



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN CDKN2A VE HEDEF GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Zekiye ALTAN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Gaziantep
2020

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN
CDKN2A VE HEDEF GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Zekiye ALTAN

Tez Savunma Tarihi: 10.09.2020
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr.Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK

Dr.Öğr. Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

Dr.Öğr. Üyesi Elif PALA

Dr.Öğr. Üyesi Tuba DENKÇEKEN

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10.09.2020

ZEKİYE ALTAN

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım süresince tüm bilgi ve deneyimleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, hiçbir zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN'e,

Tez çalışmalarım süresince her türlü bilgi ve tecrübesini nazikçe paylaşan, desteği ve ilgisiyle motivasyonumu arttıran çok değerli hocam Prof. Dr. Emel ŞAHİN'e,

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve birikimlerini özveriyle paylaşarak akademik gelişimime katkıda bulunan ve tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen Yunus ŞAHİN'e,

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR'a,

Her başımız sıkıştığında sabırla sorunlarımızı dinlediği ve naifçe verdiği destekleri için kıymetli hocam Prof. Dr. Mustafa ORHAN'a ve doktora öğrenim sürecimi devam ettirebilmemde emeği geçen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Suat ZENGİN'e,

Yalnızca tez çalışmalarım değil bütün hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, başta annem Gülten ALTAN ve babam Ömer ALTAN olmak üzere kıymetli AİLEM'e ve minik yeğenlerime,

Doktora öğrenim sürecimi BİDEB 2211/A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programıyla destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığı tarafından TF.DT.19.31 nolu BAP projesi ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programı (BİDEB) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xv
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kodlamayan RNA'lar	7
2.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar	9
2.2.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'ların İşlevleri	11
2.2.2. Uzun Kodlamayan RNA'larla İlişkili Hastalıklar.....	13
2.2.2.1. İmmün Hastalıklar	15
2.2.2.2. Metabolik Hastalıklar.....	15
2.2.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar	16
2.2.2.4. Nörolojik Hastalıklar	16
2.3. Hücre Döngüsü ve CDKN2A	17
2.3.1. Kolorektal Kanserde CDKN2A	21
2.4. Kolorektal Kanseri	21
2.4.1. Risk Faktörleri	22
2.4.2. Kolorektal Kanserde LncRNA'lar	24
2.4.3. Polipten Kolorektal Kansere İlerme Mekanizması	25
2.5. Uzun Kodlamayan RNA MEG3 (LncRNA MEG3).....	28
2.5.1. LncRNA MEG3'ün Tümör Baskılayıcı Yollar Üzerindeki İşlevleri.....	29
2.5.2. LncRNA MEG3'ün Diagnostik ve Prognostik Önemi	33
2.5.2.1. LncRNA MEG3'ün İfade Düzeyi ile Kanseri Arasındaki İlişki.....	33
2.5.2.2. MEG3 Hücre Proliferasyonunu Baskılar ve Apoptozisi İndükler	34

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hücre Kültürü	35
3.1.1. Hücre Sayımı	36
3.1.2. Hücre Pasajı	36
3.2. MEG3 Genine Uygun Plazmid Seçilmesi.....	37
3.3. Bakteri Ekimi ve Plazmid Çoğaltılması.....	41
3.3.1. LB Agar Besiyeri Hazırlanması ve Bakteri Ekimi	41
3.3.2. Sıvı Besiyeri Hazırlanması ve Bakteri Ekimi	41
3.4. Bakteri Stoğu Hazırlanması ve Saklanması.....	41
3.5. Plazmid İzolasyonu.....	42
3.6. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi	43
3.7. Total RNA İzolasyonu	44
3.8. Elde Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini.....	45
3.9. cDNA Sentezi	45
3.10. Elde Edilen cDNA'ların Kalite ve Miktar Tayini.....	46
3.11. Primer Tasarımı	47
3.12. Gen ifade analizi	48
3.13. MTT Hücre Canlılığı Testi	50
3.14. Koloni Oluşum Deneyleri.....	51
3.15. Migrasyonun Yara İyileştirme Deneyi ile Tayini	52
3.16. Biyoinformatik Analizler ve CDKN2A Hedef Tayini.....	53
3.17. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi	53
4. BULGULAR.....	55
4.1. Kolorektal Kanser Hücre Hatlarında ve Kolon Dokusunda Transfeksiyon Öncesi Gen İfadeleri	55
4.1.1. AURKA	55
4.1.2. CASC3	56
4.1.3. CCND1	57
4.1.4. CDKN2A	58
4.1.5. E2F1	59
4.1.6. EGR1.....	60
4.1.7. HUWE1.....	61
4.1.8. KAT2B.....	62

4.1.9. MAPK8	63
4.1.10. MEG3	64
4.1.11. P53	65
4.1.12. PCNA	66
4.1.13. RAF1	67
4.1.14. RELA	68
4.1.15. SIVA1	69
4.1.16. SP1	70
4.1.17. TFDPI	71
4.1.18. TOP1	72
4.1.19. VHL	73
4.2. HCT-116 Hücre Hattında Transfeksiyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri	74
4.2.1. HCT-116 Hücre Hattında AURKA İfade Düzeyi	74
4.2.2. HCT-116 Hücre Hattında CASC3 İfade Düzeyi	75
4.2.3. HCT-116 Hücre Hattında CCND1 İfade Düzeyi	76
4.2.4. HCT-116 Hücre Hattında CDKN2A İfade Düzeyi	77
4.2.5. HCT-116 Hücre Hattında E2F1 İfade Düzeyi	78
4.2.6. HCT-116 Hücre Hattında EGR1 İfade Düzeyi	79
4.2.7. HCT-116 Hücre Hattında HUWE1 İfade Düzeyi	80
4.2.8. HCT-116 Hücre Hattında KAT2B İfade Düzeyi	81
4.2.9. HCT-116 Hücre Hattında MAPK8 İfade Düzeyi	82
4.2.10. HCT-116 Hücre Hattında MEG3 İfade Düzeyi	83
4.2.11. HCT-116 Hücre Hattında P53 İfade Düzeyi	84
4.2.12. HCT-116 Hücre Hattında PCNA İfade Düzeyi	85
4.2.13. HCT-116 Hücre Hattında RAF1 İfade Düzeyi	86
4.2.14. HCT-116 Hücre Hattında RELA İfade Düzeyi	87
4.2.15. HCT-116 Hücre Hattında SIVA1 İfade Düzeyi	88
4.2.16. HCT-116 Hücre Hattında SP1 İfade Düzeyi	89
4.2.17. HCT-116 Hücre Hattında TFDPI İfade Düzeyi	90
4.2.18. HCT-116 Hücre Hattında TOP1 İfade Düzeyi	91
4.2.19. HCT-116 Hücre Hattında VHL İfade Düzeyi	92
4.3. HT-29 Hücre Hattında Transfeksiyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri	93
4.3.1. HT-29 Hücre Hattında AURKA İfade Düzeyi	93
4.3.2. HT-29 Hücre Hattında CASC3 İfade Düzeyi	94

4.3.3. HT-29 Hücre Hattında CCND1 İfade Düzeyi	95
4.3.4. HT-29 Hücre Hattında CDKN2A İfade Düzeyi	96
4.3.5. HT-29 Hücre Hattında E2F1 İfade Düzeyi.....	97
4.3.6. HT-29 Hücre Hattında EGR1 İfade Düzeyi.....	98
4.3.7. HT-29 Hücre Hattında HUWE1 İfade Düzeyi.....	99
4.3.8. HT-29 Hücre Hattında KAT2B İfade Düzeyi.....	100
4.3.9. HT-29 Hücre Hattında MAPK8 İfade Düzeyi	101
4.3.10. HT-29 Hücre Hattında MEG3 İfade Düzeyi.....	102
4.3.11. HT-29 Hücre Hattında P53 İfade Düzeyi	103
4.3.12. HT-29 Hücre Hattında PCNA İfade Düzeyi.....	104
4.3.13. HT-29 Hücre Hattında RAF1 İfade Düzeyi.....	105
4.3.14. HT-29 Hücre Hattında RELA İfade Düzeyi	106
4.3.15. HT-29 Hücre Hattında SIVA1 İfade Düzeyi	107
4.3.16. HT-29 Hücre Hattında SP1 İfade Düzeyi	108
4.3.17. HT-29 Hücre Hattında TFDP1 İfade Düzeyi.....	109
4.3.18. HT-29 Hücre Hattında TOP1 İfade Düzeyi.....	110
4.3.19. HT-29 Hücre Hattında VHL İfade Düzeyi	111
4.4. MEG3 Geninin Hücre Hatlarındaki İfade Düzeyi	112
4.5. MEG3 Geninin Dokulardaki İfade Düzeyi.....	113
4.6. CDKN2A Geninin Normal İnsan Dokularındaki İfade Düzeyi.....	114
4.7. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	115
4.8. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Koloni Oluşumu Üzerinde Etkileri.....	117
4.9. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Hücre Migrasyonu Üzerinde Etkileri ..	120
4.10. Kolorektal Kanser Hücrelerinde Transfeksiyonun Hücre Morfolojisi Üzerinde Etkileri	125
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	127
6. KAYNAKLAR	143

SİMGE VE KISALTMALAR

ANRIL	Antisense Non-Coding RNA in the INK4 Locus
AURKA	Aurora Kinase A
BACE1-AS	Beta-Secretase 1 Antisense RNA
CASC3	Cancer Susceptibility Candidate Gene 3 Protein
CCND1	Cyclin D1
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	Complementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT1	DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1
E2F1	E2F Transcription Factor 1
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGR1	Early Growth Response 1
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GAS5	Growth Arrest Spesific 5
H19	H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HOTAIR	HOX Antisense Intergenic RNA
HULC	Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Long Non-Coding RNA
HUWE1	HECT, UBA And WWE Domain-Containing Protein 1
KAT2B	Lysine Acetyltransferase 2B
Kb	Kilobaz
KRK	Kolorektal Kanser

lincRNA	Long Intergenic RNA
lncRNA	Long Non Coding RNA
MALAT1	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MAPK8	Mitogen-Activated Protein Kinase 8
MEG3	Maternally Expressed Gene 3
MIAT	Myocardial Infarction Associated Transcript
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Center For Biotechnology Information
ncRNA	Non Coding RNA
Nt	Nukleotid
ORF	Open Reading Frame
P53	Tumor Protein P53
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
RELA	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RNA	Ribonucleic Acid
RNP	Ribonucleoprotein
SIVA1	SIVA1 Apoptosis Inducing Factor
SP1	Sp1 Transcription Factor
TFDP1	Transcription Factor Dp-1
TOP1	DNA Topoisomerase I
VHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. LncRNA'ların genomik yerleşimlerine göre sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.2. LncRNA aracılı gen ifadesinin düzenlenmesine genel bakış.	12
Şekil 2.3. CDKN2A-RB-CDK 4/6 yolağının şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.4. CDKN2A'nın lokusunun genomik yapısı ve lokusundan üretilen transkriptler.	20
Şekil 2.5. Dünya çapında kolorektal kanserin yaşa bağlı görülme oranı.....	22
Şekil 2.6. Kolonun yapısı ve bölümleri	25
Şekil 2.7. Kolorektal kanser dizilerinde polipten kansere ilerleme süreci.	27
Şekil 2.8. MEG3'ün tümör baskılayıcı yolaklardaki genlerle etkileşimi.	30
Şekil 3.1. Boş plazmidin gen haritası.	37
Şekil 3.2. MEG3-del5 plazmidinin gen haritası.	38
Şekil 3.3. MEG3 plazmidinin gen haritası.....	39
Şekil 3.4. MEG3b plazmidinin gen haritası.....	40
Şekil 4.1. AURKA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. 55	
Şekil 4.2. CASC3 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'daki ifade düzeyi.	56
Şekil 4.3. CCND1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi..	57
Şekil 4.4. CDKN2A geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	58
Şekil 4.5. E2F1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	59

Şekil 4.6.	EGR1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	60
Şekil 4.7.	HUWE1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	61
Şekil 4.8.	KAT2B geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	62
Şekil 4.9.	MAPK8 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	63
Şekil 4.10.	MEG3 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	64
Şekil 4.11.	P53 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	65
Şekil 4.12.	PCNA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi..	66
Şekil 4.13.	RAF1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi...	67
Şekil 4.14.	RELA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi..	68
Şekil 4.15.	SIVA1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	69
Şekil 4.16.	SP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	70
Şekil 4.17.	TFDP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	71
Şekil 4.18.	TOP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi...	72
Şekil 4.19.	VHL geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.	73
Şekil 4.20.	HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası AURKA geninin ifade düzeyi.....	74
Şekil 4.21.	HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CASC3 geninin ifade düzeyi.....	75
Şekil 4.22.	HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CCND1 geninin ifade düzeyi.....	76

Şekil 4.23. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CDKN2A geninin ifade düzeyi.....	77
Şekil 4.24. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası E2F1 geninin ifade düzeyi.....	78
Şekil 4.25. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası EGR1 geninin ifade düzeyi.....	79
Şekil 4.26. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası HUWE1 geninin ifade düzeyi.....	80
Şekil 4.27. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası KAT2B geninin ifade düzeyi.....	81
Şekil 4.28. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MAPK8 geninin ifade düzeyi.....	82
Şekil 4.29. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 geninin ifade düzeyi.....	83
Şekil 4.30. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası P53 geninin ifade düzeyi.....	84
Şekil 4.31. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası PCNA geninin ifade düzeyi.....	85
Şekil 4.32. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RAF1 geninin ifade düzeyi.....	86
Şekil 4.33. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RELA geninin ifade düzeyi.....	87
Şekil 4.34. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SIVA1 geninin ifade düzeyi.....	88

Şekil 4.35. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SP1 geninin ifade düzeyi.....	89
Şekil 4.36. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TFDP1 geninin ifade düzeyi.....	90
Şekil 4.37. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TOP1 geninin ifade düzeyi.....	91
Şekil 4.38. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası VHL geninin ifade düzeyi.....	92
Şekil 4.39. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası AURKA geninin ifade düzeyi.....	93
Şekil 4.40. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CASC3 geninin ifade düzeyi.....	94
Şekil 4.41. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CCND1 geninin ifade düzeyi.....	95
Şekil 4.42. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CDKN2A geninin ifade düzeyi.....	96
Şekil 4.43. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası E2F1 geninin ifade düzeyi.....	97
Şekil 4.44. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası EGR1 geninin ifade düzeyi.....	98
Şekil 4.45. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası HUWE1 geninin ifade düzeyi.....	99
Şekil 4.46. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası KAT2B geninin ifade düzeyi.....	100

Şekil 4.47. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MAPK8 geninin ifade düzeyi.....	101
Şekil 4.48. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 geninin ifade düzeyi.....	102
Şekil 4.49. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası P53 geninin ifade düzeyi.....	103
Şekil 4.50. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası PCNA geninin ifade düzeyi.....	104
Şekil 4.51. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RAF1 geninin ifade düzeyi.....	105
Şekil 4.52. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RELA geninin ifade düzeyi.....	106
Şekil 4.53. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SIVA1 geninin ifade düzeyi.....	107
Şekil 4.54. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SP1 geninin ifade düzeyi.....	108
Şekil 4.55. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TFDP1 geninin ifade düzeyi.....	109
Şekil 4.56. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TOP1 geninin ifade düzeyi.....	110
Şekil 4.57. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası VHL geninin ifade düzeyi.....	111
Şekil 4.58. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin çeşitli hücre hatlarındaki ifade düzeylerinin gösterilmesi.	112

Şekil 4.59. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin çeşitli hücre hatlarındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterilmesi.....	112
Şekil 4.60. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin gösterimi.	113
Şekil 4.61. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterimi.	113
Şekil 4.62. Real Time PCR sonucunda CDKN2A geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin gösterimi.	114
Şekil 4.63. Real Time PCR sonucunda CDKN2A geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterimi.	114
Şekil 4.64. HCT-116 hücre hattında transfeksiyonun hücre proliferasyonu üzerine etkileri.	115
Şekil 4.65. HT-29 hücre hattında transfeksiyonun hücre proliferasyonu üzerine etkileri.	116
Şekil 4.66. HCT-116 hücre hattında transfeksiyonun koloni oluşum yeteneği üzerine etkisi.....	117
Şekil 4.67. HCT-116 hücre hattında, transfeksiyon sonrası oluşan kolonilerin Image J ile analizi sonrasında elde edilen grafik.....	118
Şekil 4.68. HT-29 hücre hattında transfeksiyonun koloni oluşum yeteneği üzerine etkisi.	119
Şekil 4.69. HCT-29 hücre hattında, transfeksiyon sonrası oluşan kolonilerin Image J ile analizi sonrasında elde edilen grafik.....	120
Şekil 4.70. HCT-116 hücre hattında MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ifadesinin hücre migrasyonu üzerine etkisi.	121

Şekil 4.71. HCT-116 hücre hattında yara kapanma sürecinin analizi sonrasında elde edilen grafik.	122
Şekil 4.72. HT-29 hücre hattında MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ifadesinin hücre migrasyonu üzerine etkisi.	123
Şekil 4.73. HT-29 hücre hattında yara kapanma sürecinin analizi sonrasında elde edilen grafik.	124
Şekil 4.74. Transfeksiyonun HCT-116 hücre hattı morfolojisi üzerindeki etkileri.	125
Şekil 4.75. Transfeksiyonun HT-29 hücre hattı morfolojisi üzerindeki etkileri.....	126



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. LncRNA'larla ilişkili hastalıklar.....	14
Tablo 2.2. MEG3 geninin çeşitli kanser türlerindeki ifade düzeyi.	32
Tablo 3.1. Her bir hücre için çalışmada tercih edilen besiyeri çeşidi, FBS ve antibiyotik oranları.	35
Tablo 3.2. Tek sarmal cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları.....	46
Tablo 3.3. cDNA eldesi.....	46
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi için dizayn edilen primer dizilimleri ve özellikleri.	47
Tablo 3.5. CDKN2A hedef genleri için qPCR bileşenleri ve miktarları.....	48
Tablo 3.6. MEG3 geni için qPCR bileşenleri ve miktarları.	49
Tablo 3.7. GAPDH geni için qPCR bileşenleri ve miktarları.	49
Tablo 3.8. qPCR döngü koşulları.	49

ÖZET

KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN CDKN2A VE HEDEF GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Zekiye ALTAN

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Eylül 2020, 179 sayfa

Kolorektal kanser (KRK) uzun yıllardır tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNAs), 200 nükleotitten daha uzun olan ve genellikle bir proteine çevrilmeyen RNA molekülleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli lncRNA'ların KRK oluşumu ve metastazında önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, KRK'de henüz tam olarak işlevleri aydınlatılamamış olan lncRNA MEG3 ve izoformu MEG3b'nin, hücre döngüsü kontrolünde kilit rol oynayan CDKN2A'nın ve hedeflerinin üzerindeki rolünü değerlendirmektir. Bu amaç doğrultusunda kolon dokusu ve HCT-116 ve HT-29 KRK hücre hatlarında lncRNA MEG3'ün ve olası hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. KRK hücrelerinde MEG3 ekspresyonunun düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu hücre hatlarında MEG3 ekspresyonunu arttırmak için hücreler plazmid ile transfekte edilmiştir. KRK hücre hatlarında, MEG3 ve MEG3b tarafından hedeflenen CDKN2A ilişkili düzenlemeyi tespit edebilmek için, CDKN2A ve hedefi olan 17 genin ifade düzeyleri MEG3 ve MEG3b transfeksiyonundan önce ve sonrasında qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Transfeksiyon sonrasında MEG3 overekspresyonu 17 hedef genden 14'ünde, MEG3b overekspresyonu ise 17 genden 15'inde anlamlı değişime yol açmıştır ($p<0.05$). Bununla beraber MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu HT-29 hücre hattında CDKN2A'nın ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırmıştır ($p<0.05$). Ayrıca transfeksiyon sonrasında KRK hücrelerinde MTT ile hücre proliferasyonu; yara iyileştirme deneyi ile migrasyon; koloni oluşum deneyi ile koloni oluşturabilme yeteneği tayin edilmiştir. MEG3 ve MEG3b'nin KRK hücrelerindeki aşırı ekspresyonu, kontrol ve boş plazmide kıyasla migrasyon, hücre proliferasyonu ve koloni oluşturabilme yeteneğini anlamlı düzeyde baskılamıştır ($p<0.05$). Elde ettiğimiz bu veriler literatürde lncRNA MEG3 ile CDKN2A hedef genleri arasındaki ilişkiyi ilk defa ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma lncRNA MEG3 ile CDKN2A arasındaki moleküler etkileşimin tanımlanmasına katkı sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: CDKN2A, Hücre Döngüsü, Kolorektal Kanser, lncRNA, MEG3

ABSTRACT

EFFECT OF LNCRNA MEG3 ON CDKN2A AND TARGET GENES IN COLORECTAL CANCER CELLS

Zekiye ALTAN

Ph.D. Thesis, Department of Medical Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

September 2020, 179 pages

Colorectal cancer (CRC) continues to be an important health problem all over the world for many years. Long noncoding RNAs (lncRNAs) are RNA molecules that are longer than 200 nucleotides and generally cannot be translated into a protein. Recent studies have shown that various lncRNAs have important roles in CRC formation and metastasis. The aim of this study is to evaluate the role of lncRNA MEG3 and its isoform MEG3b, which has not yet been fully clarified in CRC, CDKN2A, which plays a key role in cell cycle control, and its targets. For this purpose, expression levels of lncRNA MEG3 and possible target genes in colon tissue and HCT-116 and HT-29 CRC cell lines were determined by qRT-PCR method. To increase MEG3 expression in these cell lines, cells were transfected with plasmid. In order to detect the CDKN2A-related regulation targeted by MEG3 and MEG3b in CRC cell lines, expression levels of CDKN2A and its target 17 genes were determined by qRT-PCR method before and after MEG3 and MEG3b transfection. After transfection, MEG3 overexpression caused a significant change in 14 of 17 target genes and MEG3b overexpression in 15 of 17 genes ($p<0.05$). However, MEG3 and MEG3b transfection significantly increased the expression of CDKN2A in HT-29 cell line ($p<0.05$). In addition, cell proliferation with MTT in CRC cells after transfection; migration with the wound healing test; colony formation ability was determined by the colony formation experiment. Overexpression of MEG3 and MEG3b significantly suppressed migration, proliferation and colony formation ability of CRC cells compared to control and empty plasmid ($p<0.05$). These data have revealed the relationship between lncRNA MEG3 and CDKN2A target genes for the first time in the literature. Therefore, our work will contribute to the definition of the molecular interaction between lncRNA MEG3 and CDKN2A.

Keywords: CDKN2A, Cell Cycle, Colorectal Cancer, LncRNA, MEG3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Protein kodlama potansiyeli olmayan RNA molekülleri genel olarak kodlamayan RNA'lar (ncRNA) olarak adlandırılır. İnsan genomunun sadece %1-2 kadarı, RNA dünyasını iki ayrı gruba bölen proteinleri kodlar: 1) kodlama potansiyeline sahip RNA'lar ve 2) kodlama potansiyeli olmayan kodlamayan RNA'lar (non-coding RNA) (1). mRNA'lar uzun yıllar boyunca en çok çalışılan RNA grubu olmasına rağmen, ncRNA'lar diğer tüm RNA'ların büyük bir kısmını oluşturur. En iyi bilinen ncRNA'lar; taşıyıcı RNA'lar (tRNA), ribozomal RNA'lar (rRNA), küçük nükleer RNA'lar (snRNA) ve küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA) gibi protein biyosentezinde yapısal olarak işlev gösteren klasik "housekeeping" RNA'lardır. Uzunluklarına göre ncRNA'lar üç gruba ayrılır: kısa ncRNA'lar (<200 nt), orta ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar. Son yıllarda mikroRNA'lar (miRNA), küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA) veya PIWI ile etkileşen RNA'ların (piRNA) kısa ncRNA'lar içerisinde daha fazla ilgi gördüğü ve özellikle miRNA'ların kanserde birçok önemli rol oynadığı gösterilmiştir (2-4).

LncRNA'lar, 200 nükleotitten daha uzun olmakla beraber protein kodlayan ve kodlamayan genleri kontrol edebilen usta bir gen düzenleyici olarak görülmektedir. Ayrıca hücrede proliferasyon, migrasyon, invazyon ve hücrel transformasyon gibi çeşitli süreçlerde yer alırlar (5). LncRNA'lar çeşitli genlerin ifadelerini transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyebilmektedir. Bunun yanı sıra kromatin modifikasyonu, RNA'lara bağlanan proteinlerle etkileşim, transkripsiyon faktörlerinin ve baskılayıcıların ko-aktivasyonu da dahil olmak üzere gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki neredeyse tüm basamaklardan sorumludurlar (6). Bu nedenle lncRNA'larda meydana gelen düzensizlikler çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (5).

Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen üçüncü kanser türü olmakla birlikte en yüksek mortalite oranına sahip olan dördüncü kanser türüdür, bu nedenle insan sağlığı için önemli bir tehdittir (7). Dünya çapında her yıl KRK kaynaklı olarak yaklaşık 1.2 milyon yeni vaka ve 600.000 ölüm meydana gelmektedir (8). Bununla birlikte, KRK'in tarama, teşhis ve tedavisine yönelik klinik uygulamalar oldukça sınırlıdır. Örneğin, dışkıda gizli kan testi ve karsinoembriyonik (CEA) antijenler gibi KRK'in erken dönem taramasında kullanılan yöntemler, genellikle bireylerin diğer sağlık sorunları gibi diğer

çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu durum düşük özgüllük ve duyarlılık sonucunda yanlış klinik tanıya sebep olabilmektedir. Malignite evrelerini tanımlamak ve hasta prognozunu değerlendirmek için tümör nod metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılmaktadır. Buna rağmen, TNM evreleme sistemi, invaziv yöntemlerden ve örnek toplamadaki zorluklardan etkilenir. Ayrıca bu yöntemin uygulanması KRK'in tanı ve prognozunu sınırlandırır (9, 10). Ayrıca KRK'in tedavisinde kullanılan setuksimab ve panitumumab gibi hedefe yönelik ileri kemoterapi yöntemleri kullanılıyor olsa da KRK hastaları halen kötü prognoz göstermektedir (11). Yapılan bu çalışmalar KRK'in tanısında daha iyi klinik yöntemlere ihtiyaç duyulduğunu vurgulamaktadır. KRK'li hastaların tanıdan sonraki ilk 5 yıl içerisinde erken evre KRK'li hastaların yaklaşık %90'ının, ileri evre KRK'li hastaların sadece %14'ünün hayatta olduklarını ortaya koymuştur. Ancak, KRK vakalarının sadece %39.6'sı erken evrelerde teşhis edilmektedir (9, 10). Böylece, KRK'in gelişimi ve ilerlemesinde altta yatan mekanizmaların ortaya çıkarılması, hastaların prognozunu daha da iyileştirebilecek potansiyel tedavi hedefleri sağlayabilir.

Kolorektal kanserin gelişimi, çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok aşamalı ve çok adımlı bir süreçtir (12). Klinik çalışmalarda, KRK hastalarında, sinyal iletiminde görevli olan APC, KRAS, SMAD4 gibi onkogenlerle birlikte, hücre döngüsünde anahtar rol oynayan TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla mutasyon meydana geldiği bildirilmiştir (13). Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan bir başka gen olan CDKN2A, siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve sikline bağımlı kinaz 6 (CDK6)'nın inhibitörüdür. CDKN2A bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür (14). CDKN2A ifadesi, hücre senesensle beraber upregüle edilir ve çeşitli insan dokularında yaşlanmayla beraber belirgin şekilde artar (14). CDKN2A kanseri önlemek için aktive edilir ve hücre büyümesinin durması ve senesensin uyarılması yoluyla yaşlanmayı teşvik edebilir (15). Delesyon, nokta mutasyon ve/veya promotör metilasyonu ile CDKN2A'da meydana gelen işlev kaybı, neoplazik transformasyona neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilir.

Guinney ve ark., KRK'i moleküler olarak dört alt tipe ayırmıştır bunlar; KRK dokularındaki gen ifade motifine, genomik değişikliklere, ayırt edici özelliklere ve prognozuna göre oluşturulmuştur (12). Bu alt tipler KRK'in sınıflandırılmasını kolaylaştırırsa da, bu çok basamaklı süreçte ncRNA'ların da işlevleri sürece dahil

edildiğinde KRK'de henüz aydınlatılmamış moleküler süreçleri daha da karmaşıktır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lncRNA'ların hücre içi sinyal iletiminin yeni düzenleyicileri olduğunu ve KRK'de tümör oluşumu ve ilerlemesinde hayati rol oynadığını göstermektedir (16).

İnsan genomunda 14q32.3'de bulunan MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) geni, 1.6 kilobaz (kb) uzunluğunda bir lncRNA'yı kodlar (17). Beyin, mide, karaciğer, pankreas ve yumurtalık dahil olmak üzere, birçok organda MEG3 ekspresyonu görülmektedir. Bunun aksine, MEG3 ekspresyonunun tümör dokularında sıklıkla baskılandığı da vurgulanmıştır (17). Çeşitli kanser türlerinde, MEG3 geninin promotör bölgesinde genomik delesyon ve anormal metilasyonların olduğu fark edilmiştir. Bu durum tümör dokularında MEG3 ekspresyonunun azalmasına yada kaybolmasına yol açmıştır (18-20). MEG3, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde, p53'ü ve p53'ün alt sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozisi indükler (19). Yapılan bazı çalışmalarda da MEG3'ün aşırı ekspresyonu, p53 delesyonuna sahip olan tümör hücrelerinde, miRNA-421 ve miRNA-184 gibi miRNA'ları hedefleyerek tümör oluşumunu inhibe eder (21, 22). Bu çalışmalar, tümör gelişiminde MEG3'ün rollerinin altında yatan çoklu mekanizmaları göstermiştir. Önceki çalışmalar, düşük MEG3 seviyesinin, KRK hastalarında artmış karaciğer metastazına (23) ve KRK hücrelerinde oksaliplatine karşı artmış ilaç direnci ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (24).

MEG3'ün çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı aktivitesine ilişkin bilgiler son 10 yılda artış göstermiştir. Ancak MEG3'ün KRK hücrelerinde proliferasyonu önleyici ve apoptotik etkileri ve altta yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgimiz halen büyük ölçüde muammadır. Ayrıca uzun yıllardır KRK hastalarının tedavisi için fonksiyonel moleküler ilaçların ve potansiyel hedeflerin keşfi için yoğun çaba harcanmaktadır. CDKN2A hücre döngüsü çalışmalarında en çok çalışılan tümör baskılayıcı genlerden biridir. CDKN2A hücre döngüsü ilerlemesi, farklılaşma, yaşlanma ve apoptozisde kritik bir role sahip olduğu için, MEG3'e benzer şekilde bu gendeki mutasyonlar veya fonksiyonel aktivite düzensizlikleri çeşitli kanser türleri ilişkilidir. Yakın zamandaki bir çalışmada lncRNA MEG3'ün, miRNA aracılı olarak CDKN2A'nın gen ekspresyonunu düzenlendiği ortaya konulmuştur (25). Ancak MEG3 geninin CDKN2A'nın hedef genleriyle olan ilişkisi henüz açığa çıkarılmamış olup, MEG3'ün

CDKN2A yolağındaki işlevinin daha iyi anlaşılabilmesi için söz konusu hedef genlerle olan ilişkisinin araştırılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada, KRK hücrelerinde hem transkripsiyonel hem de translasyon sonrası seviyelerde kovalent modifikasyonlarla CDKN2A geni tarafından düzenlenen moleküler hedeflerin MEG3 ile olan ilişkilerinin açığa çıkarılması için, MEG3 ve CDKN2A'nın gen hedefleri arasındaki ilişkileri araştırmayı hedefledik. Bu amaç doğrultusunda KRK hücre hatlarında plazmid aracılı MEG3 ekspresyonunun arttırılmasının, CDKN2A'nın hedef genlerindeki ekspresyon değişimlerine ve KRK hücre hatlarındaki migrasyon, proliferasyon ve koloni oluşum yeteneği üzerine etkilerini belirleyebilmek için çeşitli yöntemler kullanıldı. Elde ettiğimiz veriler gelecekte kolorektal kanser hastaları için potansiyel yeni tanı, tedavi ve prognozunun iyileştirilmesine yönelik yeni hedefler sağlayacaktır. Literatür taramalarında KRK'de MEG3 ve CDKN2A hedef genleri arasındaki düzenleyici bir ilişki tespit edilememiştir. Bu bağlamda yaptığımız çalışma KRK'de MEG3 ve CDKN2A yolağındaki genler arasındaki ilişkileri ilk kez açığa çıkaracağı için özgündür. Ayrıca elde edeceğimiz veriler KRK'in moleküler mekanizmalarının açığa çıkarılması için ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kodlamayan RNA'lar

Haploid genomun içerdiği DNA miktarı 1950'li yıllarda *C değeri* ile ifade edilmiştir. Organizmanın genom büyüklüğü ile karmaşıklığı arasında az da olsa bir ilişki olduğu düşünülmekteydi. Ancak semender gibi basit yapılı bir canlının bile insandakinin yaklaşık 40 katı kadar büyüklükte genoma sahip olması gen bilimcileri çıkmaza sürüklüyordu. *C değerine* göre en gelişmiş yapıda görünen canlı olan insanın diğer canlılardan daha fazla sayıda gene sahip olması gerekmektedir (26). Yaklaşık 20 yıl sonra genomda kodlanmayan DNA dizilerinin varlığının keşfedilmesiyle beraber *C değeri paradoksu* kısmen çözümlenmiş olsa da, benzer düzeyde karmaşıklığa sahip bazı türlerin genomlarının diğerlerinden daha fazla miktarda kodlamayan diziler içerip içermediği halen bilinmemektedir (27).

İnsan Genom Projesi (HGP-Human Genome Project) kapsamında, uluslararası genom dizileme konsorsiyumu tarafından 2001 yılında insan genomunun ilk taslağı yayınlandı. İnsan genom projesinin ardından, yeni nesil dizileme yöntemleri ve protein kodlayan genleri tespit eden yöntemlerin de gelişmesiyle beraber (28), yakın zamanda yapılan çalışmalarda insan genomunda 19.000-20.000 kadar protein kodlayan genin var olduğu ortaya konulmuştur (29). İnsan Genom Projesinin yayınlandığı zamana kadar, ncRNA'lar "evrimsel atık" olarak görülmekteyken (27), günümüzde ise genomun sadece ufak bir bölümünün protein kodlayıcı genlerden oluştuğu bilinmektedir. Bununla beraber, *C değeri paradoksu*'nun çözümü için yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak artan kanıtlar ncRNA'ların birçok moleküler mekanizma üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkarak bir organizmadaki ncRNA miktarının, organizma karmaşıklığı ile doğru orantılı olduğu ortaya konulmuştur. Bu da, ncRNA'ların daha karmaşık yapılı hayvanların gelişimi ve organizasyonu üzerinde muazzam bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (26, 27).

Kodlayan ve kodlamayan RNA'ları (ncRNA) ayırt etmek çoğu zaman oldukça zor olabilmektedir. Ökaryotlarda, protein kodlayan bir transkript genellikle 100 amino asitten daha büyük bir açık okuma çerçevesinin (Open Reading Frame-ORF) varlığı ile tanımlanır. Bununla beraber, uzun bir ncRNA sadece tesadüfen böyle bir ORF içerebilir

ve iyi karakterize edilmiş birçok uzun ncRNA gerçekten de uzun ORF'ler barındırır. Karşılıklı olarak, 100 amino asitten daha küçük proteinler de transle edilebilir, *Drosophila* türlerinde 11 amino asit kadar küçük fonksiyonel peptitlerin de transle edildiği rapor edilmiştir (30). Kodon kullanımını korumak için yapılan seçimin, sinonim olmayan mutasyonlar üzerinde sinonim (sessiz) olduğunun gözlemlenmesi, sahte ORF'lerden ziyade gerçek olan transkriptleri ayırt etmek için kullanılmıştır (31). Bununla birlikte, son yıllarda transkriptlerin tanımlanmasındaki bu tür kolaylaştırmalara rağmen, ncRNA'ların tatmin edici bir tanımından hala yoksunuz. Ayrıca hem kodlayan hem de kodlamayan özellikler gösteren birçok tanımlanmamış transkript bulunmaktadır. Bu da, nihayetinde genomun, kodlayan ve kodlamayan transkriptleri gelişigüzel tanımlamalarımıza önem vermeksizin, sürekli bir transkript ve bilgi spektrumunu kodlamak için evrimleştiği olasılığını düşündürmektedir (32).

Alternatif kesime uğramış kodlayan ve kodlamayan izoformların üst üste çakışması, kodlayan ve kodlamayan transkriptleri ayırt etme problemini daha da karmaşıklştırmaktadır. İlk ve en iyi karakterize edilmiş lncRNA'lardan biri olan SRA'nın, daha sonraları bu ncRNA'nın fonksiyonuna antagonistik olarak etki eden bir proteini kodladığı bulunmuştur (33). Karşılıklı olarak, birçok mRNA da RNA düzeyinde işlev gösterebilir. Örneğin p53 geninin mRNA'sı, MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homologu) proteinini bağlayarak doğal bir RNA regülatörü görevi görür ve bu da p53 fonksiyonunu ve ekspresyonunu uyarır (34). Sinonim yani sessiz mutasyonlar da bu sürece müdahil olurlar. Protein translasyonunu benzer şekilde etkileyen sessiz mutasyonlar genomda oldukça yaygındır (35). Ayrıca, mRNA'ların 3' UTR bölgeleri, ilgili mRNA (36)'dan ayrı olarak ekspresyon gösterebilir ve mRNA'nın kodladığı proteinden bağımsız olarak işlevsel bilgi taşıyabilir (37, 38). Tüm bu çalışmalar transkriptlerin hem RNA seviyesinde potansiyel işlev gördükleri hem de protein kodlayabildiklerini göstermektedir.

ncRNA'lar, ribozomal RNA (rRNA) ve taşıyıcı RNA (tRNA) gibi "housekeeping" RNA'larının yanı sıra düzenleyici RNA'ları da içeren büyük bir transkript grubudur. Düzenleyici RNA'lar, transkript uzunluklarına göre, 200 nükleotitten (nt) büyük olan uzun ncRNA (lncRNA)'lar ve 200 nt'den daha küçük olan kısa ncRNA'lar olarak kategorize edilmektedir.

Küçük düzenleyici ncRNA'ların üyeleri arasında mikroRNA (miRNA)'lar, PIWI ile etkileşen RNA (piRNA)'lar ve endojen küçük etkileşen RNA (endo-siRNA)'lar bulunur. Kısa ncRNA'lar; biyogenez yolları, uzunlukları ve Argonaute ailesinin farklı proteinleri ile etkileşimleri sayesinde karakterize edilebilirler (39-42).

2.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar

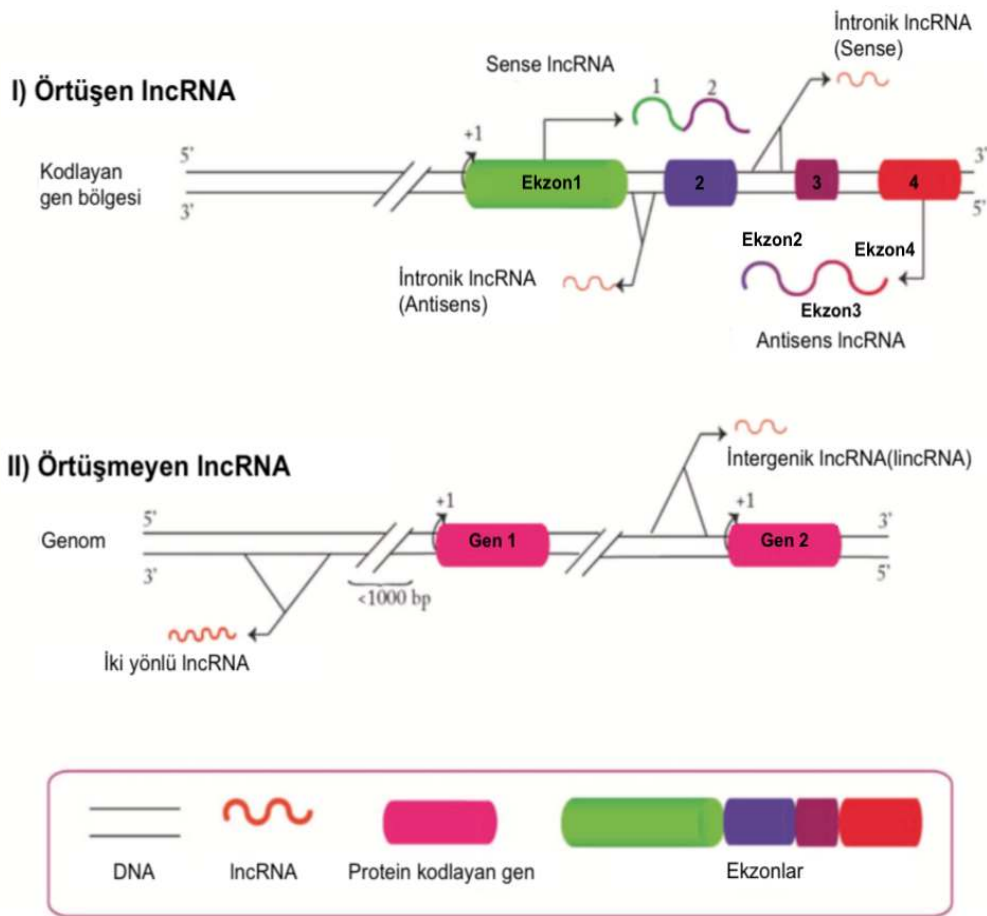
Kodlamayan RNA'ların geniş bir alt sınıfı olan uzun kodlamayan RNA (LncRNA veya Uzun ncRNA)'lar türler arasında az korunmuş olup, 200 nükleotitten daha uzun olarak transkribe olurlar (43).

LncRNA'ları diğer protein kodlayan mRNA'lardan ayırmak önemsiz bir süreç olmasa da, yine de bariz bir şekilde transkriptomun önemli bir bölümünün protein kodlama kapasitesi bulunmamaktadır. Genom Tilling Array (mikro dizileme yönteminin alt sınıfı) yönteminin artan hassasiyeti, kodlamayan dizilerin transkripsiyon miktarının, kodlayan dizilerden en az dört kat daha fazla olduğunu göz önüne sermiştir. Ayrıca poliadenillenmemiş kodlamayan transkriptlerin çokluğunun daha önce göz ardı edildiğini de ortaya koymuştur (44). Bu çalışmalar ayrıca transkriptomun tahmin edildiğinden çok daha karmaşık olduğunu, uzun ncRNA'ların sıklıkla kodlayan ve kodlamayan transkriptlerle üst üste örtüştüğü (overlapping) veya bu transkriptlerin aralarına serpiştirildiğini (intronik) göstermiştir (45). Ayrıca lncRNA'ların bir kısmı Poli-A kuyruğuna sahipken bir kısmında ise Poli-A kuyruğu bulunmayışı da onları daha karmaşık bir hale getirmektedir (46).

LncRNA'ları kendi içerisinde sınıflandırma konusunda ortak bir fikre varılamamış olsa da lncRNA'lar hakkındaki mevcut bilgilerimizle en kabul gören sınıflandırma biçimi, lncRNA'ların protein kodlayan genlere olan mesafelerini baz alarak yapılan sınıflandırmadır. Genomda protein kodlayan gene olan konumlarına göre beş alt sınıfta incelenebilir:

- Sense lncRNA'lar ve antisense lncRNA'lar sırasıyla aynı ve karşıt iplik üzerinde bulunur ve en az bir ekzon ile komşu mRNA'lar ile üst üste gelir.
- İntronik lncRNA'lar protein kodlayan genlerin intronlarından kopyalanır.

- İki yönlü lncRNA'lar, antisense sarmalındaki bitişik genlere yakın transkripsiyon başlangıç bölgelerine sahiptir ve bunlar ortak promotörlere sahiptir.
- İntergenik lncRNA (lincRNA)'lar, iki gen arasındaki genomik boşluktan kopyalanır.
- Promotör ilişkili lncRNA'lar, promotörün akış yukarı tarafında bulunur.
- 3'UTR ilişkili lncRNA'lar, protein kodlayan bir genin 3'UTR bölgesinden transkribe edilir (46) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. LncRNA'ların genomik yerleşimlerine göre sınıflandırılması.

LncRNA'lar, protein kodlayan genlerle ilişkili olarak genomik orjinlerine göre 5 grupta incelenebilirler. Bunlar; sense, antisense, intronik, çift yönlü ve intergenik lncRNA'lardır (47).

Literatürde tanımlanmış lncRNA'ların bir çoğu polimeraz II tarafından transkribe edilir, böylece başlık eklenebilir, poliadenilasyona uğrayabilir ve mRNA gibi kesilebilirler (48, 49). Uzun intergenik kodlamayan RNA (lincRNA), genomun intergenik bölgesine kopyalanırken, doğal antisense transkript olan NAT'lar, protein kodlayan genlerin karşı ipliğinden kopyalanır. LincRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'ların şimdiye kadar keşfedilmiş en kalabalık alt sınıfıdır. mRNA ile karşılaştırıldığında, lncRNA'lar mRNA'lara göre daha az ekzon içerebilir, genellikle daha zayıf splay olurlar ve zayıf poliadenilasyon sinyallerine sahiptirler (50).

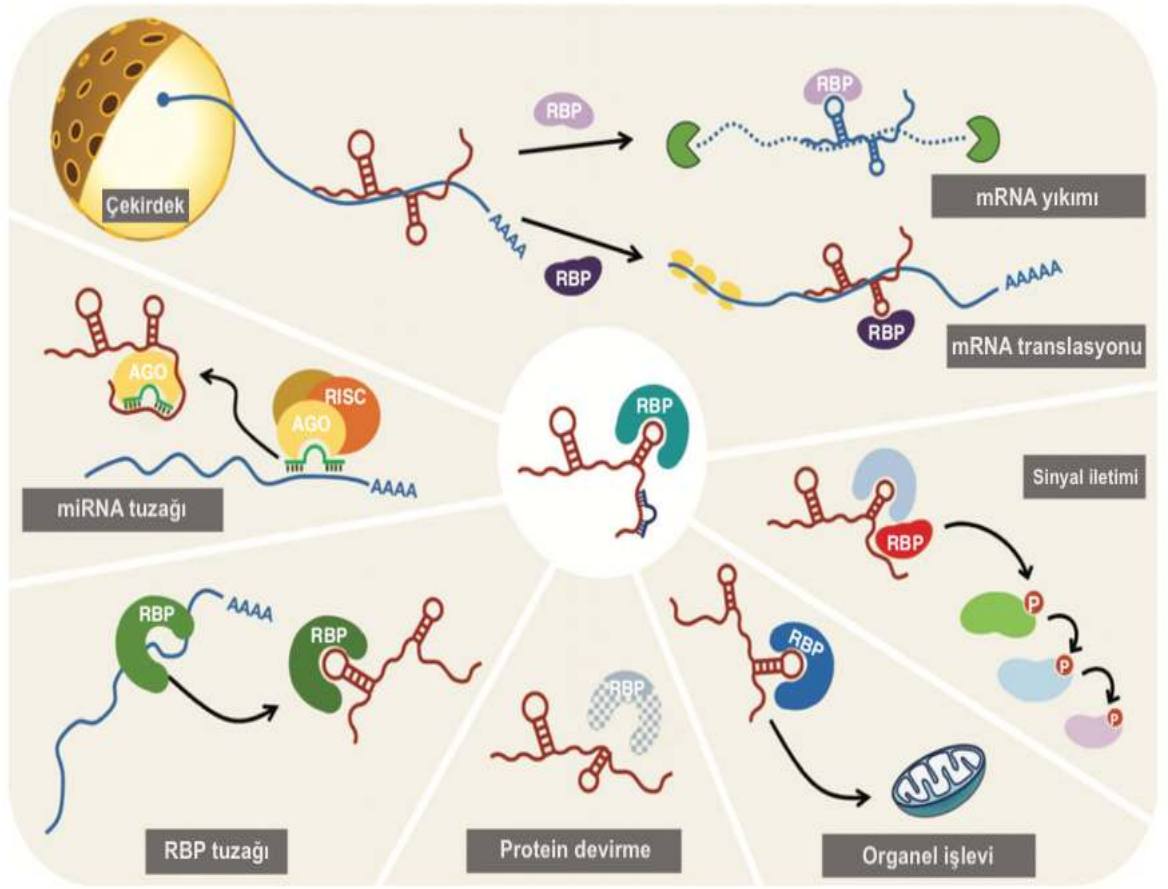
Proteinlere benzer şekilde, lncRNA'ların işlevi de, içinde bulundukları hücre bölmesine bağlıdır ve bulundukları hücre lokalizasyonu lncRNA'ların işlevini tahmin etmek için bir miktar referans sağlayabilir (51). LncRNA'lar, hücrel lokalizasyonlarına göre sitoplazma ve nükleer lncRNA'ya bölünebilir. Bazı lncRNA'lar çekirdekte bulunur ve bazıları ise sitoplazmada yerleşmişlerdir. LncRNA'ların hücre içerisindeki lokalizasyonları çeşitli düzenleyici mekanizmalarda rol almalarını sağlar. Sitoplazmada bulunan lncRNA'lar, mRNA ekspresyonunun düzenlenmesine katılabilir ve mRNA kararlılığını koruyabilir. Örneğin, ceRNA iskelet kasının farklılaşmasını düzenlediği için *Linc-MDI* esas olarak sitoplazmada eksprese edilir (52). LncRNA eğer çekirdekte yerleşik ise, hedef gen ekspresyonunu inhibe etmek veya aktive etmek için doğrudan hedef gene bağlanma yeteneğine sahip olabilir. Ayrıca çekirdekte lokalize olan bazı lncRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesine aracılık etmek amacıyla transkripsiyon faktörlerini veya histon modifiye edici komplekslerin bir araya toplanmasını sağlar. Çekirdekte lokalize olmuş bir lncRNA çeşidi olarak *Xist*, inaktivasyona uğramış X kromozomu üzerinde lokalize olmuştur. *Xist*, X kromozomunun kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonu etkiler (53, 54).

2.2.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'ların İşlevleri

Çeşitli hücrel koşullarda ve biyolojik süreçlerde lncRNA'ların transkripsiyonel, post transkripsiyonel ve epigenetik modifikasyonlarının gen ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkileri vardır (48). ncRNA'lar ile miRNA'lar arasındaki etkileşim mekanizmasının, RNA-RNA tamamlayıcı eşleşmesi yoluyla olduğu bilinmektedir (55). miRNA'larla karşılaştırıldığında lncRNA'lar, daha uzun bir dizilime ve karmaşık uzaysal

yapılara sahiptirler. Bu nedenle daha kompleks mekanizmalara sahip, olup daha fazla bilgi içermektedirler (56).

LncRNA'lar, cis-trans veya antisense etkileşim yoluyla gen ifadesini düzenleyebilen; moleküler tuzak, moleküler iskele, moleküler sinyal ve moleküler kılavuz da dahil olmak üzere birçok farklı mekanizmaya sahiptir (Şekil 2.2) (57).



Şekil 2.2. LncRNA aracılı gen ifadesinin düzenlenmesine genel bakış.

mRNA yıkımı ve translasyonu; LncRNA'lar sitoplazmaya aktarıldıktan sonra spesifik mRNA'ların stabilitesini ve/veya translasyonunu düzenlemek için RNA bağlayıcı proteinlerle (RBP) veya kısmen tamamlayıcı mRNA'larla birleşebilir. *Sinyal iletimi;* RBP'lerin LncRNA'lar ile birleşmesi sinyal moleküllerini (ör. Kinazlar) aktive eden konformasyonel değişikliklere yol açabilir. *Organel fonksiyonu;* RBP'ler, LncRNA'ların belirli fonksiyonları yerine getirdikleri hücresel organellere taşınımını gerçekleştirmek için şaperona işlevi gösterebilir. *Protein stabilitesi,* LncRNA'lar, spesifik RBP'lerin protein parçalanma makinelerine sunumunu kolaylaştıran iskeleler olarak işlev görebilir. *RBP tuzağı ve mikroRNA tuzağı;* RBP'lere ve mikroRNA'lara bağlanan LncRNA'lar, mRNA'nın kaderini düzenleyerek bu faktörlerin mRNA'lara ve miRNA'lara olan erişimini azaltabilir veya engelleyebilir (58).

LncRNA'lar hücre içerisinde pek çok düzeydeki moleküler süreçlerde rol almaktadırlar. İlk başlarda keşfedilen bazı lncRNA'ların moleküler mekanizmalar üzerindeki işlevleri neredeyse tamamen açığa kavuşturulmuştur. Bununla beraber lncRNA'ların büyük bir kısmının işleyiş mekanizmaları hakkında çok az bilgiye sahibiz (43, 59). LncRNA'lar; hücrelerin farklılaşması, proliferasyonu, büyüme ve gelişimi gibi süreçlerin yanı sıra organ oluşumu, bağışıklık yanıtı ve tümör oluşumu gibi çeşitli düzenleyici süreçlerde de rol oynamaktadır (59). Ayrıca, son çalışmalar lncRNA'ların hücre dışı veziküller içerisinde lokalize olduğunu göstermekle beraber hücre içi iletişimde ve biyolojik belirteçler olarak işlev görmesi için önemli olabileceğini de kanıtlamıştır (60-62).

2.2.2. Uzun Kodlamayan RNA'larla İlişkili Hastalıklar

LncRNA'ların fizyolojik ve patolojik yanıtlarda önemli düzenleyiciler olduğuna dair kanıtlar vardır (63-65). LncRNA'ların tümör oluşumuyla ilişkili olarak oksidatif stres, inflamasyon, apoptozis, hücre büyümesi ve canlılığını düzenleyen mekanizmalarda önemli role sahip oldukları bilinmektedir (66-70). Örneğin, HOX transkript antisense RNA (HOTAIR), gen regülasyonu ve kromatin dinamiğinde önemli bir rol oynar ve çeşitli kanserlerde ekspresyonu artmıştır (66, 71). HOTAIR, PRC2 ve LSD1 histon modifikasyon komplekslerini birbirine bağlar. Böylece gen susturulmasını indüklemek ve kanser hücre proliferasyonunda artışı ve metastazını teşvik etmek için kromatin yapısını değiştiren bir moleküler iskele işlevi gösterir (66, 71).

Karaciğer kanserinde yüksek ekspresyon gösteren lncRNA HULC, kanserle ilişkili başka bir lncRNA'dır. HULC, tümör baskılayıcı özellikte bir miRNA olan miR-372 de dahil olmak üzere çeşitli miRNA'ların işlevlerini durdurabilir veya inhibe edebilir (72, 73). Bununla birlikte, lncRNA'ların düzensizliği sadece çeşitli kanser türleri ile değil, çeşitli insan hastalıklarıyla da ilişkilidir. Bunlar arasında kardiyovasküler hastalıklar (74-76), diyabet (77), membranöz nefropati (78), otizm spektrum bozukluğu ve Alzheimer hastalığı gibi nöral patogenezlere (63, 79, 80) ve hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemi değişiklikleri (81, 82) sayılabilir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. LncRNA'larla ilişkili hastalıklar (83).

LncRNA	İlişkili Hastalıklar
aHIF	Çoklu Kanserler
GAS5	Meme Kanseri
AK023948	Papiller Tiroid Karsinoma
ANRIL	Koroner Arter Hastalığı, Çoklu kanserler
H19	Çoklu Kanserler
HOTAIR	Çoklu Kanserler
ASFMR1	Frajil X Sendromu; Frajil X Tremor Ataksi Sendromu
HULC	Çoklu Kanserler
Kcnq1ot1	Kolon Kanseri
Kras1p	Prostat Kanseri
MALAT-1	Çoklu Kanserler
MIAT	Miyokardiyal Enfarktüs
NcRNA	Nöroblastoma
RMRP	Lösemi ve Lenfoma
Ube3a-as	Angelman Sendromu
Uc.73A	Kolon Kanseri
FMR4	Frajil X Sendromu; Kırılgan X Tremor Ataksi Sendromu
BACE1-AS	Alzheimer Hastalığı
ATXN8OS	Spinocerebellar Ataksi Tip 8

2.2.2.1. İmmün Hastalıklar

LncRNA'lar bağışıklık hücrelerinin farklılaşması ve aktivasyonunun önemli düzenleyicileri olarak karşımıza çıkmaktadır (84, 85). Birçok çalışmada, otoimmün ve alerjik hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli enflamatuvar durumlarda lncRNA seviyelerinde anormal değişimler olduğu bildirilmiştir (86-91). Örneğin, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, romatoid artrit risk bölgesinde TRAF1-C5'in patogenezi için önemli olan transkript C5 düzeylerini etkileyen yeni C5T1lncRNA keşfedilmiştir (92). Sedef hastalığı, genellikle çevresel faktörlerce tetiklenen genetik bir hastalık olduğu düşünülen bir başka otoimmün bozukluktur. PRINS (psoriasis associated non-protein coding RNA induced by stress), stres kaynaklı sedef hastalığı yatkınlığına katkıda bulunan bir lncRNA'dır (93, 94).

2.2.2.2. Metabolik Hastalıklar

Metabolizmanın ve glikoz homeostazisinin düzenlenmesi, dokuların/organların karmaşık bir etkileşimidir ve mekanik olarak önemli birkaç lncRNA'yı da içerir (95). Örneğin, lncRNA GAS5 hücre büyümesini düzenler ve besin yoksunluğu ve hücre stres koşulları altında indüklenir (96-98). Fonksiyonel olarak, GAS5 hem snoRNA'lar için öncüdür (99), hem de glukokortikoid reseptörü (GR) için tuzaktır (96). GAS5, GR DNA'ya bağlanan dizilerle rekabet ederek, GR'ye bağımlı gen promotörlerinin trans-aktivasyonunu baskılar (96). GAS5 ayrıca diğer steroid hormon reseptörlerinin etkilerini de bastırıyor gibi görünmektedir (96). Steroidlere cevap veren genlerin ekspresyonunu kısıtlayarak enerji kaynaklarının açlığa uyarlanabilir bir yanıt olarak tasarrufunda rol oynayabilir. Bunun yanı sıra proapoptotik fonksiyonlara sahip olduğu da bildirilmiştir (96-98).

Diyabetin nedenlerini moleküler düzeyde anlayabilmek için lncRNA'lar üzerinde yapılan çalışmalar, bazı lncRNA'ların kaybının diyabetle ilişkili olduğunu açığa çıkarmıştır (100). Carter ve ark. yaptıkları bir çalışmada, ABD'li askerlerin GAS5 serum düzeylerinin azalmasının tip 2 diyabet ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (77).

2.2.2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar

Son çalışmalar ayrıca lncRNA'ların kardiyovasküler hastalıkların başlamasını ve ilerlemesini modüle etmede kritik rolleri olduğunu göstermektedir (74, 101, 102). Bvrt, Fendrr, ANRIL, MIAT ve MyHeart (Mhrt) gibi lncRNA'lar, miyokard enfarktüsü, kardiyomiyopati, kalp yetmezliği ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler gelişim ve kalp hastalıklarında önemli roller oynarlar (75, 103-107). Örneğin Mhrt, Brgl'in helikaz domainine bağlanarak, stresle tetiklenen kromatin yeniden modelleme faktörünün yol açtığı kromatin hedeflemesini ve anormal gen düzenlemesini inhibe ederek farelerde miyopatiyi önler (105).

2.2.2.4. Nörolojik Hastalıklar

Tüm dizilenmiş lncRNA'ların önemli bir kısmı beyin dokusuna özgü ekspresyona uğrar. Beyin dokusunda ekspresyon gösteren bu lncRNA'lar tam olarak düzenlenmiş zamansal ve uzamsal ekspresyon motifleri gösterirler (63, 108). Genom çapında ilişki çalışmaları ve karşılaştırmalı transkriptomik çalışmalar, lncRNA'ların şizofreni, bipolar bozukluk, depresyon, otizm spektrum bozukluğu, Asperger sendromu, dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu, nöropatik ağrı, epilepsi ve amiyotrofik lateral skleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda, ekspresyon profilinde anormal değişimler olduğu bildirilmiştir (63, 80, 109-111). Örneğin: lncRNA BACE1-AS, BACE1 geninin antisensi olup Alzheimer hastalarının beyinlerinde kontrol gruba kıyasla 2-6 kat daha yüksek düzeylerde ekspresyon göstermektedir (79). BACE1 geni, Alzheimer hastalığında patojenik A β -42 peptitlerinin aşırı üretimini sağlayan, transmembran bir protein olan beta-sekretazı kodlar (79). Fonksiyonel olarak, BACE1-AS, BACE1'in pozitif düzenleyicisi olup, BACE1 mRNA'sına bağlanır ve stabilize eder. Deneysel veriler, BACE1-AS'nin toksik A β -42 peptitlerinin aşırı üretimini teşvik ettiği ve daha sonra BACE1-AS aşırı ekspresyonunun ve amiloid birikim hızının artışıyla indükleyen pozitif bir geri besleme döngüsü olduğunu göstermektedir (79).

2.3. Hücre Döngüsü ve CDKN2A

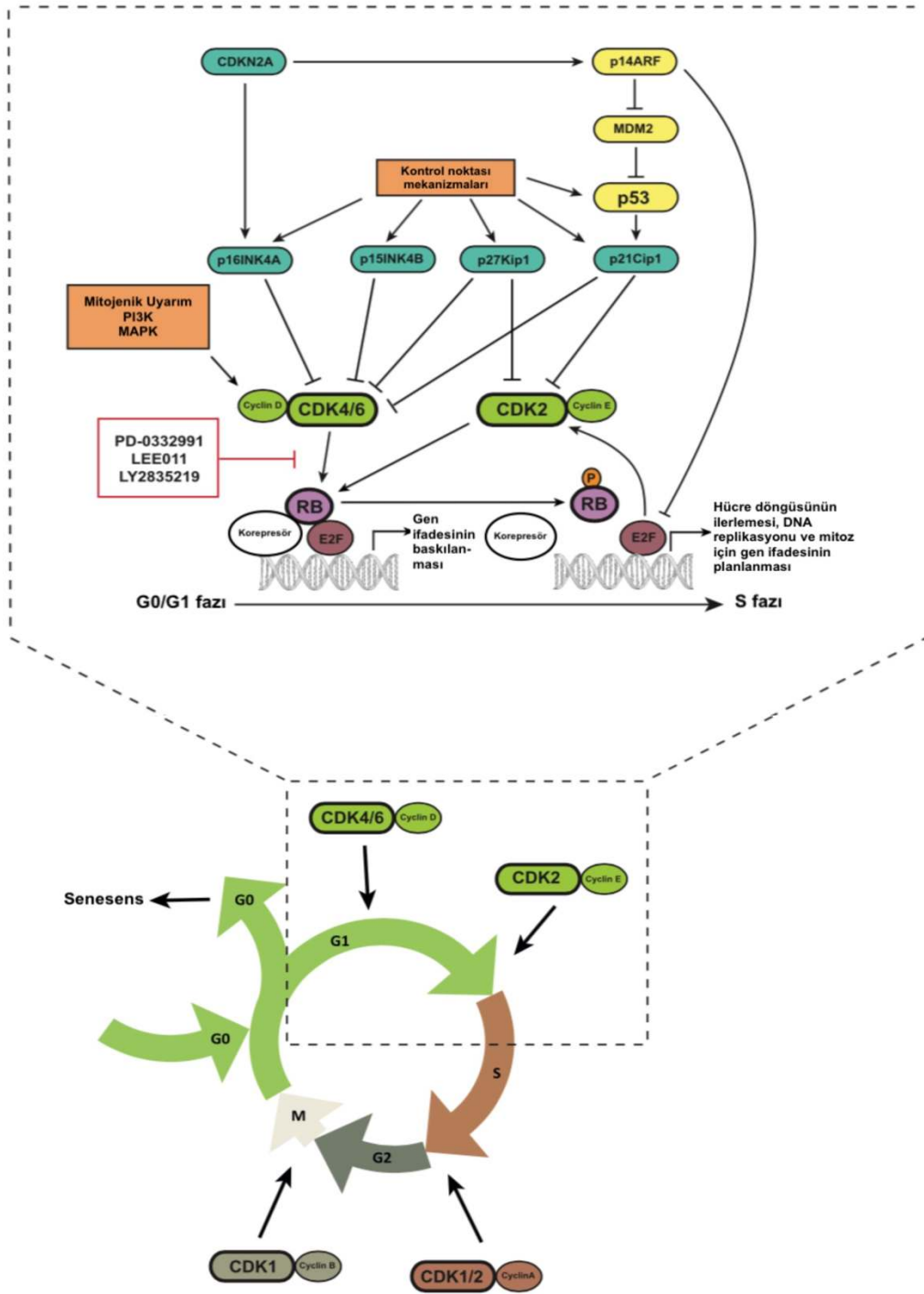
Kanser, genetik ve epigenetik bozuklukların birikiminden kaynaklanan, çok aşamalı bir süreçtir (112). Tümör hücreleri bu süreçlerin sonunda, sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli büyüme sinyali üretebilme, besin ve oksijen ihtiyacını karşılamak için yeni damar oluşumu (anjiyogenez) ve anti-proliferatif ve apoptotik uyarılara direnç gibi yeni özellikler kazanırlar (113).

