



T. C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **LNCRNA ERICD’NİN DÜZENLENMESİNDE ARID3A’NIN ROLÜ**

**Mohammad Kaiffee ARMAN**

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

İKİNCİ TEZ DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

Gaziantep  
2017

## 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.

21.03.2017

Mohammad Kaiffee ARMAN

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik hayatımın gelişmesinde büyük katkılar sağlayan kıymetli ve değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a,

Tezi zamanında bitirmem için yaptığı yardımlardan dolayı değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Sibel Oğuzkan BALCI'ya,

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışma sürecinde bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK ve ikinci tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR'a,

Deney sürecinin her aşamasındaki tavsiyeleriyle yardımlarını esirgemeyen Tokyo Medikal ve Dental Üniversitesinde görevli Doç. Dr. Masa Aki İKEDA'ya,

Tez sürecim ve hayatım boyunca her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli eşim Hatice Hamide ARMAN'a ve bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten değerli aileme,

Deney sürecinin her aşamada yardımlarını ve tezimin tamamlanmasındaki çok önemli katkılarından dolayı İbrahim BOZGEYİK ve Esra BOZGEYİK'e,

Laboratuvarda birlikte çalıştığımız arkadaşlarım Yunus Şahin ve Zekiye Altan başta olmak üzere, Hasan Dağlı, Meltem Özer, Rozgar Abdullah, Naser Gilani ve bölümdeki diğer bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yapmış olduğum doktora tez çalışmamı, 15 Temmuz Demokrasi Mücadelesinde ve Kurtuluş Savaşı'nda şehit ve gazi olan vatandaşlarımıza ve yakınlarına armağan ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Simge ve Kısaltmalar .....                                                        | v  |
| Şekil Listesi .....                                                               | vi |
| Tablo Listesi .....                                                               | ix |
| Özet .....                                                                        | 1  |
| Abstract .....                                                                    | 2  |
| 1. Giriş ve Amaç .....                                                            | 3  |
| 2. Genel Bilgiler .....                                                           | 6  |
| 2.1. Kanser .....                                                                 | 6  |
| 2.2. Kanserin ayırt edici özellikleri .....                                       | 6  |
| 2.2.1. Çoğalmayı desteklemek için büyüme faktörlerine bağımliliğin azalması ..... | 7  |
| 2.2.2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış .....                                       | 7  |
| 2.2.3. Hücre ölümüne karşı direnç .....                                           | 8  |
| 2.2.4. Ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama .....                                     | 10 |
| 2.2.5. İnvazyon ve metastazın aktive edilmesi .....                               | 11 |
| 2.2.5.1. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) .....                                   | 11 |
| 2.2.6. Anjiyogenezin uyarılması .....                                             | 12 |
| 2.3. Kodlanmayan RNA'lar .....                                                    | 13 |
| 2.4. Kodlanmayan RNA dünyası .....                                                | 13 |
| 2.5. NcRNA'ların sınıflandırılması .....                                          | 14 |
| 2.5.1. Kısa kodlamayan RNA'lar .....                                              | 14 |
| 2.5.1.1. Mikro RNA'lar .....                                                      | 16 |
| 2.5.1.2. Küçük müdahaleci RNA (siRNA)'lar .....                                   | 22 |
| 2.5.1.3. Piwi proteinleri ile etkileşimli RNA (piRNA) .....                       | 23 |
| 2.5.1.4. Küçük çekirdekçik RNA'lar (snoRNAs) .....                                | 24 |
| 2.5.1.5. Özendirici bölge ilişkili RNA'lar .....                                  | 24 |
| 2.5.2. Uzun kodlanmayan RNA'lar .....                                             | 25 |
| 2.5.2.1. LncRNA'ların işlevleri .....                                             | 26 |
| 2.5.2.2. İşleyiş mekanizmaları .....                                              | 27 |
| 2.5.2.3. LncRNA mekanizmaları .....                                               | 29 |
| 2.6. LncRNA'ların E2F'ler tarafından düzenlenmesi .....                           | 31 |
| 2.7. LncRNA'ların kanserdeki rolleri .....                                        | 32 |
| 2.8. Osteosarkomda rol oynayan lncRNA'lar .....                                   | 34 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.9. Diğer lncRNA çeşitleri .....                                           | 36 |
| 2.9.1. Uzun intergenik kodlamayan RNA'lar .....                             | 36 |
| 2.9.2. Doğal antisens transkriptler (NAT'lar) .....                         | 37 |
| 2.9.3. Arttırıcı benzeri lncRNA'lar (eRNA'lar) .....                        | 37 |
| 2.9.4. Aşırı korunmuş bölgelerden transkripte edilen RNA'lar (UCRs) .....   | 38 |
| 2.9.5. Özendirici bölge ilişkili lncRNA'lar .....                           | 38 |
| 2.10. Bükülmüş bir 8q24 genomik bölgesi .....                               | 39 |
| 2.11. ARID Ailesi .....                                                     | 39 |
| 2.11.1. ARID1A ve ARID1B .....                                              | 41 |
| 2.11.2. ARID2 .....                                                         | 42 |
| 2.11.3. ARID3A, ARID3B ve ARID3C .....                                      | 42 |
| 2.11.3.1. ARID3A .....                                                      | 43 |
| 2.11.4. ARID4A and ARID4B .....                                             | 43 |
| 2.11.5. ARID5A ve ARID5B .....                                              | 44 |
| 2.11.6. JARID1A, JARID1B, JARID1C ve JARID1D .....                          | 44 |
| 2.11.7. JARID2 .....                                                        | 44 |
| 3. Gereç ve Yöntem .....                                                    | 45 |
| 3.1. Hücre hatları ve hücre kültürü .....                                   | 45 |
| 3.2. Hücre hatlarından RNA eldesi .....                                     | 45 |
| 3.3. Tek Sarmal cDNA Sentezi .....                                          | 47 |
| 3.4. Primer Tasarımı .....                                                  | 49 |
| 3.5. Kısmi Miktarlara Dayalı RT-PCR Analizleri .....                        | 49 |
| 3.6. GAPDH'in RT-PCR koşulları .....                                        | 51 |
| 3.7. Sonuçların Agaroz Jelde Görüntülenmesi .....                           | 52 |
| 3.8. Real-Time PCR (qPCR) Analizleri .....                                  | 52 |
| 3.9. siRNA ile Gen Susturma .....                                           | 53 |
| 3.10. ARID3A'nın Aşırı İfadelelendirilmesi (Overexpression) .....           | 55 |
| 3.11. Göç Deneyleri (Yara İyileşmesi Deneyleri) .....                       | 56 |
| 3.12. Koloni Oluşum Deneyleri .....                                         | 57 |
| 4. Bulgular .....                                                           | 59 |
| 4.1. Gen İfadesi Sonuçları .....                                            | 59 |
| 4.1.1. Farklı doku ve hücre hatlarında ARID3A'nın gen ifade sonuçları ..... | 59 |
| 4.1.2. Farklı doku ve hücre hatlarında ERICD'nin gen ifade sonuçları .....  | 60 |
| 4.2. ARID3A'nın Susturulması ve ERICD Üzerine Etkileri .....                | 62 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1. Negatif kontrol siRNA kullanılarak siARID3A'nın özgülüğünü kontrol etme ve transfeksiyon kimyasalının hücre üzerindeki toksik etkisini kontrol etme .....              | 66 |
| 4.2.2. ERICD'nin Susturulması ve ARID3A Üzerine Etkileri.....                                                                                                                 | 67 |
| 4.2.2.1. Negatif kontrol siRNA kullanılarak siERICD-2 (ERICD-2)'nin özgülüğünü kontrol etme ve transfeksiyon kimyasalının hücre üzerindeki toksik etkisini kontrol etme ..... | 73 |
| 4.3. ARID3A'nın Aşırı İfadelendirilmesi ve ERICD Üzerine Etkisi .....                                                                                                         | 74 |
| 4.4. Yara İyileşmesi Deneyi (Göç Deneyi) .....                                                                                                                                | 80 |
| 4.4.1. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının göç üzerine etkisi.....                                                                                                 | 80 |
| 4.4.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin göç üzerine etkisi .....                                                                                     | 82 |
| 4.4.3. U2OS hücre hattında ERICD'nin susturulmasının göç üzerine etkisi .....                                                                                                 | 84 |
| 4.5. Koloni Oluşum Deneyi.....                                                                                                                                                | 86 |
| 4.5.1. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının koloni oluşumu üzerine etkisi .....                                                                                     | 86 |
| 4.5.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin koloni oluşumu üzerine etkisi.....                                                                           | 86 |
| 4.5.3. U2OS hücre hattında ERICD'nin susturulmasının koloni oluşumu üzerine etkisi .....                                                                                      | 87 |
| 5. Tartışma.....                                                                                                                                                              | 89 |
| 6. Kaynaklar .....                                                                                                                                                            | 95 |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|               |                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------|
| AMPK          | AMP-activated protein kinase                     |
| ARID3A        | AT-rich interactive domain-containing protein 3A |
| ATP           | Adenozin trifosfat                               |
| circRNA       | Halkasal intronik RNA                            |
| CLL           | Chronic lymphatic leukaemia                      |
| CTGF          | Connective tissue growth factor                  |
| DMEM          | Dulbecco's modified eagle's medium               |
| dsRNA         | Double-stranded RNA                              |
| ECM           | Extracellular Matrix                             |
| ENCODE        | The Encyclopedia of DNA Elements                 |
| EMT           | Epitelyal mezenkimal geiş                       |
| ERICD         | E2F1-Regulated Inhibitor Of Cell Death           |
| eRNAs         | Enhancer-like lncRNAs                            |
| FBS           | Cenin sığır serum                                |
| HIF1 $\alpha$ | Hypoxia-inducible factor 1-alpha                 |
| lincRNAs      | long intergenic non-coding RNAs                  |
| lncRNA        | Uzun kodlanmayan RNA, long non-coding RNA        |
| miRNA         | Mikro RNA                                        |
| NAD           | Nicotinamide adenine dinucleotide                |
| NAT           | Doğal antisense transkript                       |
| ncRNA         | Kodlanmayan RNA                                  |
| PASRs         | Promoter-associated small RNAs                   |
| PCR           | Polimeraz zincir tepkimesi                       |
| piRNAs        | PIWI-interacting RNAs                            |
| qPCR          | Real-Time PCR                                    |
| RISC          | RNA-Induced Silencing Complex                    |
| RNAi          | RNA müdahalesi, RNA interference                 |
| qPCR          | Real-Time PCR                                    |
| RISC          | RNA-Induced Silencing Complex                    |
| RNAi          | RNA Interference                                 |
| ROS           | Reactive oxygen species                          |
| rRNA          | Ribosomal RNA                                    |
| RT-PCR        | Reverse Transcriptase PCR                        |
| siRNA         | Small interfering RNA                            |
| snoRNAs       | Small nucleolar RNAs                             |
| snRNAs        | Small nuclear RNAs                               |
| ssRNAs        | Single-stranded RNAs                             |
| TERRAs        | Telomere-associated ncRNAs                       |
| T-UCRs        | Transcribed ultraconserved regions               |
| UTR           | Untranslated region                              |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor               |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. ERICD'ye ait nükleotid dizisinin şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                                                              | 5  |
| Şekil 2.1. Sitozolik ve mitokondriyal p53'ün apoptotik yollarının gösterimi.....                                                                                                                                                                                 | 9  |
| Şekil 2.2. Nekroz, otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki.....                                                                                                                                                                                                     | 10 |
| Şekil 2.3. EMT'nin mezenkimal hücrelere dönüşüm mekanizması.....                                                                                                                                                                                                 | 12 |
| Şekil 2.4. miRNA biyogenezinin genel moleküler mekanizmaları.....                                                                                                                                                                                                | 17 |
| Şekil 2.5. miRNA'lar ile hedef miRNA'ların ilişkisi.....                                                                                                                                                                                                         | 18 |
| Şekil 2.6. Önerilen miRNA aracılı transkripsiyonel baskı mekanizmaları.....                                                                                                                                                                                      | 18 |
| Şekil 2.7. RNA müdahalesi.....                                                                                                                                                                                                                                   | 23 |
| Şekil 2.8. LncRNA'ların genomik yerleşimi.. ....                                                                                                                                                                                                                 | 26 |
| Şekil 2.9. Uzun ncRNA'ların nasıl çalıştığını gösteren paradigma. ....                                                                                                                                                                                           | 27 |
| Şekil 2.10. LncRNA'ların işlevsel mekanizmaları. ....                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| Şekil 2.11. LncRNA mekanizmasının dört modelinin şematik gösterimi.....                                                                                                                                                                                          | 30 |
| Şekil 2.12. İnsan ARID ailesi proteinleri. ....                                                                                                                                                                                                                  | 40 |
| Şekil 4.1. ARID3A ve GAPDH genlerinin farklı dokularındaki ifade seviyeleri<br>gösterilmiştir .....                                                                                                                                                              | 59 |
| Şekil 4.2. ARID3A ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin<br>gösterilmesi. ....                                                                                                                                                        | 60 |
| Şekil 4.3. ERICD ve GAPDH genlerinin farklı dokularındaki ifade seviyeleri<br>gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                | 61 |
| Şekil 4.4. ERICD ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin<br>gösterilmesi. ....                                                                                                                                                         | 62 |
| Şekil 4.5. U2OS hücre hattının siARID3A, negatif kontrol siRNA, yalnızca<br>transfeksiyon kimyasalı ile transfeksiyonu yapılmış ve normal (transfeksiyon<br>yapılmamış) hücrenin morfoloji ve hücre yoğunluğunun 24, 48 ve 72 saat sonunda<br>gösterilmesi. .... | 63 |
| Şekil 4.6. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının qPCR ile gösterilmesi...64                                                                                                                                                                             |    |

