden 2 µL alındı ve kör olarak kullanılmak üzere 2 µL dH₂O konularak RNA örneklerinin 260 ve 280 nm absorbansları ölçüldü. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı

hesaplanarak RNA saflığı tespit edildi. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu hesaplanırken aşağıda verilen formül kullanılmıştır:

$$\text{RNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times (10\text{mm}/0.49\text{mm})$$

3.2.3.3 RNA Jel Elektroforezi

Tablo 3.19: RNA jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve hazırlanışı.

Tamponun Adı	Hazırlanışı
FA Jel Tamponu	0.2 M MOPS (pH:7.0) 0.05 M EDTA (pH: 8.0) 0.01 M NaAc (pH: 7.0) DEPC'li su ile 1L'ye tamamlanır.
FA Tank Tamponu	100 mL 10X FA jel tamponu (1X) 900 µL %37'lik 12.3 M Formaldehit DEPC'li su ile 1L'ye tamamlanır.

İzole edilen total RNA'da degradasyon veya bozulma olup olmadığını, saf bir RNA izole edilip edilemediğinin tespiti için RNA Jel elektroforezi gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar, RNaz enzimlerinin etkilerine karşı çok savunmasız olduğundan kullanılan malzemelerden, tank sisteminden ve tampon ve jel hazırlarken kullanılacak sudan, RNaz enzimi uzaklaştırıldı. Tüm malzemeler önce, %0.1 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) içeren suda 12 saat bekletildi, ardından %0,5'lik SDS kullanılarak steril hale getirildi. SDS, güçlü bir yüzey aktif maddedir, yüksek miktarda lipid barındıran RNaz enzimlerini etkisiz hale getirir ve protein yapılarını bozar. RNaz içermeyen %0.1'lik DEPC'li su ile malzemeler durulanır. DEPC, RNaz enzimlerini inaktive etme kabiliyetine sahip bir bileşiktir. DEPC'li su, RNaz aktivitesini azaltmak veya ortadan kaldırmak için kullanılır. Malzemeler, saf etanolden geçirilerek, RNaz enzimlerinin inaktive edilmesi sağlanır. Malzemeler etüvde kurutularak etanolün iyice uzaklaştırılması sağlanır. Bu kurutma işlemi, RNaz enziminin aktivitesini tamamen ortadan kaldırır.

0.5 g agaroz tartılarak 5 mL 10X FA jel tamponu içerisine eklendi. DEPC içeren su ile 50 mL son hacme tamamlanan RNA jeli, mikrodalgada kaynatıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. Uygun sıcaklığa gelen RNA jeli içerisine 0.9 mL %37'lik (12.3 M) formaldehit

ve 10 mg/mL Et-Br stok solüsyonundan 1 µL eklenerek karıştırıldı. Elektroforez kasetine, taraklar takılarak, hazırlanan jel döküldü. RNA jelinin polimerleşmesi için oda sıcaklığında beklendi.

RNA örneklerinin yüklemeye hazırlanması için; 3 µL RNA örneği, RNA boyası ile 1:1 oranında boyandı. Boyanan örnekler önce 10 dakika 70 °C'de denatüre edildi, ardından buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi ve jele yüklemeye hazır hale getirildi. Jele yüklenen örnekler 1X FA tamponu içerisinde kontrollü bir şekilde 80 V'ta 30 dakika yürütüldü. UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve değerlendirildi.

3.2.3.4 cDNA sentezi

İzole edilip ölçümü yapılan RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. 1 µg RNA'dan cDNA sentezi, Thermo cDNA sentez kiti kullanılarak iki basamaklı olarak gerçekleştirildi. Aşağıda Tablo 3.20'de cDNA sentezi için gereken malzemeler ve koşullar verilmiştir.

Tablo 3.20: cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

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

Hazırlanan cDNA'lar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.3.5 Semi Quantitative (Sq) RT-PCR

Hazırlanan yeni cDNA'ların kontrolü için kullanılan bu PCR tekniğinde, MIR100HG genine spesifik olan ekspresyon primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 50 µL'lik total hacimde 1 µL cDNA, 2 µL MgCl₂, 5 µL 1X KCl Reaksiyon Tamponu, 5 U/mL Taq polimeraz enzimi, dNTP karışımı ve 100 ng/µL MIR100HG spesifik ekspresyon primerleri eklenerek gerçekleştirildi. Son hacim 50 µL'ye dH₂O ile tamamlandı. Uygun döngü şartlarında PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları aşağıda Tablo 3.21'de verildi. Normalizasyon amaçlı olarak aynı reaksiyon, Humanbeta-2 primerleri kullanılarak aynı döngü şartlarında gerçekleştirildi.

Tablo 3.21: Semi-Quantitative (Sq) RT-PCR Döngü Şartları.

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

3.2.3.6 Real Time PCR

Real-Time PCR reaksiyonu, 5 µL SYBR Green PCR Master Mix, 1 µL elde edilen cDNA, seyreltme sonucu elde edilen 100 pmol/µL'lik ileri ve geri primer stoğundan 0.5'er µL ve 3 µL dH₂O kullanılarak 10 µL son hacimde gerçekleştirildi. Buna göre, her bir cDNA en az üç tekrarlı olacak şekilde ilgilenilen gen ve internal kontrol gen primerleri kullanılarak çalışılmıştır. Real-Time PCR Tablo 3.22'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR 'da kullanılan primerler Tablo 3.23'te verilmiştir.

Sonuçlar Livak metoduna göre analiz edildi. Belirlenen Ct değerlerinin ortalama değeri hesaplandı, internal kontrol geninin belirlenen Ct ortalama değerinden, ilgilenilen genin belirlenen Ct ortalama değeri çıkarıldı. Bulunan değer, 2'nin üssü olacak şekilde kuvveti hesaplandı. Kontrol grubu kendine bölünerek 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi. Bu değerler ile sütun grafiği çizildi. Roche Light Cycler 480 cihazı kullanılarak Real-Time PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.22: Real Time PCR Döngü Şartları.

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

Tablo 3.23: Tüm PCR'larda ve Real-Time PCR'da kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Dizisi
MIR100HG_exp_Forward	5' AAC TTG GCT TCC TCG CTT CT 3'
MIR100HG_exp_Reverse	5' TGG CTC ATG AAA ATC TAG ATG T 3'
Hß-2 Forward	5' -TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC- 3'
Hß-2 Reverse	5' - CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T- 3'
GAPDH Forward	5'-CTG GAG AAA CCT GCC AAG TAT G-3'
GAPDH Reverse	5'- GGT GGA AGA ATG GGA GTT GCT-3'
HIF-1α Forward	5'-CCA CCT ATG ACC TGC TTG GT -3'
HIF-1α Reverse	5' -TGT CCT GTG GAC TTG TCC -3'

3.2.4 Protein Tabanlı Teknikler

3.2.4.1 Western Blot Tekniği Kullanılarak Proteinlerin Belirlenmesi

Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında hipoksik ortam oluşumunun protein seviyesinde doğrulanması amacıyla Western blot tekniği gerçekleştirildi. Western blot tekniğinin temel basamakları özetle Tablo 3.24'te verilmiştir. Bu teknikte kullanılan çözeltiler Tablo 3.25'te verilmiştir.

Tablo 3.24: Western-blot tekniğinin temel basamakları.

Western-blot Yönteminin Basamakları	
1. Protein Ekstraksiyonu:	Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinden Hipoksi ve Normoksi olarak RIPA tamponu ile protein ekstraktlarının çıkarılması sağlandı. Bu adımda, hedef proteinlerin, istenmeyen bileşenlerden ayrılması sağlanır.
2. Protein Ayırma:	Proteinlerin boyutlarına göre ayrılmasını sağlamak amacıyla Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi gerçekleştirildi.
3. Transfer İşlemi:	Boyutlarına göre ayrılan proteinlerin, jel üzerinden PVDF membrana aktarılması işlemidir. Hedef proteinlerin tespiti için proteinlerin, antikorlarla reaksiyona girebileceği bir yüzeyin oluşturulmasını sağlamak amacıyla yapılır.
4. Bloklama:	Istenmeyen bağlanmaların önüne geçmek ve antikorların hedef proteinlere spesifik olarak bağlanmasını sağlamak amacıyla yapılır.
5. Antikor İnkübasyonu:	Hedef proteinleri belirlemek ve antikorlar aracılığıyla bu proteinlere spesifik olarak bağlanmayı gerçekleştirmek için yapılır.
6. Sinyal Tespiti:	Sekonder antikorun ve substratın bağlanmasıyla birlikte hedef proteinlerin varlığının ve büyüklüğünün tespit edildiği adımdır.

Tablo 3.25: Western Blot çözeltileri ve hazırlanma yöntemleri.

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

Tablo 3.25 (devam)

1X Çözeltisi	TBST	100 mL 10X Stok TBS çözeltisine 1 mL Tween-20 eklenerek karıştırıldı. Son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.
Bloklama Tamponu		%5 (w/v) Yağsız süt tozu içeren 1X TBST çözeltisi hazırlandı. 50 mL 1X TBST çözeltisi içerisine 2.5 g yağsız süt tozu eklenerek homojen bir karışım elde edildi. +4 °C'de saklandı.
Ponceau Boyası		Ponceau-S'in 0.1 g tartıldı, %5 (v/v) asetik asit çözeltisi içinde 100 mL olarak çözüldü.
Jelden Boya Giderici Çözelti		Hacimce; %5 Metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH ₂ O olacak şekilde hazırlandı.
Jel Boyama Çözeltisi		Comassie Brilliant Blue (G-250) 0.1 g tartıldı, 50 mL methanol içerisinde çözülmeye dek çalkalandı. Ardından karışıma 10 mL asetik asit eklenerek homojen çözelti elde edildi. dH ₂ O kullanılarak çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

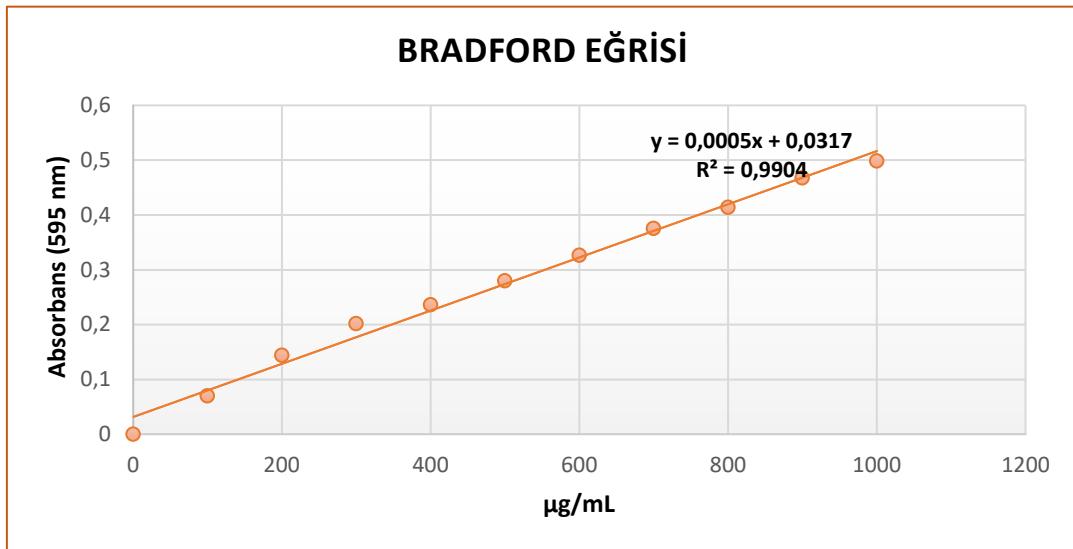
3.2.4.1.1 RIPA Tamponu Kullanılarak Hücrelerin Lizisi ve Proteinlerin Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonu öncesinde, protein ekstraktlarının aktarılacağı ependorf tüpleri soğutulmak üzere etiketlenerek buz üzerinde bekletildi. Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinden 100 mm'lik bir kültür kaplarından normoksi ve 300 µM CoCl₂ uygulanan 100 mm kültür kaplarından hipoksi protein izolasyonu yapıldı. CoCl₂ uygulandıktan 24 saat sonra kültür kaplarından medyum atıldı. Daha sonra hücreler iki defa soğuk 1X PBS ile yıkanarak istenmeyen kalıntıların uzaklaştırılması sağlandı. Ardından buz üzerine çıkarılarak eritilen RIPA tamponu her bir petri kabına 360 µL olacak şekilde eklendi. RIPA tamponu eklendikten sonra hücreler buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi, süre boyunca arada bir "8" çizilerek yavaşça karıştırıldı. Kazıyıcı %70 alkol ile steril edildikten sonra, kazıyıcı ile hücreler yüzeyden ayrılarak mekanik olarak parçalandı. Kazınan hücreler, pipet yardımıyla önceden soğutulmuş ve etiketlenmiş ependorflara aktarıldı. Daha iyi lizis sağlamak amacıyla protein ekstraktlarına sonikasyon işlemi uygulandı. Buz ile doldurulmuş sonikasyon cihazında 2 dakika sonikasyon, 2 dakika buz üzerinde inkübasyon yapıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Süre sonunda örnekler buzla dolu bir kaba alınarak yatay çalkalayıcı üzerinde 15 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edildi. 15 dakika +4 °C soğutmali

santrifüjde 13.500 rpm’de santrifüjlendi. Hücre atıkları pelet haline gelerek dibe çöktü. İlgilendiğimiz proteini içeren süpernatant pelete değmeden dikkatli bir şekilde soğuk ependorflara alındı. Örneklerin içerdiği protein miktarları, Bradford yöntemi ile belirlendi ve örnekler ileriki deneylerde kullanılana kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.4.1.2 Bradford Tekniği Kullanılarak Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tespiti; Bovine Serum Albumin (BSA) standart çözeltilerinden oluşan farklı konsantrasyonlara sahip (100-1000 µg/mL) olarak hazırlanan bir seri kullanılarak gerçekleştirildi ve standart eğri oluşturuldu. Standart eğri, örnek içerisinde bilinmeyen protein miktarının tespiti amacıyla kullanılan bir referans değerdir. Farklı konsantrasyondaki standart BSA çözeltileri 3 tekrarlı şekilde ölçümün gerçekleştirileceği 96 kuyucuklu plakaya 5 µL eklendi. Değerleri normalize etmek için kör olarak 5 µL dH₂O kullanıldı. Kuyucuk başına 250 µL Bradford reaktifi ilave edilerek pipetajlandı. Karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. Absorbans ölçümü 595 nm’de spektrofotometre cihazında yapıldı. Standart BSA çözeltilerindeki protein miktarları kullanılarak, standart bir eğri oluşturuldu (Şekil 3.18). Elde edilen proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için, 595 nm absorbans değerleri ve standart eğriden elde edilen Bradford Denklemi kullanılarak protein miktarları tespit edildi. Bu şekilde örneklerin protein miktar tayinleri doğrudan absorbans değerleri ile belirlenerek doğru ve hassas bir şekilde tespit edildi.



Şekil 3.18: Bradford eğrisi ve denklemi.

3.2.4.1.3 SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), protein örneklerinin dikey yönde elektrik akımıyla sahip oldukları molekül ağırlıklarına göre ayrılması ilkesine dayanan bir tekniktir. SDS-PAGE tekniğinde kullanılacak olan malzemeler ve Bio-Rad sistem aparatları saf su ile yıkanarak %70'lik alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar, aparatlara yerleştirilip, jel dökme stantlarına takıldı.

Kesintili şekilde; ayırma jeli üzerine, yığıma jeli dökülerek jel hazırlandı. İlk olarak proteinleri büyüklüklerine göre ayırmak için %10 poliakrilamid ayırma jeli Tablo 3.26'da belirtildiği gibi hazırlanarak üst kısımda 2-3 cm boşluk bırakacak şekilde cam plakaların arasına pastör pipeti ile hızlıca döküldü. Jel, dökülür dökülmez üzerine %90'luk izopropanol (veya dH₂O) eklenerek düz şekilde polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra %90'luk izopropanol (veya dH₂O) kurutma kağıdı yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı. %4 poliakrilamid yığıma jeli (Tablo 3.26) hazırlandı ve hızlıca hava kabarcığı kalmaması için bir kısım taşırılarak döküldü. Camlar arasına uygun büyüklükte tarak konulduktan sonra jellerin polimerleşmesi için oda sıcaklığında beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar kuyuları bozmadan dikkatlice çıkarılıp aparata dengeli bir şekilde 1X yürütme tamponu ile dolu olan elektroferez tankına yerleştirildi. Örnekler yüklenmeden önce kuyular 1X yürütme tamponu ile yıkandı ve camların arası da yürütme tamponu ile dolduruldu.

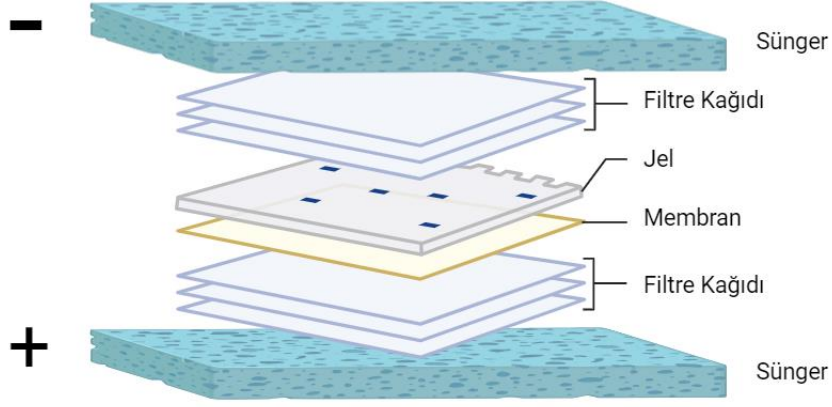
Deneyde, spektrofotometrik olarak en az protein içerdiği belirlenen örneğin, 20 µL miktarı baz alınarak diğer örneklerde eşit şekilde hesaplandı ve böylece tüm örneklerin protein miktarlarının standardizasyonu sağlandı. Her bir örnek takibine yapabilmek amacıyla 5 µL yükleme boyası ile karıştırılarak boyandı. Yükleme boyası hazırlamak amacıyla ticari olarak satın alınan 4X Laemli örnek tamponu (90 µL) ve β-Merkaptoetanol (10 µL) karıştırıldı. Örneklerin son hacmi 25 µL'ye yığıma jel tamponu kullanılarak tamamlandı. Örnekler, proteinler denatürasyonu amacıyla 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Yığıma jelinin ilk kuyusuna proteinlerin moleküler ağırlıklarını tespit etmek amacıyla PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo) büyüklük belirtecinden 5 µL yüklendi. Diğer kuyulara 25 µL protein örneği yüklendi. Jel yüklemesi tamamlandıktan sonra, serbest mA'da 80 V'ta 3,5-4 saat elektrik akımında örnekler yürütüldü. Yavaş yürütme; proteinlerin dengeli ve düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için önemlidir.

Tablo 3.26: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Ayırma Jeli (%10 Poliakrilamid)	Yığıma Jeli (%4 Poliakrilamid)
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	2.5 mL	2.5 mL
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	-	-
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	2.5 mL	625 µL
dH₂O	5 mL	3.05 mL
%10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

3.2.4.1.4 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi

Proteinlerin SDS-PAGE jellerinden PVDF (Milipore™) membranına transfer işlemi, Bio-Rad Trans Blot sistemi kullanılarak yapıldı. SDS-PAGE’te yürütüldükten sonra, jel dengelenmesi için 5 dakika soğuk transfer tamponu koyulan bir kap içerisinde bekletildi. Camlar aparat yardımıyla ayrıldı, üst kısmından kesilerek üst jel uzaklaştırıldı. Soğuk transfer tamponunda bekletilerek transfer aparatı, Whatman 3 MM kağıdı ve süngerlerle birlikte transfer süreci için hazır hale getirildi. Aktifleştirilmek üzere 8 x 6 cm boyutlarında kesilmiş olan PVDF membran, membranın aktif yüzeyi aşağıya bakacak şekilde bir kap içerisinde metanolde 2 dakika bekletildi. Daha sonra, soğuk transfer tamponuna aktarılan membran, yine 2 dakika bekletildi. Transfer kasetinin (-) kutbundan başlayarak "sünger-3 filtre kağıdı-jel-membran-3 filtre kağıdı-sünger" olacak şekilde katmanlar yerleştirildi, silindirik aparat ile katmanların üzerinden geçirilerek transfer etkinliğini düşürecek hava kabarcıkları ortadan kaldırıldı (Şekil 3.19). Transfer kaseti, negatif kutuptan pozitif kutba doğru kapatılarak içerisinde soğuk transfer tamponu bulunan tanka yerleştirildi. Transfer işlemi gece boyunca +4 °C’de, serbest voltaj, 35 mA olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3.19: Western-blot: transfer işlemi sırasında hazırlanan katmanlar.

3.2.4.1.5 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Tekniği ile Tespiti

Protein transferi sonrasında PVDF membranda, spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi ve doğru bir sinyal elde etmek amacıyla transferden alınan membrana bloklandı. Bu amaçla membran aktif yüzeyi yukarı bakacak şekilde temiz bir kap içerisine alındıktan sonra hazırlanan 20 mL bloklama tamponu (Tablo 3.25) eklenerek yaklaşık bir buçuk saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda membran 1X TBST solüsyonu ile üç kez 5 dakika boyunca horizontal çalkalayıcıda yıkandı. Tekrarlı yıkama adımları, istenmeyen bileşiklerin ve spesifik olmayan bağlantıların uzaklaştırılmasını sağlamak ve aynı zamanda antikorların hedef proteinlere bağlanmasına katkı sağlamak amacıyla gerçekleştirildi. Membran, HIF-1 α ve β -aktin protein bantlarını görüntülemek amacıyla uygun noktalardan kesilip, membranlar ayrı şekilde primer antikorlarla muamele edildi. Antikor olarak bloklama tamponunda seyreltilerek 1/3000 oranında hazırlanan HIF-1 α ve 1/5000 oranında hazırlanan β -aktin antikorları kullanıldı. Membran +4 °C'de bir gece boyunca döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra membran üç kez 5'er dakika 1X TBST tamponu içerisinde yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra membranlar, sekonder antikorlarla (1/10.000 oranında Mouse β -aktin ve (1/5000) Mouse HIF-1 α antikor) oda sıcaklığında 1 saat döner çalkalayıcıda inkübe edildi. Sürenin dolmasının ardından membranlar üç kez, 5'er dakika TBST tamponu içerisinde yıkandı ve görüntülendi.

3.2.4.1.6 Protein Bantlarının Görselleştirilmesi ve Analiz Edilmesi

Spesifik antikörlerle işaretlenen proteinlerin tespiti için (Pierce™) ECL Western Blot substratı kullanıldı. ECL substratı, membranda bulunan primer/sekonder antikör bağlantıları ile işaretlenmiş proteinlere sekonder antikörler tarafından bağlanarak ışık emisyonu sağlar. Bu şekilde hedeflenen proteinlerin varlığı ve yoğunluğu görüntülendi. UVP BioSpectrum™ görüntüleme sistemi, oluşan ışık emisyonunu algılayarak görüntü oluşturdu ve fotoğraflama işlemi cihaz yardımıyla gerçekleştirildi. Protein bantlarının fotoğraflarının analizi için Image J programı kullanıldı. Bu analizde, normoksi ve hipoksi gruplarında bulunan protein bantları ölçülerek yoğunluk değerleri elde edildi. Ayrıca, normalizasyon amacıyla β -aktin proteini de incelendi. HIF-1 α ve β -aktin analiz sonuçları, iki proteinin aynı protein örneğindeki oranları hesaplanarak GraphPad Prism programında grafiklendirildi. Bu değerler, protein ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ve istatistiksel analizler için kullanıldı.

3.2.4.2 IFC (İmmünofloresans) Deneyi

Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında hipoksik ortam oluşumunun protein seviyesinde doğrulanması amacıyla immünofloresans deneyi gerçekleştirildi. Deneyde kullanılacak olan özel yuvarlak cam lameller herhangi bir kontaminasyon olmaması için 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmeden önce alkol ile steril edildi ve UV'de bekletildi. Ardından tripsinizasyonla kaldırılan Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücreleri Thoma lamında sayılarak, 24 kuyucuklu plakalara 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Steril cam lameller yerleştirildi. Bir gece %5 CO₂'li ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Hipoksik ortam oluşturulacak kuyulara hücreler tutunduktan sonra kimyasal hipoksi uygulaması için 300 μ M CoCl₂ uygulaması yapıldı. Bu uygulamadan 24 saat sonra medyum uzaklaştırıldı. Kuyucuklar PBS ile 2 defa yıkandı. Fiksasyon için hücreler PBS içinde çözünmüş %4'lük Paraformaldehit çözeltisinde oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Fiksatif %4 PFA uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara üç defa PBS yıkaması yapıldı. Ardından kuyucuklardaki hücrelere boyanın çekirdeğe girebilmesi için por açmak amacıyla %0.1 (k/h) Triton X-100 ihtiva eden PBS eklendi. 5 dakika bekletildikten sonra tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi. İstenmeyen olası bağlanmalar olmaması için %10 oranında BSA içeren PBS ile seyreltilerek hazırlanan 1/100 oranında HIF-1 α Primer Antikoru (HIF-1 α Monoclonal Antibody, MA1-16504, Invitrogen) uygulandı. Primer antikör içeren hücreler, gece boyu karanlık ve nemli bir ortama sahip kutuya dikkatlice konuldu, +4 °C'de inkübe edildi. 16 saat sonunda primer antikör uzaklaştırıldı. 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile kuyucuklar yıkandı. Kullanılan primer

antikora uygun olarak seçilen Alexa Flour 488 Antimouse sekonder antikor (Yeşil renk verir) %1 BSA içeren PBS ile 1/100 kat seyreltildi. Bu basamaktan sonra uygulamalara ışık geçirmeyen, karanlık ortamda devam edildi. Nemli ortam oluşturulan kabın içerisinde oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat süresinde inkübe edildi. Süre sonunda kuyulara PBS ile 5 dakikalık 3 tekrarlı yıkama yapıldı. Hücre zarından geçip çekirdeği boyayan bir floresan boya çeşidi olan DAPI solüsyonu (4',6-diamin-2-fenilindol) hücrelere 1 µg/mL olacak şekilde uygulandı. Ardından hücreler PBS ile yıkandı. Görüntülemeye kullanılmak üzere lamaların üzerine ticari olarak satın alınan ve uzun sürelerde floresan ışımının kaybolmasını engelleyen Antifade tamponundan bir damla pastör pipeti yardımıyla damlatıldı. Plakaların içerisine yerleştirilmiş olan yuvarlak lameller ısıtılmış iğne ucu yardımıyla dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Bu işlemden önce %70 alkol ile silinerek steril hale getirilen lamaların üzerine hücre yüzeyinin tampon ile birleşmesini sağlayacak şekilde ters bir biçimde kapatıldı.

İmmünofloresan deneyinin görüntülemeleri Nikon Eclipse E600 ile yapıldı. DP2-BSW programı ile yakalanan görüntüler Image J programı ile analiz edildi. Sonuçlar Graphpad Prism programında grafiklendirildi.

3.2.5 DNA-Protein Etkileşim Teknikleri

Hep3B (ana model) hücre hattında hipoksik ortam oluşumunun DNA-protein etkileşim teknikleri ile doğrulanması amacıyla EMSA ve CHIP deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1 EMSA Tekniği

3.2.5.1.1 Nükleer Ekstrakt Hazırlanması

EMSA tekniği uygulamasında ilk aşama nükleer ekstrakt hazırlama işlemidir. Bu aşamada kullanılan çözeltiler Tablo 3.27'de verildiği gibidir.

Tablo 3.27: Hep3B hücrelerinden nükleer ekstrakt hazırlarken kullanılan çözeltiler ve içeriği.

Tampon Adı	İçeriği
TEN Tamponu	40 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
A Tamponu	10 mM HEPES (pH: 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche)
C Tamponu	20 mM HEPES (pH: 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM EDTA, %25 Gliserol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche)

100 mm petri kabı içerisinde %95 doluluğa ulaşan Hep3B hücrelerine hipoksi ortam oluşturmak için 300 µM CoCl₂ uygulaması yapıldı. Normoksi Hep3B hücreleri ve hipoksi ortam oluşması için 6 Saat %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C’de inkübe edilen hipoksi Hep3B hücreleri, medyumları dökülerek 2 mL buzda soğutulmuş PBS ile iki kere yıkandı. 2 mL TEN tamponu ile hücreler kaplandı, 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücreler kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden kazınarak pipet ile 2 ependorfa 1’er mL olacak şekilde eşit olarak paylaştırıldı. 13.000 rpm’de 1 dakika +4 °C’de santrifüjlendi. Üst kısım uzaklaştırılarak pelet, soğuk PBS’ten 1 mL eklenerek ile yıkandı. 13.000 rpm’de 5 dakika +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pelet üzerine 37.5 µL A tamponu eklenerek pelet süspanse hale getirildi ve 15 dakika buzda inkübe edildi. İnsülin iğnesi yardımıyla örnek lizis edildi. Lizat 13.000 rpm’de 20 saniye +4 °C’de santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 40 µL C tamponu eklenerek homojen hale getirilene kadar pipetaj yapıldı ve süspanse edildi. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 13.000 rpm’de 5 dakika soğuk santrifüjlendi. Üst kısım, pelete değmemeye özen gösterilerek temiz bir ependorfa alındı. Protein miktarı Bradford reaktifi kullanılarak ölçüldü. Her bir tüpte 4000 ng olacak şekilde nükleer ekstraktlar alikot edildi. İleriki deneylere kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.5.1.2 EMSA Reaksiyonu

EMSA reaksiyonunda kullanılan kitler, içeriği ve üretici firmalar Tablo 3.28’de verilmiştir.

Tablo 3.28: EMSA’da kullanılan kitler, içerikleri ve üretici firma.

Malzemenin Adı	İçeriği	Üretici Firma
Kemiluminesans EMSA kit (LightShift®Chemiluminescent EMSA Kit)™	10X Bağlanma Tamponu, PolidIdC, %50 Gliserol, 1M KCl, 100 mM MgCl ₂ , 200 mM EDTA (pH: 8.0), 5X Yükleme Tamponu	Thermo Scientific
Pierce Biotin 3’ Ucu DNA Etiketleme Kiti™	5X TdT Reaksiyon Tamponu, Terminal Deoksinükleotidil Transferase (TdT), Biotin-11-UTP	Pierce
Kemiluminesans Nükleik Asit Tanıma Kiti (Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module)™	Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroksidaz Konjugat, Kemiluminesans Substrat, Luminol/Enhancer Solüsyon, Stable Peroksit Solüsyonu, Bloklama Tamponu, 4X Yıkama Tamponu, Substrat Dengeleme Tamponu	Thermo Scientific

3.2.5.1.3 Oligoların Etiketlenmesi

Kit içeriğinde bulunan TdT enzimi reaksiyon tamponu ile 2 U/mL olacak şekilde sulandırıldı. 5X Reaksiyon tamponundan son konsantrasyonları 1X, 1 µM oligo 100 nM, 5 µM Biotin 11-UTP 0,5 µM, 2 U/µL dilüe edilmiş TdT enzimi 0.2 U/µL son hacim 50 µL olacak şekilde reaksiyon kuruldu. 37 °C’de 30 dakika bekletildikten sonra 0.2 M EDTA (pH: 8.0) eklenerek reaksiyon durduruldu. Kloroform-izoamil alkol (24:1) tamponu reaksiyondan TdT enzimini uzaklaştırma amacıyla 50 µL eklendi. 2 dakika santrifüjlendikten sonra iki faz oluştu. Üst faz dikkatlice pipetle temiz bir ependorfa aktarıldı. Etiketlenmiş prob -20 °C’de saklandı.

3.2.5.1.4 Oligoların Bağlanması

Çift zincirli oligo parçaları oluşturmak üzere, oligoların bağlanması işlemi yapıldı. 1 pmol/ μL olacak şekilde sulandırılmış olan ileri ve geri oligolardan eşit miktarda alınıp reaksiyon 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Primerler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığına gelen primerler, -20 °C’de saklandı.

3.2.5.1.5 Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Poliakrilamid Jel, deneyden bir gün önce hazırlanarak +4 °C’ye kaldırıldı. Deneyden önce, 0.5X TBE tamponu içerisine jeller yerleştirilerek boş şekilde 1 saat 90 V’ta yürütüldü. Poliakrilamid jel hazırlama için gereken malzemeler ve miktarları aşağıda Tablo 3.29’da verildiği gibidir.

Tablo 3.29: Poliakrilamid jel hazırlama için gereken malzemeler ve miktarları.

Malzeme	Miktar
5X TBE	600 μL
%40 Poliakrilamid	900 μL
%50 Gliserol	300 μL
TEMED	600 μL
%10 APS	600 μL
dH ₂ O	3 mL
Son Hacim	6 mL

3.2.5.1.6 Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması

Tablo 3.30’da verildiği gibi Hep3B Normoksi ve Hep3B Hipoksi nükleer ekstraktı içeren bağlanma reaksiyonları kuruldu. Reaksiyon spesifikliğini belirlemek için yarışma ve supershift deneyleri kuruldu. Reaksiyon 10 dakika buz üzerinde, 40 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kit içerisinde bulunan yükleme boyasından 5 μL koyularak boyandı. Örnekler poliakrilamid jele yüklenerek 100 V’ta yürütüldü.

Tablo 3.30: EMSA Bağlanma reaksiyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları.

Malzemeler	Miktarları
10X Bağlanma Tamponu	2 µL (1X)
1 ug/µL dIdC	1 µL
1M KCl	1 µL
100 mM MgCl	1 µL
Nükleer Ekstrakt (Hep3B Normoksi ve Hep3B Hipoksi)	X µL (4 µg)
1 pmol/µL Biotinle Etiketlenmiş Oligolar (Sıcak Prob)	1 µL
Yarışma Deneğinde Kullanılan Etiketlenmemiş Spesifik Transkripsiyon Faktörlerine Ait Oligolar (Soğuk Prob)	5 µL (500 kat)
Supershift Bağlanmaları İçin Antikor	X µL (1/400-800)
dH₂O	X µL
Toplam Hacim	20 µL

3.2.5.1.7 Jelin Membrana Transferi ve Crosslink Aşaması

8 x 10 cm büyüklüğündeki naylon membran, jel büyüklüğünde kesilerek 0.5X TBE içerisinde 10 dakika bekletildi ve -10 °C'ye soğutulmuş olan 0.5X TBE içerisinde 90 V akımda 2 saat süresince yürütülerek transfer işlemi gerçekleştirildi. Transferden sonrasında membranlar, kuru kalmayacak şekilde tampon ile ıslatılarak streç film ile sarıldı ve 15 dakika boyunca UV altında bekletilerek Crosslink (Örneklerin Membrana Sabitlenmesi) işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5.1.8 Membranın Görüntülenmesi

Membran ilk olarak kitin içeriğinde bulunan 20 mL bloklama tamponunda 15 dakika horizontal çalkalayıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi. Bloklama tamponu içerisine 66.7 µL Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate antikorunu eklendi ve 15 dakika süresinde horizontal çalkalayıcı üzerinde çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Membran, kit içinde yer alan 1X yıkama tamponu ile dört defa yıkanmasının ardından 15 mL substrat dengeleme tamponu içerisinde 5 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Biotin ile işaretlenmiş olan DNA örneği, ECL solüsyonu ile muamele edilerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.5.2 Kromatin İmmuno Presipitasyonu (ChIP)

Hipoksik koşullarda MIR100HG geni promotorunda bulunan DNA-Protein etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla Hep3B hücreleri ile Kromatin İmmuno Presipitasyonu (ChIP) Deneyi gerçekleştirildi. ChIP tekniği, proteinlerin genom üzerindeki bağlanma bölgelerinin tespiti amacıyla sıklıkla kullanılan moleküler biyoloji prosedürüdür (Tablo 3.31).

Tablo 3.31: ChIP Prosedürüne ait basamaklar.

ChIP Basamakları	
Hücrelerin çapraz bağlama için formaldehit ile fiksasyonu	Hep3B hücreleri, çapraz bağlayıcı bir ajan olan formaldehit ile fikse edilir. Bu adım protein-DNA etkileşimlerini sabitleyerek hücrelerin orjinal durumlarını korumasını sağlamaktadır.
Kromatinin hazırlanması	Fikse edilen hücrelere, hücre zarlarının parçalanması ve çekirdeklerinin açılması için uygun tamponlar uygulanır. Bu adım, kromatin komplekslerini açığa çıkarır ve protein-DNA etkileşimleri serbest bir hal alır.
Kromatinin parçalanması	Kromatin genellikle ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak uygun büyüklükteki parçalara ayrılır (yaklaşık 200 bp). Bu işlem, DNA parçalarının istenilen boyut aralığında parçalanmasını sağlar.
Antikor İmmünopresipitasyonu	HIF-1 α proteininin, protein-DNA komplekslerinin seçici olarak çekilmesi için 1 μ g olacak şekilde HIF-1 α antikorunu kullanıldı. Antikorlar, kromatin ile birleşerek hedef protein-DNA komplekslerine bağlanır ve bu komplekslerin izolasyonuna yardımcı olur.
Protein-DNA bağlarının ters çevrilmesi ve proteinlerin çözülmesi	İmmünopresipite edilen komplekslerdeki protein-DNA bağları, sıcaklık ve enzimatik sindirim aracılığıyla çözülür. Bu adım, proteinlerin ayrılması ve DNA'nın serbest hale getirilebilmesi açısından önem taşır.
İzole edilen DNA'nın saflaştırılması ve analizi	Proteinler çözüldükten sonra, Real Time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile analizi gerçekleştirilip, Graphpad Prism Programı kullanılarak veriler grafikleştirilmiştir.

ChIP deneyleri, EZChIP™ Milipore kiti kullanılarak üreticinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi.

3.2.5.2.1 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Fiksasyon

100 mm petri kabında bulunan Hep3B hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında deney gerçekleştirildi. Hipoksik ortam oluşturmak amacıyla 300 µM CoCl₂ uygulaması yapıldı ve hücreler %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de 6 saat inkübe edildi. 6 saat bekleme süresinin ardından, ChIP prosedürü uygulanacak olan Hep3B hücreleri, inkübatörden alındı. Hücre medyumuna hücreleri fikse etmek için %37'lik formaldehitten 366.6 µL eklendi. Oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcı kullanılarak 15 dakika boyunca yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Reaksiyona girmeyen formaldehit kalıntılarının uzaklaştırılması için medyum-formaldehit karışımına 1.3 mL 10X Glisin eklendi. Karışım 5 dakika hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Kültür kabı buz üzerine yerleştirildi. Medyum bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kültür kabına, Soğuk 1X PBS'ten 1 mL eklenerek hücrelerin yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama, üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu aşama sonrasında hücreleri kazıyabilmek amacıyla her 1 mL PBS içerisine 3.25 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II eklendi. Hücrelerin kazandıktan sonra aktarılacağı ependorf tüpleri hazırlandı ve buzda soğutuldu. İçerisinde 1X Proteaz İnhibitör Kokteyl II bulunan soğuk PBS'ten 2 mL eklendi. Hücreler, 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Kazıyıcı ile hücreler kültür kabı yüzeyinden kazınarak önceden soğutulmuş steril 2 mL'lik ependorf içerisine aktarıldı. Daha sonra 700 x g'de +4 °C'de 8 dakika santrifüjlenerek çöktürme sağlandı. Sonraki basamakta kullanılacak olan Lizis tamponu, her bir petri için gerekli olan 666 µL SDS Lizis Tampona'a 3.3 µL Protease İnhibitor Koktail II ilavesi ile hazırlandı. Santrifüj ardından süpernatant atıldı. Hücre peleti, 1X Proteaz İnhibitör Kokteyli II ile hazırlanan 666 µL SDS Lizis tamponu ile çözüldü. Hücre lizatı, santrifüj tüpünlerine 300-400 µL bölündü. Hücre lizatında bulunan çapraz bağlı DNA'ları 200-1000 bç uzunluğunda parçalara ayırmak üzere buz ile doldurulmuş olan ultrasonik sonikasyon cihazı kullanılarak 5 tekrarlı şekilde 10 saniye sonikasyon, 10 saniye buzda inkübe edildi. Sonikasyon işlemi sonrasında +4 °C'de, 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant 100'er µL şeklinde temiz ependorflara paylaştırıldı. Her 100 µL'lik süpernatant, 1 x 10⁶ hücreye eşit hücre lizatı içermektedir. İstenirse 5 µL hücre lizatı sonikasyon sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilebilir. Elde edilen hücre lizatları 2 ay süresince -80 °C'de zarar görmeden muhafaza edilebilir.

3.2.5.2.2 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Çapraz Bağlı DNA/Protein İmmunopresipitasyonu

Her IP örneğine, 600 µL Dilüsyon Tamponu ve 3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli II eklenmelidir. Dilüsyon tamponu buz üzerinde soğutulduktan sonra Bölüm 3.2.5.2.1’de hazırlanan ve -80 C’den çıkarılan 100 µL hücre lizatı üzerine 600 µL eklendi. 700 µL son hacimdeki hücre lizatının antikor ile muamele işlemi öncesinde ön temizleme amacıyla her bir IP örneği üzerine 42 µL Protein G Agaroz ilave edildi. Protein G Agaroz ile IP, spesifik olmayan, bağlanabilecek protein parçalarından ayrıştırıldı. Rotasyonlu döndürücüde, +4 °C’de, 1 saat inkübe edildi. 1 dakika, 5000 x g’de santrifüjlendikten sonra Protein G Agaroz pelet haline getirildi, süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Hiçbir antikor uygulanmamış süpernatanttan %10 İnut olacak şekilde 7 µL sonraki basamaklar için temiz bir ependorf tüpüne ayrılarak, +4 °C’de muhafaza edildi. Örnekler üzerine uygun antikorlar eklendi (Tablo 3.32). Uygun antikorlar eklendikten sonra +4 °C’de rotasyonlu çalkalayıcıda gece boyu inkübe edildi. Antikor/antijen/DNA kompleksi ile Protein G Agaroz ‘un birleştirilmesi amacıyla ertesi gün için IP’ler üzerine 42 µL Protein G Agaroz ilave edildi. 1 saat boyunca +4 °C’de rotasyonlu çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra 1 dakika 5000 x g’de santrifü işlemi uygulanarak, Protein G Agaroz pelet haline getirildi. Ardından süpernatant dikkatli bir şekilde, temiz bir ependorf tüpüne alındı. Pelet halindeki Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin komplekslerinin yıkama işlemleri Tablo 3.33’te belirtilen tamponlarla ve belirtilen sayılarda, 700 µL tamponda resüspanse edilerek gerçekleştirildi. Her resüspanسیون sonrasında, 5000 x g’de 1 dakika santrifüj işlemi yapılarak Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin kompleksi yıkamaları tamamlandı.