Dinlenme evresindeki hücrelerde hücre döngüsü, kontrol noktalarında döngüyü kontrol eden bir dizi düzenleyici protein tarafından sıkı bir şekilde yönetilir (14, 114). Bu hücre döngüsü makineleri, çeşitli tümör baskılayıcı genlerin susturulmasının bir sonucu olarak kanserde genellikle deregülasyona uğramaktadır (112, 114). Aslında, delesyon, inaktive edici mutasyonlar, epigenetik susturma veya transkripsiyon sonrası modifikasyon ile tümör baskılayıcı genlerin ve bunların kodlanmış proteinlerinin kaybı tümör oluşumuna neden olur. Memelilerde hücre döngüsünün G1'den mitozaya ilerlemesi, çeşitli siklin proteinleri ve bunların siklin bağımlı kinazlar (CDK) olarak adlandırılan katalitik alt birimleri tarafından düzenlenir (115). Yapısal ve fonksiyonel olarak homoloji gösteren CDK4 ve CDK6, siklin D proteinleri ile kompleks oluşturdıklarında G1 fazındaki hücrelerin S fazına geçişini düzenler (Şekil 2.3). Siklin D proteinlerinin üç alt tipi vardır ve bu proteinler mitojenik uyarıların varlığında birikir (116-118). CDK4 / 6'nın kinaz aktivitesi, Rb, RBL1 (p107) ve RBL2 (p130) dahil olmak üzere retinoblastoma (Rb) protein ailesi üyelerinin fosforilasyonuna yol açar, bu da fonksiyonel inaktivasyonlarıyla sonuçlanır (116, 119, 120). Sessiz evredeki hücrelerde, aktif hipofosforile Rb, E2F transkripsiyon faktörü ailesinin üyelerine korepresörlerle bağlanır ve E2F fonksiyonunu baskılar. Fosforilasyon sonrası Rb proteini bu kompleksten ayrılır ve hücre döngüsünün S fazına geçişi için gerekli olan siklin A, siklin E ve dihidrofolat redüktaz dahil E2F hedef genlerinin transkripsiyonuna izin verir (119). Bu durum, CDK4/6 aktivitesinin inhibisyonuna, Rb'nin fosforilasyonuna ve E2F aktivitesinin baskılanmasına yol açar, bu da G0/G1'de döngünün durması teşvik edilmiş olur (Şekil 2.3). CDK4/6'nın negatif regülatörleri, CDK 4/6 aktivitesini siklin D1 ile bağlanmasını azaltarak veya doğrudan katalitik alt ünitelerini işgal ederek inhibe eder. CDK'lara bağlanan ve onları inaktive eden bir siklin-CDK inhibitör proteinleri ailesi (CDI) izole edilmiştir. Bu aile, p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} ve ilişkili proteinler p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d} ve p57^{KIP2}yi içerir (115, 121).

CDK4/6-RB yolağının yanı sıra, p53 aracılı hücre döngüsü kontrol noktası da G1/S'e geçişte hücrelerin bekletilmesinden sorumludur. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücrelerde DNA hasarını tespit eden, onarım için zaman tanımak üzere hücre döngülerini durduran ve böylece yeni nesil yavru hücrelerde genom bütünlüğünü sağlayan denetim mekanizmaları olarak işlev görürler (122). ATM (ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış) ve ATR (ataksi telanjiektazi ve Rad3 ile ilişkili) DNA hasar sensörü olarak işlev gösterirler. ATM ve ATR, doğrudan veya dolaylı olarak p53 fosforilasyonunu indükler. Bu fosforilasyon, bir ubiquitin ligazı ve p53 arasındaki etkileşimi kesintiye uğratarak p53'ün koruyarak bozulmasını önler (122, 123). Bu proteinler potansiyel tümör baskılayıcılar olarak işlev görürler ve bunların inaktivasyonu insanlarda kanser oluşumu ile sonuçlanır.

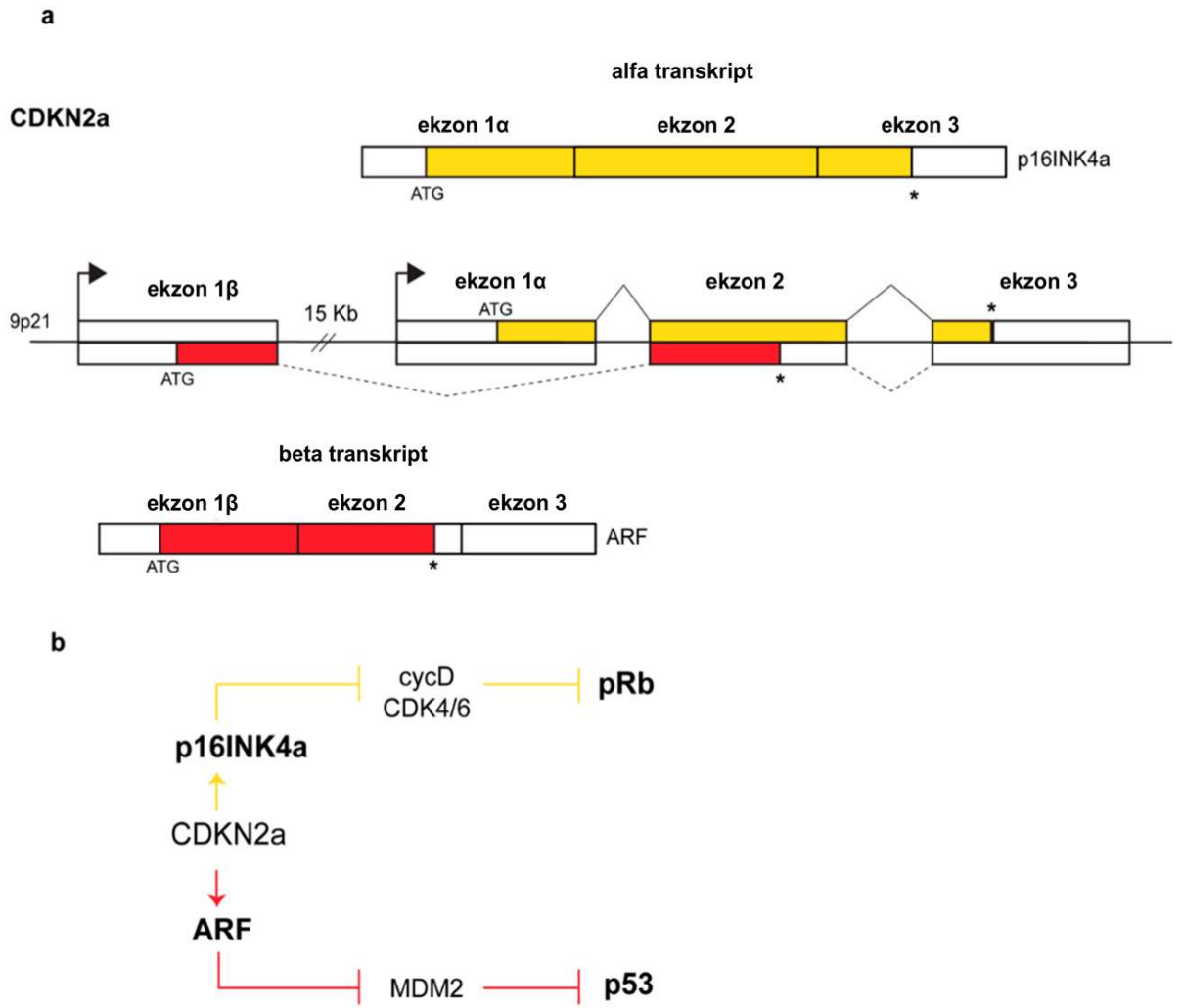
Kanserde inaktive edilmiş tümör baskılayıcı proteinlerden biri de, CDKN2A (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A) veya MTS1 (çoklu tümör baskılayıcı 1) geni tarafından kodlanan p16^{INK4a} proteinidir (124). CDKN2A geni, sıklıkla delesyona uğrayan 9p21 kromozomal bölgesinde yer alır (125). İki intron ve üç ekzondan meydana gelen CDKN2A geni 8,5 kb uzunluğundadır ve p16^{INK4a} proteinini kodlar. P16^{INK4a} proteini, 16 kDa molekül ağırlığına sahip 156 amino asitten oluşan bir proteindir ve hücre döngüsünün negatif düzenleyicisidir (126).

P16^{INK4a}, ya ek olarak CDKN2A'nın alternatif bir açık okuma çerçevesinden (farelerde ARF veya p19Arf) transkribe olan ve p53 düzenleyici proteinle etkileşime giren MDM2 proteini kodlanır (127). Basit tandem düzenlemesi, kendi promotöründen kopyalanan fazladan bir ekzon 1β varlığından dolayı oldukça komplikedir. Elde edilen RNA ekzon 2 ve 3'ü içerir, ancak ayrı bir proteini belirtir, çünkü ekzonlar alternatif bir okuma çerçevesi tarafından transkribe edilir. Böylece ekzon 2 ve 3, iki mRNA tarafından paylaşılırken, p16^{INK4a} ve ARF olmak üzere iki farklı protein ürününü kodlar (Şekil 2.4) (128). P16^{INK4a} proteininin CDK4 veya CDK6'ya spesifik bağlanması, bu proteinlerde allosterik konformasyonel bir değişikliği indükler ve CDK4 veya CDK6 ile siklin D arasında kompleks oluşumunu engeller (126). Bu kompleks oluşumun eksikliği, Rb'yi hipofosforile halde tutar ve büyümeyi baskılar. Rb/E2Fs-baskılayıcı kompleksin oluşumu, G1 evresinde hücre döngüsünün durmasını indükler (129).



Şekil 2.3. CDKN2A-RB-CDK 4/6 yolağının şematik gösterimi.

CDK4/6, siklin D ile etkileşince Rb'yi fosforiler. Bu etkileşim, Rb'nin E2F transkripsiyon faktörleri ailesinden ayrılmasına yol açar ve G1'den S fazına hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan E2F hedef genlerinin transkripsiyonuna izin verir. CDK4/6'nın küçük molekül inhibitörleri, Rb fosforilasyonunu, S fazına ilerlemeyi ve hücre proliferasyonunu inhibe eder. CDK4/6'nın aktivitesi ayrıca, upstream mitojenik sinyal yolları, CDK4 (INK4) proteinlerinin inhibitörü ve p53 yolağını da içeren kontrol noktası mekanizmalarından da etkilenir (130).



Şekil 2.4. CDKN2A'nın lokusunun genomik yapısı ve lokusundan üretilen transkriptler.

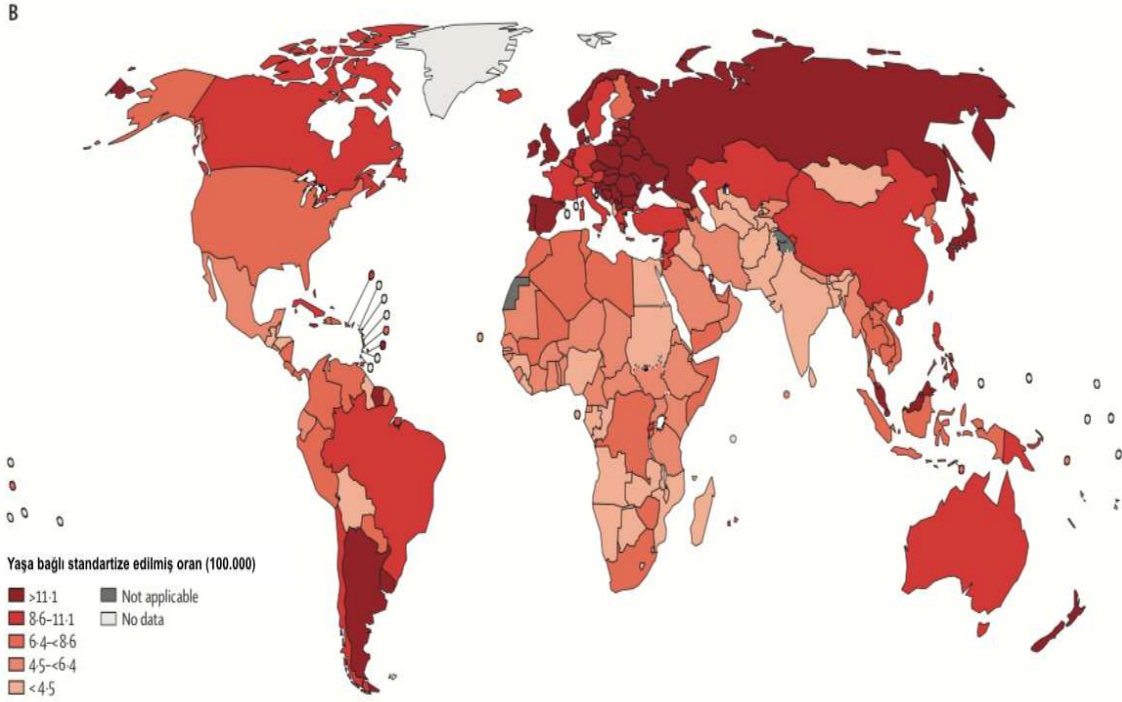
(a) Ekzon 1'lerin üzerindeki oklar promotörleri, genomik yapının üzerinde ve altındaki sürekli ve kesikli çizgiler sırasıyla p16 ve ARF'nin kesim motiflerini göstermektedir. Ekzon 1β transkripsiyonuna ekzon 2 ve 3'e eklenmesi, p16^{INK4a}'yı kodlayan α-transkript ile sonuçlanırken, ekzon 1β'nın downstream yönünden başlayan transkripsiyon, ekzon1'in ve ortak ekzon 2 ve 3'ün ARF kodladığı β-transkripti üretir (insanda p14^{ARF}, farede p19Arf). Sarı ve kırmızı renkte sırasıyla p16 ve ARF'nin açık okuma çerçeveleri (ORF) belirtilir, ekzon 2 iki örtüşen ORF gösterir. Beyaz kutular 3' ve 5' uçlarında çevrilmemiş bölgeleri temsil ederken yıldız işaretleri (*) dur kodonlarını gösterir. (b) İki protein tarafından düzenlenen yollar: p14^{ARF}, MDM2 fonksiyonlarını p53 stabilizasyonu ile inhibe ederken, p16^{INK4a} siklinD-CDK4/6 kompleksini inhibe eder, böylece retinoblastoma proteinini (pRb) büyüme baskılayıcı modunda tutar (131).

2.3.1. Kolorektal Kanserde CDKN2A

Kolorektal kanser gelişimi, CDKN2A da dahil olmak üzere birçok tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikleri içerir (132). Diğer kanserlere benzer şekilde, CDKN2A geni KKR patogenezi sırasında promotör hipermetilasyonu yoluyla susturulmuştur (133). CDKN2A'nın promotör metilasyonunun 285 sporadik KKR hastasının %11.9'unda meydana geldiğini bildirmiştir. CDKN2A promotör hipermetilasyonlu kanser hastaları arasında, 264 hastada %10.6 sıklığında mikrosatellitlere rastlanmaktayken, 21 hastada %28.6 olmak üzere yüksek sıklıkta mikrosatellitlere rastlanmaktadır (133). Başka bir çalışmada, 497 hastanın %17.1'inde CDKN2A promotör metilasyonu bulunmaktadır. CDKN2A'da meydana gelen bu düzenleme II ve III. evredeki KKR hastalarında kötü sağ kalım oranıyla yüksek oranda ilişkilidir (134). Ayrıca bu gende meydana gelen metilasyonun prognostik değeri, cinsiyetle ilişkilidir ve bu ilişki sadece erkek hastalarda anlamlıdır (134).

2.4. Kolorektal Kanseri

Kolorektal kanser, dünya çapında her yıl teşhis edilen kanserlerin ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (135). Kadınlarda en sık görülen ikinci, erkeklerde ise en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kadınlarda insidansı ve mortalitesi erkeklerdekine göre yaklaşık %25 daha düşüktür. Bu oranlar coğrafyaya göre değişkenlik göstermekle beraber, yaş standardına göre en yüksek oranlar gelişmiş ülkelerde görülmektedir (Şekil 2.5). Gelişmekte olan ülkelerdeki sürekli artışlarla beraber, dünya çapında KKR insidansının 2035 yılında 2.5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (135, 136).



Şekil 2.5. Dünya çapında kolorektal kanserin yaşa bağlı görülme oranı (135).

Yeni vaka sayısındaki düşüş ve stabilizasyon eğilimi yalnızca oldukça gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu başarı, yaşam tarzı ve beslenmedeki değişimlerin katkısı da olmasına rağmen, öncelikle ülke çapındaki tarama programları ve genel olarak kolonoskopinin yaygınlaşmasına atfedilmiştir (137). Buna karşılık, özellikle 50 yaşından küçük KRK tanısı ile başvuran hasta sayısında endişe verici bir artış gözlenmektedir. Her ne kadar genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörlerin etkisi olsa da, bu artışın kesin bir nedeni ortaya konulamamıştır (138-141).

2.4.1. Risk Faktörleri

Kolorektal kanser için yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, ilerlemiş yaş ve cinsiyetin erkek olması, hastalık insidansının artışı ile güçlü ilişkiler göstermektedir. Hem kalıtsal hem de çevresel risk faktörleri KRK'in gelişiminde rol oynar. Pozitif aile öyküsü, KRK'li tüm hastaların yaklaşık %10-20 kadarında görülmekle beraber (142), etkilenen akrabaların sayısı, akrabalık derecesi ve KRK'in tanı yaşına bağlı olarak risk oranı da

değişkenlik göstermektedir (143). İkizler üzerinde yapılan çalışmalara göre KRK'nin kalıtım oranı %12 ila %35 arasında değişmektedir (144, 145). KRK ile ilişkili genom çapında yapılan birkaç çalışmada, KRK riski ile ilişkili SNP'ler başarıyla tanımlansa da, KRK'nin kalıtımına etki eden faktörlerin çoğunun halen anlaşılması güçtür ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (146). KRK'li hastaların yaklaşık %5-7'si iyi tanımlanmış olan ailesel KRK sendromundan etkilenir (147). Bu hastalarda KRK'i önlemek için uygun bir gözetim stratejisi geliştirilmesi gerekmektedir. Gözetim stratejisi, KRK gelişimi durumunda en uygun tedavinin sağlanmasını ve risk altındaki akrabaların tespitini kolaylaştırmaktır. Ayrıca, uzun süredir devam eden inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip bireyler ve daha önce KRK veya adenom öyküsü olan hastalar kolorektal kanser için daha fazla risk altındadır (148-150).

Kalıtsal kolorektal kanser sendromları polipozsuz (Lynch sendromu ve ailesel kolorektal kanser) ve polipozlu olarak iki alt gruba ayrılabilir. Polipoz sendromları, doktor tarafından polip sayısının çokluğu sayesinde daha kolay tanınır. Poliplerin tipi doğrudan imkanı verebilir. Ancak Lynch sendromunda, genellikle hastalarda çok az adenom olduğu ve bu adenomların morfolojileri sporadik lezyonlara benzediği için sıklıkla gözden kaçır. Bu nedenle, bu genetik sendromun tanısını geliştirmek için, 70 yaşından küçük herhangi bir yaş grubundaki hastalarda tümör dokusu için sistematik bir moleküler analiz kullanılmaktadır. Lynch sendromunun tanısı için mikrosatellit instabilitesi (MSI) metodu kullanılmaktadır. Bu sendromda sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında DNA tamir sisteminde meydana gelen bozukluk sonucunda mikrosatellit bölgelerinde genişlemeler veya büzölmeler meydana gelir, bu durum MSI olarak adlandırılır. Ayrıca, immünohistokimya yöntemi ile bu tümörlerde, DNA tamir mekanizmasından sorumlu proteinlerin eksik olduğu da gösterilmiştir. Ancak MSI, Lynch sendromuna özgü bir durum değildir ve sporadik olgulu KRK'lerin yaklaşık %15'inde MSI'ya rastlanır. Bu hastalarda hızlanmış adenom-karsinom oluşumu nedeniyle, Lynch sendromlu hastaların 20 ila 25 yaşları arasında, 1-2 yıllık sıklıklarla kolonoskopi yaptırmaları tavsiye edilir (147-151). Ayrıca, bu hastalar endometriyal kanser ve diğer maligniteler (örn. ince bağırsak, mide ve yumurtalık kanserleri) için de daha fazla risk taşırlar.

Sigara (152), aşırı alkol tüketimi (153), vücut ağırlığındaki artış (154), kırmızı ve işlenmiş et tüketimi (155) gibi büyük ölçüde değiştirilebilir çevresel ve yaşam tarzı faktörleri KRK riskini arttırmaktadır. Kolon mikrobiyota araştırmaları, *Fusobacterium nucleatum* ve *Bacteroides fragilis* gibi belirli bakteri türleriyle enfeksiyonun da KRK riskini artırabileceğini düşündürmektedir (156-158).

2.4.2. Kolorektal Kanserde LncRNA'lar

LncRNA'lar hücre gelişimi ve farklılaşması sırasında gen ekspresyonu ve hücresel homeostazinin düzenlenmesinde ve sürdürülmesinde anahtar rol oynarlar (159, 160). LncRNA'lar hematopoetik, ürolojik, akciğer, karaciğer, meme, yumurtalık ve kolorektal gibi bazı kanser çeşitlerinde anormal ifade göstermektedir (161-167). Bu moleküllerde meydana gelen değişiklikler, tanı, prognoz ve terapötik uygulamalar için klinik biyobelirteçler elde etmek amacıyla KRK'de araştırma konusu olmuştur (168, 169). KRK'de birçok lncRNA, klinik ve mekanistik olarak önemli moleküller olarak ilişkilendirilmişlerdir.

Bu bağlamda bir lncRNA olan GAS5 (Growth arrest specific-transkript 5), 630 nt uzunluğunda (96), 1q25 üzerinde lokalize olmuştur. GAS5, büyüme faktörlerinin yokluğu veya serum açlığının neden olduğu büyüme durması sırasında upregüle edilir. GAS5, glukokortikoid reseptörünün (GR) DNA bağlanma domainine bağlanarak, glukokortikoid yanıt elemanı (GRE) için tuzak işlevi gördüğü gösterilmiştir. Böylece GR'ye bağlanmak için DNA GRE'leri ile rekabet edebilir (96). Bu lncRNA, tümör baskılayıcı olarak hareket ederek hücre çoğalmasını önleyebilir ve apoptozu teşvik edebilir (170). Günümüzde araştırmalar, GAS5'in meme kanseri, prostat kanseri ve renal karsinom gibi çeşitli kanser hücrelerinde down regüle edildiğini göstermektedir (98, 171, 172).

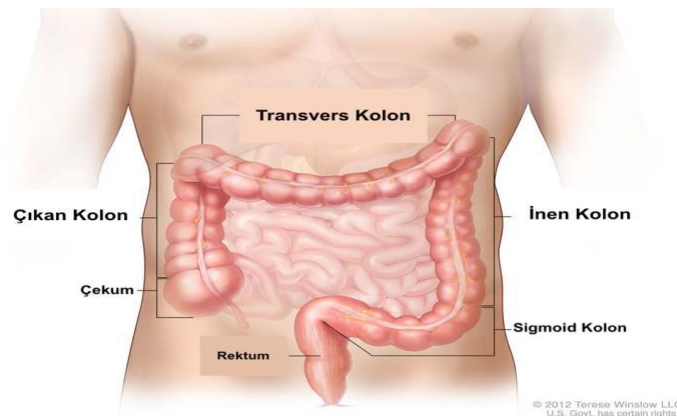
İnsan KRK tümör dokularında, GAS5 down regüle edilmiştir, bu regülasyon tümör boyutu, TNM evrelemesi ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir (173-177). Ayrıca, GAS5'in aşırı ifadelenmesinin, in-vitro ve in-vivo (173) hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği, migrasyonu ve invazyonu önleyebildiği rapor edilmiştir (177, 178). Bunun yanı sıra GAS5'in Akt, Erk ve mRNA ifadesini inhibe ederek KRK hücrelerini apoptozisi teşvik ettiği de bildirilmiştir (174, 175, 177).

KRK ile ilişkili diğer bir lncRNA HOTAIR, ileri seviyedeki KRK'lerde aşırı ifadenir (179-182) ve bazı çalışmalar, HOTAIR'in sadece sağ (proksimal) KRK numunelerinde aşırı ifade edildiğini göstermektedir (183). Bu aşırı ifadenme lenf ve tümör nodu metastazı, uzak doku metastazı, farklılaşma derecesi ile ilişkilendirilmiştir (179). İn-vitro olarak, HOTAIR baskılanması, hücre proliferasyonun, invazyon ve migrasyonu azaltmanın yanı sıra, siklin E ve CDK2 ifadesini de baskılamakla beraber apoptozisi ve p21 ifadesini arttırmıştır (179). Bir başka çalışmada ise, lncRNA HOTAIR'in tümör oluşumunu ve saldırganlığını arttırdığı bildirilmiştir (180). Ek olarak, KRK hücre dizilerinde HOTAIR'in yıkıma uğraması ve miR-203a-3p'nin arttırılmış ifadesi, Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu azaltmış ve ilaç direncini düşürmüştür (181).

2.4.3. Polipten Kolorektal Kansere İlerme Mekanizması

Kolon, ince bağırsak ile rektum arasında yer alan kalın bağırsağın en büyük ve ilk bölümü olup, sindirim sisteminin temel kısımlarından biridir. Başlıca işlevleri su, mineral ve besin maddelerinin emilimi ve dışkıyı oluşturan atık malzeme için bir depolama alanı olarak görev yapmaktır (184).

Kolon, kalın bağırsağın en büyük kısmıdır bu nedenle kolondan bahsedildiğinde kelime anlamı olarak kalın bağırsakla örtüşür. Kalın bağırsak çoğu kaynaktan, çekum, kolon, rektum ve anal kanalın kombinasyonu olarak tanımlanır. Kolon beş bölümden oluşur: sağ tarafta bulunan çıkan kolon; enine kolon veya transvers kolon; sol tarafta bulunan inen kolon, sigmoid kolon ve rektum (Şekil 2.6) (184, 185).



Şekil 2.6. Kolonun yapısı ve bölümleri (184).

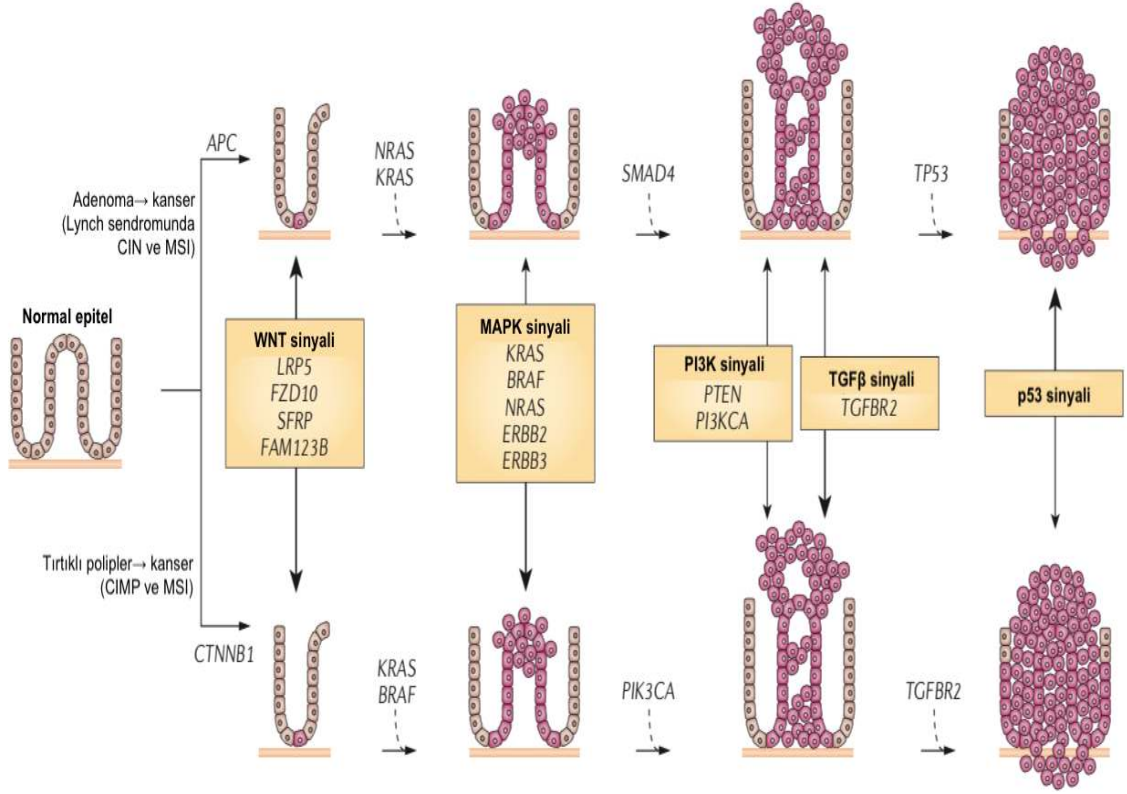
İnce bağırsağınkinden daha kalın bir mukozaya sahip olan kolon, epitel yüzeyi boyunca geniş, derin ve çok sayıda olan ve epitelyumun yenilenmesinin gerçekleştiği çok tüplü invajinasyonlara sahiptir. Ortalama yetişkin insan kolonunun uzunluğu erkekler için 166 cm (80 ila 313 cm arası) ve kadınlar için 155 cm'dir (80 ila 214 cm) (186).

Çoğu KRK kolon içerisinde gelişen bir polipten kaynaklanır. Bu süreç, neoplastik bir öncü lezyona (polip) dönüşen ve nihayetinde 10-15 yıllık bir süre boyunca KRK'e ilerleyen anormal bir kript ile başlar. KRK'lerin çoğunun köken aldığı hücrenin bir kök hücre veya kök hücre benzeri hücre olduğu varsayılmaktadır (187, 188). Bu kanser kök hücreleri, tümörü baskılayıcı genleri inaktive eden ve onkogenleri aktive eden genetik ve epigenetik değişikliklerin kademeli birikiminin bir sonucudur. Kanser kök hücreleri kolon kriptlerinin tabanında bulunur ve bir tümörün başlatılması ve sürdürülmesi için gereklidir (187, 188).

Bazı genetik sendromlar polip oluşum mekanizmasına katkıda bulunduğundan dolayı daha yüksek KRK oranları ile ilişkilidir. Bunlardan en yaygın olanı, KRK'li kişilerin çok az bir kısmında görülen kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserdir (HNPCC veya Lynch sendromu) (189). Kolorektal kanserle güçlü bir şekilde ilişkili diğer sendromlar arasında Gardner sendromu ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP) bulunur (190). Bu sendromları olan insanlar için kanser neredeyse her zaman meydana gelir ve kanser vakalarının %1'ini oluşturur (191). Yüksek malignite riski nedeniyle önleyici bir önlem olarak FAP'li kişiler için toplam proktokolektomi önerilebilir. Kolektomi, kolonun çıkarılması, rektum kalırsa yüksek rektal kanser riski nedeniyle önleyici bir önlem olarak yeterli olmayabilir (192). Kolonu etkileyen en sık görülen polipoz sendromu, %25-40'luk bir KRK riski ile ilişkili olan tırtıklı polipozis sendromudur (193). POLE ve POLD1 gen çiftindeki mutasyonlar ailesel kolon kanseri gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (194).

Genel olarak, iki belirgin öncü lezyon yolağı vardır (Şekil 2.7). KRK'lerin %70-90'ına yol açan geleneksel adenom-karsinom yolu (kromozomal instabilite dizisi olarak da bilinir) ve KRK'lerin %10-20 kadarını oluşturan tırtıklı neoplazi yolu. Bu yollar, ardışık bir sırada farklı çoklu genetik ve epigenetik olayları temsil eder (195).

Kromozomal instabilite fenotipleri tipik olarak bir APC mutasyonu ile başlatılan genomik olayları takiben RAS aktivasyonu veya TP53 fonksiyon kaybı sonrasında gelişir. Bunun aksine, tırtıklı neoplazi yolu, RAS ve RAF mutasyonları ve CpG adacıkları metilasyon fenotipi ile karakterize edilen, mikrosatellit bakımından kararlı ve kararsız kanserlere yol açan epigenetik instabilite ile ilişkilidir (196).



Şekil 2.7. Kolorektal kanser dizilerinde polipten kansere ilerleme süreci.

APC, adenomatöz polipozis coli; *CIN*, kromozomal instabilite; *CTNNB1*, katenin-β1; *FAM123B*, 123B dizi benzerliğine sahip aile (AMER1 olarak da bilinir); *FZD10*, kıvrılmış sınıf reseptörü 10; *LRP5*, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5; *MAPK*, mitojenle aktive edilen protein kinaz; *MSI*, mikrosatellit kararsızlığı; *PI3K*, fosfatidilinositol 3-kinaz; *PI3KCA*, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim-a; *PTEN*, fosfatase ve tensin homologu; *SFRP*, kıvrılmış, ilişkili protein salgılayıcı; *SMAD4*, *SMAD* aile üyesi 4; *TGFβ*, dönüştürücü büyüme faktörü-8; *TGFBR2*, TGF-β reseptörü 2 (196).

Her iki kolon hücre hattında normal kolon epitel hücrelerinin anormal kript odacıklarına ilerlemesinin ardından erken ve ileri polipleri takiben erken kansere ve daha sonra ileri kansere ilerlemeyi içerir. "Klasik" veya geleneksel yol, adenokarsinoma ile ilerleyebilen tübüler adenomların gelişim sürecini içermektedir. Alternatif yol ise son 5-10 yıl

içerisinde tanımlanmış olup, tırtıklı polipleri içerir ve tırtıklı kolorektal kansere yol açar. Mutasyona uğramış veya epigenetik olarak değiştirilmiş genler her hücre dizisinde belirtilmiştir; bazı genler iki yolakta da mevcutken bazıları her bir yolak için benzersizdir. Örneğin; BRAF mutasyonları ve CpG adacıkları metilatör fenotipi (CIMP) sadece tırtıklı yolakta görülmektedir (196).

2.5. Uzun Kodlamayan RNA MEG3 (LncRNA MEG3)

MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) ve faredeki homologu Meg3, androjenetik ve normal döllenmiş embriyolara substaktif hibridizasyon metodunu takiben EST veri tabanı kullanılarak tanımlanmıştır (197). Bu gen, farelerde distal kromozom 12 insanlarda ise kromozom 14q üzerindeki DLK1-MEG3 bölgesi üzerinde yerleşiktir (197-199). DLK1-MEG3 bölgesi, paternal alel üzerinde iki DMR (diferansiyel metillenmiş bölgeye) sahiptir. Bunlardan biri MEG3'ün transkripsiyon başlangıç bölgesinin yaklaşık 13 kb yukarısında yer alan intergenik DMR (IG-DMR) adı verilen ve diğeri ise MEG3 ile örtüşen promotör bölgesidir (197, 200, 201). Alternatif RNA kesimi ile bu genetik lokustan çok sayıda transkript izoformu üretilmiştir. Bu genetik bölgeden çok sayıda transkript izoformunun üretilmesi ile sonuçlanmıştır. Başlıca ifade edilen izoform 1-4 ve 8-10 ekzonlarını içerir (17). Olgun MEG3 RNA uzunluğu yaklaşık 1.600 nt olan on ekzondan oluşur (198). Dizi analizleri sonucunda MEG3 geni için belirgin bir açık okuma çerçevesi (ORF) belirlenemediği için bu gen uzun kodlanmayan RNA olarak sınıflandırılmıştır.

MEG3, PRC2 (policomb repressive complex 2)'nin etkileşime girdiği kromatin ile etkileşen bir lncRNA'dır. Bu lncRNA, EZH2 ile benzer hedeflere sahiptir ve bunlar arasında TGF- β yolağında yer alan genler de bulunmaktadır. LncRNA MEG3, hedeflerini RNA-DNA tripleks oluşumu yoluyla tanıır (202).

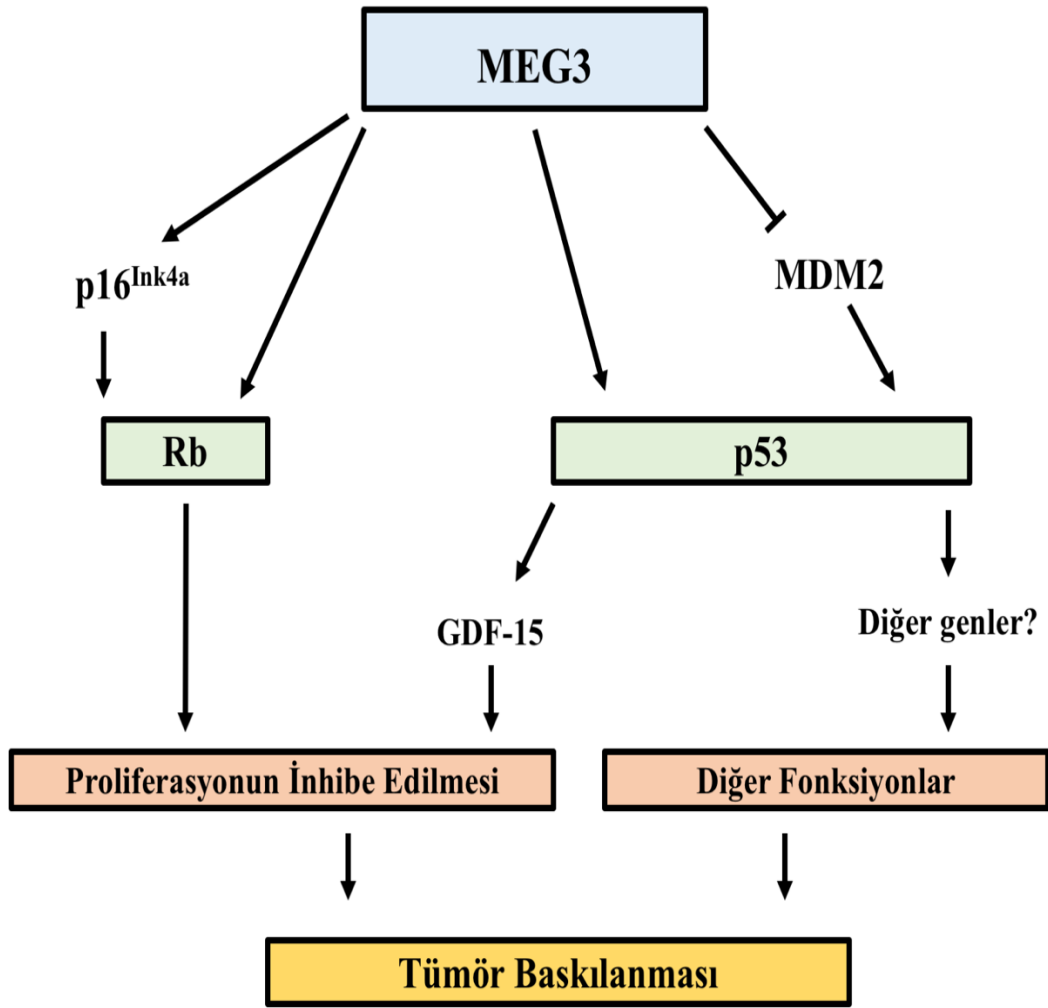
MEG3'ün insan kanserlerindeki katkısına dair ilk kanıtlar, MEG3 ifadesinin tamamen kaybolduğu hipofiz bezinin işlevsiz hipofiz adenomlarından (NFPA) elde edilmiştir (17). Daha sonra, MEG3 ifadesinin çeşitli kanser türlerinde azaldığı gösterilmiştir. İleri evrelerdeki meningiomlarda alele özgü MEG3 kaybı saptanmıştır ancak erken evrede olanlarda MEG3 kaybı söz konusu değildir (203). Promotör hipermetilasyonu, işlevsiz

adenoma (201), menenjiom (203) ve nöroblastomadaki (204) MEG3 down-regülasyonunun altında yatan bir diğer nedendir. Bazı miRNA'ların post-transkripsiyonel seviyede MEG3 ifadesini düzenlediği gösterilmiştir. Buna karşılık, MEG3 bir dizi miRNA için yarışmalı endojen RNA olarak işlev görür (205).

2.5.1. LncRNA MEG3'ün Tümör Baskılayıcı Yolaklar Üzerindeki İşlevleri

MEG3, p53 tümör baskılayıcı geninin ifadesini düzenler ve çeşitli mekanizmalar üzerinden p53'e bağlı transkripsiyonu uyarır. Öncelikle, MDM2 seviyesini düşürür ve daha sonra p53'ün übikitin aracılı yıkımını inhibe eder. Bu teori, MEG3'ün artmış ekspresyonunun ardından MDM2 düzeyinin azalması ile doğrulanmıştır (206).

MEG3 ayrıca p53'ün DNA bağlama domainine ve p53'ün çok sayıda hedef genine doğrudan bağlanabilir. p53'e duyarlı bir raportör vektörün MEG3 ekspresyon vektörü ile birlikte transfeksiyonu, MEG3'ün p53'ün transkripsiyonel aktivitesini arttırdığını göstermiştir. MEG3'ün delesyonlu mutantlarının oluşturulması, p53'ün transkripsiyonel aktivitesini uyarmak için MEG3'ün üç domaininin hepsinin de gerekli olduğunu doğrulamıştır. MEG3 upregülasyonu, transkript seviyesini etkilemeden p53 protein seviyelerini arttırdığından, muhtemelen p53 proteininin stabilitesini artırır. Ayrıca, MEG3 ve p53'ün doğrudan etkileşimi, MEG3'ün M3 domaini ve p53'ün DNA bağlama domaininin aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 2.8) (207). Özellikle MEG3, p53 yokluğunda bile hücre proliferasyonunu baskılayabilir (206). Bu lncRNA'nın ifadesi p53 aktivasyonunu takiben endotelial hücrelerde artmıştır (208).



Şekil 2.8. MEG3’ün tümör baskılayıcı yollardaki genlerle etkileşimi.

Rb ve p53 hücre döngüsünde rol alan iki önemli tümör baskılayıcıdır. MEG3, Rb ile ilişkili yollarda önemli bir tümör baskılayıcı rolü oynayabilir, MEG3 Rb’yi doğrudan RNA-protein etkileşimleriyle aktive eder veya dolaylı olarak pozitif regülatör p16’yı aktive ederek hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu baskılamak için Rb yolağını aktive eder. Rb yolağına benzer olarak, MEG3 p53’ü doğrudan RNA-protein etkileşimleriyle aktive eder veya dolaylı yollardan negatif regülatör olan MDM2’yi baskılayarak hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu baskılamak için p53 yolağını aktive eder (209).

MEG3, bir diğer önemli tümör baskılayıcı olan Rb ile de etkileşime girer. MEG3 ifadesi, hücre proliferasyonu ile ilişkili olarak bu tümör baskılayıcı protein tarafından modüle edilir. Farelerde Rb familyasının genetik olarak delesyonu, MEG3 ifadesinin bariz şekilde susturulması ile sonuçlanmıştır. Tersine, pRb’nin aktivasyonu MEG3 ifadesini arttırmıştır (210). MEG3, Rb üzerindeki etkilerini doğrudan Rb fosforilasyonunun

modülasyonu veya dolaylı olarak Rb ifadesini arttıran p16^{INK4A}'nın indüklenmesiyle gerçekleştirir (Şekil 2.8) (211). Ayrıca, MEG3'ün PRC2 kompleksi ile açıkça etkileşimi vardır. Bu etkileşim, TGF- β (Transforming Growth Factor- β) yolağındaki genlerin ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunur. ChOP (Chromatin Oligo Affinity Precipitation) yöntemiyle, bir dizi TGF- β yolağı geni ile MEG3 arasında doğrudan etkileşimlerin olduğunu göstermiştir. Buna ilave olarak daha ileri çalışmalarda, GA-zengini dizilerin, bu hedef dizilere lncRNA MEG3 taşınımını kolaylaştırdığını göstermiştir (202).

MEG3 için öne sürülen tümör baskılayıcı rolü ile uyumlu olarak, birçok çalışmada aynı kökene sahip normal dokularla karşılaştırıldığında, bu lncRNA'nın tümör dokularında down regüle olduğu bildirilmiştir (Tablo 2.1). MEG3'ün aşırı ekspresyonu, akciğer kanseri (210), yassı epitel hücreli karsinom (212), gastrointestinal kanser (213) ve benzeri birçok kanser hücre dizisinde hücre çoğalmasını durdurmuş ve apoptozisi indüklemiştir. Kanıtların aksine, Wang ve ark. bir insan osteoblast hücre hattına kıyasla osteosarkom hücre hattında MEG3'ün aşırı ekspresyonunu göstermiştir. Bu lncRNA'nın yıkılması, miR-127 ekspresyonunu modüle ederek hücrelerin büyümesini ve metastazını inhibe etmiş ve osteosarkom hücre hattında apoptozisi indüklemiştir (214). Bununla birlikte, osteosarkom hücre hatlarında ve klinik örneklerle yapılan diğer çalışmalar, söz konusu çalışmanın sonuçlarını doğrulamamıştır (215-217). Yakın zamanda yapılan bir pilot çalışmada ise, KRK hastalarından elde edilen plazma örnekleri kanserli olmayan kontrollere göre daha yüksek MEG3 seviyeleri göstermiştir (218).

Tablo 2.2. MEG3 geninin çeşitli kanser türlerindeki ifade düzeyi.

Kanser Türü	İfade Motifi	Hedefleri/Düzenleyicileri	Sinyal Yolağı	Referans
Mesane Kanseri	Azalan	p53, MMP2, MMP9, Kaspaz-3, bax	-	(219)
Akciğer Kanseri	Azalan	Skp2, p27, miR-3163	-	(210)
Meme Kanseri	Azalan	GRP78, IRE1, PERK, ATF6, CHOP Kaspaz-3, NF-κB, p53	NF-κB ve p53	(220)
Mide Kanseri	Azalan	p53	-	(213)
Kolon Kanseri	Azalan	Clusterin	Vitamin D	(221)
Pankreas Kanseri	Azalan	Siklin E1, CDK1, Siklin D1, CDK4 Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2, miR-183, BRI3	p38/ERK/AKT ve Wnt/β-Catenin	(222)
Serviks Kanseri	Azalan	Rac1	Rac1	(223)
Prostat Kanseri	Azalan	Bcl-2, Bax, Kaspaz 3, Siklin D1	-	(224)
Osteosarkoma	Azalan	Notch1, Hes1, TGF-β, N- Kaderin E-Kaderin, miR-664a	-	(215, 217)
	Artan	miR-127, ZEB1	JNK ve Wnt	(214)
Retinoblastoma	Azalan	-	Wnt/β-catenin	(225)
Glioma	Azalan	Sirt7, Bax, caspase-3/-9, Beclin- 1 p62, LC3-II/LC3-I	PI3K/AKT ve mTOR	(226)
Lösemi	Azalan	miR-147, DNMT1, JAK2, TYK2 STAT3, HDAC1, DNMT3B, MBD2, MECP2	JAK/STAT	(227)

2.5.2. LncRNA MEG3'ün Diagnostik ve Prognostik Önemi

Son yıllarda yapılan çalışmalar GAS5, p21, H19, HOTAIR ve PTENP1 gibi bazı lncRNA'ların hücre proliferasyonunu, invazyonu ve metastazı etkileyerek tümör baskılamasında rol oynayabileceğini öne sürmektedir (228-233). Ayrıca, bazı lncRNA'ların ifadesi kanserde kemoterapinin etkinliği ile ilişkilidir (234-236). Bu nedenle, bazı lncRNA'lar kanser tedavisi için potansiyel terapötik hedef olmanın yanı sıra kanserlerin tanı ve prognozu için de biyo-belirteçler olarak kullanılabilir (166, 237-240).

MEG3, birçok normal dokuda eksprese eden bir lncRNA'dır. Bununla birlikte, birçok insan tümöründe ve tümör kökenli hücre hatlarında sıklıkla kaybolur veya mutasyona uğrar ya da ifadesi azalır (198, 237, 241). MEG3 ifadesinin normal haline döndürülmesi tümör hücresinin proliferasyonunu inhibe eder ve hücrede apoptozisin yanı sıra otofajiyi indükler (215, 242, 243). Bu bulgular, MEG3'ün tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olan lncRNA'lardan biri olduğunu düşündürmektedir (17).

2.5.2.1. LncRNA MEG3'ün İfade Düzeyi ile Kanser Arasındaki İlişki

Beyin, adrenal bez, plasenta, testis, yumurtalık, pankreas, dalak, meme bezi ve karaciğer dahil olmak üzere çeşitli dokularda bol miktarda MEG3 ifadesi olduğu gösterilmiştir (198). Son çalışmalar çeşitli primer insan kanserlerinde MEG3 seviyelerinin düştüğünü göstermiştir (Tablo 2.1). Örneğin akciğer kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, osteosarkoma ve gliomada MEG3 ekspresyon seviyesi azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda MEG3 delesyonunun genellikle daha agresif kanserlerle ilişkili olduğu ve MEG3 seviyesinin meninjiyomlarda tümör derecesi ve prognozla ilişkili olduğunu bildirilmiştir (198).

Yin ve ark., 62 kolorektal kanser vakasını analiz etmiş ve düşük MEG3 seviyesinin daha düşük patolojik derece, daha derin tümör invazyonu ve ileri TNM (tümör düğümü metastazı) evresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (20). Li ve ark., invaziv NFPA'larda invaziv olmayan NFPA'lara kıyasla MEG3 ekspresyon düzeyinin anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir (244).

Sun ve ark., ifade seviyesi düşen MEG3'ün kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ve mide kanserinde hücre proliferasyonunu desteklediğini bildirmiştir (245). Bu bulgular, MEG3 seviyesinin sadece kanser gelişimine katkıda bulunmadığını, aynı zamanda kanserin patolojik derecesi ve kanser hastalarının prognozu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Son zamanlardaki meta-analiz çalışmaları ayrıca MEG3 seviyesinin kanser evreleri ve sağ kalım sonuçları ile ilişkisini de göstermektedir (237).

2.5.2.2. MEG3 Hücre Proliferasyonunu Baskılar ve Apoptozisi İndükler

MEG3'ün in-vivo işlevini incelemek için birkaç Meg3 nakavt (KO) fare modeli kullanılmıştır. Zhou ve ark. ilk beş eksonu ve Meg3 promotörünün küçük bir kısmını içeren 5 kb genomik bölgenin delesyonuna sahip olan fare modeli oluşturmuşlardır (246). Paternal alel delesyonuna sahip fareler canlı ve normaldir. Bununla birlikte, maternal alel delesyonu sonucunda farelerde majör iskelet kası defekti meydana geldiği için doğumdan hemen sonrasında fareler ölmüştür. Ayrıca bu farelerde hem Meg3 hem de Meg3'ün akış aşağısındaki Meg8 geninin ifadesi kayıptır. Takahashi ve diğ. MEG3-DMR ve Meg3 geninin ilk beş ekzonunu içeren genomun 10 kb'lık bölgesini delesyona uğratarak başka bir Meg3 KO fare modeli oluşturmuştur; maternal alelde delesyonu olan fareler doğumdan 4 hafta sonra ölmüştür (247). Şaşırtıcı bir şekilde, homozigot delesyonu olan fareler hayatta kalarak sağlıklı bir yetişkin olmuşlardır (247). Takahashi'nin KO farelerinde IG-DMR'nin metilasyon durumu etkilenmemiş (247), ancak Zhou'nun KO farelerinde IG-DMR bölgesi hipermetillenmiştir (246). Bu, MEG3-DMR'nin IG-DMR'nin metilasyon durumunu etkileyebileceğini ve Meg3-DMR delesyonundan sonra IG-DMR'nin metile olacağını göstermektedir. Bu nedenle, Meg3-DMR'nin olası işlevlerinden biri, akış aşağısındaki MEG'lerin ifadenmesine izin veren IG-DMR bölgesindeki aktif (metillenmemiş) durumun muhafaza edilmesidir. Gordon ve ark. ürettikleri Meg3 KO fare modelinde, Meg3'den yoksun embriyolarda beyin mikrodamar oluşumunda artış olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu MEG3'ün anjiyogenez yolağındaki genlerin aktivitelerini etkileyebileceğini düşündürmektedir (246, 248).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çeşitli hücre hatlarında CDKN2A ve MEG3 geninin ifade düzeylerini belirleyebilmek amacıyla Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'nın azot tankından alınan hücrelerin, optimal büyüme koşullarının sağlanması ve kültüre edilmesi için ATCC (ATCC, Teddington, UK)'nin her bir hücre için önerdiği protokoller takip edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve her bir hücre hattı için kullanılan besiyerleri, Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ve antibiyotik oranları Tablo 3.1'de verilmiştir. Tüm hücreler CO₂ oranı %5, nem oranı %95 ve 37°C sıcaklıktaki inkübatörde kültüre edilmiştir.

Tablo 3.1. Her bir hücre için çalışmada tercih edilen besiyeri çeşidi, FBS ve antibiyotik oranları.

Hücre Adı	Kökeni	Besiyeri	FBS Oranı	Antibiyotik Oranı
HGC 27	Mide kanseri	DMEM	%10	%1
HE-LA	Serviks kanseri	DMEM	%10	%1
HL-60	Lösemi	RPMI	%10	%1
PANC1	Pankreas kanseri	DMEM	%10	%1
HUV-EC-C	Göbek kordonu	RPMI	%10	%1
A-172	Glioblastoma	DMEM	%10	%1
BEAS-2B	Akciğer, bronş	RPMI	%10	%1
A549	Akciğer kanseri	RPMI	%10	%1
Nthy-ori 3-1	Tiroid folüler epitel	RPMI	%10	%1
B-CPAP	Tiroid karsinom	RPMI	%10	%1
CAL-29	Mesane kanseri	DMEM	%10	%1
LNCaP	Prostat kanseri	RPMI	%10	%1
DU 145	Prostat kanseri	RPMI	%10	%1
PNT1A	Normal prostat	RPMI	%10	%1
PC-3	Prostat kanseri	RPMI	%10	%1
DLD-1	Kolorektal kanser	DMEM	%10	%1
HT-29	Kolorektal kanser	DMEM	%10	%1
HCT-116	Kolorektal kanser	DMEM	%10	%1
HCC-1500	Meme kanseri	RPMI	%10	%1
hTERT-HME1	Normal meme bezi	RPMI	%10	%1
MCF-7	Meme kanseri	DMEM	%10	%1
SK-BR-3	Meme kanseri	DMEM	%10	%1

MDA-MB-231	Meme kanseri	DMEM	%10	%1
2-A	Fetal böbrek	RPMI	%10	%1
HEK-293	Embriyonik böbrek	DMEM	%10	%1
Hep G2	Hepatoselüler karsinom	DMEM	%10	%1
SNU-423	Hepatoselüler karsinom	DMEM	%10	%1
hFOB 1.19	Osteoblast	Ham's F12 DMEM	%10	%1
OST-7	Osteosarkoma	DMEM	%10	%1
U-2 OS	Osteosarkoma	DMEM	%10	%1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Scientific, California, USA) **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (Sigma, Deisenhofen, Almanya) **Antibiyotik:** Penisilin/Streptomisin (Sigma, Deisenhofen, Almanya)

3.1.1. Hücre Sayımı

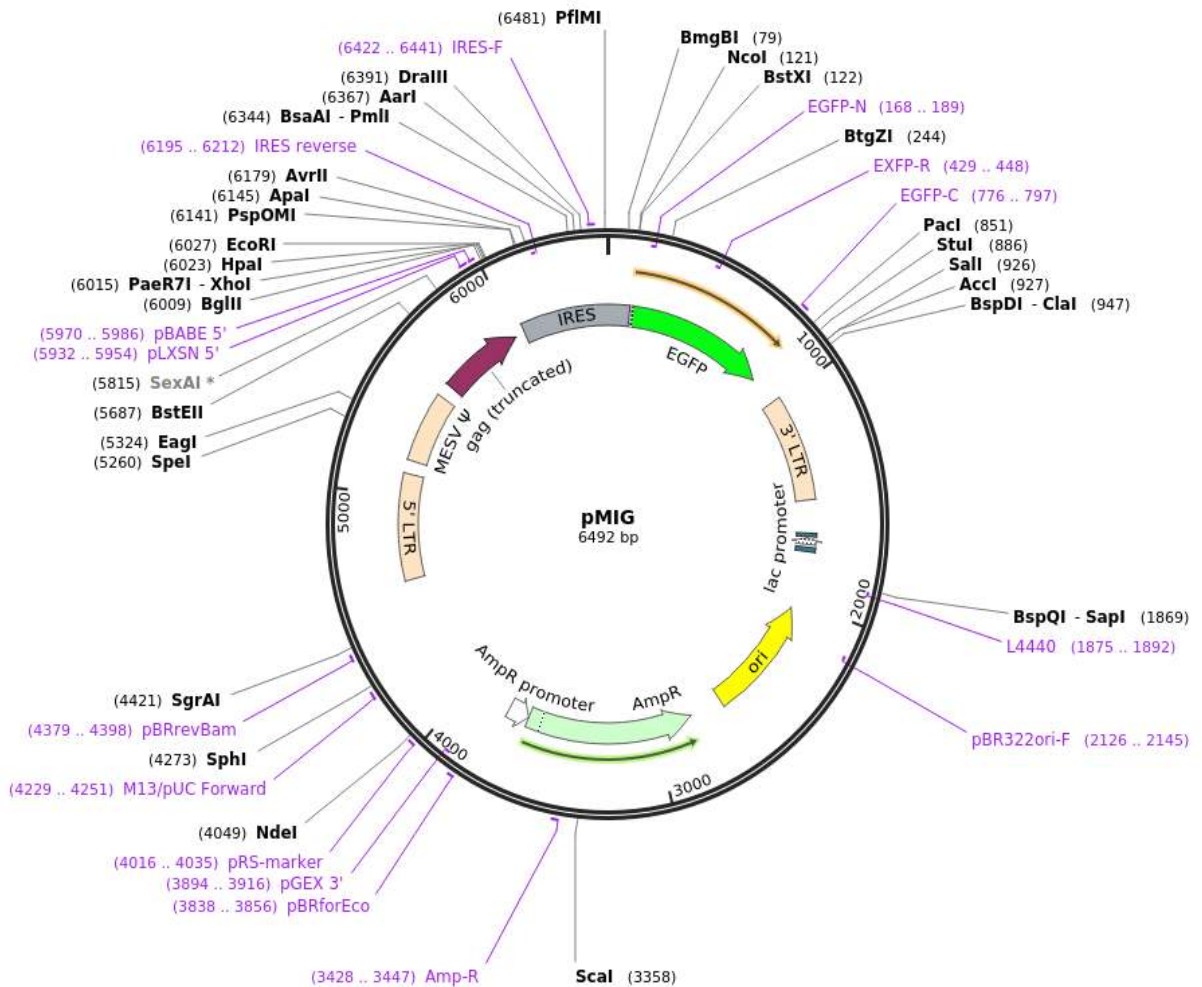
Hücreleri saymak için hücre sayım cihazı (EVE™ Automated Cell Counter) kullanılmıştır. Hücreler %0.25 Tripsin-EDTA (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ile kaldırılıp santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süspansiyon edilerek Tripan mavisi boyası ile 1:1 oranda karıştırılarak hücre sayım aparatına koyularak cihazda okuması yapılmıştır. Bu test ile canlı hücreler, zar bütünlüğü bozulmamış olduğundan Tripan mavisi boyasını içerisine alamayacağı için kolayca tespit edilmektedir. Ölü hücrelerin sitoplazmaları mavi olarak görünmektedir.

3.1.2. Hücre Pasajı

Çalışmada kullanılan HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinin koloni, plazmid transfeksiyonu, MTT ve yara iyileşme deneylerinde kullanılmaya kadar pasajlarının devam ettirilmesi için T25'lik ve T75'lik flasklar kullanılmıştır. T25'lik flasklarda %100 yoğunluğa erişen hücreler, 2 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) çözeltisiyle dikkatlice yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 3 dk boyunca 37°C'lik sıcaklıkta 2 ml %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskop altında kontrollü şekilde gözlemlenmiş, tamamen yüzeyden ayrıldıklarında Tripsin aktivitesini sonlandırmak amacıyla 6 ml %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Serolojik pipet yardımıyla flastaki hücre çözeltisi dikkatlice toplanarak 50 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre çözeltisi 4000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Çöken hücreler 1:3 oranında seyreltilerek T25'lik flasklara veya 1:2 oranında seyreltilerek T75'lik flasklara tekrardan ekilmiştir.

3.2. MEG3 Genine Uygun Plazmid Seçilmesi

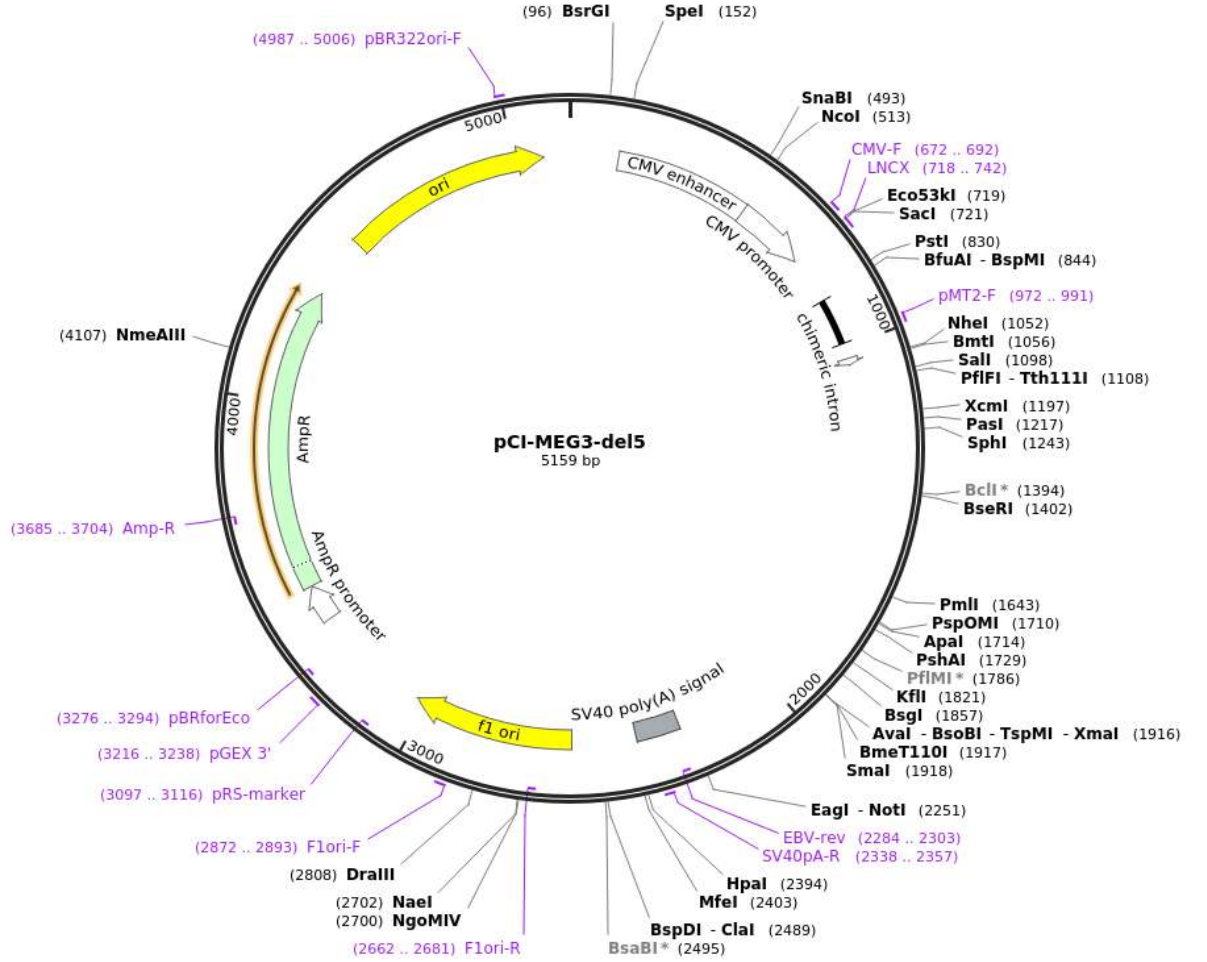
Addgene Deposit Plasmids plazmid veri tabanı kullanılarak, çalışmamıza uygun MEG3 plazmidleri seçilmiştir (249). Boş plazmid (pMIG), MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b (MEG3 izoformu), çalışmada kullanılmak üzere Addgene (Addgene, Watertown, USA)’den temin edilmiştir. Tüm plazmidler agara gömülü halde satın alınmıştır. Çalışmada kullandığımız plazmidlerin gen haritaları Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Boş plazmidin gen haritası.