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.7.</b> U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının RT-PCR ile gösterimi. .64                                                                                                                                               | 64 |
| <b>Şekil 4.8.</b> ARID3A'nın susturulması sonrasında ERICD'nin ifadesinin düşmesi. ....65                                                                                                                                                | 65 |
| <b>Şekil 4.9.</b> ARID3A'nın susturulması sonrasında ERICD'nin ifadesinin düşmesinin RT-PCR ile gösterilmesi. ....66                                                                                                                     | 66 |
| <b>Şekil 4.10.</b> ARID3A ve ERICD'nin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalı muamelesi sonrasında göreceli ifade seviyeleri. ....67                                                                                           | 67 |
| <b>Şekil 4.11.</b> siRNA olarak siERICD-1 (ERICD-1) kullanılarak ERICD ifade seviyesinin katlı değişim analizi. ....68                                                                                                                   | 68 |
| <b>Şekil 4.12.</b> siERICD-2 (ERICD-2), negatif kontrol siRNA, transfeksiyon kimyasalının etkisi ve normal (transfeksiyon yapılmamış) U2OS hücrelerinin 48 ve 72 saatlerdeki hücre yoğunluğunun ve morfolojilerinin gösterilmesi. ....69 | 69 |
| <b>Şekil 4.13.</b> qPCR yöntemi ile azalan ERICD ifade seviyesinin gösterilmesi. ....70                                                                                                                                                  | 70 |
| <b>Şekil 4.14.</b> RT-PCR kullanılarak azalan ERICD ifade seviyesinin gösterilmesi. ....71                                                                                                                                               | 71 |
| <b>Şekil 4.15.</b> ERICD'nin susturulmasından sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin azalması. ....72                                                                                                                                        | 72 |
| <b>Şekil 4.16.</b> ERICD'nin susturulmasından sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin azalmasının RT-PCR ile gösterilmesi. ....73                                                                                                             | 73 |
| <b>Şekil 4.17.</b> ARID3A ve ERICD'nin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalı ile muamelesi sonrasında nisbi ifade seviyeleri. ....74                                                                                          | 74 |
| <b>Şekil 4.18.</b> Klonlanmış ARID3A geninin kesim enzimleri kullanılarak doğrulanması..75                                                                                                                                               | 75 |
| <b>Şekil 4.19.</b> 24, 48 ve 72 saatlerde pEF_xpress_ARID3A, pozitif kontrol pEF4-HisC ve normal (transfekte edilmemiş) U2OS hücrelerinin morfolojileri ve yoğunlukları gösterilmiştir. ....76                                           | 76 |
| <b>Şekil 4.20.</b> qPCR kullanılarak U2OS hücrelerinde ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. ....77                                                                                                                   | 77 |
| <b>Şekil 4.21.</b> RT-PCR kullanılarak ARID3A'nın ifade seviyesindeki artış gösterilmiştir.78                                                                                                                                            | 78 |
| <b>Şekil 4.22.</b> qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ERICD ifade seviyesinin katlı değişim oranları. ....79                                                                                                | 79 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.23.</b> RT-PCR kullanılarak, ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ardından ERICD'nin gen ifade analizi. ....             | 80 |
| <b>Şekil 4.24.</b> siNC ve boş kontrole kıyasla ARID3A'nın susturulması sonrasında U2OS hücrelerinin göçü. ....                      | 81 |
| <b>Şekil 4.25.</b> Pozitif kontrol ve boş kontrole kıyasla ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi sonrasında U2OS hücrelerinin göçü..... | 83 |
| <b>Şekil 4.26.</b> siNC ve boş kontrole kıyasla ERICD'nin susturulması sonrasında U2OS hücrelerinin göçü. ....                       | 85 |
| <b>Şekil 4.27.</b> siARID3A U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu. ....                                                                 | 86 |
| <b>Şekil 4.28.</b> ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi (pEF_xpress_ARID3A) U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu.....                    | 87 |
| <b>Şekil 4.29.</b> siERICD U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu.....                                                                   | 88 |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Yakın zamanda keşfedilen insan kodlamayan RNA çeşitleri.....                                                          | 15 |
| <b>Tablo 2.2.</b> Tümör baskılayıcı miRNA'lar.....                                                                                      | 20 |
| <b>Tablo 2.3.</b> Onkogenik miRNA'lar.....                                                                                              | 21 |
| <b>Tablo 2.4.</b> Kanserde rol oynayan snoRNA'ların listesi.....                                                                        | 24 |
| <b>Tablo 2.5.</b> Kanserde rol oynayan bazı lncRNA'lar.....                                                                             | 34 |
| <b>Tablo 2.6.</b> Osteosarkomda lncRNA'lara genel bir bakış.....                                                                        | 36 |
| <b>Tablo 2.7.</b> İnsan ARID'lerinin isimlendirilmesi.....                                                                              | 41 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....                                                                | 45 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları gösterilmiştir.....                                                           | 47 |
| <b>Tablo 3.3.</b> RNA panelinde bulunan doku türleri.....                                                                               | 47 |
| <b>Tablo 3.4.</b> cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.....                                                                 | 48 |
| <b>Tablo 3.5.</b> cDNA sentezi tepkime koşulları.....                                                                                   | 48 |
| <b>Tablo 3.6.</b> Çalışılacak ilgili genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimlerinin özellikleri..... | 49 |
| <b>Tablo 3.7.</b> Gradient PCR tepkime sıcaklık koşulları.....                                                                          | 50 |
| <b>Tablo 3.8.</b> RT-PCR bileşen ve miktarları.....                                                                                     | 50 |
| <b>Tablo 3.9.</b> ARID3A'nın RT-PCR tepkime koşulları.....                                                                              | 50 |
| <b>Tablo 3.10.</b> ERICD'nin RT-PCR tepkime koşulları.....                                                                              | 51 |
| <b>Tablo 3.11.</b> GAPDH'ın RT-PCR bileşen ve miktarları.....                                                                           | 51 |
| <b>Tablo 3.12.</b> GAPDH'ın RT-PCR tepkime koşulları.....                                                                               | 52 |
| <b>Tablo 3.13.</b> qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.....                                                                     | 52 |
| <b>Tablo 3.14.</b> qPCR için tepkime koşulları.....                                                                                     | 53 |
| <b>Tablo 3.15.</b> Susturma deneylerinde kullanılacak siRNAların dizileri görülmektedir. ERICD için iki siRNA kullanılacaktır.....      | 54 |
| <b>Tablo 3.16.</b> ARID3A klonlanmış geninin doğrulama protokolü.....                                                                   | 55 |

## ÖZET

### LNCRNA ERICD’NİN DÜZENLENMESİNDE ARID3A’NIN ROLÜ

Mohammad Kaif ARMAN

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

İkinci Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

Mart 2017, 116 sayfa

ERICD (E2F1-Regulated Inhibitor of Cell Death) yakın zamanda kromozom 8’de bulunmuş uzun kodlanmayan bir RNA’dır. Transkripsiyon faktörü E2F1 tarafından düzenlenmektedir. ARID3A/DRIL1/Bright çeşitli biyolojik süreçlerde görev alan AT Rich Interaction Domain (ARID) DNA bağlanma proteinidir. ARID3A E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak E2F-bağımlı transkripsiyonu aktifleştirir. ERICD üzerinde ARID3A’nın varsayılan bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasındaki hipotezimiz ARID3A ve ERICD’nin, kanserde, biyolojik süreçlerde birbirlerini düzenliyor olabilecekleridir. ARID3A ve ERICD’yi seçmemizin bir diğer sebebi DNA hasarı durumunda gelişen apoptotik süreçte ikisinin karşıt roller üstleniyor oluşudur. ARID3A’nın lncRNA ERICD’nin ifadesini düzenleyip düzenlemediğini araştırmak amacıyla ARID3A ve ERICD’de ifade edilen osteosarkom hücre hattı (U2OS) kullanılmıştır. DNA bağlayıcı protein geni ARID3A ve lncRNA ERICD arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla susturma ve aşırı ifadelendirme deneyleri yapılmıştır. U2OS hücre hatlarında hücre göçü ve koloni oluşum deneyleri de yapılmıştır. ARID3A’nın ve ERICD’nin siRNA aracılığı ile susturulması, U2OS hücrelerinin göçünü ve kolonilerin oluşumunu belirgin bir şekilde baskılamıştır. Diğer bir taraftan, ARID3A’nın aşırı ifade edilmesi U2OS hücrelerinde yara kapanmasında önemli bir tetikleyici olduğunu doğrulamıştır ve U2OS hücrelerinin koloni oluşum kabiliyetini arttırdığı bulunmuştur. Özetle, ARID3A ve ERICD’nin E2F1 aracılığı ile birbirleri ile dolaylı olarak ilişkili olduğu, ARID3A ve lncRNA ERICD’nin osteosarkomda onkogenik işlevlerinin olduğu ortaya konulmuştur. ARID3A ve lncRNA ERICD arasında bulunan ilişki yeni bir bulgudur ve DNA bağlayıcı proteinleri hedefleyen lncRNA’lar hakkındaki önemli bir kilometre taşıdır.

**Keywords:** ARID3A, LncRNA ERICD, Gen susturma, Overekspresyon, Hücre göçü deneyler, Koloni oluşum deneyler.

## **ABSTRACT**

### **ROLE OF ARID3A IN THE REGULATION OF LncRNA ERICD**

Mohammad Kaifee ARMAN

Doctoral Thesis, Department of Medical Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

March 2017, 116 Pages

ERICD (E2F1-Regulated Inhibitor of Cell Death) is a newly found lncRNA located on chromosome 8. ERICD is regulated by E2F1. ARID3A/DRIL1/Bright is a family member of the AT rich interaction domain (ARID) DNA-binding proteins that are involved in diverse biological processes. ARID3A binds to the E2F transcription factor and activates E2F-dependent transcription. I have found putative binding sites of ARID3A on ERICD. I think that ARID3A and ERICD might be regulated by each other for several biological processes in cancer. The other hypothesis for selecting these two in our study is that both of them have just opposite roles in apoptosis in case of DNA damage indicating a probability of reciprocal interaction between each other. To explore if ARID3A regulates expression of lncRNA ERICD, I took advantage of a human osteosarcoma cell line (U2OS) that each express conditionally active ARID3A and ERICD. Overexpression and knockdown experiments were carried out for ARID3A and knockdown experiment was done for ERICD. Migration assay and colony formation assays were also performed in U2OS. siRNA-mediated knockdown of ARID3A and ERICD inhibited cell migration and reduced the formation of colonies in U2OS cells to a considerable degree. On the other side overexpression of ARID3A confirmed a significant induction in wound closure and increased colony forming ability of U2OS cells. In summary, the obtained data in my thesis suggest that ARID3A and ERICD interact with each other indirectly via E2F1. Moreover, ARID3A and lncRNA ERICD have oncogenic functions in osteosarcoma. The interaction that has been found between ARID3A and lncRNA ERICD is novel and adds a further milestone regarding lncRNAs targeting DNA binding proteins.

**Keywords:** ARID3A, lncRNA ERICD, Knockdown, Overexpression, Migration Assay, Colony Formation Assay.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan genomu, her bir hücrenin çekirdeğinde üç boyutlu bir yapıya paketlenmiş 2 m'den fazla lineer DNA'dan oluşur (1). Moleküler biyolojinin merkezi dogması, genetik bilgi akışının DNA'dan RNA'ya, RNA'dan proteine doğru olduğunu belirtmektedir. Bununla birlikte, son on yılda bu dogma, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) üzerine yeni bulgularla başka bir boyut kazandı. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200'den fazla nükleotid uzunluğa sahip protein kodlamayan (yada 100 amino asitten fazla açık okuma çerçevesi kaybı olan), geniş ve çeşitli bir transkribe RNA molekül sınıfıdır. Transpozonlar, psödogenler ve biyolojik açıdan önemli işlevsel düzenleyici olan basit tekrarlar dahil olmak üzere birçok lncRNA, 'çöp' olarak tabir edilen genom bölgelerinden transkribe edilir (2, 3). LncRNA'lar, kansere ilişkin bir araştırma konusu olarak her geçen gün önem kazanmaktadır. Şu ana kadar kanserlerde rolleri olan birçok lncRNA molekülü tespit edilmiştir. Bazı lncRNA'lar tümör baskılayıcı olarak görev yaparken bazıları onkogenler gibi davranır. Akciğer kanseri, kolon kanseri, karaciğer kanseri, göğüs kanseri gibi pek çok kanser türünde onkogen gibi davranan MALAT1, H19 ve HOTAIR gibi birçok lncRNA tanımlanmıştır (4-8). Tümör baskılayıcı gibi davranan birçok lncRNA vardır. MEG3 birçok kanser çeşidinde tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (9). PTCSC3 (Papiller Tiroid Karsinoma Duyarlılığı Aday 3), tiroid kanseri ile ilişkili bir tümör baskılayıcı lncRNA'dır (10). ERICD (E2F1-Regulated Inhibitor of Cell Death) yakın zamanda bulunan bir lncRNA'dır. Kromozom 8 (chr8:141646242-141648531) üzerinde yerleşiktir ve iki ekzondan oluşmaktadır. Transkript boyutu 1745 bp'dir. ERICD'nin E2F (transkripsiyon faktörü 1) tarafından düzenlendiği ve DNA hasarına karşı hücrel yanıtı modüle ettiği bulunmuştur (11).