Tablo 3.32: ChIP prosedüründe kullanım amacına göre antikorlar ve miktarları.

Kullanım Amacı	Antikor
Pozitif Kontrol	Anti-RNA Polimeraz II (1 µg)
Negatif Kontrol	Normal Mouse IgG (1 µg)
İlgilenilen Antikor (Mouse)	HIF-1a (Mouse) (1 µg)

Tablo 3.33: ChIP prosedüründe kullanılan yıkama tamponları ve yıkama sayıları.

Tampon İsimleri	Yıkama Sayısı
Düşük Tuzlu Yıkama Tamponu	1
Yüksek Tuzlu Yıkama Tamponu	1
LiCl İçeren Yıkama Tamponu	1
TE Tamponu	2

3.2.5.2.3 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu

IP tüpleri için hazırlanan elüsyon tamponuna, her IP için, 7 µL %20 SDS, 14 µL 1 M NaHCO₃ ve 119 µL dH₂O karışımı ilave edildi. Bölüm 3.2.5.2.2’de ayrılan input üzerine hazırlanan elüsyon tamponundan 140 µL eklendi ve Bölüm 3.2.5.2.4’e kadar oda sıcaklığına bırakıldı. Kromatin/Antikor/Protein G Agaroz kompleksi içeren her IP tüpüne hazırlanan elüsyon tamponu 70 µL olacak şekilde ilave edildi. Tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 1 dakika 5.000 x g’de santrifüjlenerek, süpernatant temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Elüsyon tamponu eklendikten sonra oda sıcaklığında inkübasyon ve santrifüjleme işlemleri tekrar edildi.

3.2.5.2.4 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA’ya Çevrilmesi

Bölüm 3.2.5.2.3’de hazırlanarak elüsyon tamponu içerisinde oda sıcaklığında bekletilen %10 input ve IP’lere 5.6 µL 5M NaCl eklenerek gece boyu 65 °C’de sıcak su banyosunda bekletildi. Ertesi gün, tüm örnekler 0.7 µL RNaz A eklenerek 30 dakika 37 °C su banyosunda tutulduktan sonra RNaz A’nın aktivitesini inaktive etmek amacıyla her örnek üzerine 2.8 µL 0.5M EDTA, 5.6 µL 1M Tris-HCl ve 0.7 µL Proteinaz K karışımı eklendi. 45 °C su banyosunda 1-2 saat süresince bekletildi.

3.2.5.2.5 Kromatin İmmunopresipitasyonunda DNA’nın Saflaştırılması

Her bir IP örneği ve input için, kit içeriğinde yer alan Spin filtre ve spin filtrelerin yerleştirileceği toplama tüpleri hazırlandı. İçerisinde 140 µL örnek olan her tüp içerisine 700 µL Bind Reagent A eklenerek güzelce karıştırıldı. Her 140 µL numune için, 5 katı miktarda olacak şekilde Bind Reagent A eklendi. Bu aşamada örneklerde presipitasyon olduğu

gözlemlendi. Presipite olmuş 600 µL Numune/Bağlama Reaktifi A spin filtreye alınarak 30 saniye 13.500 rpm’de kısa santrifüjlendi. Spin filtre, toplama tüpünden ayrıldı ve toplama tüpünde bulunan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı. Spin filtre, toplama tüpüne yerleştirildi ve kalan 600 µL karışım spin filtreye aktarılarak kolondan geçirme basamakları tekrar edildi. Toplama tüpüne yerleştirilen spin filtre içerisine 350 µL olacak şekilde kit içinde yer alan Yıkama Reaktifi B eklenerek, 30 saniye 13.500 rpm’de kısa santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde biriken kısım atılarak spin filtre tekrar toplama tüpüne yerleştirildi ve boş şekilde santrifüj işlemi tekrarlandı. Ardından Spin Filtre, steril ependorf tüpüne yerleştirildi. Spin filtrenin merkezinde yer alan beyaz membran üzerine, 35 µL Elüsyon Tamponu C eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 30 saniye 13.500 rpm’de santrifüj yapıldı. Spin filtre membranından serbest hale getirilerek elde edilen elüat; saflaştırılan DNA’dır. Saflaştırılan DNA ile Tablo 3.34’te verilen primerler kullanılarak Tablo 3.35’te belirtilen koşullarda Real Time PCR’a tabi tutuldu ve HIF-1α bağlanma bölgelerinin (HRE) tespiti sağlandı. Elde edilen saflaştırılmış saflaştırılan DNA örnekleri, uzun vadede -20 °C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.34: ChIP Real Time PCR’ında kullanılan primerlerin lokasyonları, dizileri ve büyüklükleri.

Primer Adı	Lokasyon	Primer dizileri (5’-3’)	Ürün büyüklüğü (bç)
ChIP 1 İleri	+51/-155	5’-CAACTCACACAGAGGCTGTTCTT-3’	206 bç
ChIP 1 Geri		5’-AACTTCTGCGCTTCCAAAATTCC-3’	
ChIP 2 İleri	-260/-465	5’-CAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGA-3’	205 bç
ChIP 2 Geri		5’-CTGCATGGCTTACGCGCTGCAT-3’	
ChIP 3 İleri	-748/-941	5’-GATAGGTATCGAGTCTAGATCTG-3’	193 bç
ChIP 3 Geri		5’-ACGTATGGTTCAGTATAGAGCTG-3’	
ChIP 4 İleri	-1046/-	5’-CAGGAGAAAACCTGGTCATGATGT-3’	183 bç
ChIP 4 Geri	1229	5’-ATGGCAGAATGAAATAATACGTCA-3’	
ChIP 5 İleri	-4734/-	5’-ATTAGGCGAAGTAAAAACAGAGTGA-3’	175 bç
ChIP 5 Geri	4909	5’-TTCTTCAGAGATCTGCTTACATTC-3’	
ChIP 6 İleri	-56979/-	5’-GATGAACACCCAGTATTGTTATGA-3’	128 bç
ChIP 6 Geri	57107	5’-GTAAGAAGCTTTTACATTAAGCATG-3’	

Tablo 3.35: ChIP Real Time PCR döngü şartları.

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

3.2.5.2.6 Sonuçların Analiz Edilmesi

Real-time PCR sonuçları Microsoft Excel programında analiz edildi. Analiz için; Input CT değerlerinden %1 Log değeri çıkarılarak düzeltilmiş (Adjusted) Input değerleri elde edildi. Düzeltilmiş Input değerlerinden, örnek CT'leri çıkarılarak delta CT değerleri belirlendi. Belirlenen değerin 2'nin üssü şeklinde kuvveti alındı ve 100 ile çarpılıp % Input değeri elde edilerek ortalaması alındı. % Input negatif kontrol ortalamasına göre, örneklerin % Input değerleri kat alındı. % Input kat ortalaması ve standart sapmaya göre Graphpad Prism Programında sonuçlar grafiklendirildi.

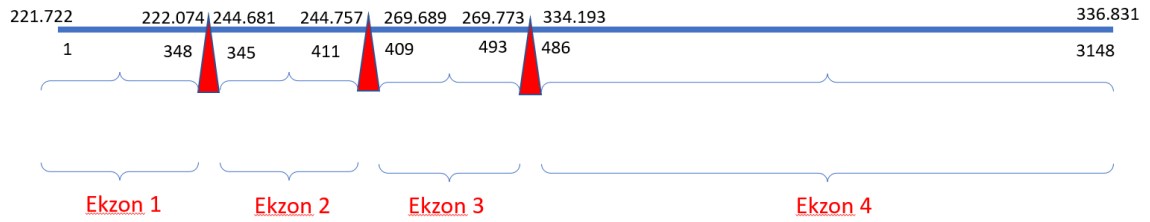
4. BULGULAR

4.1 Bioinformatik Analizler

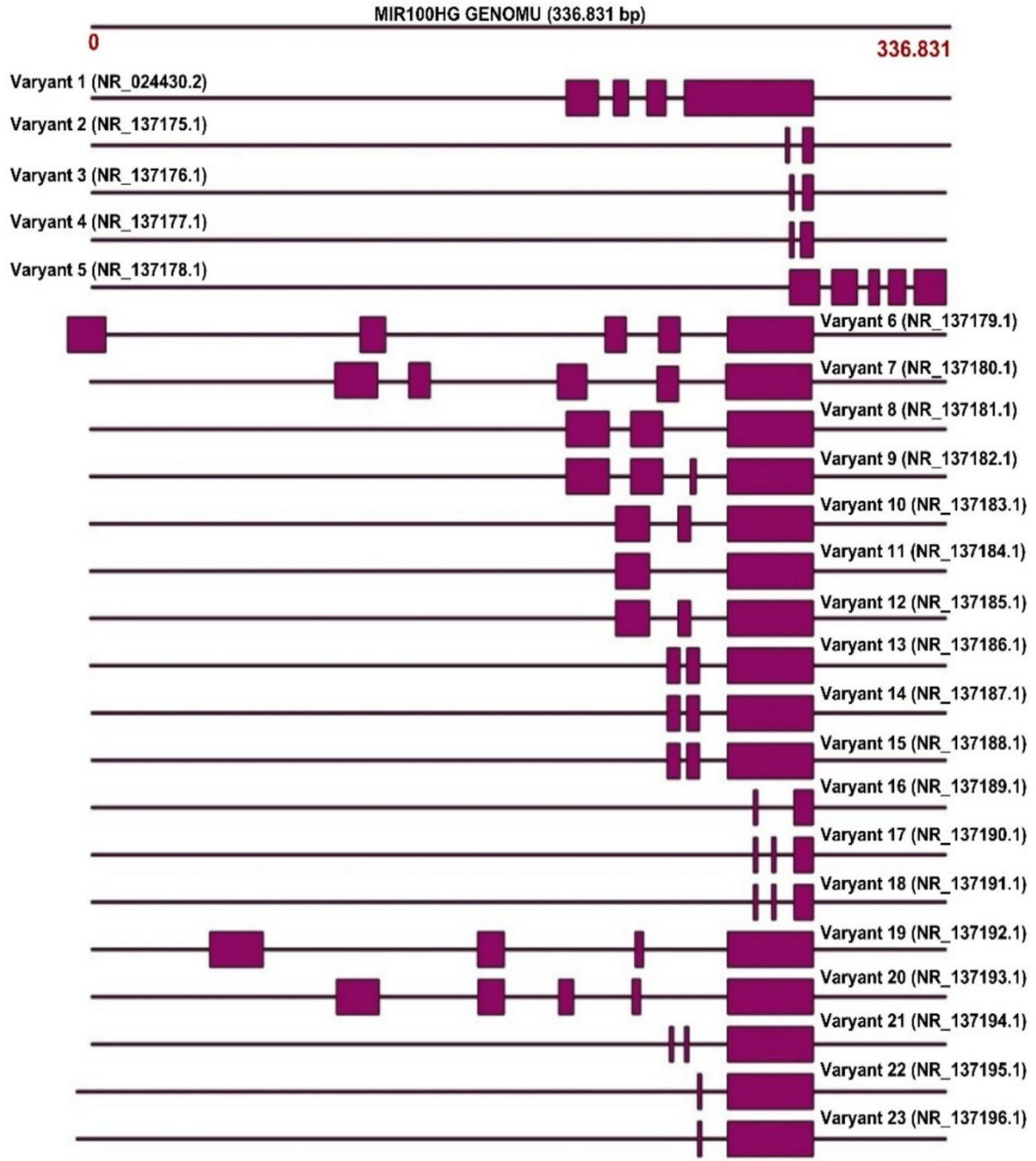
4.1.1 MIR100HG Geninin Bioinformatik Analizleri ve Varyant Seçimi

MIR100HG, uzun kodlanmayan RNA olduğu için biyoinformatik çalışmalar, ilk olarak MIR100HG genomunun analizi ile gerçekleştirildi. Bunun için NCBI'dan MIR100HG genomu ile ilgili araştırma gerçekleştirildi. MIR100HG genom uzunluğunun yaklaşık 337.000 bp uzunluğuna sahip olduğu sonucuna ulaşıldı. NCBI'da 23 varyantı olduğu tespit edildi. Her bir varyantın, MIR100HG genomu üzerinde konumları, başlangıç ve bitiş noktaları NCBI BLAST programı ile tespit edildi, ekzon ve intronları belirlendi. Genom üzerinde işaretlenerek şematik hale getirildi (EK A). MIR100HG genomu ve varyantların mRNA transkriptleri BİOEDİT programında dizi kıyaslama çalışmaları ile karşılaştırıldı. Sonrasında tüm varyantların ekzon ve intronları, MIR100HG genomu üzerinde işaretlenerek birbirleri ile kıyaslama yapmak amacıyla genom üzerinde ölçeklendirilip görselleştirildi (Şekil 4.2).

Varyant 1 ([NR 024430.2](#))



Şekil 4.1: Varyant 1'in şematik gösterimi.



Şekil 4.2: MIR100HG Genomu ve varyantları.

Genom üzerinde her bir varyantın ekzonları mor kutucuk ile gösterilmiştir. Kutucuklar arasında bulunan çizgiler ise intronları temsil etmektedir. Biyoinformatik analizler sonucunda, uzun kodlanmayan RNA olan MIR100HG geni ile yapılacak ileriki çalışmalar için Varyant 1 (NR_024430.2) seçilmiştir (Şekil 4.1). Varyant 1, MIR100HG genomu üzerinde 221.722 bp noktasında başlayıp, 336.831 bp'de sonlanmaktadır. Dört ekzon ve üç introndan oluşmaktadır.

4.1.2 MIR100HG Ekspresyon Primerlerinin Tasarlanması

MIR100HG genine ait Varyant 1'in CDS (mRNA transkript) dizisi üzerinden başlangıç ve bitiş kodonları belirlenerek ekzonları işaretlenmiştir. MIR100HG geni ekspresyon çalışmaları için tasarlanan ekspresyon primerleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ekspresyon primerleri tasarlanırken, iki farklı ekzondan seçilmesine, 20-25 bp uzunluğunda olmasına, seçilen iki primer arasında yaklaşık 300 bp bulunmasına, G-C bakımından zengin bölgeler olmamasına, Tm değerlerinin yaklaşık 50-60 °C olmasına ve NCBI'da bulunan BLAST programı kullanılarak belirlenen primerler ile MIR100HG geni arasında %100 benzerlik olmasına dikkat edilmiştir (EK B).

1	ggggagccgc	cgaggggcag	ctggggctgc	ggaatthttg	aagcgcagaa	gtttttcctc
61	cctgtcctgt	aactggtttt	cactcactca	actgagagat	ttctttgttg	caatgatggg
121	gtctaagata	acaactctgg	aggctgcagg	cgagaaacac	agctgatatc	atctttttatt
181	gtgtgttgtt	atttgccctag	cattataaat	taaggaggaa	tagtaacaaa	gagcttgaag
241	acatgcacag	ctcacaggcc	cgggtgggag	gctggcgaca	tcagacagac	agaaccaaga
301	catctgaggg	gcaaccagga	ggtgcgtgtg	gctgcagagc	acacagactt	gtctttggac
361	aaaattgaga	agaactcata	aaattggatt	actggatttg	gllcctcaga	cgcggttga
421	tgatttgaag	atattagcct	aacaagatgg	aagcaggttt	aaaatthttc	ataagaagtt
481	acgtttttca	gttgtgttga	tgttcctttc	agctggctct	atagtacccc	tcctcaggaa
541	tgctcccca	gtgcaaggac	aaaactgaa	gagactgcta	tattgatgga	ctctcaagcc
601	aactatgaag	ttgaaacaaa	gaaagtgatc	acctgaagac	acctcctctg	ctaagaaaca
661	ccccaaatt	gtgcagcttc	tgccactaga	actctcagaa	caagagacaa	tcctttcaag
721	aacagaaaa	actcaataat	gacatctaga	ttttcatgag	ccaagaactt	tcctctcctc
781	atgtgtatcc	ctctgtttgt	acttaaatcc	atgtgacatt	catthttttc	ctagtattga
841	tatgcttatt	aatgcacttg	tttcaaatcc	ccaaattgca	caaatgtggt	aatatthtaa
901	gaaacaaat	gaaatcctaca	aggagaatga	tttttagcca	ccataggggt	tggtctttga
961	gagtgacctc	cagaataaaa	gtacttttaa	aataaagtag	tcagaggcta	ttcaaggggt
1021	aaaataatca	tagtaccaca	ttggtccact	tgacactaac	caatcgatca	ttttttttta
1081	atcaagaaag	ctagattcctc	tcagataaaa	tcactgcttc	taagagtttt	aaatctagtt
1141	agaaaaagtt	atagaaatgt	ttgcaagat	aagtaacaga	tagagtcagt	agaggataag
1201	atcaaaaaa	aaaccaagca	aaagtgaat	tcaggggagt	ttgccatcaa	gttgcaaaa
1261	ctgacttact	tagggaagaa	agttataaaa	cagggaaata	tgagatgaac	cttgagtgat
1321	gtggaagatt	tagataaatg	gaaaggaagg	agaaaatgga	ggtctttagg	tggttgtaat
1381	tgaggaggga	aatgaataca	cacatcttgt	tgacttaaac	ccagacattc	agcagctctc
1441	tatacatatc	tggaaaagac	tgacagctca	ctctctgtct	ctcaccocag	gtattactta
1501	gaattattat	catatttccc	ttccttttaa	gtaagtaagg	gtgattggtg	acaatttggg
1561	gaactatgat	ttttccattc	acctaaata	aattggtatt	tattgagttc	tgtaagcat
1621	tttaccatatt	aaactcactta	agcctttcaa	cagccttgca	aaataggtat	tattatcccc
1681	atthttcagg	caagaaaact	gggttttaag	taacttgccg	aagtgccata	tacagggctc
1741	acattcagta	ttgcagttgc	aaagctcatg	atctatagtg	ccaagttgca	atatgtaggt
1801	caatgtcaca	attattaccc	ctttttatat	tccttgatat	ttttccatgg	caaaacaatta
1861	gctatttcat	tttaataatc	ctaaaaactt	ttcagttctc	tgattaaat	tacgctggag
1921	tgatagaatg	tattttcatg	atagaaattg	ggaaaaaaaa	tggggaatga	agttttcag
1981	gatttcagac	ttgttttttt	tttttttttt	tgcaagactt	tgatgagatt	gttcaacttt
2041	gtctatgtaa	aatcccaaat	ccttgagaat	aaaaaagggg	gaggtttaag	tcacttggtg
2101	caatgcccct	tttaatagag	gcaataaatc	taaaggccat	aaatttagag	tgacttacag
2161	aagatcgaac	tttgaggtgt	ggcagagtaa	gggatggaaa	ccgggccctc	cagttcaacta
2221	tcagtagctt	ttgcactggt	ctgcccttcc	taaatataag	atgcacttca	atthgatgag
2281	tggaacagct	ctatctgggc	agtaaccagg	gagctttgtg	ctagtagat	tgctctgttt
2341	ctgcacttct	ttggtttccc	acctcaatgt	aaaaaatagc	tagcaatgaa	gtccagaagt
2401	tgccaatggt	tcattcccag	aagaatgcat	aatgtccaaa	gttgtatgtg	tatgatgtct
2461	tcattgggat	taagttatth	caaatcttta	gttcaactac	ataaatcatt	ttcaacaagc
2521	atcttcttaa	ccaactttat	gcacagtgta	tgthtataag	tgcttctgca	ccaatgttta
2581	tacatgactg	tttccatagt	acttatgttt	ttaaaaatat	tcagtcattt	cctactataa
2641	tcctcatgta	tcctatgtaac	tgactcaaaa	atacttcagc	ccagaaagc	taaaactgag
2701	caaatctcat	ttcttttttc	catccctttt	gcagtggtct	ggcatttagt	aatgattaat
2761	aatatggcca	gctgaataac	agaggtttga	gacacaatcc	tttctcaag	gagtcagcta
2821	agctgggtct	acttatggac	aaacatctaa	atgtgtggaa	gtatctgata	tttgacaatg
2881	gtaaatthcc	acttagctag	ctagcattgt	cagacttcaa	ttctctcatg	gctctggccg
2941	tcctgtttta	agcatgataa	ttgttggcca	catctcacat	agttctcatt	gagtgagctc
3001	ataaataaac	agggtttttt	tttttttttt	aagagcagcc	aagcaaaaag	tgtagctttg
3061	ttgacattht	atgtgacttt	gtcatatggt	cctaaacccc	aataaaaagca	atgttgcatc
3121	aactgtgaa					

Şekil 4.3: MIR100HG Varyant 1 CDC (mRNA transkript) dizisi, ekzonları ve seçilen ekspresyon primerleri.

Tasarlanan ekspresyon primerlerinin Tm ve annealing değerleri hem manuel olarak hem de <https://www.idtdna.com> adresinden Oligo dT Analyzer programı ile analiz edildi. Seçilen primerler, MIR100HG ekspresyon çalışmalarında kullanılmıştır.

4.1.3 MIR100HG Ekspresyon Primerlerinin PCR ile Denenmesi

MIR100HG ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan MIR100HG primerlerinin tasarımı Bölüm 4.1.2’de anlatılmıştır. Tasarlanan MIR100HG ekspresyon primerlerinin denenmesi için öncelikle Hep3B hücrelerine 300 µM CoCl₂ uygulandı. 24 saat sonunda, Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı şekilde hipoksi ve normoksi RNA’lar izole edilmiştir. Bölüm 3.2.3.4’te anlatıldığı şekilde cDNA’lar elde edilmiştir. Elde edilen cDNA’lar farklı ng’larda kullanılarak MIR100HG ekspresyon primerleri ile Hβ-2 PCR ((Sq) RT- PCR) kuruldu (Bölüm 3.2.3.5). MIR100HG ekspresyon primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR’a ait döngüler Tablo 4.1’de verilmiştir. PCR ürünleri, Bölüm 3.2.1.3’te anlatıldığı şekilde DNA agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.4).

Tablo 4.1: Ekspresyon primerlerinin kontrolü için gerçekleştirilen Hβ-2 ((Sq) RT-PCR) döngü şartları.

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

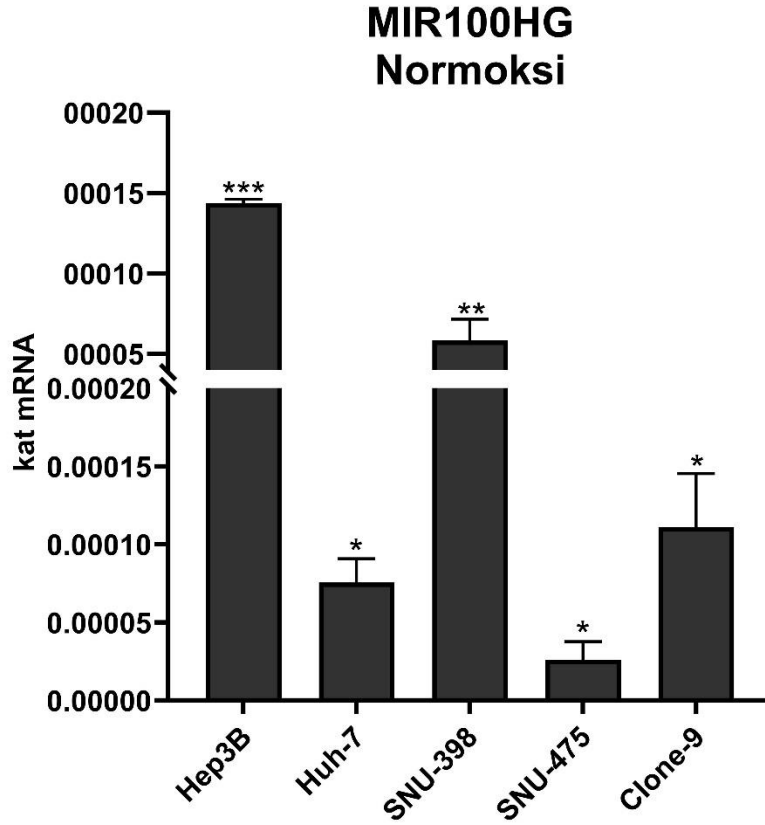


Şekil 4.4: MIR100HG ekspresyon primerlerinin Hep3B normoksi ve hipoksi cDNA'ları ile kontrolü.

Yapılan PCR sonucunda, tasarlanan MIR100HG primerlerinin kontrolü sağlanmıştır.

4.1 MIR100HG Geninin Farklı Hücre Hatlarında Ekspresyonunu Belirleme Çalışmaları

MIR100HG'nin normal oksijen koşullarında ifadesinin belirlenmesi için, iki epitelial (Hep3B ve Huh-7) ve iki mezenşimal benzeri (SNU-398 ve SNU-475) hepatosellüler kanser ve de sağlıklı epitelial karaciğer hücresi (Clone-9) Bölüm 3.2.2.7'de belirtildiği üzere büyütülmüştür. Total RNA izolasyonu (Bölüm 3.2.3.1) yapıldıktan sonra, cDNA sentezi (Bölüm 3.2.3.4) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar Bölüm 3.2.3.6'da belirtildiği üzere Real-Time PCR analizine tabi tutulmuştur. Normalizasyon amaçlı insan Humanbeta-2 mikroglobülin primerleri kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.2.3.6'da belirtildiği üzere değerlendirilmiştir. Graphpad Prism programı ile analiz edilip grafiklendirilmiştir. Sonuçlara göre MIR100HG ekspresyonunun en yüksek olduğu hücre hattı Hep3B hücre hattı olarak belirlenmiştir. Bu ekspresyon düzeyini SNU-398 hücreleri takip etmektedir (Şekil 4.5).



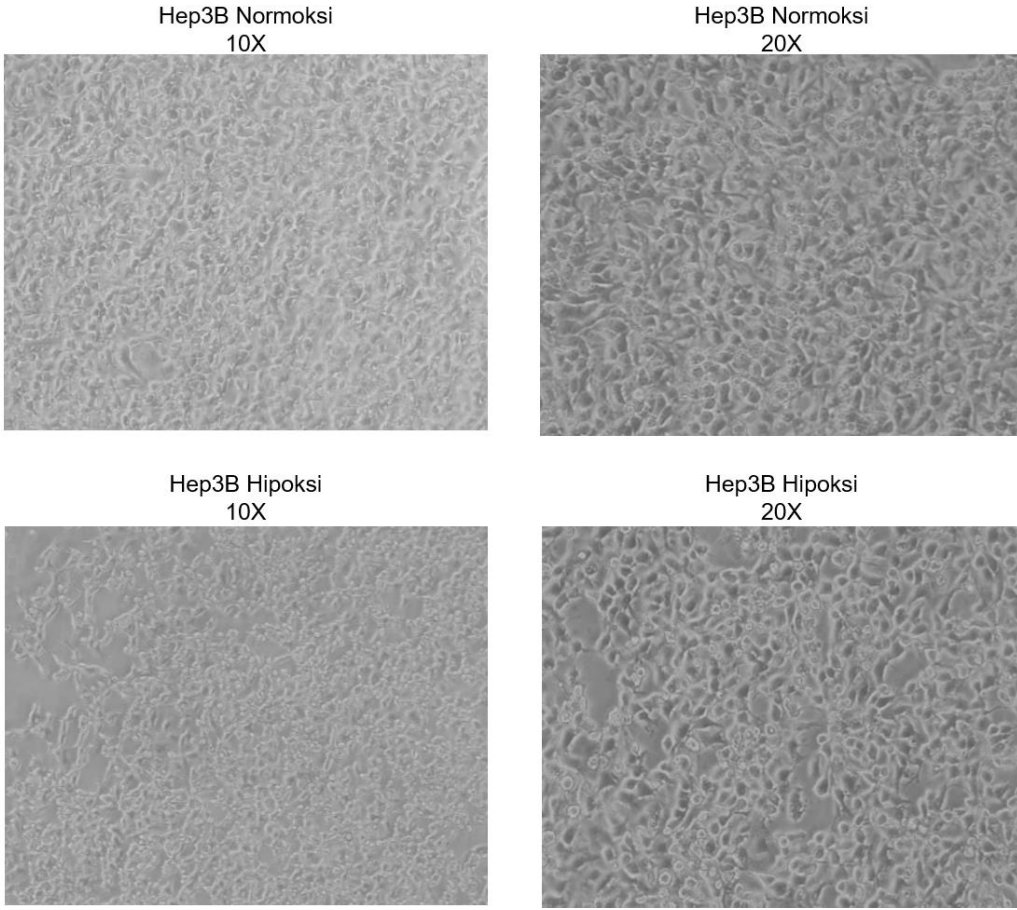
Şekil 4.5: MIR100HG mRNA ifadesinin farklı hepatosellüler kanser hücre hatlarında ve sağlıklı karaciğer hücre hattında normoksi şartlarda belirlenmesi.

Bu sonuçlar doğrultusunda Hep3B hücre hattı ana model, SNU-398 hücre hattı yan model, Clone-9 hücre hattı ise sağlıklı karaciğer hücre hattı olarak seçilmiştir.

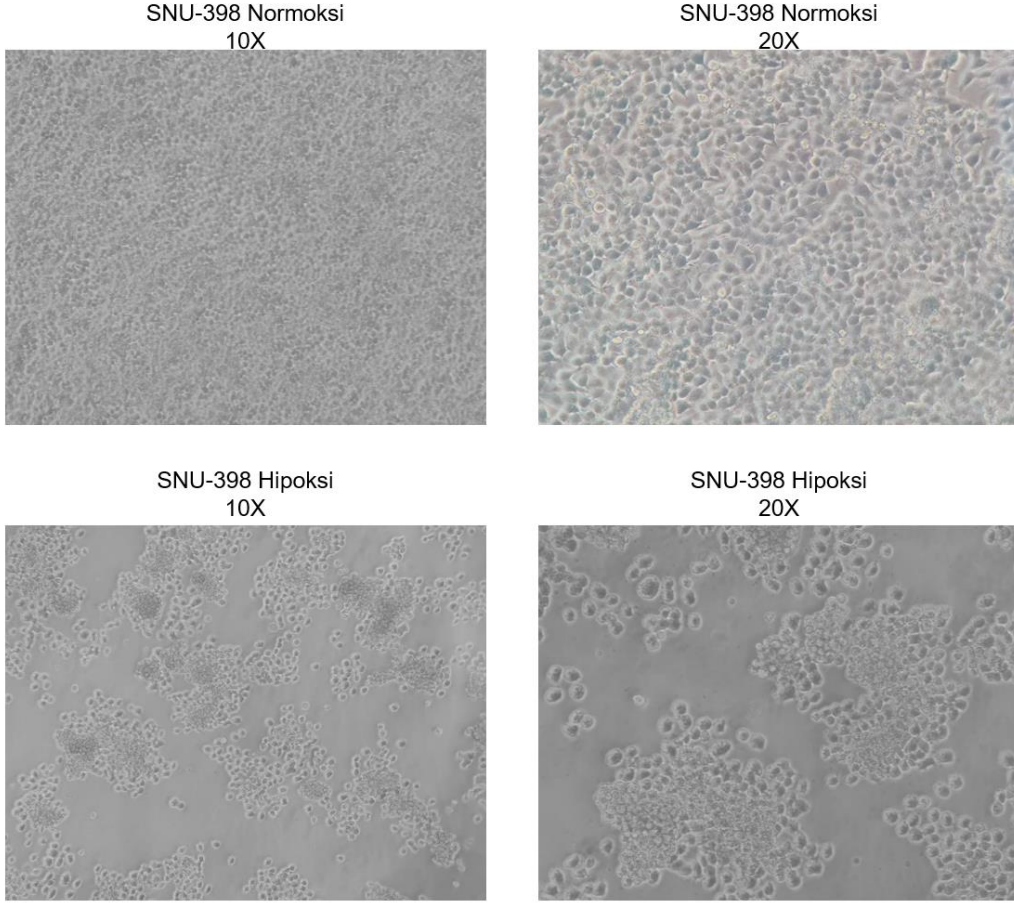
4.2 Hücre Hatlarında Kimyasal İndüklenmiş Hipoksik Modelin Oluşturulması

4.2.1 Hipoksik Model Oluşturulması

MIR100HG'nin hipoksik koşullarda ifadesinin belirlenmesi için, iki epitelial (Hep3B ve Huh-7) ve iki mezenşimal benzeri (SNU-398 ve SNU-475) hepatosellüler kanser ve de sağlıklı epitelial karaciğer hücresi (Clone-9) Bölüm 3.2.2.7'de belirtildiği üzere büyütülmüştür. Kimyasal hipoksi oluşturmak amacıyla hücelere $CoCl_2$ uygulamaları, Bölüm 4.2.2 ve 4.2.3 'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen MTT testi ve Real-Time PCR analizleri sonucunda belirlenen konsantrasyonlara göre uygulanmıştır. Aşağıda hücrelerin normoksi ve hipoksi şartlardaki hücre fotoğrafları 10X ve 20X büyütmede verilmiştir (Şekil 4.6-4.10).



Şekil 4.6: Epitelial kökenli Hep3B hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.

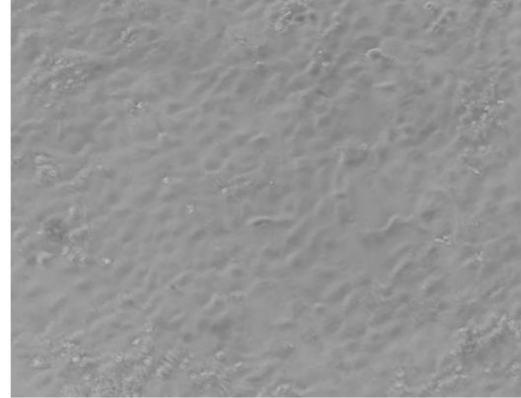


Şekil 4.7: Mezenşimal kökenli SNU-398 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.

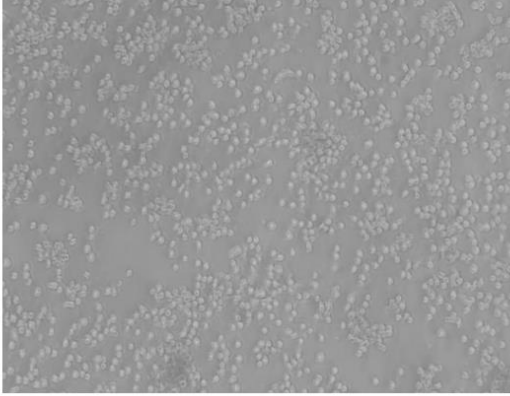
Clone-9 Normoksi
10X



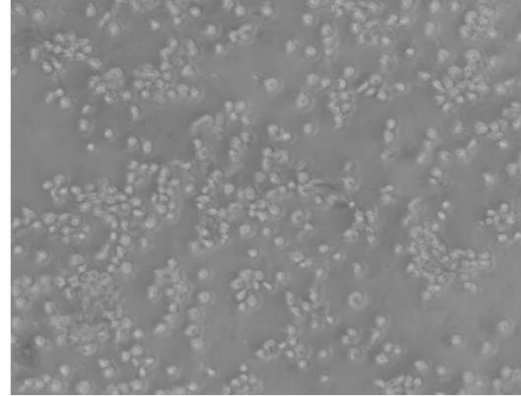
Clone-9 Normoksi
20X



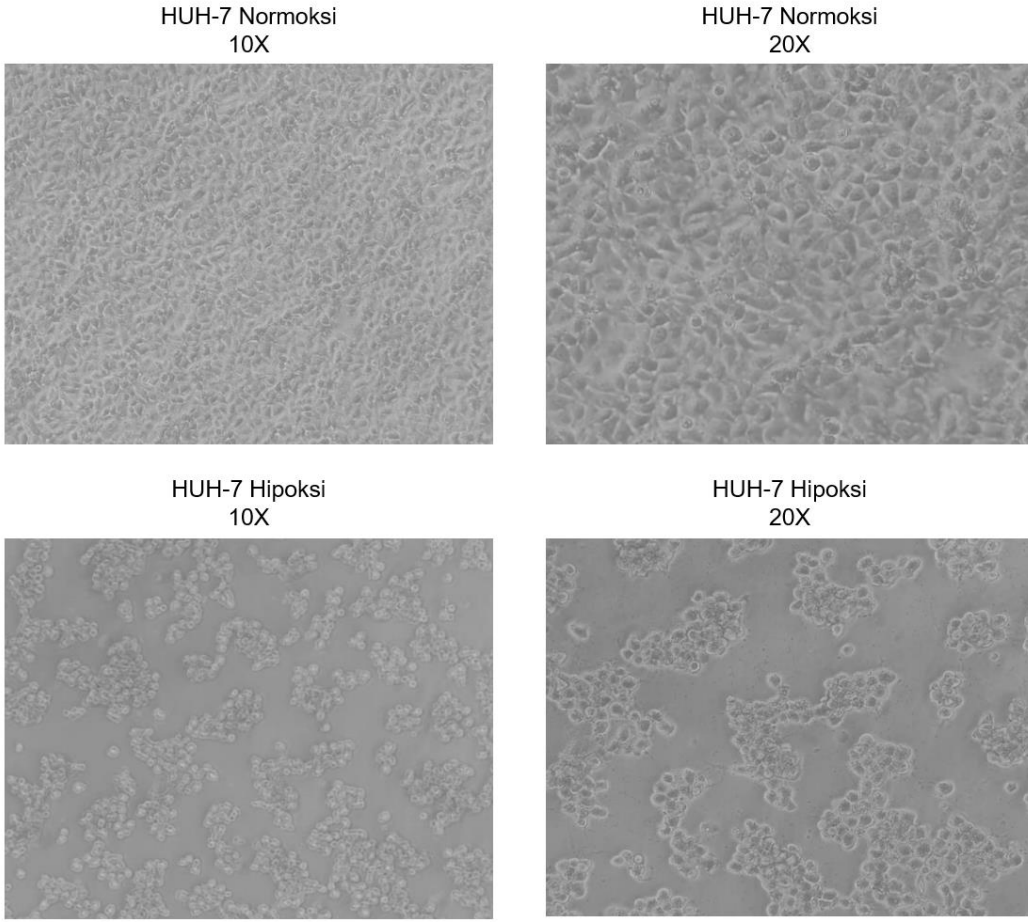
Clone-9 Hipoksi
10X



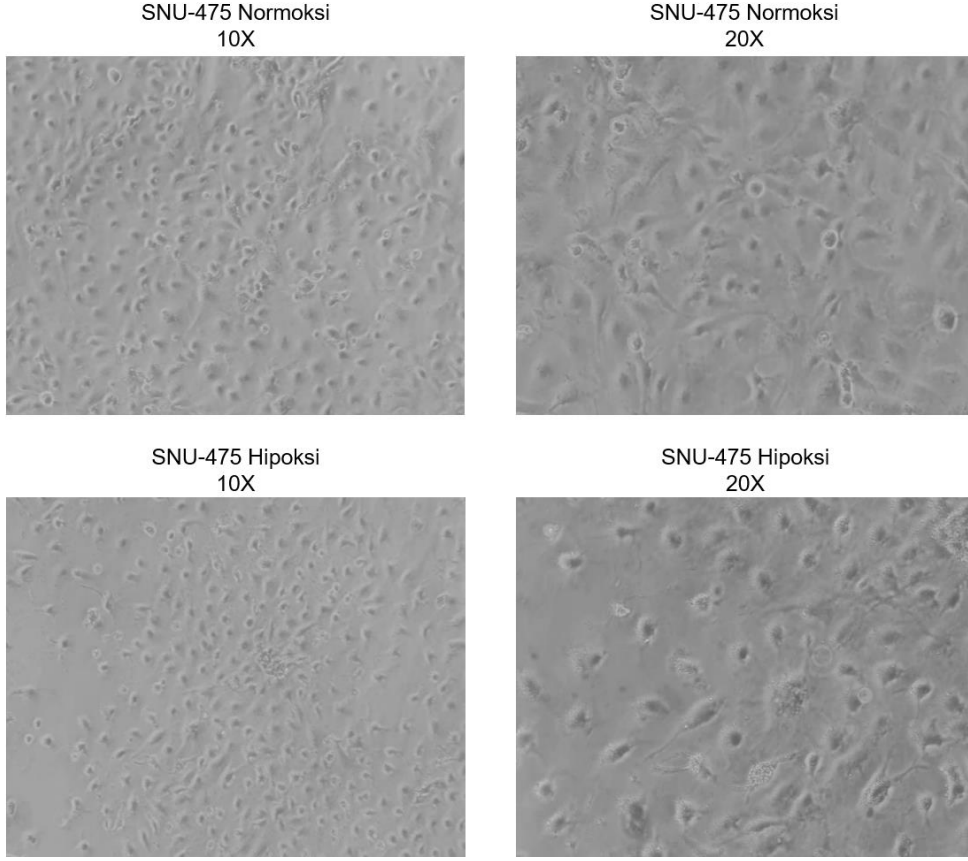
Clone-9 Hipoksi
20X



Şekil 4.8: Sağlıklı karaciğer hücre hattı Clone-9 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.9: Epitelial kökenli HUH-7 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.