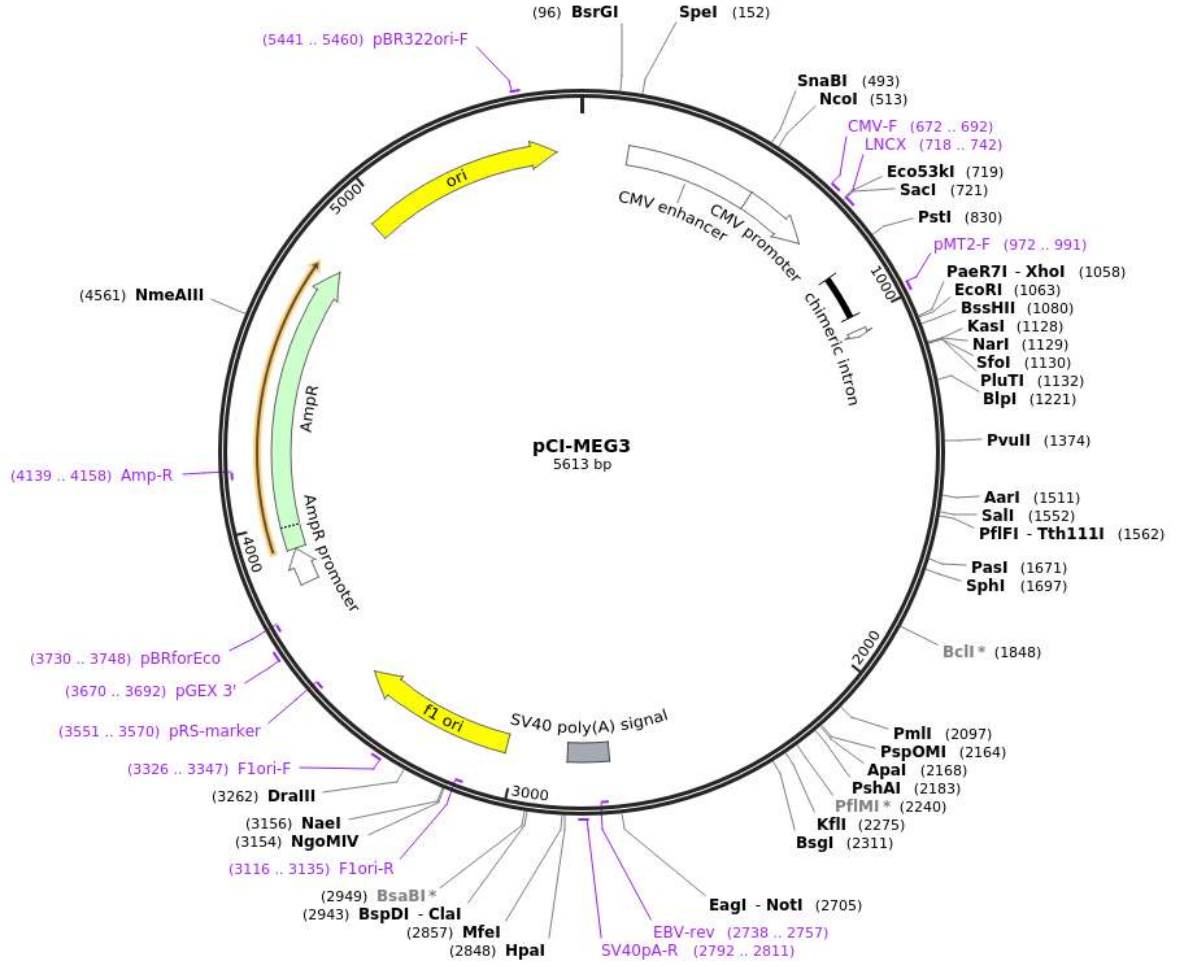
Çalışmada boş plazmid olarak, pMIG plazmidi kullanılmıştır. Plazmidin aktarıldığı bakteri suşu Stbl3'tür. Plazmidin omurga büyüklüğü 6492 bp uzunlukta olup, Ampisilin

direnç geni ve IRES-GFP (Yeşil Floresan Proteini) füzyon geni bulundurmaktadır. (Addgene Deposit Plasmids).



Şekil 3.2. MEG3-del5 plazmidinin gen haritası.

MEG3-del5 plazmidi MEG3 geninin 1200 bp'lık kısmını içerir. Bu plazmid, MEG3'ün ilk 450 bazlık kısmının delesyona uğratılmasıyla elde edilmiştir. Plazmidin omurga büyüklüğü 4006 bp uzunlukta olup, rekombinant plazmid uzunluğu 5159 bp'dir. Amphisilin direnç geni bulundurmaktadır. (Addgene Deposit Plasmids).



Şekil 3.3. MEG3 plazmidinin gen haritası.

Bu çalışmada MEG3 geninin memeli hücrelerindeki kopya sayısını arttırmak amacıyla pCI-MEG3 rekombinat plazmidi kullanılmıştır. MEG3 rekombinat plazmidi, MEG3 geninin 1600 bç'lik kısmını içerir. Plazmidin aktarıldığı bakteri suşu DH5alpha'tür. Plazmidin omurga büyüklüğü 4006 bç uzunlukta olup, rekombinant plazmid uzunluğu 5613 bç'dir. Amphisilin direnç geni bulundurmaktadır. (Addgene Deposit Plasmids).

3.3. Bakteri Ekimi ve Plazmid oğaltılması

3.3.1. LB Agar Besiyeri Hazırlanması ve Bakteri Ekimi

12 g agar-agar (Cat: 05039) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ve 25 g LB Broth (Cat: 1.10285) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) tartılarak 1 litre suda çözdürüldü ve 121 °C ve 1 atm basınç altında otoklavlandı. Otoklavdan ıkarılan besiyeri 55-60 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra 100 ul, 100 ug/ul ampisilin eklenerek karıştırıldı. Agarlı besiyeri karışımı petrilere döküldü. Soğuyup katılaşılan agarlı besiyerleri ilerleyen aşamalarda kullanılmak üzere, 4 °C'de saklandı.

MEG3 geninin ifade seviyesini arttırabilmek için MEG3 plazmiti taşıyan, transforme bakteriler satın alındı. Agara gömülü halde elimize ulaşan transforme hücrelerden saf kültür elde edilmek için, agarlı besiyerlerine öze yardımıyla ekim yapıldı. Ekim yapılan agarlı besiyerleri 24-72 saat 37 °C'de saf koloniler oluşuncaya kadar inkübasyona bırakıldı.

3.3.2. Sıvı Besiyeri Hazırlanması ve Bakteri Ekimi

25 g LB Broth tartılarak 1 litre suda özdürölerek 121 °C ve 1 atm basınç altında otoklavlandı. Otoklavdan ıkarılan besiyeri 55-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 100 ug/ul ampisilin eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan karışım plazmid çoğaltımında kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı.

Petrilere saf kültür ekimi yapılan tekli koloniler, bek alevi etrafında öze yardımıyla alınarak, 15 ml'lik falcon tüplerdeki sıvı besiyerlerine ekildi. Ekim sonrasında sıvı besiyerleri 37 °C'deki çalkalamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.4. Bakteri Stoğu Hazırlanması ve Saklanması

Sıvı besiyerinde gece boyunca çoğaltılan koloniler daha sonra kullanmak üzere her plazmid izolasyonu öncesinde stoklanarak -80 °C'de saklanmak üzere stoklanmıştır. Addgene'den temin edilen bakteri kültürlerinin korunması amacıyla aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- Saf gliserolden 1:1 oranında gliserol: dH₂O olacak şekilde gliserol çözeltisi hazırlanır.
- Bakteri büyümesini takiben sıvı besiyeri tüplerinin ağız kısımları alevden geçirilir.
- Tüplerden dikkatli şekilde 500 µl kültür süspansiyonu alınarak, 2 ml'lik ependorf tüp içerisine konulur.
- %50 oranındaki gliserol çözeltisinden 500 µl alınarak kültür karışımına yavaşça eklenir ve nazikçe karıştırılır.
- Gliserol ve bakteri kültürünün homojen şekilde karıştığından emin oluktan sonra stoklar beklemeden 80 °C'ye kaldırılır.

3.5. Plazmid İzolasyonu

Çalışmada kullanılan kontrol (pMIG), MEG3-Del5, MEG3 ve MEG3b plazmitleri sıvı besiyeride gece boyu inkübe edildikten sonra koloniler, besiyeri bulanıklaştıktan sonra bek alevinin etrafında dikkatli şekilde 1.5-5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Plazmid DNA'yı saflaştırmak için Biobasic EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit (Cat: BS4139) (Biobasic, Markham, Kanada) kullanıldı. Plazmid saflaştırılması için aşağıda verilen protokol izlenmiştir.

- Ependorf tüplere aktarılan besiyerleri 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlenir. Sıvı kısım tamamen uzaklaştırılır.
- Geride kalan pelete 100µl Solüsyon I eklenip, iyice karıştırılır ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- Elde edilen karışıma 1µl VisualLyse eklenir (Bu aşama isteğe bağlıdır).
- Karışıma 200µl Solüsyon II eklenir ve tüp 4-6 defa alt üst edilerek hafifçe karıştırılır. Sonrasında 1 dakika boyunca oda sıcaklığında tutulur. Genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için vorteksten kaçınılmalıdır.
- VisualLyse eklenmişse, Solüsyon II'nin eklenmesinden sonra çözelti maviye dönecektir. Homojen mavi renkteki süspansiyon da gözlemlenmelidir. Süspansiyon düzensiz mavi renk veya beyaz / kahverengimsi hücre kümeleri içeriyorsa, dikkatlice karıştırmaya devam edilir.

- 350µl Solüsyon III eklenir ve yavaşça karıştırılır. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir. İnkübasyonu takiben kabarık beyaz bir madde oluşur. Oluşan lizat daha az viskoz hale gelmelidir. VisualLyse eklenmişse, tüm mavi renk gidene kadar ve lizat renksiz hale gelinceye dek süspansiyon karıştırılmalıdır.
- 12,000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenir.
- Santrifüj sonrasında süpernatant EZ-10 kolonuna aktarılır. 10,000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenir.
- Tüpün altındaki sıvı kısım boşaltıldıktan sonra kolona 750 µl yıkama solüsyonu eklenir ve 2 dakika boyunca 10,000 rpm’de santrifüjlenir.
- Yıkama prosedürünü tekrarlanır.
- Santrifüjden sonra kolonun altındaki sıvı atılır.
- Kolondaki fazla sıvının uzaklaştırılması için ilave olarak 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
- Kolon temiz bir 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarılır. Kolonun orta kısmına 50 µl elüsyon tamponu eklenir ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenir.
- Elde edilen sıvı kısım saflaştırılmış DNA’yı içerir. Kalite tayini için NanoDrop’ta saflık ölçümü yapıldıktan sonra -20 °C’de saklanır.

3.6. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi

Transfeksiyondan 18 ila 24 saat önce, HCT-116 ve HT-29 hücre hatları uygun kültür koşullarında 12 kuyulu kültür kaplarına ekildi. Hücreler transfeksiyon sırasında %70 ila %90 yoğunluğa erişene kadar 37 °C sıcaklıktaki CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon için DNAfectin™ Plus Transfeksiyon Reagent (ABM Good, Kanada) protokolü izlenmiştir. Transfeksiyon protokolü aşağıda verilmiştir:

- 200 µl serumsuz, antibiyotik içermeyen besiyerine 2.0 µg DNA eklenir (Solüsyon A).
- DNAfectin™ Plus, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilir ve hafifçe vortekslenir.
- Solüsyon A’ya 6 µl DNAfectin™ Plus eklenir.
- Çözeltiyi tamamen homojenize etmek için birkaç kez yavaşça pipetaj yapılır.

- DNAfectin™ Plus-DNA kompleksi oluşturmak için oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir. Oluşan kompleks oda sıcaklığında 3-5 saat stabil kalabilir.
- DNAfectin™ Plus-DNA kompleksi kültür kabının farklı bölgelerine yavaşça damla damla aktarılır. Kompleksin eşit olarak dağılması için kültür kabı yavaşça ileri-geri ve sağa-sola sallanır.
- Transfekte edilen hücreler 12-16 saat boyunca uygun koşullarda inkübe edilir. DNAfectin™ Plus ile transfeksiyonun ardından kültür ortamının değişimi gerekli değildir. Ancak hassas hücre hatları için kültür ortamı transfeksiyondan sonraki 6-24 saat arasında değiştirilebilir.
- İlgili yöntemler kullanılarak transfeksiyondan sonraki 24-72 saat süresince transfeksiyon verimliliği izlenir.

3.7. Total RNA İzolasyonu

Transfeksiyondan önce Tablo 3.1’de verilen hücre hatlarının tamamı gen ekspresyon düzeyi ölçümünde kullanılmak üzere, uygun koşullarda çoğaltıldıktan sonra Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak kaldırılmıştır. HCT-116 ve HT-29 hücre hatları da uygun koşullarda çoğaltılıp plazmid ile transfekte edildikten sonra, Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak kaldırılmıştır. Roche High Pure RNA izolasyon kiti (Cat : 11828665001) (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak aşağıdaki yöntemle Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak kaldırılmış tüm hücrelerden RNA eldesi yapılmıştır.

- 1- Hücre kültüründen uygun yöntemlerle elde edilen süspanse hücreler $8,000 \times g$ ’de 5 dk boyunca santrifüjlenir, üst faz uzaklaştırılır.
- 2- Peletin üzerine 200 μ l PBS eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra üzerine 400 μ l Lysis / Binding Buffer eklenerek 15 s vortekslenir.
- 3- Filtreli tüplerin alt kısmına toplama tüpleri (Collection Tube) takılır ve örnekler filtreli tüpe tek seferde en fazla 700 μ l örnek olacak şekilde eklenir.
- 4- $8,000 \times g$ 15 saniye santrifüjlenerek, toplama tüpleri yenisiyle değiştirilir.
- 5- Her bir örnek için 10 μ l DNase ve 90 μ l DNase incubation buffer karışımı toplam 100 μ l olacak şekilde eklenir.
- 6- 30 dakika oda sıcaklığında (+15 ile +25°C) bekletilir.
- 7- 500 μ l Wash Buffer I ilave edilir.
- 8- $8,000 \times g$ ’de 15 saniye santrifüjlenerek, toplama tüpleri yenisiyle değiştirilir.

- 9- 500 µl Wash Buffer II ilave edilir.
- 10- 8,000 × g'de 15 saniye santrifüjlenerek, toplama tüpleri değiştirilir.
- 11- 200 µl Wash Buffer II ilave edilip, 2 dakika en yüksek devirde santrifüjlenir.
- 12- Filtreli tüp temiz 1.5 ml'lik kapaklı tüplere alınır.
- 13- Filtrenin üzerine 50 µl elution buffer eklenerek, 1 dakika 8,000 rpm'de santrifüjlenir.
- 14- Santrifüj sonrası kapaklı tüpler RNA içermektedir.
- 15- Elde edilen RNA küçük miktarlarda tüplere bölünerek, kullanacağımız vakte kadar -80°C'de saklanır.

3.8. Elde Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

CDKN2A ve MEG3 genlerinin sağlıklı insan dokularındaki ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere Doku Paneli RNA'ları (Cat. No: 636643, Human Total RNA Master Panel II, Clontech Laboratories) ticari olarak temin edilmiştir. CDKN2A ve MEG3 genlerinin çeşitli hücre hatlarındaki ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere elde edilen hücre hattı RNA'larının; transfekte edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarından elde edilen RNA'ların; ve ticari olarak temin edilen doku RNA'larının deneyde kullanılmaya elverişli olup olmadığını tayin edebilmek için RNA konsantrasyonu ve kalite tayini için spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için NanoDrop ND-1000TM (Thermo Scientific, US) kullanılarak nicel ölçüm yapılmıştır.

3.9. cDNA Sentezi

Çalışmada kullanılan RNA'lardan cDNA eldesi için Revert Aid First Strand DNA kit (Cat: K1621) (Thermo Scientific, California, USA) kullanılmıştır. Tablo 3.2'deki miktarlar kullanılarak; doku, hücre hatları ve transfekte edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarından elde edilen kalıp RNA ve primer PCR tüpüne konulduktan sonra toplam hacim su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır.

Tablo 3.2. Tek sarmal cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar
Kalıp RNA	Hücre soylarından elde edilen RNA
Primer	Random Hexamer Primer
Su	12 µl'ye tamamlanır.

Elde edilen karışım Sensoquest PCR cihazı kullanılarak, 5 dk 65 °C'de bekletilmiş ve hemen ardından buz üzerine alınarak sırasıyla Tablo 3.3'e göre PCR tüpüne ekleme yapılmıştır.

Tablo 3.3. cDNA eldesi

Bileşen	Miktar
5x Reaction Buffer	4 µl
Ribolock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT	1 µl

PCR karışımı yeniden cihaza konularak önce 5 dakika 25 °C'de sonra 60 dakika 42 °C'de bekletilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.10. Elde Edilen cDNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

Doku, hücre hatları ve transfeke edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücre hattı RNA'larından elde edilen cDNA'ların, deneyde kullanılmaya elverişli olup olmadığını tayin edebilmek için cDNA konsantrasyonu ve kalite tayini için spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için NanoDrop ND-1000TM (Thermo Scientific, US) kullanılarak nicel ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonrası cDNA'ların konsantrasyonları Real Time PCR'da kullanılmak üzere ddH₂O ile 150 ng/ µl'e sulandırılmıştır.

3.11. Primer Tasarımı

Gen ifade seviyelerini belirlemek için ilgili genlerin bazı bölgelerine özgül primerler tasarlanmıştır. RNA izolasyonu sırasında olası DNA kirliliğini önlemek ve sadece RNA transkriptini çoğaltmak için primerler ekzon-ekzon bağlantı bölgelerine tasarlanmıştır. Referans gen olarak Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) geni seçilmiştir. Primerler NCBI veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (250). Tasarımı yapılan primerlerin forward ve reverse dizilimleri, ürün boyutu ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi için dizayn edilen primer dizilimleri ve özellikleri.

GEN ADI	İLERİ	TM	GERİ	TM	Bağlanma Sıcaklığı
CDKN2A	CTCGTGCTGATGCTACTGAGGA	66.7	GGTCGGCGCAGTTGGGCTCC	73.1	66.7
CASC3	GGACTTGAGCAAGATGTGGCAC	66.7	AAACTGAGGTGGAGGTCCTGCT	68.5	66.7
RELA	TGAACCGAACTCTGGCAGCTG	68.1	CATCAGCTTGCGAAAAGGAGCC	67.2	67.2
AURKA	GCAACCAAGTGTACCTCATCCTG	65.8	AAGTCTTCAAAGCCCACTGCC	68.3	65.8
HUWE1	CGGCTTTTCTGAAGAAGGGAC	66.3	GTTTCAAAGGCTTCAGAGCAGC	67.3	66.3
TOP1	GAACAAGCAGCCCGAGGATGAT	67.8	TGCTGTAGCGTGATGGAGGCAT	69.2	67.8
VHL	GACACACGATGGGCTTCTGGTT	67.9	ACAACCTGGAGGCATCGCTCTT	69.2	67.9
CCDN1	TCTACACCGACAACCTCCATCCG	66.6	TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG	65.8	65.8
SIVA1	GCAGATGCTGATTGGACCAGAC	66.4	CTCGCTCACACTGACCGCAGA	69.3	66.4
EGR1	AGCAGCACCTTCAACCTCAGG	69.7	GAGTGGTTTGGCTGGGGTAACT	67.6	67.6
PCNA	CAAGTAATGTCGATAAAGAGGAGG	69.7	GTGTCACCGTTGAAGAGAGTGG	65.8	65.8
SP1	ACGCTTCACACGTTCCGATGAG	69.7	TGACAGGTGGTCACTCCTCATG	66.7	66.7
RAF1	TCAGGAATGAGGTGGCTGTTCTG	67.4	CTCGCACCACTGGGTCACAATT	68.1	67.4
TFDP1	CACTTTGCCTCTCAGAACCAGC	66.5	CTTCTCTGCACCTTCTCGCA	67.6	66.5
KAT2B	GCACCATCTCAACGAAGACTGC	66.6	GTGTGGTTTCGTACCGAGGTAG	65.3	65.3
E2F1	GGACCTGGAACTGACCATCAG	65.6	CAGTGAGGTCTCATAGCGTGAC	65.2	65.2
MAPK8	GACGCCTTATGTAGTGACTCGC	65.6	TCCTGGAAAGAGGATTTTGTGGC	66.1	65.6
P53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	65.2	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	66.8	65.2
GAPDH	AGACCACAGTCCATGCCATCAC	67.6	GGTCCACCACCTGTTGCTGT	70.0	67.6
MEG3	CCACTCCCAGTTCAATTACAGCTC	66.1	TAGTGCCCTCGTGAGGTGTAG	66.0	66.0

3.12. Gen ifade analizi

Real Time PCR (qPCR) veya Eşzamanlı PCR teknolojisi DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını güvenilir bir şekilde tespit edebilen, son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir. Real Time PCR, polimeraz zincir tepkimesi teknolojisi için önemli bir gelişmedir. Bu teknik, hedef bir diziye hibridize olması için tasarlanmış bir oligonükleotid probunun, diziye hibridizasyonunu mümkün kılar. Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesi, PCR esnasında probun bölünmesine neden olarak, hedef ürünün amplifikasyonunu nicel olarak belirler (251).

CDKN2A hedef genleri ve MEG3 geninin, HCT 116 ve HT-29 hücre hatlarındaki ve sağlıklı insan dokularındaki bazal seviyesini tespit edebilmek için transfeksiyondan önce Qiagene Rotor-Gene Q (Cat: 9001550) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) Real Time PCR cihazı kullanılarak qPCR yapılmıştır. Bu genlerin ifade düzeylerini değerlendirebilmek için GAPDH geni, kullanılmıştır. qPCR'da kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.5, Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'de, PCR koşulları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.5. CDKN2A hedef genleri için qPCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktarı (µl)
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	7,5
CDKN2A Hedef Primeri R	0,5
CDKN2A Hedef Primeri F	0,5
Su	4,5
Kalıp	2

Tablo 3.6. MEG3 geni için qPCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktarı (µl)
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	7,5
MEG3 Primeri R	0,5
MEG3 Primeri F	0,5
Su	4,5
Kalıp	2

Tablo 3.7. GAPDH geni için qPCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktarı (µl)
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	7,5
GAPDH F Primeri	0,5
GAPDH R Primeri	0,5
Su	4,5
Kalıp	2

Tablo 3.8. qPCR döngü koşulları.

Adım	Süre	Sıcaklık
Etkinleştirme Adımı	15 dk	95 °C
3-Adımlı Döngü:		
Denatürasyon	15 s	94 °C
Bağlanma	30 s	55 °C
Uzama	30 s	70 °C
Döngü Sayısı	40 döngü	

Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için, Real Time PCR yöntemi ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Tüm genlerin ifade seviyelerini belirlemek için referans gen (hamarat, housekeeping gene) olarak GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) kullanılmıştır.

Real Time PCR sonuçlarına istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır (252).

$\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}$

3.13. MTT Hücre Canlılığı Testi

Hücre proliferasyon analizleri için MTT testi kullanıldı. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksiteyi analiz etmeye yarar. Hücredeki metabolik aktiviteye dayalı olarak canlı hücre miktarı hakkında fikir veren kolorimetrik bir ölçüm metodudur. Bu yöntem MTT'nin hücresel mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından yıkılmasına dayanır. Canlı hücrelerde sarı renkteki MTT aktif biçimde yıkıma uğrayarak mor renkteki bileşenlere ayrışır. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı 500-600 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülür. Canlı hücre sayısı arttıkça, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi yükselmekte ve ölçülen absorbans artmaktadır (253).

HCT-116 ve HT-29 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Her kuyuya 2 ml DMEM eklenerek hücreler 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübe edildi. 24 saatin sonunda yeterli yoğunluğa erişen hücrelerin seçilen 4 kuyusuna kontrol, MEG3-Del5, MEG3 ve MEG3b plazmitleri transfekte edildi. Seçilen bir kuyudaki hücrelere herhangi bir plazmit transfeksiyonu yapılmadan kontrol grubu oluşturuldu ve 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı. Hücreler 24 saatin sonunda tripsinle kaldırılarak sayıldı. Her 24 kuyulu kültür kaplarının her kuyusuna 12.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında, 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakıldı. MTT konsantrasyonu %10 olacak şekilde RPMI içerisinde hazırlanarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiş hücrelerin, besiyerleri uzaklaştırılarak 500 µl MTT eklendi. 4 saat uygun

koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTT uzaklaştırılarak kuyulara 500 µl asidik izopropanol (mutlak izopropanolda hazırlanmış 0.04 M HCl (10 ml izopropanolden 33 µl atılıp yerine 33 µL HCl eklenerek hazırlanır) eklendi. Boyanın homojenize olması için pipetaj yapıldı. Çözünen boya 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak 2 dk 5000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında üst fazdan 250 µl alınarak 96 kuyulu ölçüm kaplarına eklendi. 570 nm dalga boyunda Thermo Scientific™ Multiscan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, California, USA) içerisine yerleştirilerek absorbans ölçümü yapıldı. Deneyler 3'er kez tekrar edildi. Ölçüm sonrası elde edilen OD değerleri GraphPad Prism 7.02 (San Diego, California) programı kullanılarak grafiğe dönüştürülmüştür.

3.14. Koloni Oluşum Deneyleri

Koloni, 50 hücreden oluşan hücre topluluğu olarak tanımlanır. Koloni oluşum deneyi, hücrelerin neslinin devamlılığını ne kadar sağlayabildiği hakkında yorum yapabilmemize olanak veren bir deneydir. Bu deney esasında hücre popülasyonundaki her bir hücrenin “limitsiz” olarak bölünme kapasitesini test etmektedir. Hücre kültüründe iyonize radyasyonun etkisini tespit etmek için kullanılan bir yöntem olmasına rağmen hedef genlerin aşırı ifade edilmesi veya susturulmasının hücre hatları üzerine etkisinin araştırılması için de tercih edilmektedir. Kültür kaplarına ekilen hücrelerin yalnızca bir kısmı koloni üretme kapasitesi gösterir. Koloni oluşturma kapasitesinin ölçümünde, tek bir hücreden en az 50 hücrelik oluşturabilme yeteneğini test eder (254, 255). Bu çalışmada 2 boyutlu koloni oluşum deneyi yapılmıştır.

HCT-116 ve HT-29 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Her kuyuya 2 ml DMEM eklenerek hücreler 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübe edildi. 24 saatin sonunda yeterli yoğunluğa erişen hücrelerin seçilen 4 kuyusuna kontrol, MEG3-Del5, MEG3 ve MEG3b plazmitleri transfekte edildi. Bir kuyudaki hücelere herhangi bir plazmit transfeksiyonu yapılmadan kontrol grubu oluşturuldu. Oluşturulan deney grubu hücreleri 24 saat uygun koşullarda inkübe edildikten sonra tripsinle kaldırılarak sayıldı. 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 1000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin her 3 günde bir besi yeri değişimleri yapıldı. Hücreler koloni oluşturmaya başlayıp, her kolonideki hücre sayısı 50'yi geçtikten sonra (yaklaşık 2 hafta sonra) besi yeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında, 1 ml %70'lik metanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dk boyunca hücreler fikse edildi. 5 dk

sonunda metanol uzaklaştırıldı ve 1 ml %1 kristal viyole eklenerek 15 dk oda sıcaklığında boyama için bekletildi. Arka plandaki fazla boyanın uzaklaştırılması için musluk altında kuyular yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra koloniler ışık mikroskobu altında sayıldı ve görüntüleri alındı.

3.15. Migrasyonun Yara İyileştirme Deneyi ile Tayini

Migrasyon, normal gelişimde, immün cevapta ve kanser metastazı ve yangı gibi hastalık süreçlerinde önemli olan ve canlı hücrelerin anahtar bir özelliğidir. Hücre migrasyonunu test eden yöntemler kanser biyolojisi, immünoloji, vasküler biyoloji, hücre biyolojisi ve gelişim biyolojisi gibi birçok biyomedikal araştırma alanları için kullanışlı ve önemlidir (256). Hücresel migrasyonu çalışma yolları arasında en kolay ve ucuz olan yöntem yara iyileştirme deneyidir. Bu yöntem, bütün hücre kütlelerinin migrasyonunu ölçmek için oldukça basit ve hızlıdır. Dahası, hücrelerin migrasyon sırasındaki morfolojik karakteristiklerinin incelenmesi açısından da kullanılabilir. Yara kapanması analizi sonrasında birçok fenotip ortaya konulabilir. Zamana göre kapanan uzaklığın ölçülmesi ve bu uzaklığın kontrollere göre kıyaslanması özgül migrasyon değişikliklerini veya daha önce bilinmeyen sorunlu bir migrasyon fenotipini ortaya koyabilir. Ayrıca, tek hücre lamellipodun oluşumu, kuyruk geri çekmesi ve hareket yönü hücrelerde neyin sıkıntılı veya artmış olduğu hakkında bilgi verebilir (257). Bu çalışmada hücre migrasyonunu tayin edebilmek amacıyla yara iyileştirme yöntemi kullanıldı. Yara iyileştirme deneyi için aşağıda verilen protokol izlendi.

- HCT-116 ve HT-29 hücreleri %0.25 Trypsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılır. Trypsin aktivitesini durdurmak için hücrelerin üzerine 15 ml %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besi yeri (büyüme çözeltisi) eklenerek 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılır ve 4500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir.
- Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 ml büyüme çözeltisi eklenerek homojenize edilir.
- Tripkan mavisi kullanılarak hücre sayım cihazı ile hücre sayımı yapılır. 6 kuyulu kültür kaplarına, 24 saat sonra %80 yoğunluğa erişecek şekilde 1×10^6 hücre ekilir.
- Seçilen kuyulara kontrol, MEG3-Del5, MEG3 ve MEG3b plazmitleri transfekte edilir ve 24 saat boyunca uygun koşullarda inkübasyona bırakılır.

- 100 µl'lik pipet ucu kullanılarak kültür kaplarının ortasından yukarıdan aşağıya doğru çizgi çekilir. Kuyu yüzeyine zarar verebileceği için pipet ucuyla kültür kabına fazla kuvvet uygulamamaya dikkat edilir.
- Kültür kapları dikkatli bir şekilde HBSS çözeltisi ile iki kez yıkanır. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için kapların içindeki çözelti aspire edilir. Kuyuların altını örtmek ve tutunmuş hücrelerin yüzeyden kopmasını önlemek için kuyu duvarına oldukça hassas şekilde 2 ml besi yeri eklenir.
- Yaranın ortaya çıkması ve incelenmesinin ardından ilk resim çekilir ve kültür kapları inkübatöre yerleştirilir.
- 24 saatlik zaman aralıklarında inkübatörden alınan kültür kaplarının içindeki çözelti uzaklaştırılıp mikroskop altında görüntü alınır ve yara kapanma süreci gözlenir.

Görüntülenen resimlerde boşluklar arasındaki uzunluk Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA) programı kullanılarak ölçülmüştür.

3.16. Biyoinformatik Analizler ve CDKN2A Hedef Tayini

CDKN2A geninin ilişkili olduğu genlerin belirlenmesi için Reactome veritabanı kullanılmıştır. CDKN2A ile ilişkili olduğu deneysel yöntemlerle tespit edilmiş ve 17 hedef gen seçilmiştir (258).

Hedef genlerin plazmid transfeksiyonundan önceki ifade profillemeleri için DISPLAYR veritabanından sıcaklık haritası analizi gerçekleştirilmiştir (259).

3.17. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

Tüm deneyler sonrası elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 7.02 (San Diego, California) programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin ortalama ve standart sapma (SD) değerleri en az 3 bağımsız deney tekrarının hesaplanmasıyla, tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak

verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlılık derecelerini belirlemeden önce Shapiro-Wilk normality test kullanılarak normalite testi yapılmıştır. Gen ifade seviyelerinin değerlendirilmesi, koloni oluşumu, yara iyileşmesi ve MTT sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılmasında, one-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Deney gruplarının karşılaştırılmalarında * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken, anlamlılık dereceleri * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ olarak ifade edilmiştir.

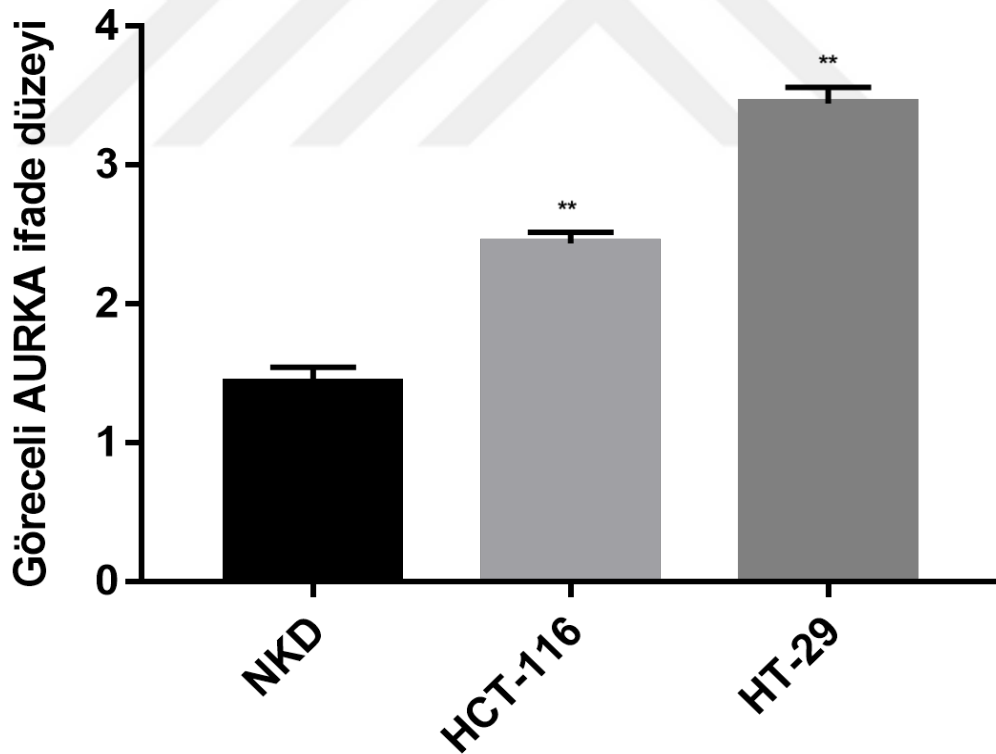


4. BULGULAR

4.1. Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında ve Kolon Dokusunda Transfeksiyon Öncesi Gen İfadeleri

4.1.1. AURKA

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve normal kolon doku (NKD)'sunda AURKA geninin ifade düzeyi Şekil 4.1'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde AURKA geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. AURKA'nın ifade düzeyindeki artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.01$; HT-29 $p<0.01$).

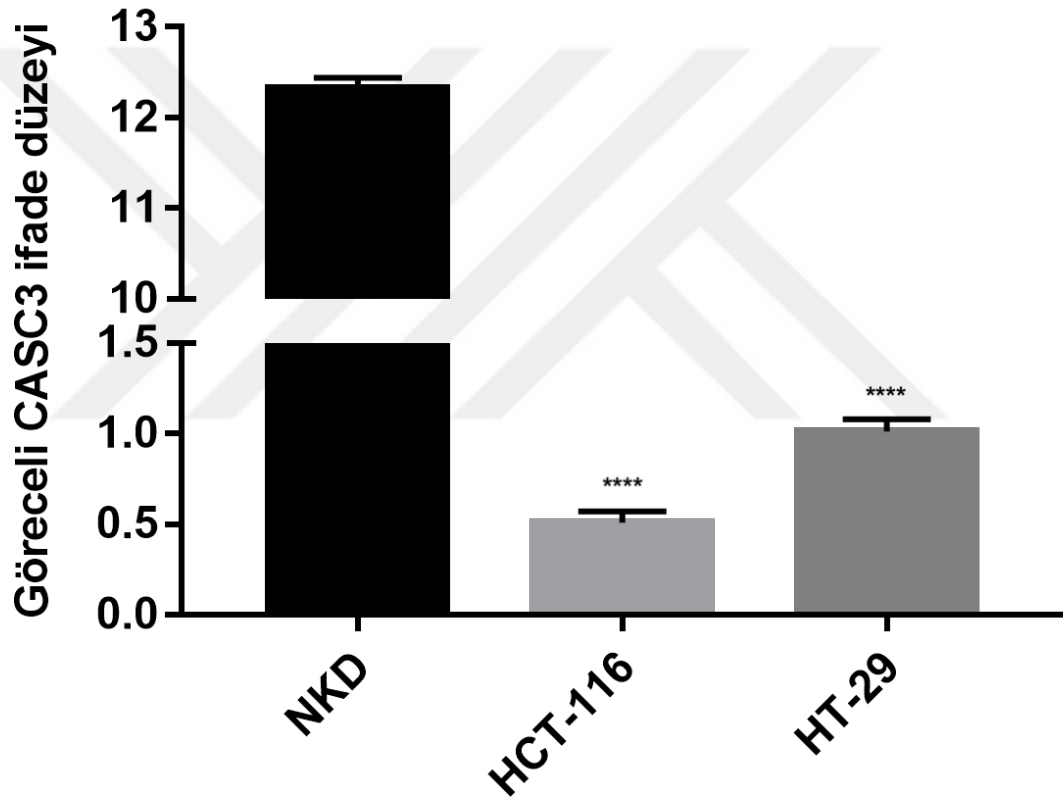


Şekil 4.1. AURKA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki AURKA ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0.01$).

4.1.2. CASC3

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda CASC3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.2'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde CASC3 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. CASC3'ün ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



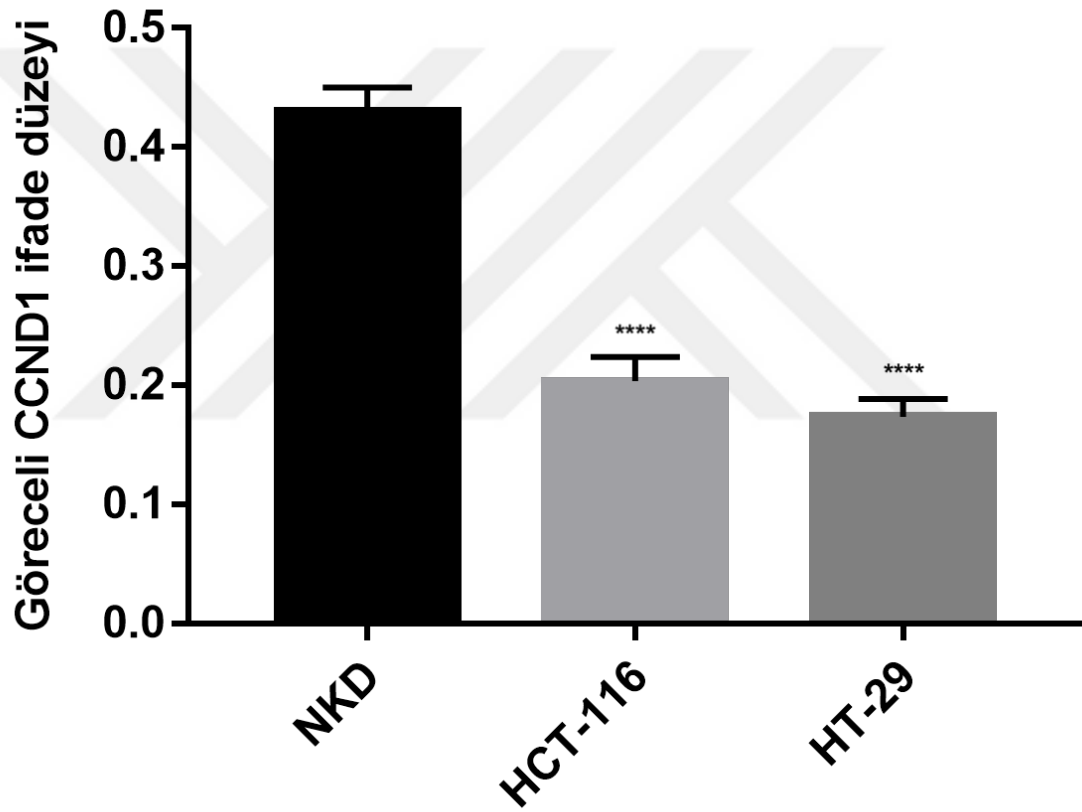
Şekil 4.2. CASC3 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki CASC3 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır.

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.3. CCND1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda CCND1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.3'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde CCND1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. CCND1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

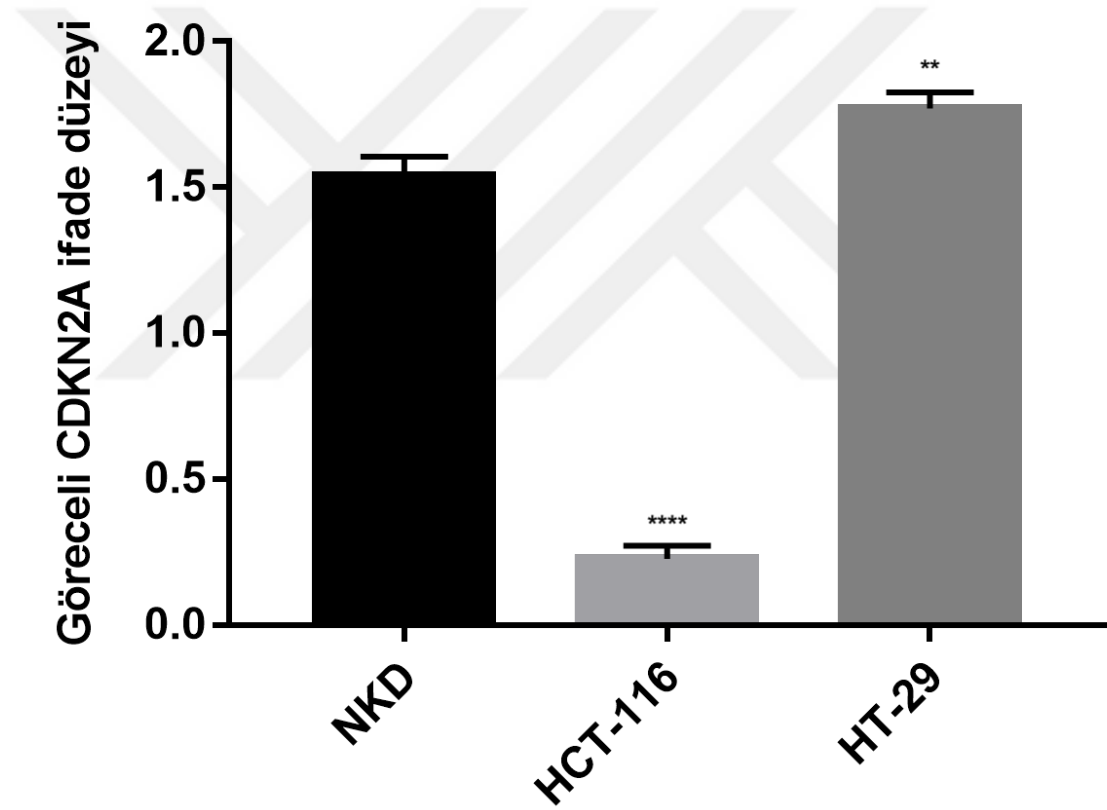


Şekil 4.3. CCND1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki CCND1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.4. CDKN2A

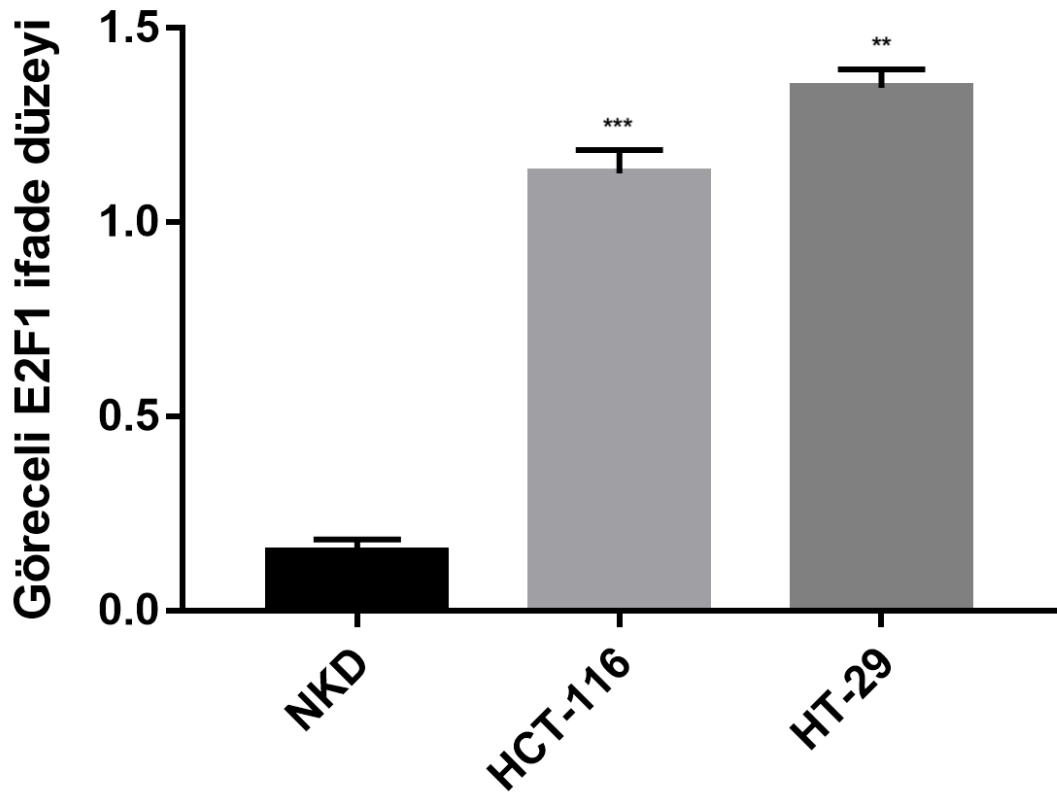
HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda CDKN2A geninin ifade düzeyi Şekil 4.4'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HCT-116 hücre hattında CDKN2A ifade düzeyi azalmıştır. HT-29 hücre hattında ise CDKN2A ifade düzeyi NKD'suna göre artış göstermiştir. Her iki kolon kanseri hücre hatlarındaki CDKN2A ifade düzeyindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.01$).



Şekil 4.4. CDKN2A geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki CDKN2A ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0.01$, **** $p<0.0001$).

4.1.5. E2F1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda E2F1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.5'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde E2F1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. E2F1'in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.001$; HT-29 $p<0.01$).

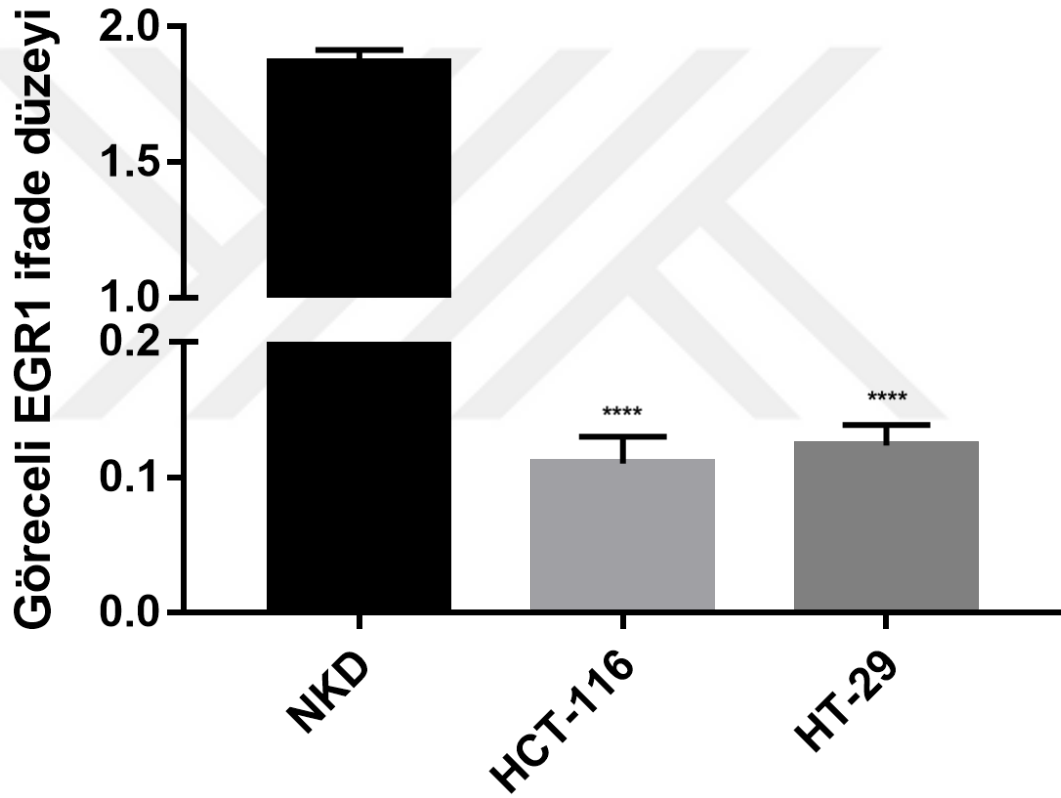


Şekil 4.5. E2F1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki E2F1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.1.6. EGR1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda EGR1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.6'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde EGR1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. EGR1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

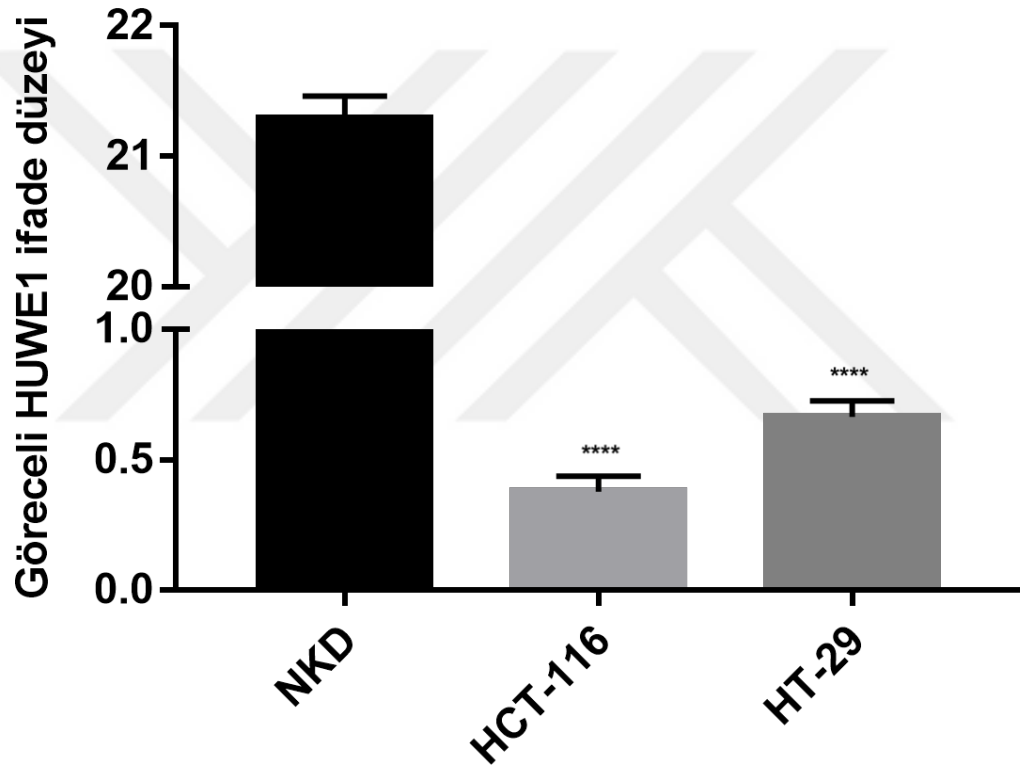


Şekil 4.6. EGR1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki EGR1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.7. HUWE1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, HUWE1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.7'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde HUWE1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. HUWE1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



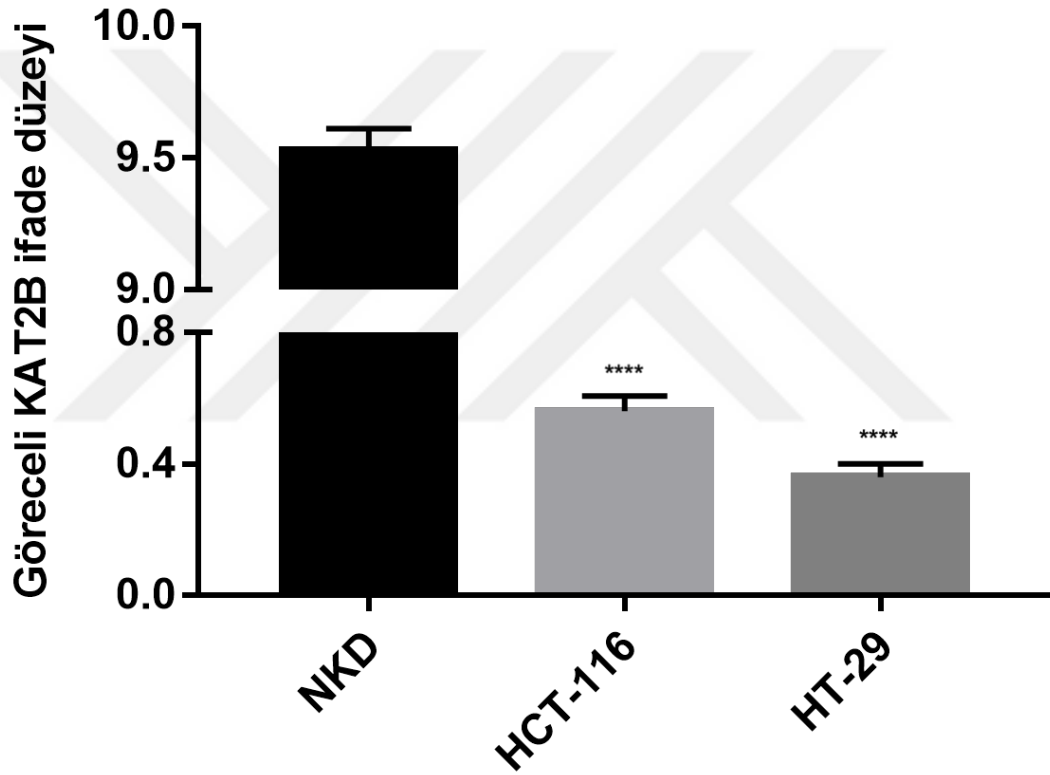
Şekil 4.7. HUWE1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki HUWE1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır.

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.8. KAT2B

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, KAT2B geninin ifade düzeyi Şekil 4.8'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde KAT2B geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. KAT2B'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



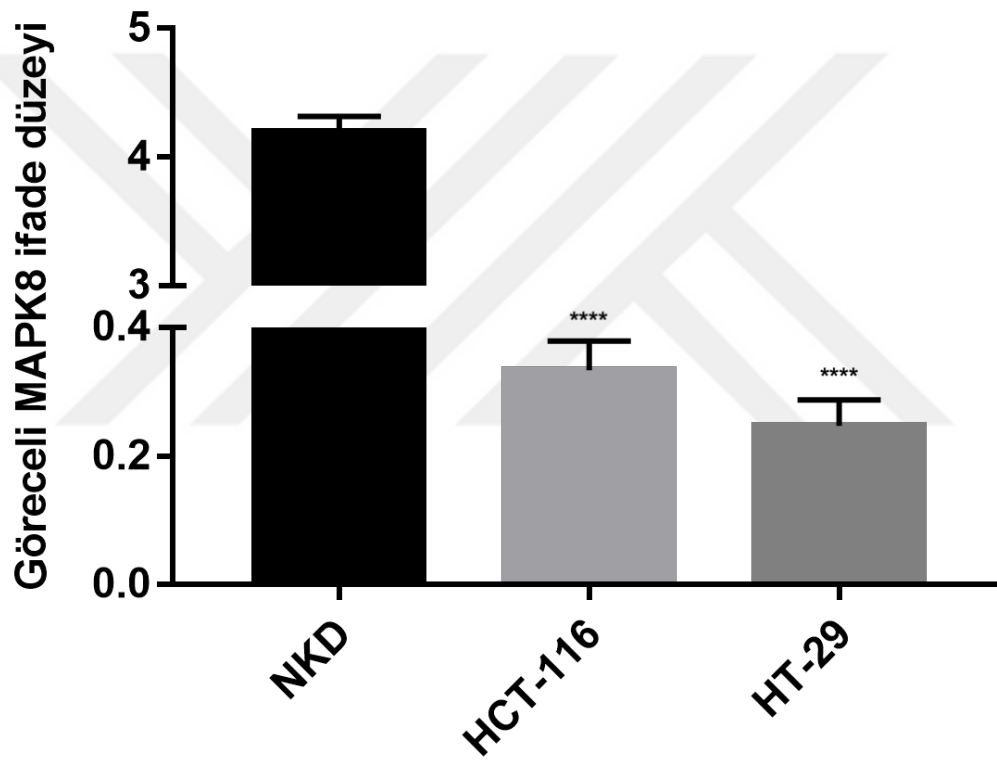
Şekil 4.8. KAT2B geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki KAT2B ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır.

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.9. MAPK8

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, MAPK8 geninin ifade düzeyi Şekil 4.9'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde MAPK8 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. MAPK8'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



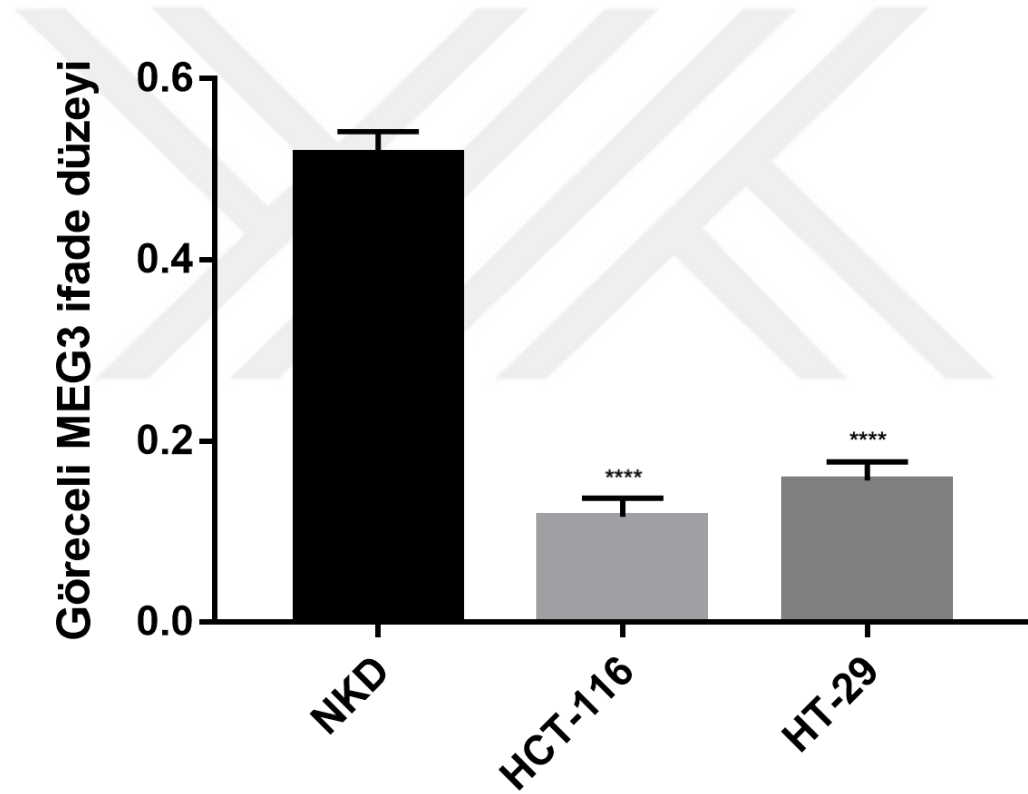
Şekil 4.9. MAPK8 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki MAPK8 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır.