ERICD'nin yukarı tarafındaki insan genomik dizisinin analizi ile, -221 / -214'de bir varsayılan E2F bağlanma yeri tespit edilmiştir. Bu da endojen E2F'lerin ERICD'nin yukarı tarafına bağlandığını düşündürmektedir (12). DNA hasarı karşısında hayatta kalmayı desteklediği için, ERICD kanseri teşvik edici etkilere sahip olabilir, ayrıca kemo-direnç kazandırabilir. ARID3A/DRIL1/Bright AT zengin etkileşim bölgesi

(ARID) DNA-bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir ve gelişim, hücre farklılaşması, hücre döngüsü kontrolü, kromatin yeniden şekillenmesi ve epigenetik düzenlemelerin de içerisinde olduğu çeşitli biyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir. Bu proteinler, ARID DNA bağlama bölgesi ile karakterizedirler. ARID3A'nın "AATTAA" bağlayıcı bir uzlaşma dizisi vardır (13). ARID3A E2F transkripsiyon faktörüne bağlanır ve E2F-bağımlı transkripsiyonunu aktive eder (14). Şimdiye kadar, ARID3A'nın bir onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı olarak mı işlev gösterdiği halen tartışmaya açık bir konudur. Çeşitli kanser türlerinde farklı rollerinin olduğunu gösteren örnekler vardır. ARID3A, primer murin fibroblastlarında Ras'ın indüklediği erken yaşlanmayı önlemektedir (15). Ayrıca, ARID3A'nın yüksek gen ifadesinin kolorektal karsinomda iyi prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16). Yukarıda bahsedilen örnekler ARID3A'nın onkogenik rolünü göstermektedir. Bunun dışında, ARID3A tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir. ARID3A, E2F hedef gen ifadesinde önemli bir role sahiptir. ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması, E2F1, p107, CDC2 ve CDC6 gibi E2F hedef genlerinin transkripsiyonuna engel olduğu gösterilmiştir. ARID3A sessizleştirmesinin, normal insan dermal fibroblastlarının (NHDF'ler) S faz girişini zayıflatığı ve insan tümör hücre hatlarının büyümesini baskıladığı da bulunmuştur (17). Bu bulgular, ARID3A'nın tümör baskılayıcı rollerinin olduğunu destekler niteliktedir. Birçok biyolojik süreçte, DNA'ya bağlanan proteinleri hedefleyen birçok lncRNA vardır (18-20). LncRNA'lar DNA'nın transkripsiyonunu epigenetik olarak düzenlemek için DNA'ya bağlanan proteinlerle birlikte hareket etmektedirler (21). ARID3A'nın uzun kodlamayan RNA'larla olan etkileşimi halen araştırmaya açık bir alandır. Bu tez çalışmasında, ARID3A (AT-zengin etkileşim alanı 3A) ve lncRNA ERICD (E2F1-Kontrollü Hücre Öldürücü İnhibitörü) konularına odaklanılmıştır. Şu ana kadar bu ikisinin arasındaki ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir çalışma yapılmamıştır. LncRNA ERICD ile ilgili araştırmalar bile son derece yeni çalışmalar olup bununla ilgili sadece bir çalışma yayımlanmıştır. ARID3A üzerindeki AATTAA dizilerinin ERICD üzerinde de benzer dizilerinin bulunması ARID3A'nın ERICD üzerinde bağlanabileceğini düşündürmektedir (Şekil 1.1).

>ERICD-001 ENSE00003758938 exon:KNOWN\_lincRNA

```

GGGAGCGGGAGGGCGGGGAGGAAGGAGGAGGGAGGGGAGGGGAGGGCGGGCGGGAGCGCGCTCGCGGGGGGAG
CGGGGCTGGGCGCGCGGGCGGGGTCCGCGGC GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGGGTCTGGCGGGGCTGGGGCGGGGAG
GGGGCCC GGAGACCTCGCGGGCGGGTGGGAACCGCGGGCGGGAGCGGGGAGGGCCGAGGGCGCGCGCGGGTGTGGCGC
GGGGGGCGGGCGCGGGCCC GGGGACCC TTAC TGGCA CCCAGAGAAG CCGCTCTTCCGACGGGGAGGAGCGGGCCCCCGG
CTGTGCCCGCGGAGCGGAGGGGAGGCGACGCGCCCCGCTTTCCCGCGCGCCCCCGGTGGGGGGCGCAGAACCTCCACC
CTCAGCCCTCGGGCCCCCAGCCTGGCTCTTTAAAGTTACTACAGAAACACGGGAGGTCTGGAGGCTCCCTCCAGCCCGAGCTT
GAACCTGAACGCGGGCGGGCGCTCGCGCAGGACACACCGCCACCTCCCGCGGGCCCCGAGAACCCAGATAATCTCGTTTAAA
GCACTGAGAAAAATCTAAGAAGTTTTAGTAACTGTAGCTGTATCAGGGATCAGATCAGCGGACACGCCATTCCAGCAGTC
AGGGGCCCTGCTCGGACCTCGTGCACCTCCGAGCGTTCTGTGCCGTCCCTCTGGGTCCGTCTGGTTTTTCGGAGGCTTCTCG
GAAAAGCCAGCCTGTGGCTACCTCCTTTCTCCCTAAGTGTAGGAGGATTAGAAGGAGAGGTTGACCCACAATCTAAAGTGC
CTGGTCCGCTTTTCCAGATTTCCTCGGAGCATTCCTTCACCCCGTGGCATCGGCTGTCTGCATATGGGTGCAAGGCCCTGTTC
CGGGCGGAGGATAAAAGGAGGTTCTGACTGACAGGAGCTCCGACGCAGCAGGGTGGTCACTAGTCTCTGCAGTCTCGGAGG
ACAGCCCTGAAGAAGGGCAGGAGAACCAGCACTTCTCCGAAACTCAAAAGGACATCAGTCTTACCAAGTTGCCGATACAA
AACGTGCTCTGAAATGTGTAGTAATGAACACCGAGAAACCTGGGTAGGAGTGTGCATGGCATTCATCACCCTGTGGACT
GCATGGCCTGTAATACCCACGGAGAGCAGGATGGAGAAACAGTGTCTCATATTACAGGATGGAATCTAGCCATTCACAAAA
ATTCCAAACAGGCAAGATAAACTGCACTTCTTAGGGAAGCATCATTAAGTAGTAATAATTGACAGAAGGGCAAGAAGGTG
CTTACTCTAAGTGTGAGAAATGGTGATACAGCTGGGGGTGAGAGGGCTGTGACCACAGCAGGGCCCTGGGGGATTTGGGGGT
GCCAGGCCCTGTTCTTCTGCAATGGTGCCCTTTGGCAGCCATCCCTTAACTGCACTTTTACTTTATATGCTTTTCTGTACC
TTTACTGTAGTATTTACGGAATAAAATAATCATGAATGTTACCACTTTCCTATTTATGAACCATGCAACCTCATCAAT
CTTCCAGTTTCGAGATGCCACCCCTCTCTCTGCCCCCTGTCTCCTTTCACATATCCCCAAACTCGTTTTGGCCCGAAATCC
CTGAGGCCCAACTGCCCCGCTGTCTGAGCGACTGCACGCTCAGCAAGGCCAGAGGCTCTGTCTCACTGGCTGCCCTCAGC
CCGCTTTCAGCTCCTTTGAGCGCTGTGTTGGGGAACCTTGTGCAAGGATTTCGTTCCAGAAGGCAGATAATGTCTCTGAGG
GCTTCATTGTGTCACTTCTCTTTGGAATGGCGGACACCGTGGCCCTCTGCTGGCGGAGGGGTGCCATTGCTGCCTGCCCATCT
CTATCCCCAGGGCCCATGCAGTCACTGGGTTCCGCTCTGGGGCAGGGGTTCCTCTGCTCTTTTCCCTAGATAAGGCCATTCT
TCTGAGGCTCTTACCTCCACACCTGTGTTGAGGAATTCAGCCCGCTTCTGACGCCCATCCCTACCTTCTCTCCACCTG
CTTTCTCTGCTGCTCCCTCACTCAGCATGGCTAACAGATCCACCACCCAAAGGAGCTGAGAACTGCAGTCCCTCTGCTGT
TACCTCTCTGCTCATTAGTGAACCTGCTTAACTCATCTGACTGTGCTCTCGGTGCTTGTGTGACATGTCTCCAGCCCTTGC
TGCTCTGTCCCCCAGACCCACGCTCCACACCGGATGGTGACTCAGCCGACTCTGGGTCTTCTGGAGCCAGTGTCTCTCCCTG
ATACAATTCCTTCTCTGTGTTTAGGATCCTGATGCTTTGATAAGACCGTGGGCTCTAATCACAGCCAGGGACATTTGCAGC
AGCCTGGGCTGCAGCTCTGCACACTGGGTGCACTCAGTCTAAAGCACCAGCTCCCATGAGAGAGAAAGAGGGGTGAGGGGA
AGTACAGAGAAAGCTCTGAGGCCACAGGGCTGACAAAGCCCTCGGCTTTGGGGGCACTTTGTTTCTCAAGACTAAAATGCA
GGCAATGGGATAAAATCAATTTGTTCTAAAACATGTTCTGCACATGATAAGAGCTTTGGGAAGTCAAGTAAATGGGAAGC
ACTGGATCAACAAATGATAAAATAAGTTTATTGTCTGCAGGCCTTCTCAGAGCCTGTAGCAAGGTGAGAAGAAATCAAGCTTCTA
CAAAGAGGAGGAGGGCATGAGACAGTATGCACCTGTCCCAAAACCATTTAGCCAAGAACCCCTTTTTACAGGAGTACCTC
AAGGTTCCGTGGAGCATAAATTAGGAACACAGAGGTAGAGTCTTCTATGATCCCTTCCAGCTCTAATAGTCTATGATCTT
TGAGTAATATATACCTTTGAGACAGGATCACCAGAGTGAAGTGTAGTGGCGAAAACACAGCTCATTCAGCCTTGACTTCCCA
GGCTCAAGTGATCTCCCACTCAGCCTCCTGAGCAGCTGGGAGCAAGGTGCATGCCACCATGCTGGCTTAAATTTAAAAA
CTTTGTAGAGACAGGTCTCACTGTGTTGCTCAGGTGGTCTTGAATGCTTGGCCCAAGTGATCTCCACCTTGGCTCCT
CAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTACACCTGACCTTATTTTT

```

**Şekil 1.1.** ERICD'ye ait nükleotid dizisinin şematik gösterimi. Ekzon kısmı altı çizgili, varsayımsal ARID3A bağlanma bölgeleri yeşil kutular içinde gösterilmiştir. Feldstein vd. tarafından kromatin immünopresipitasyon ile keşfedilen promotor dizisi sarı işaretlidir (11). Görüldüğü üzere, bu promotor dizisine çok yakın bir ARID3A bağlanma dizisi mevcuttur.

Yapılan çalışmalarda, ARID3A ve ERICD'in E2F tarafından düzenlendiği ve hücre döngüsünde rol aldığı gösterilmiştir (14, 17, 21). Bu hipotezimizi desteklemektedir. Bu ikisinin apoptozda zıt rollerinin olması ERICD'nin farklı kanserlerde ARID3A'nın aksine işlev gösterdiğini düşündürmektedir. Hücre döngüsünde rol alan birçok lncRNA vardır ve bunların rolleri DNA sentezi ve koloni oluşumu sırasında gözlemlenmiştir (22-25). Bunlara dayanarak kanserde lncRNA ERICD ve ARID3A arasındaki ilişkiyi bulmayı hedeflemekteyiz. Birbirinden bağımsız olarak ERICD ve ARID3A'nın kanserdeki rolleri de araştırılacaktır. Bulgularımız, ERICD ve ARID3A'nın kanserdeki rolünü aydınlatacak ve kanser terapisinde kullanımları için bize bir fikir verecektir. Araştırmamız aynı zamanda ERICD ve ARID3A'nın onkogenik veya tümör baskılayıcı genler olup olmadığını da gösterecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanser**

Kanser, kontrol dışı hücre büyümesi ile karakterize bir hastalık sınıfıdır. Tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Örneğin ABD'de, yaşam boyu kanser gelişme olasılığı erkeklerde %44, kadınlarda %38 civarındadır (26, 27). Her yıl, Amerikan Kanser Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelecek yeni kanser vakaları ve ölüm sayısını tahmin ederek ve kanser insidansı, mortalite ve hayatta kalma ile ilgili en son verileri derlemektedir. 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,685,210 yeni kanser vakası ve 595,690 kanser ölümünün gerçekleşmesi tahmin edilmiştir (27-29). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, önümüzdeki 20 yıl içinde yeni kanser vakalarının sayısının yaklaşık %70 artması beklenmektedir. Erkeklerde kanserin en yaygın olduğu bölgeler akciğer, prostat, kolon, rektum, karın ve karaciğer iken, kadınlarda göğüs, kolon, rektum, akciğer, serviks ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır. "Kanser", heterojen bir hastalık grubunu içermesine rağmen, karakteristik ve birleştirici özelliklerden birisi, doğal sınırlarının ötesinde büyüyen anormal hücrelerin oluşturulmasıdır. Tümör oluşumu çok aşamalı bir süreç olduğundan, normal hücreler aşamalı olarak neoplastik aşamaya geçer ve bu süreç boyunca, tümörojenik olmasını sağlayan özel kapasiteler kazanırlar (30). Kanser özellikle hücre büyümesi ve bölünmesi gibi hayati biyolojik süreçleri kontrol eden genlerde meydana gelen bozukluklar nedeniyle ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Kansere katkıda bulunan genetik değişiklikler, üç temel gen tipini etkilemektedir: proto-onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri.

### **2.2. Kanserinin ayırt edici özellikleri**

2000 yılında Hanahan ve Weinberg, kanser oluşumunun temelini oluşturan altı tane ayırt edici özelliği öne sürdüler (31). Bu ayırt edici özellikler şu şekilde sıralanmaktadır: (i) çoğalma uyarısının devamlılığı, (ii) büyüme baskılayıcılardan kaçış, (iii) ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama, (iv) invazyon ve metastazın aktifleşmesi, (v) anjiogenezin indüklenmesi ve (vi) hücre ölümüne karşı direnç olarak sıralanmaktadır. Son on yılda,

kanser araştırmaları alanında bu ayırt edici özelliklerin daha iyi anlaşılmasına yol açan dikkate değer bir ilerleme kaydedildi. Aynı zamanda orijinal konseptin değıştirilmesine ve sonuçta genişletilmesine yol açtı (32).

### **2.2.1. oğalmayı desteklemek için büyüme faktörlerine bağımliliğın azalması**

Normal insan dokularında, büyüme faktörleri genellikle uzak bölgelerde ekstraselüler olarak üretilir ve daha sonra kan dolaşımı yoluyla taşınır veya yakındaki hedef hücrelere yayılır. Büyüme faktörü uyarımının eski modu, endokrin uyarı ve ikinci mod, parakrin uyarımı olarak adlandırılır. Ancak, tümör hücreleri kendileri büyüme faktörü üreterek kendi büyüme faktörü reseptörlerinin uyarabilir ve aktivitelerini arttırabilirler. Bu durum, herhangi bir eksojen proliferatif sinyal yokluğunda bile kendi ürettiğı büyüme faktörleri ile sürekli olarak tümör hücresinin çoğalmasını sağlayan otokrin uyarılmaya sebep olmaktadır.