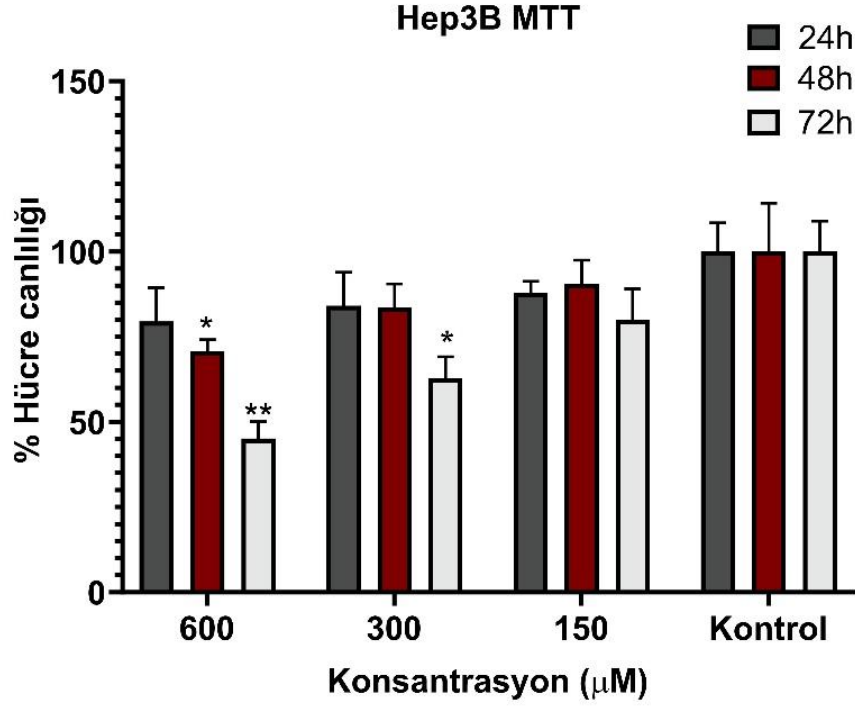


Şekil 4.10: Mezenşimal kökenli SNU-475 hücrelerine ait normoksi ve hipoksi ortamda 10X-20X büyütmede çekilen mikroskop görüntüleri.

4.2.2 Hipoksi Oluşumu İçin Gereken CoCl_2 Miktarının MTT Analizi ile Belirlenmesi

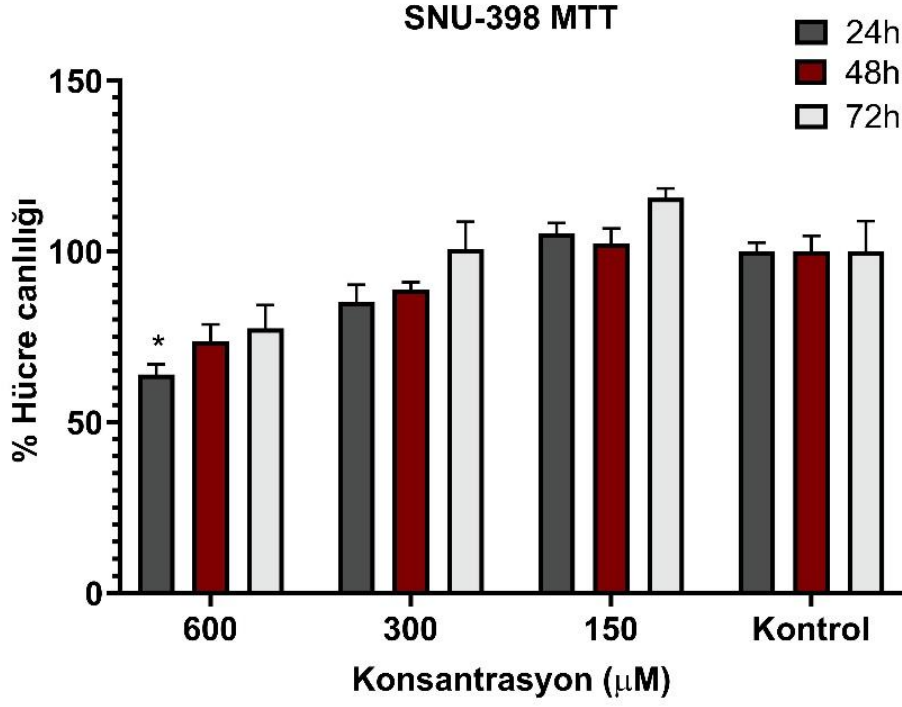
Hipoksi oluşumu için gereken CoCl_2 miktarının belirlenmesi amacıyla ilk olarak hücreler yeterli doluluğa ulaşana kadar Bölüm 3.2.2.7’de anlatıldığı şekilde büyütülmüştür. Ardından hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp Bölüm 3.2.2.8’de anlatıldığı şekilde sayılarak MTT deneyi için 10×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara bölünmüş ve üzerine CoCl_2 , 150, 300 ve 600 μM konsantrasyonlarda olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. Değerlendirme amaçlı Bölüm 3.2.2.12’de verilen MTT uygulaması yapılmış olup, sonuçlar % hücre canlılığı olarak grafikleştirilmiştir.

Hep3B hücre hattında uygulanacak olan CoCl_2 ’ün hücre canlılığı üzerine etkileri, farklı doz uygulamaları yapılarak değerlendirilmiştir. En yüksek doz olan 600 μM için 72 saatte bir toksisite gözlenmiştir. Diğer tüm uygulamaların sitotoksik açıdan anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.11).



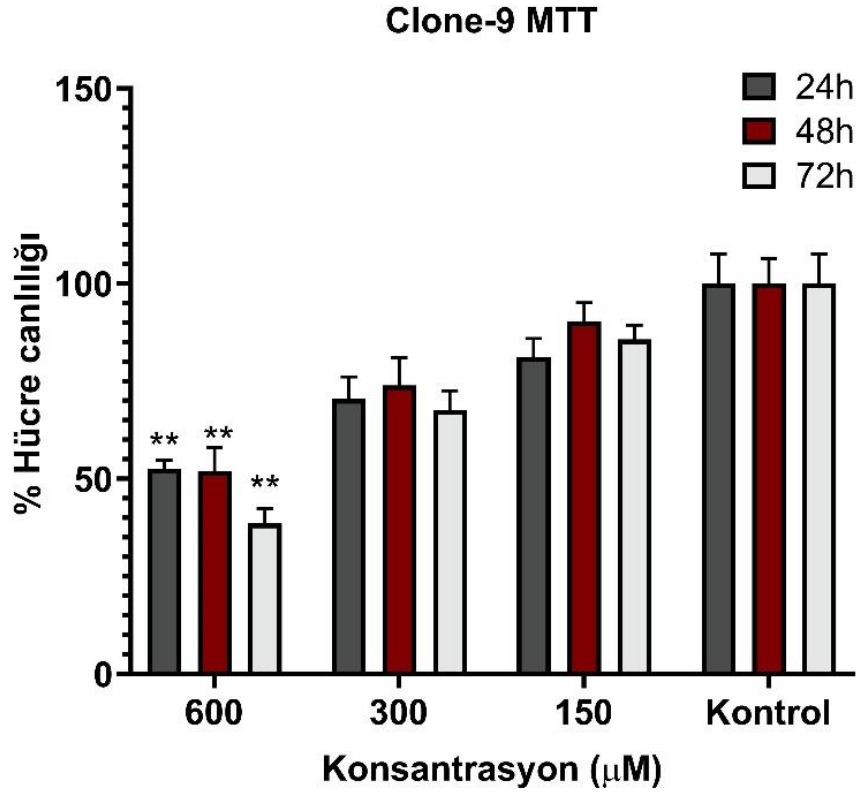
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulamalarının Hep3B hücre canlılığı üzerine etkisi.

SNU-398 hücre hattında uygulanacak olan CoCl_2 'ün hücre canlılığı üzerine etkileri, farklı doz uygulamaları yapılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, uygulamaların tüm dozları ve tüm saat dilimlerine bakıldığında SNU-398 sitotoksik açıdan anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulamalarının SNU-398 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Clone-9 hücre hattında uygulanacak olan CoCl_2 'ün hücre canlılığı üzerine etkileri, farklı doz uygulamaları yapılarak değerlendirilmiştir. 600 μM CoCl_2 uygulamasının tüm zaman dilimlerinde hücreler için %50'nin altında hücre canlılığını etkilediği belirlenmiştir. 150 ve 300 μM CoCl_2 konsantrasyonlarının ise tüm zaman dilimlerinde istatistiki olarak sitotoksik açıdan anlamlı etki göstermediği tespit edilmiştir. Sağlıklı hücre modeli olan Clone-9'un CoCl_2 uygulamaları için hassasiyet gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.13).

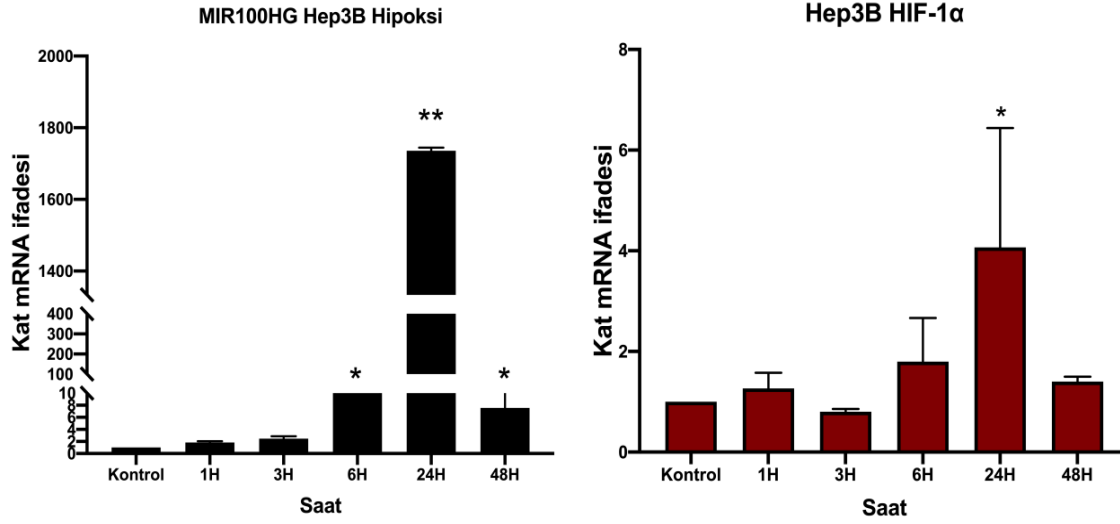


Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlarda CoCl_2 uygulamalarının Clone-9 hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.2.3 MIR100HG Geni Ekspresyonunun Hipoksik Koşullar Altında mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

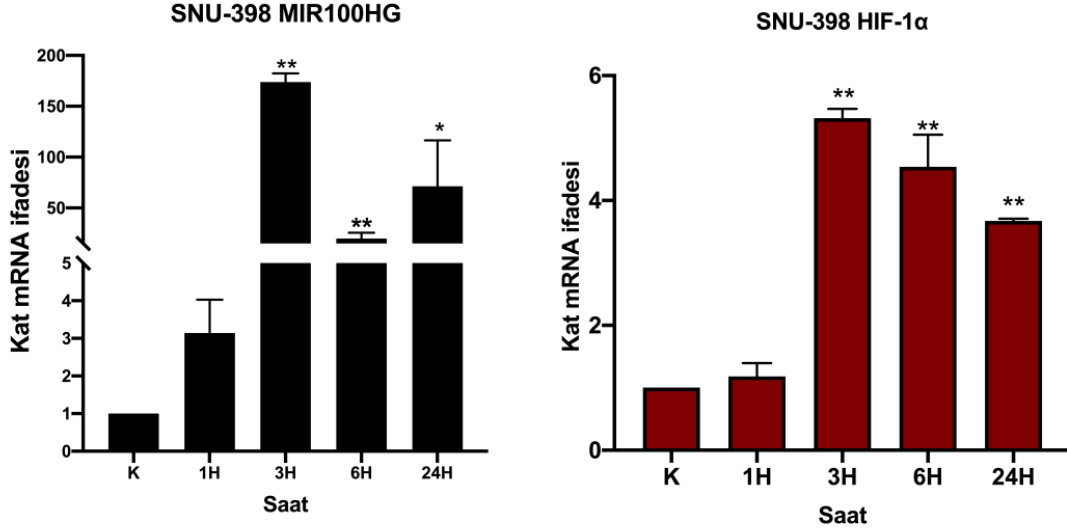
CoCl_2 kimyasal indüklemesi ile oluşan hipoksi durumu ve bu hipoksi durumunda MIR100HG ve HIF-1 α genlerinin ifadesinin belirlenmesi için ilk olarak Hep3B hücreleri büyütülüp, yeterli pasaj sayısı ve doluluğa ulaştıktan sonra hücreler, tripsinizasyonla kaldırılıp Bölüm 3.2.2.8'de anlatıldığı şekilde sayılarak 6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde bölünerek deney kurulmuştur. Kontrol kuyusuna karşılaştırma yapmak için uygulama yapılmamıştır. Hipoksi oluşturulacak kuyulara belirlenen 300 μM konsantrasyonunda CoCl_2 uygulanarak, 1s, 3s, 6s, 24s ve 48s zaman aralıklarında hipoksik durum değerlendirilmiştir. Devamında, Bölüm 3.2.3.1-4'te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar ile Real-Time PCR'da hedeflenen genler için (MIR100HG ve HIF1- α) Real-Rime PCR kurulmuştur. Normalizasyon amaçlı H β -2 primerleri kullanılmıştır (Bölüm 3.2.3.6). Sonuçlar Şekil 4.14'da gösterilmiş olup, buna göre

Hep3B hücrelerinde hipoksik cevabın HIF1- α mRNA seviyesinde olduğu doğrulanmıştır. Aynı zamanda MIR100HG ifadesinin mRNA seviyesinde, tüm zaman dilimlerinde arttığı ancak en yüksek cevabın, 24 saat zaman diliminde yaklaşık 1700 kat olduğu gösterilmiştir.



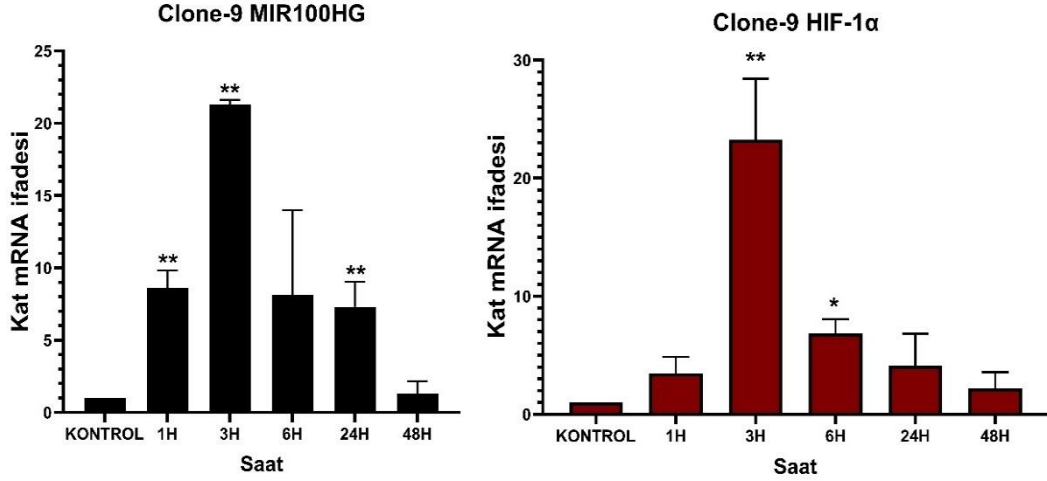
Şekil 4.14: Hep3B hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.

CoCl₂ kimyasal indüklemesi ile oluşan hipoksi durumu ve bu hipoksi durumunda MIR100HG ve HIF-1 α genlerinin ifadesinin belirlenmesi için ikinci olarak SNU-398 hücreleri büyütülüp, yeterli pasaj sayısı ve doluluğa ulaşıktan sonra hücreler, tripsinizasyonla kaldırılıp Bölüm 3.2.2.8’de anlatıldığı şekilde sayılarak 6 kuyucuklu plakalara 5 x 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde bölünerek deney kurulmuştur. Kontrol kuyusuna karşılaştırma yapmak için uygulama yapılmamıştır. Hipoksi oluşturulacak kuyulara belirlenen 300 μ M konsantrasyonunda CoCl₂ uygulanarak, 1s, 3s, 6s ve 24s zaman aralıklarında hipoksik durum değerlendirilmiştir. Devamında, Bölüm 3.2.3.1-4’te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA’lar ile Real-Time PCR’da hedeflenen genler için (MIR100HG ve HIF1- α) Real-Time PCR kurulmuştur. Normalizasyon amaçlı H β -2 primerleri kullanılmıştır. (Bölüm 3.2.3.6). Sonuçlar Şekil 4.15’de gösterilmiş olup, buna göre SNU-398 hücrelerinde hipoksi cevabın olduğu tüm saat dilimlerinde doğrulanmıştır. MIR100HG ifadesinin mRNA seviyesindeki tüm saat dilimlerinde HIF-1 α ile korele olacak şekilde artmış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15: SNU-398 hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.

CoCl₂ kimyasal indüklemesi ile oluşan hipoksi durumu ve bu hipoksi durumunda MIR100HG ve HIF-1 α genlerinin ifadesinin belirlenmesi için ikinci olarak Clone-9 hücreleri büyütülüp, yeterli pasaj sayısı ve doluluğa ulaştıktan sonra hücreler, tripsinizasyonla kaldırılıp Bölüm 3.2.2.8’de anlatıldığı şekilde sayılarak 6 kuyucuklu plakalara 5 x 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde bölünerek deney kurulmuştur. Kontrol kuyusuna karşılaştırma yapmak için uygulama yapılmamıştır. Hipoksi oluşturulacak kuyulara belirlenen 300 μ M konsantrasyonunda CoCl₂ uygulanarak, 1s, 3s, 6s, 24s ve 48s zaman aralıklarında hipoksik durum değerlendirilmiştir. Devamında, Bölüm 3.2.3.1-4’te anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA’lar ile Real-Time PCR’da hedeflenen genler için (MIR100HG ve HIF1- α) Real-Rime PCR kurulmuştur. Normalizasyon amaçlı GAPDH primerleri kullanılmıştır (Bölüm 3.2.3.6). Sonuçlar Şekil 4.16 ile gösterilmiş olup, buna göre Clone-9 hücrelerinde hipoksi cevabın olduğu tüm saat dilimlerinde doğrulanmıştır. MIR100HG ifadesinin mRNA seviyesindeki durumuna bakıldığında 1, 3 ve 24. Saatte artışın olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ve HIF-1 α mRNA ifadesi.

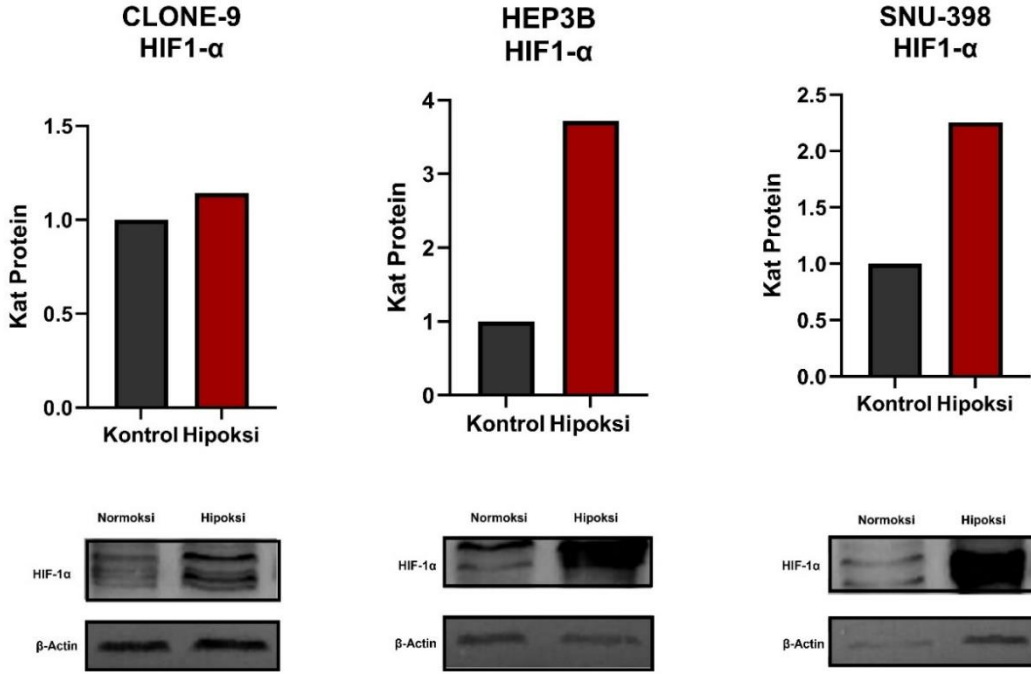
4.2.4 Hipoksi Oluşumunun Protein Düzeyinde Doğrulanması

Real Time PCR ile HIF-1 α ifadesine bakılarak mRNA düzeyinde hipoksi oluşumu doğrulanmıştır. Hipoksi oluşumu ayrıca Western Blot, IFC ve EMSA deneyleri gerçekleştirilerek protein düzeyinde de Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde doğrulanmıştır.

4.2.4.1 Western Blot

Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında hipoksik ortam oluşumunun protein seviyesinde doğrulanması amacıyla Western blot yöntemi gerçekleştirildi. 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler 6 kuyucuğa sahip plakalara paylaşılarak %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C’de gece boyu tutunmaları için bekletildi. Hipoksi oluşturulacak kuyulara 300 μ M CoCl₂ uygulaması gerçekleştirildi. 37 °C’de, 24 saat inkübe edildikten sonra, Bölüm 3.2.4.1.1’de belirtildiği şekilde RIPA tamponu ile 24 saat normoksi ve hipoksi protein ekstraktları elde edildi ve Bölüm 3.2.4.1.2’de anlatıldığı şekilde Bradford ile miktarları belirlendi. Protein ekstraktları ile Bölüm 3.2.4.1.3’te anlatıldığı gibi SDS-PAGE gerçekleştirildi. Protein örneklerinin molekül büyüklüklerine göre ayrılması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.4.1.4’te anlatıldığı gibi PDVF membrana transfer işlemi yapıldı. Daha sonra hipoksi oluşumunun protein seviyesinde kanıtlanması amacıyla Bölüm 3.2.4.1.5 ‘te belirtildiği şekilde HIF-1 α primer ve sekonder antikoru uygulandı. ECL Western substratı uygulandıktan sonra membranda bulunan protein bantları, UVP sisteminde görüntülendi (Şekil 4.17). Görüntülenen bantlar β -aktin antikoru

ile elde edilen sonuçlara göre normalize edilerek, veriler GraphPad programında grafiklendirildi (Şekil 4.17).

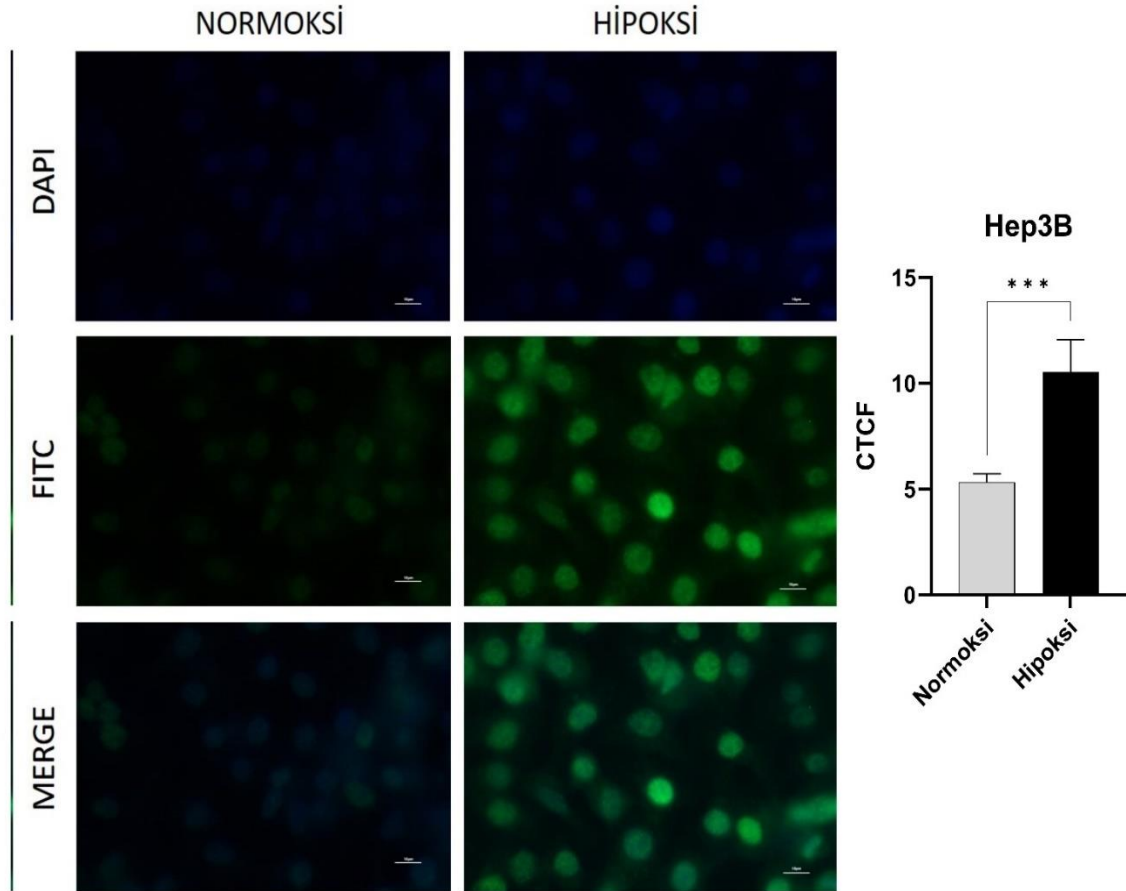


Şekil 4.17:Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde HIF-1α ifadesinin Western Blot yöntemi analizi ve hipoksi oluşumunun protein düzeyinde doğrulanması.

Bu şekilde, Hep3B (ana model), SNU-398 (yan model) ve Clone-9 (sağlıklı karaciğer hücresi) hücre hatlarında hipoksi oluşumu, protein seviyesinde doğrulanmıştır. CoCl₂ uygulaması yapılmayan normoksi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hipoksi oluşumunda en çok artış Hep3B hücrelerinde yaklaşık 4 kat olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçları SNU-398 yaklaşık 2 kat artış, Clone-9 hücreleri ise yaklaşık 0.5 kat artış ile takip etmektedir.

4.2.4.2 IFC

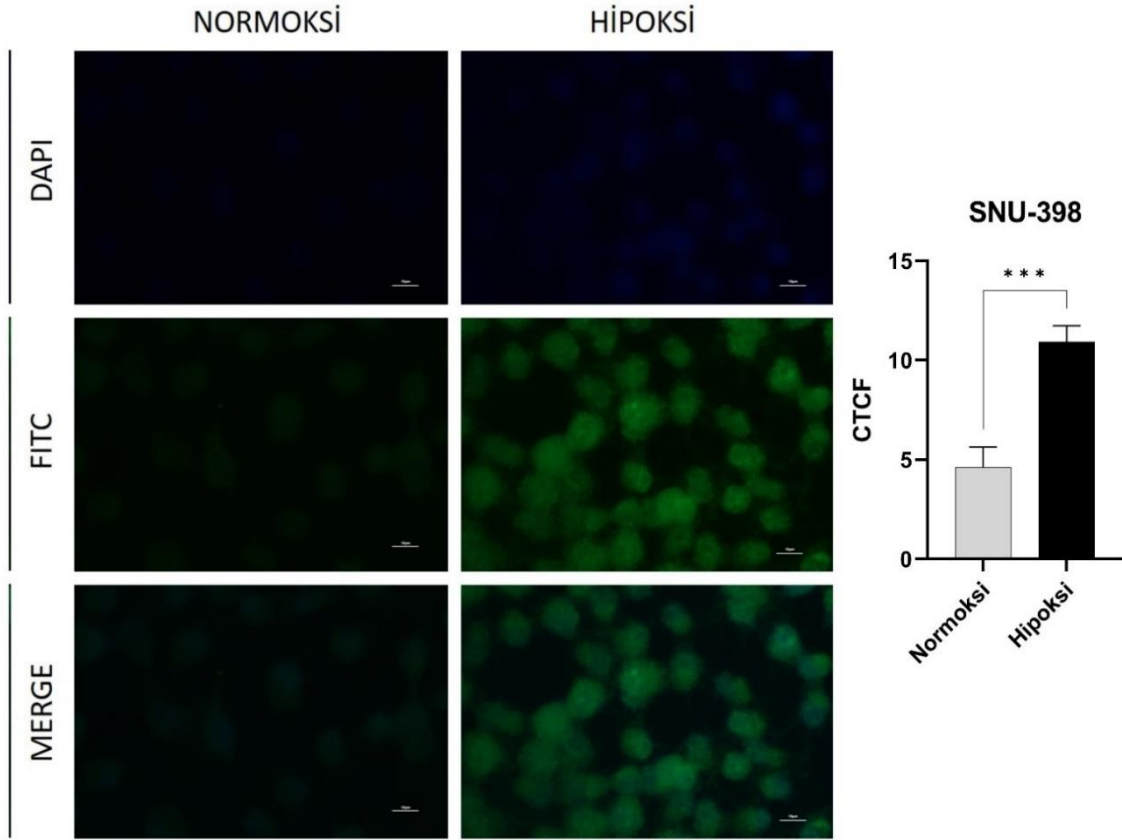
Hipoksi oluşumunun protein düzeyinde doğrulanması için IFC metodu kullanılmıştır. Bölüm 3.2.4.2’de anlatıldığı şekilde deney yapılmıştır. Hipoksi oluşumunun doğrulanması Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney sonucunda HIF-1 α ’nın protein düzeyinde doğrulanması sağlanmıştır. Deneye ait elde edilen bulgular Şekil 4.18-4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.18: Hep3B hücre hattında HIF-1 α antikoruna ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.

Hep3B hücre hattı ile yapılan immunofloresan deneyinde normoksi koşullara göre karşılaştırma yapmak ve HIF-1 α ’nın doğrulanmasını sağlamak için kuyucuklara uygulanan 300 μ M CoCl₂ sonrasındaki cevap hem floresan mikroskopundaki görüntüsü ile hem de bu görüntünün Image J programı ile densitometrik analizi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre Hep3B hücre hattında kimyasal olarak indüklenmiş hipoksi koşullarında HIF-1 α ’nın cevabı,

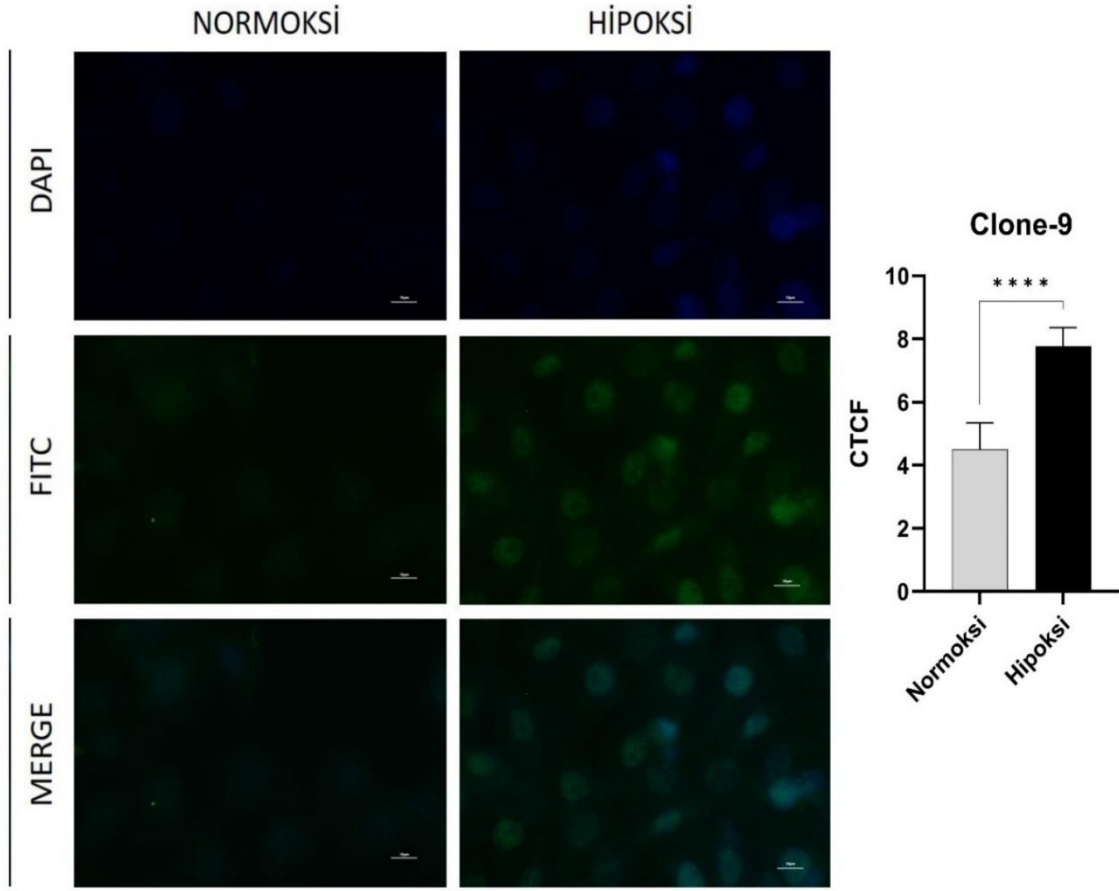
normoksi koşullardan yaklaşık 2 kat daha fazla ışımaya ile artış olarak analiz edilmiştir. Bu sonuç, hipoksik koşullarda izlediği yollardan dolayı HIF-1 α 'nın arttığını ve koşulların oluşturulduğunu göstermektedir. Bu artış istatistiki olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.19: SNU-398 hücre hattında HIF-1 α antikoruna ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.

SNU-398 hücre hattı ile yapılan immunofloresan deneyinde normoksi koşullara göre karşılaştırma yapmak ve HIF-1 α 'nın doğrulanmasını sağlamak için kuyucuklara uygulanan 300 μ M CoCl₂ sonrasındaki cevap hem floresan mikroskopundaki görüntüsü ile hem de bu görüntünün Image J programı ile densitometrik analizi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre SNU-398 hücre hattında kimyasal olarak indüklenmiş hipoksi koşullarında HIF-1 α 'nın cevabı, normoksi koşullardan yaklaşık 2 kat daha fazla ışımaya ile artış olarak analiz edilmiştir.

Bu sonuç, hipoksik koşullarda izlediği yolaklardan dolayı HIF-1 α 'nın arttığını ve koşulların oluşturulduğunu göstermektedir. Bu artış istatistiki olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

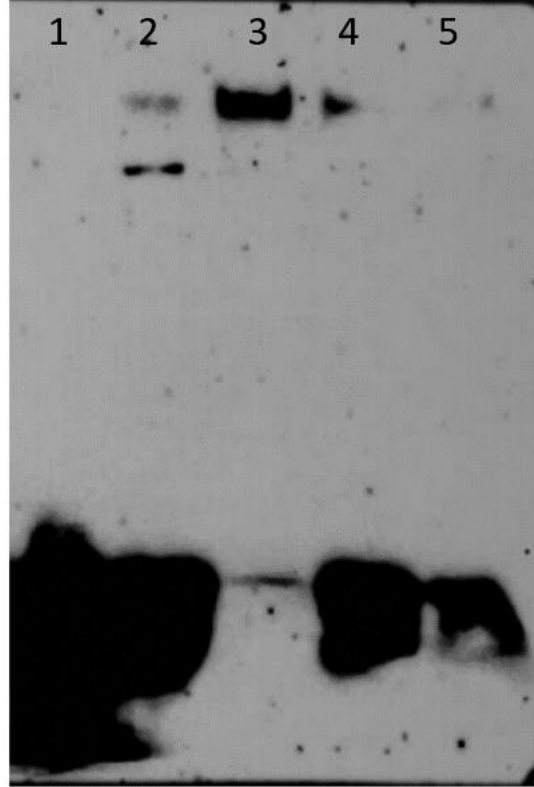


Şekil 4.20: Clone-9 hücre hattında HIF-1 α antikoru ile hipoksik koşul oluşumunun doğrulanması.

Clone-9 hücre hattı ile yapılan immunofloresan deneyinde normoksi koşullara göre karşılaştırma yapmak ve HIF-1 α 'nın doğrulanmasını sağlamak için kuyucuklara uygulanan 300 μ M CoCl₂ sonrasındaki cevap hem floresan mikroskobundaki görüntüsü ile hem de bu görüntünün Image J programı ile densitometrik analizi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre Clone-9 hücre hattında kimyasal olarak indüklenmiş hipoksi koşullarında HIF-1 α 'nın cevabı, normoksi koşullardan yaklaşık 2 kat daha fazla ışımaya ile artış olarak analiz edilmiştir. Bu sonuç, hipoksik koşullarda izlediği yolaklardan dolayı HIF-1 α 'nın arttığını ve koşulların oluşturulduğunu göstermektedir. Bu artış istatistiki olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4.2.4.1 EMSA

Hipoksi oluşumunun protein düzeyinde doğrulanması için son olarak EMSA metodu kullanılmıştır. Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde deney gerçekleştirilmiştir. HIF-1 α ’nın EMSA ile doğrulanması Hep3B hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney sonucunda HIF-1 α ’nın doğrulanması sağlanmıştır. Bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α ’nın HRE bölgesine (Hypoxia Response Element) CoCl₂ uygulaması ile daha yüksek afinite ile bağlandığı bir kez daha doğrulanmıştır. Edilen sonuçlar Şekil 4.21’de verilmiştir.



	1	2	3	4	5
Free Prob	+	-	-	-	-
Nükleer Ekstrakt	-	+	+	+	+
Normoksi	-	+	-	+	+
Hipoksi	-	-	+	-	-
Cold Prob	-	-	-	+	+

X100 X500

Şekil 4.21: Hep3B nükleer ekstrektı kullanılarak yapılan EMSA deneyi ile HIF-1 α ’nın doğrulanması.

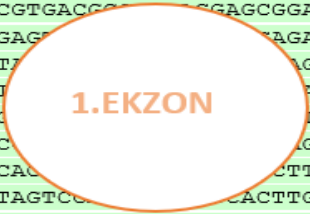
Hep3B hücrelerinde kimyasal indüklenmiş hipoksi oluşumu protein seviyesinde EMSA deneyi ile doğrulanmıştır.

4.3 MIR100HG Promotor Parçalarının Klonlanması

4.3.1 MIR100HG Promotorunun Biyoinformatik Analizi ve Promotor Primerlerinin Tasarlanması

MIR100HG geni, 11. Kromozom üzerinde yer almaktadır. MIR100HG geninin, uzun kodlanmayan RNA olması sebebiyle promotor bölgeyi bulabilmek amacıyla, MIR100HG'nin kodlanmayan uzun genomu üzerinde varyant 1'in ilk ekzonu tespit edildi (Şekil 4.22). Promotor bölge olarak varyant 1'in ATG'sinin üst kısmından yaklaşık 1300 bp'lik bir bölge seçildi. Primer tasarlama çalışmaları yapılırken, spesifikliği arttırmak için seçilecek ortak reverse primerin Varyant 1'in 1. Ekzonundan olmasına ve primer uzunluklarının 20-25 nükleotid uzunluğunda olmasına dikkat edilmiştir. Primer uzunlukları 24 nükleotid olarak belirlenmiştir. Klonlama (Promotor) primerleri tasarlanırken, G-C bakımından zengin bölgeler olmamasına, Tm değerlerinin yaklaşık 50-60 °C olmasına ve NCBI da bulunan BLAST programı kullanılarak seçilen primerler ile MIR100HG geni arasında yüksek oranda benzerlik olmasına ve farklı bir genle benzerliğin daha düşük oranda olmasına dikkat edilmiştir (EK C). Tüm bu koşullar dikkate alınarak tasarlanan primerler Şekil 4.23'te işaretlenerek gösterilmiştir.