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.10. MEG3

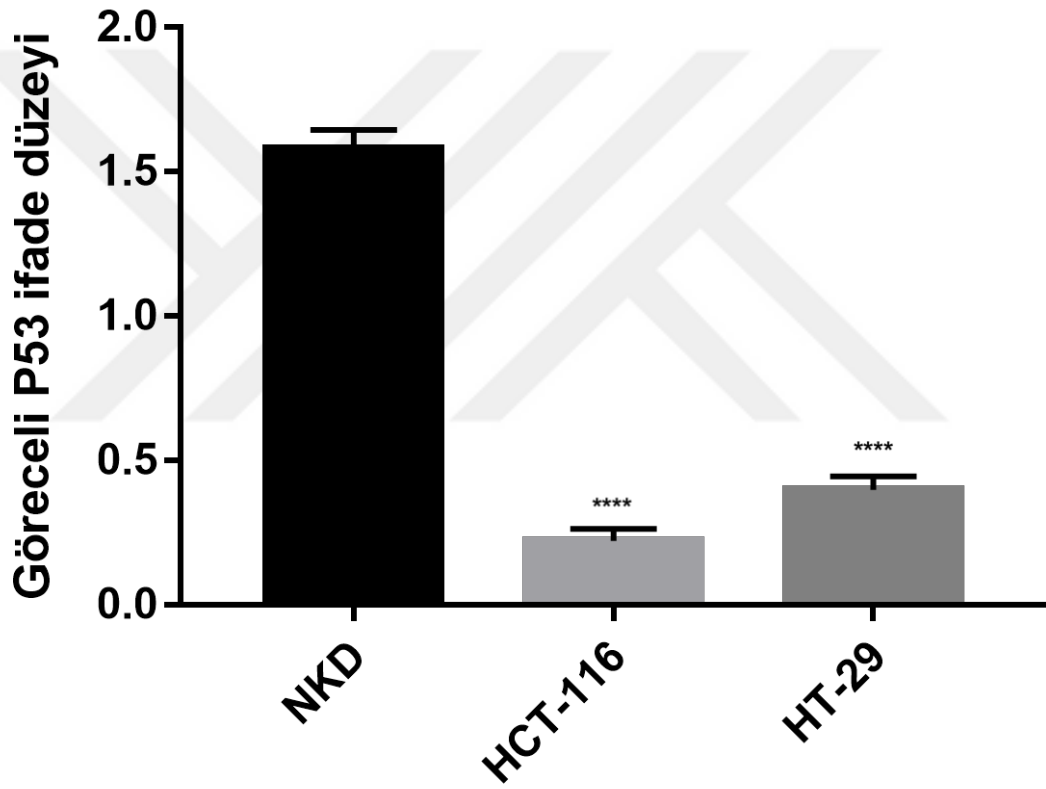
HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, MEG3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.10'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde MEG3 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. MEG3'ün ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



Şekil 4.10. MEG3 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki MEG3 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.11. P53

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, P53 geninin ifade düzeyi Şekil 4.11'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde P53 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. P53'ün ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

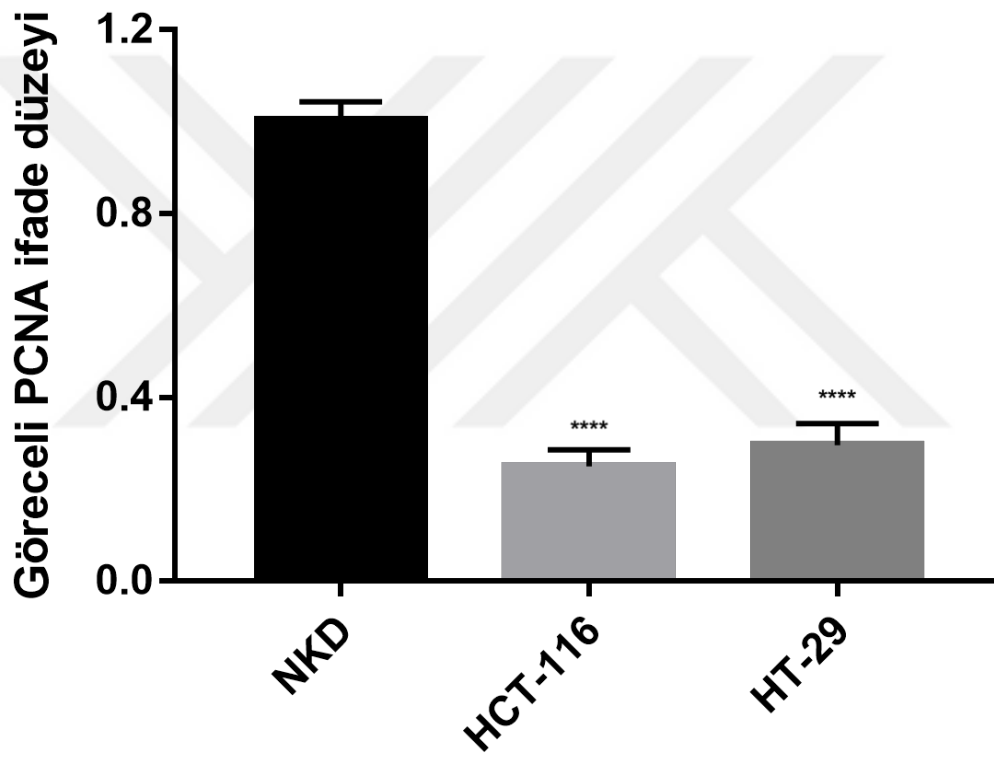


Şekil 4.11. P53 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki P53 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.12. PCNA

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, PCNA geninin ifade düzeyi Şekil 4.12'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde PCNA geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. PCNA'nın ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

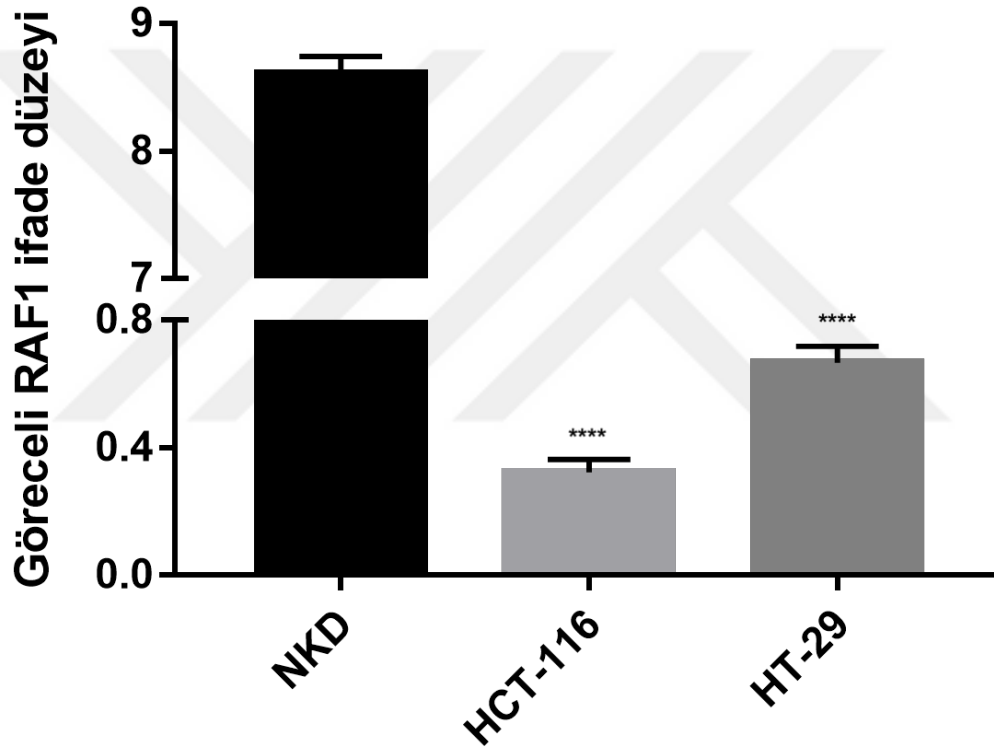


Şekil 4.12. PCNA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki PCNA ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.13. RAF1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, RAF1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.13'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde RAF1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. RAF1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

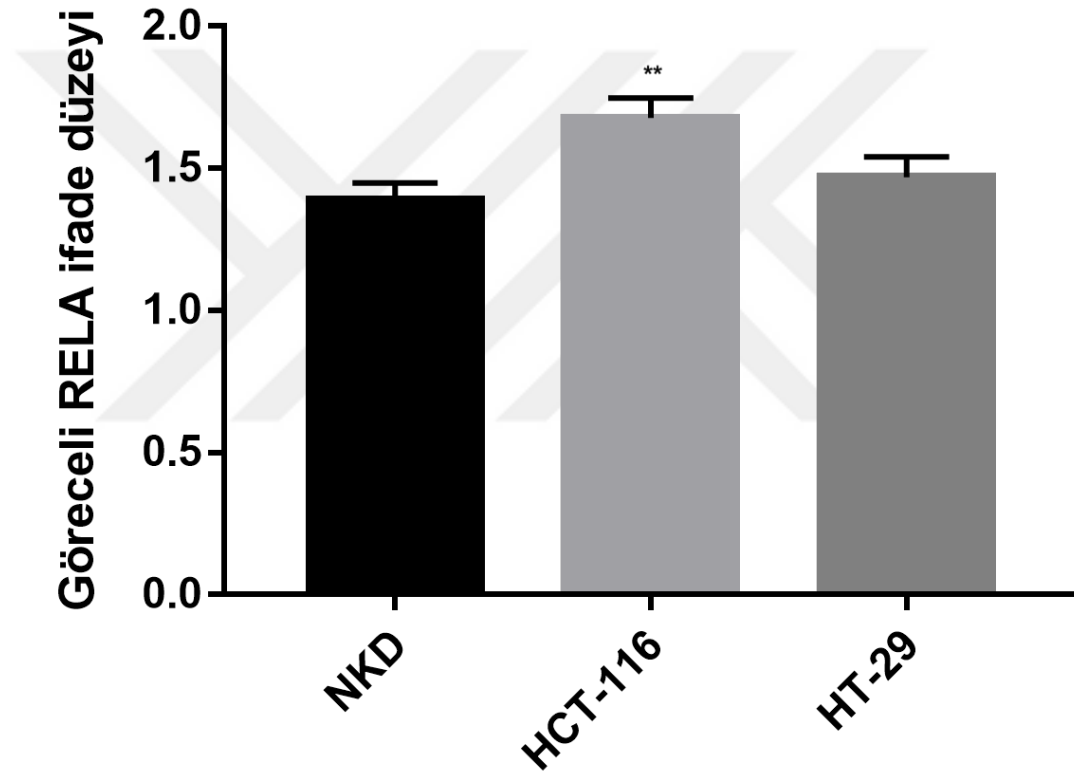


Şekil 4.13. RAF1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki RAF1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.14. RELA

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, RELA geninin ifade düzeyi Şekil 4.14'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HCT-116 kolon kanseri hücre hattında RELA geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. RELA'nın ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.01$).

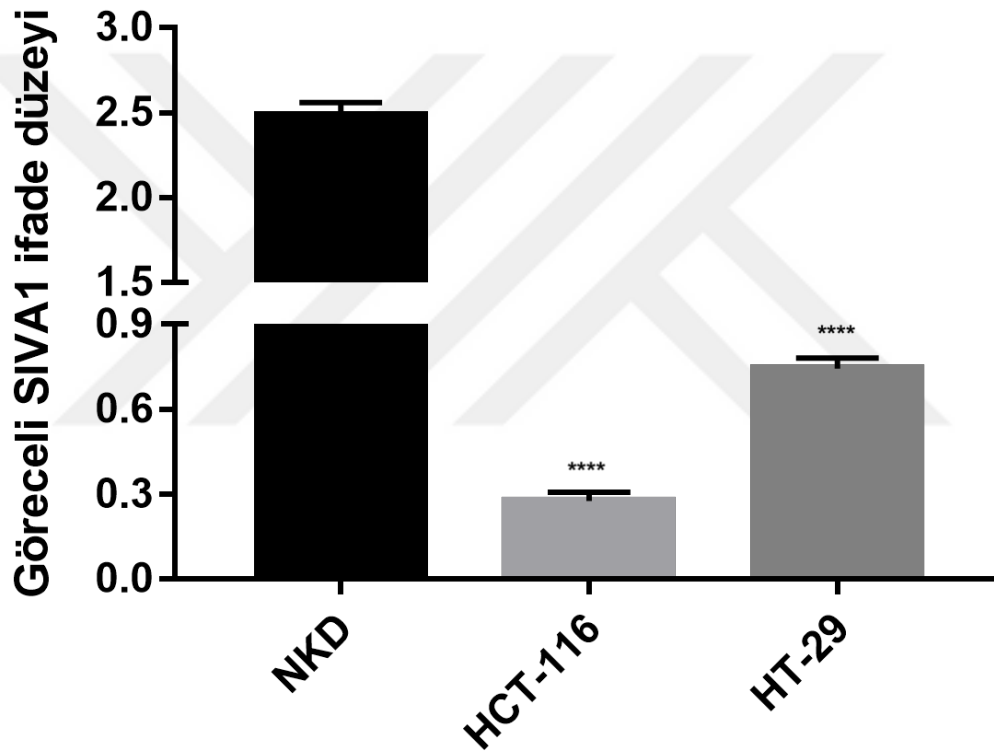


Şekil 4.14. RELA geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki RELA ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0.01$).

4.1.15. SIVA1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, SIVA1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.15'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde SIVA1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. SIVA1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

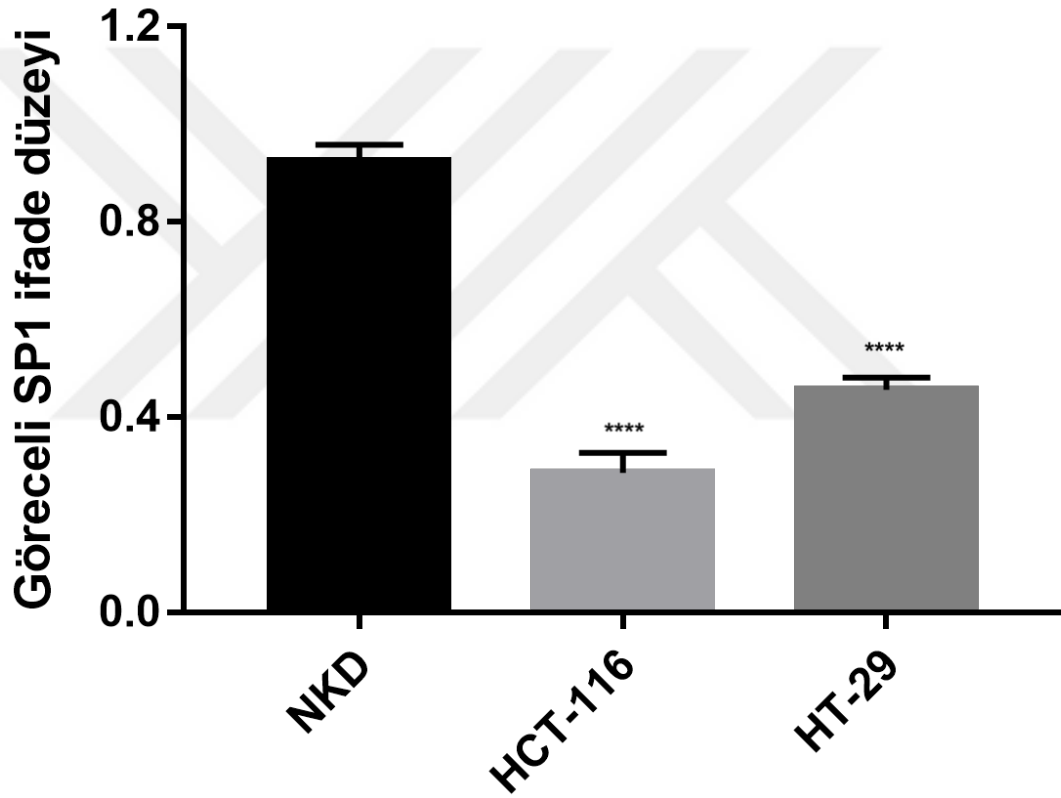


Şekil 4.15. SIVA1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki SIVA1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.16. SP1

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, SP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.16'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde SP1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. SP1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

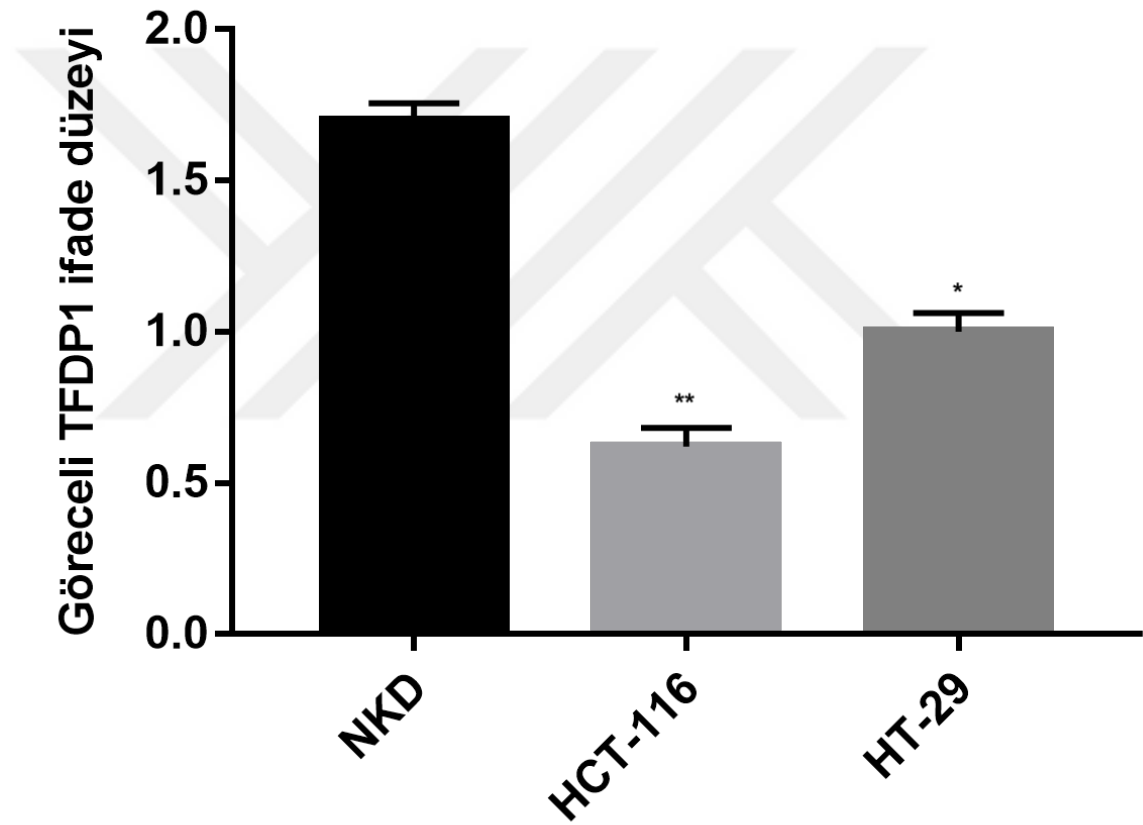


Şekil 4.16. SP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki SP1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.17. TFDP1

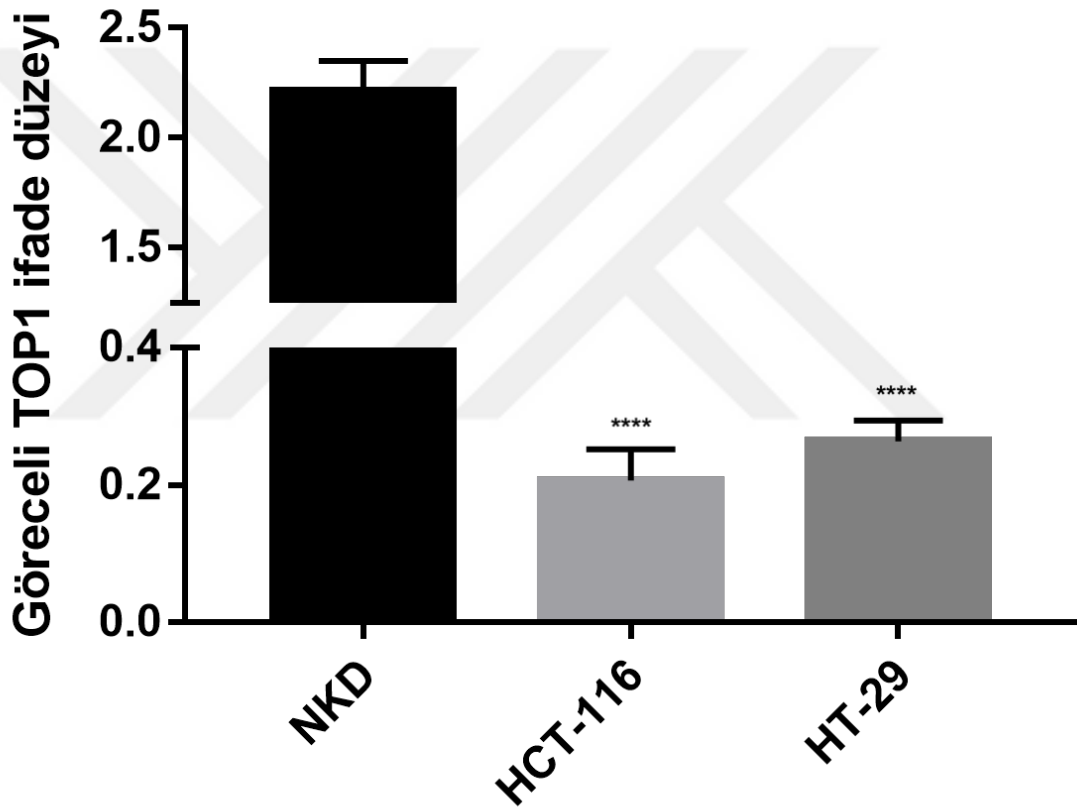
HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, TFDP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.17'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde TFDP1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. TFDP1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



Şekil 4.17. TFDP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki TFDP1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0.05$,** $p<0.01$).

4.1.18. TOP1

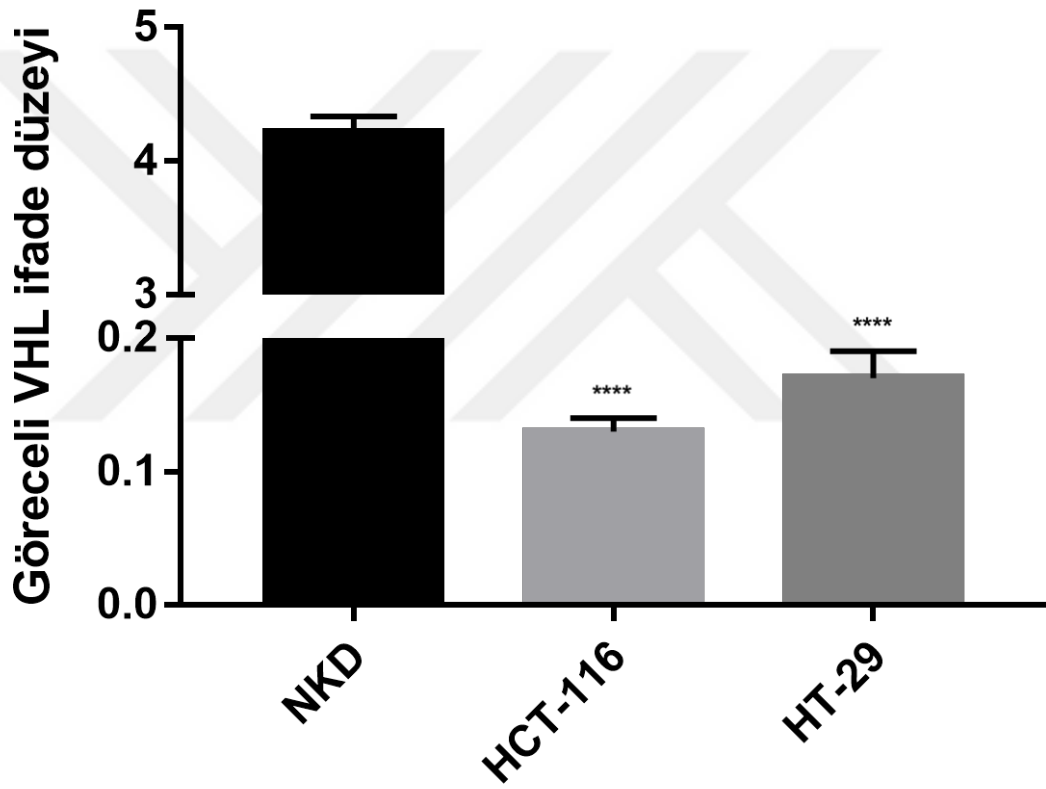
HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, TOP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.18'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde TOP1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. TOP1'in ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).



Şekil 4.18. TOP1 geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki TOP1 ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.1.19. VHL

HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve NKD'sunda, VHL geninin ifade düzeyi Şekil 4.19'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre NKD'suna kıyasla HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde VHL geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. VHL'nin ifade düzeyindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (HCT-116 $p<0.0001$; HT-29 $p<0.0001$).

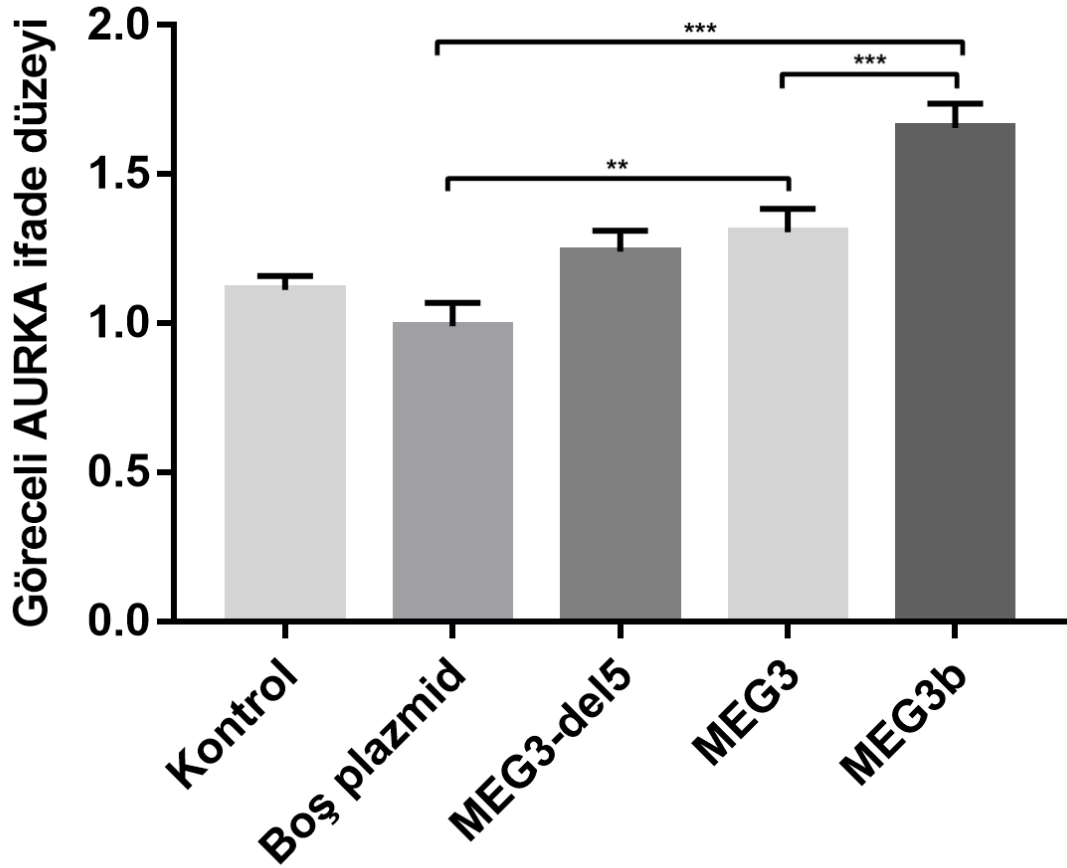


Şekil 4.19. VHL geninin kolorektal kanser hücreleri ve NKD'sundaki ifade düzeyi. HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki VHL ifade düzeyi NKD ile kıyaslanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0.0001$).

4.2. HCT-116 Hücre Hattında Transfeksiyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri

4.2.1. HCT-116 Hücre Hattında AURKA İfade Düzeyi

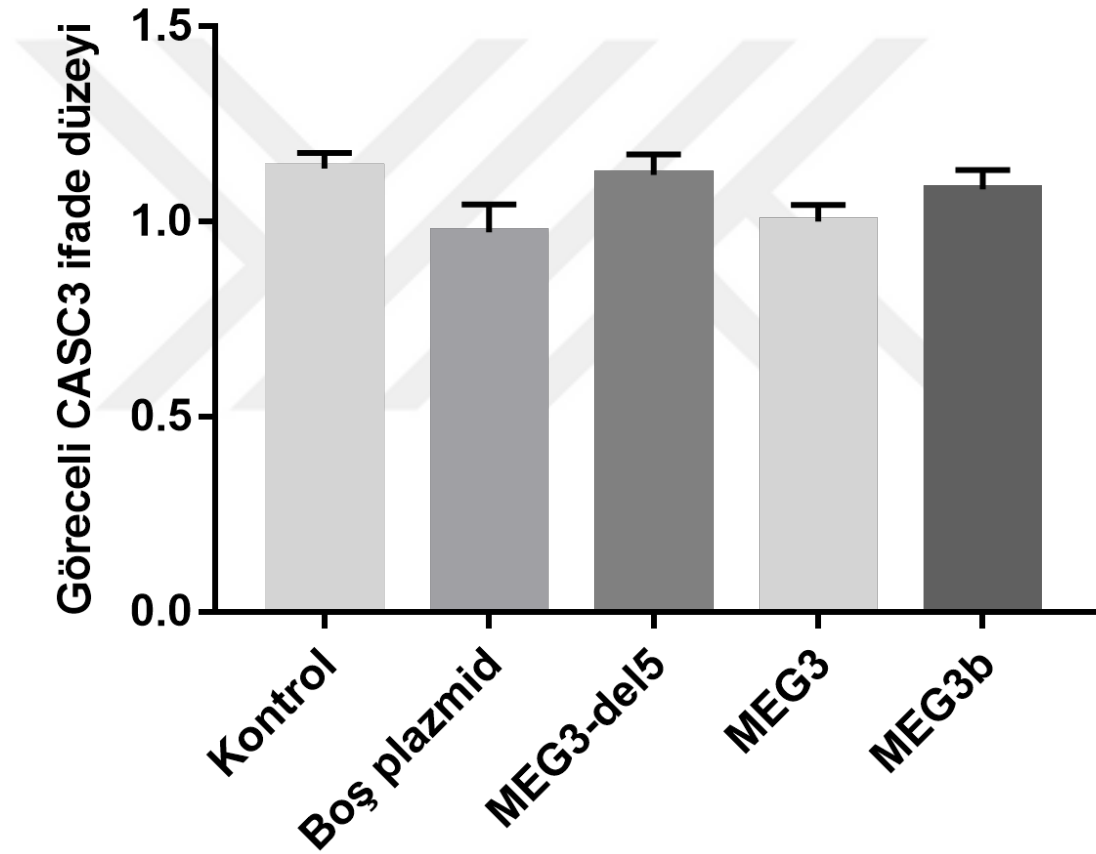
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında AURKA geninin ifade düzeyi Şekil 4.20’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmide kıyasla MEG3b ve MEG3 plazmidi verilen deney gruplarında AURKA geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MEG3-del5 plazmidi verilen deney grubuna kıyasla MEG3 plazmidi verilen deney grubunda da AURKA ifadesinde artış tespit edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3 plazmidine göre MEG3b plazmidi verilen deney grubunda AURKA’nın ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.20. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası AURKA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01, ***p<0.001).

4.2.2. HCT-116 Hücre Hattında CASC3 İfade Düzeyi

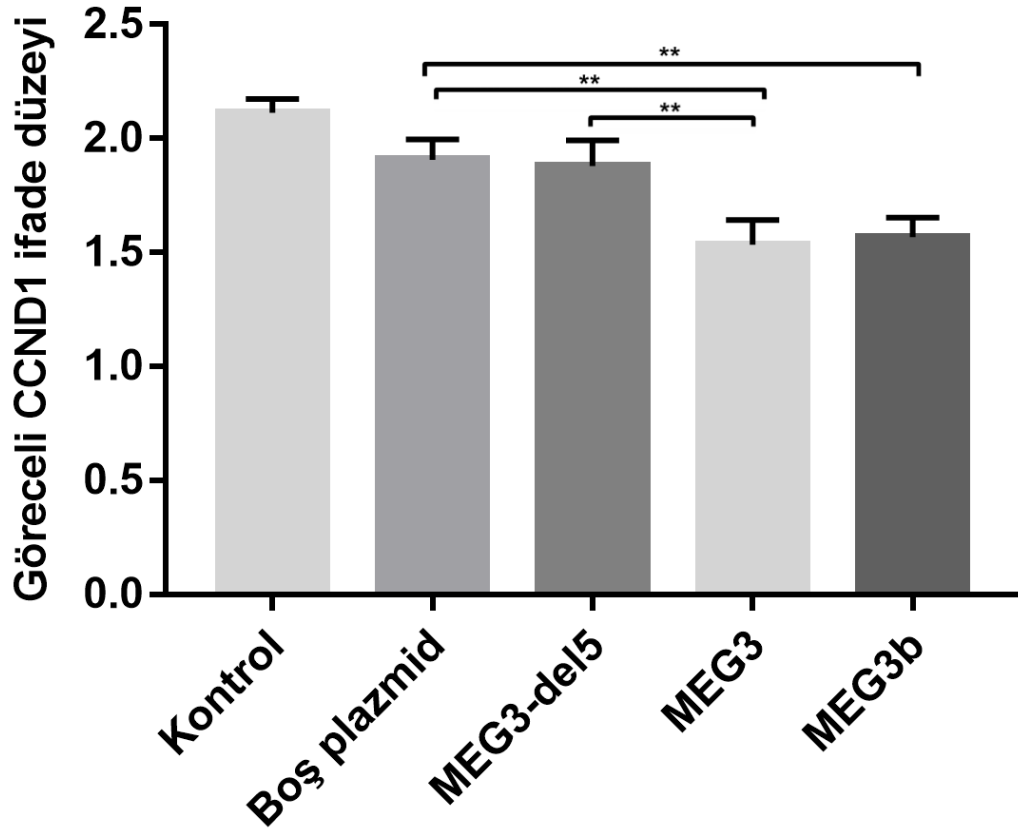
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında CASC3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.21’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmide kıyasla MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidi verilen deney gruplarında CASC3 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir ancak bu deney gruplarındaki ifade artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3b plazmidi verilen deney grubunda da MEG3 plazmidi verilen gruba göre CASC3 geninin ifadesi artış göstermiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.21. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CASC3 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.2.3. HCT-116 Hücre Hattında CCND1 İfade Düzeyi

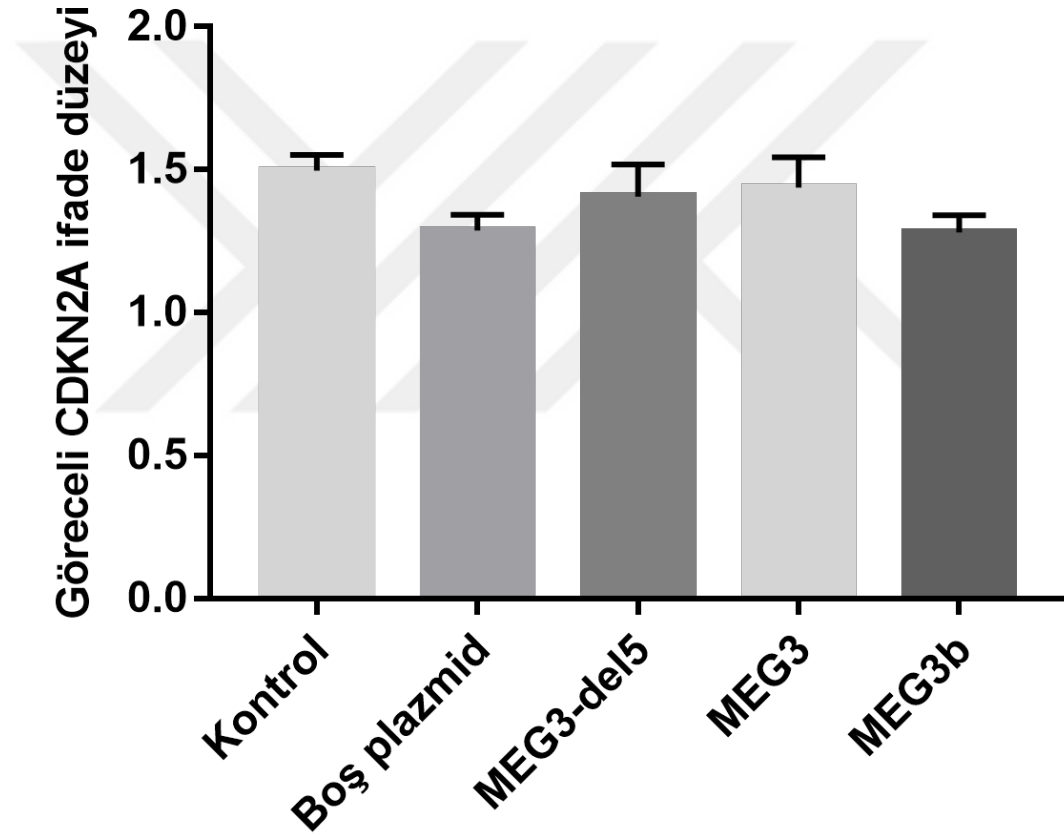
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında CCND1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.22’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. CCND1’in ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.22. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CCND1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01).

4.2.4. HCT-116 Hücre Hattında CDKN2A İfade Düzeyi

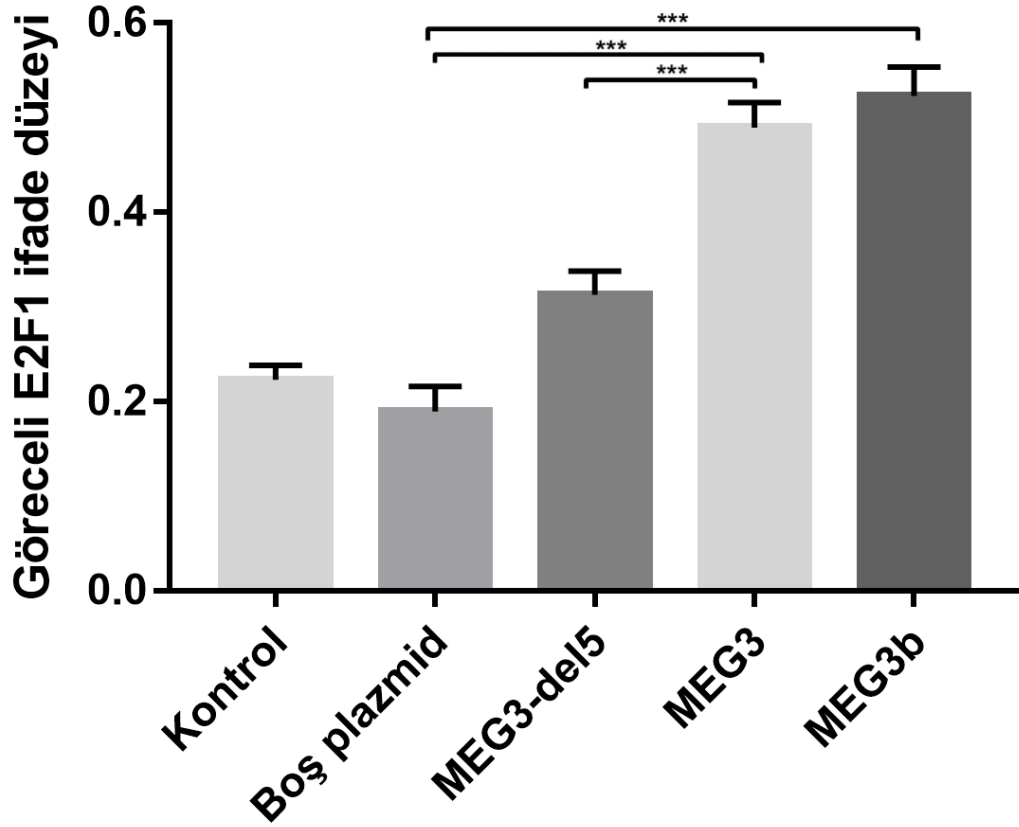
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında CDKN2A geninin ifade düzeyi Şekil 4.23’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmide kıyasla MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidi verilen deney gruplarında CDKN2A geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir ancak bu deney gruplarındaki ifade artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda CDKN2A geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.23. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CDKN2A geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.2.5. HCT-116 Hücre Hattında E2F1 İfade Düzeyi

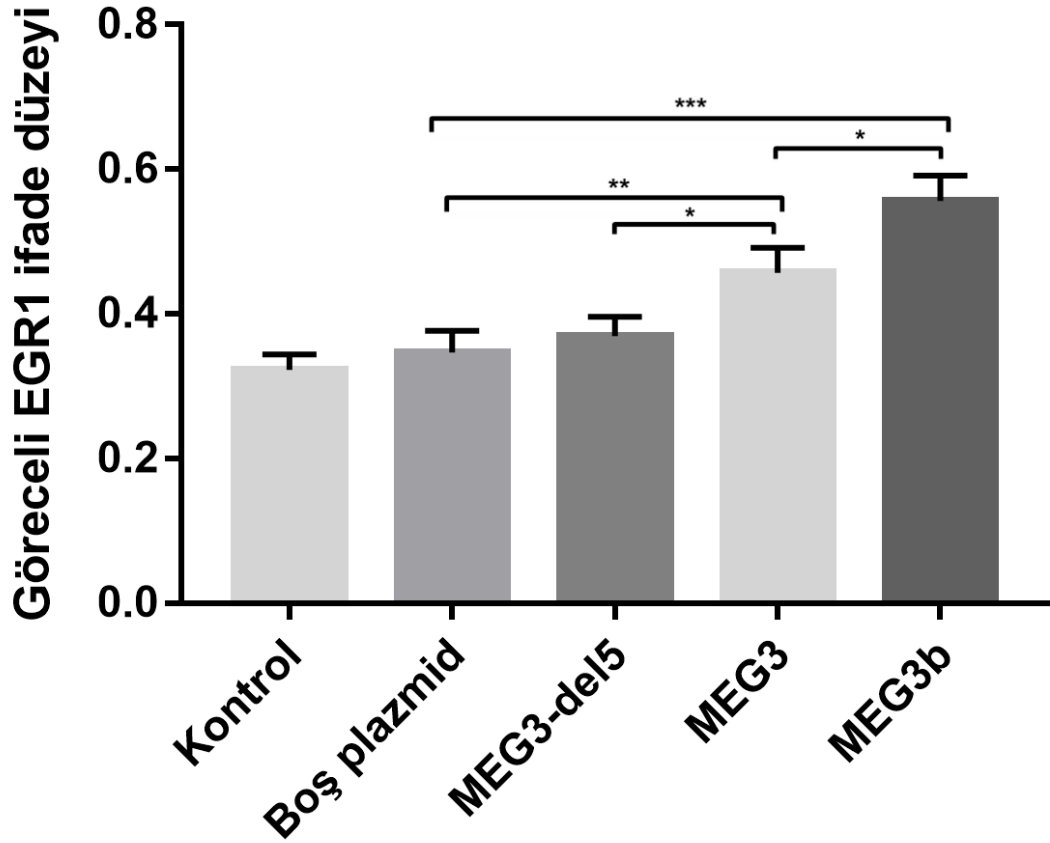
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında E2F1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.24’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda E2F1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. E2F1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda E2F1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda E2F1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.24. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası E2F1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.2.6. HCT-116 Hücre Hattında EGR1 İfade Düzeyi

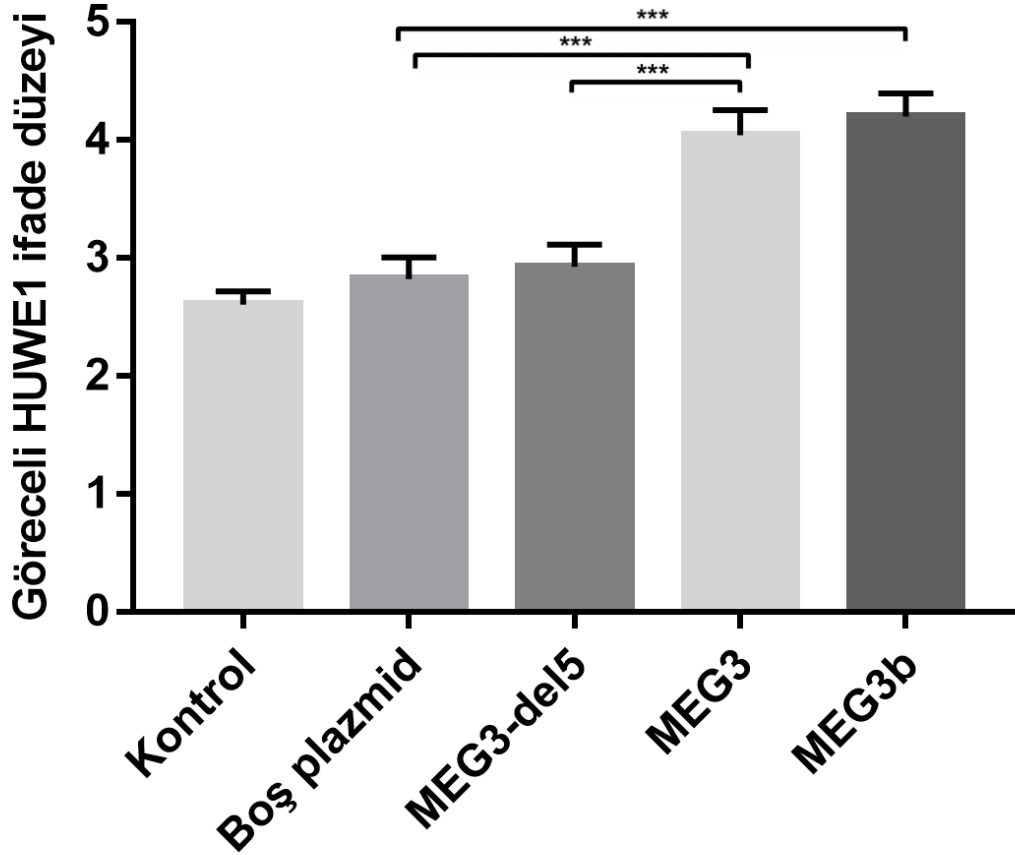
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında EGR1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.25’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda EGR1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. EGR1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda EGR1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda EGR1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.25. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası EGR1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.2.7. HCT-116 Hücre Hattında HUWE1 İfade Düzeyi

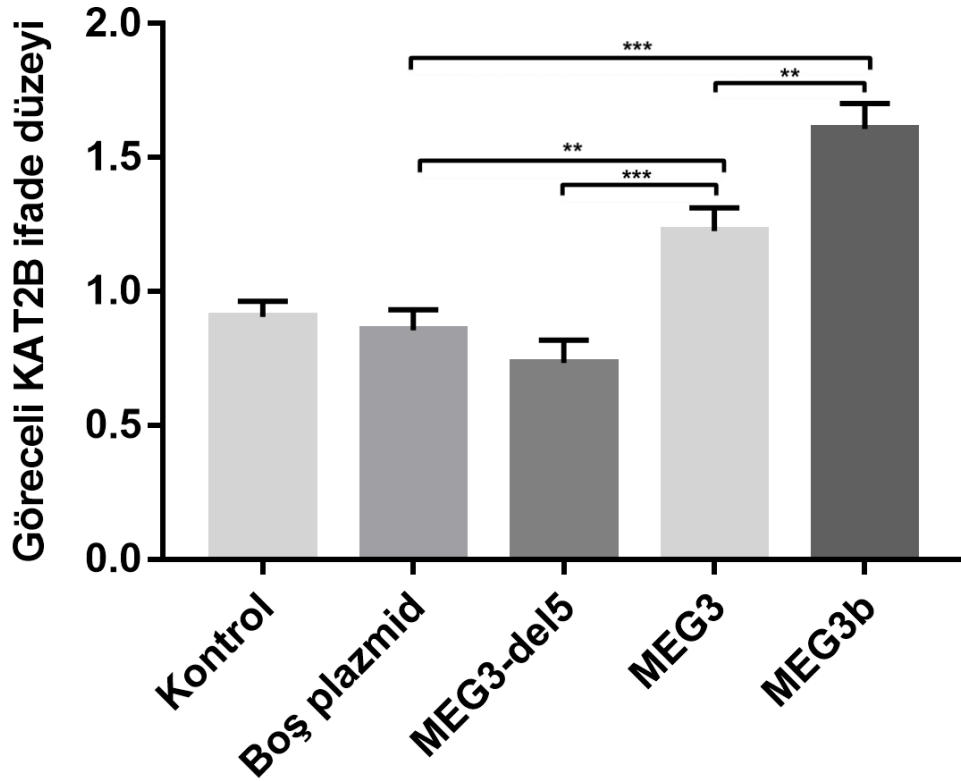
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında HUWE1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.26’da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda HUWE1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. HUWE1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda HUWE1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda HUWE1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.26. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası HUWE1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.2.8. HCT-116 Hücre Hattında KAT2B İfade Düzeyi

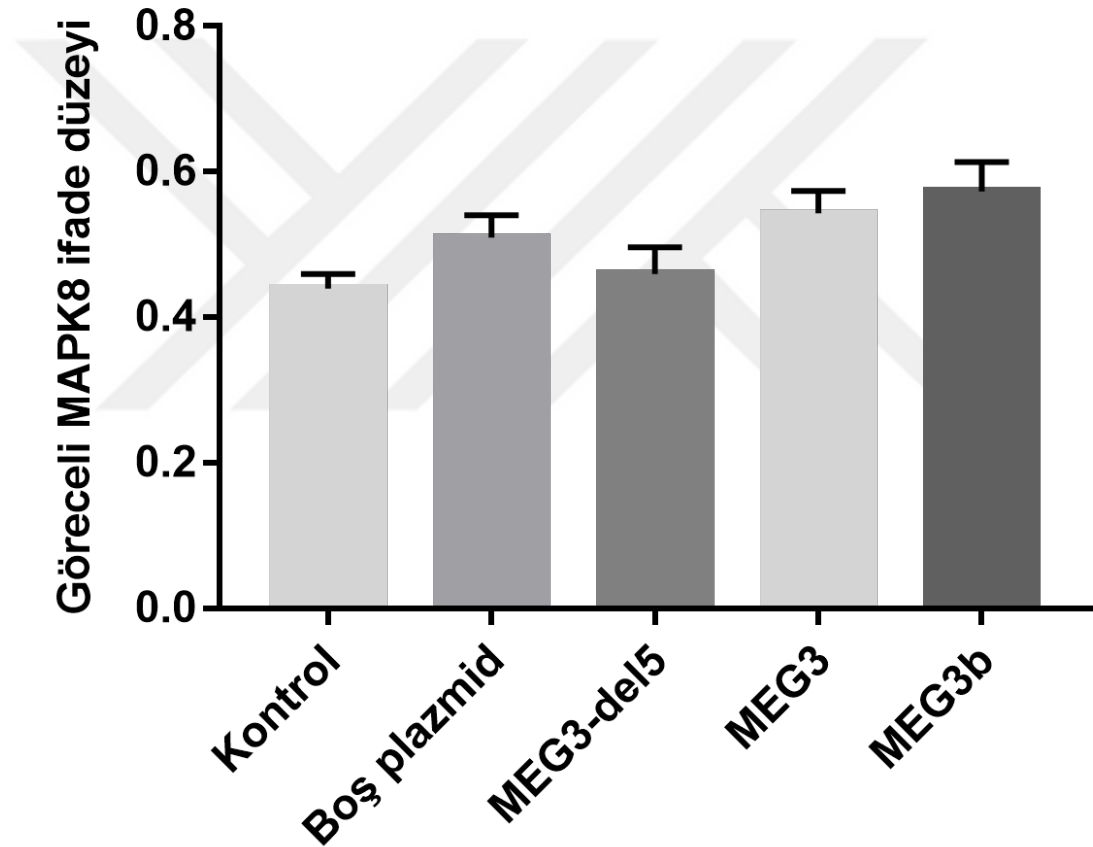
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında KAT2B geninin ifade düzeyi Şekil 4.27’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, MEG3-del5 plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda KAT2B geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir, bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen deney gruplarında KAT2B geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda KAT2B geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.27. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası KAT2B geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01, ***p<0.001).

4.2.9. HCT-116 Hücre Hattında MAPK8 İfade Düzeyi

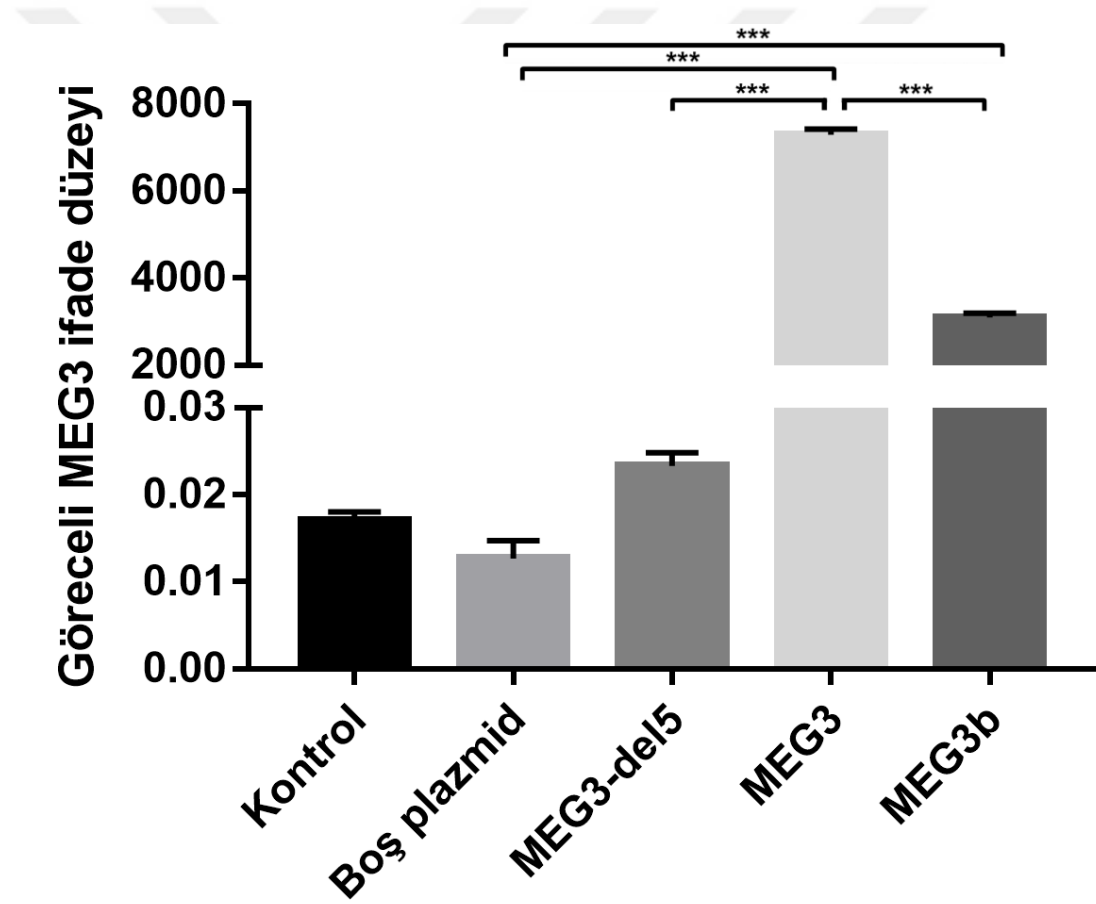
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında MAPK8 geninin ifade düzeyi Şekil 4.28’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmid ile transfekte edilen deney grubunda MAPK8 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MAPK8’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda MAPK8 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.28. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MAPK8 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.2.10. HCT-116 Hücre Hattında MEG3 İfade Düzeyi

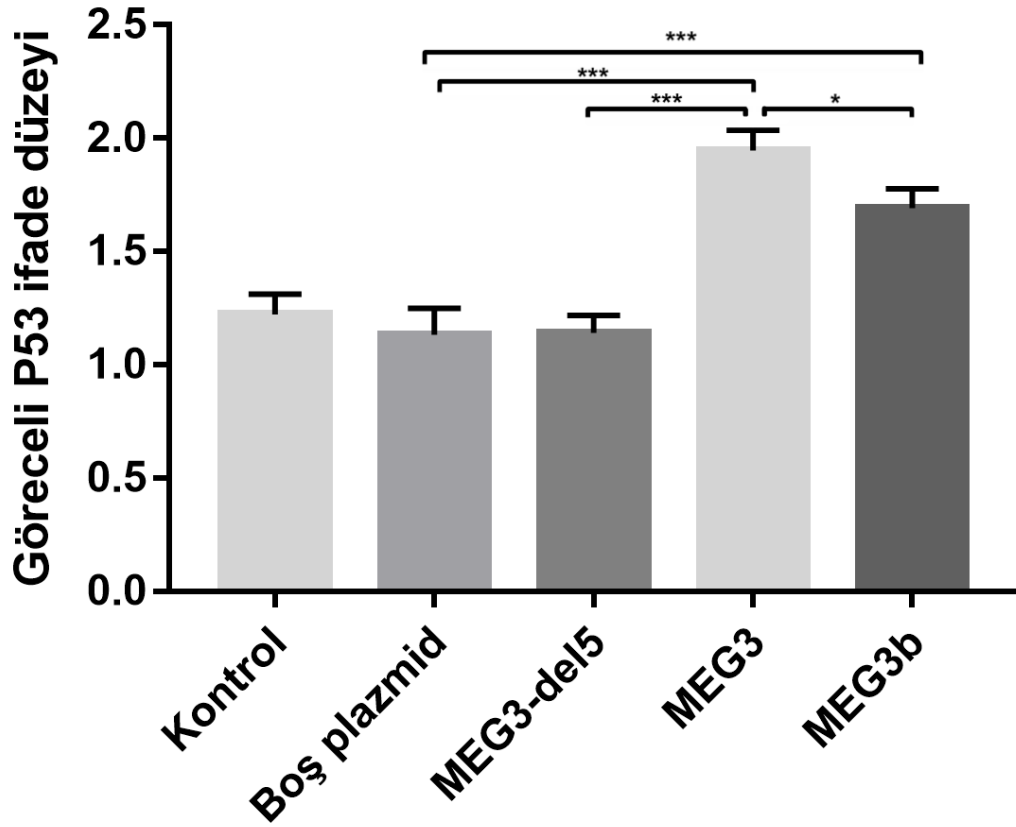
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında MEG3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.29’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda MEG3 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MEG3’ün ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda MEG3 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda MEG3 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.29. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.2.11. HCT-116 Hücre Hattında P53 İfade Düzeyi

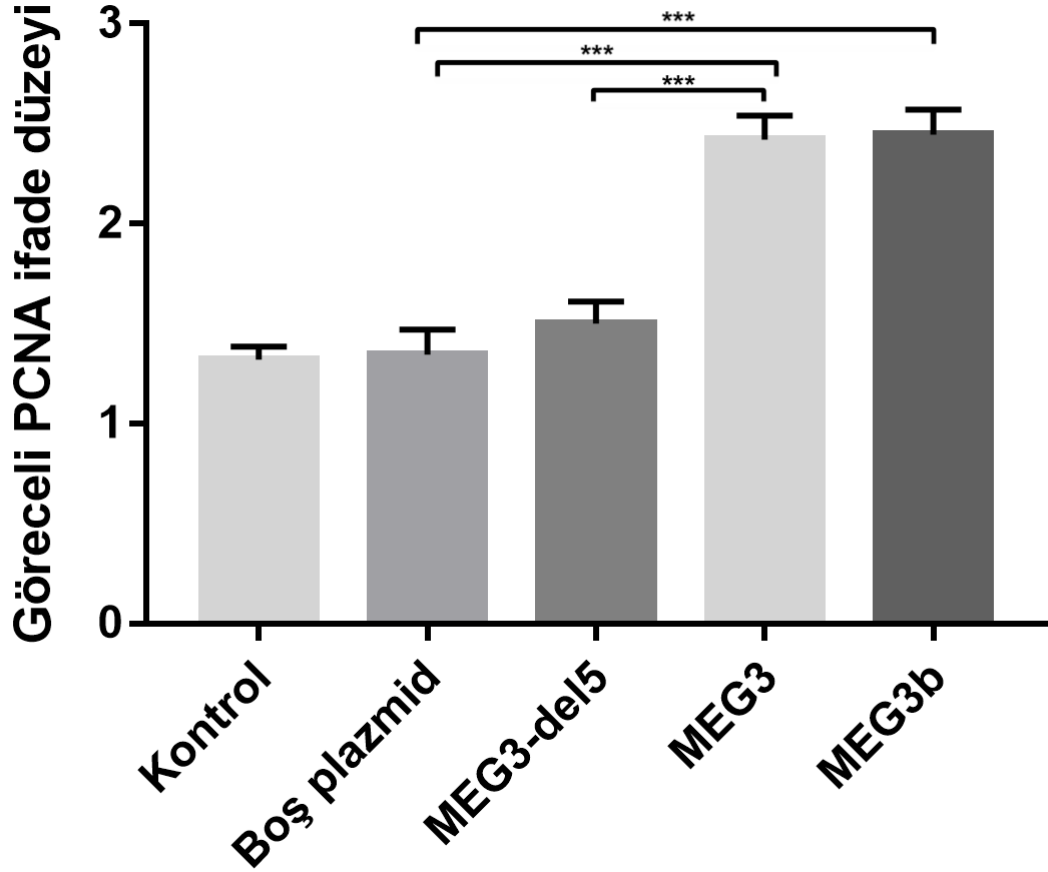
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında P53 geninin ifade düzeyi Şekil 4.30’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda P53 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. P53’ün ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda P53 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda P53 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.30. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası P53 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

4.2.12. HCT-116 Hücre Hattında PCNA İfade Düzeyi

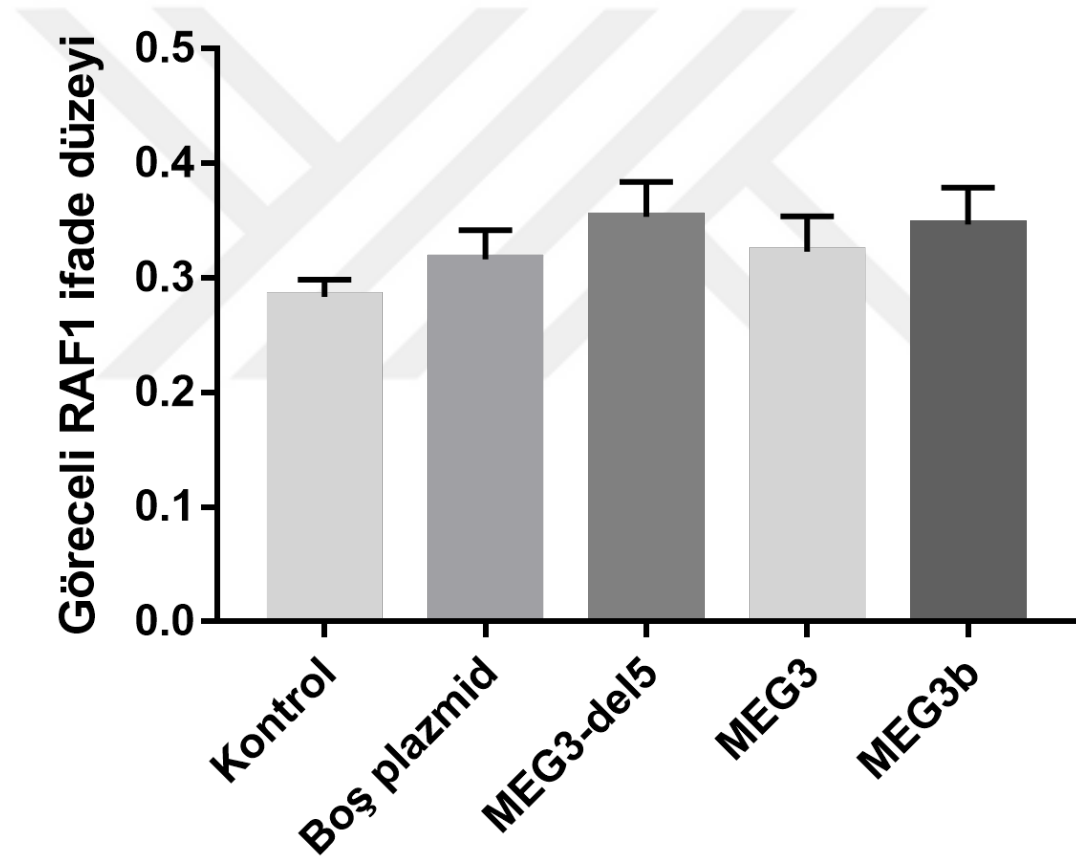
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında PCNA geninin ifade düzeyi Şekil 4.31’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. PCNA’nın ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.31. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası PCNA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.2.13. HCT-116 Hücre Hattında RAF1 İfade Düzeyi