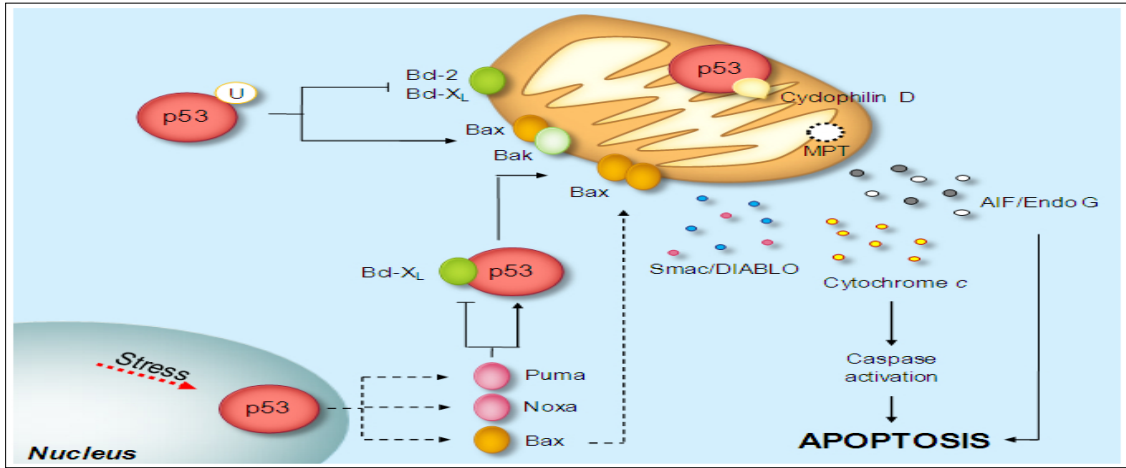
### **2.2.2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış**

Kanser hücrelerinde çoğalma uyarısının sürdürülebilmesi için tamamlayıcı bir özellik de, büyüme baskılayıcılardan kaçıştır. Çeşitli şekillerde hücrenin büyümesini ve çoğalmasını inhibe eden *TP53*, *PTEN* veya *RB* gibi birçok tümör baskılayıcı protein kodlayıcı gen keşfedilmiştir. Bu tümör baskılayıcı genlerin harekete geçirilmesi harici veya dahili uyarılara bağılı olup, ya hücre siklusunun durması ya da hücrelerde yaşlanmayı ve hatta apoptozu indükleyebilmektedir. Bu nedenle, tümör hücreleri, bu genlerin aktivasyonlarını veya ifadelerini önlemenin bir yolunu bulmalıdır. Kanser hücreleri, tümör baskılayıcı geninin tamamen kaybedilmesi veya bu geni inaktif hale getiren mutasyon birikimi gibi mekanizmalar aracılığıyla bu durumla başa çıkmaktadır. İnsan tümörlerinin %50'sinden fazlası *Tp53* geninde bir mutasyon veya delesyon içermektedir. *Tp53* geninin yalnızca bir işlevsel kopyasını taşıyan insanlar yetişkinliğin erken safhalarında kansere yakalanması muhtemeldir ve bu hastalık Li-Fraumeni sendromu olarak bilinmektedir (33). Alternatif olarak, tümör baskılayıcı genler, tümör hücrelerinde eksprese edilen diğere proteinlere de bağlanabilir ve bu nedenle de inaktive olur veya hızla parçalanabilir. İnsan rahim ağzı kanserlerinde tercihen eksprese edilen human papilloma virüsü (HPV) E6 ve E7 onkogenleri bu durum örnek olarak verilebilir. *Tp53* ve *RB* ile etkileşim kurar, bu da onların inaktivasyonuna neden olur (34). Ayrıca,

Mdm2, Tp53'ün baskın E3 ubiquitin ligazıdır ve bu nedenle, proteazom aracılığıyla yıkılmasına neden olur (35).

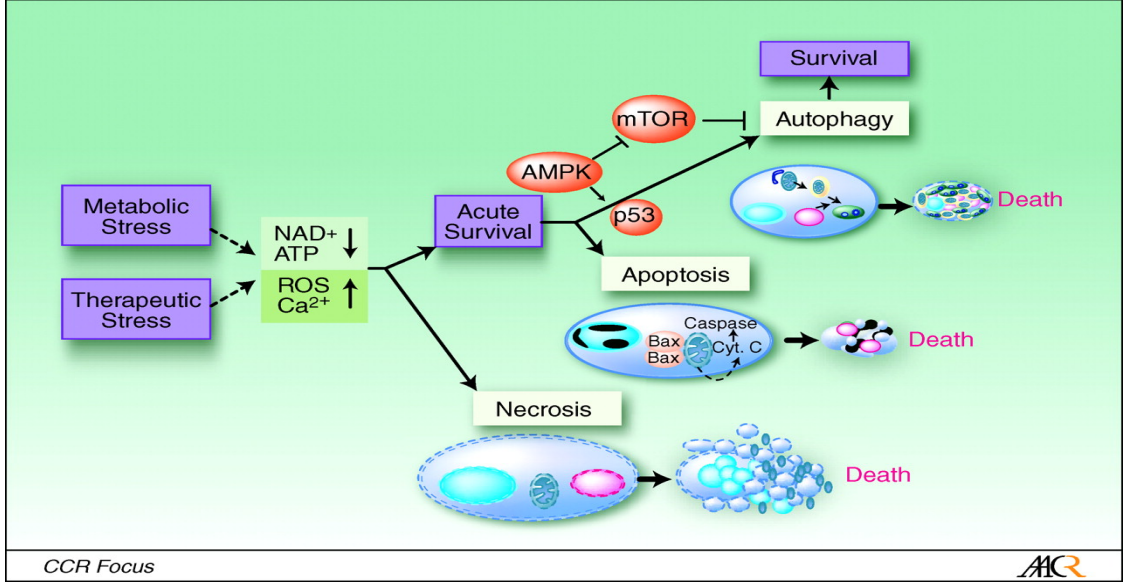
### **2.2.3. Hücre ölümüne karşı direnç**

Hücre ölümüne yol açan üç önemli yolak ve bunların aktivasyonu, tümör hücreleri tarafından dikkatle kontrol edilmelidir. Kontrollü hücre ölümüne yol açan ilk mekanizma apoptozdur. Apoptoz çeşitli dış ve iç uyarılarla indüklenebilir. Birçok çalışma, oldukça malign kanserlerin apoptozu zayıflatabileceğini ve tedaviye dirençli olabileceğini göstermiştir (36, 37). DNA hasarının kemoterapötik ajanlar (sisplatin, etoposid, vb.) ile indüklenmesi, TP53 (p53) yolu ile apoptozu tetiklemenin yollarından biridir. TP53, BH-3 proteinleri Bax, Noxa ve Puma gibi çeşitli proapoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğine sahiptir ve böylelikle hücre ölümüne yol açabilir (Şekil 2.1) (38). Tüm insan kanserlerinin %50'sinde TP53 geninin kaybı veya mutasyonları görülmüştür (33). Bu, bu tür hücrel streslere karşı daha dirençli olunmasını sağlar. Alternatif olarak, tümörler, hayatta kalma faktörlerinin veya Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik düzenleyicilerin artmış ekspresyonunu göstermektedir.



**Şekil 2.1.** Sitosolik ve mitokondriyal p53'ün apoptotik yollarının gösterimi. Sitosolik p53 apoptotik yolda, nükleer p53, Puma ifadesini indükler, bu da Bcl-XL'e bağlanarak sitoplazmada aktif olmayan sitosolik p53'ü serbest bırakır. Mitokondride p53, Bax ve Bak oligomerizasyonunu indükler, Bcl-2 ve Bcl-XL antiapoptotik etkisini baskılar ve mitokondriyal membranda siklofilin D ile kompleks oluşturur. Bu değişiklikler, mitokondriyal zarların bozulmasına ve daha sonra çözünür ve çözünmez apoptojenik faktörlerin salınmasına neden olur. MPT, mitochondrial permeability transition; U, ubiquitin (38).

Kontrollü hücre ölümüne yol açan ikinci bir mekanizma otofajidir. Bu mekanizma genellikle hücrelerde düşük seviyelerde çalışır, ancak besin eksikliği gibi hücrel stres durumlarında aktive edilebilir (39). Otofaji, hücrelerin organellerini parçalamasına izin veren ve yıkılan ürünlerin biyosentez yollarında ve enerji üretiminde yakıt olarak kullanılmasına olanak sağlayan bir geri dönüşüm programı olarak görülebilir (39, 40). Son hücre ölüm şekli nekrozdan oluşur. Sıklıkla "kontrol edilemeyen" hücre ölümü olarak adlandırılırsa, nekrozun ölmek için kontrolsüz bir yol olmaktan çok kontrollü bir süreç olduğunun kanısı giderek artmaktadır (41, 42). Otofajiye benzer şekilde, nekroz kanser hücrelerini ortadan kaldırır veya çoğalmalarını teşvik edebilir (Şekil 2.2). Nekrotik hücreler, proinflamatuar hücreleri çekebilir, bu da anjiogenezi, kanser hücresi çoğalmasını ve invazyonunu harekete geçirir (41, 43).



**Şekil 2.2.** Nekroz, otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki. Metabolik ve terapötik stresler, artmış hücre içi kalsiyum ve ROS eşliğinde akut NAD<sup>+</sup> ve ATP tükenmesine yol açar. AMPK'ya bağlı fosforilasyon ayrıca, Bax ve Bak'ın aktivasyonu, sitokrom c'nin sitoplazmik salınması (Cyt. C) ve kaspazların aktivasyonu vasıtasıyla otofajiye veya apoptozise neden olabilen p53'ü de aktive eder. Apoptoz veya nekrozdan farklı olarak, stres kaynaklı otofaji, otofajik hücre ölümüne veya hücre sağkalımına yol açabilir (44).

#### 2.2.4. Ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama

Sadece sınırlı sayıda hücre bölünme döngüsünü geçirebilen normal hücrelerin aksine, tümör hücreleri neredeyse sınırsız replikasyon gösterir. Normal hücrelerde replikasyon potansiyeli yaşlanmanın veya krizin ortaya çıkması nedeniyle sınırlıdır ve kriz durumu genellikle hücre ölümü ile sonuçlanır. Kromozom uçlarında yer alan telomerler, replikasyonun sınırlandırılması için çok önemlidir (45, 46). Omurgalılarda, bu sekanslar, "TTAGGG" heksanükleotidinin birden fazla tekrarından oluşur ve kromozomların uçtan uca bağlanmalarına engel olur (47). Bununla birlikte, normal hücrelerde, bu telomerik tekrarlar, her hücre bölünmesi sonrası kısalmır ve dolayısıyla telomer DNA'nın uzunluğu hücre bölünme döngüsü sayısını belirler (48). Tümör hücreleri telomer kaybını önlemenin iki yolunu bulmuşlardır: (i) Tüm insan kanserlerinin yaklaşık %90'ı telomeraz olarak adlandırılan ve kromozomların sonuna telomerik tekrarlar ekleyebilen özel bir enzimi ifade etmektedir, (ii) geri kalan %10'u, kardeş kromatidler arasında telomer ardışık tekrarlarının transferini içeren, konservatif

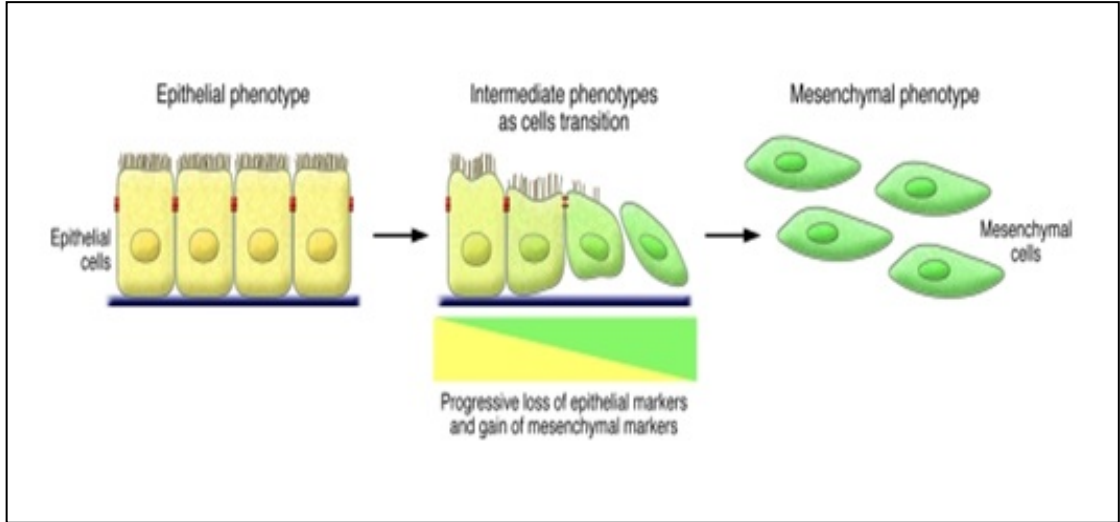
olmayan bir telomer uzatma yöntemi olan telomerlerin alternatif uzaması (ALT) mekanizmasını kullanmaktadır (49-52).

## **2.2.5. İnvazyon ve metastazın aktive edilmesi**

Diğer bir ayırt edici özellik ise istila etme ve uzak yerlere metastaz yapabilme yeteneğidir. Bu ayırt edici özellik, son derece zorlayıcı bir konudur ve karmaşık etkileşimler ve düzenleyici mekanizmaları içermektedir. Genellikle kanser hücreleri morfolojik değişiklikler geçirir ve hücre-hücre veya hücre-matrik etkileşimlerini değiştirir. Bütün bunlar, invazyon ve metastazın çok basamaklı sürecinin ilk adımlarını başarıyla geçmesini sağlar (30). Bu invazyon-metastaz kaskadı, kanserli hücrelerin sağlıklı dokulara girmesine izin veren çoklu biyolojik değişikliklerden oluşur, bunu takiben kan ve lenfatik damarlara girmelerine olanak sağlar (53, 54). Son yıllarda bu konuda çok ilerleme kaydedilmiştir ve "epitelyal mezenkimal geçiş" (EMT) olarak bilinen gelişimsel düzenleyici program tarafından istilanın düzenlenmesi gibi ilginç kavramlar ileri sürülmüştür (55-57).