TATGCTGGGTGTGACACAGACAGAGAGACCCAGACCGAGTCTGCAGGAGAAAAGTGGTTCATGATGTCAAACGTGGA
GGAAACAACAATAGGCCCTAGTGGGATGCTCTGTATTTATCAGCAGAGTACTGGAATCCAAACAAGAAACTTTC
CAGAATGACAAACCGTCTGCCACTGAACTGTAGGTGAGCATGTGGTTTGTGACGTATTATTTCTATTCTGCCATC
ATACCAGTTGTGAGATCTTGCTTGTGAAACTAAGTTAACTCCATTTTTATGGACAAAAGAACTGAGGTGAGAGTAGT
TAATTGAGCATAAAAATAAGTAGCAGAGATAGGTATCGAGTCTAGATCTGTTGAAGCCTAGAGCTTGTTTTGGCCAG
TCATATTGTCTCATTGACTCTTCCAGCAGTCTGGCAAGGGAGTCCCTAATTTAGCAAAAACAATCTCAGACCAA
TTTCCACTGGACTCTATTAACCTCCACTACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACTGAACCATACTGAAAGAT
TGAACCTGGAATAAAAATAAAGCTCCATTTGTTAAAAACCACAGCTACTTTCATGAGCTGTTTCTCCATAAGCAA
CATAGACACTACAGTAATAAAGATTAAAAACAACAATAAACCCTAAGCAAAAAGAAAGCTGTATGACACTCAA
ATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGACAGTATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCCGTGTTCCCTCTGG
AGAAAAGATACTATTTGGACATACAGTCTGTTTTCACTAAGGTGGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGAC
CGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAAGAGAATCCAGGAGACTGGACCATCAAGTCTTTTACTCAGAGACTGGAGA
CCACGCCTTACCTCTCGGAACAGCCCTGTGTGAACCTCCGACTTTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTC
CCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCTTATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCATGAG
GACTGCGTCTCCCGAAGTATTTCCCTGAGAAATTGCAGAGGACCTCAGTCTGCAACTCACACAGAGGCTGTTCT
TCGTGGCCGGAACCCGACCCACGCCCTCTGGGGCACATCCCTGAGTGGCAGCACTCTTCTCTCGCCCTCCTCCCA
CCCAGGCACCCGTCCCAACTGGGCACTGCCTTGTATGCCCCACATCTCCCAAGGGGGAGCCCGCGGAGGGGCAGC
TGGGGCTGCGGAATTTTGGAAAGCGCAGAAGTTTTCTCCTCCTGTCTGTAAGTGGTTTTCACTCACTCAACTGAGA
GATTTCTTTGTTGCAATGATGGGGTCTAAGATAACACTTCTGGAGGCTGCAGGCGAGAAAACACAGCTGATATCATC
TTTTATTGTGTGTTGTTATTGTCCTAGCATTATAAATTAAGGAGGAATAGTAACCTGAGCTGGAAGACATGCACA
GCTCACAGGCCCGGGTGGAGGCTGGCGACATCAGACAGACAGAACCAAGACATGAGGGGCAACCAGGAGGTGC
GTGTGGCTGCAGAGCACACAGTAGGTACCCGCAAGAGGACAGTCTGTGACCGGAGAGCGGATGGAGCATTCA
CAAAAGGTGGTGCAGCAGAGATTAAAGGGGAAAGGCAGTGCAGAGGAGGAGGAGGAGAGAGAGAGAGGGAGG
AGTCCCAAAGGAGCGCAAAGAAAAAATGTTTGCAGGGTGTGATGTTGTTGGGAGAGGGGAAGTAACTTCACAAG
GGGTTTGGAAAGTGAATCAGAGACATAAGAGGGTTGAAGTTGGTAACTTCACAAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GCAGGAGAGGATGGGAGATTGACACAAAAGGCTCAGTTGCACAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TCAATCTAATCATTCTGGTTGTGTGTCGTATAGCCACACCCTCAGTCTGAGGAAATTCTG
GTCTGAGTGTGTTTTTTCAGGTCTCTCTGCTCGGAACCTCATGTTTTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAGTCGCTCTAGGTAATGGAATAGGAGTCAAAAATTCGTTCTAGTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGCTTAAGAAAGGAATATCTGAGTTTCTTTTCTTTGTCTATAAAGGAAGATAAATAATATATTACTTATGAGC



Şekil 4.22: 11. Kromozomda yer alan MIR100HG genomu üzerinde Varyant 1'e ait ekzon 1'in gösterimi.

CGTATGTCTAGACTATGCTCCTGTCTCTGGAGAAAAGTGGGAGTGCAGACTCACTGATCATCCTCAGTACAGGGCATT
GAGCCACACCATTAAGGAGTATTGATTGGCTCCCCCTCTGTGAGAACAGTATGCTGGGTGTGACACAGACAGAGAG
ACCCAGACCCGAGTCTGCAGGAGAAAAGTGGTTCATGATGTCAAACGTGGAGGAAACACCAATAGGCCTAGTGGGAT
GCTCTCTATTTATCAGCAGTACTGGAATCCAAACAAGAAACTTTCCAGAATGACAAACCGTGTCTGCCACTG
AACTGTAGGTGAGCATGTGGTTTGTGACGTATTATTTCTGCCATCATAACCCAGTGTGAGATCTTGTCTGTGA
AACAAAGTTAACTCCATTTATGGAAGAAACTGAGGTGAGAGTAGTTAATTGAGCATAAAAATAAGTAGCAGAG
ATAGGTATCGAGTCTAGATCTGTTGAAGCCTAGAGCTGTTTGGCAGCTCATATTGTCTCATTGACTCTTCCAGC
AGTCTGGCAAGGGAGTCTTAATTTAGCAAAAACAATCTCAGACCAAATTCCACTGGACTCTATTAACCTCAC
TACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACTGAACCATACTGAAAGATTGAACCTGGAATAAAAATAAAGCTC
CATTTGTTAAAAACCACAGCTACTTTCATGAGCTGTTTCTCCATAAGCAACATAGACATACAGTAATAAAGATTAA
AAAACAACAATAAATAACCGTAAGCAAAAAGAAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGACA
GTGATATCTGCCAGGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCCGTGTTCCCTCTGGAGAAAAGATACTATTTGGACATACAGTC
TGTTTTCACTAAGGTGGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGACCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAA
GAGAATCCAGACTGGACCATCAAGTCTTTTACTCAGAGACTGGAGACCAGCCCTTACCTCTCGGAACAGCCCT
GTGTGAACCTCCGACTTTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCT
TATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCAGTGGACTGCGTCTCCCGGAGTATTTCCT
GAGAAATTGCAGACCTCAGTCTGCAACTCACACAGAGGCTGTTCTTCTGTTGGCCGGAACCCGACCCACGCC
TCTGGGGCACATCCCTGAGTGGCAGCACTCTTCTCTCGCCCTCCTCCACCCAGGCACCCGTCCCAACTGGGCACTG
CCTTGTATGCCCCACATCTCCCAAGGGGGAGCCCGGAGGGCAGCTGGGGCTGCGGAATTTTGGAAAGCGCA
GAAGTTTTCTCCTCCTGTCTGTAAGTGGTTTTCACTCACTCAACTGAGAGATTTCTTTGTTGCAATGATGGGGT
TAAGATAACACTTCTGGAGGCTGCAGGCGAGAAAACACAGCTGATATCATTTTTATTGTGTGTTGTTATTGCTA
GCATTATTATAAGGAGGAATAGTAACAAAGTTGAAGACATGCACAGCTCACAGGCCCGGGTGGAGGCTGG
CGACATCAGACAGACAGAACCAAGACATCTGAGGGGCAACCAGGAGGTGCGTGTGGCTGCAGAGCACACAG

Şekil 4.23: Klonlama (Promotor) Primeri olarak seçilen; 6 Forward, 1 Reverse primerin MIR100HG genomu üzerinde gösterimi.

Tablo 4.2: Tasarlanan MIR100HG Klonlama (Promotor) Primerleri ve Dizileri.

Primer	Dizisi (5'-3')
Forward Primer 6: (1535 Bç) (-1189/+231)	5'-ACCAATAGGCCTAGTGGGA-3'
Forward Primer 5: (1244 Bç) (-1013/+231)	5'-AAGTTAACTCCATTTTATGGAC-3'
Forward Primer 4: (1046 Bç) (-815/+231)	5'-TTCCACTGGACTCTATTAAC-3'
Forward Primer 3: (909 Bç) (-678/+231)	5'-TTCTCCATAAGCAACATAGAC-3'
Forward Primer 2: (628 Bç) (-397/+231)	5'-GACTGGACCATCAAGTCTTT -3'
Forward Primer 1: (419 Bç) (-188/+231)	5'-TTTCCCTGAGAAATTGCAGA -3'
Ortak Reverse Primer:	5'-CTTTGTTACTATTCTCCTTAAT-3'

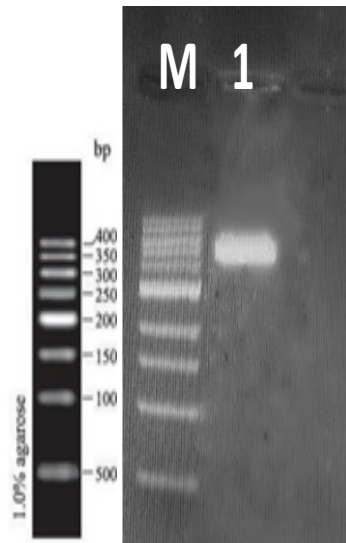
Promotor bölgesinin amplifikasyonunda kullanılacak olan primerler, kısaltılarak yapılmış farklı promotor uzunluklarını çoğaltacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin Tm, % GC ve NCBI Blast analizleri yapılmıştır. Haberci vektör sistemine doğru oryantasyonda klonlamanın yapılabilmesi amacıyla primerlerin 5' uçlarına belirlenen restriksiyon enzimlerin tanıma dizileri eklenmiştir. Bu sebeple öncelikle promotor bölgesine ait restriksiyon haritası Restriction Mapper Version 3 programı kullanılarak hazırlanmıştır. Bu analize göre MIR100HG geninde çalışılması planlanan 1300 bç'lik bölgeyi kesmediği tespit edilen enzimlerden HindIII'e ait tanıma dizisi forward primerlere ve XhoI'e ait tanıma dizisi de reverse primere eklendi (EK C). Tasarlanan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 4.3'te verildiği gibidir.

Tablo 4.3: MIR100HG genine ait tasarlanan ve restriksiyon enzim bölgeleri eklenen klonlama primerleri, dizi ve Tm sıcaklıkları.

Primer	Dizisi (5'-3')	Tm (°C)
Forward Primer 6	5'- A CTCGAGACCAATAGGCCTAGTGGGA-3'	80
Forward Primer 5	5'- A CTCGAGAAGTAACTCCATTTTATGGAC-3'	80
Forward Primer 4	5'- A CTCGAGTTCCACTGGACTCTATTAAAC-3'	80
Forward Primer 3	5'- A CTCGAGTTCTCCATAAGCAACATAGAC-3'	80
Forward Primer 2	5'- A CTCGAGTTCCCTGAGAAATTGCAGA-3'	80
Forward Primer 1	5'- A CTCGAGTTCCCTGAGAAATTGCAGA-3'	78
Ortak Reverse Primer	5'- A AAGCTTCTTTGTTACTATTCCTCCTTAAT-3'	78

4.3.2 Genomik DNA İzolasyonu

MIR100HG promotörü klonlama çalışmalarında kullanmak amacıyla Bölüm 3.2.1.1'de belirtilen şekilde Hep3B hücrelerinden genomik DNA izole edildi. Elde edilen genomik DNA %0.8'lik agaroz jelinde, DNA Jel Elektrofrezisi ile görüntüledi. Spektrofotometrik olarak konsantrasyonu ve saflığı belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Hep3B hücrelerinden elde edilen genomik DNA'nın %0.8'lik Agaroz jel elektrofrez görüntüsü. 1: İzole edilen genomik DNA, M: 500bp Marker.

4.3.3 MIR100HG Promotorunun PCR ile oğaltılması

MIR100HG promotorunun çoğaltılması ve klonlanması için 6 farklı klonlama (promotor) primeri tasarlandı (Bölüm 4.3.1). Tasarlanan primerlere ait bilgiler Tablo 4.3'te verilmiştir. Bu tez kapsamında **-1013/+231 promotor primeri ve -397/+231 promotor primeri kullanılarak sırasıyla 1244 bç'lik ve 628 bç'lik promotor parçalarının çoğaltılması ve klonlanmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir.**

MIR100HG promotor parçalarının çoğaltılması amacıyla tasarlanan promotor primerlerinden -1031/+231 ile 1244 bç'lik, -397/+231 ile 628 bç'lik MIR100HG promotor parçaları PCR ile amplifiye edilmiştir.

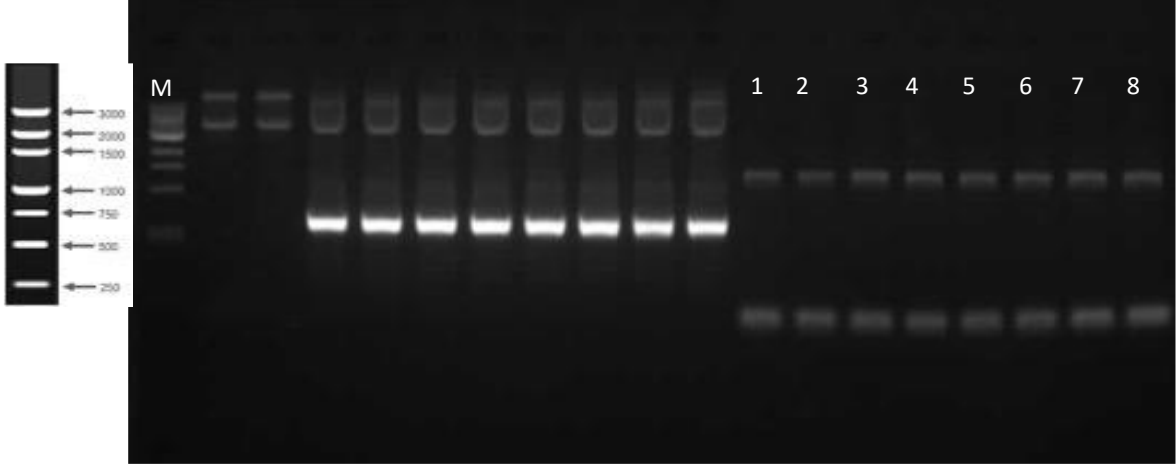
250 ng gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı MIR100HG 1244 b promotor parçasının PCR bileşenleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı polimeraz zincir reaksiyonunun başarıyla gerçekleşebilmesi için önemli etkenlerden bir tanesidir. $4*(G+C) + 2*(A+T)$ formülüyle hesaplanabilir. Bağlanma sıcaklığı belirlemek için farklı optimizasyon denemeleri yapılmış, son olarak 55 °C koşulunda çalışılmıştır. Tüm PCR reaksiyonlarında, pozitif kontrol olarak insan β-mikroglobulin primer setleri kullanılmıştır. Ayrıca her PCR reaksiyonunda DNA içermeyen negatif kontrol de dahil edilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Tablo 4.5 ile verilmiştir. PCR reaksiyonu sonrasında, PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütölerek görünlölünmüştir (şekil 4.25). Çoğaltılan PCR ürünleri kesilerek Jelden DNA purifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.4: -1013/+231 MIR100HG promotör parçasının promotör PCR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	1244 bç	(+) Kontrol	(-) Kontrol
gDNA	1 µL	1 µL	-
MgCl₂	2 µL	2 µL	2 µL
KCl Tampon	5 µL	5 µL	5 µL
Forward Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Reverse Primer	1 µL	1 µL	1 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
dH₂O	38.5 µL	38.5 µL	39.5 µL
Toplam hacim	50 µL	50 µL	50 µL

Tablo 4.5: -1013/+231 MIR100HG promotör parçasının promotör PCR döngü şartları.

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



Şekil 4.25: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-8: 1244 bp büyüklüğündeki promotor parçası, M: 250 bp Marker.

Çoğaltılan 1244 bç'lik PCR ürünleri kesilerek Jelden DNA purifikasyonu Bölüm 3.2.1.5'te anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir.

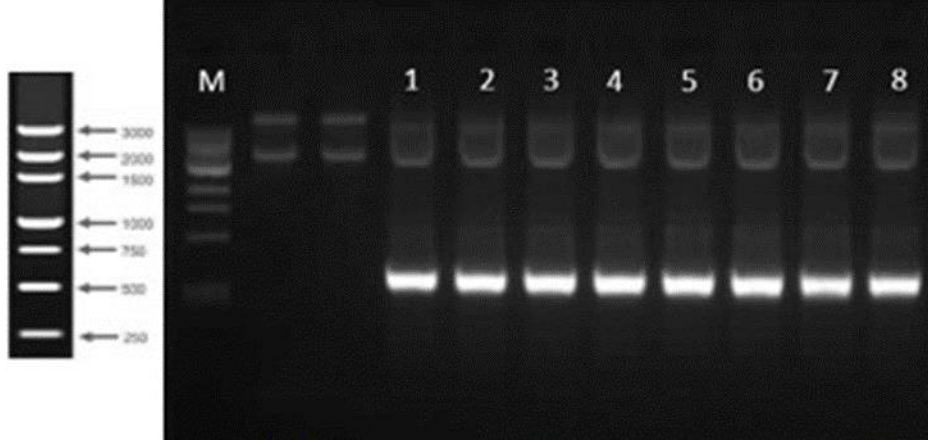
250 ng gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı MIR100HG 628 bç promotor parçasının PCR bileşenleri Tablo 4.6'de verilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 55 °C koşulunda çalışılmıştır. Tüm PCR reaksiyonlarında, pozitif kontrol olarak insan β -mikroglobulin primer setleri kullanılmıştır. Ayrıca her PCR reaksiyonunda DNA içermeyen negatif kontrol de dahil edilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Tablo 4.7 ile verilmiştir. PCR reaksiyonu sonrasında PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.26). Çoğaltılan PCR ürünleri kesilerek Jelden DNA purifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.6: -397/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	628 bç	(+) Kontrol	(-) Kontrol
gDNA	1 µL	1 µL	-
MgCl₂	2 µL	2 µL	2 µL
KCl Tampon	5 µL	5 µL	5 µL
Forward Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Reverse Primer	1 µL	1 µL	1 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
dH₂O	38.5 µL	38.5 µL	39.5 µL
Toplam hacim	50 µL	50 µL	50 µL

Tablo 4.7: -397/+231 MIR100HG promotor parçasının promotor PCR döngü şartları.

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

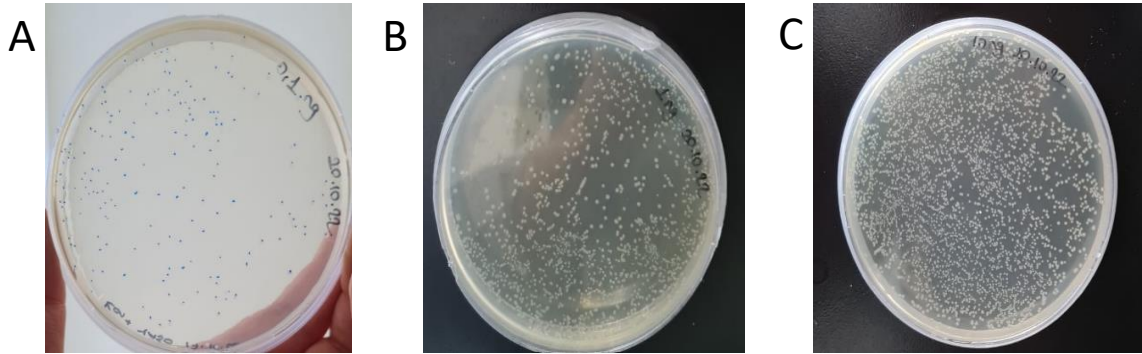


Şekil 4.26: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1-8: 628 bp büyüklüğündeki promotor parçası, M: 250 bp Marker.

Çoğaltılan 628 bp'lik PCR ürünleri kesilerek Jelden DNA purifikasyonu Bölüm 3.2.1.5'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Jelden geri kazanılan PCR ürünleri %1'lik DNA jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir.

4.3.4 Kompetan Hücrenin Hazırlanması ve Etkinliğinin Belirlenmesi

Klonlama deneylerinde kullanılacak olan DH5 α kompetan hücreleri Bölüm 3.2.1.9'da anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan kompetan hücrelerin kullanılmadan önce etkinliğini belirleme çalışmaları Bölüm 3.2.1.9.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.27'de verilmiştir. Kompetan hücre etkinliği; 240×10^6 CFU/ μ g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.27: Etkinlik kontrolü için sırasıyla 0,1 (A) μ g, 1 μ g (B) ve 10 μ g (C) plazmid transforme edilen DH5 α kompetan hücrelerinin oluşturduğu koloniler.

4.3.5 MIR100HG Geninin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Jelden geri kazanılan ve kontrol edilen -397/+231 ve -1013/+231 promotor parçaları ile pGEM-T Easy (Promega) vektörü PCR tabanlı T:A klonlama stratejisi kullanılarak ligasyon kurulmuştur. Ligasyon bileşenleri Tablo 4.8’de verildiği gibidir. Reaksiyon 16 °C’de 16 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.8: Promotor parçaları ile pGem-T Easy ligasyonu bileşenleri.

Malzemeler	628bp (-397/+231)	1244bp (-1013/+231)
Geri kazanılan DNA	15 µL	15 µL
pGEM-T Easy Vektör	2 µL	2 µL
T4 DNA Ligaz	1 µL	1 µL
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µL	2 µL
Toplam	20 µL	20 µL

Oluşturulan -397/+231 ve -1013/+231 promotor parçaları ile pGEM-T Easy vektörünün ligasyon ürünleri, Bölüm 3.2.1.8’de hazırlanan DH5α hücrelerine Bölüm 3.2.1.9’da belirtildiği gibi transforme edilmiştir. 2 dk 42 °C su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra ampisilinli petriye transformasyon ürününün ekimi yapılmıştır. Rekombinant kolonilerin tespiti için iki özellik kullanılmıştır:

- 1) *Vektörün içerdiği ampisilin antibiyotiği ile tespit:* Ampisiline dirençli olmayan koloniler yaşayamaz. Böylece petride sadece antibiyotiğe direnç geni taşıyan koloniler gözlemlenir.
- 2) *Mavi-Beyaz koloni seçimi:* pMetLuc vektörü *LacZ geni* taşımaktadır. *LacZ geni*; β-galaktozidaz enzimini kodlamaktadır. Ampisilinli petriye eklenen X-Gal, β-galaktozidaz enziminin substratıdır ve enzim tarafından parçalandığında mavi renkli kolonileri meydana getirir. Eğer pGEM-T Easy vektörüne MIR100HG promotor parçaları transforme edilebilirse, *LacZ geni* bozulur, β-galaktozidaz enzimi üretilmez ve X-Gal parçalanıp mavi renk açığa çıkamaz. Sonuç olarak Beyaz rekombinant koloniler tespit edilebilir.

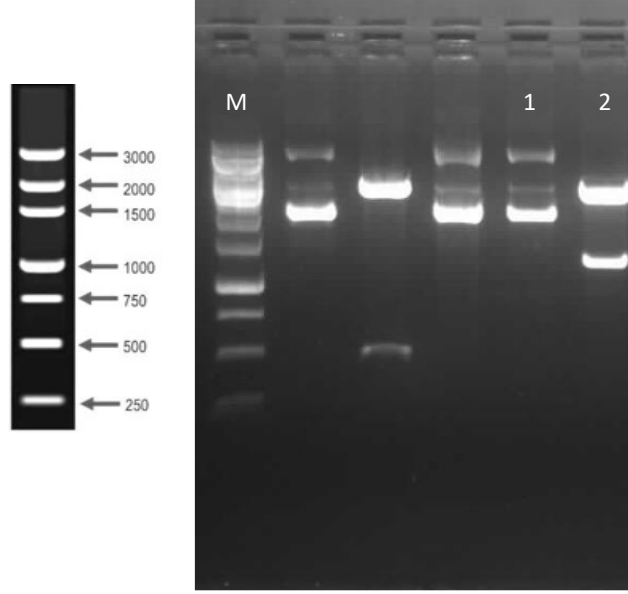
Rekombinant olduğu düşünülen beyaz kolonilerin, bek alevi yanında steril öze yardımı ile Ampisilin antibiyotiği içeren 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi gerçekleştirildi. 37

°C çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Kültürlerden MN NucleoSpin Plasmid Miniprep kiti kullanılarak Bölüm 3.2.1.12’de anlatıldığı gibi plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmid miktarları Bölüm 3.2.1.2’deki belirtilen yöntem kullanılarak tespit edildi. Sonrasında kolonilerin rekombinant tayinleri için Bölüm 4.3.1’de belirlenen XhoI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile 37 °C’de 1 saat kesim reaksiyonu kuruldu. Kesim reaksiyonuna ait bileşenler Tablo 4.9’da verilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.1.3’te belirtilen şekilde %1’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

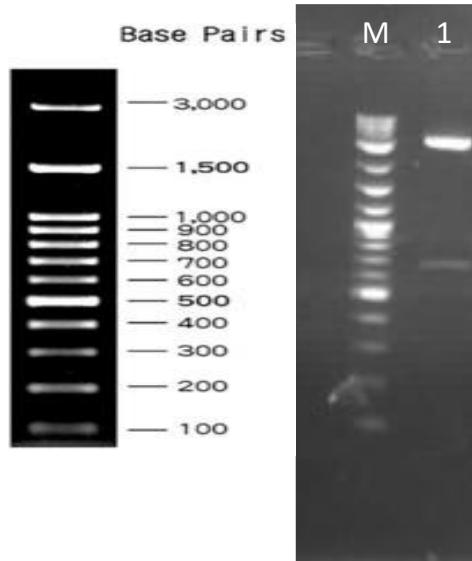
Tablo 4.9: Rekombinant kolonilerin tespiti için kurulan kesim reaksiyon bileşenleri.

Malzemeler	(-397/+231)-pGEM-T Easy	(-1013/+231)-pGEM-T Easy
Plazmid İzolasyonu	1.14 µL	1.28 µL
XhoI	1 µL	1 µL
HindIII	1 µL	1 µL
Cut Smart Buffer	4 µL	4 µL
dH₂O	32.86 µL	32.72 µL
Toplam	40 µL	40 µL

Elde edilen sonuçlara göre kesimi yapılan koloninin -1013/+231 promotor konstrağı için rekombinant olduğu yani 1244 bç’lik promotor parçasını içerdiği belirlendi (Şekil 4.28). Kesimi yapılan koloninin -397/+231 promotor konstrağı için rekombinant olduğu yani 628 bç’lik promotor parçasını içerdiği belirlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.28: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 1: Rekombinant olmayan kesim sonucu. 2: Rekombinant pGEM-T Easy-[-1013/+231] promotor parçası. M: 250 bp Marker.



Şekil 4.29: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 1: Rekombinant pGEM-T Easy-[-397/+231] promotor parçası. M: 100 bp Marker.

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan promotor parçalarına ait 628 ve 1244 bp'lik bantlar kesilerek jelden DNA purifikasyonu Bölüm 3.2.1.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Jelden geri kazanılan promotor parçaları %1'lik DNA jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir

4.3.6 MIR100HG Promotor Parçalarının pMETluc Haberci Vektör Sistemine Alt Klonlaması

İnsan MIR100HG promotorunun transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için PCR tekniği kullanılarak çoğaltılan ve pGEM-T Easy'e T:A klonlama stratejisi ile klonlanan promotor parçalarının, haberci vektör sistemine alt klonlaması gerçekleştirildi. Haberci vektör sistemi olarak pMetLuc (Clontech) vektör sistemi seçilmiştir (Şekil 3.2). Bu sistemin özelliği salınabilir lusiferaz enzimi sentezleyebilmesidir. Maksimum aktif promotor bölgesinin tespiti için, kısaltılarak hazırlanan promotor parçalarının ayrı ayrı pMetLuc vektör sistemine klonlanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Alt klonlama çalışmaları için, pMetLuc vektörünün ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanan MIR100HG promotor parçalarının gliserol stoklarından sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. 16 saat 37 °C'de kültür büyütüldükten sonra Bölüm 3.2.1.12'de anlatıldığı şekilde plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmid konsantrasyonları belirlenmiştir (Bölüm 3.2.1.2). Klonlamaya devam etmek için pMetLuc vektörü ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanan MIR100HG promotor parçaları XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilmiştir (Şekil 4.30). Kesim süresi sonunda örnekler agaroz jelde yürütüldü. Kesim sonrası oluşan bantlar kesilerek jelden saflaştırılmıştır. Ligasyon koşulları Tablo 4.10'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. 16 saat 16 °C'de bekletilen ligasyon ürünleri ertesi gün DH5 α hücrelerine transforme edilmiştir. Ertesi gün koloniler rekombinantların tespiti için araştırılmıştır. Her bir koloni büyütülmüş, plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.1.12). XhoI ve HindIII kesimi ile rekombinantların tespiti gerçekleştirilmiştir. Kesim planı Tablo 4.11'de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.1.3'te anlatıldığı şekilde %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Öncelikle pMetLuc vektör ve -1013/+231 promotor parçası taşıyan pGEM-T Easy plasmidi XhoI/HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek ligasyon için hazırlanmıştır (Şekil 4.30). Bantlar bölüm 3.2.1.5'te anlatıldığı üzere jelden geri kazanılmıştır. Tablo 4.10'da verildiği şekilde ligasyon kurulmuştur. Ligasyon ürünleri, transforme edildikten sonra -1013/+231

promotor parçası için, 7 koloni rekombinant olasılığı için araştırılmıştır. Olası koloniler içinde 3. ve 4. kolonilerin rekombinant olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).



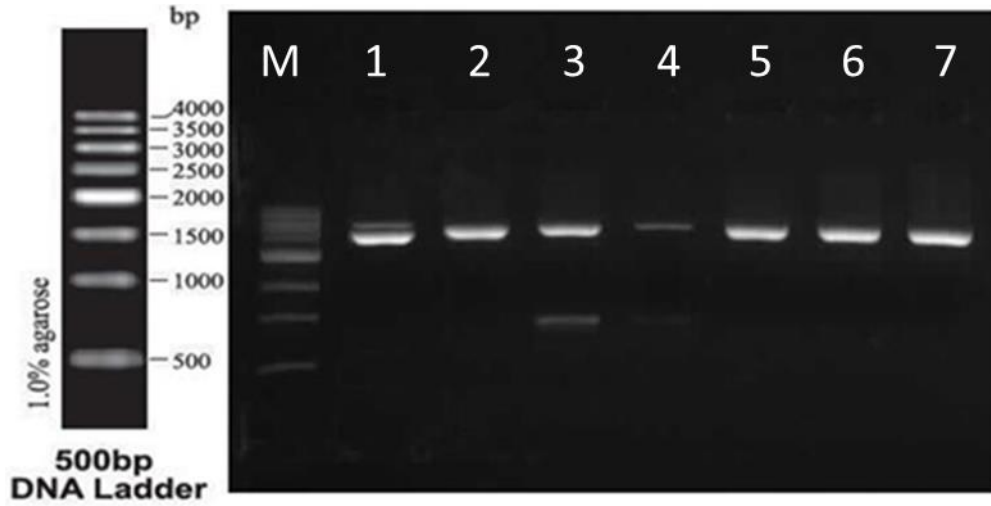
Şekil 4.30: 1-4: pGEM-T Easy vektörüne klonlaması yapılan 1244 bp’lik promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi, 5-12: pMETLuc vektörün ligasyon hazırlığı için gerçekleştirilen XhoI/HindIII kesimi DNA jel elektroforez görüntüsü, M: 500 bp Marker.

Tablo 4.10: PmetLuc Vektör ve MIR100HG promotor parçalarının ligasyon bileşenleri.

Malzemeler	628bp (-397/+231)	1244bp (-1013/+231)
Geri kazanılan DNA	12 µL	12 µL
PMetLuc Vektör	5 µL	5 µL
T4 DNA Ligaz	1 µL	1 µL
T4 DNA Ligaz Buffer	2 µL	2 µL
Toplam	20 µL	20 µL

Tablo 4.11: Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla kurulan kesim reaksiyon bileşenleri.

Malzemeler	(-397/+231)-pMetLuc	(-1013/+231)-pMetLuc
	A3.1 Koloni	A2.1. Koloni
Plazmid İzolasyonu	1.94 µL	3.54 µL
XhoI	1 µL	1 µL
HindIII	1 µL	1 µL
Cut Smart Buffer	4 µL	4 µL
dH ₂ O	32.06 µL	32.46 µL
Toplam	40 µL	40 µL



Şekil 4.31: MIR100HG -1013/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 3-4: pMetLuc vektöre klonlanmış rekombinant [-1031/+231] promotor parçası, M: 500 bp Marker.

Ligasyon ürünlerinin transformasyonu sonrası -397/+231 promotor parçası için, 8 koloni rekombinant olasılığı için araştırılmıştır. Olası koloniler içinde 5. koloninin rekombinant olduğu yani -397/+231 promotor parçasını içerdiği belirlenmiştir tespit edilmiştir (Şekil 4.32).

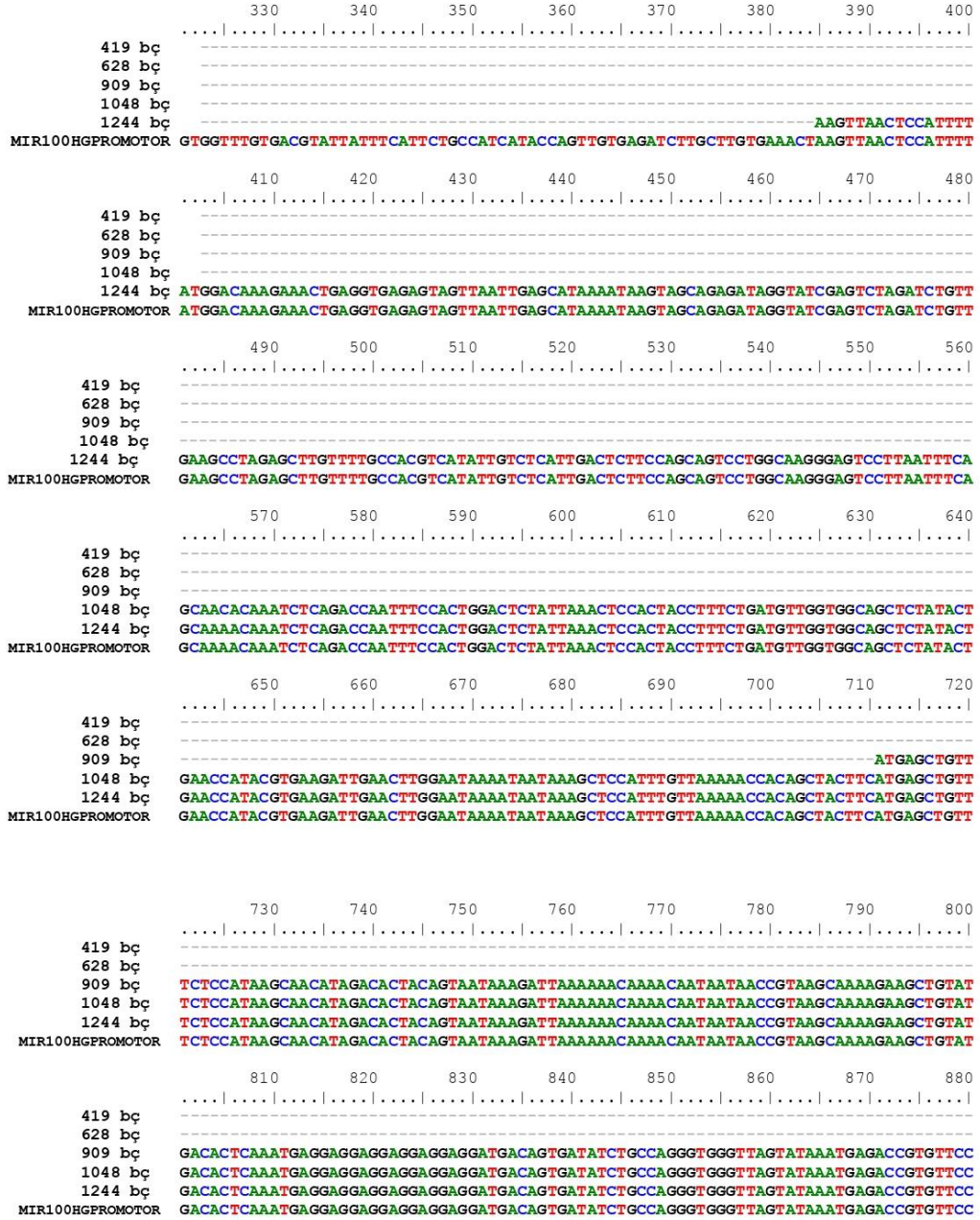


Şekil 4.32: MIR100HG -397/+231 promotor parçasının pMetLuc vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü. 5: pMetLuc vektöre klonlanmış rekombinant [-397/+231] promotor parçası, M: 500 bp Marker.

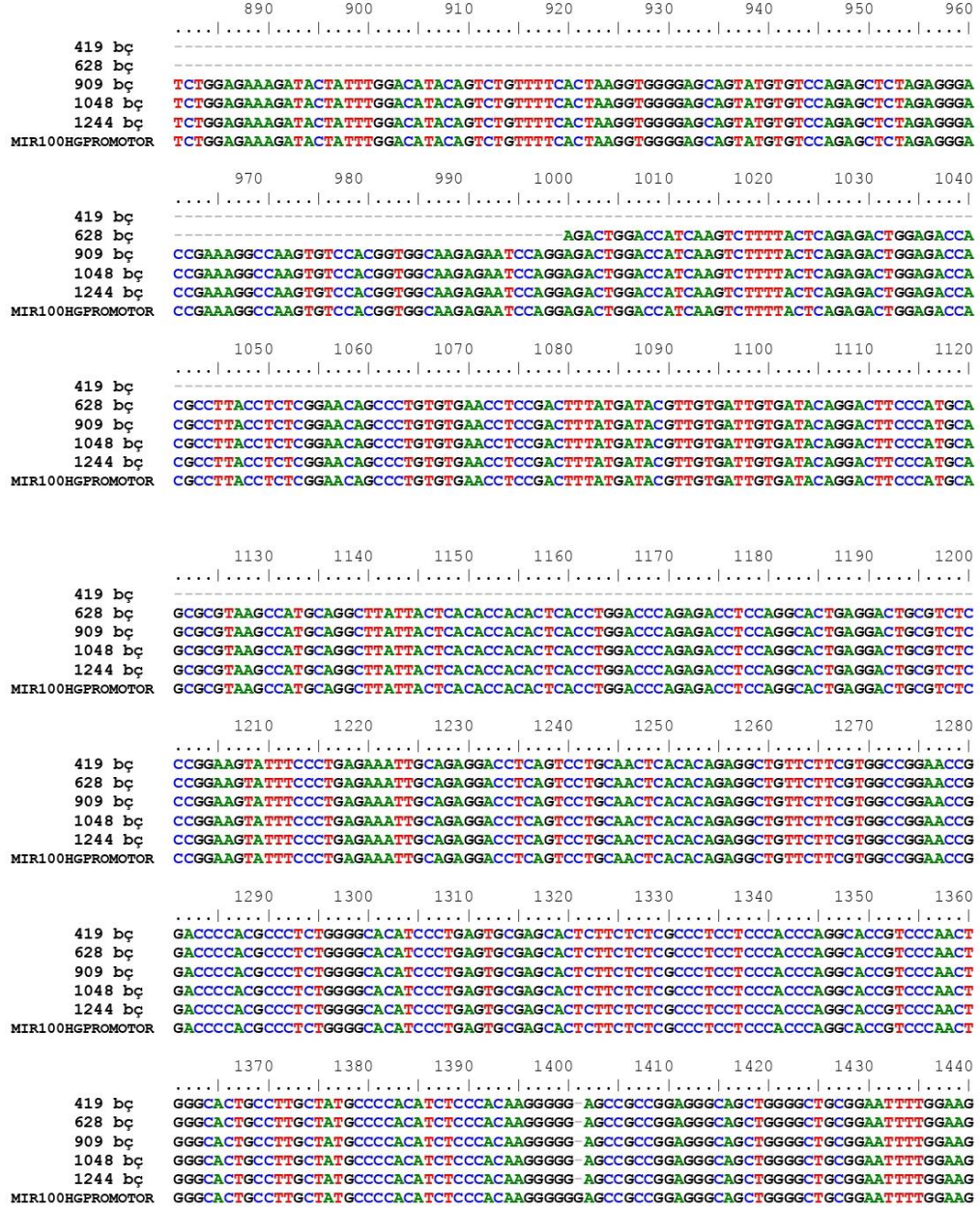
4.3.7 Sanger Dizileme ile Doğrulama

İnsan MIR100HG promotor bölgesine ait 5'delesyonlu parçaların her biri PCR metoduyla çoğaltıldığı için, bu sırada oluşabilecek mutasyonların var olup olmadığını kontrol etmek ve dizinin, MIR100HG muhtemel promotor bölgesine ait olup olmadığını tespiti amacıyla BM Labosis/Ankara firmasına rekombinant olduğu düşünülen plazmitler gönderildi. Dizilemenin sağlanabilmesi amacıyla pMetLuc dizileme primeri ve MIR100HG için tasarlanan spesifik klonlama primerleri gönderilerek okuma gerçekleştirilmiştir. En büyük MIR100HG promotor parçaları ve NCBI data bankasında bulunan MIR100HG genomik dizisi NCBI-BLAST programı ile karşılaştırıldı. Özgün olarak MIR100HG geninin kromozom 11'deki bölgesi ile promotor olarak seçilen [-1013/+231] bç bölgesi ile eşleştiği doğrulanmıştır.

Tüm promotor konstraktları ve NCBI daki MIR100HG geni ile yapılan çoklu hizalama çalışmaları BIOEDIT programında gerçekleştirilmiştir. Promotor konstraktlarının dizilerinde PCR'a dayalı herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir. Ancak, 1401. Pozisyonunda NCBI'da bulunan **G- nükleotidinin tüm promotor parçalarında bulunmadığı tespit edilmiştir** (Şekil 4.33-4.34).



Şekil 4.33: 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotoru ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması.