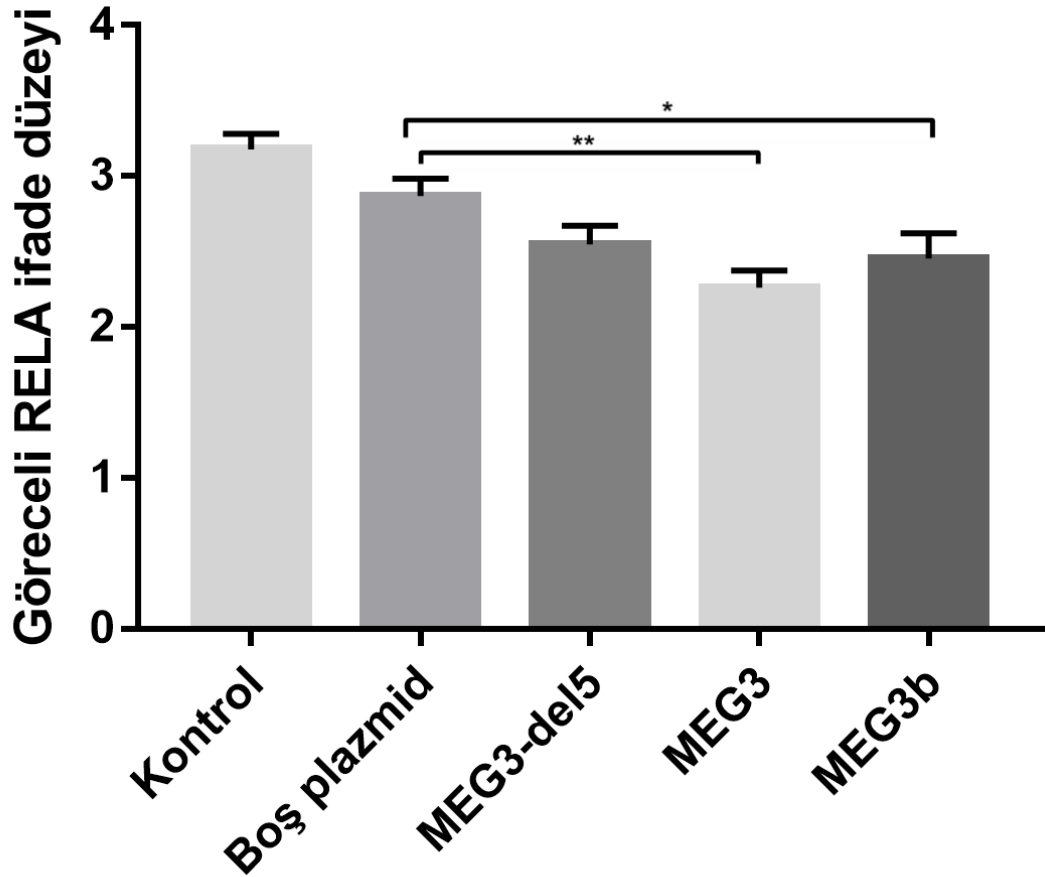
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında RAF1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.32’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda RAF1 geninin ifade düzeyinde değişim olmamıştır. MEG3-del5 plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda RAF1 geninin ifadesi azalmıştır ancak bu azalma anlamlı değildir. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda RAF1 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.32. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RAF1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.2.14. HCT-116 Hücre Hattında RELA İfade Düzeyi

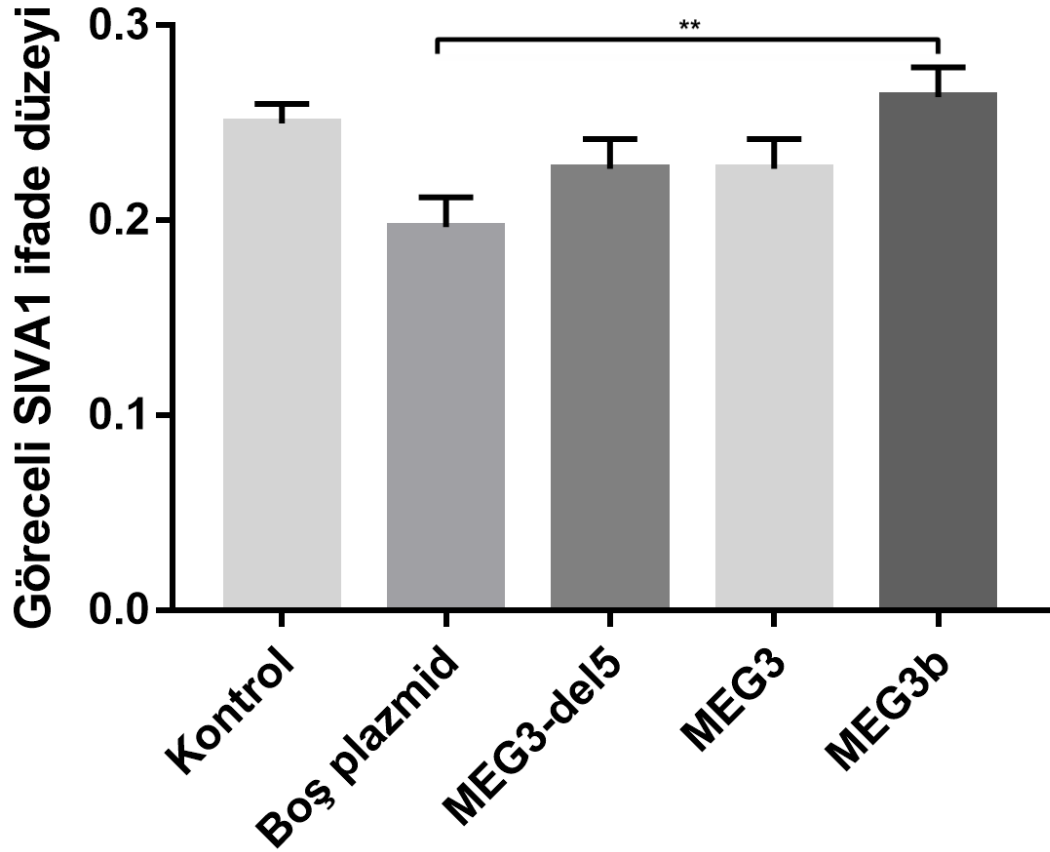
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında RELA geninin ifade düzeyi Şekil 4.33’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b plazmidini ile transfekte edilen deney gruplarında RELA geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. RELA’nın ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3-del5 plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilen deney grubunda da RELA geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda RELA geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.33. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RELA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2.15. HCT-116 Hücre Hattında SIVA1 İfade Düzeyi

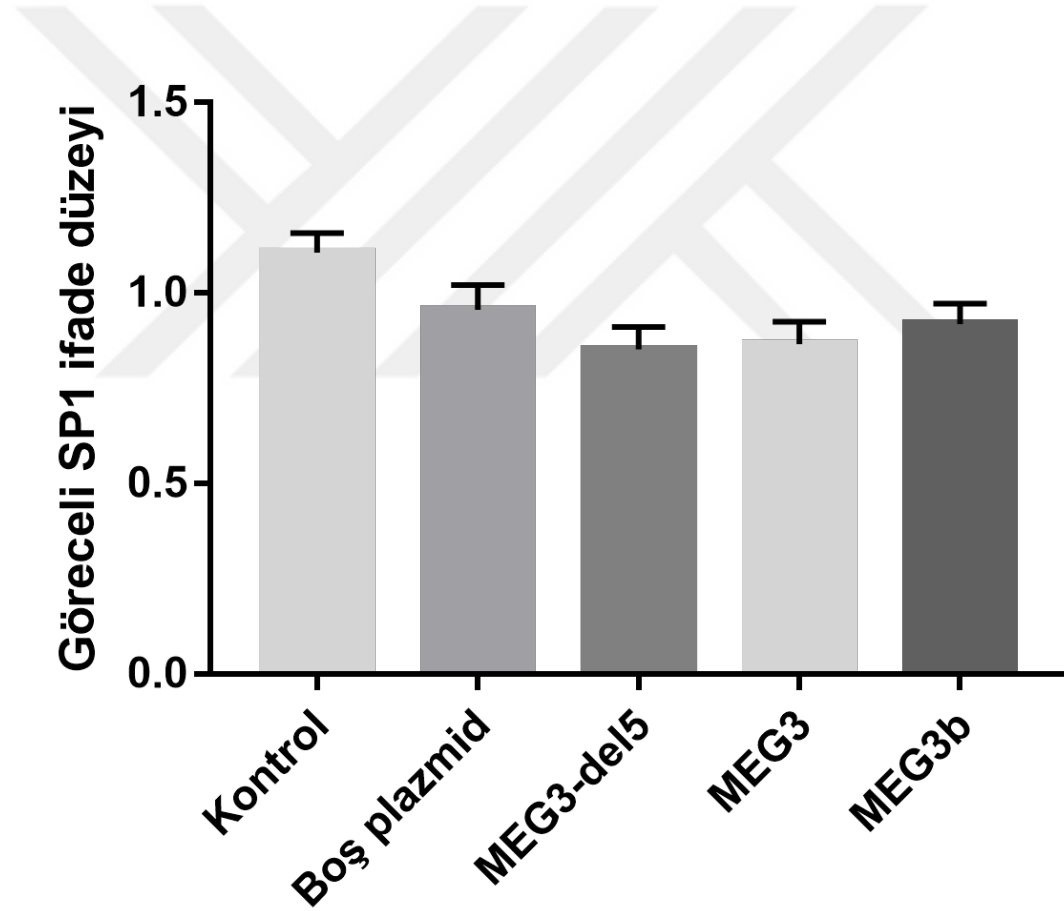
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında SIVA1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.34’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidıyla transfekte edilen deney grubunda SIVA1 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3-del5 plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmid ile transfekte edilen deney grubunda SIVA1 geninin ifade düzeyinde değişim olmamıştır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda SIVA1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.34. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SIVA1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01).

4.2.16. HCT-116 Hücre Hattında SP1 İfade Düzeyi

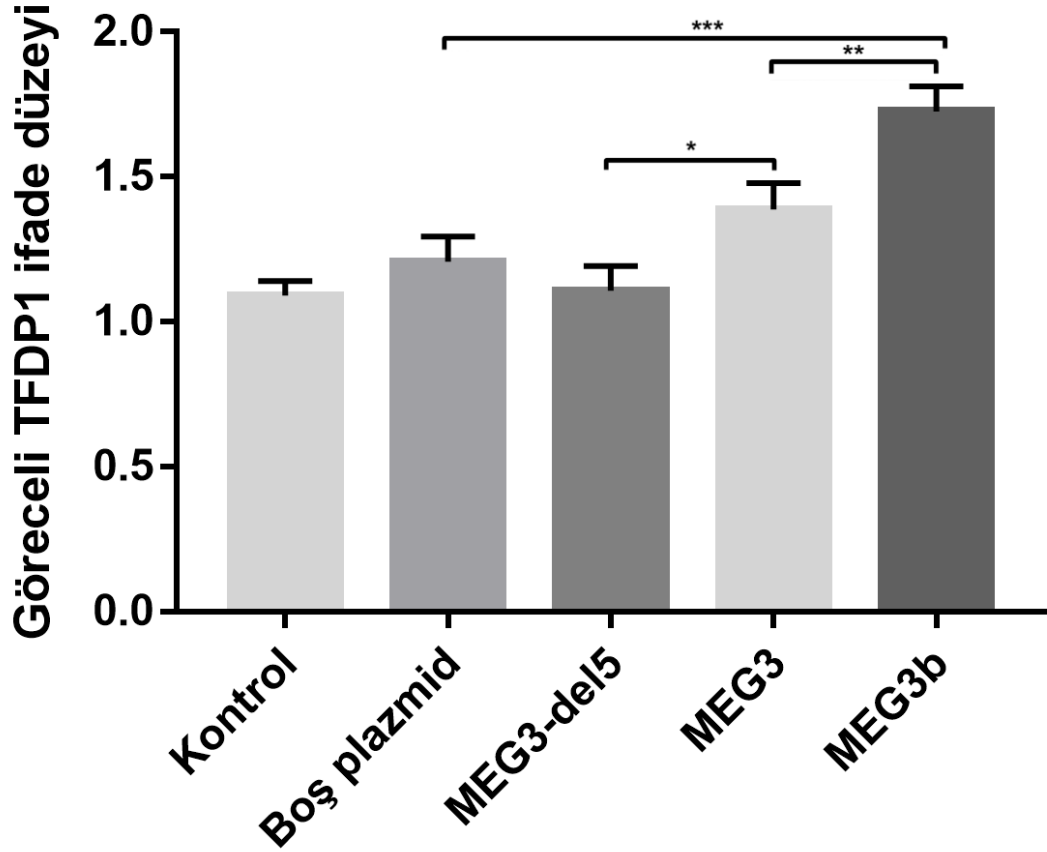
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında SP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.35’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen deney gruplarında SP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3-del5 plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilen deney grubunda SP1 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda SP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.35. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.2.17. HCT-116 Hücre Hattında TFDP1 İfade Düzeyi

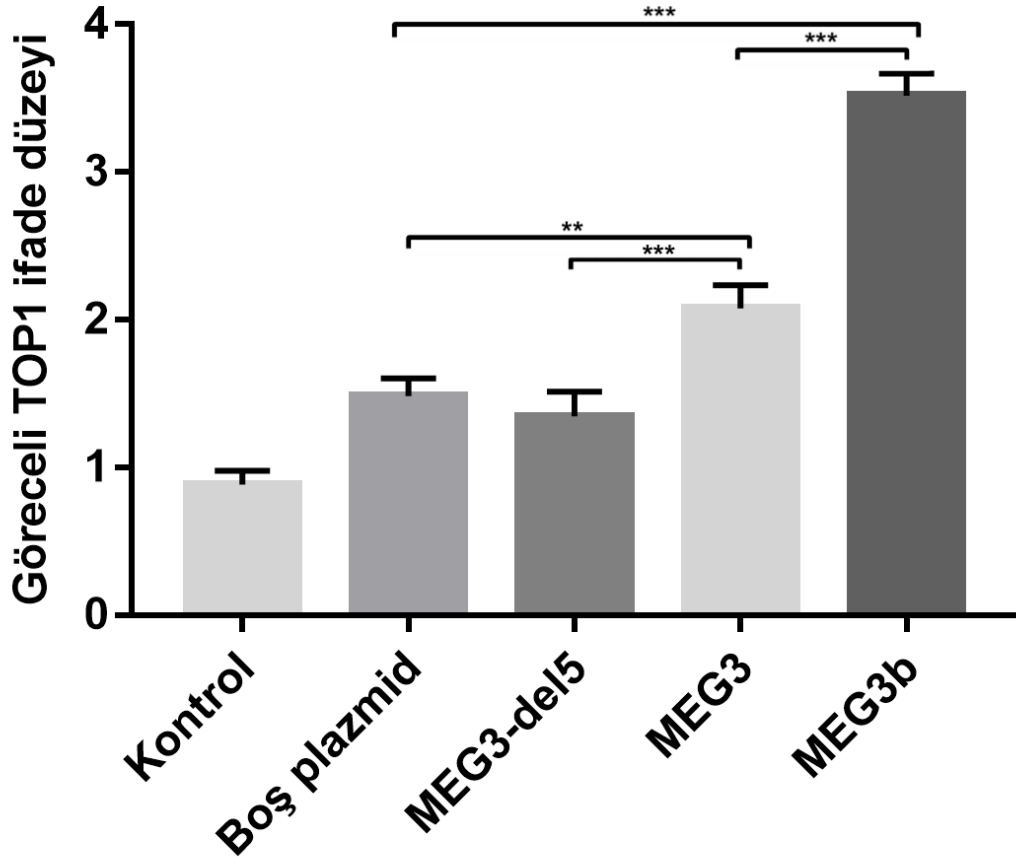
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında TFDP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.36’da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, MEG3-de15 ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda TFDP1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. TFDP1’nın ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda TFDP1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda TFDP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.36. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TFDP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01).

4.2.18. HCT-116 Hücre Hattında TOP1 İfade Düzeyi

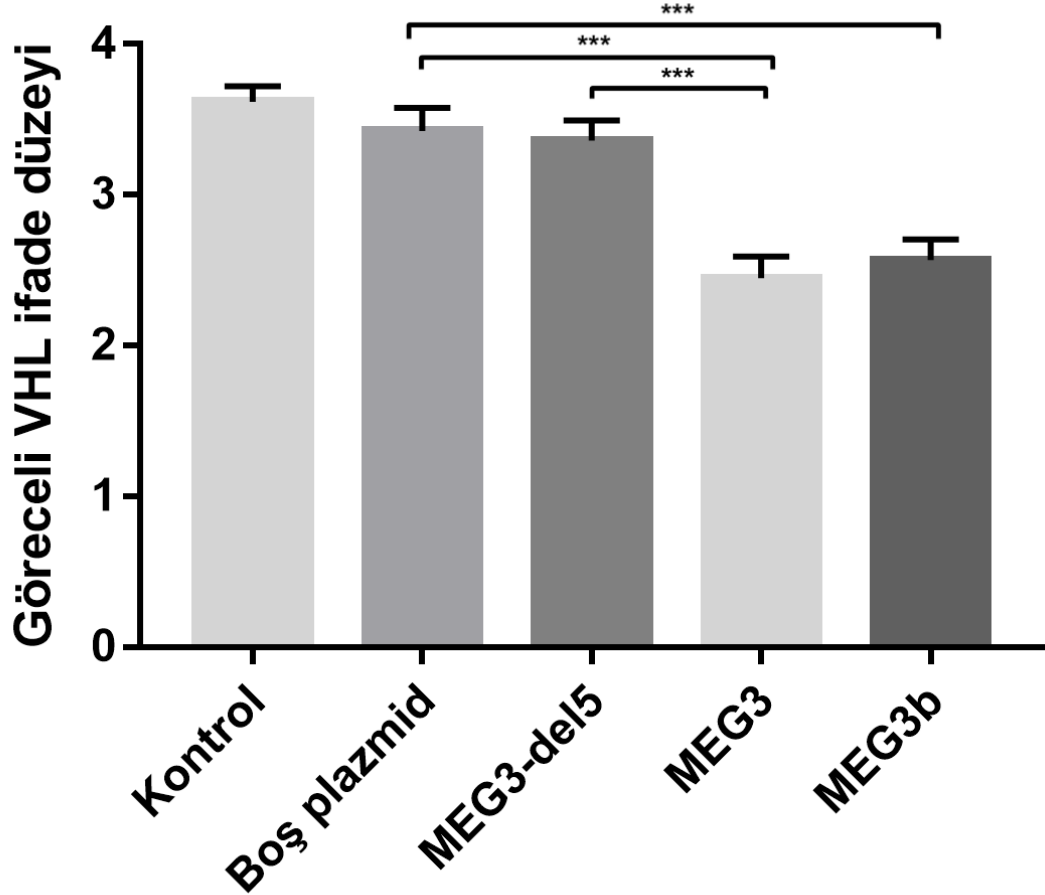
HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında TOP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.37’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. TOP1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.37. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TOP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. (**p<0.01, ***p<0.001).

4.2.19. HCT-116 Hücre Hattında VHL İfade Düzeyi

HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında VHL geninin ifade düzeyi Şekil 4.38’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda VHL geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. VHL’nin ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda VHL geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda VHL geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

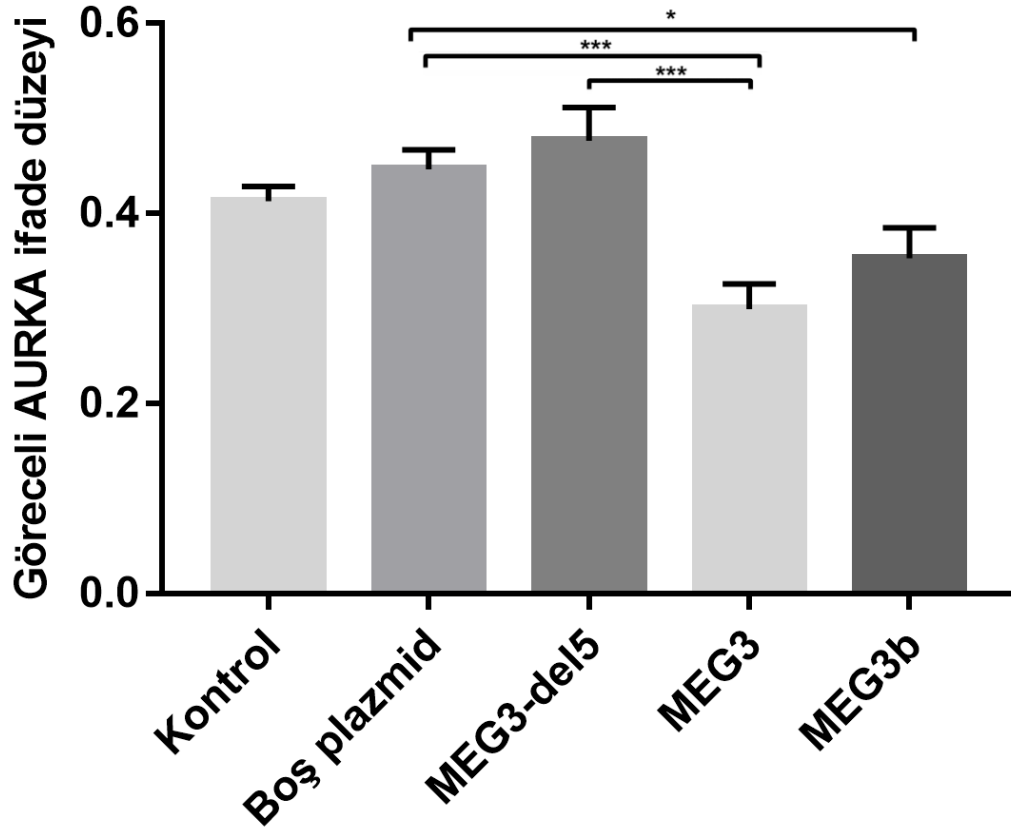


Şekil 4.38. HCT-116 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası VHL geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3. HT-29 Hücre Hattında Transfeksiyon Sonrası Gen İfade Düzeyleri

4.3.1. HT-29 Hücre Hattında AURKA İfade Düzeyi

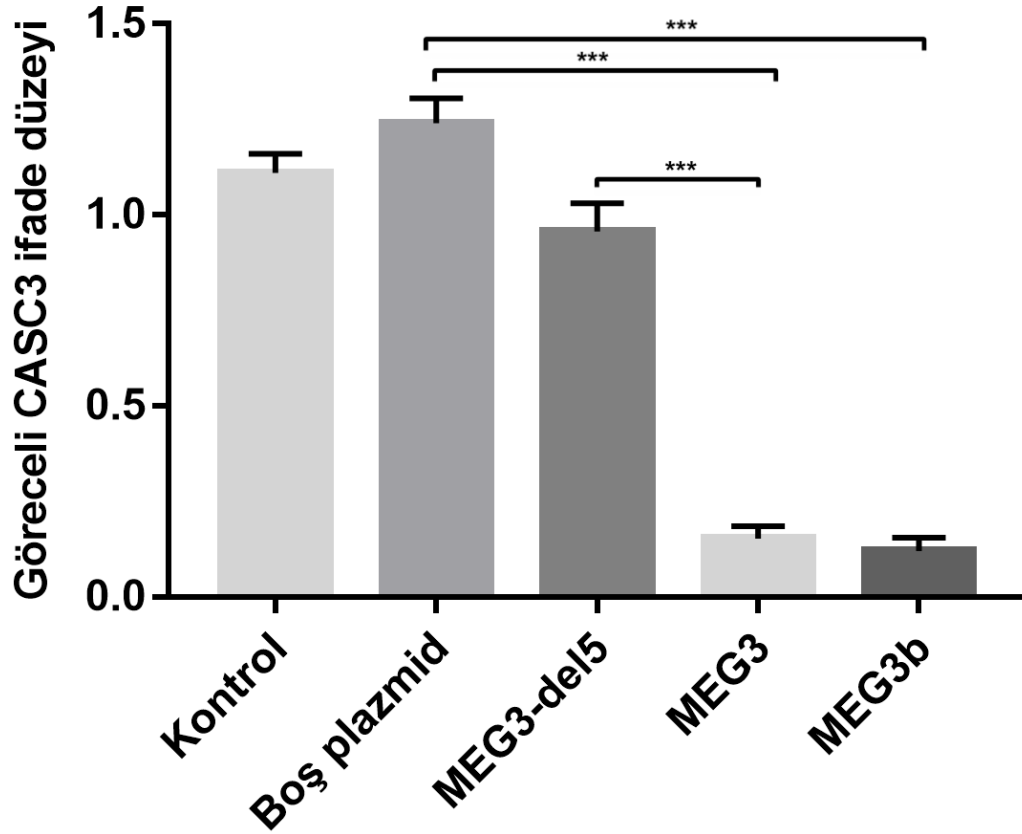
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında AURKA geninin ifade düzeyi Şekil 4.39’da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda AURKA geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. AURKA’nın ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda AURKA geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.39. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası AURKA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

4.3.2. HT-29 Hücre Hattında CASC3 İfade Düzeyi

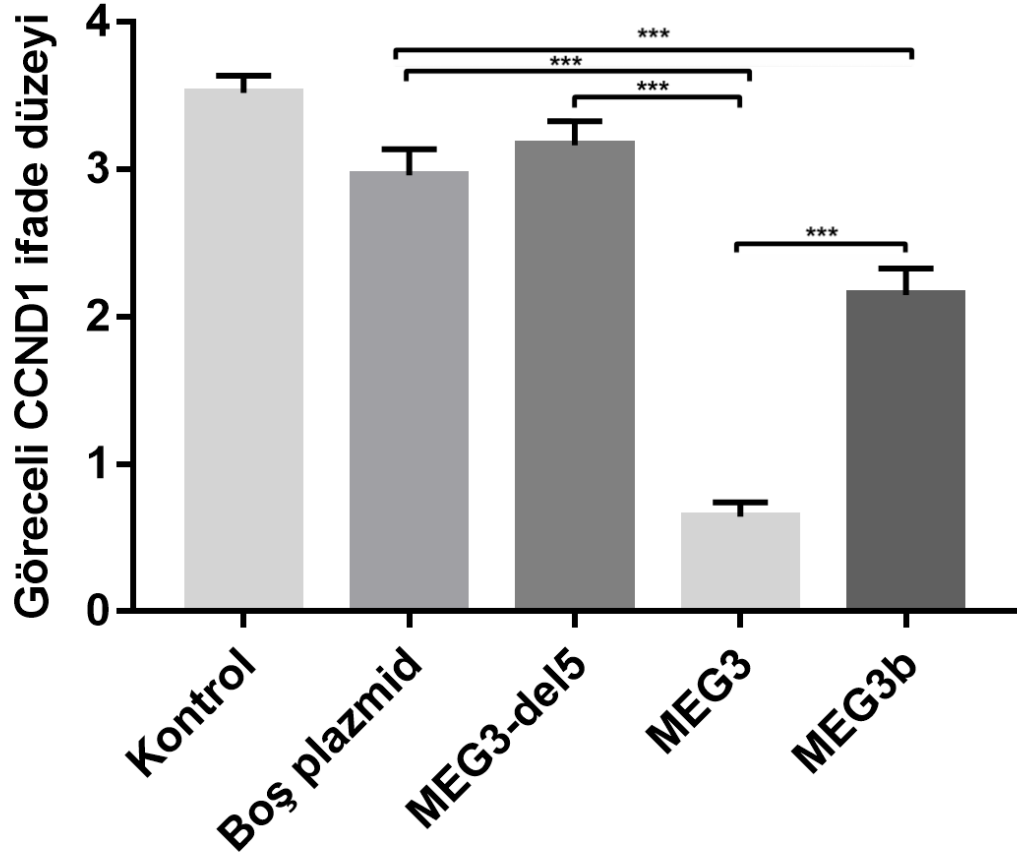
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında CASC3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.40'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda CASC3 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. CASC3'ün ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda CASC3 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda CASC3 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.40. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CASC3 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.3.3. HT-29 Hücre Hattında CCND1 İfade Düzeyi

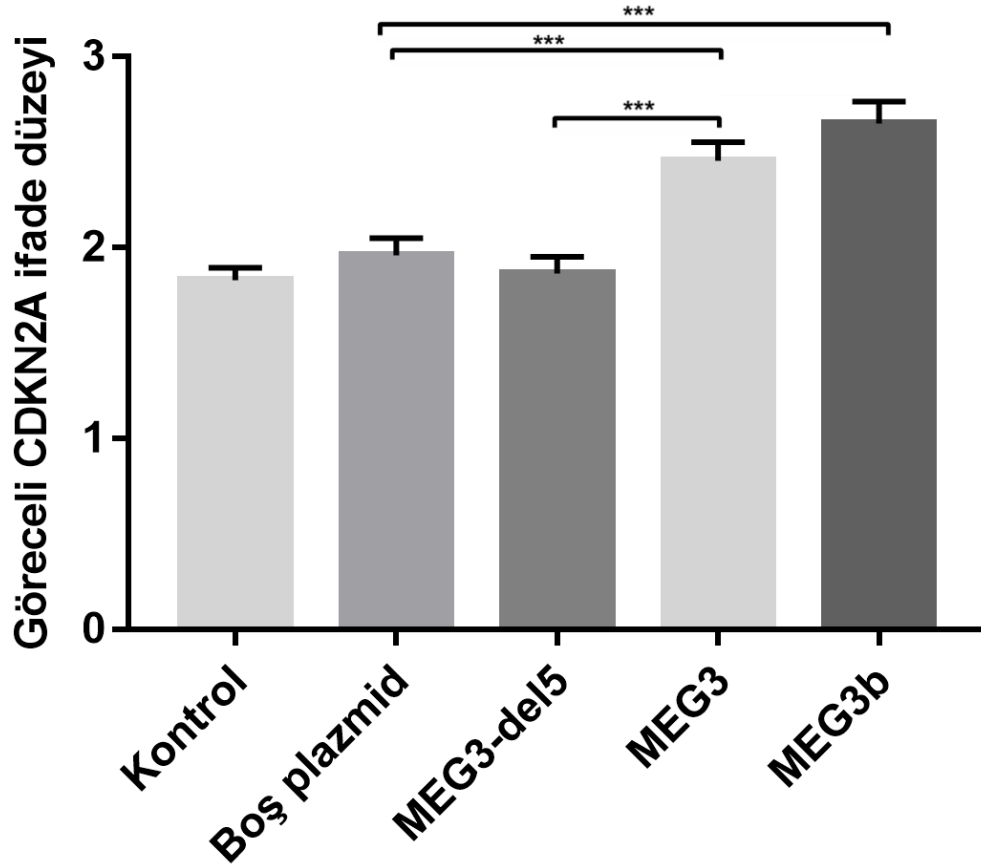
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında CCND1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.41’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. CCND1’in ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda CCND1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.41. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CCND1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.3.4. HT-29 Hücre Hattında CDKN2A İfade Düzeyi

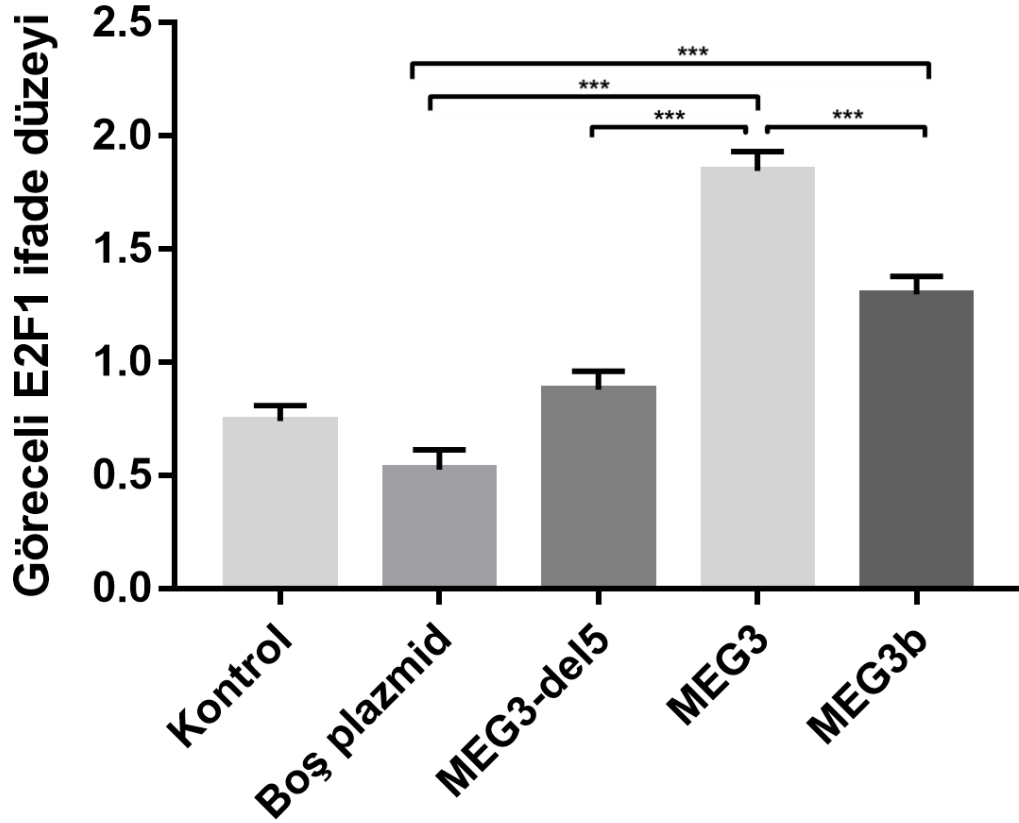
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında CDKN2A geninin ifade düzeyi Şekil 4.42’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda CDKN2A geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. CDKN2A’nın ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda CDKN2A geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda CDKN2A geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.42. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası CDKN2A geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.5. HT-29 Hücre Hattında E2F1 İfade Düzeyi

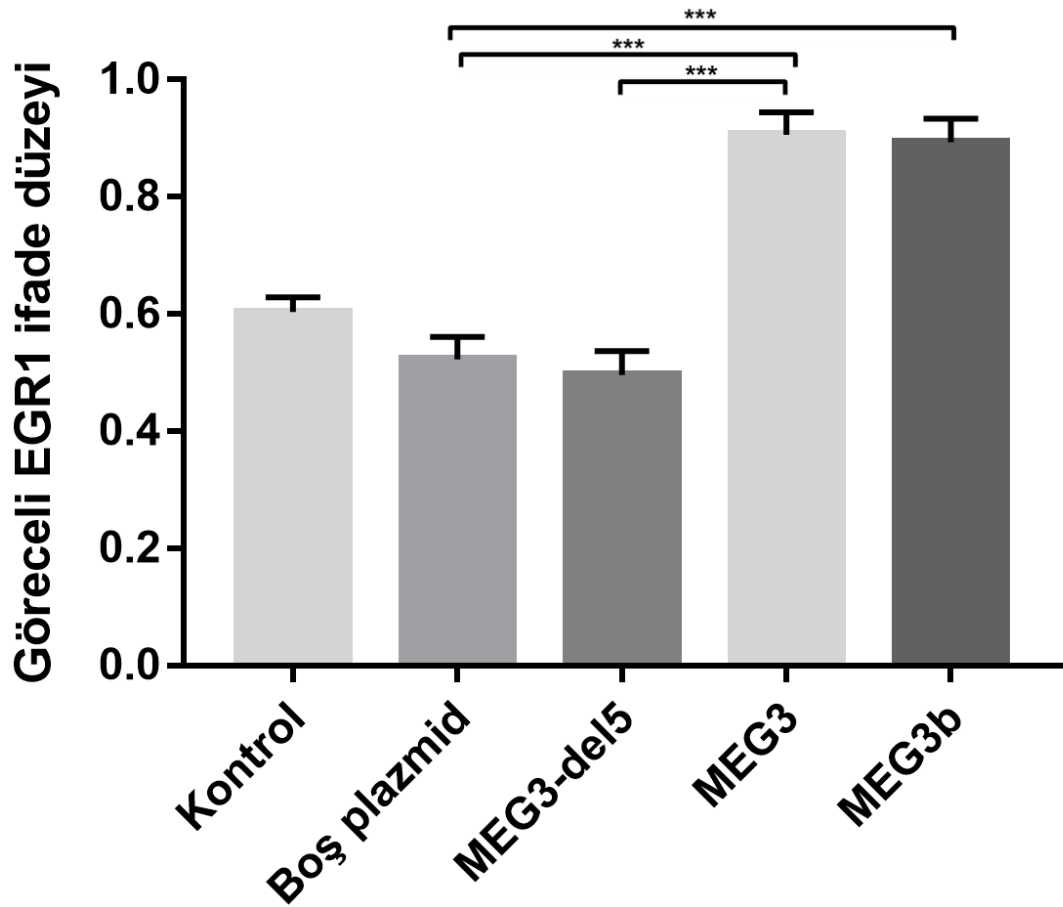
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında E2F1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.43’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b plazmidini ile transfekte edilen deney gruplarında E2F1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. E2F1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda, E2F1’in ifadesi anlamlı düzeyde artmıştır. Ayrıca, MEG3b ile transfekte edilen deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda E2F1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.43. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası E2F1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.3.6. HT-29 Hücre Hattında EGR1 İfade Düzeyi

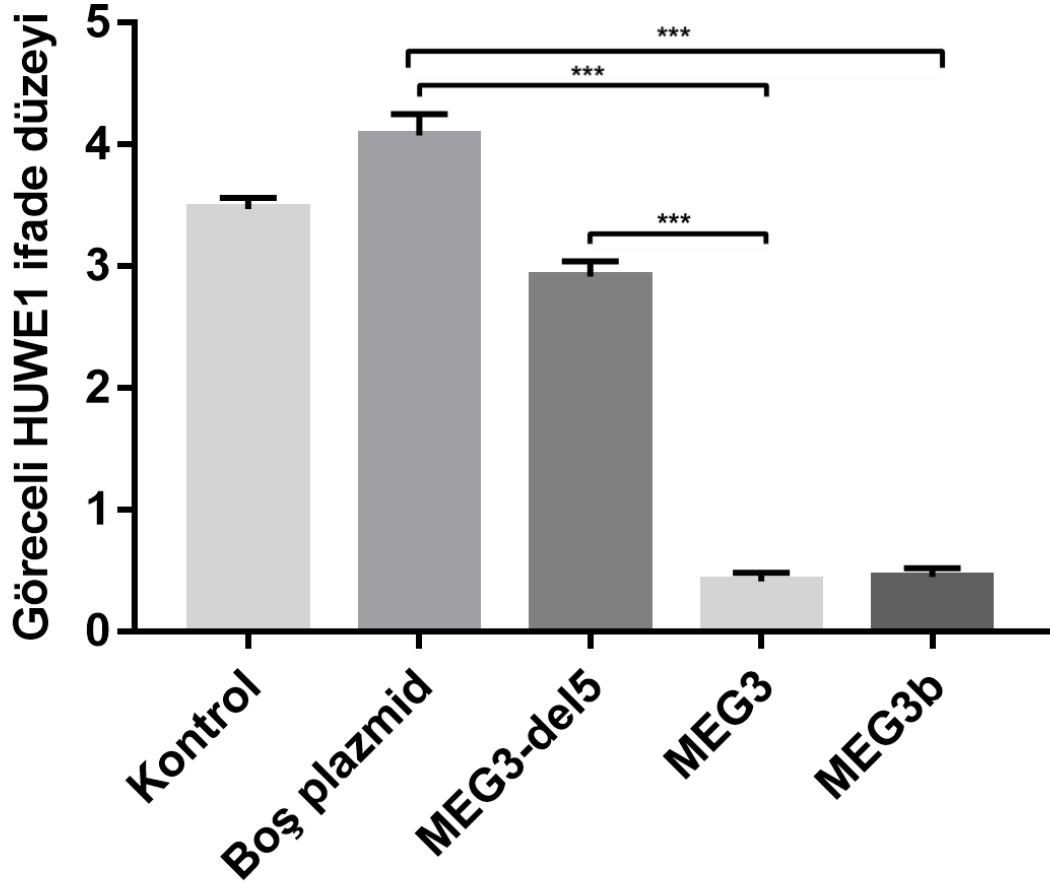
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında EGR1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.44’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda EGR1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. EGR1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda EGR1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.44. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası EGR1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.7. HT-29 Hücre Hattında HUWE1 İfade Düzeyi

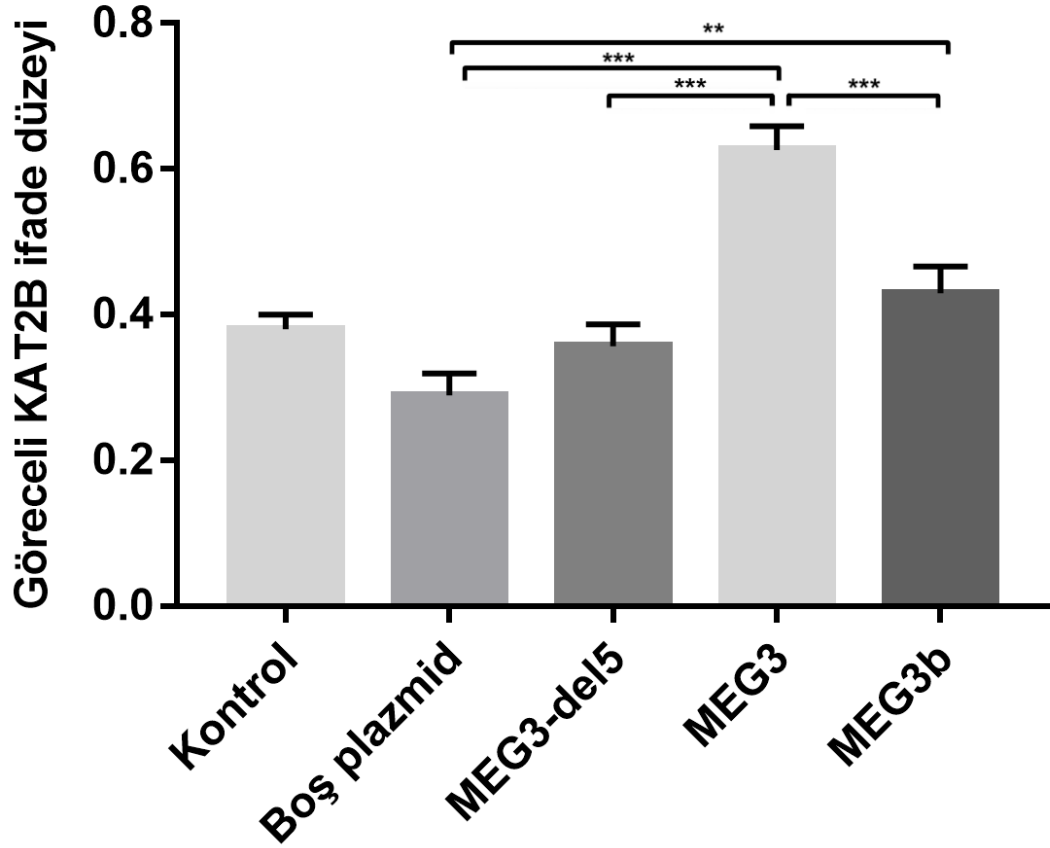
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında HUWE1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.45’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmid ile transfekte edilen deney grubunda HUWE1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. HUWE1’in ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda HUWE1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.45. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası HUWE1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.8. HT-29 Hücre Hattında KAT2B İfade Düzeyi

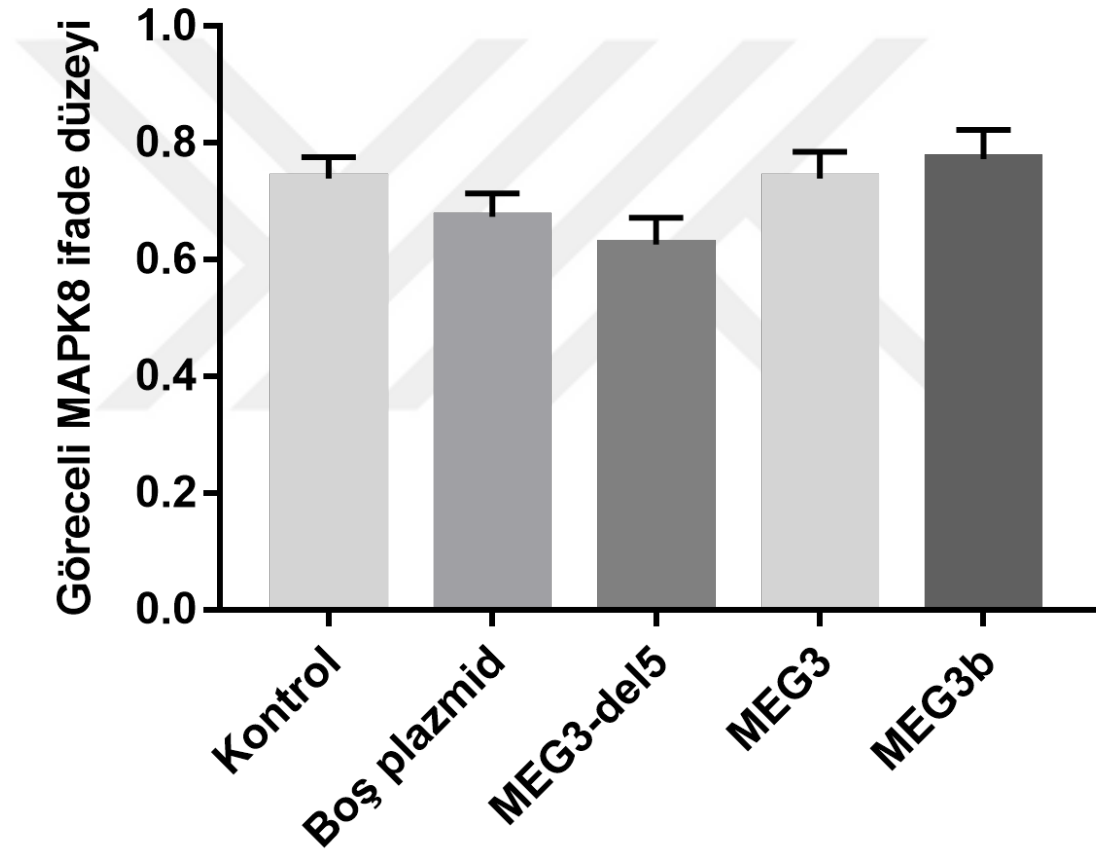
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında KAT2B geninin ifade düzeyi Şekil 4.46’da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda KAT2B geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. KAT2B’nin ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda KAT2B geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Bununla beraber MEG3b ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda KAT2B’nin ifade düzeyi anlamlı düzeyde artış göstermiştir.



Şekil 4.46. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası KAT2B geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01,***p<0.001).

4.3.9. HT-29 Hücre Hattında MAPK8 İfade Düzeyi

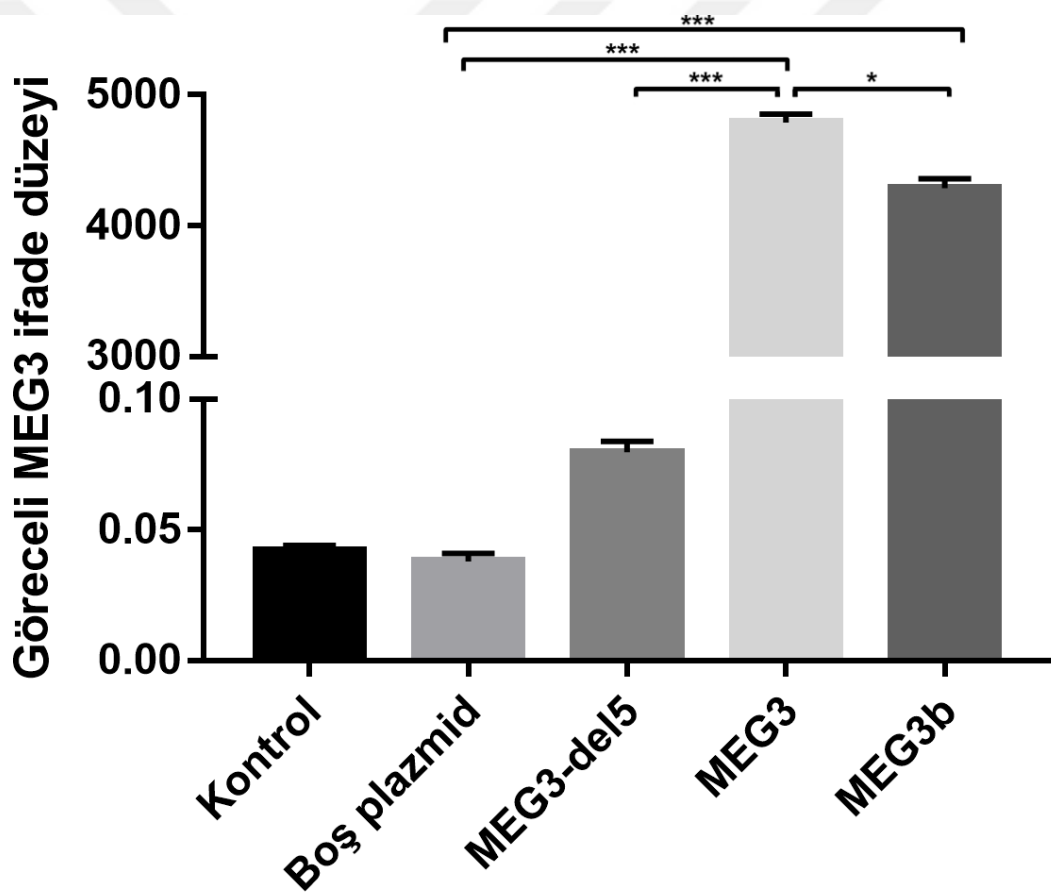
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında MAPK8 geninin ifade düzeyi Şekil 4.47’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda MAPK8 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MAPK8’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda MAPK8 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.47. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MAPK8 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.3.10. HT-29 Hücre Hattında MEG3 İfade Düzeyi

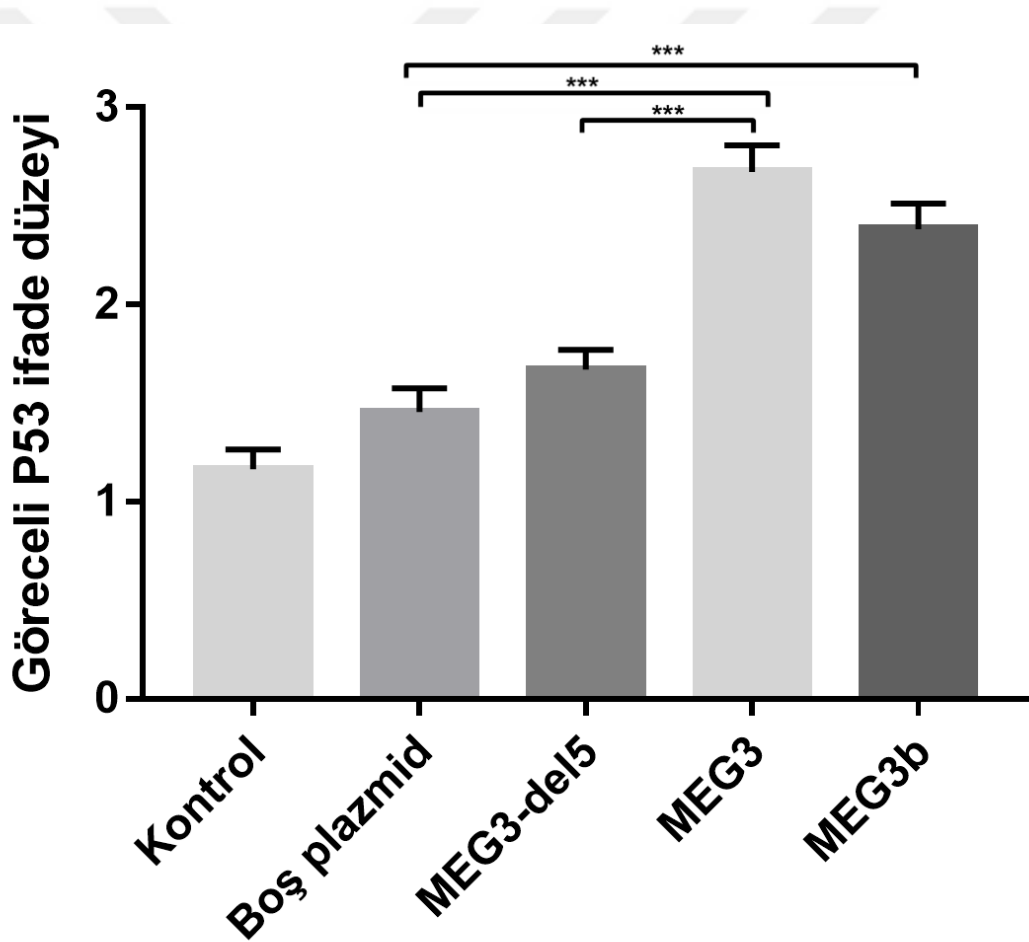
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında MEG3 geninin ifade düzeyi Şekil 4.48’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda MEG3 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MEG3’ün ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda MEG3 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda MEG3 geninin ifadesi artış göstermiştir, bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.48. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).

4.3.11. HT-29 Hücre Hattında P53 İfade Düzeyi

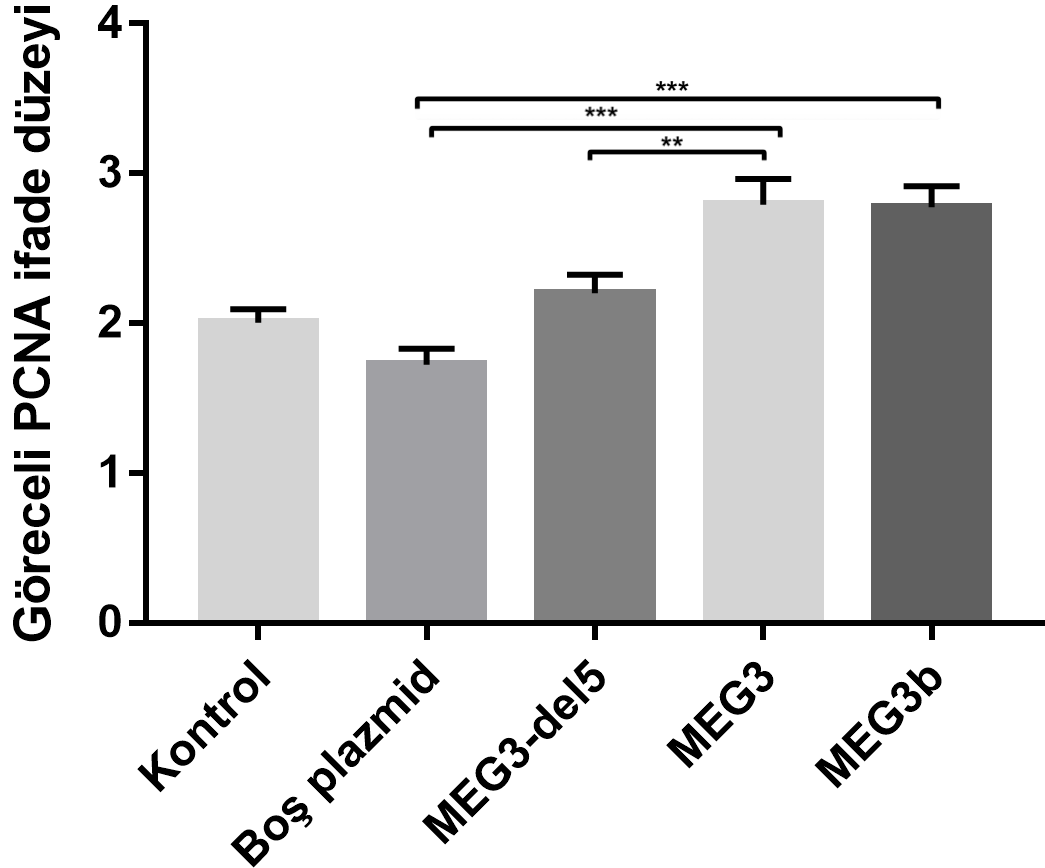
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında P53 geninin ifade düzeyi Şekil 4.49’da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmid ile transfekte edilen deney grubunda P53 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. P53’ün ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda P53 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda P53 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.49. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası P53 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.001).

4.3.12. HT-29 Hücre Hattında PCNA İfade Düzeyi

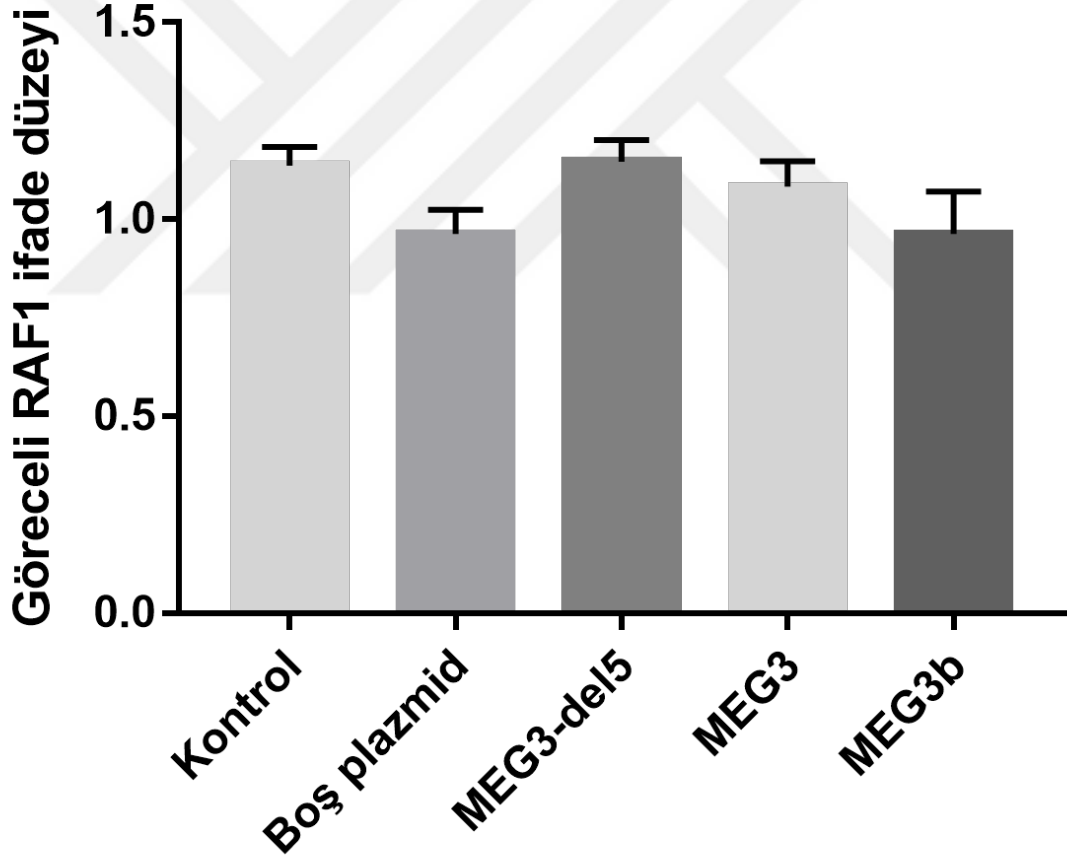
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında PCNA geninin ifade düzeyi Şekil 4.50’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. PCNA’nın ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda PCNA geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.50. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası PCNA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0.01, ***p<0.001).