### **2.2.5.1. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)**

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), polarize bir epitel hücresinin, artmış göç kapasitesi, artmış invazyon kapasitesi, apoptoza karşı artmış direnç ve büyük ölçüde artmış ECM (hücre dışı matris) bileşenlerini içeren ve hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal hücre fenotipi elde etmesini sağlayan çoklu biyokimyasal değişikliklere izin veren biyolojik bir süreçtir (58). E-cadherin (CDH1) önemli bir hücre-hücre yapışma molekülüdür ve epitel hücre katmanlarını bir araya getirmeye yardımcı olur. Dolayısıyla artmış bir E-cadherin ekspresyonu invazyon ve metastaz oluşumunu baskılar. Bir dizi farklı moleküler süreç, EMT sürecini başlatmak ve tamamlanmasına olanak sağlamak için birlikte işlev gösterir. Bunlar, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu, spesifik hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonunu, hücre iskelet proteinlerinin yeniden düzenlenmesini ve ekspresyonunu, ECM'nin yıkılmasına olanak sağlayan enzimlerin üretilmesini içerir. Çoğu durumda ilgili faktörler, bir hücrenin EMT sürecini göstermek için biyolojik belirteç olarak da kullanılır (Şekil 2.3) (59).



**Şekil 2.3.** EMT'nin mezenkimal hücelere dönüşüm mekanizması. EMT, polarize epitel hücrelerinin mobil ve ECM bileşen-salgılayan mezenkimal hücelere fonksiyonel geçişini içerir. EMT araştırmacıları tarafından yaygın olarak kullanılan epitel ve mezenkimal hücre belirteçleri listelenmiştir (59).

Diğer taraftan, göç eden nöronlarda ve mezenkimal hücelerde bulunan N-Cadherin (CDH2) genellikle birçok invazif tümörlerde aşırı ifade edilmektedir. Kanser hücrelerindeki bu değişimlerin yanında kanser hücrelerinin tümör stroma hücreleri ile birbirleri ile haberleşmesi ile bu ayırt edici özellik için gereklidir (60-63).

#### 2.2.6. Anjiyogenezin uyarılması

Kanser hücreleri büyüdüğü ve çoğaldığı zaman tümör büyüklüğü ve kütlesi artmaktadır. Eğer kanser hücreleri anjiyogenezi uyarma özelliğini kazanmazlarsa bu büyüme süreci oksijen ve besinlerin doğal difüzyon limiti ile sınırlanacaktır. Yeni kan damarlarının oluşması yalnızca besin maddeleri ve oksijen alımını değil aynı zamanda tümörlerin metabolik atıklarının atmasına ve hematojen metastatik sürece girmesine izin verir. Anjiyogenik anahtar “angiogenic switch” tümör ilerlemesinde de aktiftir. Bu da tümör büyümesini sürdürmeye yardımcı olan yeni kan damarlarının sürekli oluşmasına yol açar (64). Tümör hücreleri bunu sağlamak için pro-anjiyogenik etmenleri uyarır veya anti-anjiyogenik uyarıları baskılar (65). Anjiyogenezin en iyi bilinen aktivatörlerinden birisi VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)'dır. VEGF-A hipoksi veya onkogenik iletilerle uyarılabilen bir salgı proteinidir (66). VEGF-A'nın etkisi, aynı

zamanda endotel hücreleri tarafından hücre yüzeyinde ifade edilen zargeçiş (transmembrane) almaçlara bağlanan Thrombospondin-1 ile dengelenebilir (67). Dolayısıyla, bu etmenlerin ifadesi sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir ve Ras ve Myc gibi onkogenlerin çoğalma uyarısına ve anjiyogeneze katkıda bulunduğu dikkati çekmektedir.

### **2.3. Kodlanmayan RNA'lar**

İnsan genomu her bir hücrenin çekirdeğinde üç boyutlu bir yapıyla yerleştirilen 2 m'den fazla lineer DNA'dan oluşur (1). Moleküler biyolojinin merkezi dogması genetik bilgi akışının DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine doğru olduğunu öne sürmektedir. Bununla birlikte son on yılda bu dogma kodlanmayan RNA'ların (ncRNAs) keşfi ile yeni boyutlar kazanmıştır. The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) projesi insan genomunun en az %75'inin RNA'ları kodladığı ve sadece %3'lük bir kısmının protein kodlayan genleri oluşturduğunu ortaya koymuştur (68). Son on yılda en büyük biyolojik keşiflerden biri birçok biyokimyasal hücresel süreçlerde (örn; RNA düzeltme) anahtar roller oynayan kodlanmayan RNA'ların keşfidir ve insan sağlığı ve hastalıkları açısından büyük öneme sahiptir (69).

### **2.4. Kodlanmayan RNA dünyası**

Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) protein kodlamayan RNA transkriptleridir. Ancak bu onların herhangi bir bilgi veya işlev taşımadıkları anlamına gelmemektedir. Kodlanmayan RNA'lara transkripte edilen birçok genomik bölge daha önce genomda 'çöp' olarak değerlendirilmekteydi ve bu bölgelerden yapılan transkripsiyon yazılımsal parazit (transcriptional noise) olarak değerlendirilmekteydi (70). Son on yılda kodlanmayan RNA'ların biyolojik işlevinin ve klinik öneminin anlaşılmasında önemli gelişmeler kaydedildi. Dizileme teknolojileri ve biyoinformatik gelişmeler ile birlikte, endojen küçük müdahaleci RNA (endo-siRNAs), PIWI-etkileşimli RNA (piRNA), küçük çekirdekçik RNA (snoRNA), doğal antisense transkript (NAT), halkasal RNA (circRNA), uzun intergenik kodlanmayan RNA (lincRNA), arttırıcı kodlanmayan RNA (eRNA) ve aşırı korunmuş bölgelerden transkripte edilen RNA'lar (T-UCR) gibi kısa ve uzun kodlanmayan RNA'lar tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (71, 72).

## **2.5. ncRNA'ların sınıflandırılması**

Kodlanmayan RNA'lar transkript büyüklüklerine göre iki büyük sınıfa ayrılmışlardır; kısa ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar. Yeni keşfedilen kodlamayan RNA'ların sınıflandırılması Tablo 1'de özetlenmiştir.

### **2.5.1. Kısa kodlamayan RNA'lar**

Birkaç düzine kısa ncRNA'nın keşfi ile birlikte çeşitliliği en çok artan RNA sınıfı kısa ncRNA'lar olmuştur (74, 75). Bunlar, hücre biyolojisinin temel yönleri için gerekli olan iyi tanımlanmış hamarat ncRNA'lar (taşıyıcı RNA(tRNA) ve bazı ribozomal RNA (rRNA)'lar), splicing RNA'lar (küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar)), küçük transkripsiyon başlatma RNA'ları, promoter ile ilişkili kısa RNA'lar, 3'UTR'den türetilen RNA'lar gibi protein kodlayan gen transkripsiyonuyla ilişkili son zamanlarda gözlenen çeşitli RNA'ları içermektedir (74).

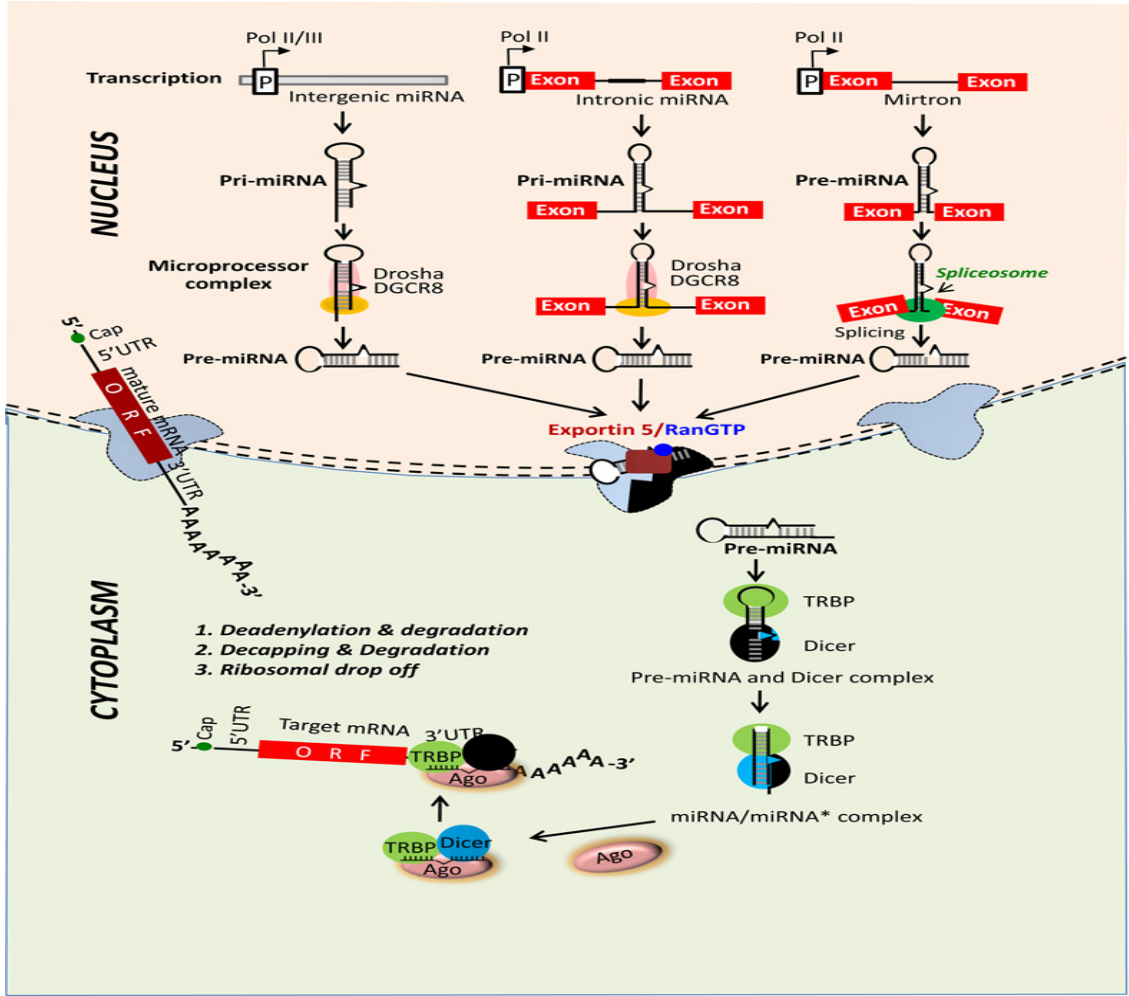
**Tablo 2.1.** Yakın zamanda keşfedilen insan kodlamayan RNA çeşitleri (73).

| Sınıf                | Sembol                                                  | Özellik                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kısa kodlanmayan RNA | MikroRNA                                                | miRNA                                                                                                                   | 18-25 nt uzunluğunda, insan genomunun %1-2'lik kısmını oluşturmakta, protein kodlayan genlerin %50'sini kontrol eden, çevrimsel baskılanmaya kılavuzluk eden ve Drosha ve Dicer enzimine bağımlı küçük RNA molekülleridir. |
|                      | Küçük müdahaleci RNA                                    | siRNA                                                                                                                   | 19-23 nt uzunluğunda, Dicer ile işlenen, kılavuz dizilimin hedef mRNA'yı parçaladığı özgül RNA molekülleridir.                                                                                                             |
|                      | Piwi-etkileşimli RNA                                    | piRNA                                                                                                                   | 26-30 nt uzunluğunda, Piwi proteinleri ile etkileşimli, Dicer bağımlı, esasen germ hücreleriyle ve germ hücrelerine bitişik somatik hücreler ile sınırlanmış küçük RNA molekülleridir.                                     |
|                      | Küçük çekirdekçik RNA                                   | snoRNA                                                                                                                  | 60-300 nt uzunluğunda, çekirdekçikte yerleşik, pre-mRNA intronlarını çıkarmada görevli, snoRNP proteinlerine bağlanan küçük RNA molekülleridir.                                                                            |
|                      | Özendirici bölge ilişkili küçük RNA                     | PASR                                                                                                                    | 20-200 nt uzunluğunda, 5' başlıkları modifiye edilmiş, protein kodlayan ve kodlamayan genlerin yazılımsal başlama bölgelerinde bulunan ve kısa başlıklı transkriptlerdir.                                                  |
|                      | Yazılım başlatıcı RNA                                   | tiRNA                                                                                                                   | ~ 18 nt uzunluğunda, yazılımsal başlama bölgesinin aşağı kısmında yüksek yoğunluk gösteren, GC zengin özendirici bölgelerde tercih edilen küçük RNA molekülleridir.                                                        |
|                      | Sentromer tekrarları ile ilişkili küçük etkileşimli RNA | crasiRNA                                                                                                                | 34-42 nt uzunluğunda, uzun dsRNA'lardan işlenmiş küçük RNA molekülleridir.                                                                                                                                                 |
|                      | Telomer özgül küçük RNA                                 | tel-sRNA                                                                                                                | ~ 24 nt uzunluğunda Dicer bağımlı, 3' uçları 2'-O-methylated, protozoalarda korunmuş ancak henüz insanda tanımlanmamış küçük RNA molekülleridir.                                                                           |
| Pyknons              |                                                         | Değişken uzunlukta, protein kodlayan genlerin çevrilmeyen kısmında, sıklıkla 3' UTR bölgesinde olan RNA molekülleridir. |                                                                                                                                                                                                                            |
| Uzun kodlanmayan RNA | Uzun intergenik kodlanmayan RNA                         | lincRNA                                                                                                                 | Yüzlerce ve on binlerce nükleotid uzunluğunda, iki tane protein kodlayan genin arasında bulunan ve komşu genlerin yazılımsal cis-düzenlenmesinde görevli olabilen RNA'lardır.                                              |
|                      | Uzun intronik kodlanmayan RNA                           |                                                                                                                         | İntron içinde buluna, evrimsel olarak korunmuş ve doku ve hücrlerde özgül ifade gösteren RNA'lardır.                                                                                                                       |
|                      | Telomer-ilişkili ncRNA                                  | TERRAs                                                                                                                  | 100 bp - >9 kb uzunluğunda, birçok ökaryotta korunmuş, C-zengin zincirden sentezlenen, poliadenilasyona uğrayabilen RNA'lardır.                                                                                            |
|                      | İki yönlü işlevi olan uzun kodlanmayan RNA'lar          |                                                                                                                         | Hem protein kodlayan genler gibi hem de düzenleyici RNA'lar gibi özellik gösteren RNA'lardır.                                                                                                                              |
|                      | Pseudogen RNA                                           |                                                                                                                         | Protein kodlayan genlerin özelliklerini kaybetmiş ancak kopyası olan genler, doku özgül olabilirler ve protein kodlayan genlerin düzenlenmesinde görev alabilen RNA'lardır.                                                |
|                      | Aşırı korunmuş bölgelerde transkripte edilen ncRNA      | T-UCR                                                                                                                   | 200 nt uzun, insan, fare ve sıçanda aşırı korunmuş olan ve intra ve intergenik bölgelerde yerleşik olan RNA'lardır.                                                                                                        |