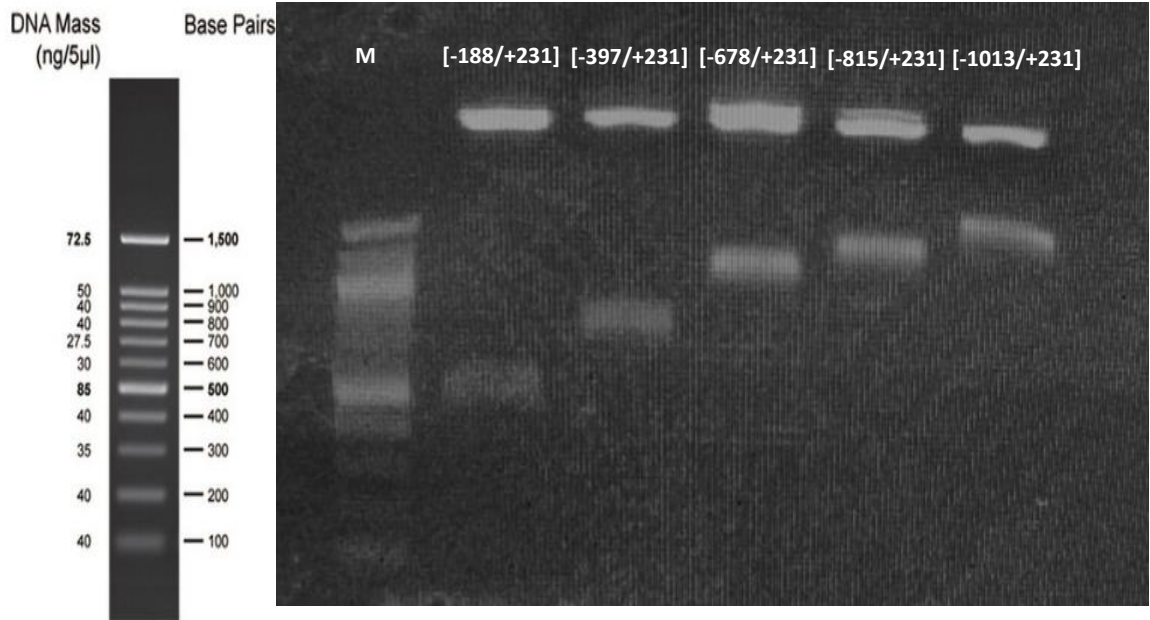


Şekil 4.34: 1244 bç, 1048 bç, 1048 bç, 909 bç, 628 bç ve 419 bç promotor parçaları kısaltılarak yapılan promotor parçalarının NCBI MIR100HG promotörü ile BIOEDİT programında çoklu hizalaması.

4.3.8 Klonlanan Promotor Parçalarının Midiprep ile Büyük Ölçekte İzolasyonu ve Kontrol Kesimi

Rekombinant olan ve Sanger dizileme ile doğrulanan konstraktlar, MIR100HG geninin bazal aktivitesinin tespiti için gerçekleştirilecek olan geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanmak amacıyla büyük hacimde izole edilmiştir. Bunun için pMetLuc vektöre alt

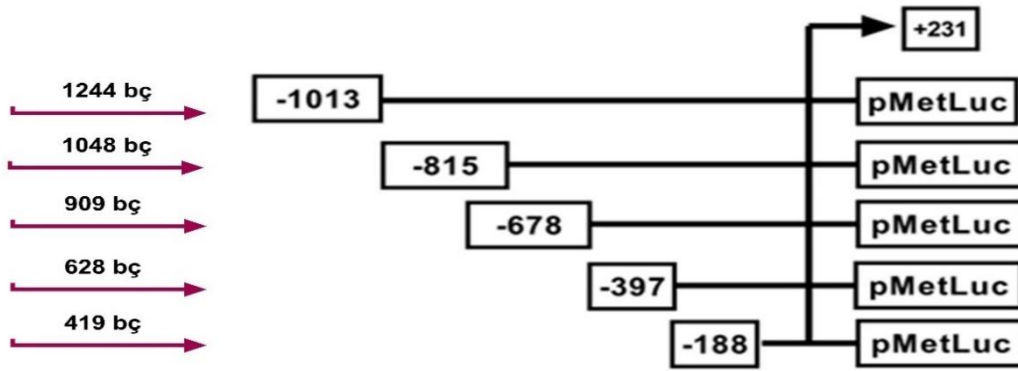
klonlaması yapılan [-397/+231] ve [-1013/+231] promotör parçalarının gliserol stoklarından 20 mL kanamisinli LB besiyerine ekim yapıldı ve kültürler 37 °C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Sonrasında ön kültürler, 200 mL kanamisinli LB besiyeri içerisine inoküle edildi. OD₆₀₀ değeri 2’ye yaklaştığında kültürler buz üzerine alındı ve üremeleri durduruldu. 5000 x g’de 15 dakika +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüjlenerek pelet elde edildi. Bu aşamadan sonra Bölüm 3.2.1.13’te anlatılan şekilde MN Nucleobond® Xtra Midi Plus Midi Prep kiti kullanılarak -397/+231-pMetLuc ve -1013/+231-pMetLuc plazmidlerinin izolasyonu sağlandı. Elde edilen midiprepler ile kontrol etmek amacı ile XhoI/HindIII kesim kuruldu. Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.1.3’te anlatıldığı şekilde %1’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35: pMetLuc vektöre klonlanmış MIR100HG promotör parçalarının midiprep kontrol kesim jel görüntüsü.

4.4 MIR100HG Geninin Bazal Aktivitesini Belirleme Çalışmaları

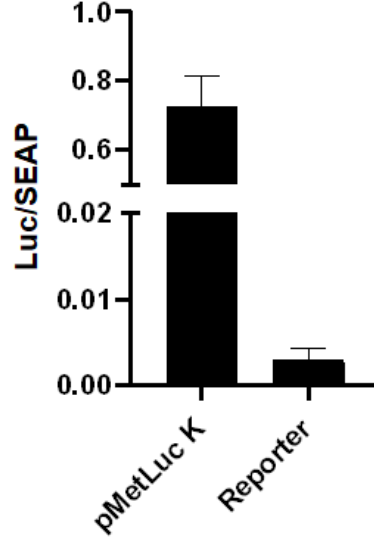
İnsan MIR100HG genine ait promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kalsiyum-fosfat geçiçi transfeksiyonu salınan sistem lusiferaz metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Transfeksiyonda kullanılan plazmitler endotoksin içermeyen yüksek kalitede plazmit DNA veren kit kullanılarak büyük ölçekte Bölüm 3.2.1.13'te anlatıldığı şekilde saflaştırıldı. Saflaştırması yapılan tüm konstraktlar için kontrol kesimleri XhoI/HindIII enzimleri ile gerçekleştirildi (Şekil 4.35). Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.1.3'te anlatıldığı şekilde %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Yapılan klonlama sonucunda 5' delesyonlu 5 adet MIR100HG promotor parçaları elde edildi. Promotor parçalarına ait konstrakt büyüklükleri Şekil 4.36'da gösterildiği gibidir.



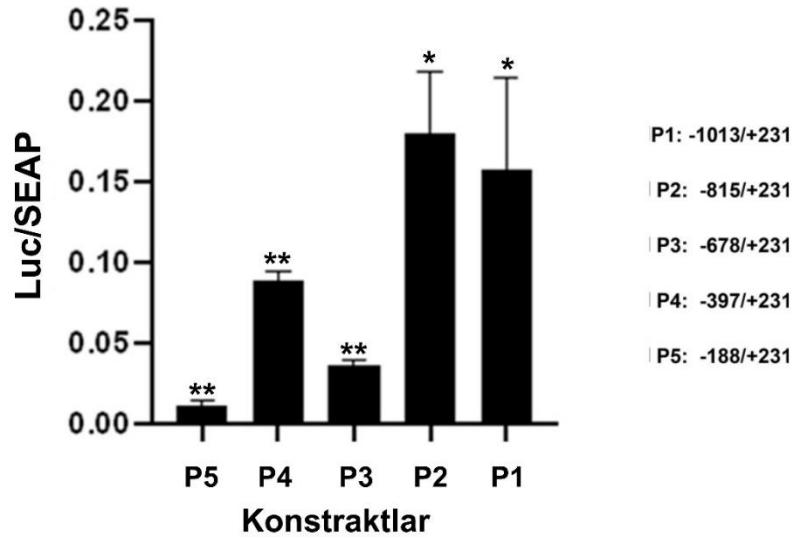
Şekil 4.36: 5' Delesyonlu MIR100HG promotor parçalarının gösterimi.

Transfeksiyon deneyi 48 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. Kalsiyum-fosfat geçiçi transfeksiyon metodu kullanılarak Bölüm 3.2.2.16'da belirtildiği gibi transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon analizinde pMetLuc vektörüne klonlanmış halde bulunan promotor parçalarının haricinde, transfeksiyon etkinliğinin her kuyuda tespiti için normalizatör görevi gören (0.5 µg) SEAP ekspresyon vektörü hücrelere verildi. Ayrıca hücrelerdeki genel transfeksiyon durumunun belirlenmesi için güçlü viral promotor ile ifade olan pMetLuc kontrol plazmidinin de transfeksiyonu gerçekleştirildi. Son olarak negatif kontrol olan ve hiçbir promotor parçasını barındırmayan pMetLuc raporör vektörü de transfekte edildi. Tüm deneyler 3 tekrar olacak şekilde kuruldu. 48. Ve 72. Saatte medyumlar alınarak -20 °C'de muhafaza edildi. Bölüm 3.2.2.16.2'de anlatılan şekilde Lusiferaz ve SEAP aktiviteleri tespit edildi. Luminometrede ölçülen Lusiferaz değeri SEAP aktivitesine bölünerek Luc/SEAP değerleri elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda Şekil 4.37’de gösterildiği şekilde en yüksek promotor aktiviteyi P2: [-815/+231] konstrağının gösterdiği; en düşük promotor aktivitesine ise P5: [-188/+231] konstrağının sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.37: Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz/SEAP aktiviteleri.



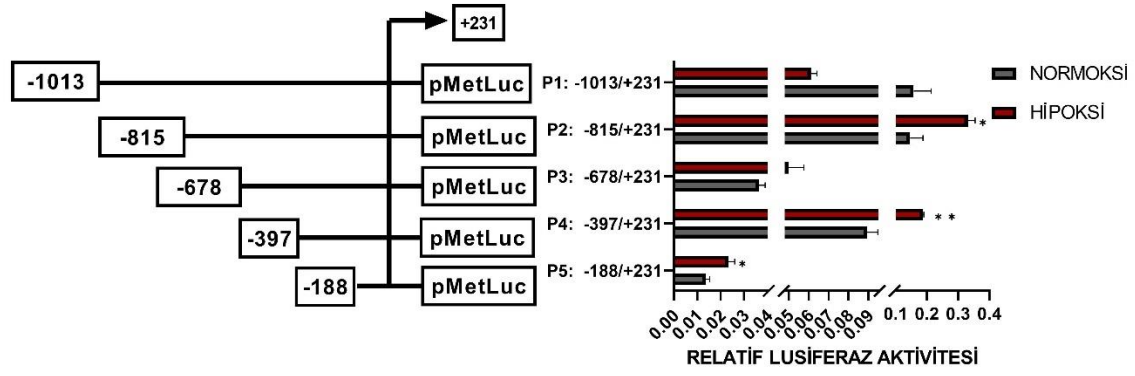
Şekil 4.38: MIR100HG geni promotor parçalarının bazal aktivitelerinin gösterilmesi.

4.4.1 MIR100HG Geninin Hipoksik Koşullarda Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi

MIR100HG geni promotor parçalarının hipoksik koşullarda bazal aktivitesinin tespiti, kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyonu salınan sistem lusiferaz metoduyla Bölüm 3.2.2.16'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Transfeksiyonda kullanılan plazmitler endotoksin içermeyen yüksek kalitede plazmit DNA veren kit kullanılarak büyük ölçekte saflaştırıldı. Saflaştırması yapılan tüm konstraktlar için kontrol kesimleri XhoI/HindIII enzimleri ile gerçekleştirildi (Bölüm 4.3.8). Kesim reaksiyonu sonucunda örnekler Bölüm 3.2.1.3'te belirtilen şekilde %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek kontrolü sağlandı.

Tranfeksiyon deneyi 48 kuyucuklu plakalarda 6×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde gerçekleştirildi. Hep3B hücrelerinin tutunmasının ardından kuyucuklara $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 uygulandı. Kalsiyum fosfat geçici transfeksiyon metodu kullanılarak Bölüm 3.2.2.16.1'de anlatıldığı şekilde 48 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. Kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon metodu kullanılarak Bölüm 3.2.2.16'da belirtildiği gibi transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon analizinde pMetLuc vektörüne klonlanmış halde bulunan promotor parçalarının haricinde, transfeksiyon etkinliğinin her kuyuda tespiti için normalizatör görevi gören ($0.5 \mu\text{g}$) SEAP ekspresyon vektörü hücrelere verildi. Ayrıca hücrelerdeki genel transfeksiyon durumunun belirlenmesi için güçlü viral promotor ile ifade olan pMetLuc kontrol plazmidinin de transfeksiyonu gerçekleştirildi. Son olarak negatif kontrol olan ve hiçbir promotor parçasını barındırmayan pMetLuc reporter vektörü de transfekte edildi. Tüm deneyler 3 tekrar olacak şekilde kuruldu. 48. Ve 72. Saatte medyumlar alınarak $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Bölüm 3.2.2.16.2'de anlatılan şekilde Lusiferaz ve SEAP aktiviteleri tespit edildi. Luminometrede ölçülen Lusiferaz değeri SEAP aktivitesine bölünerek Luc/SEAP değerleri elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda P1: [-1013/+231], P2: [-815/+231] ve P4: [-397/+231] promotor parçalarının hipoksi koşullarında aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: Normoksi ve hipoksi koşullarda MIR100HG promotor konstraktlarına ait Lusiferaz/SEAP değerleri.


Yapılan çalışma sonucunda Şekil 4.39’da gösterildiği şekilde hipoksik koşullarda en yüksek promotor aktiviteyi P2: [-815/+231] konstrağının gösterdiği; hipoksik koşullarda en düşük promotor aktivitesine ise P5: [-188/+231] konstrağının sahip olduğu bulunmuştur.


4.5 MIR100HG Promotorunda Bulunan HIF-1 α Bağlanma Bölgelerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi ve Doğrulanması

4.5.1 HRE Bağlanma Bölgelerinin Bioinformatik Analizleri ve MIR100HG Genine Özgü ChIP Primerlerinin Tasarlanması


MIR100HG promotoru üzerinde 4 adet olası HRE (Hipoksi Response Element) bölgesi yapılan biyoinformatik çalışmalar doğrultusunda tespit edilmiştir (PROMO, ALGGEN). Bu bölgeleri kapsayan ChIP primerleri (Şekil 4.40-4.41) tasarlanmıştır. Primerlerin lokasyon, dizi ve ürün büyüklükleri Tablo 4.12’de verilmiştir. Tasarlanan primerler PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.42).

`GTGAGGTAGAAGGATAGTACTTTTCCAAAGTCAGAGGTAATAAATCTTAAGAAGATGTAAATCAGCTTGGCATC
 CCTTGGCAAGTCTTGGTGACTCTATTTGTCAATGGATGATAATATGCAGTACTGTTCAATAGAATTTTCTGCAGT
 GATGGAAATATTCTGTATCTGTACTCTAATAAGGTAACCTTTAACCACAAGTGGTTTTGGAGTACTTAAAATGTG
 TCTAGTGTGATTGAATAACTGAATTTAAAATCTCATTTAGTTTTAATTAATTTCAATAGCCGCATGTGGCTTGGG
 GCTACCATACTGGACAGTCCAGGATAATAGTGTAGCACAGTGGCCACAATGGGGAAGAAATCAACAAATACTTAT
 TGACTGGCAGAATAAATGAGAAGGCAAATGAAAAAATAGTGAAAACAAATGAACAAACAATGAATAAATAAATGA
 ATATCTATGTGCCTCACAGGGTTGCTATGAAGATCAATGGGTTGAACACATGTCTGAGAACTGTACAAGCTGCC
 ATTCTAGAGTAAAGTACTATTTGGAAATTCATGCGTAAGTGAATGTTACTAAATATTTCGTTGATGGAAATCTAT
 CAAAAGTGTAGCATAGATATTGTTATCTTCTTAAAATCAATTTCTTGGATTCAGTTATTCTTTAGTCAAG
 CAAGACGGTATCAGCAGGATGAACACCCAGTATTGTTATGAACATTAACCTCTGAGAATAGCTGTATGCCTAATG


 ChIP Frw6 Primer




CCAGTTCTTCTTCTCCACGTTATCAACGTCACCTTCTTATCATGCTTAATGTAAAAGCTTCTTACCCCGT

 ChIP Rev6 Primer


`CAGAACTTACGAGAATGTGATTGCAATACTGAACCTGAACCTAGTTGAAGTTCAGGAATGAGAGGGTACTGAC
 ACATGTAATACTTCTTTCAACTGTGATCCCGTGGGGCTTGCACTAAAAGCCTCTCTAGCCCTTTCTCAAGACG
 GTCTTCAAGGGAGCCGCCCTGAGCCATCTTGCCGTCCTCTGAAATGGGATGAAGCCCAATTAGGCGAAGTAAA

 ChIP Frw5 Primer

AACAGAGTGAAAATAGGTTGCATCTCACCTCTCTCTGGGAAAAGTCTCTATGCCTACTCCACCTTAAAAGCGA



AACGTCACCTTTTTGTGTGCAGAGACAGCACGAAGTGGGCCCTGCTCTTTTCAGGGAGGAATGTAAGCAGAT


 ChIP Rev5 Primer


CTCTGAAGAAACCCTTGGCTCAGCAATTTTAGGGCTTGTGTAAATTGGCCTGGCTAAAAGAATTGAGCAAGCT

-1397 CGTATGTCTAGACTATGTCTGTCTCTGGAGAAAAGTGGGAGTGACACTCACTGATCATC -1338

-1337 CTCAGTACAGGGCATTGAGCCACACCATTAAGGAGTATTGATTGGCTCCCCCTCTGTGAG -1278

-1277 AACAGTATGCTGGGTGTGACACAGACAGAGAGACCCAGACCGAGTCTGCAGGAGAAAAGT -1218




 ChIP Frw4

-1217 GGTTCATGATGTCAAACGTCGAGGAAACAACCAATAGGCCTAGTGGGATGCTCTCTATTTA -1158


-1157 TCAGCACAGTTACTGGAATCCAAACAAGAAACTTTCCAGAATGACAACCGTGTCTGCTGCC -1098

-1097 ACTGAACTGTAGGTGAGCATGTGGTTTTGTGACGTATTATTTTATTCTGCCATCATAACCAG -1038

 ChIP Rev4

-1037 TTGTGAGATCTTGCTTGTGAAACTAAGTTAACTCCATTTTATGGACAAAAGAACTGAGGT -978

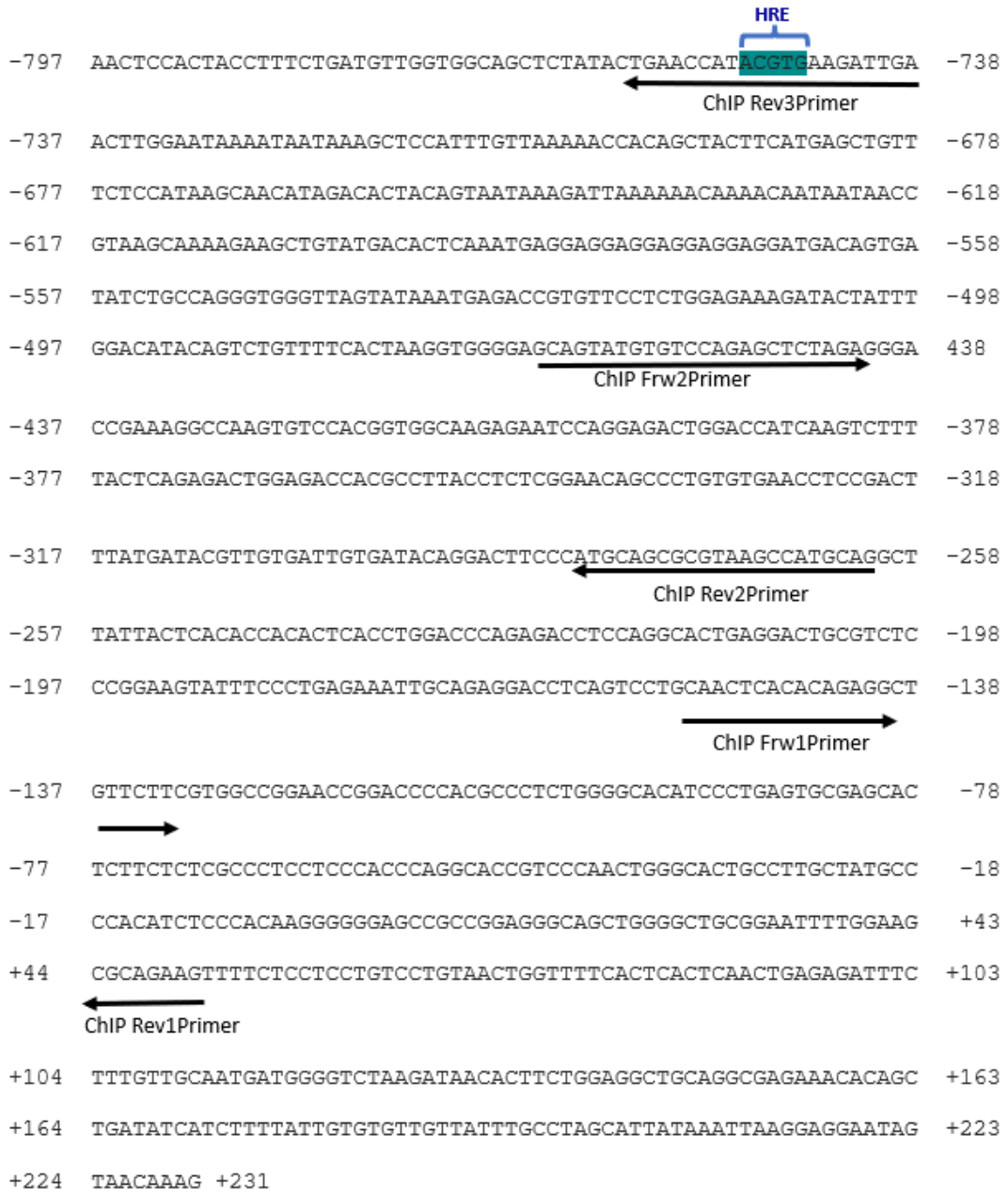
-977 GAGAGTAGTTAATTGAGCATAAAATAAGTAGCAGAGATAGGTATCGAGTCTAGATCTGTT -918

 ChIP Frw3Primer

-917 GAAGCCTAGAGCTTGTGTTTGGCACGTCAATATTGTCTCATTGACTCTTCCAGCAGTCTCTGG -858

-857 CAAGGGAGTCTTAATTTAGCAAAACAATCTCAGACCAATTTCCACTGGACTCTATTA -798

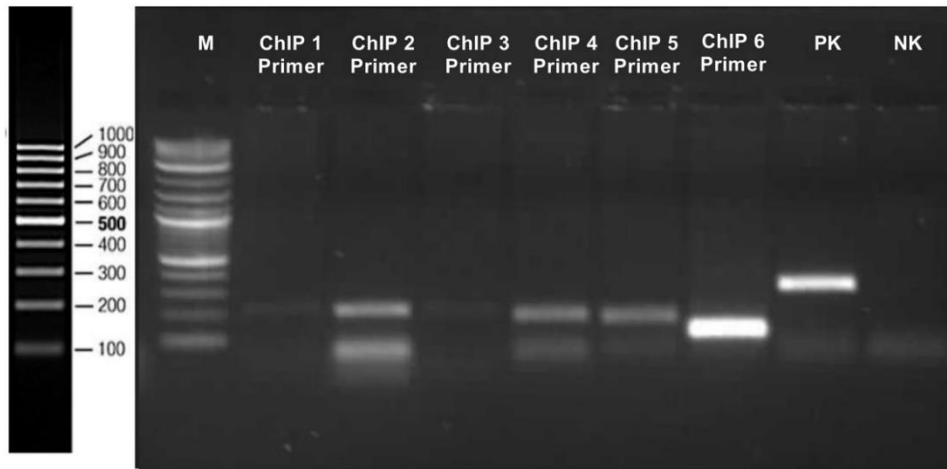
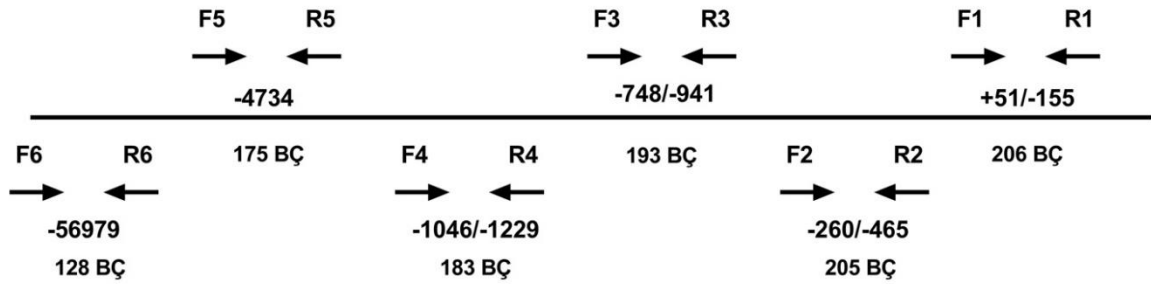
Şekil 4.40: MIR100HG promotörü üzerinde olası HRE bölgeleri ve ChIP3, ChIP4, ChIP5 ve ChIP6 primerlerinin gösterimi.



Şekil 4.41: MIR100HG promotörü üzerinde olası HRE bölgeleri ve ChIP1, ChIP2 ve ChIP3 primerlerinin gösterimi.

Tablo 4.12: Tasarlanan ChIP primerlerinin lokasyon, ürün büyüklüğü ve dizileri.

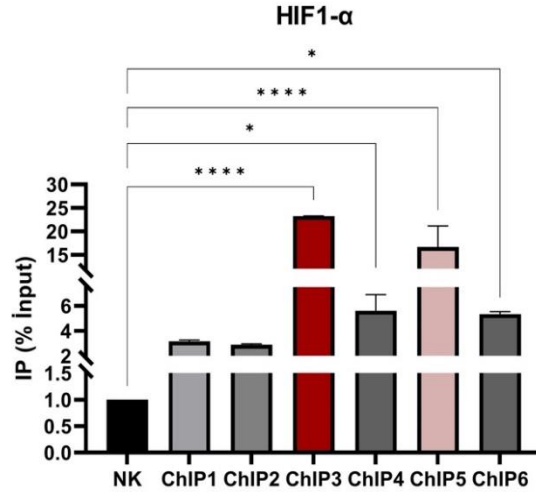
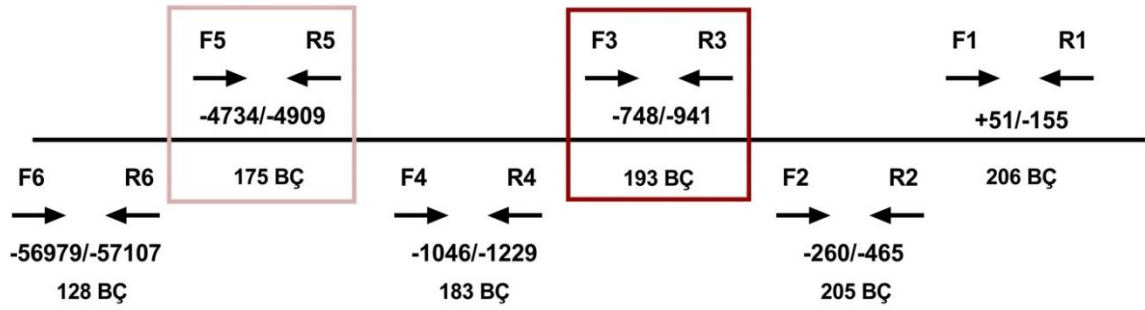
Primer Adı	Lokasyon	Primer dizileri (5'-3')	Ürün büyüklüğü (bç)
ChIP 1	+51/-155	Forw 5'-CAACTCACACAGAGGCTGTTCTT-3' Rev 5'-AACTTCTGCGCTTCCAAAATTCC-3'	206 bç
ChIP 2	-260/-465	Forw 5'-CAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGA-3' Rev 5'-CTGCATGGCTTACGCGCTGCAT-3'	205 bç
ChIP 3	-748/-941	Forw 5'-GATAGGTATCGAGTCTAGATCTG-3' Rev 5'-ACGTATGGTTCAGTATAGAGCTG-3'	193 bç
ChIP 4	-1046/-1229	Forw 5'-CAGGAGAAAACCTGGTCATGATGT-3' Rev 5'-ATGGCAGAATGAAATAATACGTCA-3'	183 bç
ChIP 5	-4734/-4909	Forw 5'-ATTAGGCGAAGTAAAAACAGAGTGA-3' Rev 5'-TTCTTCAGAGATCTGCTTACATTC-3'	175 bç
ChIP 6	-56979/-57107	Forw 5'-GATGAACACCCAGTATTGTTATGA-3' Rev 5'-GTAAGAAGCTTTTACATTAAGCATG-3'	128 bç



Şekil 4.42: Tasarlanan ChIP primerlerinin PCR ile kontrolü.

4.5.2 Kromatin İmmünopresipitasyon (ChIP) Deneyi

ChIP, kromatin immunopresipitasyon analizi olarak bilinir. Transkripsiyon faktörü DNA bağlanmalarını tespit etmek ve gen regülasyonlarının aydınlatılması basamaklarında sıklıkla kullanılmaktadır. ChIP analizi kimyasal olarak proteinlerin DNA'ya kroslink olması esasına dayanır. Bölüm 3.2.5.2'de anlatılan prosedür doğrultusunda ve Bölüm 4.5.1'de tasarlanan primerler kullanılarak kromatin immunopresipitasyonu (ChIP) deneyi gerçekleştirilmiştir. ChIP deneyi sonucunda elde edilen DNA örneklerinin, Real-time PCR analizi gerçekleştirildi. Elde edilen Ct değerleri %10 inputa göre normalize edilip (Bölüm 3.2.5.2.6). IgG uygulanan negatif kontrole göre kat alındı. GraphPad Prism programında grafiklendirildi (Şekil 4.43).



Şekil 4.43: Hep3B hücrelerinde HIF-1 α antikorunu kullanılarak gerçekleştirilen ChIP deneyinin analizi.

Deney sonucunda, 300 μ M CoCl₂ uygulanmış olan Hep3B hücrelerinde Hipoksi İndüklenebilir Element (HRE) bölgeleriyle MIR100HG promotor parçalarında istatistiksel

olarak bağlanmanın gerçekleştiği bölgeler; biyoinformatik analizde (Bölüm 4.5.1) “Olası HRE bağlanma bölgeleri” ‘ni içeren ChIP3, ChIP4, ChIP5 ve ChIP6 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, hipoksi uygulanan Hep3B hücrelerinde, MIR100HG promotor parçalarının her birinde HIF-1 α antikoruyla immuno çökeltme gözlemlendi. Bu çökeltmenin, CoCl₂ uygulamasıyla özellikle ChIP3 ve ChIP5 promotor bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, HRE bağlanma bölgelerinin MIR100HG promotorunda ChIP3 ve ChIP5’te olabileceğini düşündürmektedir.

4.6 Clone-9 Hücrelerinde MIR100HG Geninin Hücresel Etkilerinin Belirlenmesi

4.6.1 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde İfade Baskılanması Çalışmaları

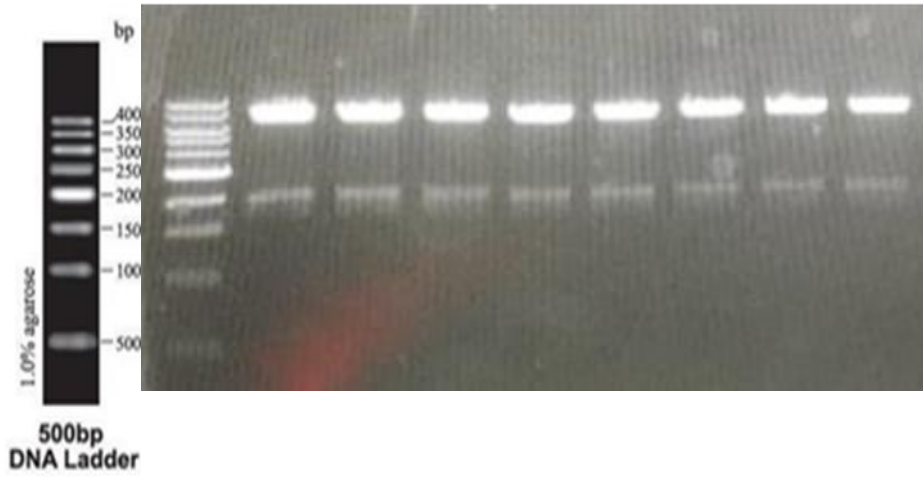
MIR100HG geninin ifade baskılanmasının hücrelerde sebep olduğu etkileri incelemek amacıyla proje kapsamında Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde susturma çalışmaları gerçekleştirildi. **Tez kapsamında Clone-9 hücre hatlarında, MIR100HG ifade baskılanmasının hücrelerin karakterizasyonuna olan etkisi incelenmiştir.** Bu amaçla MIR100HG geni pLKO.1-TRC vektörü içerisine Addgene protokolüne göre klonlandı. Kontrol olarak pLKO.1-SRC vektörü kullanıldı. TurboFect™ Reagent ile Clone-9 hücrelerine kalıcı transfeksiyon gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.2.17.2) Sonrasında transdüksiyon çalışmaları ile sh-RNA kolonileri elde edildi (Bölüm 3.2.2.17.5). Kolonilerden RNA izolasyonu yapılarak Bölüm 3.2.3.4’te anlatıldığı şekilde cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA’ların MIR100HG ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ile analiz edildi. MIR100HG ifadesi baskılanan koloniler tespit edildi. Çalışmalar için MIR100HG ifadesi en az olan koloni seçildi. Seçilen koloniler Bölüm 3.2.2.7’de bahsedildiği şekilde büyütüldü. Ardından MIR100HG ifadesinin baskılanmasının Clone-9 hücreleri üzerindeki hücre sağkalımı, proliferasyonu, hücre göçü gibi etkilerini tespit etmek amacıyla MTT testi, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.6.1.1 MIR100HG sh-RNA Oligolarının Tasarlanması

MIR100HG genine özgü sh-RNA oligolarının tasarlanması Whitehead Biyomedikal Araştırma Enstitüsü’nün sunmuş olduğu siRNA seçim programı kullanılarak gerçekleştirildi. Program sonuçları, BLAST ile analiz edildi. 4 adet sh-RNA oligo primeri tasarlanmış ve sipariş edilmiştir. sh-RNA oligoları çalışma sırasında M1, M2, M3 ve M4 olarak isimlendirilmiştir.

4.6.1.2 MIR100HG sh-RNA Oligolarını pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlama Çalışmaları

pLKO.1-TRC klonlama vektörüne, sh-RNA oligolarının klonlanabilmesi için ilk adım olarak pLKO.1-TRC vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.1.14.3). Kurulan kesim reaksiyonu 37 °C’de iki saat inkübe edildi. Kesim sonuçları için DNA jel elektroforezi gerçekleştirildi. Biri 7 kb, biri 1.9 kb olmak üzere iki bant gözlemlendi (Şekil 4.44). 7 kb’de gözlemlenen bantlar jelden kesilerek, GeneJET Gel Ekstraksiyon Kit (Thermo Scientific) ile geri kazanıldı. Spektrofotometrede ölçülerek saflığı ve DNA miktarı belirlendi.

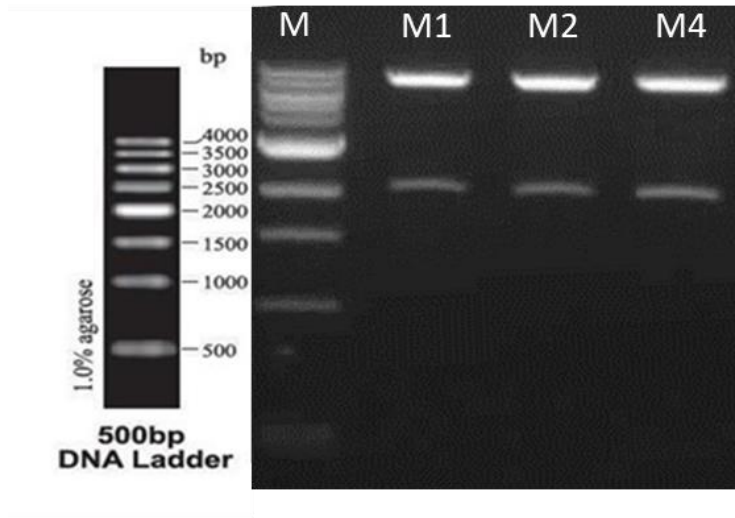


Şekil 4.44: pLKO.1-TRC klonlama vektörünün AgeI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile hazırlanması.

shRNA oligoları ile 35 µL son hacimde Bölüm 3.2.1.14.2’de anlatıldığı şekilde annealing reaksiyonu kuruldu. 95 °C’de 4 dakika inkübe edildikten sonra, 70 °C’de 10 dakika inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirildi. Ardından oda sıcaklığında yavaşça soğutuldu. Bu işlem ile sh-RNA oligolarının birleştirilmesi sağlanarak pLKO.1-TRC vektörüne klonlama için hazır hale getirildi.

Ardından pLKO.1-TRC vektörü ve MIR100HG sh-RNA oligoları, birleştirme için Bölüm 3.2.1.14.4’te anlatıldığı şekilde ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri, DH5α kompetan hücrelerine Bölüm 3.2.1.9’da anlatıldığı şekilde transforme edilip, ampisilin içeren LB agar

üzerine tek koloni yöntemiyle ekim yapıldı. 37 °C’de gece boyu koloni oluşumu için inkübe edildikten sonra, ertesi gün gözlenen koloniler taranmak üzere ampisilinli 10 mL LB Broth’a ekim yapıldı. Kültürlerden, NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit kullanılarak küçük ölçekte plazmid izolasyonu yapıldı. DNA miktarı ve saflığı spektrofotometreyle belirlendi. MIR100HG sh-RNA oligolarının pLKO.1-TRC vektörüne klonlamasının kontrolü için Bölüm 3.2.1.14.5’te anlatıldığı şekilde EcoRI enzimi ile kesim kuruldu. Kesim reaksiyonu 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Rekombinant kolonilerde 2 kb ve 5 kb’de olmak üzere iki bant gözlemlendi (Şekil 4.45). Klonlamanın doğrulanması için, örnekler dizi analizine gönderildi.

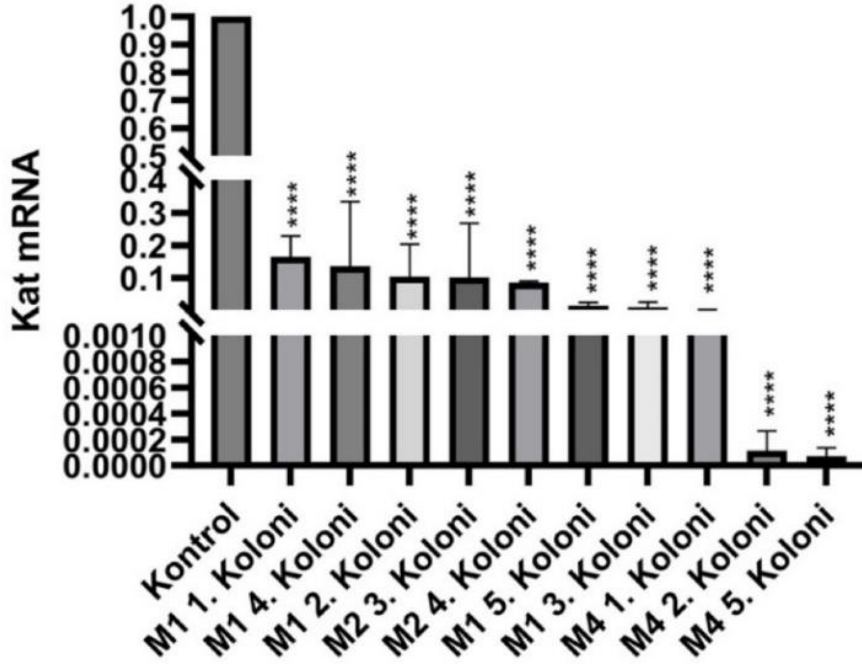


Şekil 4.45: Rekombinant M1, M2 ve M4 MIR100HG-sh-RNA-pLKO.1-TRC vektörlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: 500bp Marker.

Rekombinant olan ve doğruluğu dizileme ile doğrulanan plazmidlerin yüksek konsantrasyonda ve büyük ölçekte izolasyonu (Bölüm 3.2.1.13) yapıldı. Çok kopyalı ve yüksek saflıkta izolasyon gerçekleştirildi. MIR100HG ifade baskılama çalışmaları için HEK293-T hücreleri büyütüldü. Tripsinizasyonla kaldırılıp antibiyotiksiz medyum içeren 6 kuyucuklu plakalara 4×10^5 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Gece boyu 37 °C’de inkübe edildikten sonra, izole edilen rekombinant MIR100HG-shRNA içeren plazmidler ile birlikte pMD2.G (zarf plazmid) ve psPAX2 (paketleme plazmid) plazmidlerinin ve ayrıca da kontrol olarak kullanılacak olan pLKO.1-SCR plazmidinin HEK293-T hücrelerine Bölüm-3.2.2.17.2’de anlatıldığı şekilde TurboFect™ Reagent (Thermo) kullanılarak kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirilerek lentiviral sıvı üretildi. Ardından transfeksiyon medyumları

48 ve 72. Saatte toplandı ve 0.45 μM 'lik filtreden geçirildi. Clone-9 hücreleri tripsinizasyonla kaldırılıp sayıldı ve 5×10^5 hücre olacak şekilde transdüksiyon için 6 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. 400 μL lentiviral sıvı uygulandı. 48 saat hücreler 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Promisin uygulaması yapılarak susmuş kolonilerin tespit edilmesi sağlandı. Elde edilen kolonilerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. MIR100HG ifadesinin kontrolü için MIR100HG ekspresyon ve GAPDH primerleri kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Bölüm 3.2.2.17.5 ve 3.2.2.17.6). Real-Time PCR sonuçları GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir. Clone-9 hücreleri için 10 koloni taraması yapıldı. Real-Time PCR sonuçları Şekil 4.46'da verildiği gibidir. En çok MIR100HG ifadesinin baskılandığı koloni, M4 (2907 Başlangıç Pozisyonu) 5. Koloni olarak tespit edilmiştir. Susturma çalışmaları için MIR100HG-shRNA-pLKO.1-TRC vektörü içeren Clone-9 M4 5. Koloni hücreleri ve pLKO.1-SCR vektörü içeren Clone-9 hücreleri Bölüm 3.2.2.7'de anlatıldığı şekilde pasajlanarak büyütülmüştür. Büyütülen hücreler, yeterli doluluğa ulaştığında tripsinizasyonla kaldırılmış, MIR100HG ifadesinin baskılanmasının Clone-9 hücrelerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla aynı petrideki hücreler sayılarak mRNA, MTT testi, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri kurulmuştur. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edilip tutunduktan sonra, MIR100HG ifade baskılanmasının etkilerini hem normoksi hem de hipoksi ortamda incelemek için hipoksi uygulaması yapılacak kuyulara 300 μM CoCl_2 uygulanmıştır.