4.3.13. HT-29 Hücre Hattında RAF1 İfade Düzeyi

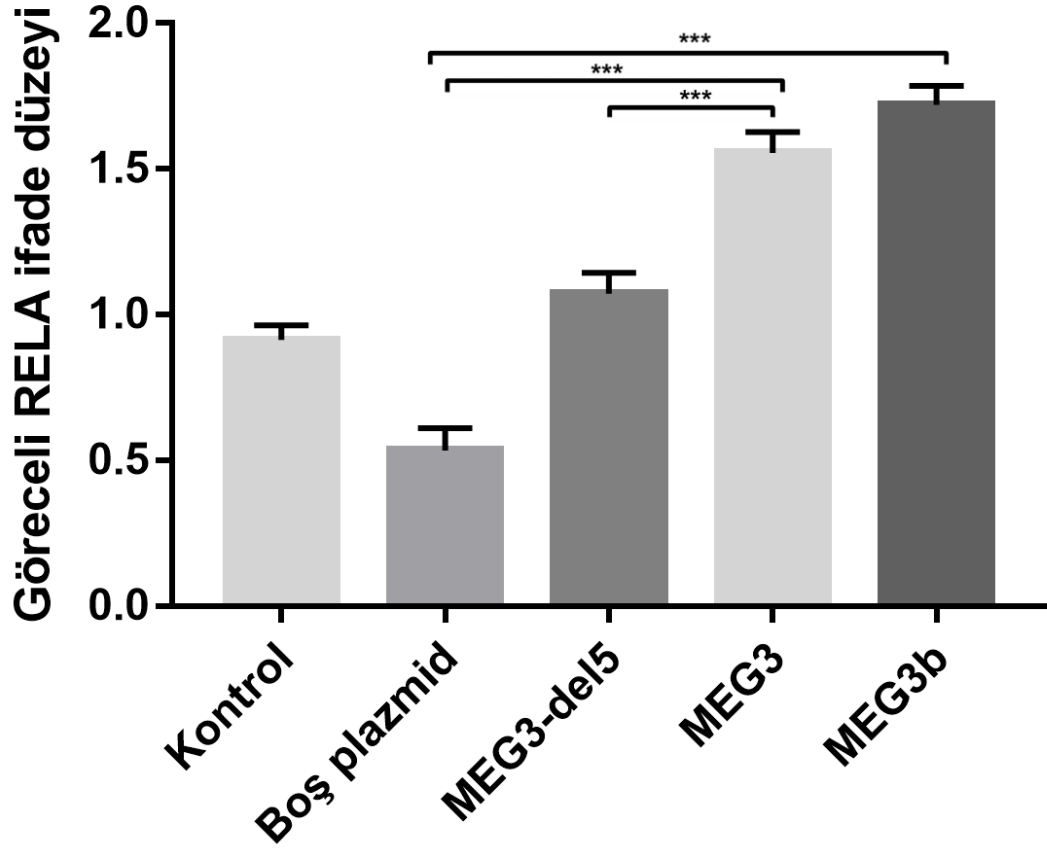
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında RAF1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.51’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidi ile transfekte edilen deney grubunda RAF1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda RAF1 geninin ifade düzeyinde değişim olmamıştır. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda RAF1 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.51. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RAF1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.3.14. HT-29 Hücre Hattında RELA İfade Düzeyi

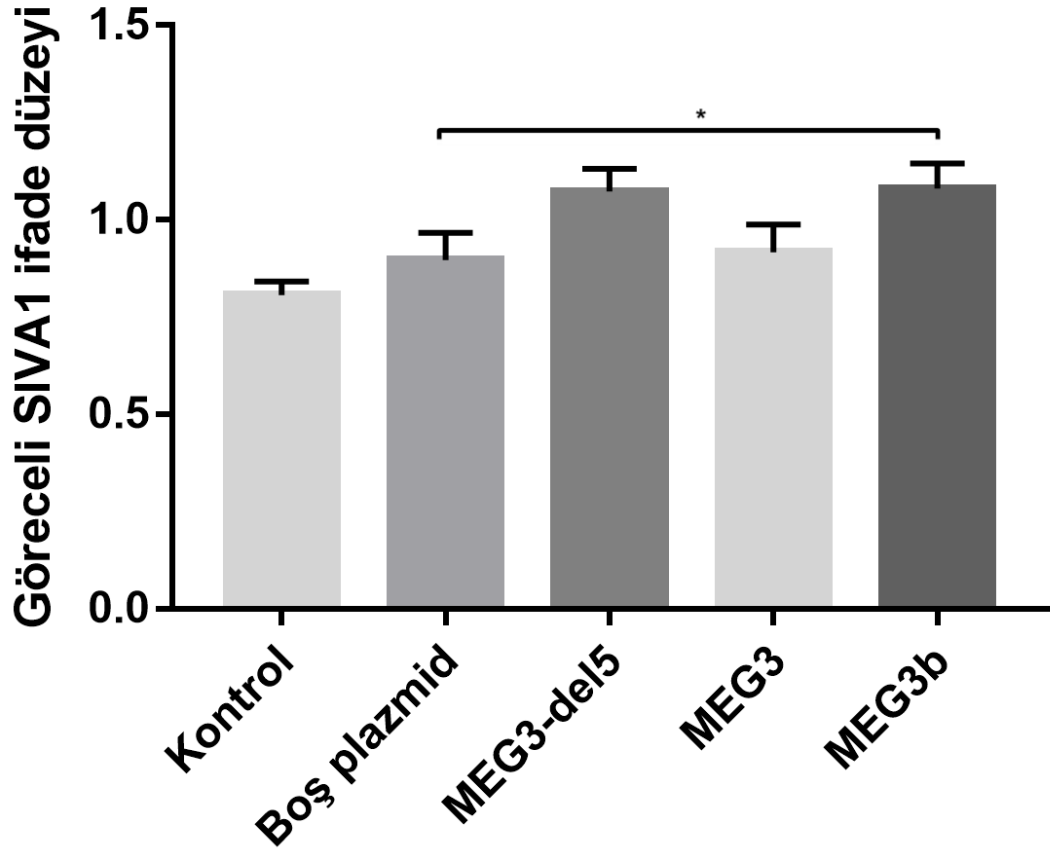
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında RELA geninin ifade düzeyi Şekil 4.52’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda RELA geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. RELA’nın ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda RELA geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda RELA geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.52. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası RELA geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.15. HT-29 Hücre Hattında SIVA1 İfade Düzeyi

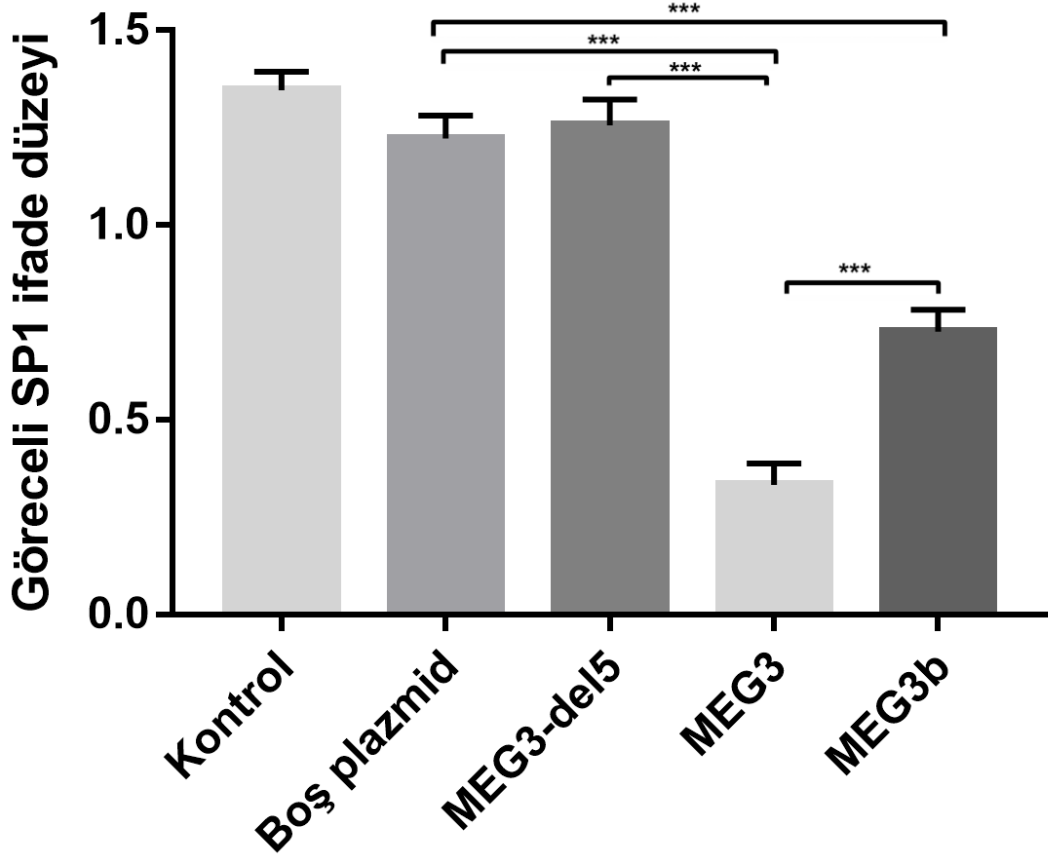
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında SIVA1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.53’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda SIVA1 geninin ifadesi anlamlı düzeyde artış göstermiştir. MEG3-Del5 plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilen deney grubunda SIVA1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda SIVA1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.53. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SIVA1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$).

4.3.16. HT-29 Hücre Hattında SP1 İfade Düzeyi

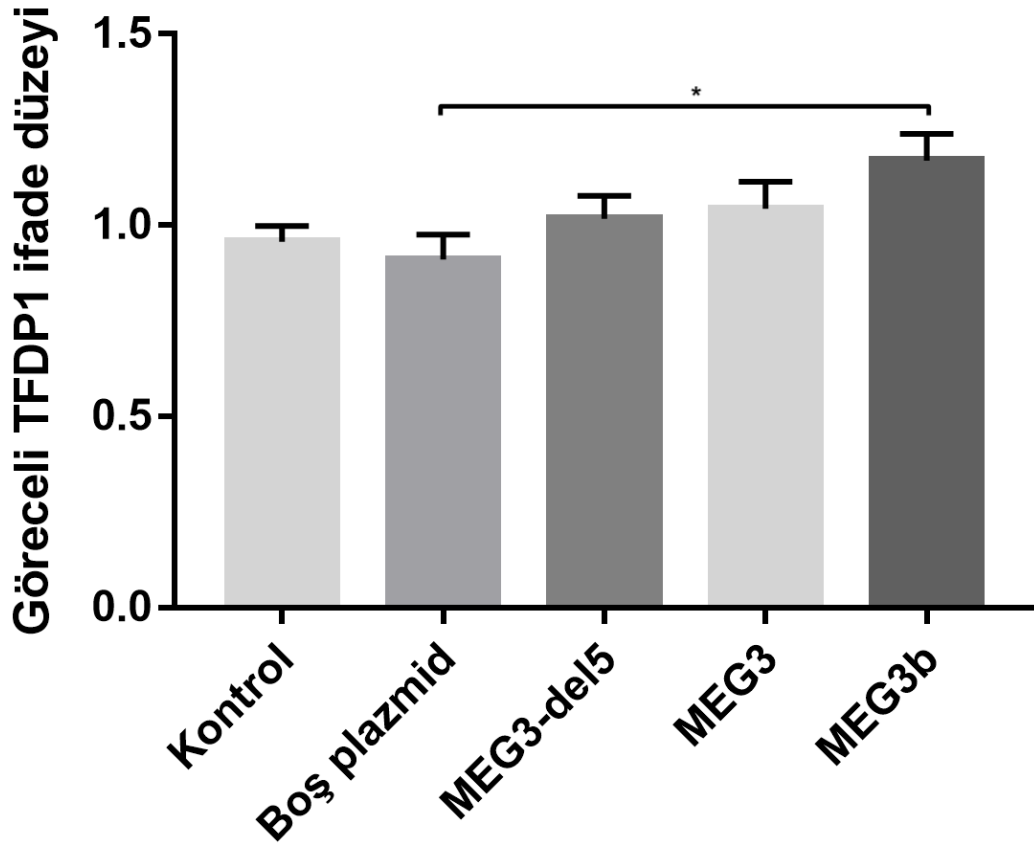
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında SP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.54’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda SP1 geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. SP1’in ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda SP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda SP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.54. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası SP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.17. HT-29 Hücre Hattında TFDP1 İfade Düzeyi

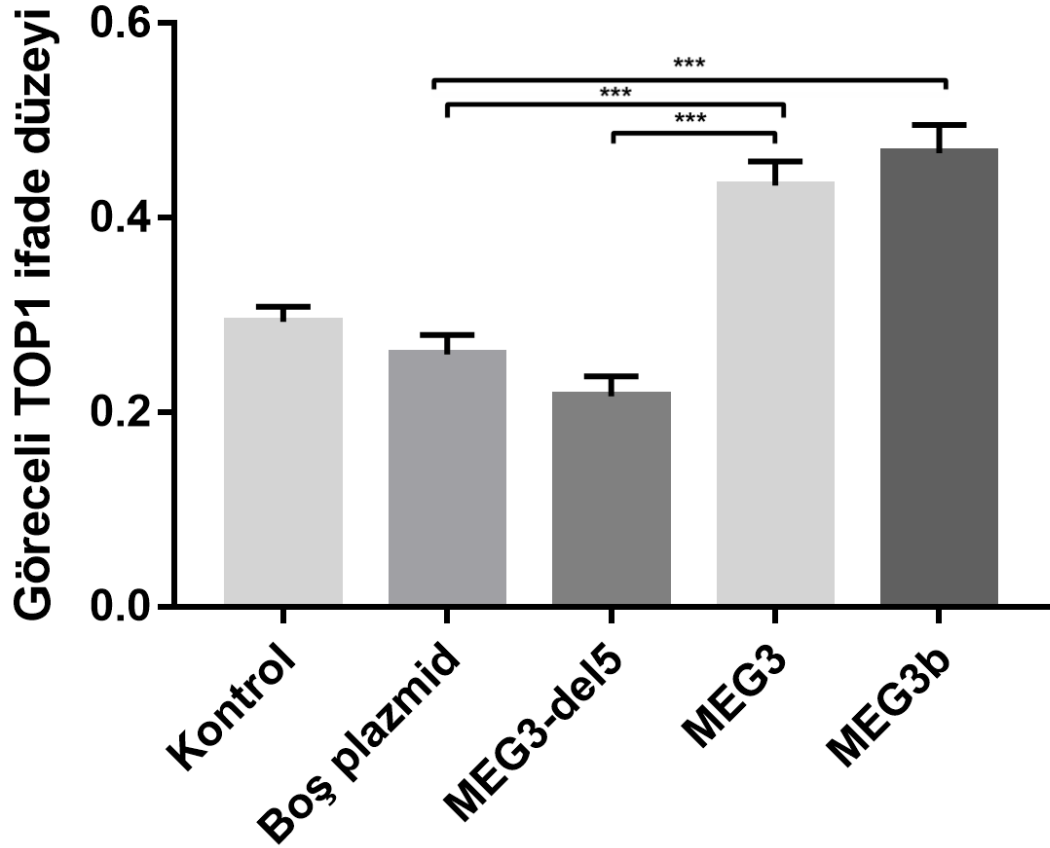
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında TFDP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.55’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edilen deney gruplarında TFDP1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. TFDP1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3-del5 plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda TFDP1 geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca MEG3b plazmidi ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda TFDP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.55. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TFDP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p < 0.05$).

4.3.18. HT-29 Hücre Hattında TOP1 İfade Düzeyi

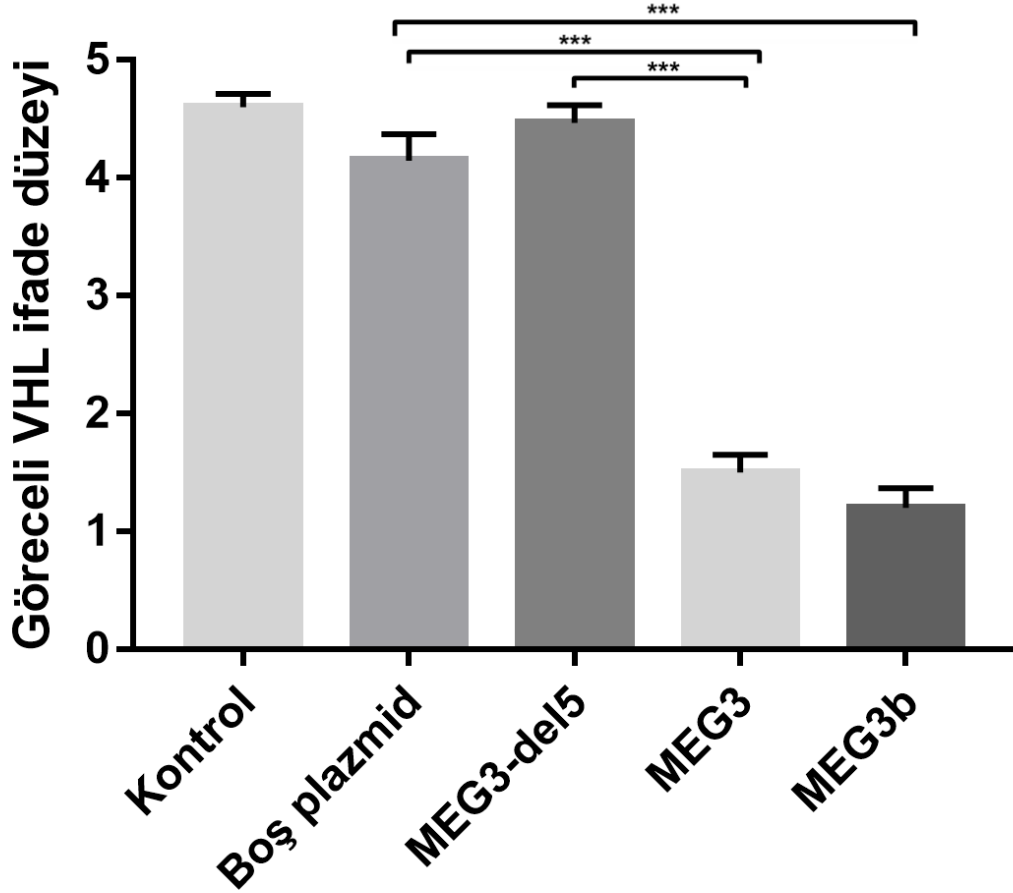
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında TOP1 geninin ifade düzeyi Şekil 4.56’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. TOP1’in ifade düzeyindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyi artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda TOP1 geninin ifade düzeyi azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.56. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası TOP1 geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***p<0.001).

4.3.19. HT-29 Hücre Hattında VHL İfade Düzeyi

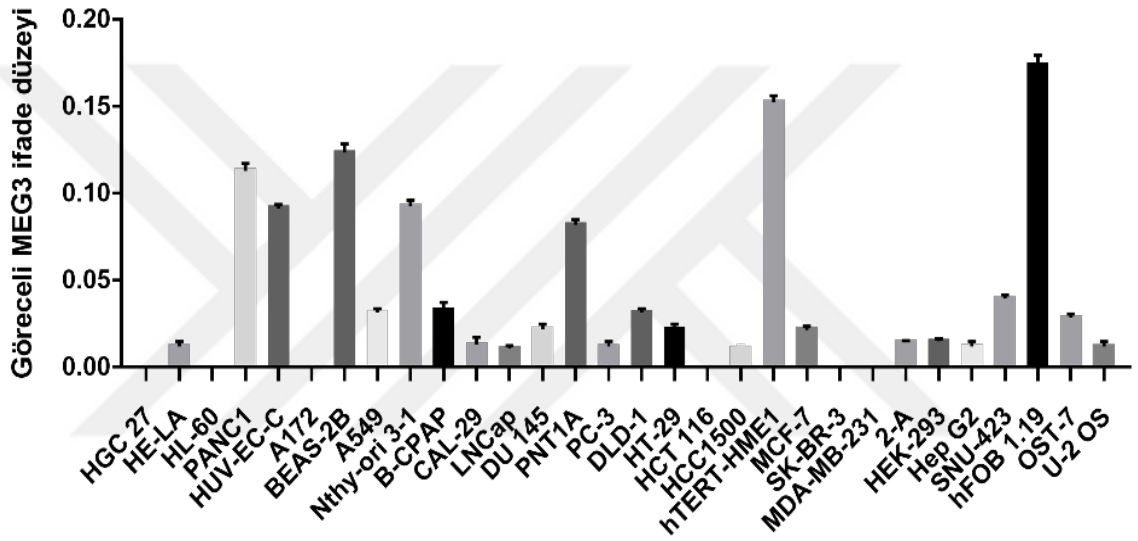
HT-29 kolorektal kanser hücre hattında VHL geninin ifade düzeyi Şekil 4.57’de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda VHL geninin ifade düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. VHL’nin ifade düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda VHL geninin ifade düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ile transfekte edilmiş deney grubunda VHL geninin ifade düzeyi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.



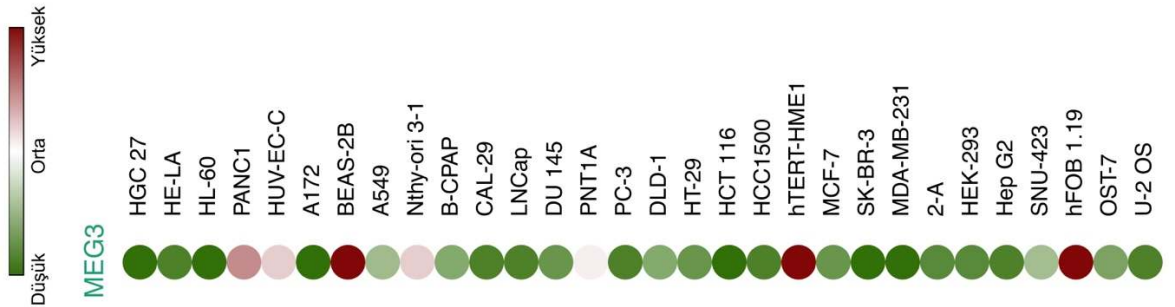
Şekil 4.57. HT-29 hücre hattında plazmid transfeksiyonu sonrası VHL geninin ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p < 0.001$).

4.4. MEG3 Geninin Hücre Hatlarındaki İfade Düzeyi

Çeşitli hücre hatlarından elde edilen RNA'lar kullanılarak, Real Time PCR yöntemi kullanılarak MEG3 geninin ifade düzeyi belirlenmiştir. Çeşitli hücrelerdeki MEG3 gen ifade düzeyleri ve kullanılan hücreler Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Buradan elde edilen verilere göre çalışmada kullandığımız hücre hatlarının büyük bir kısmında MEG3 geninin ifadesi oldukça oldukça düşüktür. Ayrıca HGC 27, HL-60, A172, HCT116, SK-BR-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında ifadesi kayıptır. Bunun aksine hTERT-HME1, BEAS-2B ve hFOB 1.19 hücre hatlarında aşırı ifadelene göstermektedir.



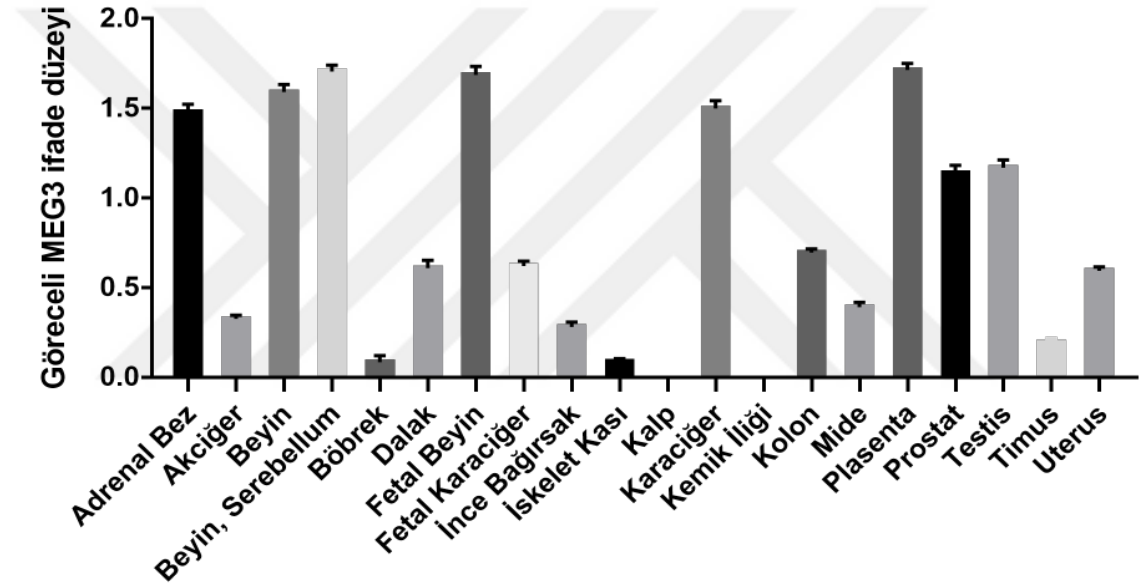
Şekil 4.58. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin çeşitli hücre hatlarındaki ifade düzeylerinin gösterilmesi.



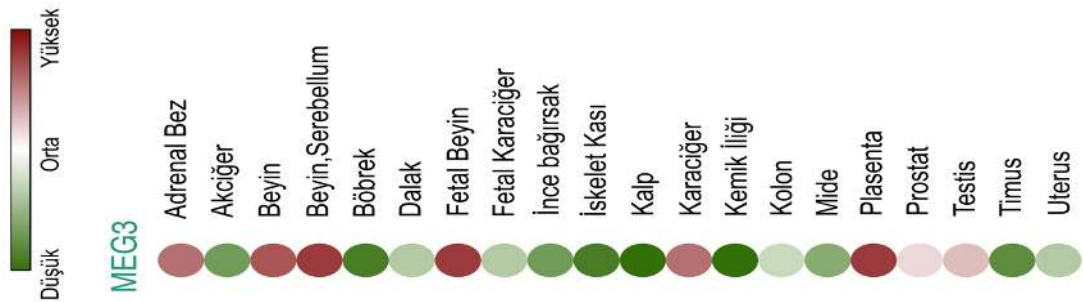
Şekil 4.59. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin çeşitli hücre hatlarındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterilmesi.

4.5. MEG3 Geninin Dokulardaki İfade Düzeyi

Ticari olarak temin edilen 20 farklı insan dokusundan Real Time PCR yöntemi kullanılarak MEG3 geninin ifade düzeyi belirlenmiştir. Çeşitli insan dokularındaki MEG3 gen ifade düzeyleri ve kullanılan dokular Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Buradan elde edilen verilere göre çalışmada kullandığımız insan dokularının büyük bir kısmında MEG3 geninin ifadesi mevcuttur. Bununla beraber kalp ve kemik iliğinde MEG3 ifade edilmemektedir. Bununla beraber timüs, mide, iskelet kası, böbrek ve akciğer dokusunda düşük ifade düzeyine sahiptir. Plesenta, karaciğer, beyin, serebellum ve adrenal bezde ise MEG3 oldukça yüksek düzeylerde ifadelenmektedir.



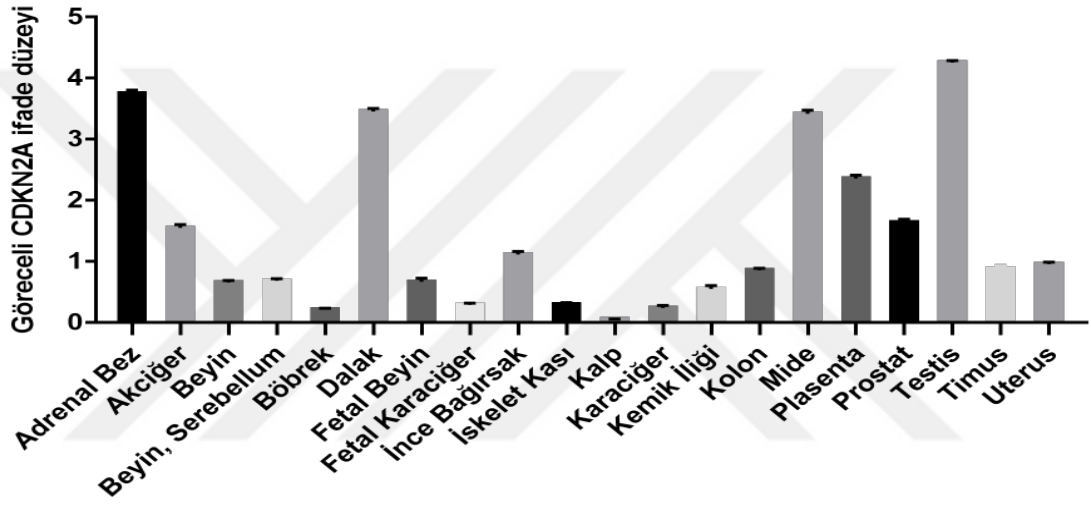
Şekil 4.60. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin gösterimi.



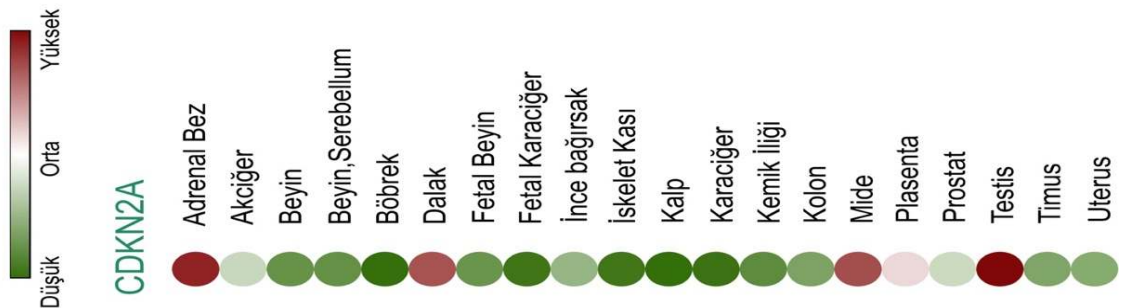
Şekil 4.61. Real Time PCR sonucunda MEG3 geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterimi.

4.6. CDKN2A Geninin Normal İnsan Dokularındaki İfade Düzeyi

Ticari olarak temin edilen 20 farklı insan dokusundan Real Time PCR yöntemi kullanılarak CDKN2A geninin ifade düzeyi belirlenmiştir. Çeşitli insan dokularındaki CDKN2A gen ifade düzeyleri ve kullanılan dokular Şekil 4.58’de gösterilmiştir. Buradan elde edilen verilere göre çalışmada kullandığımız insan dokularının tamamında CDKN2A gen ifadesi mevcuttur. Bununla beraber, kalp, böbrek, karaciğer ve fetal karaciğerde CDKN2A’nın ifade düzeyi oldukça düşüktür. Bunun aksine adrenal bez, dalak, mide ve testis dokusunda ise CDKN2A oldukça yüksek düzeylerde ifadenmektedir.



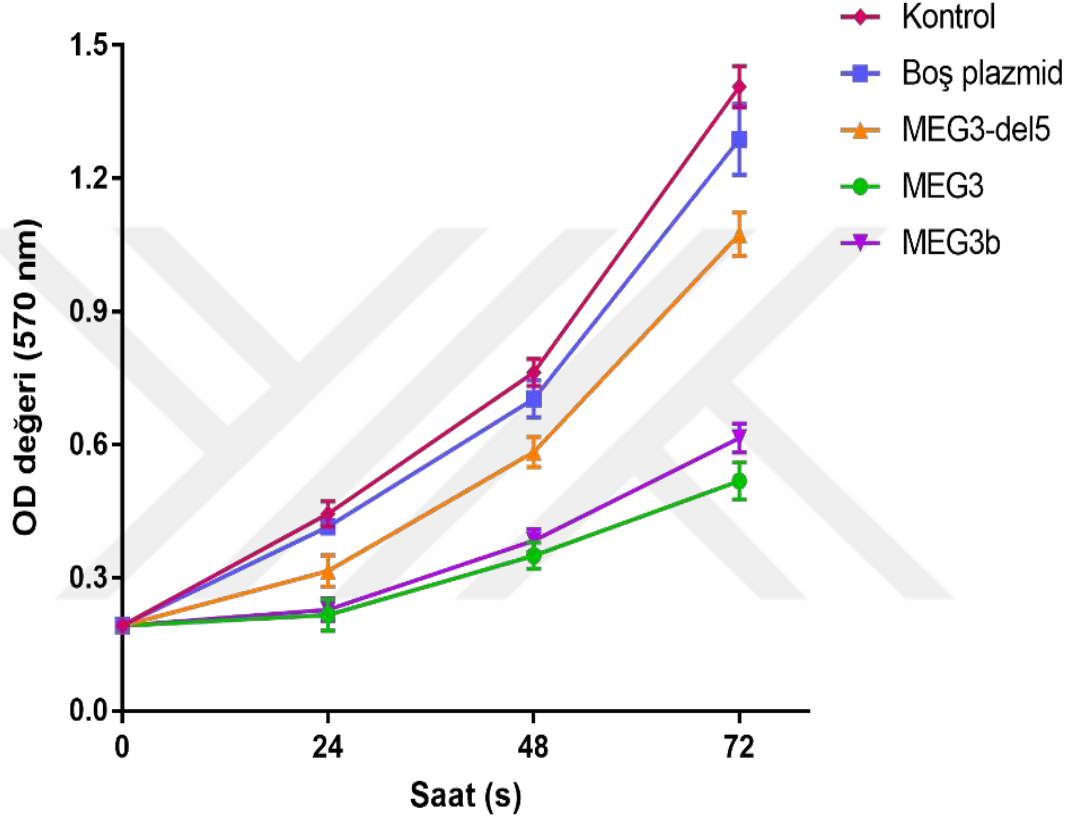
Şekil 4.62. Real Time PCR sonucunda CDKN2A geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin gösterimi.



Şekil 4.63. Real Time PCR sonucunda CDKN2A geninin normal insan dokularındaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritası yöntemiyle gösterimi.

4.7. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

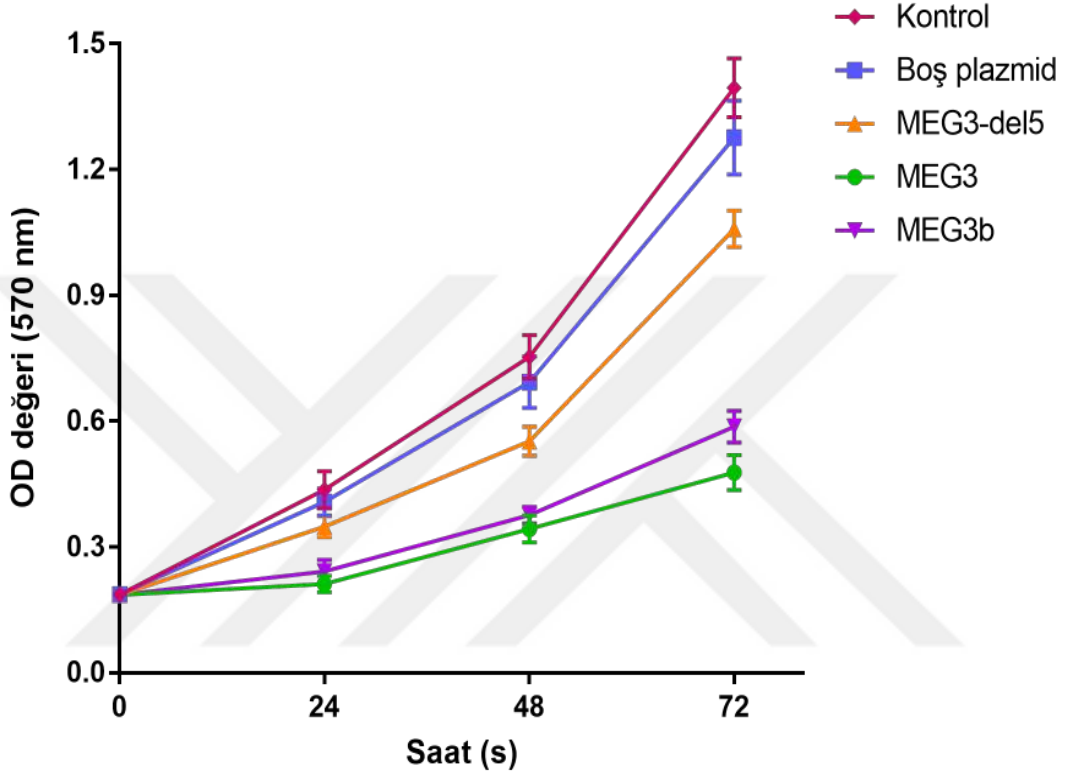
HCT-116 hücreleri boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten sonra, absorbans ölçümlerinden elde edilen hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.64 'de verilmiştir.



Şekil 4.64. HCT-116 hücre hattında transfeksiyonun hücre proliferasyonu üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (24 s; $p<0.05$) (48s ve 72s; $p<0.05$).

HCT-116 hücre hattında 24 saatlik dilimde MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında boş plazmide kıyasla hücre proliferasyonu anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen hücre gruplarında 48 ve 72 saat ölçümlerine göre hücre proliferasyonu kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 verilen hücrelere kıyasla azalmıştır. Hücre proliferasyonundaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$).

HT-29 hücreleri boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfeke edildikten sonra, absorbans ölçümlerinden elde edilen hücre proliferasyonu grafiği Şekil 4.65’de verilmiştir.

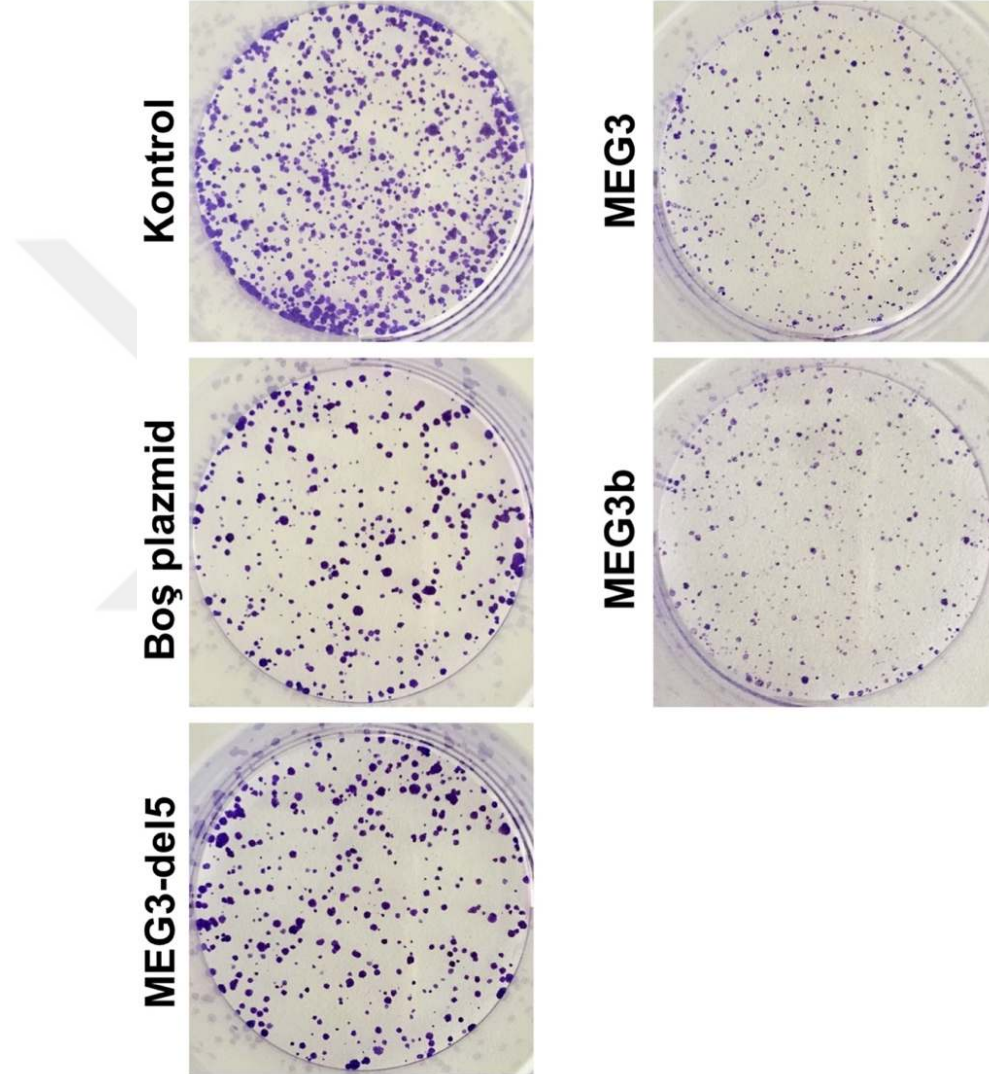


Şekil 4.65. HT-29 hücre hattında transfeksiyonun hücre proliferasyonu üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (24 s; $p<0.05$) (48s ve 72s; $p<0.05$).

HT-29 hücre hatlarında 24 saatlik dilimde MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında boş plazmide kıyasla hücre proliferasyonu anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfeke edilen hücre gruplarında 48 ve 72 saat ölçümlerine göre hücre proliferasyonu kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 verilen hücrelere kıyasla azalmıştır. Hücre proliferasyonundaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.01$).

4.8. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Koloni Oluşumu Üzerinde Etkileri

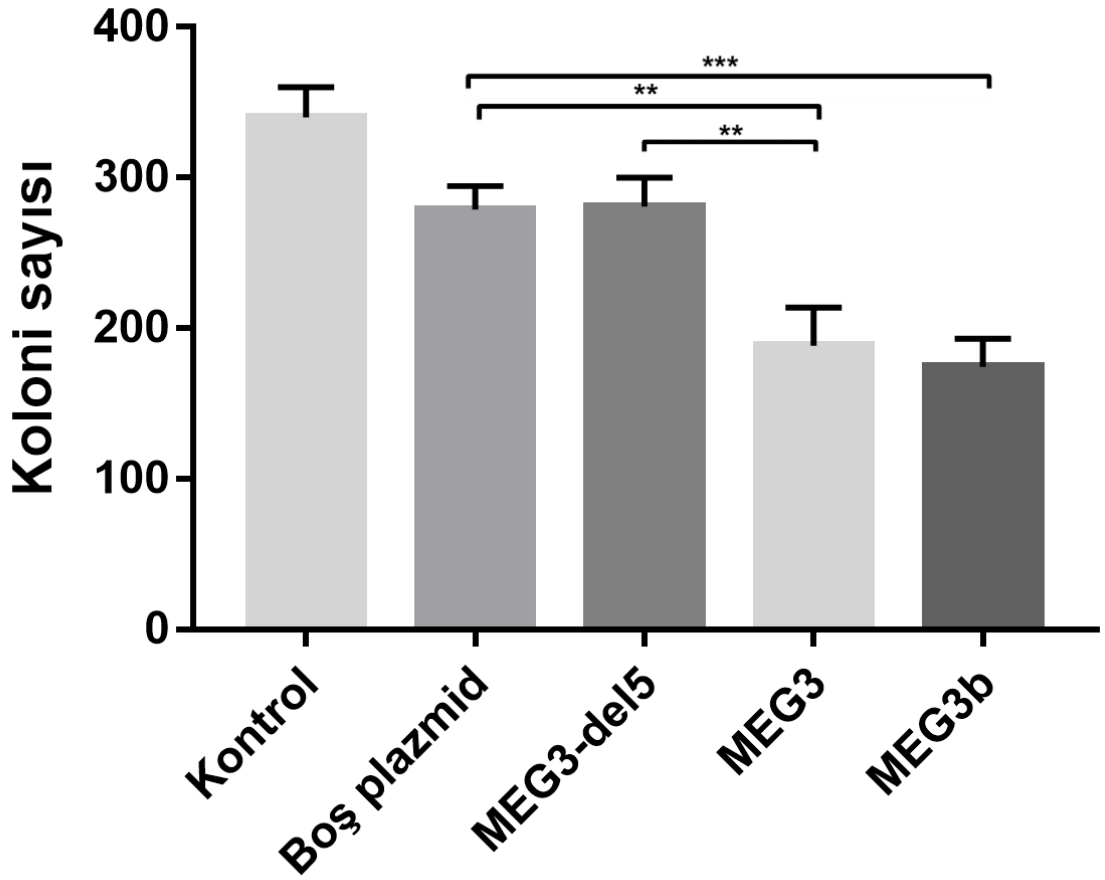
HCT-116 hücreleri boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten 14 gün sonra koloni sayımı yapılmıştır. HCT-116 hücrelerine plazmid transfeksiyonunun koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkileri Şekil 4.66'de verilmiştir.



Şekil 4.66. HCT-116 hücre hattında transfeksiyonun koloni oluşum yeteneği üzerine etkisi.

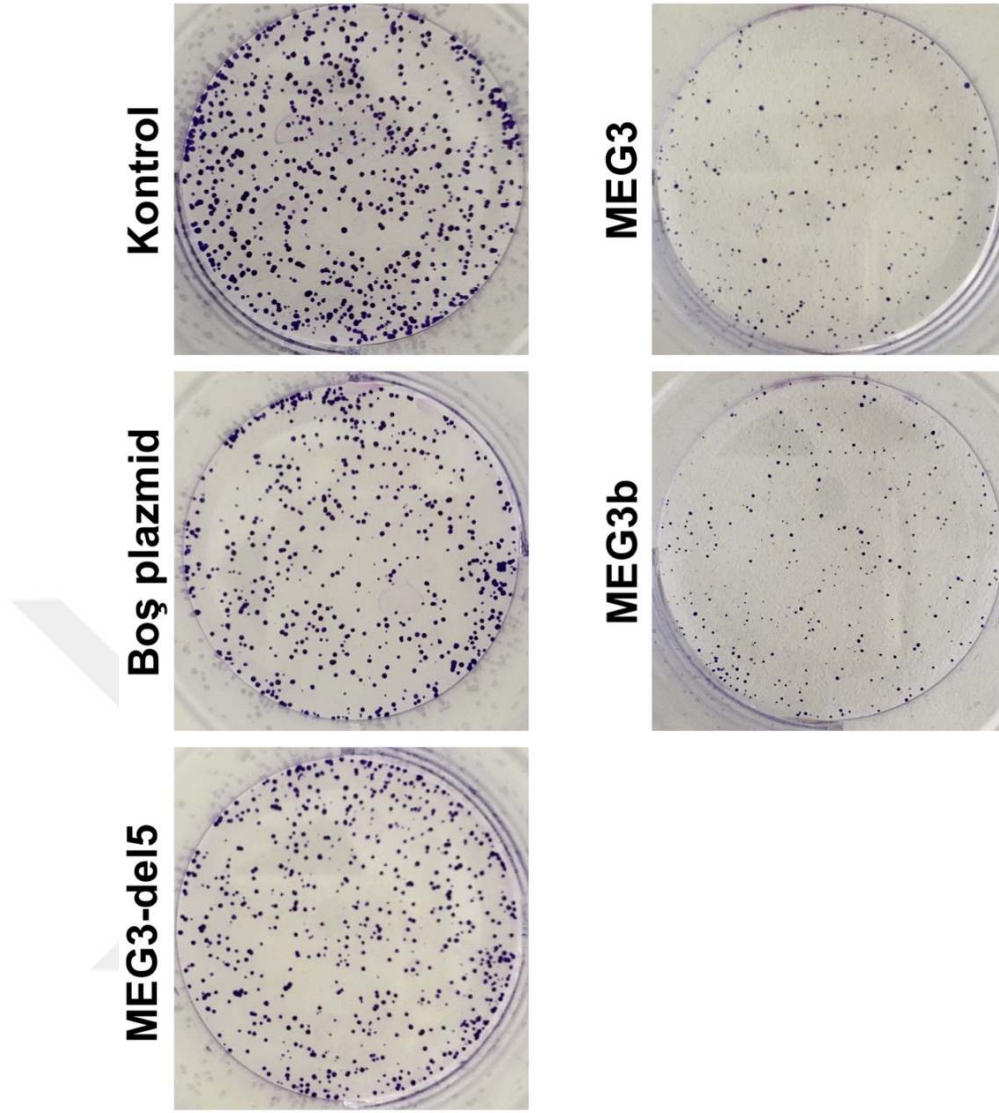
Koloniler ışık mikroskobu altında sayıldıktan sonra elde edilen veriler kullanılarak elde edilen grafik Şekil 4.67'de verilmiştir. HCT-116 hücre hattında, kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre

gruplarında koloni oluşum yeteneği ciddi anlamda azalmıştır. MEG3 ile transfekte edilmiş hücree hattında MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla koloni oluşum yeteneği azalmıştır. Ayrıca kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3-del5 ile transfekte edilen hücree grubunda koloni oluşturabilme yeteneğinde saptanabilir düzeyde değişim olmamıştır. Elde edilen tüm bu veriler istatistiksel olarak anlamlıdır.



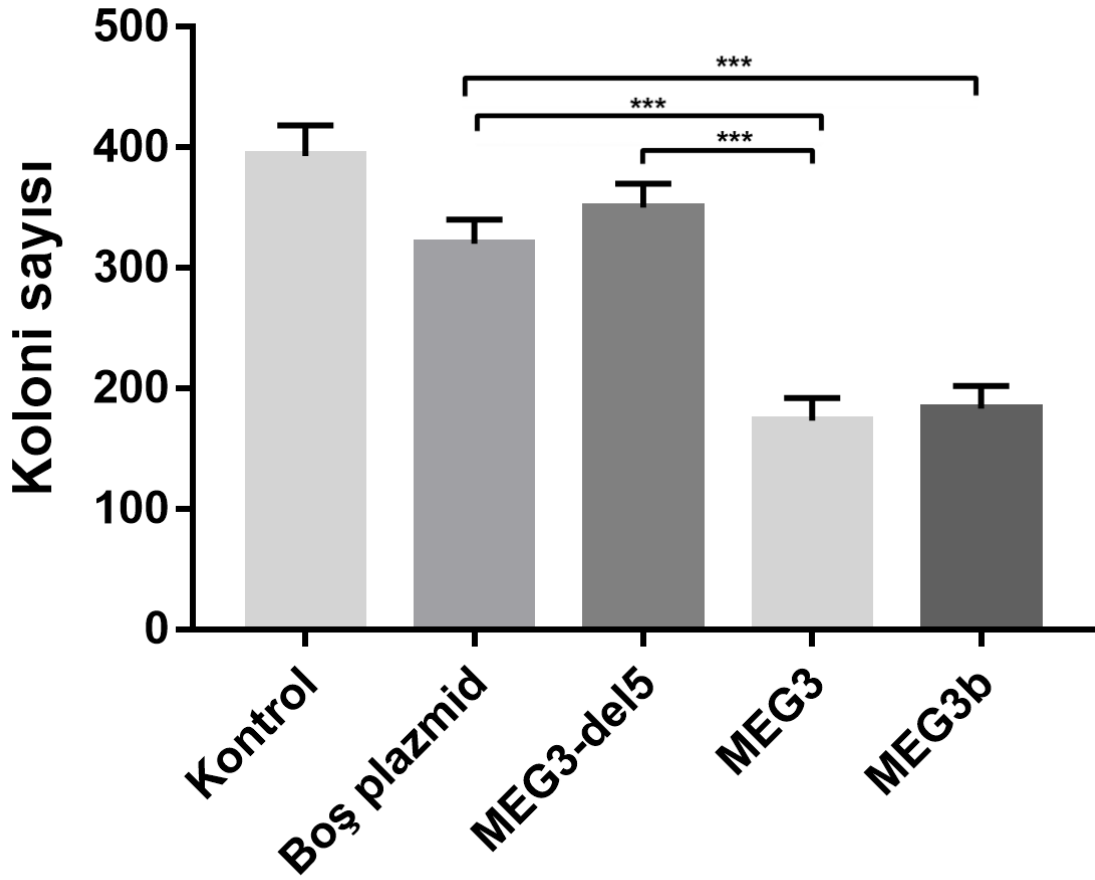
şekil 4.67. HCT-116 hücree hattında, transfeksiyon sonrası oluşan kolonilerin Image J ile analizi sonrasında elde edilen grafik. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir. (**p<0.01, ***p<0.001).

HT-29 hücreeeleri boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten 14 gün sonra koloni sayımı yapılmıştır. HT-29 hücreeelerine plazmid transfeksiyonunun koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkileri şekil 4.68 'de verilmiştir.



Şekil 4.68. HT-29 hücre hattında transfeksiyonun koloni oluşum yeteneği üzerine etkisi.

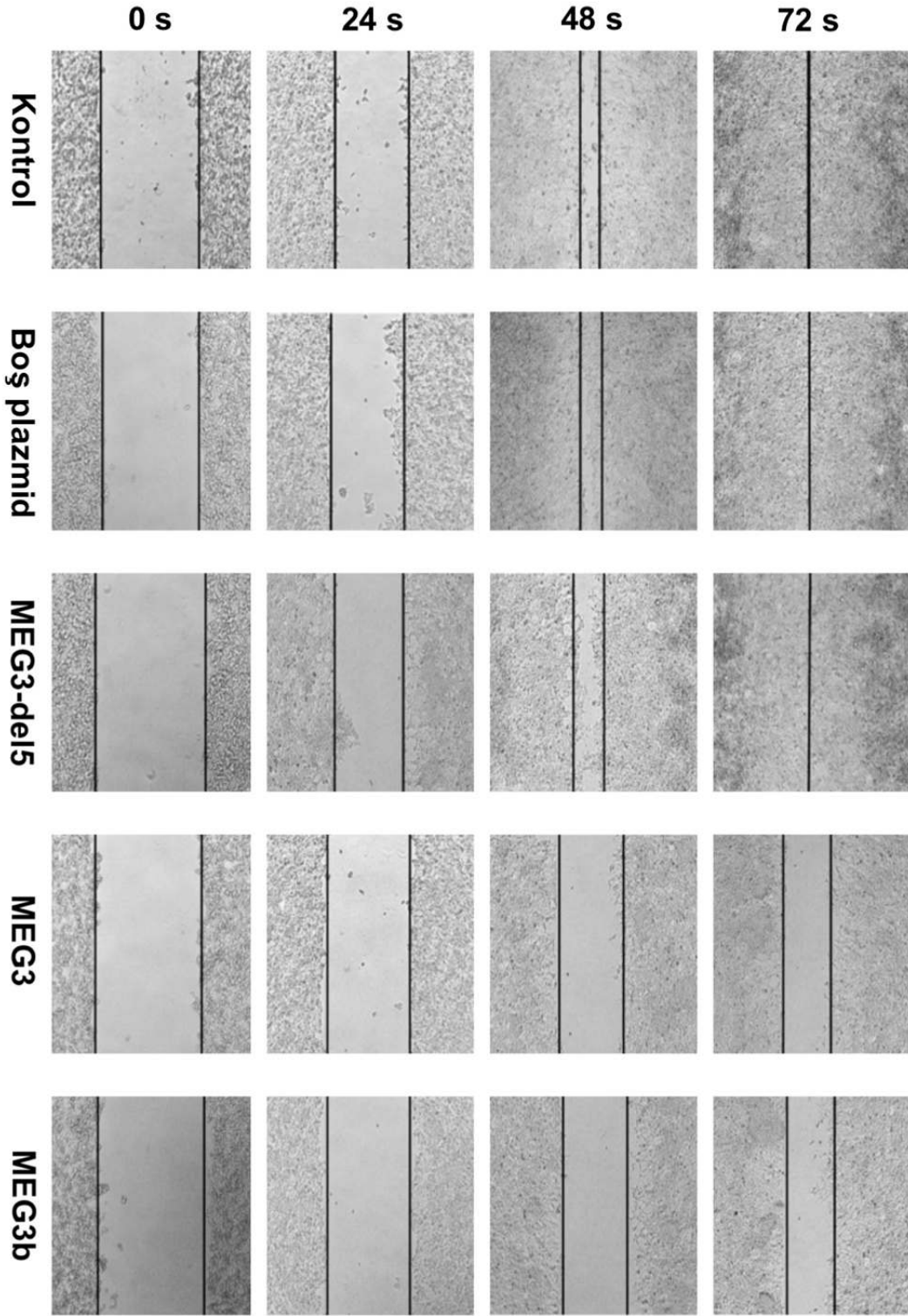
Koloniler ışık mikroskobu altında sayıldıktan sonra elde edilen veriler kullanılarak elde edilen grafik Şekil 4.69’de verilmiştir. HT-29 hücre hattında, kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre gruplarında koloni oluşum yeteneği ciddi anlamda azalmıştır. MEG3 ile transfekte edilmiş hücre hattında MEG3-del5 ile transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla koloni oluşum yeteneği azalmıştır. Ayrıca kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3-del5 ile transfekte edilen hücre grubunda koloni oluşturabilme yeteneğinde saptanabilir düzeyde değişim olmamıştır. Elde edilen tüm bu veriler istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.69. HCT-29 hücre hattında, transfeksiyon sonrası oluşan kolonilerin Image J ile analizi sonrasında elde edilen grafik. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. (***) $p < 0.001$).

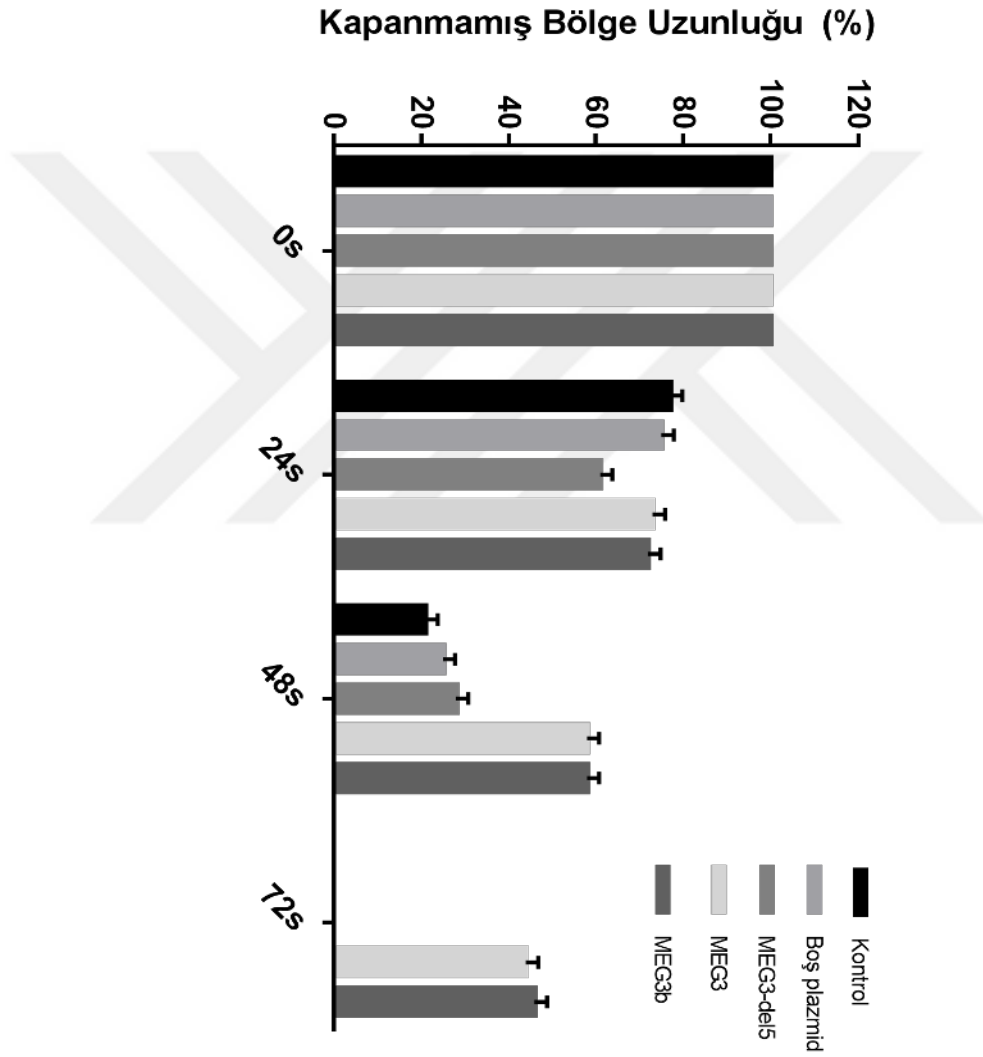
4.9. MEG3 ve MEG3b Transfeksiyonunun Hücre Migrasyonu Üzerinde Etkileri

HCT-116 hücreleri, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten sonra, transfeksiyonun hücre migrasyonu üzerinde etkilerini tayin edebilmek için oluşturulan yara 0, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla görüntülenmiştir. Her 24 saatte bir görüntülenen yaranın kapanma süreci Şekil 4.70 'de verilmiştir.



Şekil 4.70. HCT-116 hücre hattında MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ifadesinin hücre migrasyonu üzerine etkisi.

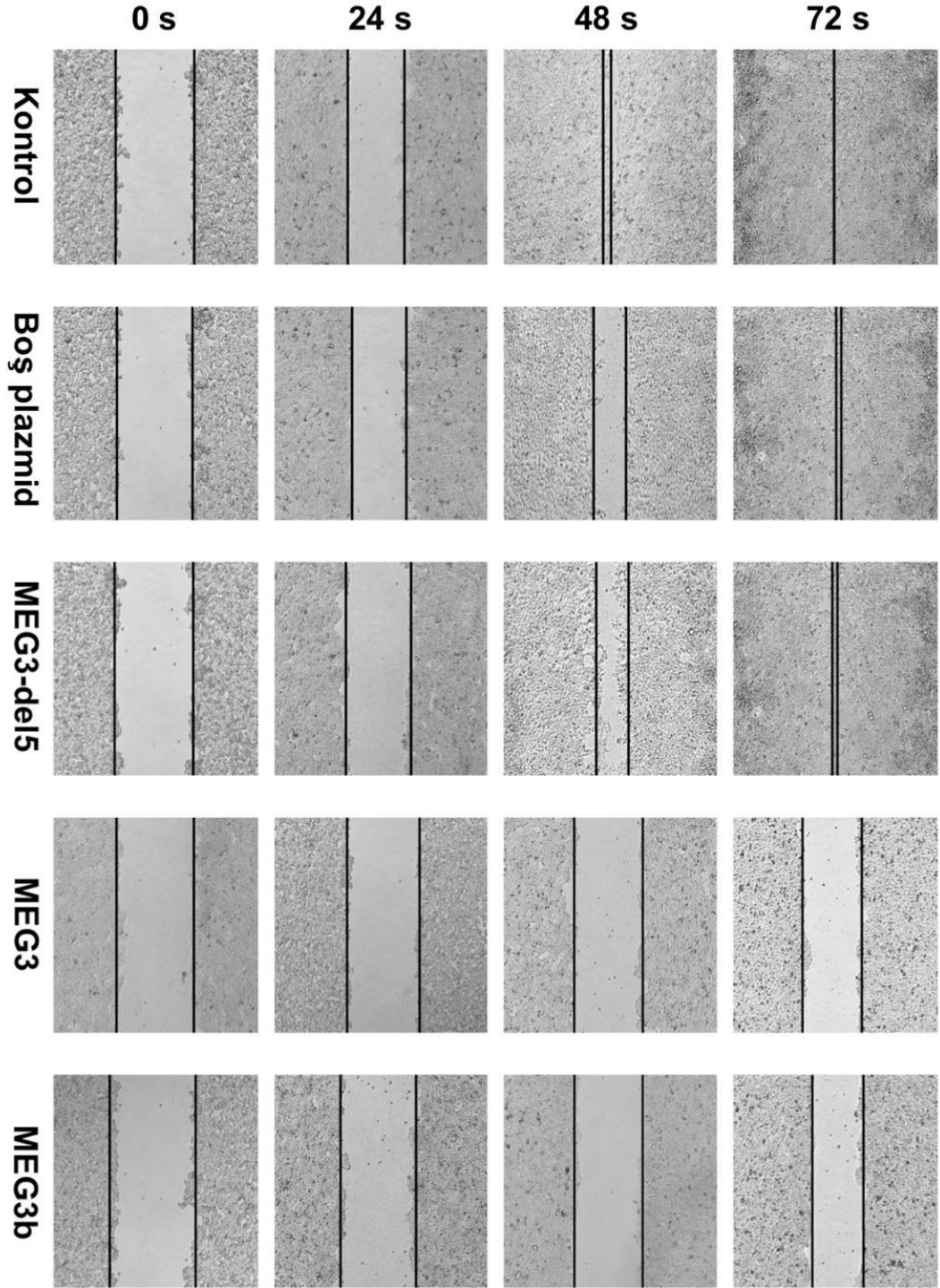
Yara kapanma sürecinin Image J ile analizi sonrasında elde edilen verileri kullanılarak oluşturulan grafik Şekil 4.71’de verilmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen HCT-116 hücre gruplarında oluşturulan yara 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilen hücelere kıyasla daha geç kapanmıştır. Buradan elde edilen verilere göre MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu yapılmış hücrelerde migrasyon hızı azalmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.71. HCT-116 hücre hattında yara kapanma sürecinin analizi sonrasında elde edilen grafik.

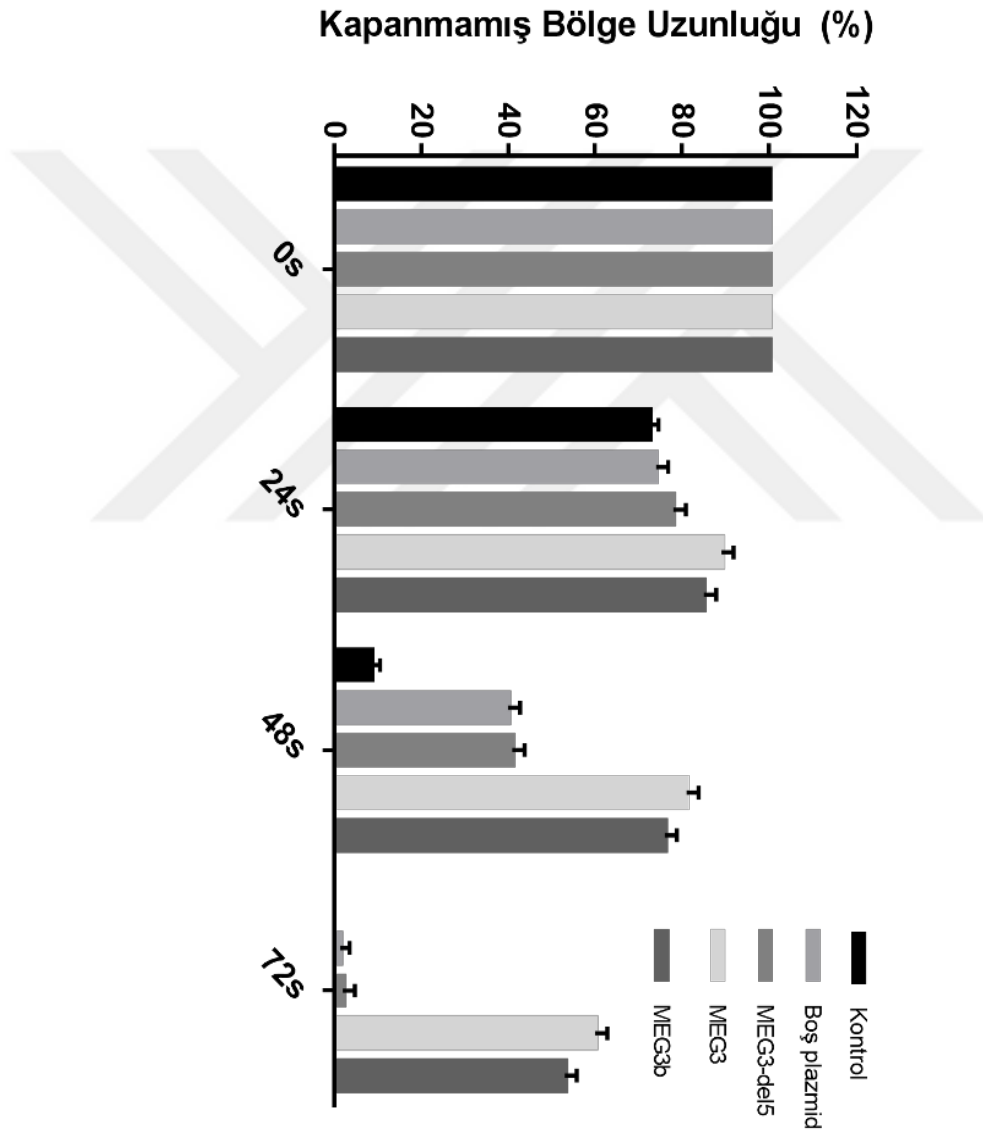
HT-29 hücreleri, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten sonra, transfeksiyonun hücre migrasyonu üzerinde etkilerini tayin edebilmek

için oluşturulan yara 0, 24, 48 ve 72 saat aralıklarla görüntülenmiştir. Her 24 saatte bir görüntülenen yaranın kapanma süreci şekil 4.72’de verilmiştir.