### 2.5.1.1. Mikro RNA'lar

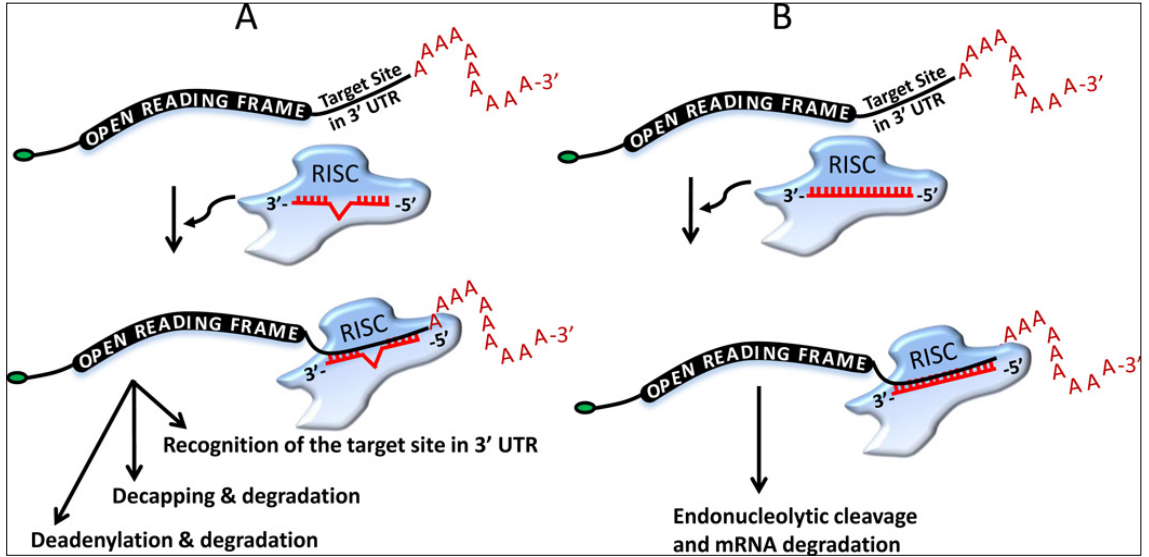
Mikro RNA'lar (miRNA'lar), protein kodlayıcı genlerin mRNA'larının yazılım sonrası baskılanması için mRNA'lar ile tamamlayıcı yapı oluşturan, hayvanlarda ve bitkilerde önemli gen düzenleyici rol oynayan endojen RNA'lardır. Ökaryotlarda gen ekspresyonunun spesifik düzenlenmesinde yer alan 18-25 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş, tek sarmallı RNA molekülleridir (76). Larval gelişim zamanlamasını kontrol eden *C. elegans* genlerinin karakterizasyonu lin-4 ve let-7 RNA'ları olarak bilinen iki küçük düzenleyici RNA'nın keşfedilmesine olanak sağlamıştır (76, 77).

MiRNA'ların hedef yerlerini incelediğimizde, mRNA hedefleri ile tohum dizisi olarak bilinen olgun miRNA'nın 5' bölgesinin doğrudan Watson-Crick baz eşleştirmesi ve kısmen tamamlayıcı mRNA'ların 3'UTR'si ile etkileşirler (78). Tüm insan mRNA'larının üçte ikisinden fazlası, protein kodlayan genlerin ve aynı zamanda uzun kodlamayan transkriptlerin araya giren bölgelerinden (intronlar) kodlanır (79). MiRNA'lar, pre-mRNA'nın alternatif bağlanma durumuna bağlı olarak ekzonlarda veya intronlarda kodlanabilir (80). Buna ek olarak, miRNA'lar, intergenik orijinli olabilir, yani iki gen arasındaki kromozomal bölgede bulunabilir (81, 82). miRNA biyogenezi transkripsiyon ile başlar ve çeşitli aşamalardan sonra olgun miRNA üretilir. MiRNA'lar, kapak yapısı ve poliadenilasyon ile modifiye edilmiş pri-mRNA olarak RNA polimeraz II veya III tarafından transkribe edilirler. Pri-miRNA'nın başlangıçtaki işlenmesi, miRNA'yı saç tokası şeklinde bir pre-miRNA'ya dönüştüren Drosha kompleksi tarafından çekirdekte gerçekleşir. Daha sonra pre-miRNA, Dicer tarafından kesilmek için Exportin-5 / Ran-GTP kompleksi ile sitoplazmaya taşınır. Bunu takiben, hedef mRNA'nın translasyonel baskılanması ya da mRNA yıkımı / deadenilasyonu yoluyla gen susturmasına aracılık etmek için miRNA dubleksinin diziliminden biri miRNA-RISC'yi oluşturmak üzere Ago'ya dahil edilir. Nonkanonik intronik miRNA'lar "mirtronlar", Drosha mikroişlemci kompleksinden bağımsız olan spliceosome tarafından işlenir (Şekil 2.4) (79).

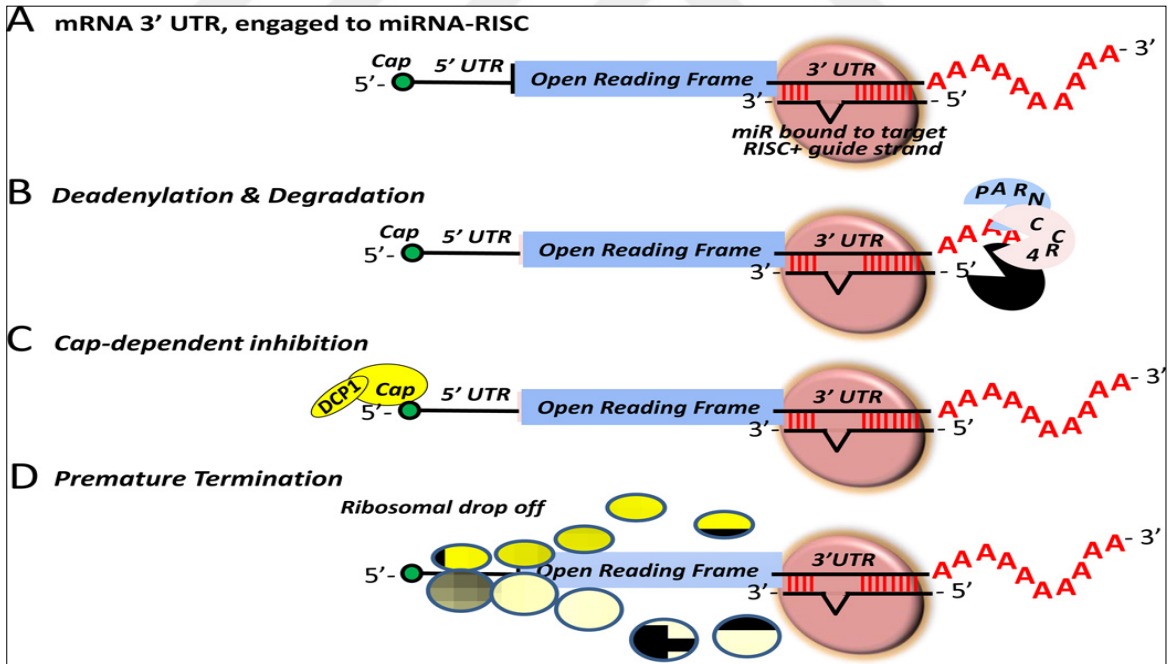


Şekil 2.4. miRNA biyogenezinin genel moleküler mekanizmaları (79).

Özetle, miRNA'lar gen ifadesinin susturulması için birden fazla mekanizma kullanıyor gibi gözüküyor. Bununla birlikte, çalışmaların çoğunluğu iki ana modeli desteklemektedir: (i) başlama veya uzama aşamasında translasyonun baskılanması (Şekil 2.5) ve (ii) mesajın deadenilasyonu ve daha sonra bozulması (Şekil 2.5, 2.6). Bu mekanizmaların birlikte işlev gördüğü ve bir gen veya hücre tipine spesifik bir şekilde düzenlendiği öngörülebilir (79).



**Şekil 2.5.** miRNA'lar ile hedef miRNA'ların ilişkisi. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesi ile kısmi (A) veya mükemmel (B) tamamlayıcı bir yapı oluşturabilir (79).



**Şekil 2.6.** Önerilen miRNA aracılı transkripsiyonel baskı mekanizmaları. (A) RISC ve miRNA ile ilişki kuran bir mRNA'nın 3'UTR bölgesi; (B) CAF1/CCR4/NOT1 kompleks aracılı hedef mRNA deadenilasyonu ve yıkımı; (C) Dcp1 / 2 kompleks aracılı başlık çıkarımı ve (D) aktif olarak transkripsiyona uğrayan polizomların başlama ve uzama aşamalarında ribozom düşmesi ile transkripsiyon baskılanması (79).

miRNA'lar, proliferasyon, apoptoz, invazyon / metastaz ve anjiyogenez gibi kanser biyolojisinin hemen hemen tüm süreçlerinde rol oynar. Transkripsiyonun düzenlenmesine ek olarak, miRNA aracılığıyla gerçekleştirilen yazılım sonrası baskılanma geniş bir gen ağının ifadesinin ince ayarının yapılmasına olanak sağlayarak farklılaşmış durumlara katkıda bulunmaktadır. Kanser gelişimi, bir süre boyunca onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde çok sayıda değişimi içeren çok basamaklı bir süreçtir (83). Yapılan birçok çalışmada zaten kanser patogenezinde yer alan birçok düzenleyici faktör arasında miRNA'ların önemli rollerinin olduğunu göstermiştir. Birçok miRNA'nın bugüne kadar taranan kanserlerin çoğunda onkogenler veya tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Tablo 2 ve 3).



**Tablo 2.2.** Tümör baskılayıcı miRNA'lar (83).

| miR                 | Kromozom                                                                              | Tümör                       | Hedef                        | Notlar                                                                                                                                                                          |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>miR-15/16</b>    | 13q14.2<br>3q25.33                                                                    | KLL                         | BCL2                         | miR-15/16, lösemi hücre hattında BCL2'yi hedefleyerek apoptoza teşvik etmiştir.                                                                                                 |
|                     |                                                                                       | Kolon Kanseri               | COX-2                        | MiR-16, COX-2'yi hedefler; HuR seviyesi arttığında miR-16'nın işlevi antagonize edilir.                                                                                         |
|                     |                                                                                       | Foliküler lenfoma           | CHEK1                        | miRNA profilleri hücre çoğalmasının artması ile ilişkilendirilmiştir ve 'geç' germinal B-hücre fenotipi göstermektedir.                                                         |
|                     |                                                                                       | Fibroblast                  | CEBP $\beta$ , CDC25a, CCNE1 | Hücre döngüsünün yeniden girişi üzerine, miR-16'nın çabuk bozulması, hedef döngüsünün baskılanmasını hafifleterek hücre döngüsünün düzgün şekilde yeniden başlatılmasını sağlar |
|                     |                                                                                       | Kansere ilişkili fibroblast | FGF2, FGFR1                  | Kansere ilişkili fibroblastlarda (CAF) miR-15 ve miR-16'nın düşük ifade edilmesi, tümör büyümesini ve ilerlemesini arttırdı                                                     |
| <b>miR-34</b>       | 1p36.22<br>11q23.1                                                                    | Ovaryan kanseri             | BMI-1                        | MiR-15a / 16 hedefi Bmi-1 düşük hücre çoğalmasına ve klonal büyümeye neden olur.                                                                                                |
|                     |                                                                                       | Kolon kanseri               | SIRT1                        | MiR-34, yalnızca p53 yabanıl tip bağlamda apoptoza yol açan SIRT1'i hedef alır.                                                                                                 |
|                     |                                                                                       | Mide kanseri                | BCL2, NOTCH, HMGA2           | MiR-34 Bcl-2, Notch ve HMGA2'yi hedefler.                                                                                                                                       |
|                     |                                                                                       | Fibroblast                  | MYC                          | Yaşlanma sırasında, miR-34a MYC'yi hedef alır ve bir dizi hücre döngüsü düzenleyicisini kontrol eder.                                                                           |
|                     |                                                                                       | Akciğer kanseri             | AXL                          | MiR-34a ve -199a / b Axl reseptörünü hedefler; Her iki miR özendirici bölge metilasyonuyla susturulur.                                                                          |
| <b>Let-7 ailesi</b> | 9q22.32<br>Xp11.22<br>22q13.31<br>21q21.1<br>19q13.41<br>11q24.1<br>3q21.1<br>12q14.1 | Ovaryan kanseri             | MET                          | MiR-34 MET'i hedefler.                                                                                                                                                          |
|                     |                                                                                       | Akciğer kanseri             | KRAS                         | Let-7 ailesi, C. elegans ve akciğer tümörlerinde let-60 / RAS'ı negatif olarak düzenler.                                                                                        |
|                     |                                                                                       | Burkitt lenfoma             | MYC                          | Let-7'in düzensizliği, Burkitt lenfoma ve diğer MYC-düzensiz kanserlerin oluşumuna ve bakımına katılır.                                                                         |
|                     |                                                                                       | Meme kanseri                | Il6                          | Enflamasyon, epigenetik dönüştürülmüş durumu koruyan bir pozitif geri besleme döngüsünü etkinleştirir.                                                                          |
|                     |                                                                                       | Karaciğer kanseri           | BCL-XL                       | Let-7, Bcl-xL'yi hedef alır ve sorafenib ile uyarılan apoptozu güçlendirir.                                                                                                     |