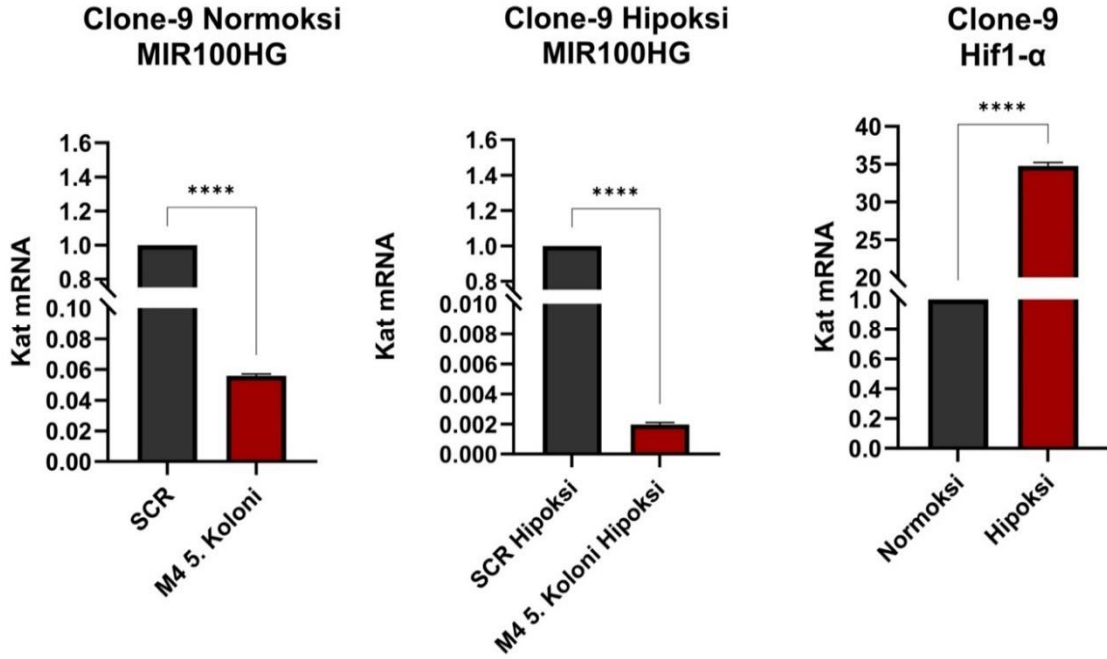
Clone-9 MIR100HG



Şekil 4.46: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesi baskılanan kolonilerin Real-Time PCR ile belirlenmesi.

4.6.1.3 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde İfade Baskılanmasının Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması

MIR100HG geninin Clone-9 hücrelerinde ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullar altında mRNA seviyesinde Real-Time PCR ile doğrulanması için tripsinizasyonla kaldırılan hücrelerden mRNA peleti alındı. Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA’ların miktarları spektrofotometre ile belirlenerek cDNA sentezi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.3.2- Bölüm 3.2.3.4). Hazırlanan cDNA’lar ile Real-Time PCR kuruldu. Normalizasyon için Clone-9 hücrelerinde GAPDH ekspresyon primerleri kullanılmıştır. Real-Time PCR sonuçları, GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.47: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.

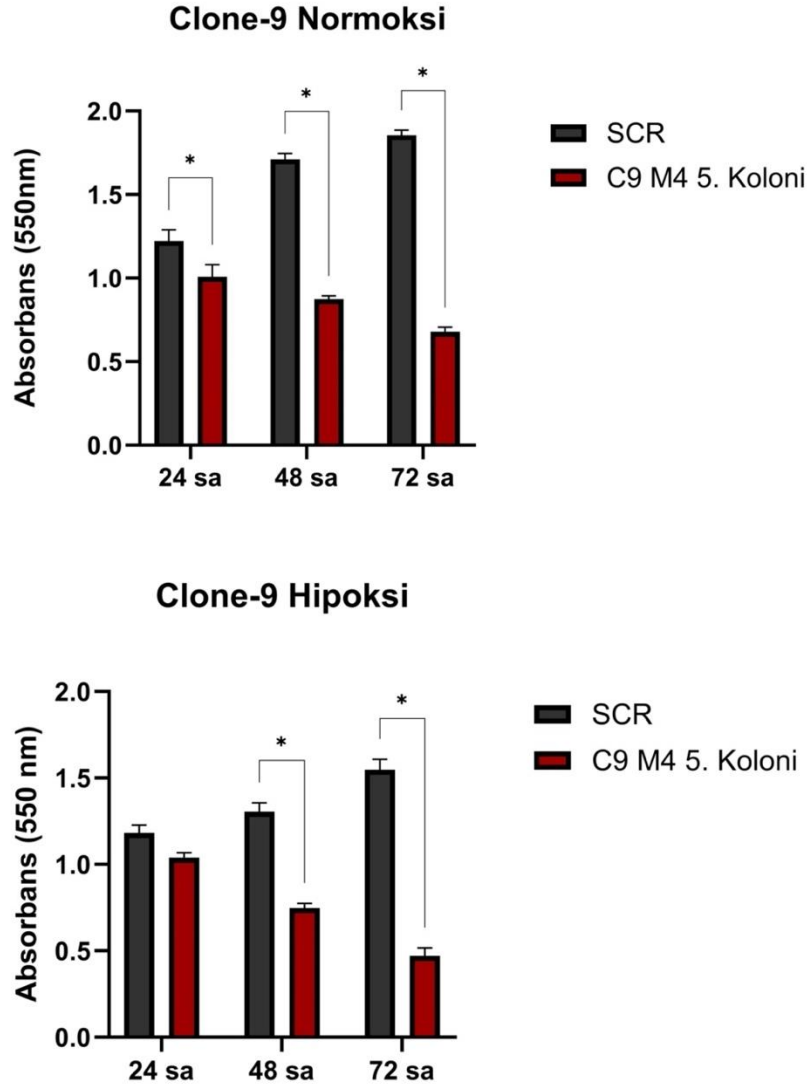
Deney hem hipoksi hem de normoksi ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması HIF-1 α seviyesi analiz edilmiş, normoksiye göre yaklaşık 35 kat artış görülmüştür. Clone-9 hücre hattında kontrol olarak pLKO.1-SCR, deney grubu olarak seçilen M4 sh-RNA-5. Koloni için normoksik ve hipoksik istatistik olarak anlamlı olan azalmalar belirlenmiştir. Bu iki sonuçta susturmanın gerçekleştiğini kanıtlamıştır.

4.6.1.4 MIR100HG Geninin İfadesinin Baskılandığı Clone-9 Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

4.6.1.4.1 MTT

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda neden olduğu sitotoksik etkilerin belirlenmesi için yapılan MTT testi deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, MTT testi için 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 10×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 4 tekrarlı paylaştırıldı. 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. Bölüm

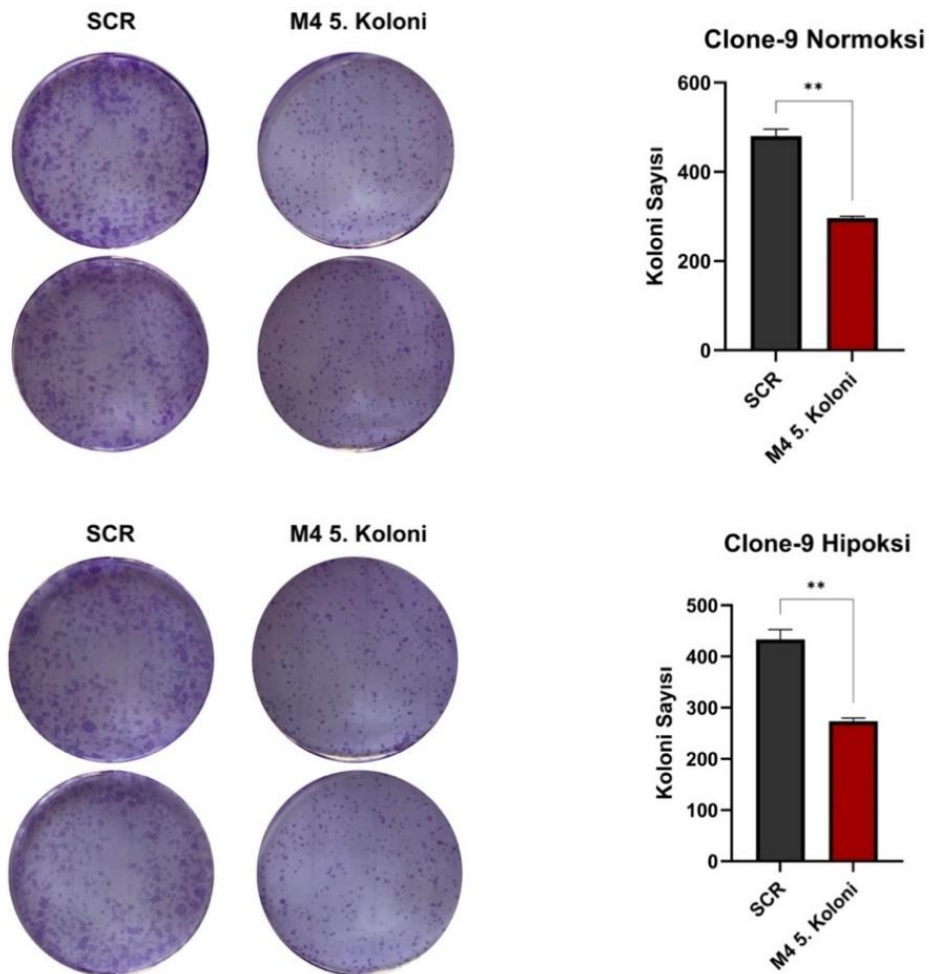
3.2.2.12’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda kontrolde olan artışa kıyasla, MIR100HG ifadesinin baskılandığı M4 5. Kolonide istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilerek susturmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulanmıştır (Şekil 4.48).



Şekil 4.48: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

4.6.1.4.2 Koloni Formasyon

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi için yapılan koloni formasyon deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, Koloni-Formasyon testi için 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 1×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 2 tekrarlı paylaştırıldı. 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. Bölüm 3.2.2.14'te anlatıldığı şekilde 10 gün 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü ve 10. Gün sonuç alındı. Kuyular fotoğraflandırdı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter Programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi (Şekil 4.49).

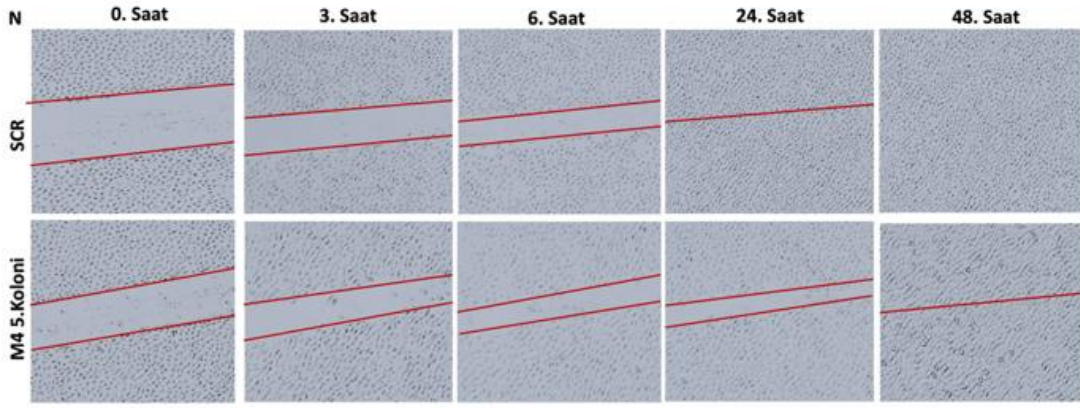


Şekil 4.49: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.

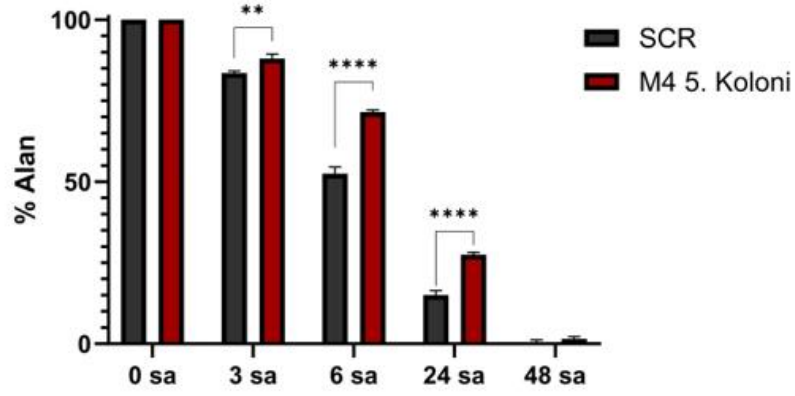
Clone-9 hücre hattında susturmanın doğrulanması için yapılan koloni formasyon deneyinde hücrelerde hem susturulmanın doğrulanması için kullanılan SCR vektörü transdüksiyonu sonrası büyütülen hücreler, hem de elde edilen M4 5. Susturma kolonisine ait büyütülen hücrelerle çalışılmıştır. Buna göre Şekil 4.49'da gösterildiği gibi, normoksik koşullarda Clone-9 hücrelerindeki susturma kolonisinin kontrole göre sayısı yaklaşık %50 kadar istatistiki olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilerek susturma doğrulanmıştır. Hipoksik koşullarda ise normoksik koşullara benzer şekilde bir azalma görülmüştür ve sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

4.6.1.4.3 Çizik Testi

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çizik testi deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, çizik testi için 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 75×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 2 tekrarlı paylaştırıldı. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Plakalardaki her bir kuyuya pipet ucu ile artı çizilmiştir. Bir kez PBS ile yıkandıktan sonra taze %10 FBS'li medyum eklenmiştir. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara $300 \text{ }\mu\text{M}$ olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Bölüm 3.2.2.13'te anlatıldığı şekilde 0. Saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6-24 ve 48. Saatlerde fotoğraflandırıldı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi.

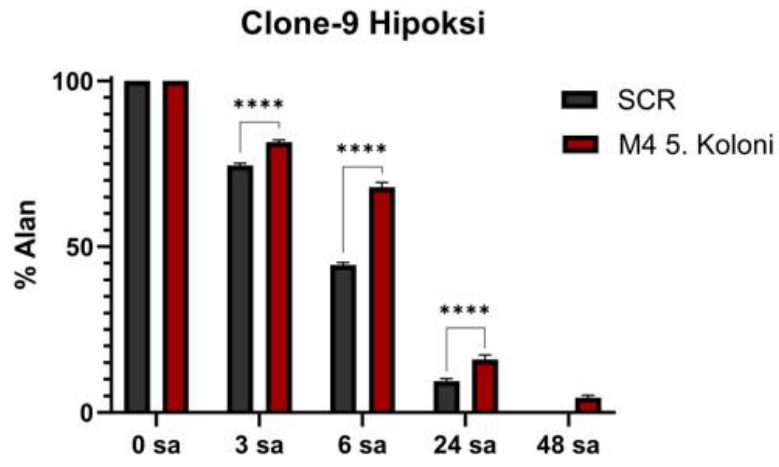
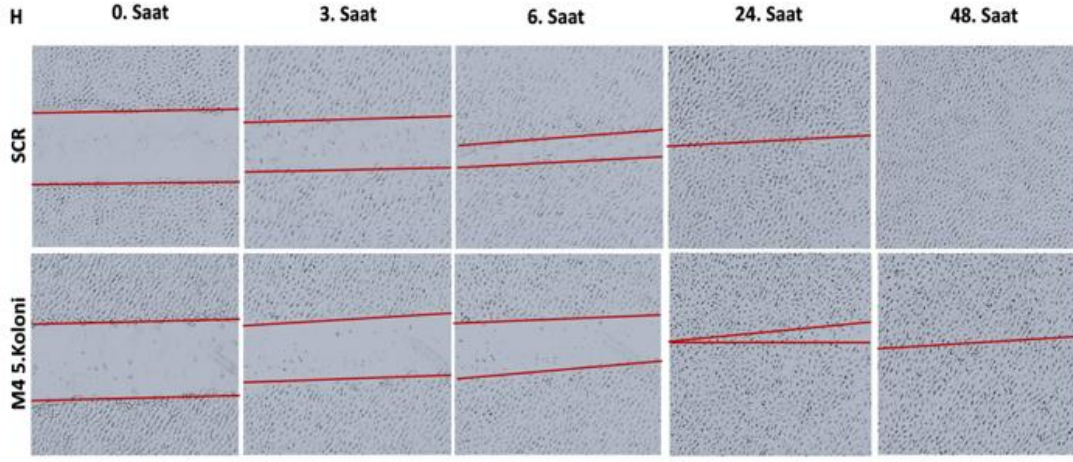


Clone-9 Normoksi



Şekil 4.50: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik koşullarda Çizik Testi analizi.

Elde edilen verilere göre, normoksi koşullarda yapılan deneyde; susturma sonrası hücrelerin kontrol grubuna kıyasla, deney grubunda daha yavaş bir kapanma gözlenmiştir.

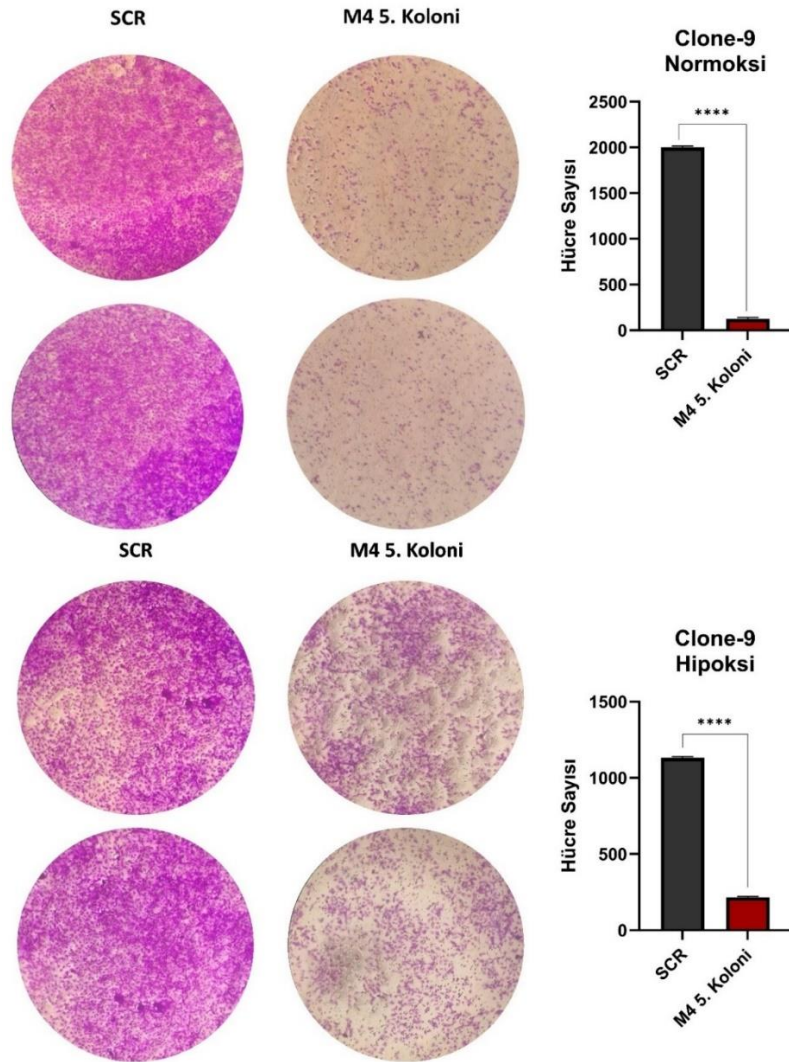


Şekil 4.51: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hipoksik koşullarda Çizik Testi analizi.

Elde edilen verilere göre, hipoksi koşullarında ise, normoksi koşullara benzer ancak daha yavaş bir kapanma gerçekleştiği belirlenmiştir.

4.6.1.4.4 Matrijel

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik şartlarda migrasyon-invazyon yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan matrijel deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, matrijel deneyi için 24 kuyucuklu ve 8 μM insert içeren plakalara 150×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 μM olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Bölüm 3.2.2.15'te belirtilen prosedürdeki adımlar izlenerek deney gerçekleştirildi. Her kuyuda 10X objektif mercekle birden fazla alan fotoğraflandı. Hücre sayıları Image J programının hücre sayacı eklentisi Cell Counter ile belirlendi. Her bir örnek için, birden fazla alandan gelen hücre sayılarının ortalaması alınarak, sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi (Şekil 4.52).



Şekil 4.52: Clone-9 hücre hattında MIR100HG ifadesinin baskılanmasının normoksik ve hipoksik koşullarda matrijel analizi.

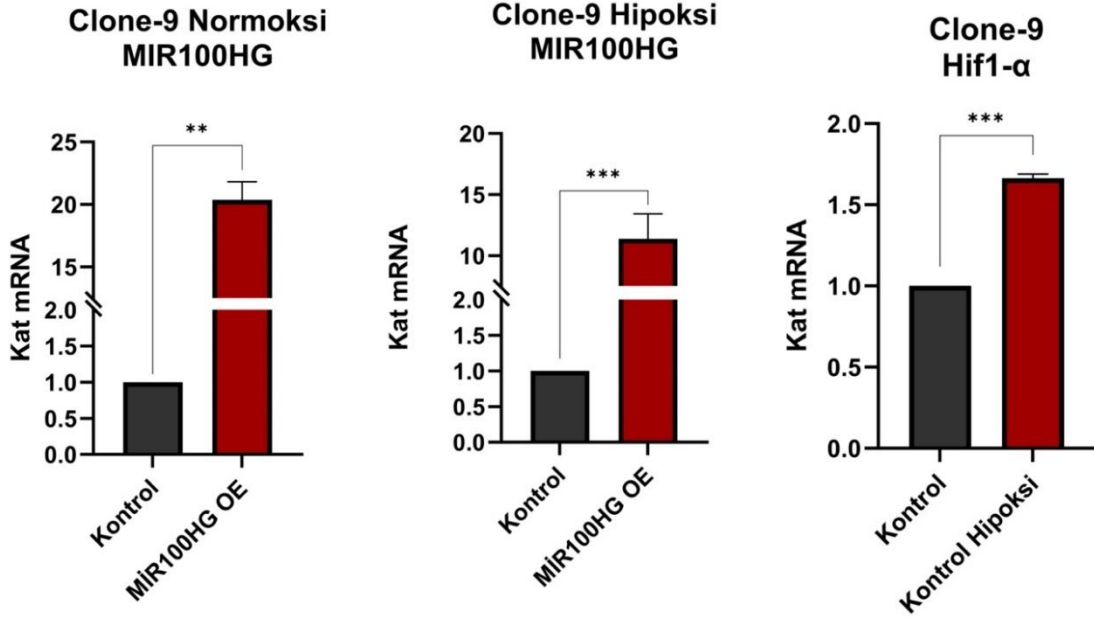
Elde edilen verilere göre susturulan MIR100HG genine ait kuyularda, kontrol grubuyla kıyaslandığında hem normoksi hem de hipoksi şartlarda neredeyse tamamen susturmanın gerçekleştirildiği ve istatistiksel olarak sonuçların anlamlı olduğu görülmektedir.

4.6.2 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde Aşırı İfade Çalışmaları

MIR100HG geninin aşırı ifade edilmesinin hücrelerde sebep olduğu etkileri incelemek amacıyla proje kapsamında Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde aşırı ifade çalışmaları gerçekleştirildi. **Tez kapsamında Clone-9 hücre hatlarında, MIR100HG aşırı ifadesinin hücrelerin karakterizasyonuna olan etkisi incelenmiştir.** Bu amaçla Bölüm 3.2.1.15'te anlatıldığı şekilde pcDNA3.1 vektörüne klonlanmış halde bulunan MIR100HG geninin ve kontrol olarak kullanılacak olan boş pcDNA3.1 vektörünün Clone-9 hücre hattına TurboFect™ Reagent ile transfeksiyonu gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.2.18). Boş vektör ve MIR100HG Overekspresyon edilen hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak Bölüm 3.2.3.4'te anlatıldığı şekilde cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA'ların MIR100HG ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR ile analiz edildi (Bölüm 3.2.3.6). Kontrol grubuna kıyasla, overekspresyon yapılan deney gruplarında MIR100HG aşırı ifadesi doğrulandı. Ardından MIR100HG aşırı ifadesinin Clone-9 hücreleri üzerindeki hücre sağkalımı, proliferasyonu, hücre göçü gibi etkilerini tespit etmek amacıyla MTT testi, Koloni Formasyon, Çizik Testi ve Matrijel deneyleri gerçekleştirildi.

4.6.2.1 MIR100HG Geninin Clone-9 Hücrelerinde Aşırı İfadesinin Normoksik ve Hipoksik Koşullar Altında mRNA Seviyesinde Doğrulanması

MIR100HG geninin Clone-9 hücrelerinde aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullar altında mRNA seviyesinde Real-Time PCR ile doğrulanması için tripsinizasyonla kaldırılan hücrelerden mRNA peleti alındı. Bölüm 3.2.3.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların miktarları spektrofotometre ile belirlenerek cDNA sentezi gerçekleştirildi (Bölüm 3.2.3.4). Hazırlanan cDNA'lar ile Real-Time PCR kuruldu. Normalizasyon için Clone-9 hücrelerinde GAPDH ekspresyon primerleri kullanılmıştır. Real-Time PCR sonuçları, GraphPad Programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 4.53).



Şekil 4.53: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda mRNA seviyesinde doğrulanması.

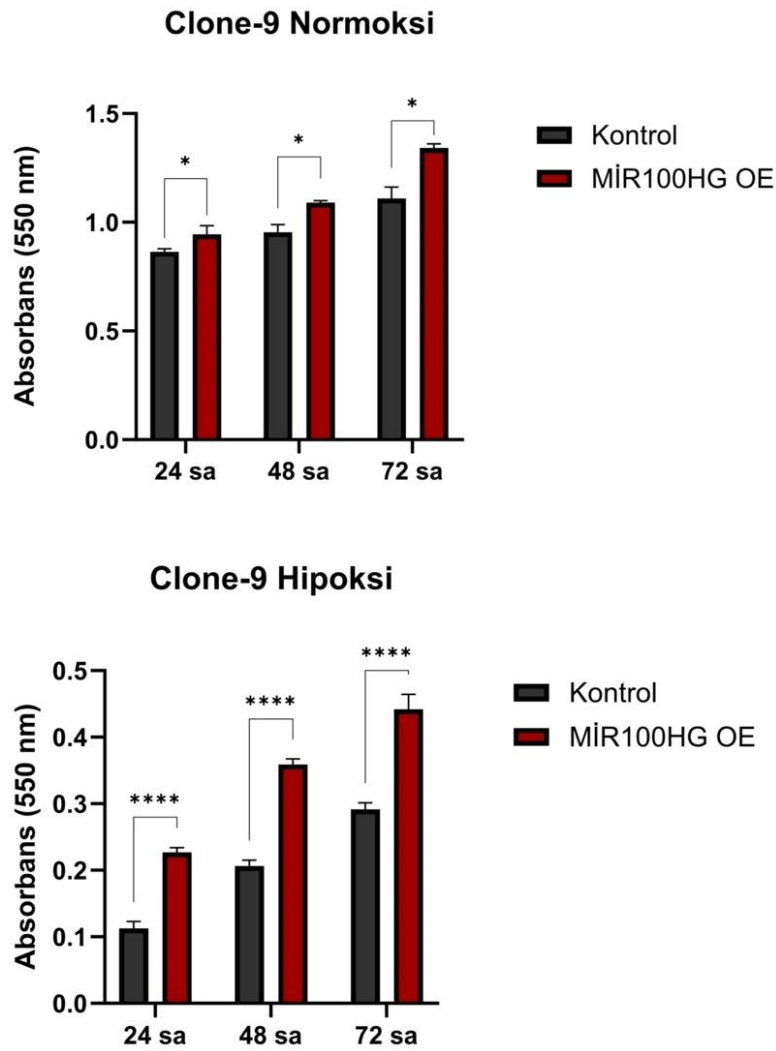
Deney hem hipoksi hem de normoksi ortamda gerçekleştirildiği için hipoksi oluşumunun mRNA düzeyinde doğrulanması HIF-1 α seviyesi analiz edilmiş, normoksiye göre yaklaşık 1 kat artış görülmüştür. Clone-9 hücre hattında kontrol olarak kullanılan pcDNA3.1 Boş vektör overekspres edilmiş hücelere kıyasla, deney grubu olarak pcDNA3.1-MIR100HG vektörü overekspres edilen hücrelerde normoksida yaklaşık 20 kat ve hipoksida yaklaşık 9 kat istatistik olarak anlamlı olan artış belirlenmiştir. Bu iki sonuç ile MIR100HG aşırı ifadesinin gerçekleştiği mRNA seviyesinde kanıtlanmıştır.

4.6.2.2 MIR100HG Geninin Aşırı İfade Edildiği Clone-9 Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hücresel Karakterizasyonunun Belirlenmesi

4.6.2.2.1 MTT

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda neden olduğu sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT testi deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, MTT testi için 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 10×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 4 tekrarlı paylaştırıldı. 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği

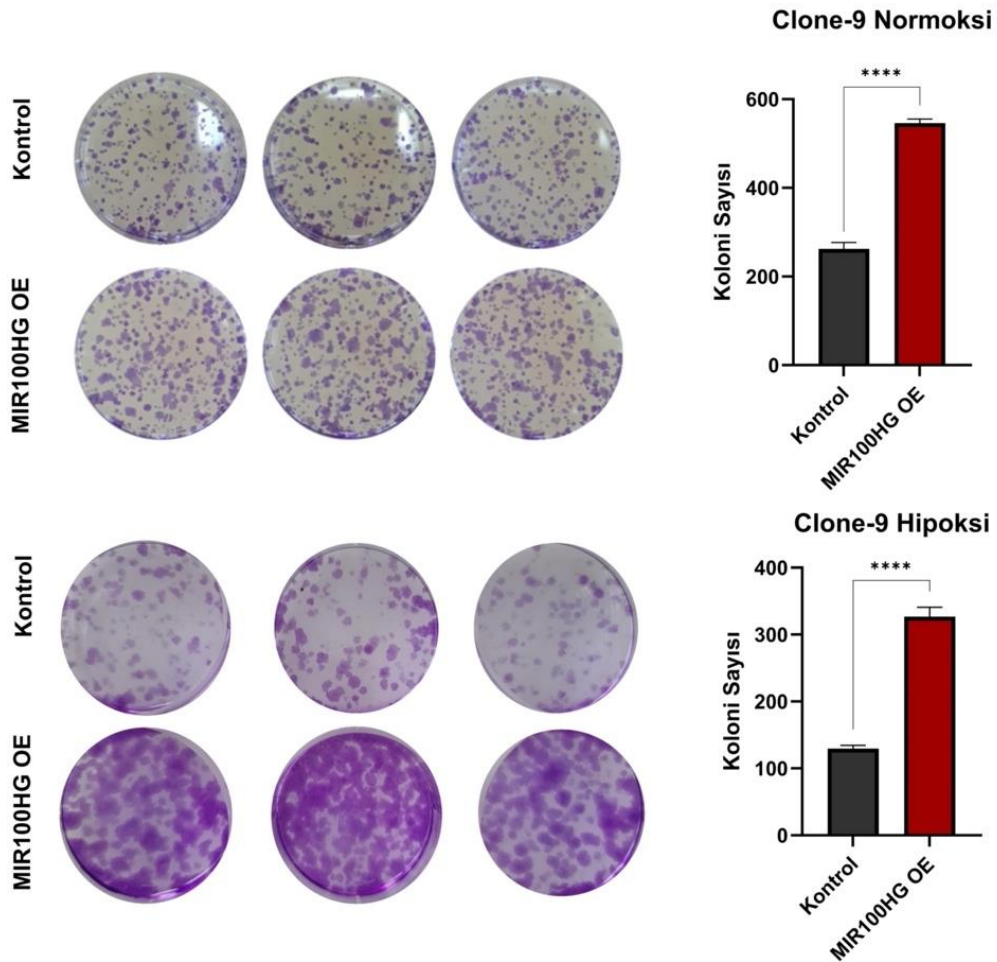
için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. Bölüm 3.2.2.12’de anlatıldığı şekilde 24, 48 ve 72. Saatlerde alınan 550 nm absorbans değerleri GraphPad Programında analiz edildi. Elde edilen verilere göre, normoksik koşullarda yapılan 24, 48 ve 72 saatlik deney sonucunda hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre, beklendiği şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda da aynı deney dizaynı aynı saat dilimlerinde yapılmış olup, sonuçlar normoksi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Buna göre hipokside de her saat diliminde kontrol grubuna göre, aşırı ifade durumunun hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmektedir (Şekil 4.54).



Şekil 4.54: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda MTT analizi.

4.6.2.2.2 Koloni Formasyon

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda koloni oluşturma yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan koloni formasyon deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, Koloni-Formasyon testi için 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 1×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 2 tekrarlı paylaştırıldı. 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara $300 \mu\text{M}$ olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Bölüm 3.2.2.14'te anlatıldığı şekilde 10 gün 37°C %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü ve 10. Gün sonuç alındı. Kuyular fotoğraflandırdı ve Image J programının bir hücre sayacı eklentisi olan Cell Counter programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi (Şekil 4.55).

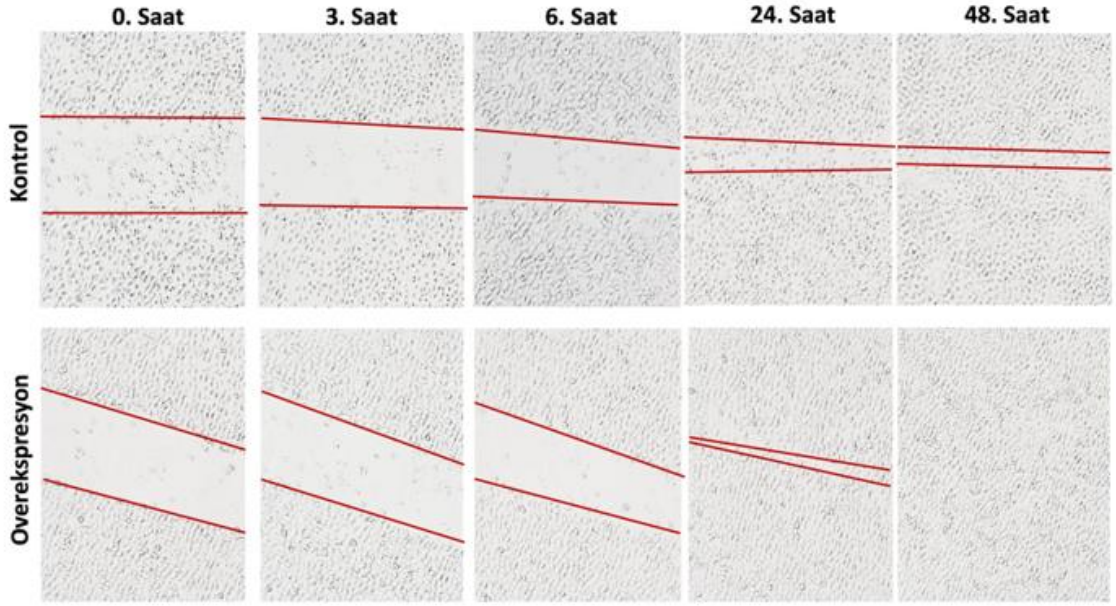


Şekil 4.55: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik ve normoksik koşullarda Koloni-Formasyon analizi.

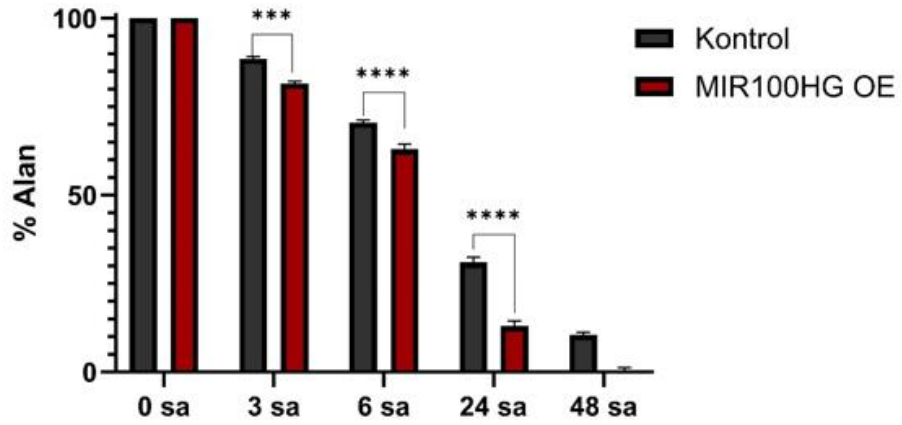
Clone-9 hücre hattında overekspresyonun doğrulanması için Boş pcDNA3.1 overekspres edilen hücreler, hem de pcDNA3.1-MIR100HG overekspres edilen hücrelerle çalışılmıştır. Buna göre kontrol grubuna kıyasla, Şekil 4.55'te gösterildiği gibi, normoksik koşullarda yapılan overekspresyon sonrası hücre sayısının arttığı hem fotoğraflamada hem de analizde görülmektedir. Bu artış kontrol grubuna göre 3 kat artış göstermiş ve 200 hücreden 600 hücreye çıkmıştır. Buradan MIR100HG'nin aşırı ifadesinin hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini anlamlı ölçüde arttırmış olduğu görülmektedir. Hipoksik koşullardaki koloni formasyon sonucuna baktığımız zaman, kontrol grubuna göre 3 kat artış olduğu gözlenmiştir.

4.6.2.2.3 Çizik Testi

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda hücre göçü kabiliyetine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çizik testi deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, çizik testi için 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 75×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 2 tekrarlı paylaştırıldı. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Plakalardaki her bir kuyuya pipet ucu ile artı çizilmiştir. Bir kez PBS ile yıkandıktan sonra taze %10 FBS'li medyum eklenmiştir. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara $300 \text{ } \mu\text{M}$ olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Bölüm 3.2.2.13'te anlatıldığı şekilde 0. Saatte uygulama yapıldığı anda ve ardından 3-6-24 ve 48. Saatlerde fotoğraflandırdı ve Image J programının bir eklentisi olan MRI Yara İyileştirme Aracı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism programında grafiklendirildi.

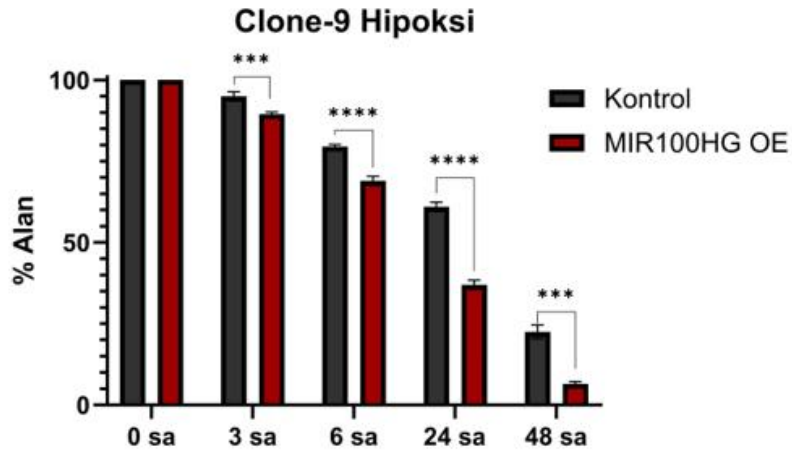
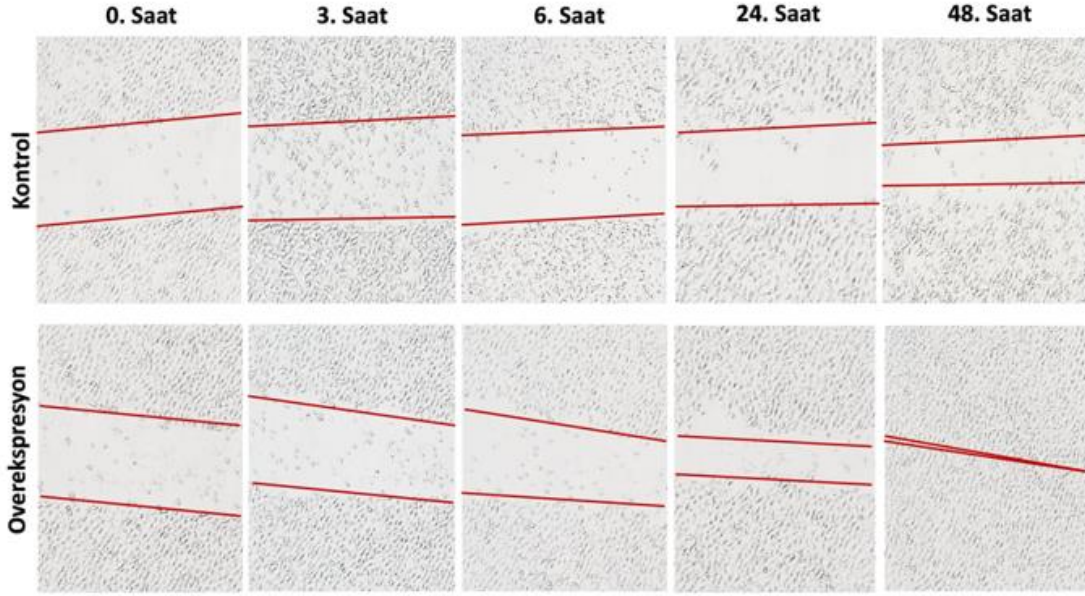


Clone-9 Normoksi



Şekil 4.56: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik koşullarda Çizik testi analizi.