şekil 4.72. HT-29 hücre hattında MEG3 ve MEG3b’nin aşırı ifadesinin hücre migrasyonu üzerine etkisi.

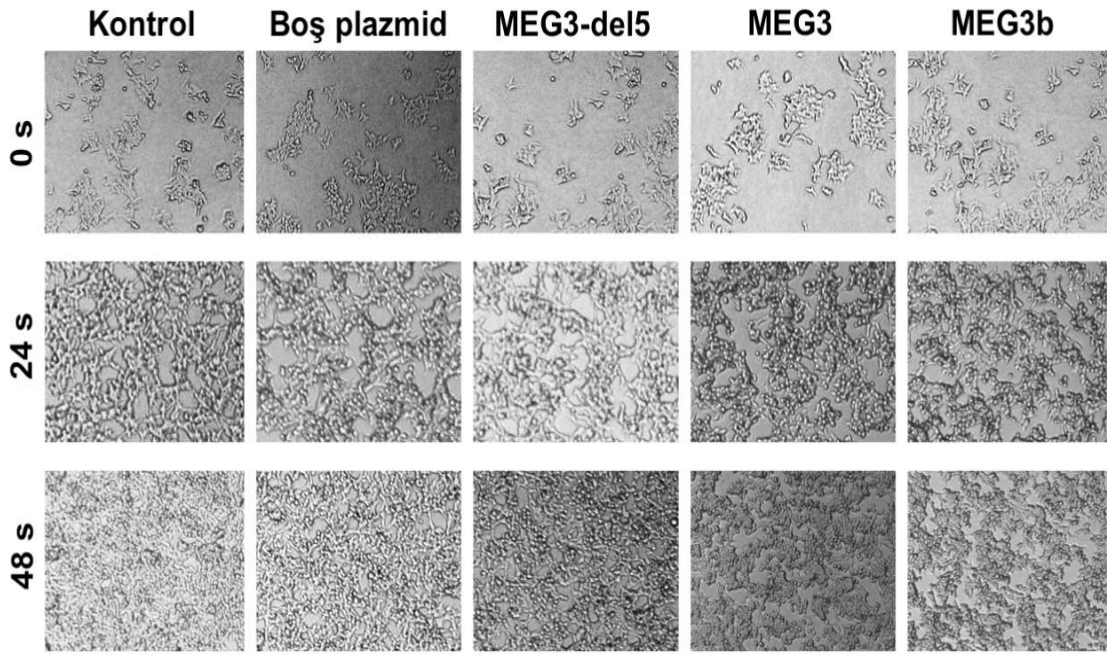
Yara kapanma sürecinin Image J ile analizi sonrasında elde edilen verileri kullanılarak oluşturulan grafik Şekil 4.73’de verilmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen HT-29 hücre gruplarında oluşturulan yara 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilen hücrelere kıyasla daha geç kapanmıştır. Buradan elde edilen verilere göre MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu yapılmış hücrelerde migrasyon hızı azalmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.73. HT-29 hücre hattında yara kapanma sürecinin analizi sonrasında elde edilen grafik.

4.10. Kolorektal Kanser Hücrelerinde Transfeksiyonun Hücre Morfolojisi Üzerinde Etkileri

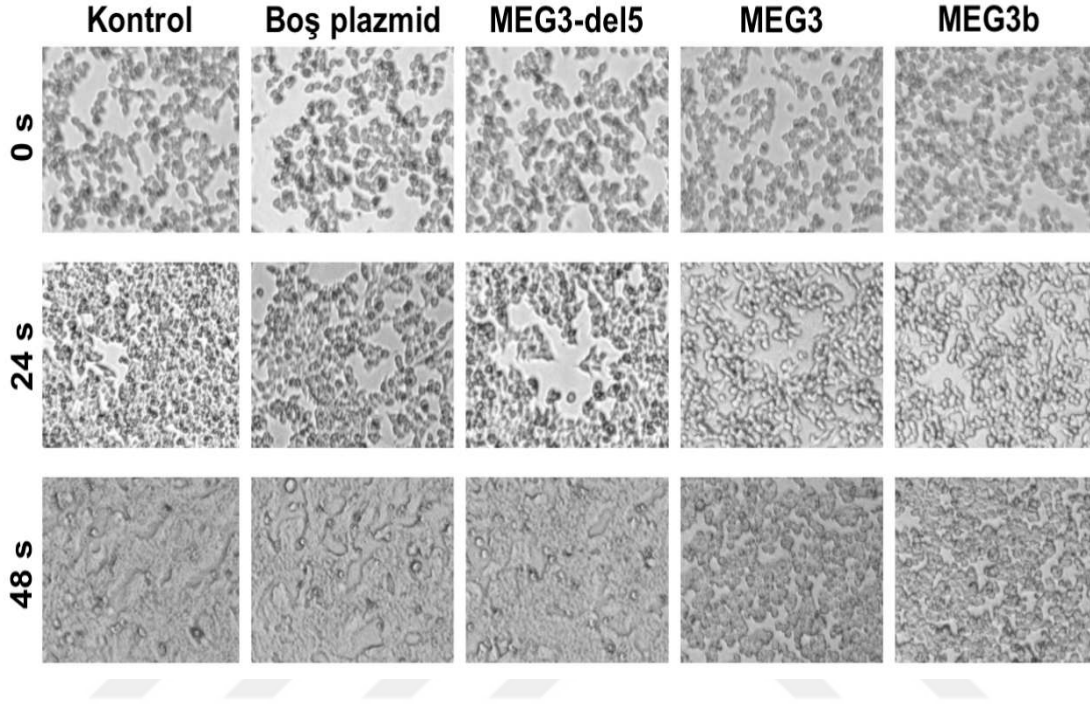
HCT-116 hücreleri, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfekte edildikten sonra, transfeksiyonun hücre morfolojisi üzerindeki etkilerini tayin edebilmek için hücre morfolojisi 0, 24 ve 48 saat aralıklarla görüntülenmiştir. Her 24 saatte bir görüntülenen hücre morfolojisi Şekil 4.74’de verilmiştir.



Şekil 4.74. Transfeksiyonun HCT-116 hücre hattı morfolojisi üzerindeki etkileri.

Kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3 plazmidini ile transfekte edilmiş deney gruplarında hücre morfolojisi 48 saatlik dilimde değişmiştir. Benzer şekilde kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3b plazmidini ile transfekte edilmiş deney gruplarında hücre morfolojisi 48 saatlik dilimde değişmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri benzerlik göstermektedir. Kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3-del5 plazmidini ile transfekte edilen deney grubunda 0, 24 ve 48. saatlerde hücre morfolojisi değişim göstermemiştir.

HT-29 hücreleri, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri ile transfeke edildikten sonra, transfeksiyonun hücre morfolojisi üzerinde etkilerini tayin edebilmek için hücre morfolojisi 0, 24 ve 48 saat aralıklarla görüntülenmiştir. Her 24 saatte bir görüntülenen hücre morfolojisi Şekil 4.75’de verilmiştir.



Şekil 4.75. Transfeksiyonun HT-29 hücre hattı morfolojisi üzerindeki etkileri.

Kontrol ve boş plazmidle transfeke edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3 plazmidini ile transfeke edilmiş deney gruplarında hücre morfolojisi 24 saatlik dilimde değişmiştir. Benzer şekilde kontrol ve boş plazmidle transfeke edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3b plazmidini ile transfeke edilmiş deney gruplarında hücre morfolojisi 24 saatlik dilimde değişmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfeke edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri benzerlik göstermektedir. Kontrol ve boş plazmidle transfeke edilmiş deney gruplarına kıyasla, MEG3-del5 plazmidini ile transfeke edilen deney grubunda 0, 24 ve 48 saatlerde hücre morfolojisi değişim göstermemiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm dünyada en yaygın üçüncü malignite ve en yüksek ölüm oranına sahip dördüncü kanser türü olan KRK'nın ölüm oranı son yıllarda istikrarlı bir şekilde azalmış olsa da halen insan sağlığı için ciddi bir sorun teşkil etmektedir (7). Metastatik yayılım, KRK'de ciddi bir ölüm nedenidir ve yeni tanı konulmuş KRK hastalarının yaklaşık %20'sinde uzak metastaz bulunmaktadır ve hastaların yaklaşık %10'u, hastalıklarının erken evresinde metastatik hastalık geliştirir ve bu da ölümle sonuçlanır (260, 261). KRK'nin etiyolojisinin genetik anormalliklerin (mutasyonlar ve genomik dengesizlikler) ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile ilişkili olduğu artık kabul edilmektedir (262). Epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerdir, ancak bunlar DNA sekansındaki değişikliklerin bir sonucu değildir (263). Bununla birlikte, anormal DNA metilasyonunun KRK'de tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (264). KRK'de, hipermetilasyon yoluyla tümör baskılayıcı genlerin promotör inaktivasyonu, polipten adenokarsinoma ilerleme sürecinin histolojik aşamalarının tamamında bulunmuştur. DNA onarım genlerindeki ve protoonkogenlerdeki mutasyonlar gibi genetik değişiklikler ve bazı tümör baskılayıcı genlerdeki işlev kaybı, KRK'nin gelişimine yol açabilir (265).

Tipik olarak 200'den fazla nükleotitten oluşan, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), endojen hücrel RNA'lar olarak adlandırılmaktadır (266). lncRNA'lar klasik olarak tanımlanmış açık okuma çerçevelerinden yoksundur ve bu nedenle sınırlı protein kodlama potansiyeline sahiptir veya hiç protein kodlamazlar (5, 267, 268). Çok sayıda lncRNA'nın ekspresyonundaki anormal değişimlerin, karsinogenez, invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu bilinmekle beraber çeşitli biyolojik süreçlerin değişiminde de rol almaktadır (269-272). Örneğin; lncRNA SPRY4-IT1, melanoma hücrelerinde büyüme ve farklılaşmayı etkiler. Ayrıca apoptozisi indüklediği ve invazyon sürecinde rol oynadığı da bildirilmiştir (273). Dahası, onkogenler veya anti-onkogenik faktörler olarak lncRNA'ların rollerine ve bunların KRK da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin saptanması için serumda biyobelirteç olabilme potansiyeline ilişkin araştırmalar artmaktadır (23, 274-276). Örneğin, KRK dokularında lncRNA SPINT1-AS1'in upregülasyonunun; bölgesel lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve daha kısa sağ kalım süresi gibi kısmi klinik özelliklerle ilişkili olarak KRK'de prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (9).

LncRNA'ların tümörler dışında çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. KRK'de de lncRNA'ların belirteç işlevi gösterebileceğine dair çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Örneğin; iyi bilinen bir lncRNA olarak HOTAIR, tümör patogeneğinde rol oynar. Ayrıca KRK dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde güçlü bir prognoz belirteci olarak fonksiyon gösterir (277-279). LncRNA GAS5 ise, hem hücre proliferasyonunu etkiler hem de KRK'li hastalarda kötü prognoza dair öngörü sağlayabilir (173). LncRNA MALAT1, KRK'de tümör büyümesini ve metastazı destekler (280). LncRNA UCA1, KRK'de upregüle edilir ve hücre proliferasyonunu, apoptozisi ve hücre döngüsünün düzenlenmesini etkileyebilir (281). BRAF ile aktive olan lncRNA, epitel-mezenkimal geçişi indükleyerek kolorektal kanserde hücre migrasyonuna katkıda bulunur (282). Son on yılda lncRNA'lar üzerine yapılan çalışmalara rağmen, sadece birkaç lncRNA, KRK için biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (283). Bununla birlikte, lncRNA'ların KRK'deki işlevleri halen büyük ölçüde bilinmemektedir. Tümör oluşumunu önleyebilmenin en kritik yöntemi, hücre sağ kalımının ve hücre çoğalmasının etkin kontrolüdür. Kanserlerle ilişkili lncRNA'ları belirlemek ve bunların moleküler mekanizmalarını ve işlevlerini araştırmak; kanser hücrelerinin çoğalması ve sağ kalımı üzerindeki etkilerinin aydınlatılması ve prognozun iyileştirilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Maternal olarak eksprese edilen gen 3 (MEG3), insanlarda 14q32.3 kromozomunda yer alan, damgalanmış DLK1-MEG3 bölgelerine ait lncRNA'yı kodlayan bir gendir (197). Bu bölge en az üç tane paternal olarak eksprese edilen protein kodlayan geni ve çok sayıda maternal olarak eksprese edilen kodlamayan RNA'yı içerir (17). Bu genlerin damgalanmış ifadesi, hücre gelişimi ve büyümesi ile ilişkilidir (199) ve in-vitro deneyler, MEG3'ün insan kanser hücre hatlarının proliferasyonunu baskılayabileceğini göstermiştir (198). Araştırmacılar, mide (284), servikal (285) ve meme (286) kanseri gibi çeşitli insan kanserleri ile ilişkili olarak MEG3 ekspresyonunun olmadığını bildirmişlerdir. MEG3, çeşitli yönlerden tümör oluşumunu engelleyebilir. İlk olarak, MEG3, tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebilir ve sonuç olarak in-vitro deneyler ve hayvan modelleri (287) tarafından doğrulanan apoptozis indükleyebilir. İkinci olarak, MEG3 epigenetik regülasyonda bir rol oynar ve DNA metilasyonunu etkileyerek ve snoRNA ve miRNA'nın fonksiyonlarını düzenleyerek kanser hücrelerinin fonksiyonunu değiştirebilir (21, 22). Ayrıca, MEG3 p53, MDM2 ve pRb yolları dahil olmak üzere birçok tümörle ilişkili sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynar (288).

MEG3'ün eksojen olarak aşırı ekspresyonu akciğer kanseri hücrelerinde apoptozisi teşvik etmektedir (289). MEG3, TPM1 ile birlikte miR-96'yı düzenleyerek tümör baskılayıcı işlevi gösterir (290). Jin ve ark., MEG3'ün upregülasyonunun safra kesesi kanserinde hücre proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiğini ve nude fare deneylerinde apoptozisin ve karsinogenezin azalmasına yol açtığını bildirmişlerdir (291). Xu ve ark., lncRNA MEG3'ün hücre proliferasyonunu ve migrasyonu inhibe ettiğini, ancak Sirt7'yi upregüle ederek glioma hücrelerinde otofajiyi kolaylaştırdığını ve PI3K / AKT / mTOR yolğunun engellenmesinde işlev gördüğünü belirtmişlerdir (226). LncRNA MEG3, prostat kanseri doku ve hücrelerinde downregüle edilir ayrıca miR-9-5p'yi ve hedef geni QKI-5'i düzenleyerek prostat kanseri hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerini azaltabilir (292). MEG3, epitelyal over karsinomda (EOC) ATG3 aktivitesini düzenleyerek ve otofajiyi indükleyerek EOC'de tümör baskılayıcı işlev görür (242).

INK4b-ARF-INK4a lokusu, hücre döngüsünün durması, stresle indüklenen apoptozis ve yaşlanmada önemli rollere sahip olan üç tümör baskılayıcı geni (p15INK4b, p14ARF ve p16INK4a (CDKN2A/p16)) kodlar. CDKN2A/p16 ve p14ARF genleri, promotör bölgelerin aktivasyonunu takiben translasyona uğrar. CDKN2A/p16 ve p14ARF proteinleri, amino asit sekansları ve sırasıyla pRB ve p53 sinyal yolları aracılığıyla hücre döngüsü regülasyonundaki rolleri bakımından farklılık gösterir (293). CDKN2A/p16 proteini, CDK4/6 inhibitörüdür, pRB fosforilasyonunu önler ve böylece G1 fazında hücre proliferasyonunu bloke eder (294). P14ARF proteini, p53'e bağımlı bir şekilde hem G1 hem de G2 fazında duraklamayı indükler (295). p14ARF, Mdm2 ile etkileşir ve onu nükleolusa bağlayarak Mdm2'nin nükleer taşınımını engeller (296). Bu durum Mdm2-p53 kompleksinin oluşumunu bloke eder ve proteozomda Mdm2 ile uyarılan p53 bozunmasını inhibe eder ve sonunda p53'ü stabilize eder (296). Bu tez çalışmasında ise KKR'de lncRNA MEG3'ün ve izoformu olan MEG3b'nin plazmid ile aşırı ekspresyonu sağlandıktan sonra yapılan analizler sonucunda p53'ün ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca çalışmamızda artan MEG3 ekspresyonunun, HT-29 hücre hattında CDKN2A ekspresyon düzeyini anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (Şekil 4.49). KKR hücrelerinde MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ekspresyonu hem p53 hem de CDKN2A ekspresyonunda artışa sebep olmuştur. MEG3'ün p53 üzerindeki düzenleyici mekanizması daha önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (206). Ancak literatürde

MEG3b'nin, p53 üzerinde MEG3'e benzer şekilde bir düzenleyici etkisinin olduğu bilgisi mevcut değildir. Bu bilgi tez çalışmamızla birlikte ilk defa literatüre katılmış olacaktır.

CDKN2A/p16 gen hipermetilasyonu, KRK dahil çeşitli insan tümörlerinde bildirilmiştir (297). P16 geninin promotör metilasyonu, kolorektal displazide, tümörlere bitişik normal mukozada, habis tümörlerde ve adenomlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, birkaç genin hipermetilasyonunun erken aşamalarda ortaya çıktığı ve yaşla birlikte arttığı, belirli patolojik durumlarda ise bu oranın arttığı görülmektedir. Örneğin, Hsieh ve ark. p16 promotör hipermetilasyonunun yaygın bir durum olduğunu ve ülseratif kolitte neoplazik transformasyon sırasında erken ortaya çıktığını göstermişlerdir. P16 promotör hipermetilasyonu, displazi riski yüksek olan hastaları tanımlamak için potansiyel bir biyobelirteç adayı olarak önerilmektedir (298).

P16 promotör metilasyonu KRK'e ek olarak; kolonik adenomlarda, anormal kript odaklarında, hiperplastik poliplerde ve ilerlemiş adenomlarda bulunur ve p16'da CpG adacık hipermetilasyonunun pre-malignitede erken gerçekleştiğini gösterir (299). Minoo ve ark., hiperplastik poliplerde yoğun p16 gen hipermetilasyonunu gösterdiler ve genetik yatkınlığın çeşitli hiperplastik polip formlarına katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu durumun erken dönem göstergeleri, normal kolon mukozasında p16 geninin hipermetilasyonundan kaynaklanıyor olabilir (300). Başka bir çalışma, p16 geninin ileri yaşla ilişkili promotör hipermetilasyonunun normal kolon mukozası ile ilişkisini göstermiştir (301). Yaşla ilişkili metilasyon ve p16 geninin inaktivasyonu, yaşla birlikte artmış kanser riski için predispozan faktörler olabilir (300), bunun yanı sıra p16'nın hipermetilasyonu için diğer risk faktörleri tanımlanmıştır. CDKN2A'nın metilasyonu, Duke evrelemesi ve tümör farklılaşması gibi bazı klinikopatolojik özelliklerle ilişkilidir (302).

Tez çalışması kapsamında yaptığımız literatür taramalarında kanserde doğrudan MEG3 ile CDKN2A arasında bir ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ancak ateroskleroz MEG3 geninin susturulması sonucunda MEG3 tarafından hedeflenen bir miRNA'nın CDKN2A'nın işlevini düzenlediği açığa çıkarılmıştır (25).

Yaptığımız çalışmada, KRK hücrelerinde CDKN2A'nın hedef genleriyle, lncRNA MEG3 arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızın başlangıcında, lncRNA MEG3'ün 30 farklı hücre hattında ve 20 sağlıklı insan

dokusundaki ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. MEG3 geni sağlıklı insan dokuları ve normal hücre hatlarının büyük çoğunluğunda ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun aksine kanser hücrelerinde daha düşük eksprese olduğu veya hiç ekspresyon göstermediği bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular, literatürdekine benzer şekilde lncRNA MEG3'ün tümör baskılayıcı özelliğini desteklemektedir (17). Ayrıca araştırmamızda kullandığımız HCT-116 ve HT-29 KRK hücre hatlarında ise normal kolon dokusuna kıyasla, oldukça düşük seviyelerde MEG3 ekspresyonu bulunduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda CDKN2A geninin de 20 sağlıklı insan dokusunda ve KRK hücrelerinde ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. CDKN2A'nın ekspresyon profillemesi sonucunda MEG3'ün profillemesine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.60, Şekil 4.62). CDKN2A geninin HCT-116 hücre hattındaki ekspresyonu, normal kolon dokusuna kıyasla yok denilebilecek kadar düşük iken; HT-29 hücre hattında normal kolon dokusuna yakın ekspresyon düzeyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki CDKN2A ekspresyonu, transfeksiyon öncesinde ve sonrasında şaşırtıcı bulgular ortaya koymuştur. Literatür araştırmalarımız sonucunda ATCC veri tabanı üzerinden, HCT-116 hücre hattında CDKN2A'nın mutant özellikte olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Ayrıca Halby ve ark., yaptıkları çalışmada HCT-116 hücre hattında CDKN2A'nın hipermetilasyona uğradığını bildirmişlerdir (303). Elde ettiğimiz verilere göre HT-29 hücre hattında MEG3 ve MEG3b ekspresyonundaki artış, CDKN2A'nın ekspresyonunu anlamlı derecede arttırmıştır (Şekil 4.40). Ancak plazmid aracılı transfeksiyon, HCT-116 hücre hattındaki CDKN2A ekspresyonunda anlamlı değişimle sonuçlanmamıştır (Şekil 4.23). CDKN2A ifadesindeki artışın anlamlı düzeyde olmayışı daha önce bahsettiğimiz, HCT-116 hücre hattındaki CDKN2A hipermetilasyonun bir sonucu olabilir.

MEG3'ün yapılan birçok çalışmada tümör baskılayıcı özellikte bir gen olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra hücre döngüsünde tümör baskılayıcı özellik gösteren CDKN2A geninin MEG3 tarafından dolaylı olarak hedeflendiği kısa bir süre önce tespit edilmiştir (25). CDKN2A'nın çok sayıda hedef geni bulunmakla beraber, bu çalışmada CDKN2A'nın hedefi olan 17 geni biyoinformatik veri tabanları ve yazılımlar kullanarak tespit ettik. Tespit ettiğimiz 17 genden 2'si (p53 ve EGR1) haricindeki bu hedeflerin henüz MEG3 ile ilişkisi ortaya konulmamıştır. Bununla beraber kolorektal kanserde, bu genlerin tamamının MEG3 ve MEG3b ile ilişkisine dair literatüre de rastlanmamıştır. Bu

bağlamda çalışmamız özgün nitelik taşımaktadır. Bu genlerin MEG3 ile ilişkisi olup olmadığını açığa çıkarabilmek amacıyla KRK'da düşük ekspresyon gösteren MEG3 geninin ekspresyon seviyesi plazmid aracılı olarak arttırılmıştır. MEG3'ün yanı sıra MEG3b ve MEG3-del5'in ekspresyon düzeyleri de plazmid aracılı olarak arttırılmıştır. HCT-116 hücre hattında transfeksiyon sonucunda MEG3 ve MEG3b plazmidleri KRK'da düşük eksprese olan MEG3'ün ekspresyonunu kontrole kıyasla yaklaşık 400.000 kat arttırırken, HT-29 hücrelerinde MEG3'ün ekspresyon düzeyini yaklaşık 90.000 kat arttırmıştır (Şekil 4.29, Şekil 4.48).

AURKA yaygın bilinen ismiyle Auroro Kinaz A, hücre döngüsünde MAPK'in yokuş aşağı hedefinde bulunan bir gendir (304). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada AURKA'nın KRK'de p53 aracılı DNA hasar yanıt genlerini inhibe ederek, oksaliplatine karşı kemoseniviteyi arttırdığı bildirilmiştir (305). AURKA ile MEG3 arasındaki ilişkiye dair mevcut literatür verisi bulunmamaktadır. Çalışmamızda AURKA'nın normal kolon dokusuna kıyasla HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. HCT-116 hücre hattında transfeksiyon sonrasında MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen deney gruplarında AURKA geninin ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir (Şekil 4.20). İlginç biçimde HT-29 hücre hattında transfeksiyon sonrasında MEG3 ve MEG3 ile transfekte edilmiş deney gruplarında AURKA geninin ekspresyon düzeyi anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.39). Elde ettiğimiz bu bulgular MEG3 ve MEG3b geninin HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında farklı ekspresyon motiflerine neden olabileceğini göstermiştir. Bununla beraber elde ettiğimiz veriler doğrultusunda MEG3 ve MEG3b'nin AURKA geni üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu söylenebilir. Ayrıca AURKA'nın KRK hücre hatlarındaki farklı ekspresyon düzeyleri, çift yönlü ekspresyon motifine sahip olabileceğini de düşündürmektedir.

CASC3 ekzon birleşme kompleksinin bir üyesi olup, kanserlerdeki işlevine dair bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Bununla beraber hepatoselüler karsinomda CASC3'ün onkogenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (306, 307). Literatürde CASC3 geninin KRK'deki işlevine dair henüz bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızda normal kolon dokusuna kıyasla HCT-116 ve HT-29 KRK hücrelerinde CASC3 geninin ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. HT-29 hücre hattına MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle yapılan muamele CASC3 geninin ekspresyonunu baskılamıştır (Şekil

4.40). HCT-116 hücre hattında ise CDKN2A'ya benzer şekilde CASC3'ün ekspresyon düzeyinde anlamlı değişim olmamıştır (Şekil 4.21). CASC3 için elde ettiğimiz bu veriler MEG3 ile CASC3 arasında düzenleyici bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bu veriler literatürde bir ilk olma özelliğindedir.

CCND1 yaygın bilinen adıyla siklin D1 geni, mitoz sırasında hücre döngüsünün ilerlemesini teşvik ettiği için, hücre proliferasyonunun mihenk taşı niteliğindedir. Bu sebepten CCND1'in artmış ekspresyonu birçok kanserle ilişki göstermektedir (308, 309). KKR hücrelerinde MEG3 ve MEG3b'nin ekspresyon düzeyindeki artış, HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarının her ikisinde de CCND1 ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalmayla sonuçlanmıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.41). Hücre proliferasyonunda kilit noktada yer alan bu genin ekspresyonunda meydana gelen azalma MTT deney verilerimizi de destekler niteliktedir. Transfeksiyon sonrası hücre proliferasyonu kontrol gruba kıyasla oldukça azalmıştır. Elde ettiğimiz bu veri MEG3 ve MEG3b'nin CCND1'i düzenliyor olabileceğine dair literatürdeki ilk bulgulardır. Bu veriyi desteklemek için RNA immünoprecipitasyon yöntemi ile doğrulama yapmak, MEG3 ve CCND1'in doğrudan etkileşimi hakkında fikir sahibi olmamızı sağlayabilir.

Son birkaç yıldır, lncRNA MEG3'ün hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan genler ile olan ilişkilerine dair çalışmalar artmaktadır. Rb1'in düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu bilinen E2F1, keşfedildiği günden bu yana hücre döngüsü çalışmalarında sıklıkla araştırmalara dahil edilmiştir. Ayrıca CDKN2A geni tarafından kodlanan p16 proteini Rb1 aracılı olarak E2F1 ekspresyonu düzenlemektedir (310). Ancak MEG3 ile E2F1 arasındaki ilişkiye dair literatür bilgisi mevcut değildir. Bu bağlamda çalışmamızda elde ettiğimiz veriler E2F1 ile MEG3 arasındaki ilişkiye dair ilk olma özelliğindedir. Çalışmamızda, MEG3 ve MEG3b'nin artmış ekspresyonunun hem HCT-116 hem de HT-29 KKR hücrelerinde E2F1 geninin ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.43). E2F1, Rb1'e bağlandığında tümör baskılayıcı bir gen olan Rb1'in ekspresyonunu engellemektedir. Artmış E2F1 ekspresyonunun hücre proliferasyonunu artırıcı yönde etki göstermesi beklenirken, şaşırtıcı biçimde KKR'da E2F1'in artmış ekspresyonu hücre çoğalmasını baskılamıştır. Pierce ve ark. (311), transgenik fare modelleri üzerinde yaptıkları çalışmada E2F1'in hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir (311). Benzer şekilde çalışmamızda transfeksiyon öncesi KKR hücrelerinde, normal kolon dokusuna kıyasla

E2F1 ekspresyonunun oldukça yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5). Bu durum KRK'da E2F1'in onkogenik özellikte olduğunu ancak MEG3 transfeksiyonu ile beraber E2F1'in daha da artmış ekspresyonunun hücre proliferasyonu, migrasyon ve koloni oluşum yeteneği üzerinde tümör baskılayıcı işleve sahip olabileceği tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulguları değerlendirecek olursak; E2F1'in MEG3 ekspresyonuna bağlı olarak KRK hücrelerinde farklı fonksiyonlar göstermesi, E2F1'in KRK'da MEG3 etkisiyle çift yönlü etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızdaki bu bulgular, Pierce ve arkadaşlarının bulgularını (311), destekler niteliktedir.

EGR1 tarafından kodlanan proteinler, çinko parmak protein ailesinin üyesidir. EGR1 transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir. Ayrıca aktive ettiği genler mitojenik uyarım ve hücrel farklılaşmadan sorumludurlar (312). Diyabetik nefropatide lncRNA MEG3'ün, miR-181a aracılı olarak EGR1 ekspresyonunu düzenlediği ortaya konulmuştur (313). KRK kanserde ise miR-34a tarafından güçlendirilmiş EGR1'in ekspresyonu invazyon ve migrasyonu engellediği bildirilmiştir (314). Yaptığımız bu çalışmada ise transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında EGR1 ekspresyonu düşük bulunmuştur (Şekil 4.6). Bu durum literatürdeki EGR1'in tümör baskılayıcı işlevine dikkat çekmiş, KRK'da da EGR1'in tümör baskılayıcı özellik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Transfeksiyon sonrasında hem HT-29 hem de HCT-116 hücre hattındaki EGR1 ekspresyonu anlamlı derece artış göstermiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.44). Ayrıca transfeksiyon sonrasında her iki hücre hattında hücre proliferasyonu, migrasyon ve koloni oluşum yeteneğinde ciddi düzeyde azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular hem MEG3'ün hem de EGR1'in kanserlerdeki tümör baskılayıcı özellikleriyle paralellik göstermektedir. Buradan yola çıkarak KRK'da lncRNA MEG3 ile EGR1 arasında düzenleyici ilişki bulunduğuna dair çıkarımlar gerçekleştirilebilir. Çalışmamızdaki bu veriler KRK'da EGR1 ile MEG3 arasındaki ilişkiye ışık tutmakta olup, özgün literatür niteliği taşımaktadır. İleriki çalışmalarla EGR1 ile MEG3 arasında herhangi bir fiziksel etkileşimin olup olmadığının ortaya çıkarılması MEG3'ün EGR1 üzerindeki işlevinin aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

HUWE1 geni, tümör gelişiminde önemli bir übikitinasyon modülatörü olarak işlev görmektedir. HUWE1'in onkogenik bir protein olan c-MYC'nin de düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (315). HUWE1, yapılan çalışmalarda tümör baskılayıcı işleve sahip gibi

görünüyor olsa da p53'ün übikitinasyonu aracılığıyla apoptozisi engeller (316). Bu durum HUWE1'in tümör oluşumundaki işlevine dair mevcut bilgilerimiz bizi, HUWE1'in tümör baskılayıcı mı yoksa onkogen mi olduğuna dair bir paradoksa sürüklemektedir. Bununla beraber MEG3'ün p53'ü düzenlediğine dair bulgularımızı ve literatürdeki diğer verileri de göz önüne alacak olursak; MEG3 ile HUWE1 arasında CDKN2A yolağından bağımsız olarak da düzenleyici bir mekanizmanın varlığından söz edilebilir. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda KRK'da HUWE1 ekspresyonunun tayini amacıyla normal kolon dokusuna göre HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Normal kolon dokusuna kıyasla iki hücre hattında da HUWE1'in ekspresyon düzeyinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak MEG3 transfeksiyonundan sonra KRK hücrelerinde oldukça şaşırtıcı sonuçlar elde edilmiştir. HUWE1 ekspresyonu, HCT-116 hücre hattında transfeksiyon sonrası anlamlı düzeyde artış gösterirken (Şekil 4.26), HT-29 hücre hattında anlamlı düzeyde azalma göstermiştir (Şekil 4.45). İki hücre hattındaki bu farklı ekspresyon motifinin nedeni, HCT-116 ve HT-29 hücre hatları arasındaki genetik yapının farklılığı olabilir. ATCC veri tabanı üzerinden HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarının genetik yapısı hakkında edindiğimiz bilgiler, bize HCT-116 hücre hattındaki RAS proto-onkogen mutasyonunun sonuçlarımız üzerinde etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Jang ve ark. (317), yaptıkları çalışmada HUWE1'in RAS ve RAF ile birlikte bir iskele oluşturarak işlev gösterdiğini bildirmişlerdir (317). Bu çalışma HT-29 hücrelerine kıyasla oldukça farklı sonuçlar elde etmemizi aydınatabilecek nitelik göstermektedir. Bu durumun bir diğer nedeni HUWE1'in de lncRNA'larda sıklıkla rastlanan bir durum olan, çift yönlü fonksiyon potansiyeline sahip bir gen olması ile de açıklanabilir. İleriki çalışmalarda MEG3 ile transfekte edilmiş HCT-116 hücre hatlarında RAS ve HUWE1 ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi bu durumun değerlendirilmesini kolaylaştırabilir. Sonuç olarak MEG3'ün aşırı ekspresyonu sonucunda HUWE1 geninde meydana gelen değişimler literatürde çalışmamızdan önce mevcut değildir. Bu çalışma ile beraber ilk defa MEG3 ile HUWE1 arasında bir ilişki olduğu açığa çıkarılmıştır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada KAT2B daha az bilinen ismiyle p300, p53'ün transaktivasyonunu sağladığı ve p53'ün KAT2B'nin otoasetilasyonunu uyardığı bildirilmiştir (318). Tez çalışması kapsamında p53 ile MEG3 arasındaki ilişkiye dair bulgulardan daha önce bahsetmiştik. CDKN2A ile de biyoinformatik olarak ilişki gösteren bu genin daha önce hem KRK'deki rolüne dair hem de MEG3 ile ilişkili

olduğuna dair literatür bilgisine rastlanmamıştır. Araştırmamızda, KAT2B'nin ekspresyonu normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde daha düşük seviyelerde bulunmuştur. Transfeksiyon sonrasında hem HCT-116 hem de HT-29 KRK hücrelerinde KAT2B ekspresyonu anlamlı seviyede artış göstermiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.46). Çalışmamızda, KRK hücrelerinde MEG3'ün KAT2B ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir.

Mitojenle aktive edilen kinaz 8 olarak da bilinen MAPK8, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve apoptozis de dahil olmak üzere hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rollere sahiptir (319). MAPK8 sinyal yolağındaki genetik modifikasyonların KRK'de hayatta kalma oranını ve KRK riskini etkilediği tespit edilmiştir (320). Çalışmamızda MAPK8 transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir (Şekil 4.9). MEG3 transfeksiyonu ise HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde MAPK8 ekspresyonunda anlamlı düzeyde değişim sağlayamamıştır (Şekil 4.28, Şekil 4.47).

PCNA, DNA replikasyonunda açılan ipliklerinin birbirine dolanmasını engellemek amacıyla kayan kısaç işlevi gösteren önemli bir moleküldür. Ayrıca PCNA'nın p53 ile de yakından ilişkili bir düzenlenme mekanizmasının olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (321). KRK'de PCNA ve MEG3 arasındaki ilişkiye dair bir çalışma literatürde mevcut değildir. PCNA transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir. Transfeksiyondan sonra, hem HCT-116 ve hem HT-29 hücrelerinde PCNA ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermiştir (4.31, 4.50). Buradan yola çıkarak KRK hücrelerinde, MEG3'ün aşırı ekspresyonunun PCNA üzerinde ekspresyon arttırıcı etkisinin olabileceği söylenebilir.

RAF1, KRK'de KRAS mutasyonlu hücre hatları da dahil olmak üzere dönüştürölmüş hücre fenotipinin korunmasında kritik rol oynar. RAF1'in bu etkisi kinaza bağımlıdır. Ayrıca RAF1, KRK hücrelerinin morfolojik yapısını goblet benzeri hücre yapısına dönüştürmüştür (322). Tez çalışmamızda, RAF1 geni transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir. MEG3 transfeksiyonu sonrasında ise, HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde RAF1 ekspresyonunda anlamlı düzeyde değişim sağlayamamıştır (Şekil 4.32, Şekil 4.51). Ancak çalışmamızda transfeksiyon sonrasında hem HCT-116 hem de HT-29 KRK hücrelerinde morfolojik

değişim gözlenmiştir. Bu değişim MEG3 ekspresyonundaki artıştan kaynaklı olabileceği gibi, MEG3 artışından etkilenen genlerdeki ekspresyon değişiminin de bir sonucu olabilir. Elde ettiğimiz bulgular literatürde daha önce mevcut değildir. Bu sebeple, MEG3 ile RAF1 arasındaki ilişkiye dair yaptığımız çalışma özgün niteliktedir.

KRK'da RELA asetilasyonu tümör oluşumunu teşvik edici etkiye sahiptir (323). Çalışmamızda, RELA'nın transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla HCT-116 hücre hattındaki ekspresyonu yüksek düzeyde iken, HT-29 hücre hattında normal kolon dokusuna yakın düzeyde ekspresyon göstermiştir. RELA ekspresyonu, transfeksiyon sonrasında HCT-116 hücre hattında azalmışken (Şekil 4.33), HT-29 hücre hattında ise artış göstermiştir (Şekil 4.52). Bu durum HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarındaki farklı genetik yapıdan kaynaklanıyor olabileceği gibi, Luo ve ark.'nın, yaptıkları çalışmadakine benzer şekilde (324), RELA geninin KRK'da henüz keşfedilmemiş bir negatif geri besleme döngüsünün varlığından da kaynaklandığı düşünülebilir. Bunu yanı sıra henüz MEG3 hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Özellikle protein kodlayan genler üzerinde farklı etkiler gösterebilen lncRNA'lar, zaman zaman kanserin moleküler mekanizmaları üzerinde beklenmedik etkileriyle farklı bulgular ortaya koyabilmektedirler.

Şahin ve ark., osteosarkomda mir-664'ün ekspresyonunu baskılayarak, mir-664'ün moleküler hedefi olan lncRNA MEG3'ün ekspresyonunu arttırmışlardır. Bu durum osteosarkomda mir-664 aracılı olarak MEG3 ekspresyonunun düzenlendiğini göstermiştir (215). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise, mir-664'ün başka bir hedefi olan SIVA1 geninin, mir-664 aracılı olarak düzenlendiği bildirilmiştir (325). Bu durum SIVA1 ile MEG3 arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişkiye dair mevcut literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu kapsamdaki araştırmamızda, transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde daha düşük SIVA1 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra transfeksiyon sonrası MEG3 geninin ekspresyonundaki artış hem HCT-116 hem de HT-29 hücrelerinde, SIVA1 ekspresyonunda anlamlı düzeyde değişime neden olmamıştır. Ancak MEG3b gen ekspresyonundaki artış hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hatlarında SIVA1 geninin ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırmıştır (Şekil 4.34, Şekil 4.53). Bu veriler, MEG3b'nin SIVA1 geninin düzenlenmesinde etkiye sahip olabileceğini

düşündürmektedir. Elde ettiğimiz bu veriler ilk defa çalışmamızla beraber literatüre katılacaktır.

SP1, onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların yanı sıra apoptozis, yaşlanma, proliferasyon, farklılaşma ve anjiyogenez gibi temel hücresel fonksiyonlarda görevli çeşitli genlerin ekspresyonunu hem aktive eder hem de baskılar (326). SP1, DNMT1'in ekspresyonunu miRNA aracılı olarak baskılamaktadır. Meme kanseri hücrelerindeki bu baskılamının in vitro olarak ortadan kaldırılmasının, DNMT1'in MEG3 geninde hipermetilasyonunu azaltarak MEG3 ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir (327). Çalışmamızda, SP1'in transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi gösterdiği bulunmuştur. Transfeksiyon sonrası HT-29 hücre hattında SP1'in ekspresyonu anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.54). Bununla beraber HCT-116 hücrelerinde SP1 ekspresyonunda anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir (Şekil 4.35). Yaptığımız çalışmayla beraber KRK hücrelerinde SP1 ve MEG3 arasındaki ilişkiye dair bulgular ilk defa literatüre kazandırılmıştır.

TFDP1, transkripsiyon faktörü D1 olarak da bilinmektedir ve sıklıkla E2F1 ile birlikte hücresel düzenleyici mekanizmalarda rol almaktadır (328). TFDP1 ve E2F1'in MEG3 ile arasındaki ilişkiye dair literatüre rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada TFDP1, transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir (Şekil 4.17). Transfeksiyon sonrası HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında MEG3b transfeksiyonu sonrasında, TFDP1'in ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermiştir (Şekil 4.36, Şekil 4.55). Bununla beraber MEG3 ekspresyonundaki artış hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hatlarında anlamlı düzeyde artış göstermemiştir. Buradan yola çıkarak MEG3b'nin TFDP1 üzerinde düzenleyici rolü olduğu söylenebilir. Ancak bu düzenlenmenin MEG3b'nin doğrudan etkisi ile mi yoksa dolaylı mekanizmalar üzerinden mi gerçekleştiğine dair kesin bir sonuca ulaşabilmek için, ileriki çalışmalarda TFDP1'in yakın etkileşimde olduğu genlerin ekspresyon düzeylerinin de araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

TOP1, topoizomeraz I olarak bilinen DNA replikasyonunun hatasız gerçekleşebilmesi için DNA ipliğinde kesim gerçekleştirir. Bu nedenle genom bütünlüğünün korunmasında kritik role sahiptir (329). Ancak TOP1'in zıt fonksiyonlu işlevleri, TOP1'in tümörlerdeki etki biçimi hakkındaki çözümlemelerimizi oldukça zorlaştırmaktadır. TOP1 geninin

sıklıkla KRK hücrelerinde kopya sayısında artış meydana gelmektedir (330). Bu tez çalışmasında TOP1 geni, transfeksiyon öncesinde normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir (Şekil 4.18). MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında, HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında ise TOP1'in ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermiştir (Şekil 4.37, Şekil 4.56). MEG3 ve MEG3b genlerinin TOP1 düzenlenmesindeki rolüne dair literatür mevcut değildir. İlk defa çalışmamızla beraber, TOP1 geninin düzenlenmesinde MEG3 ve MEG3b'nin role sahip olabileceği ortaya konulmuştur.

Giles ve ark., sporadik ve ailesel adenomatöz polipozis hastalarından aldıkları örneklerde erken evre hastalarda VHL düzeylerinin yüksek olduğunu, ilerlemiş evrelerdeki hastalarda VHL düzeylerinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (331). Çalışmamızda benzer şekilde VHL, normal kolon dokusuna kıyasla KRK hücrelerinde düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir. MEG3 transfeksiyonundan sonra, hem HCT-116 hem de HT-29 hücre hatlarında VHL ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.38, Şekil 4.57). Bu durum MEG3 hedefi olan miRNA veya lncRNA'larda meydana gelen değişimlerin etkisinden kaynaklanıyor olabileceği gibi MEG3 ve VHL arasındaki fiziksel etkileşimden de kaynaklanabilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada VHL/HIF1a'nın KRK'da hücre sağ kalımı için negatif geri besleme döngüsü oluşturduğu bildirilmiştir (332). Çalışmada kullandığımız hücre hatları VHL ile MEG3 arasındaki düzenlenmeye dair literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamız özgün nitelik taşımaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda MEG3'ün normal kolon dokusuna kıyasla kolorektal kanser hücre hatlarında ifade kaybına uğradığı bulunmuştur. Transfeksiyon sonrasında elde ettiğimiz bulgular E2F1, EGR1, KAT2B, p53, PCNA, SIVA1, TFDP1, TOP1 ve CDKN2A'nın ekspresyon düzeylerinin MEG3b overekspresyonu sonucu arttığını göstermiştir. Bununla beraber E2F1, EGR1, KAT2B, p53, PCNA, TFDP1, TOP1 ve CDKN2A'nın ekspresyon düzeyleri MEG3 overekspresyonu sonucu artmıştır. Bunun aksine VHL, SP1, CCND1 ve CASC3 genlerinin MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Ayrıca MAPK8 ve RAF1 ekspresyon düzeylerinde hem MEG3 hem de MEG3b transfeksiyonu sonrasında anlamlı bir değişim olmamıştır. MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında HUWE1, RELA ve AURKA genleri KRK hücrelerinde çift yönlü ekspresyon motifi göstermiştir. KRK hücrelerinde plazmid aracılı olarak MEG3, MEG3b ve MEG3-del5'in aşırı ekspresyonu, kolorektal

kanser hücrelerinde proliferasyonu, migrasyonu ve koloni oluşum yeteneğini baskılamıştır. HCT-116 hücre hattında, MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilmiş deney gruplarında MEG3-del5 ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre proliferasyonu anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.64). HCT-116 hücre hattında proliferasyon tayini için 24, 48 ve 72 saatlerde elde edilen bulgular, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun hücreler üzerinde proliferasyonu baskılayıcı etkisi olduğunu göstermektedir. HT-29 hücre hattında da HCT-116'dakine benzer şekilde, MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilmiş deney gruplarında MEG3-del5 ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre proliferasyonu anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 4.65). HT-29 hücre hattında proliferasyon tayini için 24, 48 ve 72 saatlerde elde edilen bulgular, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun HCT-116 hücre hattında olduğu gibi proliferasyonu baskılayıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Zhu ve ark. yaptıkları çalışmada, vitamin D aracılı MEG3 aktivasyonunun KKR hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (221). Yin ve ark., azalan MEG3 ekspresyonunun hücre proliferasyonunu arttırdığını ve KKR'de kötü prognozla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (20). Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz bulgular literatür verilerini (20, 221), destekler niteliktedir. Çalışmamız MEG3'ün KKR hücrelerinde farklı yollar üzerinden aktivasyonun hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisini doğrulamaktadır. Bununla beraber MEG3b'nin KKR hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisi ilk defa çalışmamızla beraber literatüre katılmış olacaktır.

HCT-116 hücre hattında MEG3, MEG3b ve MEG3-del5'in aşırı ekspresyonunun koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, plazmid transfeksiyonu sonrasında oluşan koloniler sayıldıktan sonra analiz edilmiştir. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen deney gruplarında koloni oluşum yeteneği, MEG3-del5 ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla azalmıştır (Şekil 4.66, Şekil 4.67). Benzer şekilde HT-29 hücre hattında da MEG3-del5 ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilmiş deney gruplarında koloni oluşum yeteneği azalmıştır (Şekil 4.68, Şekil 4.69). Elde ettiğimiz bu veriler doğrultusunda MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ekspresyonunun KKR hücrelerinde koloni oluşum yeteneğini baskıladığını söylemek mümkündür. Bununla beraber KKR hücrelerinde hem MEG3'ün hem de MEG3b'nin koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkilerine dair literatür mevcut değildir. Çalışmamızla beraber MEG3 ve MEG3b'nin

KRK hücrelerinde koloni oluşumunu baskılayıcı etkisi ilk defa literatüre kazandırılmış olacaktır.

MEG3, MEG3b ve MEG3-del5'in KRK hücrelerinde migrasyon üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla transfeksiyondan sonraki 0, 24, 48 ve 72 saat süreleri boyunca oluşturulan yara görüntülendi. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen HCT-116 hücre hattında oluşturulan yara MEG3-del5 ve boş plazmidle kıyasla daha geç kapanmıştır. HCT-116 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle gerçekleştirilen transfeksiyonun migrasyon hızını anlamlı derecede azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.70). Benzer şekilde HT-29 hücre hattında oluşturulan yara, MEG3-del5 ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney grubuna kıyasla, MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen deney grubunda daha geç kapanmıştır (Şekil 4.72). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ekspresyonunun KRK hücrelerinde migrasyonu baskıladığını göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgulara paralel şekilde, D vitamini aracılı MEG3 aktivasyonunun KRK hücrelerinde migrasyonu inhibe ettiğine dair literatür bulgusu mevcuttur (221). Ancak KRK hücrelerinde, MEG3b'nin migrasyon üzerindeki etkisine dair literatür mevcut değildir. Bununla beraber MEG3'e benzer şekilde MEG3b'nin de KRK hücrelerinde migrasyonu baskılayıcı etkisi ilk defa çalışmamızla beraber literatüre katılmış olacaktır.

HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarında MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrası morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre MEG3'ün delesyonlu kısmını içeren plazmidin aşırı ekspresyonu, boş plazmidle oldukça benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.74, Şekil 4.75). Buradan yola çıkarak çalışmada kullandığımız MEG3-del5 plazmidinin MEG3'e kıyasla işlevini yitirmiş halde olduğu çıkarılabilir. Şaşırtıcı bir şekilde MEG3 izoformu olan MEG3b'nin üç boyutlu yapısı MEG3'ten farklı olsa da MEG3'e oldukça benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Buradan yola çıkarak elde ettiğimiz bulgular MEG3 ve MEG3b'nin katlanmış yapıları farklı olsa da işlevsel bölgelerinin benzerlik gösterebileceğini düşündürmektedir. MEG3, MEG3b ve MEG3-del5'in aşırı ekspresyonu sonucunda KRK hücrelerinde meydana gelen değişimler ilk defa çalışmamızla beraber literatüre kazandırılmış olacaktır. MEG3 ve MEG3b'nin aşırı ekspresyonu sonucunda CDKN2A hedef genleri üzerinde meydana gelen ekspresyon değişimleri, MEG3 ile bu genler arasında olası fiziksel etkileşimlere işaret etmektedir. Ancak MEG3 ile bu genler arasındaki kesin ilişkiye dair sonuçlar ortaya koyabilmek için ileriki çalışmalarda farklı yöntemler aracılığıyla da araştırılmasına

gereksinim vardır. Çalışmada kullandığımız genlerin bazıları MEG3'ün aşırı ifadesi sonucunda birbirlerine benzer şekilde ekspresyon paternleri göstermişlerdir. Benzer ekspresyon paternine sahip bu genlerin daha sonraki çalışmalarda araştırılması, hem CDKN2A yolağının aydınlatılmasına hem de MEG3'ün yeni işlevlerinin açığa çıkarılmasına yardımcı olacaktır. Bunlarla birlikte, çalışmış olduğumuz genlerin büyük bir kısmı KRK'de ilk defa araştırılmıştır. KRK'de daha önce hiç çalışılmamış bu genlerin, ileriki çalışmalarda farklı KRK hücre hatlarındaki işlevlerinin ve birbirleriyle olan ilişkilerinin araştırılması KRK'de yeni tedavi hedeflerini açığa çıkarabilir.



6. KAYNAKLAR

1. Consortium, E.P., An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012. 489(7414): p. 57-74.
2. Calin, G.A. and C.M. Croce, MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(11): p. 857-66.
3. Trang, P., J.B. Weidhaas, and F.J. Slack, MicroRNAs as potential cancer therapeutics. *Oncogene*, 2008. 27 Suppl 2: p. S52-7.
4. Winter, J., S. Jung, S. Keller, R.I. Gregory, and S. Diederichs, Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(3): p. 228-34.
5. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 2009. 136(4): p. 629-41.
6. Marchese, F.P., I. Raimondi, and M. Huarte, The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol*, 2017. 18(1): p. 206.
7. Liu, H.N., T.T. Liu, H. Wu, Y.J. Chen, Y.J. Tseng, C. Yao, S.Q. Weng, L. Dong, and X.Z. Shen, Serum microRNA signatures and metabolomics have high diagnostic value in colorectal cancer using two novel methods. *Cancer Sci*, 2018. 109(4): p. 1185-1194.
8. Conev, N.V., I.S. Donev, A.A. Konsoulova-Kirova, T.G. Chervenkov, J.K. Kashlov, and K.D. Ivanov, Serum expression levels of miR-17, miR-21, and miR-92 as potential biomarkers for recurrence after adjuvant chemotherapy in colon cancer patients. *Biosci Trends*, 2015. 9(6): p. 393-401.
9. Liao, G., X. Zhang, Z. Li, S. Lan, M. Huang, and W. Huang, Renal-type clear cell carcinoma of prostate: A case report and review of literature. *Indian J Pathol Microbiol*, 2018. 61(3): p. 431-433.
10. Nikolaou, S., S. Qiu, F. Fiorentino, S. Rasheed, P. Tekkis, and C. Kontovounisios, Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. *Tech Coloproctol*, 2018. 22(7): p. 481-498.

11. Lin, J., M. Qiu, R. Xu, and A.S. Dobs, Comparison of survival and clinicopathologic features in colorectal cancer among African American, Caucasian, and Chinese patients treated in the United States: Results from the surveillance epidemiology and end results (SEER) database. *Oncotarget*, 2015. 6(32): p. 33935-43.
12. Guinney, J., R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B.M. Bot, J.S. Morris, I.M. Simon, S. Gerster, E. Fessler, E.M.F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G.C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J.W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S.H. Friend, P. Laurent-Puig, J.P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen, and S. Tejpar, The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 2015. 21(11): p. 1350-6.
13. Yu, J., W.K. Wu, X. Li, J. He, X.X. Li, S.S. Ng, C. Yu, Z. Gao, J. Yang, M. Li, Q. Wang, Q. Liang, Y. Pan, J.H. Tong, K.F. To, N. Wong, N. Zhang, J. Chen, Y. Lu, P.B. Lai, F.K. Chan, Y. Li, H.F. Kung, H. Yang, J. Wang, and J.J. Sung, Novel recurrently mutated genes and a prognostic mutation signature in colorectal cancer. *Gut*, 2015. 64(4): p. 636-45.
14. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007. 130(2): p. 223-33.
15. Liu, Y. and N.E. Sharpless, Tumor suppressor mechanisms in immune aging. *Curr Opin Immunol*, 2009. 21(4): p. 431-9.
16. Ohtsuka, M., H. Ling, C. Ivan, M. Pichler, D. Matsushita, M. Goblirsch, V. Stiegelbauer, K. Shigeyasu, X. Zhang, M. Chen, F. Vidhu, G.A. Bartholomeusz, Y. Toiyama, M. Kusunoki, Y. Doki, M. Mori, S. Song, J.R. Gunther, S. Krishnan, O. Slaby, A. Goel, J.A. Ajani, M. Radovich, and G.A. Calin, H19 Noncoding RNA, an Independent Prognostic Factor, Regulates Essential Rb-E2F and CDK8-beta-Catenin Signaling in Colorectal Cancer. *EBioMedicine*, 2016. 13: p. 113-124.
17. Zhou, Y., X. Zhang, and A. Klibanski, MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol*, 2012. 48(3): p. R45-53.

18. Bando, T., Y. Kato, Y. Ihara, F. Yamagishi, K. Tsukada, and M. Isobe, Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999. 111(2): p. 161-5.
19. Lu, K.H., W. Li, X.H. Liu, M. Sun, M.L. Zhang, W.Q. Wu, W.P. Xie, and Y.Y. Hou, Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 461.
20. Yin, D.D., Z.J. Liu, E. Zhang, R. Kong, Z.H. Zhang, and R.H. Guo, Decreased expression of long noncoding RNA MEG3 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol*, 2015. 36(6): p. 4851-9.
21. Li, J., Y. Zi, W. Wang, and Y. Li, Long Noncoding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Metastasis in Chronic Myeloid Leukemia via Targeting miR-184. *Oncol Res*, 2018. 26(2): p. 297-305.
22. Zhang, W., S. Shi, J. Jiang, X. Li, H. Lu, and F. Ren, LncRNA MEG3 inhibits cell epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-421 targeting E-cadherin in breast cancer. *Biomed Pharmacother*, 2017. 91: p. 312-319.
23. Kong, H., Y. Wu, M. Zhu, C. Zhai, J. Qian, X. Gao, S. Wang, Y. Hou, S. Lu, and H. Zhu, Long non-coding RNAs: novel prognostic biomarkers for liver metastases in patients with early stage colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016. 7(31): p. 50428-50436.
24. Li, L., J. Shang, Y. Zhang, S. Liu, Y. Peng, Z. Zhou, H. Pan, X. Wang, L. Chen, and Q. Zhao, MEG3 is a prognostic factor for CRC and promotes chemosensitivity by enhancing oxaliplatin-induced cell apoptosis. *Oncol Rep*, 2017. 38(3): p. 1383-1392.
25. Yan, L., Z. Liu, H. Yin, Z. Guo, and Q. Luo, Silencing of MEG3 inhibited ox-LDL-induced inflammation and apoptosis in macrophages via modulation of the MEG3/miR-204/CDKN2A regulatory axis. *Cell Biol Int*, 2019. 43(4): p. 409-420.
26. Gall, J.G., Chromosome structure and the C-value paradox. *J Cell Biol*, 1981. 91(3 Pt 2): p. 3s-14s.
27. Thomas, C.A., Jr., The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet*, 1971. 5: p. 237-56.

28. International Human Genome Sequencing, C., Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004. 431(7011): p. 931-45.
29. Ezkurdia, I., D. Juan, J.M. Rodriguez, A. Frankish, M. Diekhans, J. Harrow, J. Vazquez, A. Valencia, and M.L. Tress, Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet*, 2014. 23(22): p. 5866-78.
30. Kondo, T., Y. Hashimoto, K. Kato, S. Inagaki, S. Hayashi, and Y. Kageyama, Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(6): p. 660-5.
31. Lin, R., S. Maeda, C. Liu, M. Karin, and T.S. Edgington, A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene*, 2007. 26(6): p. 851-8.
32. Dinger, M.E., K.C. Pang, T.R. Mercer, and J.S. Mattick, Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol*, 2008. 4(11): p. e1000176.
33. Chooniedass-Kothari, S., E. Emberley, M.K. Hamedani, S. Troup, X. Wang, A. Czosnek, F. Hube, M. Mutawe, P.H. Watson, and E. Leygue, The steroid receptor RNA activator is the first functional RNA encoding a protein. *FEBS Lett*, 2004. 566(1-3): p. 43-7.
34. Candeias, M.M., L. Malbert-Colas, D.J. Powell, C. Daskalogianni, M.M. Maslon, N. Naski, K. Bourougaa, F. Calvo, and R. Fahraeus, P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(9): p. 1098-105.
35. Komar, A.A., Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics*, 2007. 8(8): p. 1075-80.
36. Carninci, P., A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C.A. Semple, M.S. Taylor, P.G. Engstrom, M.C. Frith, A.R. Forrest, W.B. Alkema, S.L. Tan, C. Plessy, R. Kodzius, T. Ravasi, T. Kasukawa, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, Y. Kitazume, H. Kawaji, C. Kai, M. Nakamura, H. Konno, K. Nakano, S. Mottagui-Tabar, P. Arner, A. Chesi, S. Gustincich, F. Persichetti, H. Suzuki, S.M. Grimmond, C.A. Wells, V. Orlando, C. Wahlestedt, E.T. Liu, M. Harbers, J. Kawai, V.B. Bajic, D.A. Hume, and Y. Hayashizaki, Genome-wide

- analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*, 2006. 38(6): p. 626-35.
37. Jenny, A., O. Hachet, P. Zavorszky, A. Cyrklaff, M.D. Weston, D.S. Johnston, M. Erdelyi, and A. Ephrussi, A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development*, 2006. 133(15): p. 2827-33.
 38. Rastinejad, F. and H.M. Blau, Genetic complementation reveals a novel regulatory role for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell*, 1993. 72(6): p. 903-17.
 39. Meister, G. and T. Tuschl, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 343-9.
 40. Matera, A.G., R.M. Terns, and M.P. Terns, Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(3): p. 209-20.
 41. Farazi, T.A., S.A. Juranek, and T. Tuschl, The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, 2008. 135(7): p. 1201-14.
 42. Czech, B. and G.J. Hannon, Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 2011. 12(1): p. 19-31.
 43. Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 2009. 23(13): p. 1494-504.
 44. Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, D.A. Nix, R. Duttagupta, A.T. Willingham, P.F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermuller, I.L. Hofacker, I. Bell, E. Cheung, J. Drenkow, E. Dumais, S. Patel, G. Helt, M. Ganesh, S. Ghosh, A. Piccolboni, V. Sementchenko, H. Tamma, and T.R. Gingeras, RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, 2007. 316(5830): p. 1484-8.
 45. Kapranov, P., J. Drenkow, J. Cheng, J. Long, G. Helt, S. Dike, and T.R. Gingeras, Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res*, 2005. 15(7): p. 987-97.

46. Qureshi, I.A. and M.F. Mehler, Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 2012. 13(8): p. 528-41.
47. Yousefi, H., M. Maheronnaghsh, F. Molaei, L. Mashouri, A. Reza Aref, M. Momeny, and S.K. Alahari, Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance. *Oncogene*, 2020. 39(5): p. 953-974.
48. Cabili, M.N., C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, and J.L. Rinn, Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*, 2011. 25(18): p. 1915-27.
49. Guttman, M. and J.L. Rinn, Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 2012. 482(7385): p. 339-46.
50. Katayama, S., Y. Tomaru, T. Kasukawa, K. Waki, M. Nakanishi, M. Nakamura, H. Nishida, C.C. Yap, M. Suzuki, J. Kawai, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. Wells, M. Frith, T. Ravasi, K.C. Pang, J. Hallinan, J. Mattick, D.A. Hume, L. Lipovich, S. Batalov, P.G. Engstrom, Y. Mizuno, M.A. Faghihi, A. Sandelin, A.M. Chalk, S. Mottagui-Tabar, Z. Liang, B. Lenhard, C. Wahlestedt, R.G.E.R. Group, G. Genome Science, and F. Consortium, Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, 2005. 309(5740): p. 1564-6.
51. Chen, L.L., Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends Biochem Sci*, 2016. 41(9): p. 761-772.
52. Cesana, M., D. Cacchiarelli, I. Legnini, T. Santini, O. Sthandier, M. Chinappi, A. Tramontano, and I. Bozzoni, A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 2011. 147(2): p. 358-69.
53. Penny, G.D., G.F. Kay, S.A. Sheardown, S. Rastan, and N. Brockdorff, Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 1996. 379(6561): p. 131-7.
54. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 2016. 17(1): p. 47-62.

55. Bartel, D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-33.
56. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*, 2012. 81: p. 145-66.
57. Wang, K.C. and H.Y. Chang, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2011. 43(6): p. 904-14.
58. Noh, J.H., K.M. Kim, W.G. McClusky, K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. 9(3): p. e1471.
59. Ren, T., Y. Zhou, Y. Zhou, W. Tian, Z. Gu, S. Zhao, Y. Chen, R. Han, X. Liu, X. Kang, and Z. Li, Identification and association of novel lncRNA pouMU1 gene mutations with chicken performance traits. *J Genet*, 2017. 96(6): p. 941-950.
60. Gezer, U., E. Ozgur, M. Cetinkaya, M. Isin, and N. Dalay, Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biol Int*, 2014. 38(9): p. 1076-9.
61. Huang, X., T. Yuan, M. Tschannen, Z. Sun, H. Jacob, M. Du, M. Liang, R.L. Dittmar, Y. Liu, M. Liang, M. Kohli, S.N. Thibodeau, L. Boardman, and L. Wang, Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 2013. 14: p. 319.
62. Song, J., D. Kim, J. Han, Y. Kim, M. Lee, and E.J. Jin, PBMC and exosome-derived Hotair is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*, 2015. 15(1): p. 121-6.
63. Briggs, J.A., E.J. Wolvetang, J.S. Mattick, J.L. Rinn, and G. Barry, Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron*, 2015. 88(5): p. 861-877.
64. Geisler, S. and J. Collier, RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(11): p. 699-712.
65. Maass, P.G., F.C. Luft, and S. Bähring, Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 2014. 92(4): p. 337-46.