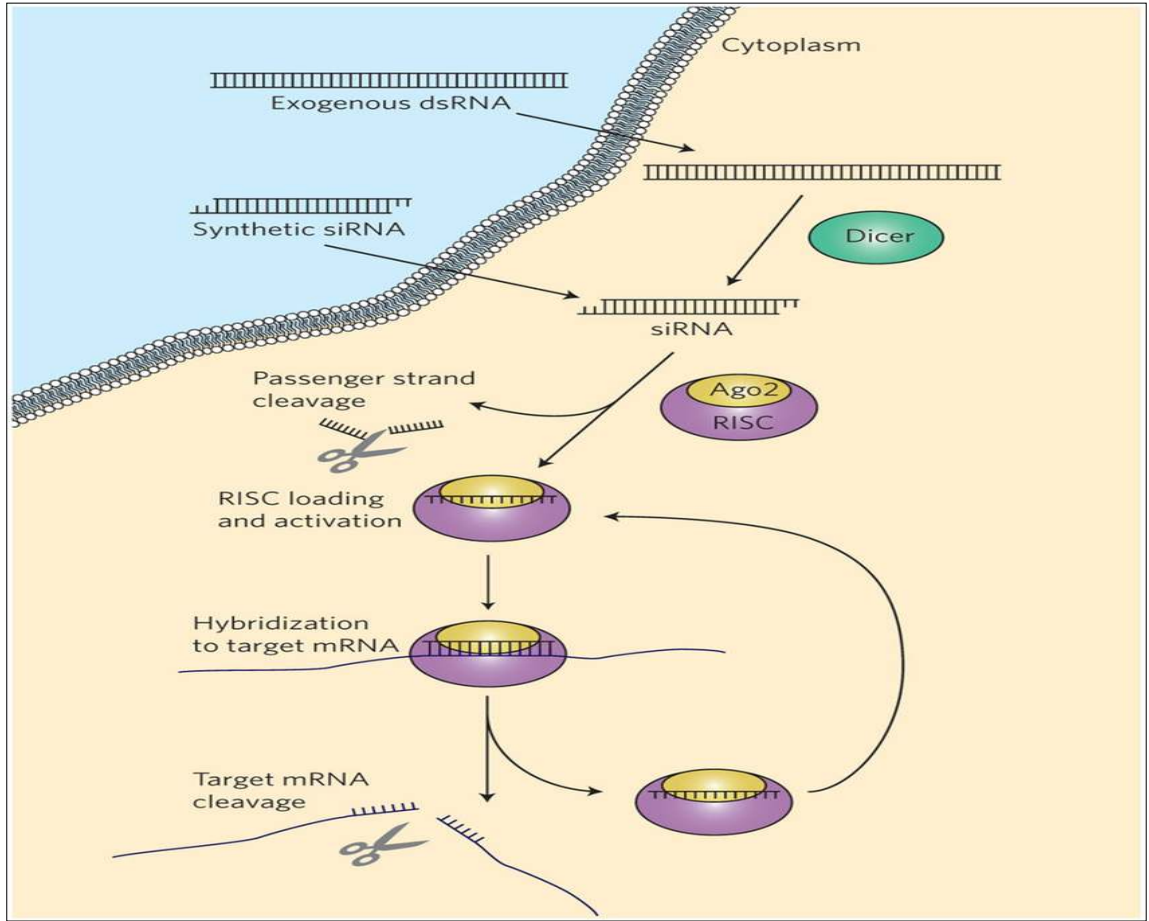
**Tablo 2.3.** Onkogenik miRNA'lar (83).

| miR                | Chromosome | Tumor                                            | Target                  | Notes                                                                                                                                           |
|--------------------|------------|--------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>miR-17-92</b>   | 13q23.1    | Kolon                                            | TSP-1, CTGF             | K-Ras, c-Myc ve p53 ile bozulmuş aktiviteyi birlikte ifade eden kolonositlerde aşırı ifadelenmiştir.                                            |
|                    |            | Prostat kanseri, Burkitt lenfoma, Testis kanseri | E2F2, E2F3              | E2F etmenleri ile miR17 / 92 arasındaki otomatik düzenleme geri besleme döngüsü.                                                                |
|                    |            | Akciğer kanseri                                  | HIF1 $\alpha$           | C-myc, miR-17/92 ve HIF1 $\alpha$ içeren karmaşık ve ince ayarlanmış devre.                                                                     |
|                    |            |                                                  |                         |                                                                                                                                                 |
| <b>miR-222/221</b> | Xp11.3     | Glioblastom, prostat ve tiroit kanseri           | p27(Kip1)               | Yüksek miR-222/221 düşük p27'yi (Kip1) korur ve çoğalmayı uyarır.                                                                               |
|                    |            | Meme kanseri                                     | FOXO3A                  | MiR-222/221, transkripsiyonel seviyede p27'yi (Kip1) bastırmak için FOXO3A'yı hedef alır.                                                       |
|                    |            | Endotel hücreler                                 | KIT                     | MiR-222, endotel hücrelerinin yeni kılcal damarlar oluşturma kabiliyetini kontrol eden c-Kit'i hedefler.                                        |
|                    |            | Glioblastoma                                     | PUMA                    | MiR-221/222 direkt olarak PUMA'yı hedefleyerek apoptozu düzenler.                                                                               |
| <b>miR-21</b>      | 17q23.1    | Meme kanseri                                     | TPM1                    | Mir-21'in bastırılması tümör büyümesini baskılar.                                                                                               |
|                    |            | Glioblastoma                                     | RECK, TIMP3             | Kanserde düzensiz ifade edilen MiR-21'in baskılanması, birden fazla proteinin "fizyolojik" modülasyonu için yeni bir terapötik yaklaşım sağlar. |
|                    |            | Prostat kanseri                                  | MARKS                   | MiR-21 apoptoz direncini, hareketliliği ve istilayı artırır.                                                                                    |
|                    |            |                                                  |                         |                                                                                                                                                 |
| <b>miR-155</b>     | 21q21.3    | Meme kanseri                                     | SOCS1                   | MiR-155, inflamasyon ile kanser arasındaki köprü görevi görebilir.                                                                              |
|                    |            | Lenfositler                                      | C-MAF                   | Bic / microRNA-155 bağışıklık sisteminin homeostaz ve fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır.                                                |
|                    |            | Nazofaringeal karsinoma                          | JMJD1A                  | LMP1 ve LMP2A, JMJD1A'nın baskılanması için miR-155'i etkinleştirir.                                                                            |
|                    |            | Kolon kanseri                                    | hMSH2, hMSH6, and hMLH1 | Uyumsuzluk onarımının etkisizleşmesi, miR-155 tarafından uyarılır.                                                                              |

### **2.5.1.2. Küçük müdahaleci RNA (siRNA)'lar**

Küçük müdahaleci RNA (siRNA)'lar RNA müdahalesi (RNAi) sürecinde mRNA parçalanmasının aracılarıdır (84). Eksojen veya endojen kaynaklı uzun dsRNA'lardan üretilirler (85). RNAi, çoğu ökaryotik hücrede çift sarmallı RNA (dsRNA) görünümüyle tetiklenen korunmuş bir yazılım sonrası gen susturma mekanizmasıdır (86, 87). DsRNA ilk olarak, siRNA çiftleri olarak adlandırılan 2-nt 3'-hidroksil çıkıntılı uçlar ve 5' fosfat ucu ile karakterize 21-23 nt uzunluğunda küçük RNA çiftlerine Dicer tarafından işlenir (88-90). Bunun ardından, substrat mRNA'nın veya tamamlayıcı hedefin dizi özgül kesilimini yönlendirmek için siRNA çift sarmalının bir ipliği RNA ile uyarılan susturma karmaşımına (RISC) dahil edilir (91-93).

Sentetik siRNA'lar çoğunlukla saf, kararlı ve kolayca modifiye edilmiş siRNA'ların üretiminde olanak sağlayan katı-faz kimyasal sentez yöntemleri ile üretilir. Küçük çift iplikli siRNA'lar kılavuz ipliğin RISC'e yüklendiği hücrelere aktarılır. Etkinleştirilmiş bu protein-nükleik asit karmaşımı mükemmel tamamlayıcılık vasıtası ile tek bir hedef mRNA dizisine bağlanarak mRNA'nın bölünmesini ve parçalanmasını sağlayarak gen susturabilir (Şekil 2.7) (94).



**Şekil 2.7.** RNA müdahalesi. Sitoplazmaya giren uzun dsRNA, Dicer enzimi tarafından 3 'uçlarında 2-nt tek sarmal çıkıntılı 22-nt uzunluğunda parçalara işlenir. Sentetik siRNA yapısı Dicer ürünlerini taklit eder. Kılavuz siRNA ipliği RISC'e yüklenir. Diğer iplik Argonaute-2 (Ago2) tarafından parçalanır. Etkinleşen RISC-kılavuz iplik karmaşımı kılavuz ipliğe tamamlayıcı olan hedef mRNA'yı tanır ve parçalanmaya sebep olur. Böylelikle çevrimin önüne geçer ve gen ifadesinin susturulmasını sağlar (94).

### 2.5.1.3. Piwi proteinleri ile etkileşimli RNA (piRNA)

piRNA'lar tipik olarak 24–32 nt uzunluğunda Dicer'dan bağımsız bir mekanizma ile üretilen RNA'lardır. Bu RNA'lar Argonaute protein ailesinden Piwi proteinleri ile karmaşım oluşturabilirler. piRNA'lar 5' ucunda üridin ve 3' ucunda 2'-O-metil modifikasyonu ile karakterizedirler. Bunların ana rolü germ hattı gelişiminde transpozan elementlerin susturulmasıdır (95). Memeli Piwi proteinleri erkek için özellikle spermatogenez için önemlidir (96,97). Son zamanlarda yapılan çalışmalar piRNA'ların kanser oluşumunda da önemli roller oynayabileceğini gösterilmiştir. Mide

kanseri dokularında piR-823 ifadesinin kanserli olmayan dokulardan anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bunun aksine piR-651 seviyesinin mide, kolon, akciğer ve meme kanseri dokularında kontrol grubuna kıyasla aşırı ifade edildiği bulunmuştur. ilginç bir şekilde mide kanserli hastalarda piR-651 ve piR-823'ün periferik kan seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (98, 99).

#### 2.5.1.4. Küçük çekirdekçik RNA'lar (snoRNAs)

snoRNA'lar genellikle 60 ile 300 nt arasında olan RNA'lardır ve hedef RNA'larda bölgeye özgül nükleotid modifikasyonuna kısa baz eşleşmesi vasıtasıyla aracılık ederler (100). 2'-O-ribose-metilasyonuna aracılık eden kutu C/D snoRNA'lar ve pseudoüridilasyona aracılık eden kutu H/ACA snoRNA olmak üzere iki ana sınıf snoRNA mevcuttur (101-104). İlk başlarda snoRNA'ların rollerinin ribozom biyogenezi sırasında RNA modifikasyonu ile sınırlı olduğu düşünülmekteydi. Ama şu anda snoRNA'ların snRNA'lar ve mRNA'ların içerisinde olduğu diğer RNA'ları hedeflediği ortaya konulmuştur (101-105). snoRNA'ların birçoğu protein kodlayan genlerin intronları içerisinde yerleşiktir ve RNA pol II tarafından transkripte edilirler. Bununla birlikte, kodlanmayan RNA öncüllerinin intronik bölgelerinden de sentezlenebilirler (106). Birçok çalışma snoRNA'lardaki değişimlerin kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir. Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.4.** Kanserde rol oynayan snoRNA'ların listesi.

| snoRNA                               | Kanser çeşidi                 | snoRNA işlevi |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------|
| h5sn2                                | İnsan meningiomları           | Baskılayıcı   |
| U50                                  | Prostat kanseri /meme kanseri | Baskılayıcı   |
| snoRD33,snoRD66,<br>snoRD76, snoRA42 | Akciğer kanseri               | Onkogenik     |
| snoRD112-114                         | Promiyelositik lösemi (APL)   | Onkogenik     |