Elde edilen verilere göre, normoksi koşullarda yapılan deneyde; overekspresyon sonrası hücrelerin kontrol grubuna kıyasla, deney grubunda daha hızlı bir kapanma gözlenmiştir.

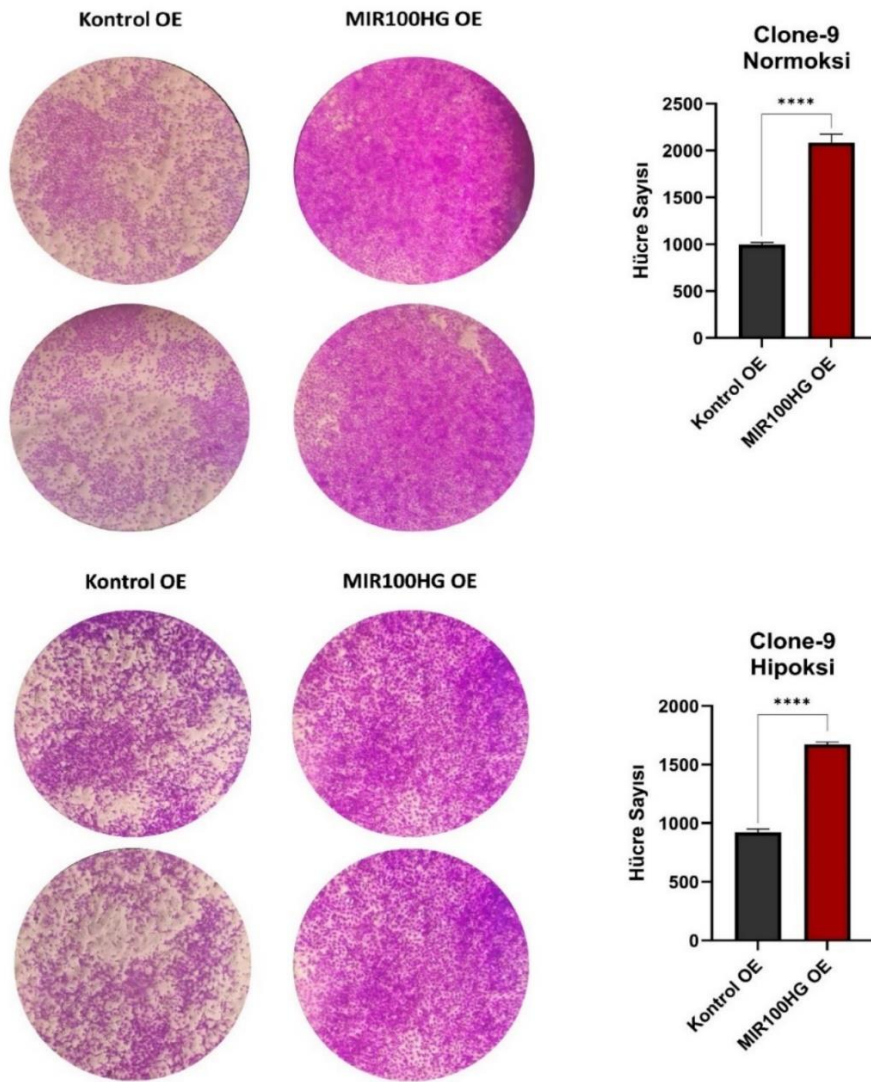


Şekil 4.57: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin hipoksik koşullarda Çizik testi analizi.

Elde edilen verilere göre, hipoksi koşullarında ise, normoksi koşullara benzer ancak daha yavaş bir kapanma gerçekleştiği belirlenmiştir.

4.6.2.2.4 Matrijel

Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik şartlarda migrasyon-invazyon yeteneğine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan matrijel deneyi için tripsinizasyonla kaldırılan hücreler sayılarak, matrijel deneyi için 24 kuyucuklu ve 8 µM insert içeren plakalara 150 x 10³ hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Deney hem normoksi hem hipoksi koşullarda gerçekleştirileceği için hipoksi uygulanacak kuyulara 300 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. Bölüm 3.2.2.15'te belirtilen prosedürdeki adımlar izlenerek deney gerçekleştirildi. Her kuyuda 10X objektif mercekle birden fazla alan fotoğraflandı. Hücre sayıları Image J programının hücre sayacı eklentisi Cell Counter ile belirlendi. Her bir örnek için, birden fazla alandan gelen hücre sayılarının ortalaması alınarak, sonuçlar GraphPad Prism programında analiz edilip grafiklendirildi (Şekil 4.58).



Şekil 4.58: Clone-9 hücre hattında MIR100HG aşırı ifadesinin normoksik ve hipoksik koşullarda matrijel analizi.

Elde edilen verilere göre MIR100HG aşırı ifade edilen kuyularda, kontrol grubuyla kıyaslandığında göç eden hücre sayısının normoksik şartlarda yaklaşık 2 kat, hipoksik şartlarda yaklaşık 1 kat arttığı görülmektedir. Aşırı ifade durumu Clone-9 hücre hattında MIR100HG geninin ifadesini arttırmıştır.

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Karaciğer vücutta pek çok karmaşık fonksiyona sahiptir [1]. Hepatosellüler karsinom (HCC), tüm primer karaciğer kanserlerinin %80'ini oluşturan önemli bir küresel sağlık sorunudur [3]. Her yıl bir milyona yakın kişide teşhis edilen HCC, 700.000'e yakın kişinin ölümüyle sonuçlanmaktadır [2]. Dünya genelinde altıncı en sık görülen kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü en yaygın nedenidir [4]. Birçok moleküler temelli faktör HCC'de tümörlerin hızla büyümesine ve yayılmasına neden olmaktadır [5]. Kısıtlı tanı, tedavi ve ilaçlar bulunması nedeniyle yeni biyobelirteçlere, hedefe yönelik tedavi ve moleküler çalışmalara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır ve büyük önem taşımaktadır.

ncRNA'lar önceden transkripsiyonel gürültü olarak düşünülürken, fonksiyonlarının tanımlanması ile önemleri ortaya konulmuş olan ve ilgi odağı haline gelmişlerdir [10]. Hücre içinde; hücre döngüsü, epigenetik ve transkripsiyonel düzenleme, apoptoz ve metastazda dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahiptirler. Büyüklükleri 200 bazdan büyük olan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve 200 bazdan küçük olan microRNA'lar olmak üzere iki grupta incelenirler. Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların microRNA'larla etkileşime girerek insan kanserlerinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir [11, 12]. ncRNA'ların bir çeşidi olan lncRNA'lar, işlevsel olarak çeşitlilik gösterir ve çeşitli hücresel süreçlerde düzenleyici rol oynarlar [14]. En yaygın bilinen işlevleri gen düzenlemedir [17]. Yapılan çalışmalar sonucunda kanserler ve çeşitli hastalıkların gelişiminde ve patogeneğinde önemli rol oynayabilecekleri bulunmuştur [19]. Hücre patolojisinin ve fizyolojisinin düzenleyicileri olan lncRNA'lar, hastalıkların tanı ve tedavisinde yeni potansiyel hedef olarak değerlendirilmişlerdir [20].

Yeni keşfedilen bir uzun kodlamayan RNA olan MIR100HG geni, kanserlerde yeni ve kritik bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Çeşitli kanserlerde düzensizleşerek onkogenik veya tümör baskılayıcı rol oynar ve birçok kanserle ilişkilendirilen yola katılır [26]. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarla çok sayıda çeşitli kanser tiplerinde çalışılmış ve insan kanserlerinde tümör promotörü olarak görev yaptığı biyoinformatik analizler ve çeşitli ekspresyon çalışmaları ile gösterilmiştir ancak hepatosellüler karsinom hakkında literatürde yer alan bilgiler sınırlıdır, normoksik ve hipoksik şartlarda MIR100HG'nin transkripsiyonel regülasyonu hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenlerle tez çalışmasında son yıllarda

ilgi odağı haline gelen önemli bir uzun kodlamayan RNA olan MIR100HG geninin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen çalışmalar iki genel basamak altında toplanabilir. Birinci basamakta MIR100HG'nin transkripsiyonel regülasyonu çalışmaları yapılmıştır.

İlk olarak MIR100HG geninin ekspresyon belirleme çalışmaları için NCBI'dan MIR100HG genomu ve varyantları belirlenerek dizi hizalama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen MIR100HG geninin transkript varyant 1 (NR_024430.2) mRNA nükleotid dizisi üzerinden ileri ve geri ekspresyon primerleri tasarlandı. MIR100HG geninin normoksik ve hipoksik şartlardaki ekspresyonunu mRNA düzeyinde belirlemek için iki tane epiteliyal karakterli hepatosellüler karsinom hücre hattı (Hep3B ve Huh-7), iki tane mezenşimal karakterli hepatosellüler karsinom hücre hattı (SNU-398 ve SNU-475), ve bir sağlıklı karaciğer hücre hattı (Clone-9) ile Real-Time PCR analizi tasarlanan ekspresyon primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, hepatosellüler kanserde MIR100HG geninin normoksi şartlarda dört farklı hücre hattı (Hep3B, Huh-7, SNU-398 ve SNU-475) ve sağlıklı karaciğer hücre modeli (Clone-9) arasından en çok Hep3B hücrelerinde ekspre edildiği, SNU-398, Huh-7, Clone-9 ve SNU-475 hücre hatlarının da bu ekspresyon düzeyini takip ettiği, en yüksek MIR100HG ifadesine sahip olan Hep3B hücre hattı ana model, ikinci en yüksek MIR100HG ifadesine sahip olan SNU-398 hücre hattı yan model ve Clone-9 hücreleri sağlıklı karaciğer hücre modeli olarak belirlendi. Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 Hücre hatları üzerinde kimyasal indüklenmiş hipoksik model oluşturularak, hipoksik MIR100HG ekspresyon seviyesi belirlendi. Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde hipoksi şartlarda MIR100HG geninin ekspresyonunun en çok Hep3B hücrelerinde olduğu ve SNU-398 ve Clone-9 hücre hatlarının da bu ekspresyon düzeyini takip ettiği belirlendi.

Literatürde daha önce Ma ve arkadaşları (2018) tarafından Cancer Genome Atlas data setleri üzerinden 364 HCC hastasının lncRNA ekspresyonu analiz edilerek, MIR100HG'nin de içinde olduğu dört farklı lncRNA tanımlanmıştır. Dört HCC hücre hattında (MHCC97L, SMCC-7721, Huh-7, MHCC97H) ve bir sağlıklı karaciğer hücre hattında (LO2) MIR100HG ekspresyon çalışmaları yapılarak, sağlıklı karaciğer hücrelerine kıyasla tüm HCC hücre modellerinde MIR100HG ekspresyonunda artış olduğunu belirlemişlerdir [19]. Li ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, Hep3B, HepG2, SK-HEP1 ve

Huh-7 hücre hatlarında MIR100HG ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Hipoksik durumdaki MIR100HG ekspresyon çalışmaları bu tez çalışması ile ilk kez gerçekleştirilmiştir [18, 27].

İkinci olarak, seçilen hepatosellüler karsinom hücre hatlarında (Hep3B ve SNU-398) ve sağlıklı karaciğer hücre hattında (Clone-9), kimyasal indüklenmiş hipoksik model oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (150-300-600 μ M) kobalt klorür uygulaması yapılarak MTT testi ile kimyasal hipoksik model oluşumu için gereken CoCl_2 miktarının 300 μ M olduğu belirlendi.

Real-Time PCR analizleri ile mRNA düzeyinde hipoksik model oluşumu için gereken CoCl_2 miktarının 300 μ M olduğu doğrulanmıştır. Hep3B, SNU-398 ve Clone-9 hücrelerinde tüm saatlerde hipoksi olduğu mRNA düzeyinde belirlendi. En iyi hipoksi oluşumunun ise Hep3B’lerde olduğu tespit edildi.

Hücreler, kimyasal indüklenmiş hipoksi uygulaması yapıldıktan sonra mikroskop ile 10X ve 20X büyütmede görüntülenmiş, normoksik ortam ile karşılaştırılmıştır.

Hipoksik modelin oluşumu mRNA düzeyinde Real-Time PCR ile doğrulandığı gibi aynı zamanda protein düzeyinde Western-blot, IFC ve EMSA deneyleri gerçekleştirilerek de doğrulanmıştır. Sonuç olarak 300 μ M CoCl_2 ’nin hücrelerde başarılı bir şekilde hipoksik koşul oluşturduğu doğrulanmıştır.

Real-Time analizi sonucunda hipoksi oluşumu için uygulanan 300 μ M CoCl_2 ’ün Hep3B hücrelerinde en iyi 24. Saat, SNU-398 hücrelerinde 3 ve 24. Saat, Clone-9 hücrelerinde ise 3. Saatte HIF-1 α ifadesinde artışa neden olduğu mRNA düzeyinde tespit edilmiştir. Western-blot sonucunda protein düzeyinde en iyi hipoksi oluşumunun 4 kat ile Hep3B hücrelerinde olduğu ve bu sonucu SNU-398 hücrelerinin 2 kat, Clone-9 hücrelerinin ise 0.5 kat HIF-1 α ifadesinde artış ile takip ettiği belirlenmiştir. Yine protein düzeyinde doğrulama için gerçekleştirilen IFC deneyinin sonucunda ise tüm hücrelerde hipoksik durumda normoksi duruma kıyasla 2 kat artış olduğu belirlenmiştir. EMSA deneyi sonucunda ise Hep3B hücrelerinde hipoksi oluşumu protein düzeyinde doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, Western blot ve IFC analizi ile hipoksi durumunda tüm hücre hatlarında (Hep3B, SNU-398, Clone-9) HIF-1 α protein seviyesinde artış olduğu belirlendi. mRNA

düzeyinde yapılan Real-time sonuçları ile protein düzeyinde yapılan Western blot ve IFC sonuçları birbirine koreledir ve MTT ile belirlenen 300 uM kobalt klorür uygulamasının hipoksi oluşumunu sağlayabileceği sonucunu doğrulamaktadır.

Yapılan EMSA deneyinde de hipoksi durumunda HIF-1 α DNA-protein kompleksinin olduğu belirlendi. Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde hücre hatlarında kimyasal indüklenmiş hipoksik ortam oluşumu için belirlenen 300 μ M konsantrasyonda CoCl₂ uygulaması yapılmıştır.

Üçüncü olarak MIR100HG geni promotor çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle MIR100HG promotorunun biyoinformatik analizi yapılarak belirlenen varyant 1'in ilk ekzonunu da içerecek şekilde promotor klonlama primerleri dizayn edildi. Restriksiyon haritalaması ile geni kesen ve kesmeyen enzimler belirlendi. Vektörün kesim bölgesinde bulunan ancak MIR100HG genini kesmeyen enzimlerin tanıma dizileri okuma çerçevesini kaydırmayacak şekilde ileri ve geri klonlama primerlerine yerleştirildi. MIR100HG geni 628 bp e 1244 bp'lik promotor parçaları (-397/+231 ve -1013/+231) PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan parçaların pGEM-T Easy vektörüne klonlaması PCR tabanlı T:A klonlama stratejisi kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından pGEM-T Easy-MIR100HG promotor parçaları restriksiyon enzimleri ile kesilerek 5' delesyon mutantları oluşturuldu ve pMetLuc vektörüne 1244 bp'lik P1: [-1013/+231] konstrağının ve 628 bp'lik P2: [-397/+231] konstrağının alt klonlaması gerçekleştirildi. Klonlamanın doğruluğu dizi analizi ile teyit edildi. Klonlanan MIR100HG promotor parçaları transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak amacıyla büyük ölçekte üretildi ve izole edildi.

Dördüncü olarak MIR100HG geninin, normoksik ortamdaki bazal aktivitesi ve hipoksik ortamdaki transkripsiyonel regülasyonunu belirleme çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla MIR100HG promotor konstraklarının (P1-P2-P3-P4-P5), Hep3B hücrelerine kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemi kullanılarak geçici transfeksiyonu yapıldı. Ardından 48 ve 72. Saat medyumları toplanarak Luc/SEAP aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilerek MIR100HG geninin normoksik bazal aktivitesi belirlendi. P2: [-815/+231] (1046 bp) konstrağının en yüksek bazal aktiviteye, P5: [-188/+231] (419 bp) konstrağının ise en düşük bazal aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Hep3B hücrelerinde 300 µM CoCl₂ uygulaması yapılarak hipoksik durum oluşturuldu. 48 ve 72. Saatlerde medyumlar toplanarak Luc/SEAP aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilerek hipoksik ortamda transkripsiyonel regülasyon belirlendi. Hipoksi durumdaki MIR100HG transkripsiyonel regülasyonunun P1:[1013/+231] (1244 bp), P2: [-815/+231] (1046 bp) ve P4: [-397/+231] (628 bp) promotor parçalarında arttığı ve en yüksek aktiviteye P2: [-815/+231] (1046 bp) promotor parçasının, en düşük aktiviteye ise P5: [-188/+231] (419 bp) promotor parçasının sahip olduğu belirlendi. Bu tez çalışması ile MIR100HG geni promotorunun hipoksik transkripsiyonel regülasyonu ilk kez belirlenmiştir.

Beşinci olarak hipoksik koşullarda MIR100HG geninin DNA-Protein etkileşimlerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaca göre ilk olarak MIR100HG promotorunda olası Hipoksik Yanıt Elementi (HRE) bağlanma bölgelerinin biyoinformatik analizi PROMO/ALGGEN programı kullanılarak gerçekleştirildi. MIR100HG geninin 1300 bp'lik promotoru üzerinde dört olası HRE bölgesi tespit edildi. ChIP primerleri tasarlanırken HRE bölgelerini içermesine dikkat edilerek altı farklı ileri ve geri ChIP primeri dizayn edildi. Buna göre ChIP3, ChIP4, ChIP5 ve ChIP6 primerleri olası HRE bağlanma bölgelerini içermekteydi. 300 µM hipoksi uygulanan Hep3B hücrelerinde yapılan ChIP deneyi sonucunda, MIR100HG promotor parçalarının her birinde HIF-1α antikoruyla immunopresipitasyon gözlemlendi. Bu çökeltmenin, CoCl₂ uygulamasıyla özellikle ChIP3 ve ChIP5 promotor bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, HRE bağlanma bölgelerinin MIR100HG promotorunda ChIP3 ve ChIP5'te olabileceğini göstermiştir.

Daha önce Bevilacqua ve arkadaşları (2015) yaptıkları bir çalışmada nöronlara spesifik bir transkripsiyon faktörünün Neuronal Activators Early Growth Response-2 (EGR-2)'nin MIR100HG promotoruna bağlandığını ChIP deneyi ile göstermişlerdir. Sonrasında, 2018 yılında Ottaivani ve arkadaşları, TGF-β indüklenmiş MIR100HG'nin pankreas kanseri hücrelerinde upregüle olduğunu, TGF-β uyarılması durumunda SMAD2 ve 3'ün MIR100HG promotoruna direkt olarak bağlandığını ve MIR100HG RNA'sını arttırdığını ChIP deneyi ile göstermişlerdir. Aynı zamanda osteosarkom üzerinde yapılan ChIP deneyi ile ELK-1 transkripsiyon faktörünün MIR100HG promotoruna bağlandığı gösterilmiştir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen hipoksik durumda, MIR100HG promotoruna HRE bağlanma bölgelerinin ChIP deneyi ile belirlenmesi ilk kez literatüre kazandırılmıştır.

Son olarak, MIR100HG geninin Clone-9 hücrelerinde hücresel etkilerinin belirlenmesi için susturma ve overekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Literatürde Hepatosellüler karsinomda MIR100HG'nin hücreler üzerindeki etkilerini aydınlatmak için gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur ancak çok sınırlıdır (MTT, Scratch ve İnvazyon testleri). Bu tez çalışmasında hücreler üzerindeki fonksiyonel analizler Real-Time PCR, MTT, Scratch, Koloni formasyon ve Matrijel deneyleri ile daha detaylı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca susturmanın doğrulanması için overekspresyon deneyleri yapılmıştır. Tüm deneyler hem normoksi hem de ilk kez hipoksi şartlarda gerçekleştirilerek daha kapsamlı bir hücresel etki belirleme çalışması gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak MIR100HG genini hedef alan shRNA oligoları pLKO.1-TRC vektörüne klonlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan pLKO.1-SCR ve pLKO.1-TRC vektöründeki MIR100HG shRNA oligoları, Clone-9 hücrelerine kalıcı transfeksiyon ile aktarılmıştır ve kalıcı olarak MIR100HG geni susturulmuş Clone-9 shRNA kolonisi Real-Time PCR ile mRNA düzeyinde analiz edilerek M4 5. Koloni olarak belirlenmiştir. Tüm susturma deneyleri hem normoksi hem de hipoksi ortamda gerçekleştirilmiştir. Clone-9 hücre hattındaki MIR100HG geninin susturulmasının hücrelerin canlılığına etkisi MTT testi ile, göç etme yeteneğindeki etkisi Çizik testi ile, Koloni oluşturma yeteneğine etkisi Koloni-Formasyon testi ile ve migrasyon-invazyon kabiliyetine etkisi Matrijel testi ile normoksik ve hipoksik şartlarda araştırılmıştır.

Deneysel sonuçunda;

- 1) Real-Time PCR ile elde edilen sonuçlara göre, mRNA düzeyinde Clone-9 hücre hattında kontrol olarak kullanılan pLKO.1-SCR'ye göre, deney grubu olarak seçilen M4 sh-RNA-5. Koloni için normokside ve hipokside istatistiki olarak anlamlı olan azalmalar belirlenmiştir. Bu iki sonuçta susturmanın gerçekleştiğini kanıtlamıştır.
- 2) MTT testinden elde edilen verilere göre, normoksi ve hipoksi şartlarda kontrolde olan artışa kıyasla, MIR100HG ifadesinin baskılandığı M4 5. Kolonide istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilerek susturmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulanmıştır.
- 3) Koloni formasyon testinden elde edilen sonuçlara göre, Clone-9 hücrelerindeki susturma kolonisinin kontrole göre sayısı yaklaşık %50 kadar istatistiki olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edilerek susturma doğrulanmıştır. Hipoksik koşullarda

ise normoksik koşullara benzer şekilde bir azalma grlmştir ve sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

- 4) izik testinden elde edilen verilere göre, normoksi koşullarda yapılan deneyde; susturma sonrası hücrelerin kontrol grubuna kıyasla, deney grubunda daha yavaş bir şekilde kapandığı gözlenmiştir. Hipoksi koşullarında ise, normoksi koşullara benzer ancak daha yavaş bir şekilde kapanmanın gerçekleştiği belirlenmiştir.
- 5) Matrijel testinden elde edilen verilere göre, susturulan MIR100HG genine ait kuyularda, kontrol grubuyla kıyaslandığında hem normoksi hem de hipoksi şartlarda neredeyse tamamen susturmanın gerçekleştirildiği ve istatistiksel olarak sonuçların anlamlı olduğu görülmektedir.

İkinci olarak MIR100HG aşırı ifade çalışmaları gerçekleştirilerek moleküler ve hücrenel düzeyde karakterizasyon yapıldı. Bu amaca uygun olarak pcDNA3.1 boş vektör ve pcDNA3.1-MIR100HG overekspresyon vektörü Clone-9 hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktarılmıştır. Tüm overekspresyon deneyleri hem normoksi hem de hipoksi ortamda gerçekleştirilmiştir. Clone-9 hücre hattındaki MIR100HG geninin aşırı ifadesinin doğrulanması için mRNA düzeyinde Real-Time analizi, MIR100HG'nin aşırı ifadesinin Clone-9 hücrelerinin canlılığına etkisi MTT testi ile, g etme yeteneğindeki etkisi çizik testi ile, Koloni oluşturma yeteneğine etkisi Koloni-Formasyon testi ile ve migrasyon-invazyon kabiliyetine etkisi Matrijel testi ile normoksik ve hipoksik şartlarda araştırılmıştır.

Deneyler sonucunda;

- 1) Real-Time PCR ile elde edilen sonuçlara göre, mRNA düzeyinde Clone-9 hücre hattında kontrol olarak kullanılan pcDNA3.1 Boş vektör overekspre edilmiş hücrelere kıyasla, deney grubu olarak pcDNA3.1-MIR100HG vektörü overekspre edilen hücrelerde normokside yaklaşık 20 kat ve hipokside yaklaşık 9 kat istatistiki olarak anlamlı olan artış belirlenmiştir. Bu iki sonuçta MIR100HG aşırı ifadesinin gerçekleştiğini kanıtlamıştır.
- 2) MTT testinden elde edilen verilere göre, normoksik koşullarda hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre, tüm saatlerde beklendiği şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda da aynı deney dizaynı aynı saat dilimlerinde yapılmış olup, sonuçlar normoksi ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Buna göre hipoksizde de her saat diliminde kontrol grubuna göre, aşırı ifade durumunun hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmektedir.

- 3) Koloni formasyon testinden elde edilen sonuçlara göre, Clone-9 hücrelerindeki kontrol grubuna kıyasla, normoksik koşullarda yapılan overekspresyon sonrası hücre sayısının arttığı hem fotoğraflamada hem de analizde görülmektedir. Bu artış kontrol grubuna göre 3 kat artış göstermiş ve 200 hücreden 600 hücreye çıkmıştır. Buradan MIR100HG'nin aşırı ifadesinin hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini anlamlı ölçüde arttırmış olduğu görülmektedir. Hipoksik koşullardaki koloni formasyon sonucunda ise, kontrol grubuna göre 3 kat artış olduğu gözlenmiştir.
- 4) Çizik testinden elde edilen verilere göre, normoksi koşullarda yapılan deneyde; overekspresyon sonrası hücrelerin kontrol grubuna kıyasla, deney grubunda daha hızlı bir kapanma gözlenmiştir. Hipoksi koşullarında ise, normoksi koşullara benzer ancak daha yavaş bir kapanma gerçekleştiği belirlenmiştir.
- 5) Matrijel testinden elde edilen verilere göre, MIR100HG aşırı ifade durumu Clone-9 hücre hattında MIR100HG geninin ifadesini arttırmıştır. Overekspre edilen MIR100HG genine ait kuyularda, kontrol grubuyla kıyaslandığında overekspresyonun gerçekleştirildiği kuyularda göç eden hücre sayısı normoksizde 1000 hücreden 2000'e, hipoksizde yaklaşık 1000'den 1500'e çıkmıştır ve istatistiksel olarak sonuçların anlamlı olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında MIR100HG ifadesinin en çok Hep3B hücrelerinde ekspre edildiği, SNU-398, Clone-9, Huh-7 ve SNU-475'inde bu ekspresyon düzeyini takip ettiği belirlendi. Kimyasal hipoksik model oluşumu için gereken CoCl₂ miktarının 300 uM olduğu MTT testleri ile belirlendi ve Real-Time analizleri ile doğrulandı. Protein seviyesinde hipoksik model oluşumunun doğrulanması Western-blot, IFC ve EMSA deneyleri ile gerçekleştirildi. MIR100HG promotorunun transkripsiyonel regülasyonunu belirleme çalışmaları için promotor konstraktlarından -1013/+231 ve -387/+231 parçalarının önce pGEM-T Easy vektöre PCR tabanlı, ardından pMetLuc haberci vektör sistemine alt klonlaması yapıldı. Sanger dizileme ile klonlamalar doğrulandı. Klonlanan promotor parçaları ile Hep3B hücrelerinde gerçekleştirilen transfeksiyon analizleri ile MIR100HG geninin, normoksik bazal aktivite ve hipoksik durumdaki MIR100HG transkripsiyonel regülasyonu belirlendi. hipoksik koşullarda, MIR100HG promotorunda Hipoksik Yanıt Elementi (HRE) bağlanma bölgeleri CHIP deneyi ile belirlendi. Son olarak; Clone-9 hücrelerindeki MIR100HG ifadesinin baskılanmasının hücre proliferasyonunu, migrasyon-

invazyonunu, koloni oluşumunu ve g yeteneğini azalttığı belirlendi. Ayrıca Clone-9 hücrelerinde MIR100HG aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu, migrasyon-invazyonunu, koloni oluşumunu ve g yeteneğini arttırdığı tespit edildi.

Sonuç olarak; yapılan tüm bu çalışmalar neticesinde, yeni keşfedilen ve önemli bir uzun kodlanmayan RNA olan MIR100HG geninin hepatosellüler kanserde sünger işlevi gördüğü, hepatosellüler kanser için MIR100HG genini hedef alan tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine bu tez ile katkı sağlanacağı düşülmektedir.

6. KAYNAKLAR (IEEE)

- [1] B. C. Fuchs *et al.*, “Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 59, no. 4, pp. 1577–1590, 2014, doi: 10.1002/hep.26898.
- [2] D. Q. Huang, P. Mathurin, H. Cortez-Pinto, and R. Loomba, “Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 20, no. 1, pp. 37–49, 2023, doi: 10.1038/s41575-022-00688-6.
- [3] A. Villanueva, “Hepatocellular carcinoma,” *Cancer Treat. Res.*, vol. 98, pp. 83–109, 2019, doi: 10.1007/978-1-4615-4977-2_4.
- [4] A. J. Craig, J. von Felden, T. Garcia-Lezana, S. Sarcognato, and A. Villanueva, “Tumour evolution in hepatocellular carcinoma,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 17, no. 3, pp. 139–152, 2020, doi: 10.1038/s41575-019-0229-4.
- [5] A. Ally *et al.*, “Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma,” *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1327–1341.e23, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.046.
- [6] J. Cai, M. Hu, Z. Chen, and Z. Ling, “The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis,” *J. Transl. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1186/s12967-021-02854-x.
- [7] B. Özdemir, “Combinatory Effects of Berberine and Sorafenib Treatment on Hepatocellular Carcinoma Cell Line, Hep3B,” 2020.
- [8] Y. Gao, L. Lyu, Y. Feng, F. Li, and Y. Hu, “A review of cutting-edge therapies for hepatocellular carcinoma (Hcc): Perspectives from patents,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 18, no. 14, pp. 3066–3081, 2021, doi: 10.7150/ijms.59930.
- [9] Y. Huang, C. Zhang, and Y. Zhou, “LncRNA MIR100HG promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma through the downregulation of miR-204-5p,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 12, pp. 2967–2973, 2019, doi: 10.2147/OTT.S202528.
- [10] S. Chen and X. Shen, “Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01287-2.
- [11] O. M. Wilkins *et al.*, “MicroRNA-related genetic variants associated with survival of head and neck squamous cell carcinoma Owen,” pp. 1–20, 2020, doi: 10.1158/1055-

- 9965.EPI-18-0002.MicroRNA-related.
- [12] Ö. Tüncel, M. Kara, B. Yaylak, İ. Erdoğan, and B. Akgül, “Noncoding RNAs in apoptosis: identification and function,” *Turkish J. Biol.*, vol. 46, no. 1, pp. 1–40, 2022, doi: 10.3906/biy-2109-35.
- [13] H. Choudhry, A. L. Harris, and A. McIntyre, “The tumour hypoxia induced non-coding transcriptome,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 47–48, pp. 35–53, 2016, doi: 10.1016/j.mam.2016.01.003.
- [14] D. Han, M. Wang, N. Ma, Y. Xu, Y. Jiang, and X. Gao, “Long noncoding RNAs: Novel players in colorectal cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 361, no. 1, pp. 13–21, 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.002.
- [15] S. Nandagopal *et al.*, “Long Non Coding RNA in Triple Negative Breast Cancer: A Promising Biomarker in Tumorigenesis,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 24, no. 1, pp. 49–59, 2023, doi: 10.31557/APJCP.2023.24.1.49.
- [16] R. Verdikt and B. Thienpont, “Epigenetic remodelling under hypoxia,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 98, no. August 2023, pp. 1–10, 2024, doi: 10.1016/j.semcancer.2023.10.005.
- [17] Y. Lu *et al.*, “lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/ β -catenin signaling,” vol. 23, no. 11, pp. 1331–1341, 2018, doi: 10.1038/nm.4424.lncRNA.
- [18] J. Wang *et al.*, “Chromobox proteins in cancer: Multifaceted functions and strategies for modulation (Review),” *Int. J. Oncol.*, vol. 62, no. 3, pp. 1–25, 2023, doi: 10.3892/ijo.2023.5484.
- [19] S. Wang *et al.*, “LncRNA MIR100HG promotes cell proliferation in triple-negative breast cancer through triplex formation with p27 loci,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 8, 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0869-2.
- [20] M. F. Lopez *et al.*, “Opposing activities of oncogenic MIR17HG and tumor suppressive MIR100HG clusters and their gene targets regulate replicative senescence in human adult stem cells,” *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41514-017-0006-y.
- [21] M. Bagheri, M. Sharifi, and M. Salehi, “The Effect of Inhibition of Lncrna Mir100Hg on the Proliferation of Human Promyelocytic Leukemia Cells,” *Int. J. Life Sci. Pharma Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 11–20, 2019, doi: 10.22376/ijpbs/lpr.2019.9.3.111-21.
- [22] J. Eniafe and S. Jiang, “MicroRNA-99 family in cancer and immunity,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 12, no. 3, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1002/wrna.1635.

- [23] D. He *et al.*, “miRNA-independent function of long noncoding pri-miRNA loci,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, no. 13, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1073/pnas.2017562118.
- [24] S. Ghafouri-Fard, A. Harsij, H. Farahzadi, B. M. Hussien, M. Taheri, and M. Mokhtari, “A concise review on the role of MIR100HG in human disorders,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 27, no. 16, pp. 2278–2289, 2023, doi: 10.1111/jcmm.17875.
- [25] D. Chen *et al.*, “miR-100 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition but Suppresses Tumorigenesis, Migration and Invasion,” *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 2, 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004177.
- [26] P. Bagheri, M. Sharifi, and A. Ghadiri, “Downregulation of MIR100HG Induces Apoptosis in Human Megakaryoblastic Leukemia Cells,” *Indian J. Hematol. Blood Transfus.*, vol. 37, no. 2, pp. 232–239, 2021, doi: 10.1007/s12288-020-01324-6.
- [27] Y. Wu, Z. Wang, S. Yu, D. Liu, and L. Sun, “LncmiRHG-MIR100HG: A new budding star in cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 12, no. September, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.997532.
- [28] X. Xu, Z. Dang, J. Zhang, Y. Feng, and Z. Wei, “The miRNA, MiR-125b, inhibited invasion and metastasis of gastric-cancer cells by triggering the stat3 signaling pathway,” *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, pp. 8569–8580, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S259513.
- [29] A. M. Dabbish *et al.*, “Prognostic MicroRNA Panel for HCV-Associated HCC: Integrating Computational Biology and Clinical Validation,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 13, pp. 1–41, 2022, doi: 10.3390/cancers14133036.
- [30] S. Emmrich, A. Streltsov, F. Schmidt, V. R. Thangapandi, D. Reinhardt, and J. H. Klusmann, “LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia,” *Mol. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1186/1476-4598-13-171.
- [31] V. Bevilacqua *et al.*, “Identification of linc-NeD125, a novel long non coding RNA that hosts miR-125b-1 and negatively controls proliferation of human neuroblastoma cells,” *RNA Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1323–1337, 2015, doi: 10.1080/15476286.2015.1096488.
- [32] C. Shang *et al.*, “Characterization of long non-coding RNA expression profiles in lymph node metastasis of early-stage cervical cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 6, pp. 3185–3197, 2016, doi: 10.3892/or.2016.4715.
- [33] P. Laneve *et al.*, “The long noncoding RNA linc-NeD125 controls the expression of

- medulloblastoma driver genes by microRNA sponge activity,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 19, pp. 31003–31015, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16049.
- [34] Y. Geng *et al.*, “CircHIF1A induces cetuximab resistance in colorectal cancer by promoting HIF1 α - mediated glycometabolism alteration,” pp. 1–15, 2024.
- [35] S. Ottaviani *et al.*, “TGF- β induces miR-100 and miR-125b but blocks let-7a through LIN28B controlling PDAC progression,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03962-x.
- [36] Q. Sun *et al.*, “MIR100 host gene-encoded lncRNAs regulate cell cycle by modulating the interaction between HuR and its target mRNAs,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 19, pp. 10405–10416, 2018, doi: 10.1093/nar/gky696.
- [37] B. Goswami, D. Ahuja, D. Pastré, and P. S. Ray, “p53 and HuR combinatorially control the biphasic dynamics of microRNA-125b in response to genotoxic stress,” *Commun. Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–17, 2023, doi: 10.1038/s42003-023-04507-9.
- [38] J. Peng *et al.*, “Construction and analysis of lncRNA-associated ceRNA network identified potential prognostic biomarker in gastric cancer,” *Transl. Cancer Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 1116–1128, 2019, doi: 10.21037/tcr.2019.06.32.
- [39] F. Y. Chen, Z. Y. Zhou, K. J. Zhang, J. Pang, and S. M. Wang, “Long non-coding RNA MIR100HG promotes the migration, invasion and proliferation of triple-negative breast cancer cells by targeting the miR-5590-3p/OTX1 axis,” *Cancer Cell Int.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1186/s12935-020-01580-6.
- [40] J. Li, Q. Xu, W. Wang, and S. Sun, “MiR100HG: A credible prognostic biomarker and an oncogenic lncRNA in gastric cancer,” *Biosci. Rep.*, vol. 29, no. 4, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1042/BSR20190171.
- [41] Y. Li, D. Ma, T. Li, and Y. Yin, “Identification of functional long non-coding RNAs in gastric cancer by bioinformatics analysis,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 101, no. 3–4, pp. 96–105, 2020, doi: 10.1111/iep.12350.
- [42] W. Li, F. Yuan, X. Zhang, W. Chen, X. Tang, and L. Lu, “Elevated MIR100HG promotes colorectal cancer metastasis and is associated with poor prognosis,” *Oncol. Lett.*, vol. 18, no. 6, pp. 6483–6490, 2019, doi: 10.3892/ol.2019.11060.
- [43] X. Su *et al.*, “ELK1-induced upregulation of long non-coding RNA MIR100HG predicts poor prognosis and promotes the progression of osteosarcoma by epigenetically silencing LATS1 and LATS2,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, no. October 2018, pp. 788–797, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.029.
- [44] M. Wang, T. Xu, W. Feng, J. Liu, and Z. Wang, “Advances in understanding the

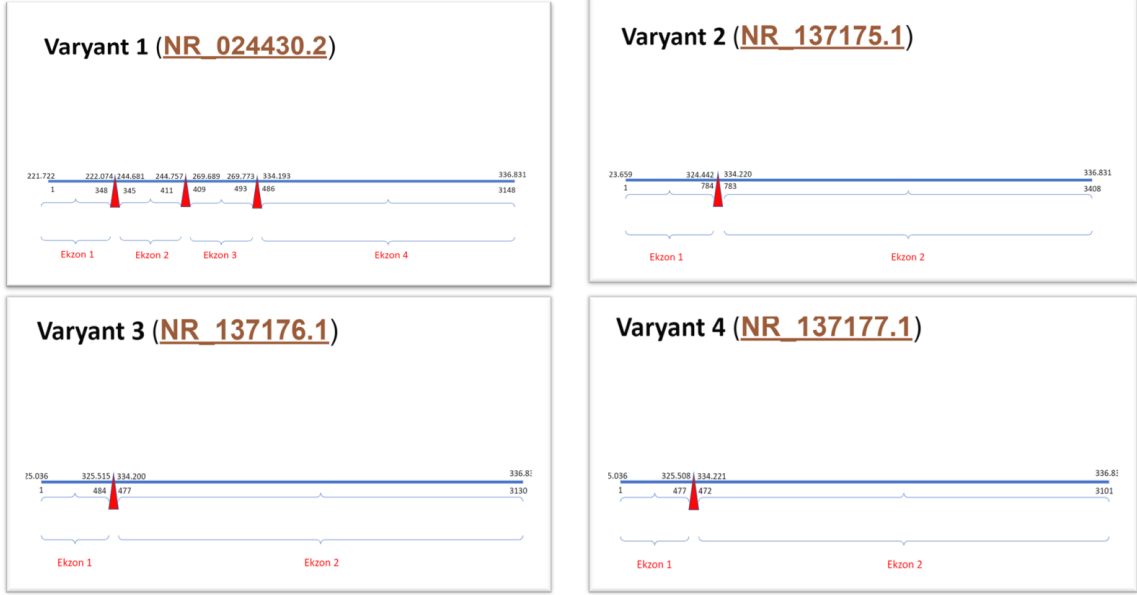
- lncRNA-mediated regulation of the hippo pathway in cancer,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 14, pp. 2397–2415, 2021, doi: 10.2147/OTT.S283157.
- [45] S. Zhang, Q. Wang, W. Li, and J. Chen, “MIR100HG Regulates CALD1 Gene Expression by Targeting miR-142-5p to Affect the Progression of Bladder Cancer Cells in vitro, as Revealed by Transcriptome Sequencing,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, no. January, pp. 1–21, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2021.793493.
- [46] P. Li *et al.*, “CXXC finger protein 4 inhibits the CDK18-ERK1/2 axis to suppress the immune escape of gastric cancer cells with involvement of ELK1/MIR100HG pathway,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 17, pp. 10151–10165, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15625.
- [47] P. Papoutsoglou *et al.*, “The noncoding MIR100HG RNA enhances the autocrine function of transforming growth factor β signaling,” *Oncogene*, vol. 40, no. 21, pp. 3748–3765, 2021, doi: 10.1038/s41388-021-01803-8.
- [48] S. Zhu *et al.*, “CTCF-Induced lncRNA C5orf66-AS1 Facilitates the Progression of Triple-Negative Breast Cancer via Sponging miR-149-5p to Up-Regulate CTCF and CTNNB1 to Activate Wnt/ β -Catenin Pathway,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 42, no. 6, pp. 1–14, 2022, doi: 10.1128/mcb.00188-21.
- [49] M. Wang *et al.*, “Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 12, 2018, doi: 10.1038/s41419-018-1187-4.
- [50] H. Liu *et al.*, “Interaction of lncRNA MIR100HG with hnRNPA2B1 facilitates m6A-dependent stabilization of TCF7L2 mRNA and colorectal cancer progression,” *Mol. Cancer*, vol. 21, no. 1, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1186/s12943-022-01555-3.
- [51] G. M. Carbone, E. M. McGuffie, A. Collier, and C. V. Catapano, “Selective inhibition of transcription of the Ets2 gene in prostate cancer cells by a triplex-forming oligonucleotide,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 3, pp. 833–843, 2003, doi: 10.1093/nar/gkg198.
- [52] U. Y. Sabitaliyevich, S. B. Nurmurzayevich, A. Yelekenova, and I. Yaylim, “Interplay of long non-coding RNAs and TGF/SMAD signaling in different cancers,” *Cell. Mol. Biol. Res.*, vol. 41, no. 3, pp. 207–216, 2018.
- [53] G. Manfioletti and M. Fedele, “Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT),” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 14, pp. 1–5, 2023, doi: 10.3390/ijms241411386.
- [54] F. Corrà, C. Agnoletto, L. Minotti, F. Baldassari, and S. Volinia, “The network of non-coding RNAs in cancer drug resistance,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. AUG, pp. 1–

- 25, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00327.
- [55] A. R. Farina, L. Cappabianca, M. Sebastiano, V. Zelli, S. Guadagni, and A. R. Mackay, “Hypoxia-induced alternative splicing: The 11th Hallmark of Cancer,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1186/s13046-020-01616-9.
- [56] X. Jing *et al.*, “Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment,” *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1089-9.
- [57] Q. Wu *et al.*, “Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01292-6.
- [58] N. Şahin Calapoğlu, “Hipoksiye Karşı Hücreyel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 Regulator of Cellular Response to Hypoxia,” *Smyrna Tıp Derg.*, pp. 48–53, 2016.
- [59] X. Guo and G. Chen, “Hypoxia-Inducible Factor Is Critical for Pathogenesis and Regulation of Immune Cell Functions in Rheumatoid Arthritis,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–6, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01668.
- [60] S. Natua, C. Ashok, and S. Shukla, “Hypoxia-induced alternative splicing in human diseases: the pledge, the turn, and the prestige,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, no. 6, pp. 2729–2747, 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03727-0.
- [61] R. S. Zhou *et al.*, “Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5983-8.
- [62] J. Muñoz-Sánchez and M. E. Chánez-Cárdenas, “The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 39, no. 4, pp. 556–570, 2019, doi: 10.1002/jat.3749.
- [63] 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,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 39, pp. 40337–40344, 2004, doi: 10.1074/jbc.M403057200.
- [64] N. J. Edinjitivty is eliminated during exposure to cycling hypoxia but returns after reoxygenation,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 88, no. 4, pp. 311–319, 2012, doi: 10.3109/09553002.2012.646046.