66. Bhan, A. and S.S. Mandal, LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1856(1): p. 151-64.
67. Brunner, A.L., A.H. Beck, B. Edris, R.T. Sweeney, S.X. Zhu, R. Li, K. Montgomery, S. Varma, T. Gilks, X. Guo, J.W. Foley, D.M. Witten, C.P. Giacomini, R.A. Flynn, J.R. Pollack, R. Tibshirani, H.Y. Chang, M. van de Rijn, and R.B. West, Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol*, 2012. 13(8): p. R75.
68. Gutschner, T. and S. Diederichs, The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 2012. 9(6): p. 703-19.
69. Khalil, A.M., M. Guttman, M. Huarte, M. Garber, A. Raj, D. Rivea Morales, K. Thomas, A. Presser, B.E. Bernstein, A. van Oudenaarden, A. Regev, E.S. Lander, and J.L. Rinn, Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(28): p. 11667-72.
70. Thai, P., S. Statt, C.H. Chen, E. Liang, C. Campbell, and R. Wu, Characterization of a novel long noncoding RNA, SCAL1, induced by cigarette smoke and elevated in lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. 49(2): p. 204-11.
71. Wu, Y., L. Zhang, Y. Wang, H. Li, X. Ren, F. Wei, W. Yu, X. Wang, L. Zhang, J. Yu, and X. Hao, Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer. *Tumour Biol*, 2014. 35(10): p. 9531-8.
72. Wang, J., X. Liu, H. Wu, P. Ni, Z. Gu, Y. Qiao, N. Chen, F. Sun, and Q. Fan, CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(16): p. 5366-83.
73. Panzitt, K., M.M. Tschernatsch, C. Guelly, T. Moustafa, M. Stradner, H.M. Strohmaier, C.R. Buck, H. Denk, R. Schroeder, M. Trauner, and K. Zatloukal, Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*, 2007. 132(1): p. 330-42.

74. Archer, K., Z. Broskova, A.S. Bayoumi, J.P. Teoh, A. Davila, Y. Tang, H. Su, and I.M. Kim, Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(10): p. 23651-67.
75. Ishii, N., K. Ozaki, H. Sato, H. Mizuno, S. Susumu, A. Takahashi, Y. Miyamoto, S. Ikegawa, N. Kamatani, M. Hori, S. Satoshi, Y. Nakamura, and T. Tanaka, Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet*, 2006. 51(12): p. 1087-1099.
76. McPherson, R., A. Pertsemlidis, N. Kavaslar, A. Stewart, R. Roberts, D.R. Cox, D.A. Hinds, L.A. Pennacchio, A. Tybjaerg-Hansen, A.R. Folsom, E. Boerwinkle, H.H. Hobbs, and J.C. Cohen, A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*, 2007. 316(5830): p. 1488-91.
77. Carter, G., B. Miladinovic, A.A. Patel, L. Deland, S. Mastorides, and N.A. Patel, Circulating long noncoding RNA GAS5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus. *BBA Clin*, 2015. 4: p. 102-7.
78. Huang, Y.S., H.Y. Hsieh, H.M. Shih, H.K. Sytwu, and C.C. Wu, Urinary Xist is a potential biomarker for membranous nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 452(3): p. 415-21.
79. Faghihi, M.A., F. Modarresi, A.M. Khalil, D.E. Wood, B.G. Sahagan, T.E. Morgan, C.E. Finch, G. St Laurent, 3rd, P.J. Kenny, and C. Wahlestedt, Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med*, 2008. 14(7): p. 723-30.
80. Kerin, T., A. Ramanathan, K. Rivas, N. Grepo, G.A. Coetzee, and D.B. Campbell, A noncoding RNA antisense to moesin at 5p14.1 in autism. *Sci Transl Med*, 2012. 4(128): p. 128ra40.
81. Carpenter, S., D. Aiello, M.K. Atianand, E.P. Ricci, P. Gandhi, L.L. Hall, M. Byron, B. Monks, M. Henry-Bezy, J.B. Lawrence, L.A. O'Neill, M.J. Moore, D.R. Caffrey, and K.A. Fitzgerald, A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science*, 2013. 341(6147): p. 789-92.
82. Fitzgerald, K.A. and D.R. Caffrey, Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 2014. 26: p. 140-6.

83. Li, J., Z. Xuan, and C. Liu, Long non-coding RNAs and complex human diseases. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(9): p. 18790-808.
84. Heward, J.A. and M.A. Lindsay, Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. *Trends Immunol*, 2014. 35(9): p. 408-19.
85. Sigdel, K.R., A. Cheng, Y. Wang, L. Duan, and Y. Zhang, The Emerging Functions of Long Noncoding RNA in Immune Cells: Autoimmune Diseases. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 848790.
86. Li, B., L.C. Tsoi, W.R. Swindell, J.E. Gudjonsson, T. Tejasvi, A. Johnston, J. Ding, P.E. Stuart, X. Xing, J.J. Kochkodan, J.J. Voorhees, H.M. Kang, R.P. Nair, G.R. Abecasis, and J.T. Elder, Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms. *J Invest Dermatol*, 2014. 134(7): p. 1828-1838.
87. Li, Z., T.C. Chao, K.Y. Chang, N. Lin, V.S. Patil, C. Shimizu, S.R. Head, J.C. Burns, and T.M. Rana, The long noncoding RNA THRIL regulates TNFalpha expression through its interaction with hnRNPL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(3): p. 1002-7.
88. Liu, Q., X. Zhang, L. Dai, X. Hu, J. Zhu, L. Li, C. Zhou, and Y. Ao, Long noncoding RNA related to cartilage injury promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2014. 66(4): p. 969-78.
89. Muller, N., F. Doring, M. Klapper, K. Neumann, D.M. Schulte, K. Turk, J.O. Schroder, R.A. Zeuner, S. Freitag-Wolf, S. Schreiber, and M. Laudes, Interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha differentially regulate lincRNA transcripts in cells of the innate immune system in vivo in human subjects with rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2014. 68(1): p. 65-8.
90. Tsitsiou, E., A.E. Williams, S.A. Moschos, K. Patel, C. Rossios, X. Jiang, O.D. Adams, P. Macedo, R. Booton, D. Gibeon, K.F. Chung, and M.A. Lindsay, Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+ T cells in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(1): p. 95-103.
91. Zhang, H., C.E. Nestor, S. Zhao, A. Lentini, B. Bohle, M. Benson, and H. Wang, Profiling of human CD4+ T-cell subsets identifies the TH2-specific noncoding RNA GATA3-AS1. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 132(4): p. 1005-8.

92. Messemaker, T.C., M. Frank-Bertoncelj, R.B. Marques, A. Adriaans, A.M. Bakker, N. Daha, S. Gay, T.W. Huizinga, R.E. Toes, H.M. Mikkers, and F. Kurreeman, A novel long non-coding RNA in the rheumatoid arthritis risk locus TRAF1-C5 influences C5 mRNA levels. *Genes Immun*, 2016. 17(2): p. 85-92.
93. Sonkoly, E., Z. Bata-Csorgo, A. Pivarcsi, H. Polyanka, A. Kenderessy-Szabo, G. Molnar, K. Szentpali, L. Bari, K. Megyeri, Y. Mandi, A. Dobozy, L. Kemeny, and M. Szell, Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *J Biol Chem*, 2005. 280(25): p. 24159-67.
94. Szegedi, K., A. Goblos, S. Bacsa, M. Antal, I.B. Nemeth, Z. Bata-Csorgo, L. Kemeny, A. Dobozy, and M. Szell, Expression and functional studies on the noncoding RNA, PRINS. *Int J Mol Sci*, 2012. 14(1): p. 205-25.
95. Kornfeld, J.W. and J.C. Bruning, Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. *Front Genet*, 2014. 5: p. 57.
96. Kino, T., D.E. Hurt, T. Ichijo, N. Nader, and G.P. Chrousos, Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*, 2010. 3(107): p. ra8.
97. Barthel, A. and D. Schmolle, Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 285(4): p. E685-92.
98. Mourtada-Maarabouni, M., M.R. Pickard, V.L. Hedge, F. Farzaneh, and G.T. Williams, GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*, 2009. 28(2): p. 195-208.
99. Smith, C.M. and J.A. Steitz, Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(12): p. 6897-909.
100. Kameswaran, V. and K.H. Kaestner, The Missing lnc(RNA) between the pancreatic beta-cell and diabetes. *Front Genet*, 2014. 5: p. 200.
101. Thum, T. and G. Condorelli, Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circ Res*, 2015. 116(4): p. 751-62.

102. Wang, P., H. Fu, J. Cui, and X. Chen, Differential lncRNA-mRNA coexpression network analysis revealing the potential regulatory roles of lncRNAs in myocardial infarction. *Mol Med Rep*, 2016. 13(2): p. 1195-203.
103. Broadbent, H.M., J.F. Peden, S. Lorkowski, A. Goel, H. Ongen, F. Green, R. Clarke, R. Collins, M.G. Franzosi, G. Tognoni, U. Seedorf, S. Rust, P. Eriksson, A. Hamsten, M. Farrall, H. Watkins, and P. consortium, Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet*, 2008. 17(6): p. 806-14.
104. Grote, P., L. Wittler, D. Hendrix, F. Koch, S. Wahrisch, A. Beisaw, K. Macura, G. Blass, M. Kellis, M. Werber, and B.G. Herrmann, The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*, 2013. 24(2): p. 206-14.
105. Han, P., W. Li, C.H. Lin, J. Yang, C. Shang, S.T. Nuernberg, K.K. Jin, W. Xu, C.Y. Lin, C.J. Lin, Y. Xiong, H. Chien, B. Zhou, E. Ashley, D. Bernstein, P.S. Chen, H.V. Chen, T. Quertermous, and C.P. Chang, A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*, 2014. 514(7520): p. 102-106.
106. Klattenhoff, C.A., J.C. Scheuermann, L.E. Surface, R.K. Bradley, P.A. Fields, M.L. Steinhauser, H. Ding, V.L. Butty, L. Torrey, S. Haas, R. Abo, M. Tabebordbar, R.T. Lee, C.B. Burge, and L.A. Boyer, Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013. 152(3): p. 570-83.
107. Wu, C. and P. Arora, Long noncoding Mhrt RNA: molecular crowbar unravel insights into heart failure treatment. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015. 8(1): p. 213-5.
108. Derrien, T., R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D.G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J.B. Brown, L. Lipovich, J.M. Gonzalez, M. Thomas, C.A. Davis, R. Shiekhattar, T.R. Gingeras, T.J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, and R. Guigo, The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 2012. 22(9): p. 1775-89.

109. Syrbe, S., U.B.S. Hedrich, E. Riesch, T. Djemie, S. Muller, R.S. Moller, B. Maher, L. Hernandez-Hernandez, M. Synofzik, H.S. Caglayan, M. Arslan, J.M. Serratosa, M. Nothnagel, P. May, R. Krause, H. Loffler, K. Detert, T. Dorn, H. Vogt, G. Kramer, L. Schols, P.E. Mullis, T. Linnankivi, A.E. Lehesjoki, K. Sterbova, D.C. Craiu, D. Hoffman-Zacharska, C.M. Korff, Y.G. Weber, M. Steinlin, S. Gallati, A. Bertsche, M.K. Bernhard, A. Merkenschlager, W. Kiess, E.R.E.S.c. Euro, M. Gonzalez, S. Zuchner, A. Palotie, A. Suls, P. De Jonghe, I. Helbig, S. Biskup, M. Wolff, S. Maljevic, R. Schule, S.M. Sisodiya, S. Weckhuysen, H. Lerche, and J.R. Lemke, De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 2015. 47(4): p. 393-399.
110. Talkowski, M.E., G. Maussion, L. Crapper, J.A. Rosenfeld, I. Blumenthal, C. Hanscom, C. Chiang, A. Lindgren, S. Pereira, D. Ruderfer, A.B. Diallo, J.P. Lopez, G. Turecki, E.S. Chen, C. Giguek, D.J. Harris, V. Lip, Y. An, M. Biagioli, M.E. Macdonald, M. Lin, S.J. Haggarty, P. Sklar, S. Purcell, M. Kellis, S. Schwartz, L.G. Shaffer, M.R. Natowicz, Y. Shen, C.C. Morton, J.F. Gusella, and C. Ernst, Disruption of a large intergenic noncoding RNA in subjects with neurodevelopmental disabilities. *Am J Hum Genet*, 2012. 91(6): p. 1128-34.
111. Zhao, X., Z. Tang, H. Zhang, F.E. Atianjoh, J.Y. Zhao, L. Liang, W. Wang, X. Guan, S.C. Kao, V. Tiwari, Y.J. Gao, P.N. Hoffman, H. Cui, M. Li, X. Dong, and Y.X. Tao, A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons. *Nat Neurosci*, 2013. 16(8): p. 1024-31.
112. Tallen, G. and K. Riabowol, Keep-ING balance: tumor suppression by epigenetic regulation. *FEBS Lett*, 2014. 588(16): p. 2728-42.
113. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
114. Collins, K., T. Jacks, and N.P. Pavletich, The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(7): p. 2776-8.
115. Nabel, E.G., CDKs and CKIs: molecular targets for tissue remodelling. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(8): p. 587-98.
116. Asghar, U., A.K. Witkiewicz, N.C. Turner, and E.S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. 14(2): p. 130-46.

117. Lim, S. and P. Kaldis, Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 2013. 140(15): p. 3079-93.
118. Satyanarayana, A. and P. Kaldis, Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 2009. 28(33): p. 2925-39.
119. Giacinti, C. and A. Giordano, RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 2006. 25(38): p. 5220-7.
120. Peyressatre, M., C. Prevel, M. Pellerano, and M.C. Morris, Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)*, 2015. 7(1): p. 179-237.
121. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 1999. 13(12): p. 1501-12.
122. Abraham, R.T., Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001. 15(17): p. 2177-96.
123. el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993. 75(4): p. 817-25.
124. Witcher, M. and B.M. Emerson, Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell*, 2009. 34(3): p. 271-84.
125. Gil, J. and G. Peters, Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(9): p. 667-77.
126. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993. 366(6456): p. 704-7.
127. Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N.J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H.W. Lee, C. Cordon-Cardo, and R.A. DePinho, The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 1998. 92(6): p. 713-23.

128. Quelle, D.E., F. Zindy, R.A. Ashmun, and C.J. Sherr, Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 1995. 83(6): p. 993-1000.
129. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. 81(3): p. 323-30.
130. Pan, Q., A. Sathe, P.C. Black, P.J. Goebell, A.M. Kamat, B. Schmitz-Draeger, and R. Nawroth, CDK4/6 Inhibitors in Cancer Therapy: A Novel Treatment Strategy for Bladder Cancer. *Bladder Cancer*, 2017. 3(2): p. 79-88.
131. Fontana, R., M. Ranieri, G. La Mantia, and M. Vivo, Dual Role of the Alternative Reading Frame ARF Protein in Cancer. *Biomolecules*, 2019. 9(3).
132. Chan, A.O., R.R. Broaddus, P.S. Houlihan, J.P. Issa, S.R. Hamilton, and A. Rashid, CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*, 2002. 160(5): p. 1823-30.
133. Kim, J.C., J.S. Choi, S.A. Roh, D.H. Cho, T.W. Kim, and Y.S. Kim, Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol*, 2010. 17(7): p. 1767-76.
134. Lee, D.W., S.W. Han, Y. Cha, Y.Y. Rhee, J.M. Bae, N.Y. Cho, K.H. Lee, T.Y. Kim, D.Y. Oh, S.A. Im, Y.J. Bang, S.Y. Jeong, K.J. Park, G.H. Kang, and T.Y. Kim, Different prognostic effect of CpG island methylation according to sex in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Clin Epigenetics*, 2015. 7: p. 63.
135. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
136. Arnold, M., M.S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 2017. 66(4): p. 683-691.
137. Ait Ouakrim, D., C. Pizot, M. Boniol, M. Malvezzi, M. Boniol, E. Negri, M. Bota, M.A. Jenkins, H. Bleiberg, and P. Autier, Trends in colorectal cancer mortality in

- Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*, 2015. 351: p. h4970.
138. Bailey, C.E., C.Y. Hu, Y.N. You, B.K. Bednarski, M.A. Rodriguez-Bigas, J.M. Skibber, S.B. Cantor, and G.J. Chang, Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg*, 2015. 150(1): p. 17-22.
 139. Siegel, R.L., S.A. Fedewa, W.F. Anderson, K.D. Miller, J. Ma, P.S. Rosenberg, and A. Jemal, Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst*, 2017. 109(8).
 140. Wolf, A.M.D., E.T.H. Fontham, T.R. Church, C.R. Flowers, C.E. Guerra, S.J. LaMonte, R. Etzioni, M.T. McKenna, K.C. Oeffinger, Y.T. Shih, L.C. Walter, K.S. Andrews, O.W. Brawley, D. Brooks, S.A. Fedewa, D. Manassaram-Baptiste, R.L. Siegel, R.C. Wender, and R.A. Smith, Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(4): p. 250-281.
 141. Kasi, P.M., F. Shahjehan, J.J. Cochuyt, Z. Li, D.T. Colibaseanu, and A. Merchea, Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2019. 18(1): p. e87-e95.
 142. Henrikson, N.B., E.M. Webber, K.A. Goddard, A. Scrol, M. Piper, M.S. Williams, D.T. Zallen, N. Calonge, T.G. Ganiats, A.C. Janssens, A. Zauber, I. Lansdorp-Vogelaar, M. van Ballegooijen, and E.P. Whitlock, Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med*, 2015. 17(9): p. 702-12.
 143. Schoen, R.E., A. Razzak, K.J. Yu, S.I. Berndt, K. Firl, T.L. Riley, and P.F. Pinsky, Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2015. 149(6): p. 1438-1445 e1.
 144. Lichtenstein, P., N.V. Holm, P.K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, and K. Hemminki, Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 2000. 343(2): p. 78-85.

145. Czene, K., P. Lichtenstein, and K. Hemminki, Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer*, 2002. 99(2): p. 260-6.
146. Jiao, S., U. Peters, S. Berndt, H. Brenner, K. Butterbach, B.J. Caan, C.S. Carlson, A.T. Chan, J. Chang-Claude, S. Chanock, K.R. Curtis, D. Duggan, J. Gong, T.A. Harrison, R.B. Hayes, B.E. Henderson, M. Hoffmeister, L.N. Kolonel, L. Le Marchand, J.D. Potter, A. Rudolph, R.E. Schoen, D. Seminara, M.L. Slattery, E. White, and L. Hsu, Estimating the heritability of colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 2014. 23(14): p. 3898-905.
147. Syngal, S., R.E. Brand, J.M. Church, F.M. Giardiello, H.L. Hampel, R.W. Burt, and G. American College of, ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*, 2015. 110(2): p. 223-62; quiz 263.
148. Brenner, H., J. Chang-Claude, C.M. Seiler, A. Rickert, and M. Hoffmeister, Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med*, 2011. 154(1): p. 22-30.
149. Cottet, V., V. Jooste, I. Fournel, A.M. Bouvier, J. Faivre, and C. Bonithon-Kopp, Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study. *Gut*, 2012. 61(8): p. 1180-6.
150. Jess, T., C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012. 10(6): p. 639-45.
151. Vasen, H.F., I. Blanco, K. Aktan-Collan, J.P. Gopie, A. Alonso, S. Aretz, I. Bernstein, L. Bertario, J. Burn, G. Capella, C. Colas, C. Engel, I.M. Frayling, M. Genuardi, K. Heinimann, F.J. Hes, S.V. Hodgson, J.A. Karagiannis, F. Laloo, A. Lindblom, J.P. Mecklin, P. Moller, T. Myrhoj, F.M. Nagengast, Y. Parc, M. Ponz de Leon, L. Renkonen-Sinisalo, J.R. Sampson, A. Stormorken, R.H. Sijmons, S. Tejpar, H.J. Thomas, N. Rahner, J.T. Wijnen, H.J. Jarvinen, G. Moslein, and g. Mallorca, Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*, 2013. 62(6): p. 812-23.

152. Botteri, E., S. Iodice, V. Bagnardi, S. Raimondi, A.B. Lowenfels, and P. Maisonneuve, Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, 2008. 300(23): p. 2765-78.
153. Cai, S., Y. Li, Y. Ding, K. Chen, and M. Jin, Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, 2014. 23(6): p. 532-9.
154. Kyrgiou, M., I. Kalliala, G. Markozannes, M.J. Gunter, E. Paraskevaidis, H. Gabra, P. Martin-Hirsch, and K.K. Tsilidis, Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ*, 2017. 356: p. j477.
155. Chan, D.S., R. Lau, D. Aune, R. Vieira, D.C. Greenwood, E. Kampman, and T. Norat, Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e20456.
156. Nakatsu, G., X. Li, H. Zhou, J. Sheng, S.H. Wong, W.K. Wu, S.C. Ng, H. Tsoi, Y. Dong, N. Zhang, Y. He, Q. Kang, L. Cao, K. Wang, J. Zhang, Q. Liang, J. Yu, and J.J. Sung, Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 8727.
157. Kwong, T.N.Y., X. Wang, G. Nakatsu, T.C. Chow, T. Tipoe, R.Z.W. Dai, K.K.K. Tsoi, M.C.S. Wong, G. Tse, M.T.V. Chan, F.K.L. Chan, S.C. Ng, J.C.Y. Wu, W.K.K. Wu, J. Yu, J.J.Y. Sung, and S.H. Wong, Association Between Bacteremia From Specific Microbes and Subsequent Diagnosis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 2018. 155(2): p. 383-390 e8.
158. Kostic, A.D., E. Chun, L. Robertson, J.N. Glickman, C.A. Gallini, M. Michaud, T.E. Clancy, D.C. Chung, P. Lochhead, G.L. Hold, E.M. El-Omar, D. Brenner, C.S. Fuchs, M. Meyerson, and W.S. Garrett, *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*, 2013. 14(2): p. 207-15.
159. Huarte, M. and J.L. Rinn, Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum Mol Genet*, 2010. 19(R2): p. R152-61.
160. Taft, R.J., K.C. Pang, T.R. Mercer, M. Dinger, and J.S. Mattick, Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*, 2010. 220(2): p. 126-39.

161. Parasramka, M.A., S. Maji, A. Matsuda, I.K. Yan, and T. Patel, Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma. *Pharmacol Ther*, 2016. 161: p. 67-78.
162. Zeng, S., Y.F. Xiao, B. Tang, C.J. Hu, R. Xie, S.M. Yang, and B.S. Li, Long Noncoding RNA in Digestive Tract Cancers: Function, Mechanism, and Potential Biomarker. *Oncologist*, 2015. 20(8): p. 898-906.
163. Sun, J., W. Li, Y. Sun, D. Yu, X. Wen, H. Wang, J. Cui, G. Wang, A.R. Hoffman, and J.F. Hu, A novel antisense long noncoding RNA within the IGF1R gene locus is imprinted in hematopoietic malignancies. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(15): p. 9588-601.
164. Shi, Y., Y. Liu, J. Wang, D. Jie, T. Yun, W. Li, L. Yan, K. Wang, and J. Feng, Downregulated Long Noncoding RNA BANCR Promotes the Proliferation of Colorectal Cancer Cells via Downregulation of p21 Expression. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0122679.
165. Shi, Y., J. Li, Y. Liu, J. Ding, Y. Fan, Y. Tian, L. Wang, Y. Lian, K. Wang, and Y. Shu, The long noncoding RNA SPRY4-IT1 increases the proliferation of human breast cancer cells by upregulating ZNF703 expression. *Mol Cancer*, 2015. 14: p. 51.
166. Ricciuti, B., C. Mencaroni, L. Paglialunga, F. Paciullo, L. Crino, R. Chiari, and G. Metro, Long noncoding RNAs: new insights into non-small cell lung cancer biology, diagnosis and therapy. *Med Oncol*, 2016. 33(2): p. 18.
167. Jin, Y., S.J. Feng, S. Qiu, N. Shao, and J.H. Zheng, LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. 21(14): p. 3176-3184.
168. Ge, X., Y. Chen, X. Liao, D. Liu, F. Li, H. Ruan, and W. Jia, Overexpression of long noncoding RNA PCAT-1 is a novel biomarker of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Med Oncol*, 2013. 30(2): p. 588.
169. Fu, J. and Y. Cui, Long noncoding RNA ZEB1-AS1 expression predicts progression and poor prognosis of colorectal cancer. *Int J Biol Markers*, 2017. 32(4): p. e428-e433.

170. Pickard, M.R. and G.T. Williams, Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes (Basel)*, 2015. 6(3): p. 484-99.
171. Qiao, H.P., W.S. Gao, J.X. Huo, and Z.S. Yang, Long non-coding RNA GAS5 functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. 14(2): p. 1077-82.
172. Pickard, M.R., M. Mourtada-Maarabouni, and G.T. Williams, Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1832(10): p. 1613-23.
173. Yin, D., X. He, E. Zhang, R. Kong, W. De, and Z. Zhang, Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Med Oncol*, 2014. 31(11): p. 253.
174. Yang, Y., Z. Shen, Y. Yan, B. Wang, J. Zhang, C. Shen, T. Li, C. Ye, Z. Gao, G. Peng, Y. Ye, K. Jiang, and S. Wang, Long non-coding RNA GAS5 inhibits cell proliferation, induces G0/G1 arrest and apoptosis, and functions as a prognostic marker in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 2017. 13(5): p. 3151-3158.
175. Cheng, K., Z. Zhao, G. Wang, J. Wang, and W. Zhu, lncRNA GAS5 inhibits colorectal cancer cell proliferation via the miR1825p/FOXO3a axis. *Oncol Rep*, 2018. 40(4): p. 2371-2380.
176. Liu, L., T. Meng, X.H. Yang, P. Sayim, C. Lei, B. Jin, L. Ge, and H.J. Wang, Prognostic and predictive value of long non-coding RNA GAS5 and mircoRNA-221 in colorectal cancer and their effects on colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion. *Cancer Biomark*, 2018. 22(2): p. 283-299.
177. Li, J., Y. Wang, C.G. Zhang, H.J. Xiao, H.J. Xiao, J.M. Hu, J.M. Hou, and J.D. He, Effect of long non-coding RNA Gas5 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of colorectal cancer HT-29 cell line. *Cancer Cell Int*, 2018. 18: p. 4.
178. Song, J., H. Shu, L. Zhang, and J. Xiong, Long noncoding RNA GAS5 inhibits angiogenesis and metastasis of colorectal cancer through the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Cell Biochem*, 2019.
179. Lin, K., H. Jiang, L.L. Zhang, Y. Jiang, Y.X. Yang, G.D. Qiu, Y.Q. She, J.T. Zheng, C. Chen, L. Fang, and S.Y. Zhang, Down-Regulated LncRNA-HOTAIR

- Suppressed Colorectal Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Migration by Mediating p21. *Dig Dis Sci*, 2018. 63(9): p. 2320-2331.
180. Pan, S., Y. Liu, Q. Liu, Y. Xiao, B. Liu, X. Ren, X. Qi, H. Zhou, C. Zeng, and L. Jia, HOTAIR/miR-326/FUT6 axis facilitates colorectal cancer progression through regulating fucosylation of CD44 via PI3K/AKT/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019. 1866(5): p. 750-760.
 181. Xiao, Z., Z. Qu, Z. Chen, Z. Fang, K. Zhou, Z. Huang, X. Guo, and Y. Zhang, LncRNA HOTAIR is a Prognostic Biomarker for the Proliferation and Chemoresistance of Colorectal Cancer via MiR-203a-3p-Mediated Wnt/ss-Catenin Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2018. 46(3): p. 1275-1285.
 182. Yang, X.D., H.T. Xu, X.H. Xu, G. Ru, W. Liu, J.J. Zhu, Y.Y. Wu, K. Zhao, Y. Wu, C.G. Xing, S.Y. Zhang, J.P. Cao, and M. Li, Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and invasiveness and improves radiosensitivity in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2016. 35(1): p. 479-87.
 183. Tatangelo, F., A. Di Mauro, G. Scognamiglio, G. Aquino, A. Lettierio, P. Delrio, A. Avallone, M. Cantile, and G. Botti, Posterior HOX genes and HOTAIR expression in the proximal and distal colon cancer pathogenesis. *J Transl Med*, 2018. 16(1): p. 350.
 184. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Colon Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>, Erişim tarihi: 18 şubat 2020
 185. Irving, M.H. and B. Catchpole, ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ*, 1992. 304(6834): p. 1106-8.
 186. Hounnou, G., C. Destrieux, J. Desme, P. Bertrand, and S. Velut, Anatomical study of the length of the human intestine. *Surg Radiol Anat*, 2002. 24(5): p. 290-4.
 187. Medema, J.P., Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 2013. 15(4): p. 338-44.
 188. Nassar, D. and C. Blanpain, Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*, 2016. 11: p. 47-76.
 189. Cunningham, D., W. Atkin, H.J. Lenz, H.T. Lynch, B. Minsky, B. Nordlinger, and N. Starling, Colorectal cancer. *Lancet*, 2010. 375(9719): p. 1030-47.

190. Juhn, E. and A. Khachemoune, Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*, 2010. 11(2): p. 117-22.
191. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. 4: p. 22.
192. Moslein, G., S. Pistorius, H.D. Saeger, and H.K. Schackert, Preventive surgery for colon cancer in familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Langenbecks Arch Surg*, 2003. 388(1): p. 9-16.
193. Mankaney, G., C. Rouphael, and C.A. Burke, Serrated Polyposis Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020. 18(4): p. 777-779.
194. Bourdais, R., B. Rousseau, A. Pujals, H. Boussion, C. Joly, A. Guillemin, I. Baumgaertner, C. Neuzillet, and C. Tournigand, Polymerase proofreading domain mutations: New opportunities for immunotherapy in hypermutated colorectal cancer beyond MMR deficiency. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017. 113: p. 242-248.
195. Cancer Genome Atlas, N., Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 2012. 487(7407): p. 330-7.
196. Kuipers, E.J., W.M. Grady, D. Lieberman, T. Seufferlein, J.J. Sung, P.G. Boelens, C.J. van de Velde, and T. Watanabe, Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15065.
197. Miyoshi, N., H. Wagatsuma, S. Wakana, T. Shiroishi, M. Nomura, K. Aisaka, T. Kohda, M.A. Surani, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino, Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells*, 2000. 5(3): p. 211-20.
198. Zhang, X., K. Rice, Y. Wang, W. Chen, Y. Zhong, Y. Nakayama, Y. Zhou, and A. Klibanski, Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*, 2010. 151(3): p. 939-47.
199. da Rocha, S.T., C.A. Edwards, M. Ito, T. Ogata, and A.C. Ferguson-Smith, Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet*, 2008. 24(6): p. 306-16.

200. Benetatos, L., A. Dasoula, E. Hatzimichael, I. Georgiou, M. Syrrou, and K.L. Bourantas, Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2008. 8(3): p. 171-5.
201. Zhao, J., D. Dahle, Y. Zhou, X. Zhang, and A. Klibanski, Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(4): p. 2179-86.
202. Mondal, T., S. Subhash, R. Vaid, S. Enroth, S. Uday, B. Reinius, S. Mitra, A. Mohammed, A.R. James, E. Hoberg, A. Moustakas, U. Gyllensten, S.J. Jones, C.M. Gustafsson, A.H. Sims, F. Westerlund, E. Gorab, and C. Kanduri, MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7743.
203. Zhang, X., R. Gejman, A. Mahta, Y. Zhong, K.A. Rice, Y. Zhou, P. Cheunsuchon, D.N. Louis, and A. Klibanski, Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res*, 2010. 70(6): p. 2350-8.
204. Astuti, D., F. Latif, K. Wagner, D. Gentle, W.N. Cooper, D. Catchpoole, R. Grundy, A.C. Ferguson-Smith, and E.R. Maher, Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer*, 2005. 92(8): p. 1574-80.
205. Moradi, M.T., H. Fallahi, and Z. Rahimi, Interaction of long noncoding RNA MEG3 with miRNAs: A reciprocal regulation. *J Cell Biochem*, 2019. 120(3): p. 3339-3352.
206. Zhou, Y., Y. Zhong, Y. Wang, X. Zhang, D.L. Batista, R. Gejman, P.J. Ansell, J. Zhao, C. Weng, and A. Klibanski, Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*, 2007. 282(34): p. 24731-42.
207. Zhu, J., S. Liu, F. Ye, Y. Shen, Y. Tie, J. Zhu, L. Wei, Y. Jin, H. Fu, Y. Wu, and X. Zheng, Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with p53 Protein and Regulates Partial p53 Target Genes in Hepatoma Cells. *PLoS One*, 2015. 10(10): p. e0139790.
208. Shihabudeen Haider Ali, M.S., X. Cheng, M. Moran, S. Haemmig, M.J. Naldrett, S. Alvarez, M.W. Feinberg, and X. Sun, LncRNA Meg3 protects endothelial

- function by regulating the DNA damage response. *Nucleic Acids Res*, 2019. 47(3): p. 1505-1522.
209. Zhang, X., Y. Zhou, and A. Klibanski, Isolation and characterization of novel pituitary tumor related genes: a cDNA representational difference approach. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 326(1-2): p. 40-7.
 210. Kruer, T.L., S.M. Dougherty, L. Reynolds, E. Long, T. de Silva, W.W. Lockwood, and B.F. Clem, Expression of the lncRNA Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Contributes to the Control of Lung Cancer Cell Proliferation by the Rb Pathway. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. e0166363.
 211. Benetatos, L., G. Vartholomatos, and E. Hatzimichael, MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer*, 2011. 129(4): p. 773-9.
 212. Jia, L.F., S.B. Wei, Y.H. Gan, Y. Guo, K. Gong, K. Mitchelson, J. Cheng, and G.Y. Yu, Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2014. 135(10): p. 2282-93.
 213. Sun, M., R. Xia, F. Jin, T. Xu, Z. Liu, W. De, and X. Liu, Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumour Biol*, 2014. 35(2): p. 1065-73.
 214. Wang, Y. and D. Kong, Knockdown of lncRNA MEG3 inhibits viability, migration, and invasion and promotes apoptosis by sponging miR-127 in osteosarcoma cell. *J Cell Biochem*, 2018. 119(1): p. 669-679.
 215. Sahin, Y., Z. Altan, K. Arman, E. Bozgeyik, M. Koruk Ozer, and A. Arslan, Inhibition of miR-664a interferes with the migration of osteosarcoma cells via modulation of MEG3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. 490(3): p. 1100-1105.
 216. Tian, Z.Z., X.J. Guo, Y.M. Zhao, and Y. Fang, Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(11): p. 15138-42.
 217. Zhang, S.Z., L. Cai, and B. Li, MEG3 long non-coding RNA prevents cell growth and metastasis of osteosarcoma. *Bratisl Lek Listy*, 2017. 118(10): p. 632-636.

218. Liu, H., D. Ye, A. Chen, D. Tan, W. Zhang, W. Jiang, M. Wang, and X. Zhang, A pilot study of new promising non-coding RNA diagnostic biomarkers for early-stage colorectal cancers. *Clin Chem Lab Med*, 2019. 57(7): p. 1073-1083.
219. Feng, S.Q., X.Y. Zhang, H.T. Fan, Q.J. Sun, and M. Zhang, Up-regulation of LncRNA MEG3 inhibits cell migration and invasion and enhances cisplatin chemosensitivity in bladder cancer cells. *Neoplasma*, 2018. 65(6): p. 925-932.
220. Zhang, Y., J. Wu, H. Jing, G. Huang, Z. Sun, and S. Xu, Long noncoding RNA MEG3 inhibits breast cancer growth via upregulating endoplasmic reticulum stress and activating NF-kappaB and p53. *J Cell Biochem*, 2019. 120(4): p. 6789-6797.
221. Zhu, Y., P. Chen, Y. Gao, N. Ta, Y. Zhang, J. Cai, Y. Zhao, S. Liu, and J. Zheng, MEG3 Activated by Vitamin D Inhibits Colorectal Cancer Cells Proliferation and Migration via Regulating Clusterin. *EBioMedicine*, 2018. 30: p. 148-157.
222. Zhang, Y.Y. and H.M. Feng, MEG3 Suppresses Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells Growth and Metastasis by Down-Regulation of Mir-183. *Cell Physiol Biochem*, 2017. 44(1): p. 345-356.
223. Chen, X. and J. Qu, Long non-coding RNA MEG3 suppresses survival, migration, and invasion of cervical cancer. *Onco Targets Ther*, 2018. 11: p. 4999-5007.
224. Luo, G., M. Wang, X. Wu, D. Tao, X. Xiao, L. Wang, F. Min, F. Zeng, and G. Jiang, Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 2015. 37(6): p. 2209-20.
225. Gao, Y. and X. Lu, Decreased expression of MEG3 contributes to retinoblastoma progression and affects retinoblastoma cell growth by regulating the activity of Wnt/beta-catenin pathway. *Tumour Biol*, 2016. 37(2): p. 1461-9.
226. Xu, D.H., G.N. Chi, C.H. Zhao, and D.Y. Li, Long noncoding RNA MEG3 inhibits proliferation and migration but induces autophagy by regulation of Sirt7 and PI3K/AKT/mTOR pathway in glioma cells. *J Cell Biochem*, 2018.
227. Li, Z.Y., L. Yang, X.J. Liu, X.Z. Wang, Y.X. Pan, and J.M. Luo, The Long Noncoding RNA MEG3 and its Target miR-147 Regulate JAK/STAT Pathway in Advanced Chronic Myeloid Leukemia. *EBioMedicine*, 2018. 34: p. 61-75.

228. Chen, C.L., Y.W. Tseng, J.C. Wu, G.Y. Chen, K.C. Lin, S.M. Hwang, and Y.C. Hu, Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and MicroRNA regulation. *Biomaterials*, 2015. 44: p. 71-81.
229. Liu, Y., J. Zhao, W. Zhang, J. Gan, C. Hu, G. Huang, and Y. Zhang, lncRNA GAS5 enhances G1 cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 10159.
230. Raveh, E., I.J. Matouk, M. Gilon, and A. Hochberg, The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. *Mol Cancer*, 2015. 14: p. 184.
231. Roberts, T.C., K.V. Morris, and M.S. Weinberg, Perspectives on the mechanism of transcriptional regulation by long non-coding RNAs. *Epigenetics*, 2014. 9(1): p. 13-20.
232. Wang, C., G. Yan, Y. Zhang, X. Jia, and P. Bu, Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1. *Neoplasma*, 2015. 62(4): p. 541-9.
233. Yang, N., Y. Fu, H. Zhang, H. Sima, N. Zhu, and G. Yang, LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2015. 6(29): p. 28151-63.
234. Malek, E., S. Jagannathan, and J.J. Driscoll, Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget*, 2014. 5(18): p. 8027-38.
235. Pan, J.J., X.J. Xie, X. Li, and W. Chen, Long Non-coding RNAs and Drug Resistance. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. 16(18): p. 8067-73.
236. Xia, Y., Z. He, B. Liu, P. Wang, and Y. Chen, Downregulation of Meg3 enhances cisplatin resistance of lung cancer cells through activation of the WNT/beta-catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*, 2015. 12(3): p. 4530-4537.
237. Cui, X., X. Jing, C. Long, J. Tian, and J. Zhu, Long noncoding RNA MEG3, a potential novel biomarker to predict the clinical outcome of cancer patients: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2017. 8(12): p. 19049-19056.

238. Fatima, R., V.S. Akhade, D. Pal, and S.M. Rao, Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*, 2015. 3: p. 5.
239. Meseure, D., K. Drak Alsibai, A. Nicolas, I. Bieche, and A. Morillon, Long Noncoding RNAs as New Architects in Cancer Epigenetics, Prognostic Biomarkers, and Potential Therapeutic Targets. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 320214.
240. Zhang, J., Z. Lin, Y. Gao, and T. Yao, Downregulation of long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promoter hypermethylation in cervical cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017. 36(1): p. 5.
241. Greife, A., J. Knievel, T. Ribarska, G. Niegisch, and W.A. Schulz, Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma. *Clin Epigenetics*, 2014. 6(1): p. 29.
242. Xiu, Y.L., K.X. Sun, X. Chen, S. Chen, Y. Zhao, Q.G. Guo, and Z.H. Zong, Upregulation of the lncRNA Meg3 induces autophagy to inhibit tumorigenesis and progression of epithelial ovarian carcinoma by regulating activity of ATG3. *Oncotarget*, 2017. 8(19): p. 31714-31725.
243. Zhang, C.Y., M.S. Yu, X. Li, Z. Zhang, C.R. Han, and B. Yan, Overexpression of long non-coding RNA MEG3 suppresses breast cancer cell proliferation, invasion, and angiogenesis through AKT pathway. *Tumour Biol*, 2017. 39(6): p. 1010428317701311.
244. Li, Z., C. Li, C. Liu, S. Yu, and Y. Zhang, Expression of the long non-coding RNAs MEG3, HOTAIR, and MALAT-1 in non-functioning pituitary adenomas and their relationship to tumor behavior. *Pituitary*, 2015. 18(1): p. 42-7.
245. Shiah, S.G., J.R. Hsiao, W.M. Chang, Y.W. Chen, Y.T. Jin, T.Y. Wong, J.S. Huang, S.T. Tsai, Y.M. Hsu, S.T. Chou, Y.C. Yen, S.S. Jiang, Y.S. Shieh, I.S. Chang, M. Hsiao, and J.Y. Chang, Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. *Cancer Res*, 2014. 74(24): p. 7560-72.
246. Gordon, F.E., C.L. Nutt, P. Cheunsuchon, Y. Nakayama, K.A. Provencher, K.A. Rice, Y. Zhou, X. Zhang, and A. Klibanski, Increased expression of angiogenic

- genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology*, 2010. 151(6): p. 2443-52.
247. Takahashi, N., A. Okamoto, R. Kobayashi, M. Shirai, Y. Obata, H. Ogawa, Y. Sotomaru, and T. Kono, Deletion of Gtl2, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(10): p. 1879-88.
248. Sauvageau, M., L.A. Goff, S. Lodato, B. Bonev, A.F. Groff, C. Gerhardinger, D.B. Sanchez-Gomez, E. Hacisuleyman, E. Li, M. Spence, S.C. Liapis, W. Mallard, M. Morse, M.R. Swerdel, M.F. D'Ecclessis, J.C. Moore, V. Lai, G. Gong, G.D. Yancopoulos, D. Frendewey, M. Kellis, R.P. Hart, D.M. Valenzuela, P. Arlotta, and J.L. Rinn, Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife*, 2013. 2: p. e01749.
249. Addgene Deposit Plasmids, <https://www.addgene.org/>. Erişim tarihi: 12 Eylöl 2019.
250. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer Blast Tool, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Erişim tarihi: 20 Ağustos 2019.
251. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams, Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996. 6(10): p. 986-94.
252. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
253. Stockert, J.C., R.W. Horobin, L.L. Colombo, and A. Blazquez-Castro, Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, 2018. 120(3): p. 159-167.
254. Franken, N.A., H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 2006. 1(5): p. 2315-9.
255. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. 11: p. 127-52.

256. Justus, C.R., N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, and L.V. Yang, In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*, 2014(88).
257. Zhang, Y., Y. Feng, C.R. Justus, W. Jiang, Z. Li, J.Q. Lu, R.S. Brock, M.K. McPeck, D.A. Weidner, L.V. Yang, and X.H. Hu, Comparative study of 3D morphology and functions on genetically engineered mouse melanoma cells. *Integr Biol (Camb)*, 2012. 4(11): p. 1428-36.
258. Reactome database. 2019.
259. Heat map analysis, <https://www.displayr.com/>, Erişim tarihi: 30 Mayıs 2020.
260. Bahrami, A., A. Hesari, M. Khazaei, S.M. Hassanian, G.A. Ferns, and A. Avan, The therapeutic potential of targeting the BRAF mutation in patients with colorectal cancer. *J Cell Physiol*, 2018. 233(3): p. 2162-2169.
261. Bahrami, A., M. Khazaei, S.M. Hassanian, S. ShahidSales, M. Joudi-Mashhad, M. Maftouh, M.H. Jazayeri, M.R. Parizade, G.A. Ferns, and A. Avan, Targeting the tumor microenvironment as a potential therapeutic approach in colorectal cancer: Rational and progress. *J Cell Physiol*, 2018. 233(4): p. 2928-2936.
262. Binabaj, M.M., A. Bahrami, S. ShahidSales, M. Joodi, M. Joudi Mashhad, S.M. Hassanian, K. Anvari, and A. Avan, The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol*, 2018. 233(1): p. 378-386.
263. Bahrami, A., M. Khazaei, M. Hasanzadeh, S. ShahidSales, M. Joudi Mashhad, M. Farazestanian, H.R. Sadeghnia, M. Rezayi, M. Maftouh, S.M. Hassanian, and A. Avan, Therapeutic Potential of Targeting PI3K/AKT Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *J Cell Biochem*, 2018. 119(3): p. 2460-2469.
264. Sahnane, N., F. Magnoli, B. Bernasconi, M.G. Tibiletti, C. Romualdi, M. Pedroni, M. Ponz de Leon, G. Magnani, L. Reggiani-Bonetti, L. Bertario, S. Signoroni, C. Capella, F. Sessa, D. Furlan, and Aifeg, Aberrant DNA methylation profiles of inherited and sporadic colorectal cancer. *Clin Epigenetics*, 2015. 7: p. 131.
265. Ng, J.M. and J. Yu, Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(2): p. 2472-96.

266. Zhao, W., M. Song, J. Zhang, M. Kuerban, and H. Wang, Combined identification of long non-coding RNA CCAT1 and HOTAIR in serum as an effective screening for colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(11): p. 14131-40.
267. Tong, Y.S., X.W. Wang, X.L. Zhou, Z.H. Liu, T.X. Yang, W.H. Shi, H.W. Xie, J. Lv, Q.Q. Wu, and X.F. Cao, Identification of the long non-coding RNA POU3F3 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2015. 14: p. 3.
268. van Werven, F.J., G. Neuert, N. Hendrick, A. Lardenois, S. Buratowski, A. van Oudenaarden, M. Primig, and A. Amon, Transcription of two long noncoding RNAs mediates mating-type control of gametogenesis in budding yeast. *Cell*, 2012. 150(6): p. 1170-81.
269. Fan, Y., B. Shen, M. Tan, X. Mu, Y. Qin, F. Zhang, and Y. Liu, TGF-beta-induced upregulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(6): p. 1531-41.
270. Gupta, R.A., N. Shah, K.C. Wang, J. Kim, H.M. Horlings, D.J. Wong, M.C. Tsai, T. Hung, P. Argani, J.L. Rinn, Y. Wang, P. Brzoska, B. Kong, R. Li, R.B. West, M.J. van de Vijver, S. Sukumar, and H.Y. Chang, Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 2010. 464(7291): p. 1071-6.
271. Kotake, Y., T. Nakagawa, K. Kitagawa, S. Suzuki, N. Liu, M. Kitagawa, and Y. Xiong, Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*, 2011. 30(16): p. 1956-62.
272. Prensner, J.R., W. Chen, M.K. Iyer, Q. Cao, T. Ma, S. Han, A. Sahu, R. Malik, K. Wilder-Romans, N. Navone, C.J. Logothetis, J.C. Araujo, L.L. Pisters, A.K. Tewari, C.E. Canman, K.E. Knudsen, N. Kitabayashi, M.A. Rubin, F. Demichelis, T.S. Lawrence, A.M. Chinnaiyan, and F.Y. Feng, PCAT-1, a long noncoding RNA, regulates BRCA2 and controls homologous recombination in cancer. *Cancer Res*, 2014. 74(6): p. 1651-60.
273. Khaitan, D., M.E. Dinger, J. Mazar, J. Crawford, M.A. Smith, J.S. Mattick, and R.J. Perera, The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res*, 2011. 71(11): p. 3852-62.

274. Chen, S., D.D. Wu, X.B. Sang, L.L. Wang, Z.H. Zong, K.X. Sun, B.L. Liu, and Y. Zhao, The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian carcinoma. *Cell Death Dis*, 2017. 8(10): p. e3118.
275. Wang, J., K. Yang, W. Yuan, and Z. Gao, Determination of Serum Exosomal H19 as a Noninvasive Biomarker for Bladder Cancer Diagnosis and Prognosis. *Med Sci Monit*, 2018. 24: p. 9307-9316.
276. Zhang, S., L. Du, L. Wang, X. Jiang, Y. Zhan, J. Li, K. Yan, W. Duan, Y. Zhao, L. Wang, Y. Wang, Y. Shi, and C. Wang, Evaluation of serum exosomal LncRNA-based biomarker panel for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *J Cell Mol Med*, 2019. 23(2): p. 1396-1405.
277. Geng, Y.J., S.L. Xie, Q. Li, J. Ma, and G.Y. Wang, Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J Int Med Res*, 2011. 39(6): p. 2119-28.
278. Kogo, R., T. Shimamura, K. Mimori, K. Kawahara, S. Imoto, T. Sudo, F. Tanaka, K. Shibata, A. Suzuki, S. Komune, S. Miyano, and M. Mori, Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res*, 2011. 71(20): p. 6320-6.
279. Niinuma, T., H. Suzuki, M. Nojima, K. Noshio, H. Yamamoto, H. Takamaru, E. Yamamoto, R. Maruyama, T. Nobuoka, Y. Miyazaki, T. Nishida, T. Bamba, T. Kanda, Y. Ajioka, T. Taguchi, S. Okahara, H. Takahashi, Y. Nishida, M. Hosokawa, T. Hasegawa, T. Tokino, K. Hirata, K. Imai, M. Toyota, and Y. Shinomura, Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*, 2012. 72(5): p. 1126-36.
280. Ji, Q., L. Zhang, X. Liu, L. Zhou, W. Wang, Z. Han, H. Sui, Y. Tang, Y. Wang, N. Liu, J. Ren, F. Hou, and Q. Li, Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex. *Br J Cancer*, 2014. 111(4): p. 736-48.
281. Han, Y., Y.N. Yang, H.H. Yuan, T.T. Zhang, H. Sui, X.L. Wei, L. Liu, P. Huang, W.J. Zhang, and Y.X. Bai, UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in

- colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. *Pathology*, 2014. 46(5): p. 396-401.
282. Guo, Q., Y. Zhao, J. Chen, J. Hu, S. Wang, D. Zhang, and Y. Sun, BRAF-activated long non-coding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett*, 2014. 8(2): p. 869-875.
 283. Reis, E.M. and S. Verjovski-Almeida, Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics. *Front Genet*, 2012. 3: p. 32.
 284. Wei, G.H. and X. Wang, lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. 21(17): p. 3850-3856.
 285. Zhang, J., T. Yao, Y. Wang, J. Yu, Y. Liu, and Z. Lin, Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21. *Cancer Biol Ther*, 2016. 17(1): p. 104-13.
 286. Sun, L., Y. Li, and B. Yang, Downregulated long non-coding RNA MEG3 in breast cancer regulates proliferation, migration and invasion by depending on p53's transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 478(1): p. 323-329.
 287. He, Y., Y. Luo, B. Liang, L. Ye, G. Lu, and W. He, Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis. *Oncotarget*, 2017. 8(42): p. 73282-73295.
 288. Zhuo, H., J. Tang, Z. Lin, R. Jiang, X. Zhang, J. Ji, P. Wang, and B. Sun, The aberrant expression of MEG3 regulated by UHRF1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*, 2016. 55(2): p. 209-19.
 289. Wu, J.L., F.M. Meng, and H.J. Li, High expression of lncRNA MEG3 participates in non-small cell lung cancer by regulating microRNA-7-5p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018. 22(18): p. 5938-5945.
 290. Liu, G., X. Zhao, J. Zhou, X. Cheng, Z. Ye, and Z. Ji, Long non-coding RNA MEG3 suppresses the development of bladder urothelial carcinoma by regulating miR-96 and TPM1. *Cancer Biol Ther*, 2018. 19(11): p. 1039-1056.
 291. Jin, L., Q. Cai, S. Wang, S. Wang, T. Mondal, J. Wang, and Z. Quan, Long noncoding RNA MEG3 regulates LATS2 by promoting the ubiquitination of

- EZH2 and inhibits proliferation and invasion in gallbladder cancer. *Cell Death Dis*, 2018. 9(10): p. 1017.
292. Wu, M., Y. Huang, T. Chen, W. Wang, S. Yang, Z. Ye, and X. Xi, LncRNA MEG3 inhibits the progression of prostate cancer by modulating miR-9-5p/QKI-5 axis. *J Cell Mol Med*, 2019. 23(1): p. 29-38.
 293. Schlecht, N.F., M. Ben-Dayan, N. Anayannis, R.A. Lleras, C. Thomas, Y. Wang, R.V. Smith, R.D. Burk, T.M. Harris, G. Childs, T.J. Ow, M.B. Prystowsky, and T.J. Belbin, Epigenetic changes in the CDKN2A locus are associated with differential expression of P16INK4A and P14ARF in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med*, 2015. 4(3): p. 342-53.
 294. Jang, S.J., [Cell cycle regulators as prognostic predictor of colorectal cancers]. *Korean J Gastroenterol*, 2004. 44(6): p. 346-9.
 295. Sharpless, N.E. and C.J. Sherr, Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, 2015. 15(7): p. 397-408.
 296. Vivo, M., M. Matarese, M. Sepe, R. Di Martino, L. Festa, V. Calabro, G. La Mantia, and A. Pollice, MDM2-mediated degradation of p14ARF: a novel mechanism to control ARF levels in cancer cells. *PLoS One*, 2015. 10(2): p. e0117252.
 297. Tsujie, M., H. Yamamoto, N. Tomita, Y. Sugita, M. Ohue, I. Sakita, Y. Tamaki, M. Sekimoto, Y. Doki, M. Inoue, N. Matsuura, T. Monden, H. Shiozaki, and M. Monden, Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology*, 2000. 58(2): p. 126-36.
 298. Kim, M.S., J. Lee, and D. Sidransky, DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(1): p. 181-206.
 299. Lee, S., K.S. Hwang, H.J. Lee, J.S. Kim, and G.H. Kang, Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest*, 2004. 84(7): p. 884-93.
 300. Minoo, P., K. Baker, R. Goswami, G. Chong, W.D. Foulkes, A.R. Ruzskiewicz, M. Barker, D. Buchanan, J. Young, and J.R. Jass, Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut*, 2006. 55(10): p. 1467-74.

301. Krakowczyk, L., J.K. Strzelczyk, B. Adamek, M. Zalewska-Ziob, J. Arendt, S. Poltorak, B. Maciejewski, and A. Wiczowski, Methylation of the MGMT and p16 genes in sporadic colorectal carcinoma and corresponding normal colonic mucosa. *Med Sci Monit*, 2008. 14(10): p. BR219-25.
302. Mitomi, H., N. Fukui, N. Tanaka, H. Kanazawa, T. Saito, T. Matsuoka, and T. Yao, Aberrant p16((INK4a)) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. 136(2): p. 323-31.
303. Halby, L., Y. Menon, E. Rilova, D. Pechalrieu, V. Masson, C. Faux, M.A. Bouhrel, M.H. David-Cordonnier, N. Novosad, Y. Aussagues, A. Samson, L. Lacroix, F. Ausseil, L. Fleury, D. Guianvarc'h, C. Ferroud, and P.B. Arimondo, Rational Design of Bisubstrate-Type Analogues as Inhibitors of DNA Methyltransferases in Cancer Cells. *J Med Chem*, 2017. 60(11): p. 4665-4679.
304. Furukawa, T., N. Kanai, H.O. Shiwaku, N. Soga, A. Uehara, and A. Horii, AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer. *Oncogene*, 2006. 25(35): p. 4831-9.
305. Shan, B., R. Zhao, J. Zhou, M. Zhang, X. Qi, T. Wang, J. Gong, Y. Wu, Y. Zhu, W. Yang, Y. Zhang, G. Wang, and X. Li, AURKA Increase the Chemosensitivity of Colon Cancer Cells to Oxaliplatin by Inhibiting the TP53-Mediated DNA Damage Response Genes. *Biomed Res Int*, 2020. 2020: p. 8916729.
306. Liu, W., C. Yin, and Y. Liu, Circular RNA circ_0091579 Promotes Hepatocellular Carcinoma Proliferation, Migration, Invasion, and Glycolysis Through miR-490-5p/CASC3 Axis. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020.
307. Xu, L., W. Dai, J. Li, L. He, F. Wang, Y. Xia, K. Chen, S. Li, T. Liu, J. Lu, Y. Zhou, Y. Wang, and C. Guo, Methylation-regulated miR-124-1 suppresses tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting CASC3. *Oncotarget*, 2016. 7(18): p. 26027-41.
308. Martin-Ezquerria, G., R. Salgado, A. Toll, M. Gilaberte, T. Baro, F. Alameda Quittlet, M. Yebenes, F. Sole, M. Garcia-Muret, B. Espinet, and R.M. Pujol, Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCDN1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumours. *Br J Dermatol*, 2010. 163(5): p. 1028-35.

309. Sherr, C.J., Cancer cell cycles. *Science*, 1996. 274(5293): p. 1672-7.
310. Hernandez-Monge, J., A.B. Rousset-Roman, I. Medina-Medina, and V. Olivares-Illana, Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB. *Genes Cancer*, 2016. 7(9-10): p. 278-287.
311. Pierce, A.M., R. Schneider-Broussard, I.B. Gimenez-Conti, J.L. Russell, C.J. Conti, and D.G. Johnson, E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(9): p. 6408-14.
312. Zwang, Y., A. Sas-Chen, Y. Drier, T. Shay, R. Avraham, M. Lauriola, E. Shema, E. Lidor-Nili, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, Y. Lu, G.B. Mills, G. Rechavi, M. Oren, E. Domany, and Y. Yarden, Two phases of mitogenic signaling unveil roles for p53 and EGR1 in elimination of inconsistent growth signals. *Mol Cell*, 2011. 42(4): p. 524-35.
313. Zha, F., X. Qu, B. Tang, J. Li, Y. Wang, P. Zheng, T. Ji, C. Zhu, and S. Bai, Long non-coding RNA MEG3 promotes fibrosis and inflammatory response in diabetic nephropathy via miR-181a/Egr-1/TLR4 axis. *Aging (Albany NY)*, 2019. 11(11): p. 3716-3730.
314. Zhu, W., J.L. Long, Y.T. Yin, H.N. Guo, E.P. Jiang, Y.L. Li, Q.L. He, C. Zeng, and Y.Q. Sun, MicroRNA-34a suppresses the invasion and migration of colorectal cancer cells by enhancing EGR1 and inhibiting vimentin. *Exp Ther Med*, 2019. 18(4): p. 2459-2466.
315. Lin, T.P., J. Li, Q. Li, X. Li, C. Liu, N. Zeng, J.M. Huang, G.C. Chu, C.H. Lin, H.E. Zhau, L.W.K. Chung, B.J. Wu, and J.C. Shih, R1 Regulates Prostate Tumor Growth and Progression By Transcriptional Suppression of the E3 Ligase HUWE1 to Stabilize c-Myc. *Mol Cancer Res*, 2018. 16(12): p. 1940-1951.
316. Chen, D., N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin, and W. Gu, ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell*, 2005. 121(7): p. 1071-83.
317. Jang, E.R., P. Shi, J. Bryant, J. Chen, V. Dukhande, M.S. Gentry, H. Jang, M. Jeoung, and E. Galperin, HUWE1 is a molecular link controlling RAF-1 activity supported by the Shoc2 scaffold. *Mol Cell Biol*, 2014. 34(19): p. 3579-93.

318. Kaypee, S., S.A. Sahadevan, S. Patil, P. Ghosh, N.S. Roy, S. Roy, and T.K. Kundu, Mutant and Wild-Type Tumor Suppressor p53 Induces p300 Autoacetylation. *iScience*, 2018. 4: p. 260-272.
319. Imajo, M., Y. Tsuchiya, and E. Nishida, Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life*, 2006. 58(5-6): p. 312-7.
320. Slattery, M.L., A. Lundgreen, and R.K. Wolff, MAP kinase genes and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis*, 2012. 33(12): p. 2398-408.
321. Hou, X.F., L.P. Xu, H.Y. Song, S. Li, C. Wu, and J.F. Wang, ECRG2 enhances the anti-cancer effects of cisplatin in cisplatin-resistant esophageal cancer cells via upregulation of p53 and downregulation of PCNA. *World J Gastroenterol*, 2017. 23(10): p. 1796-1803.
322. Peng, J. and A. Gassama-Diagne, Apicobasal polarity and Ras/Raf/MEK/ERK signalling in cancer. *Gut*, 2017. 66(6): p. 986-987.
323. Chen, T., J. Li, M. Xu, Q. Zhao, Y. Hou, L. Yao, Y. Zhong, P.C. Chou, W. Zhang, P. Zhou, and Y. Jiang, PKCepsilon phosphorylates MIIP and promotes colorectal cancer metastasis through inhibition of RelA deacetylation. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 939.
324. Luo, Z., Z.J. Yi, Z.L. Ou, T. Han, T. Wan, Y.C. Tang, Z.C. Wang, and F.Z. Huang, RELA/NEAT1/miR-302a-3p/RELA feedback loop modulates pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation and migration. *J Cell Physiol*, 2019. 234(4): p. 3583-3597.
325. Wang, X., Z. Zhou, T. Zhang, M. Wang, R. Xu, S. Qin, and S. Zhang, Overexpression of miR-664 is associated with poor overall survival and accelerates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: p. 2373-2381.
326. Beishline, K. and J. Azizkhan-Clifford, Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J*, 2015. 282(2): p. 224-58.
327. Wang, X.X., G.C. Guo, X.K. Qian, D.W. Dou, Z. Zhang, X.D. Xu, X. Duan, and X.H. Pei, miR-506 attenuates methylation of lncRNA MEG3 to inhibit migration and invasion of breast cancer cell lines via targeting SP1 and SP3. *Cancer Cell Int*, 2018. 18: p. 171.

328. Staff, P.O., Correction: E2F1 and TFDP1 Regulate PITX1 Expression in Normal and Osteoarthritic Articular Chondrocytes. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. e0167530.
329. Kim, N. and S. Jinks-Robertson, The Top1 paradox: Friend and foe of the eukaryotic genome. *DNA Repair (Amst)*, 2017. 56: p. 33-41.
330. Romer, M.U., S.B. Nygard, I.J. Christensen, S.L. Nielsen, K.V. Nielsen, S. Muller, D.H. Smith, B. Vainer, H.J. Nielsen, and N. Brunner, Topoisomerase 1(TOP1) gene copy number in stage III colorectal cancer patients and its relation to prognosis. *Mol Oncol*, 2013. 7(1): p. 101-11.
331. Giles, R.H., M.P. Lolkema, C.M. Snijckers, M. Belderbos, P. van der Groep, D.A. Mans, M. van Beest, M. van Noort, R. Goldschmeding, P.J. van Diest, H. Clevers, and E.E. Voest, Interplay between VHL/HIF1alpha and Wnt/beta-catenin pathways during colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 2006. 25(21): p. 3065-70.
332. Jin, F., R. Yang, Y. Wei, D. Wang, Y. Zhu, X. Wang, Y. Lu, Y. Wang, K. Zen, and L. Li, HIF-1alpha-induced miR-23a approximately 27a approximately 24 cluster promotes colorectal cancer progression via reprogramming metabolism. *Cancer Lett*, 2019. 440-441: p. 211-222.

ÖZGEÇMİŞ

Zekiye ALTAN, 1992 yılında Gaziantep'in Şehitkamil ilçesinde doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini 1998-2010 yılları arasında Gaziantep'te tamamlamıştır. Lisans öğrenimini 2010-2014 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde tamamlamıştır. Yüksek lisans öğrenimini 2014-2016 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında tamamlamıştır. 2016 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümünde doktora öğrenimine başlamıştır. Doktora öğrenimi TÜBİTAK BİDEB 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Bursu ile desteklenmektedir. İngilizce bilmektedir.