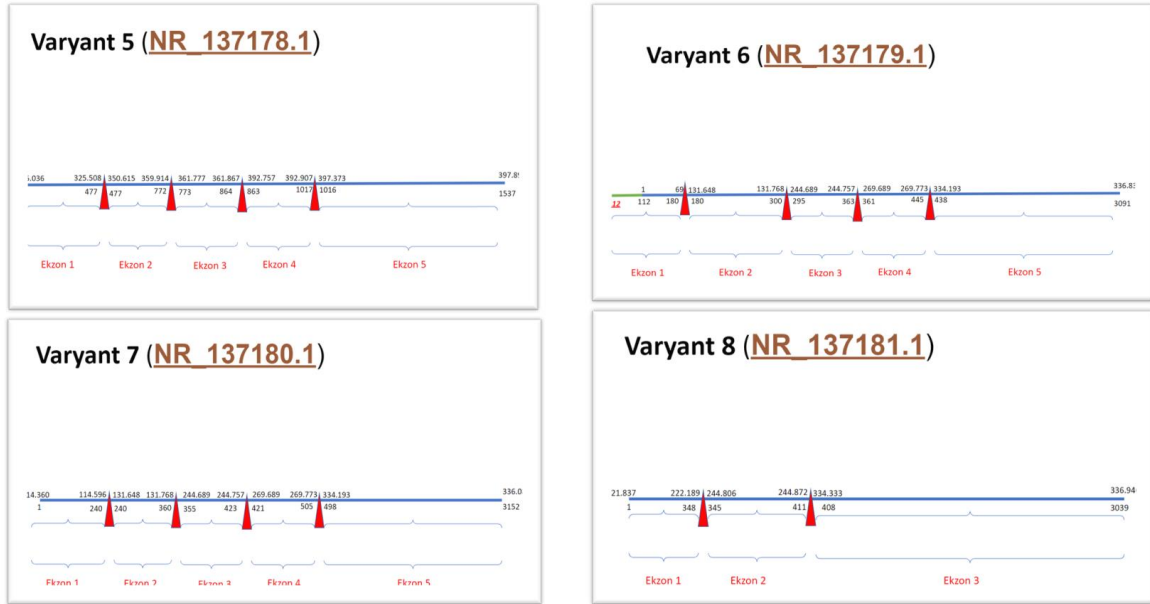
EKLER

EKLER

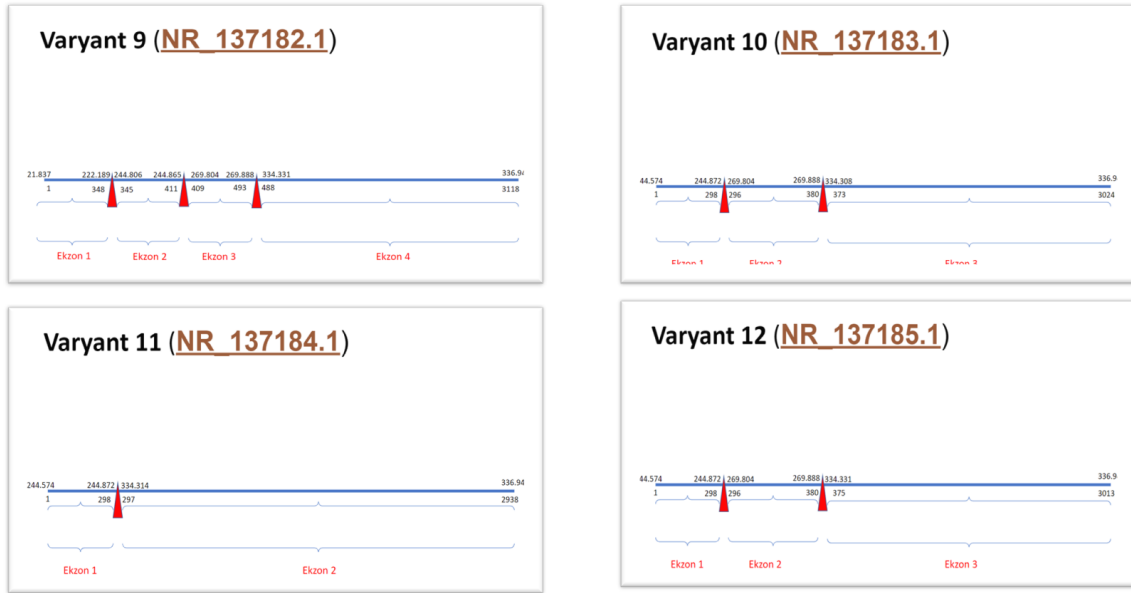
EK A: MIR100HG Geni Varyant Analizleri.



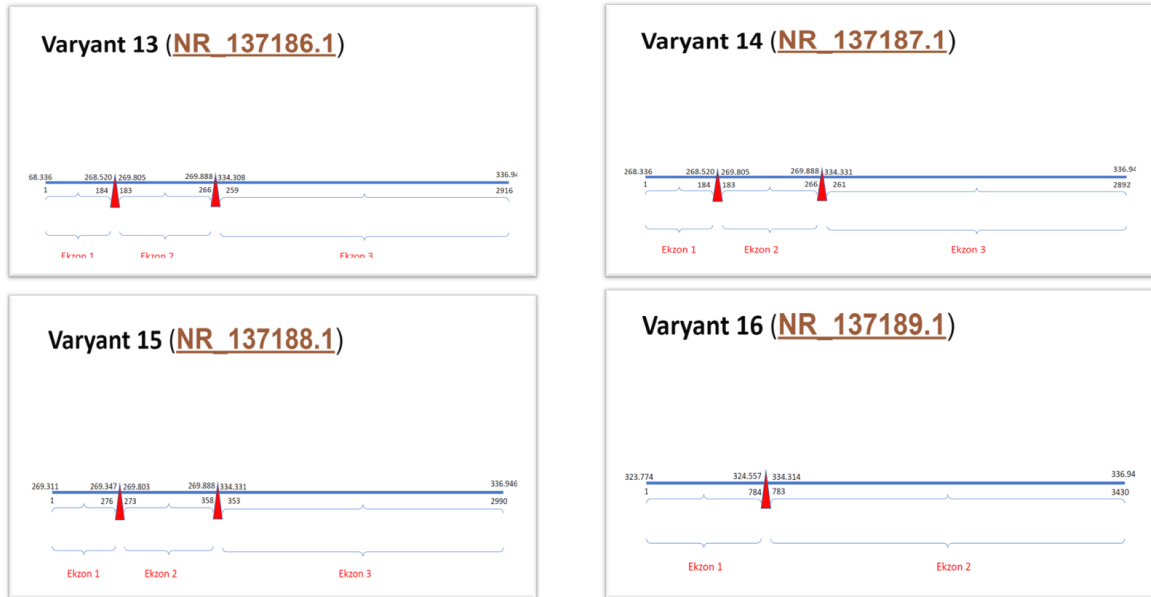
Şekil A.1: MIR100HG Varyant 1-4 şematik gösterimi.



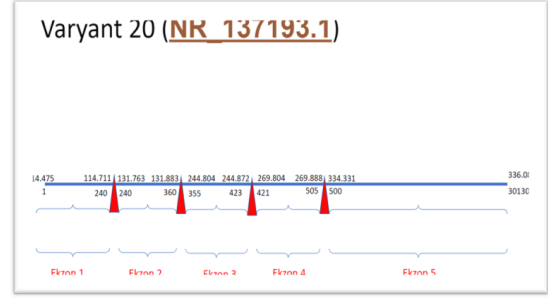
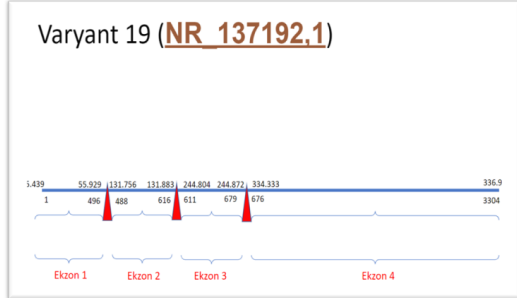
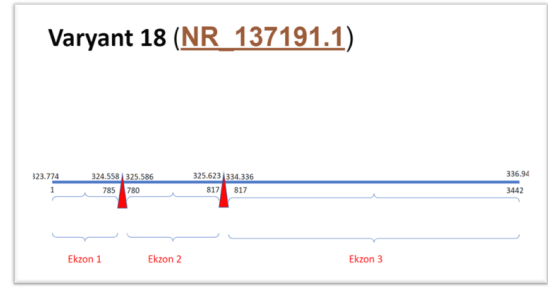
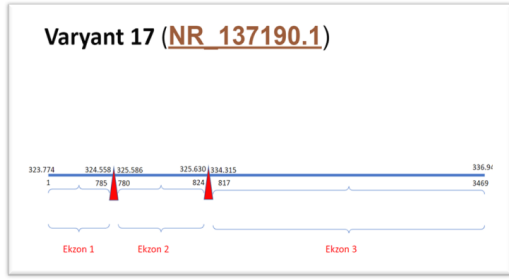
Şekil A.2: MIR100HG Varyant 5-8 şematik gösterimi.



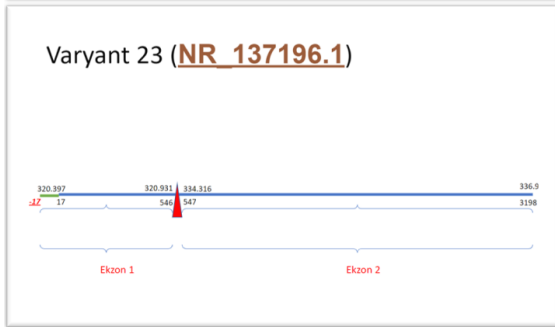
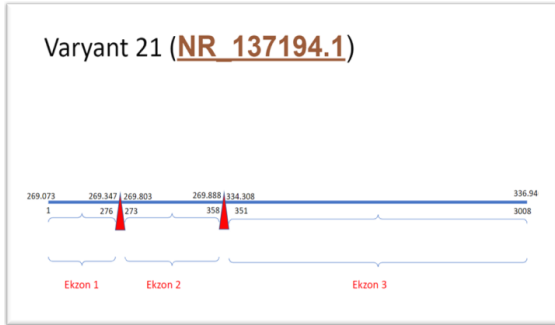
Şekil A.3: MIR100HG Varyant 9-12 şematik gösterimi.



Şekil A.4: MIR100HG Varyant 13-16 şematik gösterimi.



Şekil A.5: MIR100HG Varyant 17-20 şematik gösterimi.



Şekil A.6: MIR100HG Varyant 21-23 şematik gösterimi.

EK B: Ekspresyon Primerlerinin Tasarlanması.

Transcripts									
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 1, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3129	NR_024430.2
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 8, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3026	NR_137181.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 9, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3108	NR_137182.1
✓	Homo sapiens chloride intracellular channel 6 (CLIC6), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	4197	NM_053277.3
✓	Homo sapiens chloride intracellular channel 6 (CLIC6), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	4251	NM_001317003.2
✓	Homo sapiens shisa family member 9 (SHISA9), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	6749	NM_001145204.3
✓	PREDICTED: Homo sapiens shisa family member 9 (SHISA9), transcript variant X1, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	3766	XM_005255539.3
✓	Homo sapiens synaptotagmin 17 (SYT17), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	2977	NM_001330909.2
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	7449	NM_001136021.3
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 8, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	6917	NM_001258292.2
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 7, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	7005	NM_001258296.2
✓	Homo sapiens lysM domain containing 1 (LYSMD1), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	1794	NM_001136543.2
✓	Homo sapiens synaptotagmin 17 (SYT17), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	2946	NM_001308157.2
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 4, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	7361	NM_001258292.2
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	7431	NM_173091.4
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 5, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	6935	NM_001258294.2
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 6, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	6847	NM_001258295.2
✓	Homo sapiens synaptotagmin 17 (SYT17), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	3088	NM_016524.4
✓	Homo sapiens lysM domain containing 1 (LYSMD1), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	2462	NM_212551.5
✓	Homo sapiens RAB GTPase activating protein 1 (BARGAP1), mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	4986	NM_012197.4
✓	Homo sapiens nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	7519	NM_012340.5
✓	PREDICTED: Homo sapiens RAB GTPase activating protein 1 (BARGAP1), transcript variant X12, mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	2973	XM_024447477.1

Şekil B.1: MIR100HG Forward Ekspresyon Primerinin BLAST Analizi.

Transcripts									
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 20, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3120	NR_137193.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 11, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	2935	NR_137184.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 10, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3141	NR_137180.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 1, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3129	NR_024430.2
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 12, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	2996	NR_137185.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 19, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3017	NR_137183.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 4, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3293	NR_137192.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 5, long non-co...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3026	NR_137181.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 9, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3108	NR_137182.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 6, long non-cod...	Homo sapiens	40.1	40.1	100%	0.010	100.00%	3083	NR_137179.1
✓	PREDICTED: Homo sapiens coiled-coil domain containing 144A (CCDC144A), transcript variant X1, mRNA	Homo sapiens	34.2	34.2	85%	0.59	100.00%	5183	XM_024451045.1
✓	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 32 pseudogene 3 (USP32P3), non-coding RNA	Homo sapiens	34.2	34.2	85%	0.59	100.00%	4456	NR_146076.1
✓	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 32 pseudogene 1 (USP32P1), non-coding RNA	Homo sapiens	34.2	34.2	85%	0.59	100.00%	3901	NR_003190.2
✓	Homo sapiens solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2), transcript variant 3, non-coding RNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	6940	NR_046207.2
✓	Homo sapiens solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	6826	NM_001256461.2
✓	Homo sapiens solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	6874	NM_001046.3
✓	PREDICTED: Homo sapiens solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2), transcript variant X2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	5936	XM_011543588.2
✓	PREDICTED: Homo sapiens solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2), transcript variant X3, misc_RNA	Homo sapiens	30.2	30.2	75%	9.2	100.00%	6909	XR_00742214.1
✓	Homo sapiens G protein-coupled receptor 107 (GPR107), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	28.2	54.5	70%	36	100.00%	6786	NM_001136558.2
✓	Homo sapiens G protein-coupled receptor 107 (GPR107), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	28.2	54.5	70%	36	100.00%	6729	NM_020950.5
✓	Homo sapiens G protein-coupled receptor 107 (GPR107), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	28.2	54.5	70%	36	100.00%	6873	NM_001136557.2
✓	Homo sapiens apocynin like 2 (PODXL2), mRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	2175	NM_015720.4
✓	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105371468 (LOC105371468), ncRNA	Homo sapiens	28.2	28.2	70%	36	100.00%	1736	XR_022203.2

Şekil B.2: MIR100HG Reverse Ekspresyon Primerinin BLAST Analizi.

EK C: Promotor Primerlerinin Tasarlanması.

```
CGTATGTCTAGACTATGTCCTGTCTCTGGAGAAAAGTGGGAGTGACACTCACTGATCATCCTCAGTACAGGGCATT
GAGCCACACCATTAAGGAGTATTGATTGGCTCCCCCTCTGTGAGAACAGTATGCTGGGTGTGACACAGACAGAGAG
ACCCAGACCGAGTCTGCAGGAGAAAAGTGGTTCATGATGTCAAACGTGGAGGAAAACAACCAATAGGCCTAGTGGGAT
GCTCTCTATTTATCAGCACAGTTACTGGAATCCAAACAAAGAACTTTCCAGAAATGACAACCGTGTCTGCCACTG
AACTGTAGGTGAGCATGTGGTTTGTGACGTATTATTTTATTCTGCCATCATAACCAGTTGTGAGATCTTGCTTGTGA
AACTAAGTTAACTCCATTTTATGGACAAAAGAACTGAGGTGAGAGTAGTTAATTGAGCATAAAAATAAGTAGCAGAG
ATAGGTATCGAGTCTAGATCTGTTGAAGCCTAGAGCTTGTTTTGGCACGTATATTGTCTCATTGACTCTTCCAGC
AGTCCTGGCAAGGGAGTCTTAATTTTCCAGCAAACAAATCTCAGACCAATTTCCACTGGACTCTATTAACCTCCAC
TACCTTTCTGATGTTGGTGGCAGCTCTATACTGAACCATAACGTGAAGATTGAACTTGAATAAAAATAATAAAGCTC
CATTTGTTAAAACACAGCTACTTTCATGAGCTGTCTCTCCATAAGCAACATAGACTACTACAGTAATAAAGATTAA
AAAACAAAACAATAATAACCGTAAGCAAAGAAGCTGTATGACACTCAAATGAGGAGGAGGAGGAGGATGACA
GTGATATCTGCCAGGTGGGTTAGTATAAATGAGACCGTGTTCCTCTGGAGAAAAGATACTATTTGGACATACAGTC
TGTTTTCACTAAGGTGGGGAGCAGTATGTGTCCAGAGCTCTAGAGGGACCGAAAGGCCAAGTGTCCACGGTGGCAA
GAGAATCCAGGAGACTGGACCATCAAGTCTTTTACTCAGAGACTGGAGACCACGCTTACCTCTCGAACAGCCCT
GTGTGAACCTCCGACTTTATGATACGTTGTGATTGTGATACAGGACTTCCCATGCAGCGCGTAAGCCATGCAGGCT
TATTACTCACACCACACTCACCTGGACCCAGAGACCTCCAGGCCTGAGGACTGCGTCTCCCGGAAGTAATTTCCCT
GAGAAATTGCAGAGGACCTCAGTCTGCAACTCACACAGAGGCTGTTCTTCTGCGCCGGAACCGGACCCACGCCC
TCTGGGGCACATCCCTGAGTGCAGCACTCTTCTCTCGCCCTCCTCCACCCAGGCACCGTCCCAACTGGGCACTG
CCTTGCTATGCCCCACATCTCCCAAGGGGGGAGCCCGGAGGGCAGCTGGGGCTGCGGAATTTTGAAGCGCA
GAAGTTTTCTCCTCCTGTCTGTAAGTGGTTTTCACTCACTCAACTGAGAGATTTCTTTGTTGCAATGATGGGGTC
TAAGATAACACTTCTGGAGGCTGCAGGCGAGAAACACAGCTGATATCATCTTTTATTGTGTGTTGTTATTTGCCTA
GCATTATAAATTAAGGAGGAATAGTAACAAAGAGCTTGAAGACATGCACAGCTCACAGGCCCGGGTGGAGGCTGG
CGACATCAGACAGACAGAACCAGACATCTGAGGGGCAACCAGGAGGTGCGTGTGGCTGCAGAGCACACAG
```

Şekil C.1: Tasarlanan MIR100HG promotor primerleri.

Welcome to RestrictionMapper - on line restriction mapping the easy way.
Maps sites for restriction enzymes, a.k.a. restriction endonucleases, in DNA sequences. Also does virtual digestion.

Conformation	Include	Sequence Info	Menu
<input type="radio"/> Circular <input checked="" type="radio"/> Linear	Select Individual Enzymes All Enzymes AarI AasI AatI AatII AccI AccII	No non-base letters. Numbers and spaces OK. Paste Sequence Here AATTGCAGAGGACCTCAGTCCT GCAACTCACACAGAGGCTGTT TTCTGGCCGGAACCGGACCCC ACGCCCTTGGGGACATCCCT GAGTGGGAGCACTTCTCTCG CCCTCTCCACCCAGGACCG TCCCAACTGGCACTGCTTGC TATGCCACATCTCCACAAG GGGAGCCGCCGAGGGCAGCT GGGCTGCGGAATTTGGAAGC GCAGAAGTTTCTCCTGTCT CTGAACTGGTTTTCACTCACT CAACTGAGAGATTCT	<input type="button" value="Map Sites"/> <input type="button" value="Virtual Digest"/> <input type="button" value="Reset Form"/>
Sort By 1. frequency 2. overhang 3. name	All Commercial NEB only 5' overhang 3' overhang blunt Prototypes Only All Isoschizomers	Name your sequence Untitled	
Filter By Maximum Cuts: all Minimum Site Length: 5			

Şekil C.2: Restriction Mapper Programı ile uygun restriksiyon kesim enzimlerinin belirlenmesi.

Restriction Mapper Programı ile tespit edilen, vektörü kesen ancak genimizi kesmeyen enzimler aşağıda verilmiştir. Bu enzimlerden promotor klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere XhoI ve HindIII enzimleri seçilmiştir.

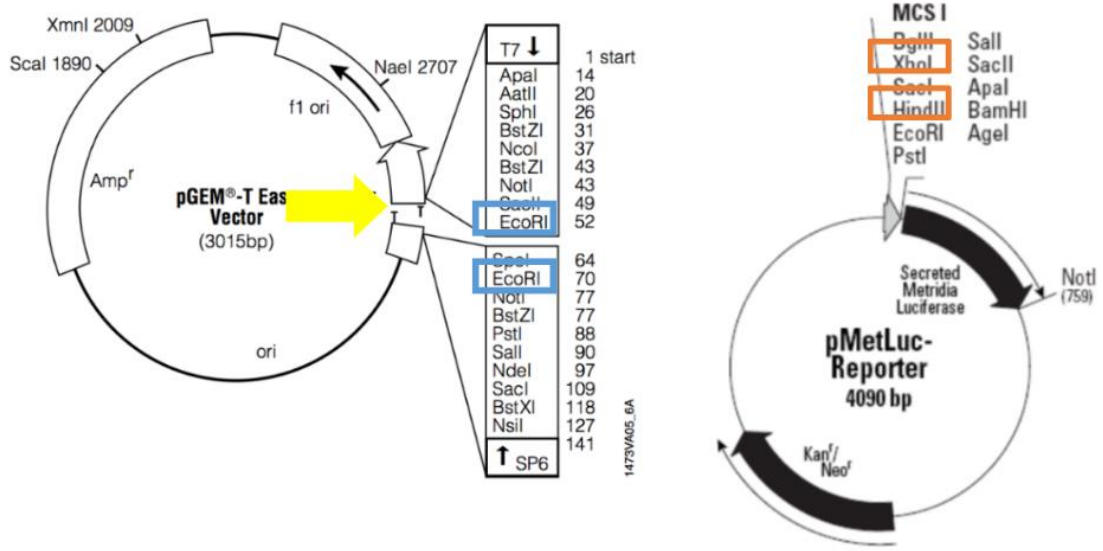
Noncutters: AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AcyI, AflII, AflIII, AgeI, AjuI, Aloi, ApaI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, AvaI, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BplI, Bpu10I, BsePI, BsgI, BsmI, Bsp1407I, BspMI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BtgZI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraIII, EciI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoRI, Fall, FauI, FseI, FspAI, HaeII, **HindIII**, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, PacI, PasI, PmaCI, PmeI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, RsrII, SacII, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StyI, SwaI, TatI, TsoI, TspGWI, TstI, VspI, XcmI, **XhoI**

Tablo C. 1: Kesen restriksiyon enzimleri ve kesme pozisyonu.

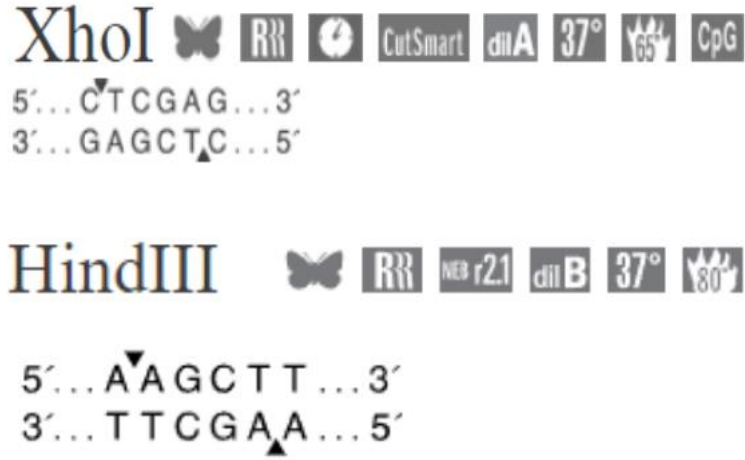
Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsaAI	YACGTR	6	blunt	1	441
BsaBI	GATNNNNATC	6	blunt	1	252
BtrI	CACGTC	6	blunt	1	296
EcoRV	GATATC	6	blunt	1	633
HindII	GTYRAC	6	blunt	1	181
HpaI	GTTAAC	6	blunt	1	181
OliI	CACNNNNGTG	6	blunt	1	715
PshAI	GACNNNNGTC	6	blunt	1	1027
PvuII	CAGCTG	6	blunt	1	1208
StuI	AGGCCT	6	blunt	1	9
XmnI	GAANNNTTC	6	blunt	1	1000
ApoI	RAATY	6	five_prime	1	1220
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	1	1208
BspHI	TCATGA	6	five_prime	1	501
CfrI	YGGCCR	6	five_prime	1	1061
DraII	RGGNCCY	6	five_prime	1	1022
EcoP15I	CAGCAG	6	five_prime	1	351
Esp3I	CGTCTC	6	five_prime	1	993
HgaI	GACGC	5	five_prime	1	975
PpuMI	RGGWCCY	7	five_prime	1	1022
SfaNI	GCATC	5	five_prime	1	8
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	1	119
Tth111I	GACNNNGTC	6	five_prime	1	985
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	1	1160
BglI	GCCNNNNGGC	6	three_prime	1	927
BstXI	CCANNNNNTGG	6	three_prime	1	794
BtsI	GCAGTG	6	three_prime	1	1155
DrdI	GACNNNNGTC	6	three_prime	1	804
Eam1105I	GACNNNNGTC	6	three_prime	1	699
HaeIV	GAYNNNNRRTC	6	three_prime	1	718
MmeI	TCCRAC	6	three_prime	1	891
NspI	RCATGY	6	three_prime	1	113
PfiMI	CCANNNNNTGG	6	three_prime	1	192
SacI	GAGCTC	6	three_prime	1	743
TauI	GCSGC	5	three_prime	1	1197
MslI	CAYNNNNRTG	6	blunt	2	599, 715
BccI	CCATC	5	five_prime	2	149, 808
BglII	AGATCT	6	five_prime	2	158, 264

Tablo C. 1 (devam)

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
PfoI	TCCNGGA	6	five_prime	2	786, 991
TfiI	GAWTC	5	five_prime	2	48, 783
XbaI	TCTAGA	6	five_prime	2	261, 743
XhoII	RGATCY	6	five_prime	2	158, 264
AgsI	TTSAA	5	three_prime	2	273, 451
AlfI	GCANNNNNNTGC	6	three_prime	2	1144, 1178
BsaXI	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	2	973, 1003
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	2	1093, 1157
PpiI	GAACNNNNNCTC	7	three_prime	2	651, 683
TaqII	GACCGA	6	three_prime	2	741, 767
TspDTI	ATGAA	5	three_prime	2	122, 490
Eco3II	GGTCTC	6	five_prime	3	654, 820, 957
FokI	GGATG	5	five_prime	3	30, 634, 1080
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	3	695, 844, 953
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	3	695, 844, 953
HphI	GGTGA	5	three_prime	3	116, 222, 942
BbvI	GCAGC	5	five_prime	4	432, 922, 1201, 1217
PleI	GAGTC	5	five_prime	4	266, 307, 346, 377
TseI	GCWGC	5	five_prime	4	420, 910, 1205, 1214
AlwNI	CAGNNNCTG	6	three_prime	4	44, 822, 976, 1050
MboII	GAAGA	5	three_prime	4	308, 456, 1047, 1105
AvaII	GGWCC	5	five_prime	5	750, 797, 956, 1022, 1072
SduI	GDGCHC	6	three_prime	5	87, 743, 1093, 1111, 1157
TspRI	CASTG	5	three_prime	5	98, 384, 633, 981, 1162
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	6	327, 638, 786, 952, 969, 1134
Hin4I	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	6	249, 281, 685, 717, 973, 1005
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	7	310, 654, 785, 813, 820, 957, 993
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	7	619, 622, 625, 628, 631, 1116, 1235
BsrI	ACTGG	5	three_prime	7	49, 149, 384, 799, 827, 1155, 1265
BseMII	CTCAG	5	three_prime	8	197, 378, 829, 968, 998, 1040, 1090, 1271



Şekil C.3: Seçilen restriksiyon enzimlerinin rotasyonlarının vektörler üzerinde gösterilmesi.



Şekil C.4: Seçilen restriksiyon enzimlerine ait tanıma dizileri.

FORWARD 6: (1535 bc) (-1189/+231)

5'-**ACTCGAGACCAATAGGCCTAGTGGGA**-3'

Genomic sequences									
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	627	96%	0.10	100.00%	135086622	NC_000011.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	734	80%	6.2	100.00%	145138636	NC_000008.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	652	100%	6.2	100.00%	156040895	NC_000023.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	579	92%	6.2	100.00%	159345673	NC_000007.14
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	1042	84%	25	94.74%	242193529	NC_000002.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	939	100%	25	100.00%	190214555	NC_000004.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 15 genomic patch of type FIX, GRCh38.p13 PATCHES HG2365_PATCH	Homo sapiens	28.2	56.5	53%	97	100.00%	5500449	NW_021180017.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	1201	100%	97	100.00%	248956422	NC_000001.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	959	88%	97	100.00%	196295559	NC_000003.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	836	80%	97	100.00%	181538259	NC_000005.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	862	80%	97	100.00%	170805979	NC_000006.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	535	84%	97	100.00%	136394717	NC_000009.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	860	96%	97	100.00%	133797422	NC_000010.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	28.2	664	92%	97	100.00%	133275309	NC_000012.12

Şekil C.5: MIR100HG Promotor Forward Primeri 6 BLAST sonucu.

Forward 6 Tm:

$$Tm = (8+4) \times 2 + (8+6) \times 4 = \underline{80 \text{ } ^\circ\text{C}}$$

FORWARD 5: (1244 bc) (-1013/+231)

5'-**ACTCGAGAAGTTAACTCCATTTTATGGAC**-3'

Genomic sequences									
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	44.1	4322	100%	0.002	100.00%	135086622	NC_000011.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	5295	93%	0.14	100.00%	196295559	NC_000003.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	2883	100%	0.55	100.00%	136394717	NC_000009.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	2976	93%	0.55	100.00%	107043718	NC_000014.9
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	1716	100%	0.55	100.00%	90338345	NC_000016.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 22, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	900	86%	0.55	100.00%	50818468	NC_000022.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4 genomic patch of type FIX, GRCh38.p13 PATCHES HG705_PATCH	Homo sapiens	34.2	34.2	58%	2.2	100.00%	276109	NW_021159995.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	6630	100%	2.2	100.00%	248956422	NC_000001.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	7365	100%	2.2	100.00%	242193529	NC_000002.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	5453	96%	2.2	100.00%	190214555	NC_000004.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	4839	96%	2.2	100.00%	181538259	NC_000005.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	3897	100%	2.2	100.00%	145138636	NC_000008.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	3139	96%	2.2	95.24%	133275309	NC_000012.12

Şekil C.6: MIR100HG Promotor Forward Primeri 5 BLAST sonucu.

Forward 5 Tm:

$$Tm = (9+9) \times 2 + (5+6) \times 4 = \underline{80 \text{ } ^\circ\text{C}}$$

FORWARD 4: (1046 bç) (-815/+231)

5'-**ACTCGAGT**TCCACTGGACTCTATTAAC-3'

Genomic sequences									
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	42.1	1775	89%	0.008	100.00%	135088622	NC_000011.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	2388	100%	2.0	95.24%	198295559	NC_000003.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	1560	96%	2.0	100.00%	133797422	NC_000010.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	2084	96%	7.8	100.00%	181538259	NC_000005.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1468	100%	7.8	100.00%	145138636	NC_000008.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1153	89%	7.8	100.00%	114384328	NC_000013.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1076	85%	7.8	100.00%	107043718	NC_000014.9
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 15, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	993	85%	7.8	100.00%	101991189	NC_000015.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1292	96%	7.8	95.00%	83257441	NC_000017.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	2229	100%	31	100.00%	248956422	NC_000001.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	2678	96%	31	100.00%	242193529	NC_000002.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	1815	85%	31	100.00%	159345973	NC_000007.14
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	1359	100%	31	100.00%	138394717	NC_000009.12

Şekil C.7: MIR100HG Promotor Forward Primeri 4 BLAST sonucu.

Forward 4 Primer Tm:

$$Tm = (8+8) \times 2 + (4+8) \times 4 = \underline{\underline{80^\circ C}}$$

FORWARD 2: (628 bç) (-397/+231)

5'-**ACTCGAGGACTGGACCATCAAGTCTTT** -3'

Genomic sequences									
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	40.1	763	100%	0.029	100.00%	135088622	NC_000011.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	944	96%	1.8	100.00%	181538259	NC_000005.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 15, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	749	98%	1.8	100.00%	101991189	NC_000015.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 18, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	383	96%	1.8	92.00%	80373285	NC_000018.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1704	96%	7.0	100.00%	198295559	NC_000003.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1395	98%	7.0	100.00%	170805979	NC_000006.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1023	96%	7.0	100.00%	145138636	NC_000008.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	426	96%	7.0	100.00%	58617616	NC_000019.10
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	1684	100%	28	100.00%	248956422	NC_000001.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	1560	98%	28	100.00%	242193529	NC_000002.12
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	726	100%	28	100.00%	159345973	NC_000007.14
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	835	96%	28	94.74%	133797422	NC_000010.11
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	30.2	777	96%	28	100.00%	133275309	NC_000012.12

Şekil C.8: MIR100HG Promotor Forward Primeri 2 BLAST sonucu.

Forward 2 Primer Tm:

$$Tm = (7+7) \times 2 + (6+7) \times 4 = \underline{\underline{80^\circ C}}$$

FORWARD 1: (419 bc) (-188/+231)

5'-**ACTCGAGTTTCCCTGAGAAATTGCAGA**-3'

Genomic sequences									
✓	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	40.1	2808	98%	0.029	100.00%	135086622	NC_000011.10
✓	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	4447	100%	0.45	100.00%	198295559	NC_000003.12
✓	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	2933	100%	0.45	100.00%	159345673	NC_000007.14
✓	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	5723	100%	1.8	100.00%	242193529	NC_000002.12
✓	Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	3961	100%	1.8	100.00%	190214555	NC_000004.12
✓	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	4604	100%	7.0	100.00%	248956422	NC_000001.11
✓	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	3555	98%	7.0	100.00%	181538259	NC_000005.10
✓	Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	4236	100%	7.0	100.00%	170805979	NC_000006.12
✓	Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	3016	100%	7.0	100.00%	145138836	NC_000008.11
✓	Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	2271	100%	7.0	100.00%	133797422	NC_000010.11
✓	Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	2501	98%	7.0	100.00%	133275309	NC_000012.12
✓	Homo sapiens chromosome 15, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	1381	100%	7.0	100.00%	101991189	NC_000015.10

Şekil C.9: MIR100HG Promotor Ortak Reverse Primeri BLAST sonucu.

Forward 1 Primer Tm:

$$Tm = (8+7) \times 2 + (6+6) \times 4 = \mathbf{78^\circ C}$$

ORTAK REVERSE PRİMER:

5'-**AAAGCTTCTTTGTTACTATTCTCCTTAAT**-3'

Transcripts									
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 1, long non-...	Homo sapiens	48.1	48.1	80%	2e-04	100.00%	3129	NR_024430.2
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 8, long non-...	Homo sapiens	48.1	48.1	80%	2e-04	100.00%	3026	NR_137181.1
✓	Homo sapiens mir-100-let-7a-2-mir-125b-1 cluster host gene (MIR100HG), transcript variant 9, long non-...	Homo sapiens	48.1	48.1	80%	2e-04	100.00%	3108	NR_137182.1
✓	Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D (LRRC8D), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3937	NM_018103.5
✓	Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D (LRRC8D), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3950	NM_001134479.2
✓	PREDICTED: Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D (LRRC8D), transcript varia...	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3149	XM_017001601.2
✓	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105379857 (LOC105379857), ncRNA	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3181	XR_001747440.1
✓	PREDICTED: Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D (LRRC8D), transcript varia...	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3399	XM_017001602.1
✓	PREDICTED: Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D (LRRC8D), transcript varia...	Homo sapiens	32.2	32.2	53%	9.3	100.00%	3429	XM_011541689.1
✓	Homo sapiens calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha (CAMK2A), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	4804	NM_171825.3
✓	Homo sapiens calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha (CAMK2A), transcript variant 5, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	4833	NM_001399025.2
✓	Homo sapiens tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 (TP53INP1), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	5643	NM_001138733.2
✓	Homo sapiens WD repeat domain 46 (WDR46), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	1908	NM_001164267.2
✓	Homo sapiens transmembrane channel like 5 (TMCS), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	3676	NM_024780.5
✓	Homo sapiens calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha (CAMK2A), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	30.2	30.2	50%	37	100.00%	4837	NM_015981.4

Genomic sequences									
✓	Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	48.1	4103	100%	2e-04	100.00%	135086622	NC_000011.10
✓	Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	4807	100%	0.15	100.00%	181538259	NC_000005.10
✓	Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	38.2	2871	100%	0.60	100.00%	114364328	NC_000013.11
✓	Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	5388	100%	2.4	95.24%	248956422	NC_000001.11
✓	Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	5774	100%	2.4	100.00%	198295559	NC_000003.12
✓	Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	4890	100%	2.4	100.00%	170805979	NC_000006.12
✓	Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	4521	100%	2.4	95.24%	159345673	NC_000007.14
✓	Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	3378	100%	2.4	95.24%	133797422	NC_000010.11
✓	Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	34.2	3333	100%	2.4	100.00%	133275309	NC_000012.12
✓	Homo sapiens chromosome 3 genomic scaffold, GRCh38.p13 alternate locus group ALT_REF_LOCI_1...	Homo sapiens	34.2	34.2	56%	2.4	100.00%	173649	NT_187533.1
✓	Homo sapiens chromosome Y genomic patch of type FIX, GRCh38.p13 PATCHES HG2062_PATCH	Homo sapiens	32.2	88.7	53%	9.3	100.00%	101150	NW_009846209.1
✓	Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	7991	100%	9.3	100.00%	242193529	NC_000002.12
✓	Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	32.2	5397	100%	9.3	100.00%	190214555	NC_000004.12

Şekil C.10: MIR100HG Promotor Ortak Reverse Primeri BLAST sonucu.

Ortak Reverse Primer Tm:

$$T_m = (7+14) \times 2 + (2+7) \times 4 = \underline{\underline{78^\circ\text{C}}}$$