#### 2.5.1.5. Özendirici bölge ilişkili RNA'lar

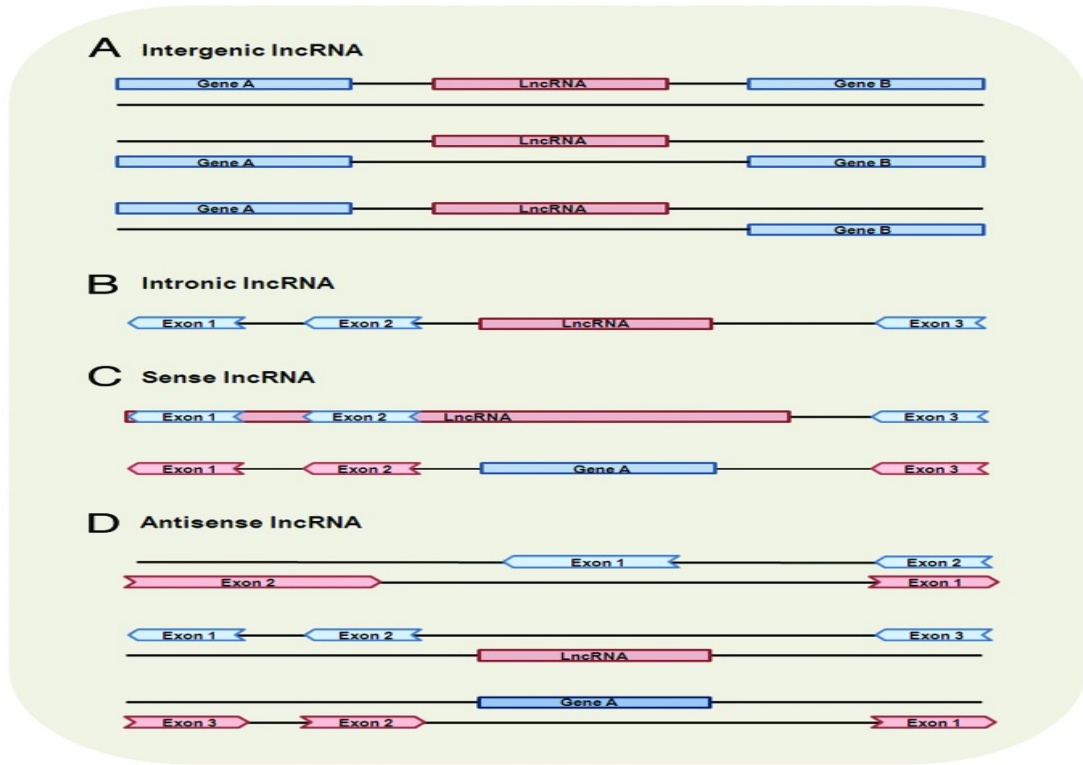
Özendirici bölge ilişkili RNA'lar (promoter-associated RNAs (paRNAs), as promoter-upstream transcripts – PROMPTs olarak da bilinen) (107), yazılımın başlangıç bölgesi ilişkili RNA'lar (108, 109) da bilinen yeni bir ncRNA sınıfı keşfedilmiştir. Uzunlukları 18 ve 200 nt arasında değişmekte olup uzun ve kısa RNA sınıfına girebilmektedirler.

paRNA'lar, potansiyel olarak yazılımı düzenleyebileceği için bunların ifadesinin bozulması kanserin de içinde bulunduğu birçok hastalık ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. paRNA mimiklerinin HeLa ve HepG2 hücrelerine aktarımı insan c-MYC ve bağ dokusu büyüme etmeninin (CTGF) yazılımsal baskılanmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (110). Bundan ayrı olarak paRNA'larının kanserdeki rollerini gösteren birçok çalışma mevcuttur (111-114).

### **2.5.2. Uzun kodlanmayan RNA'lar**

Uzun Kodlanmayan RNA'lar (lncRNAs), protein kodlamayan 200 nükleotidden uzun (veya >100 amino asit açık okuma çerçevesinden yoksun) geniş ve çeşitli transkripte edilen bir RNA sınıfıdır. Protein merkezli dogma protein kodlamayan genom bölgelerini 'çöp' DNA olarak görüyordu. Şimdi birçok lncRNA'nın, biyolojik açıdan önemli işlevleri olan transpozonların, psödogenlerin ve basit tekrarların bu çöp bölgelerinden kopyalanmakta olduğu anlaşılmıştır (2,3). LncRNA'ların büyük çoğunluğu RNA Pol II tarafından sentezlenmektedir. RNA pol II etkinliğinde rol oynayan lncRNA'ların RNA pol III tarafından sentezlendiği gösterilmiştir (115, 116). RNA Pol sentezini takiben her bir lncRNA 5' başlık eklenme, ön-lncRNA splicing ve poliadenilasyon gibi diğer yazılımsal düzenleme işlemlerine tabi tutulur (115). Nihai lncRNA olgunlaşması esasen bireysel lncRNA'ya kendi özgü işlevsel rollerini veren istikrarlı bir ikincil (veya üçüncül) yapının oluşturulmasını içerir (115).

LncRNA'lar genomda protein kodlayan genlere uzaklıklarına göre kategorize edilirler. Buna göre lncRNA'lar bir veya beşten fazla geniş kategoriye ayrılabilirler. (i) protein kodlayan genler ile örtüşen bölgeler içerdiği iplik aynı yönlü ise sense veya karşı sarmalda ise (ii) antisense; (iii) iki yönlü, kendisinin ve karşı sarmaldaki komşu protein kodlayan genin ifade seviyesi genomik yakınlıkta başlatıldığında; (iv) intronik, tamamen ikinci transkriptin intronundan sentezlendiğinde, (v) intergenik, iki gen arasındaki genomik bölgede yer alıyorsa (Şekil 2.8) (117, 118).

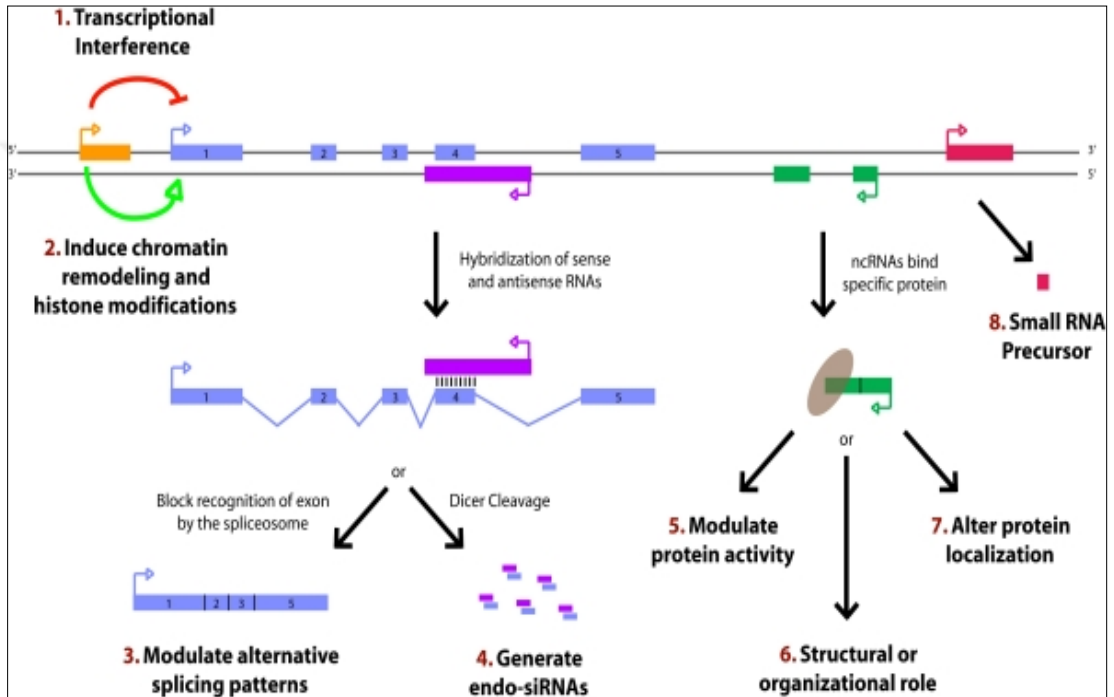


**Şekil 2.8.** lncRNA'ların genomik yerleşimi. Protein kodlayan genler ve ekzonları mavi renk ile gösterilirken lncRNA'lar ve ekzonları kırmızı renk ile gösterilmiştir. (A) İntergenik lncRNA, intergenik olarak her iki iplikten sentezlenebilmektedir. (B) İntronik lncRNA, tamamıyla protein kodlayan genlerin intronlarından sentezlenmektedir. (C) Sense lncRNA, protein kodlayan genlerin sense ipliğinden sentezlenmektedir ve protein kodlayan genlerin ekzonlarını içermektedir, protein kodlayan genler ile örtüşen bölgeler içermekte veya intron aracılığıyla protein kodlayan bütün dizilimini içermektedir. (D) Antisense lncRNA, protein kodlayan genlerin karşı sarmalından sentezlenmektedir. Ekzonik ve intronik bölgeleri ile örtüşmekte veya intron ile protein kodlayan genin tamamını içermektedir (117).

### 2.5.2.1. lncRNA'ların işlevleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ncRNA'ların ne kadar süre çalıştığına dair çeşitli düzenleyici paradigmlar tanımlanmıştır. Yukarı yönde kodlanmayan RNA'nın özendirici bölgesinden yazılım negatif (i) veya pozitif (ii) aşağı yönde bulunan genin ifadesini sırasıyla RNA Pol II'nin o bölgeye gelmesini ve kromatin yeniden şekillenmesini baskılayarak etkiler. (iii) Bir antisense transkript örtüşen sense transkript ile hibridize olma yeteneğine sahiptir ve splisozom tarafından kaynaşım bölgelerinin tanınmasına engel olur. Dolayısıyla alternatif splicing neden olur. (iv) Alternatif olarak,

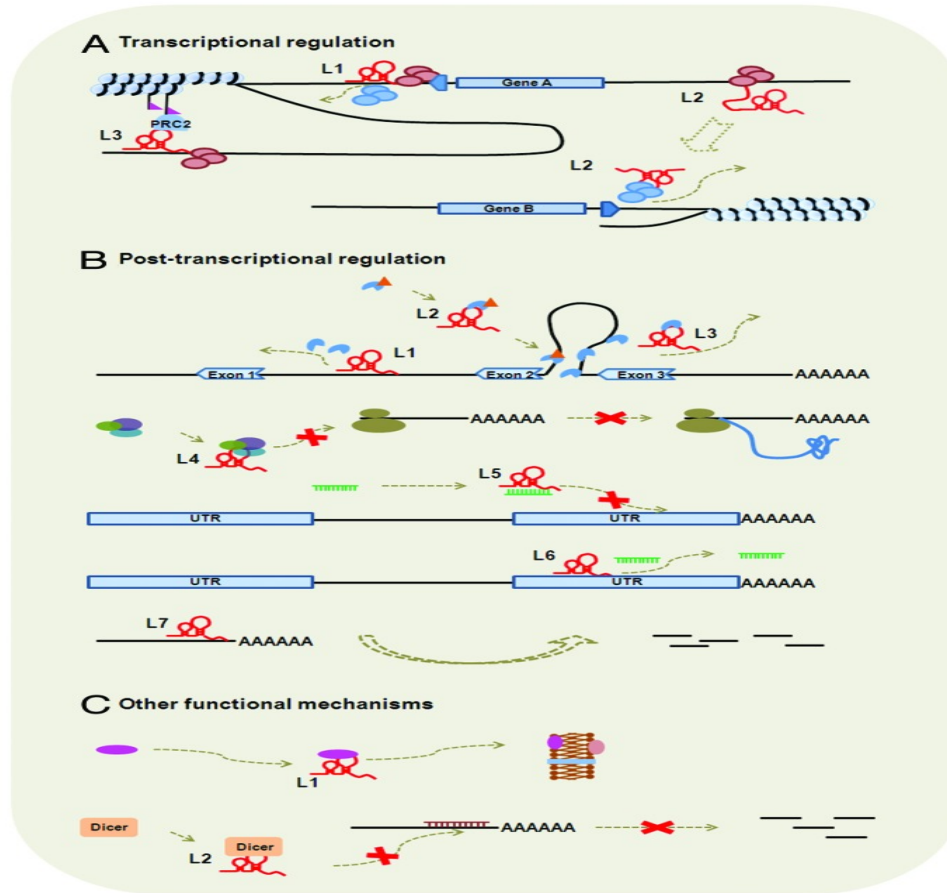
sense ve antisense transkriptlerin hibridizasyonu Dicer'ın endojen siRNA üretmesine olanak sağlar. Özgül protein eşlerine bağlanarak bir kodlanmayan transkript proteinin etkinliğini değiştirebilir (v), daha büyük bir RNA-protein karmaşımının oluşmasına izin veren yapısal bir bileşen olarak görev yapabilir (vi) veya proteinin hücre içerisindeki yerleşimini değiştirebilir (vii). (viii) Uzun ncRNA'lar, miRNA'lar, piRNA'lar ve diğer iyi karakterize edilmemiş küçük RNA'ları üretmek için işlenebilirler (Şekil 2.9) (119).



**Şekil 2.9.** Uzun ncRNA'ların nasıl çalıştığını gösteren paradigma (119).

### 2.5.2.2. İşleyiş mekanizmaları

LncRNA'ların çok çeşitli hücresel moleküler işlevlerde yer aldığı düşünülmektedir. İşleyiş mekanizmalarına göre, LncRNA'lar, yazılımın düzenlenmesi, yazılım sonrası düzenlenme veya diğer işlevler olmak üzere kabaca üç gruba ayrılır (Şekil 2.10) (117).



**Şekil 2.10.** LncRNA'ların işlevsel mekanizmaları. LncRNA, "L" harfiyle ve eklenen bir sayı ile temsil edilmiştir. (A) Yazılımsal düzenleme: Cis-lncRNA (L1 ve L3) ve trans-lncRNA (L2) örnekleri. L1 gen A'nın promotör bölgesinden kopyalanır ve gen A'nın promotörüne bağlanması, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını bloke eder ve böylece A geninin transkripsiyon başlama işlemine etki eder. L2, uzak bir bölgeden transkripsiyon faktörü veya RNA polimeraz ile etkileşim yoluyla gen B'nin transkripsiyonunu etkiler. Dolayısıyla, L1 ve L2 de transkripsiyonel müdahale vasıtasıyla işlev görürken, L3 kromatin modifikasyonu ile işlev görür. (B) Yazılım sonrası düzenleme: L1, L2 ve L3'ün hepsi gen splicing'e etki eder. L4, translasyonu inhibe etmek için translasyon faktörleri ile etkileşime girer. L5 ve L6, miRNA'lar ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşim kurabilir iki ceRNA örneğidir. L5, miRNA'ya bağlanır ve böylece miRNA'nın hedef mRNA'nın 3'UTR'ye bağlanmasını engeller. L6, hedef mRNA'nın 3'UTR'sine bağlanır. Bu da, miRNA'nın hedef gene bağlanmasını bloke eder. L7, mRNA'nın bozunmasını teşvik etmek için doğal antisens inhibitörü olarak görev yapmaktadır. L1, protein taşınmasında yer alır ve L2, RNA girişimini etkilemek için Dicer'e bağlanır. L1, protein taşınmasında yer alır ve L2, RNA müdahalesine etki etmek için Dicer'e bağlanır (117).

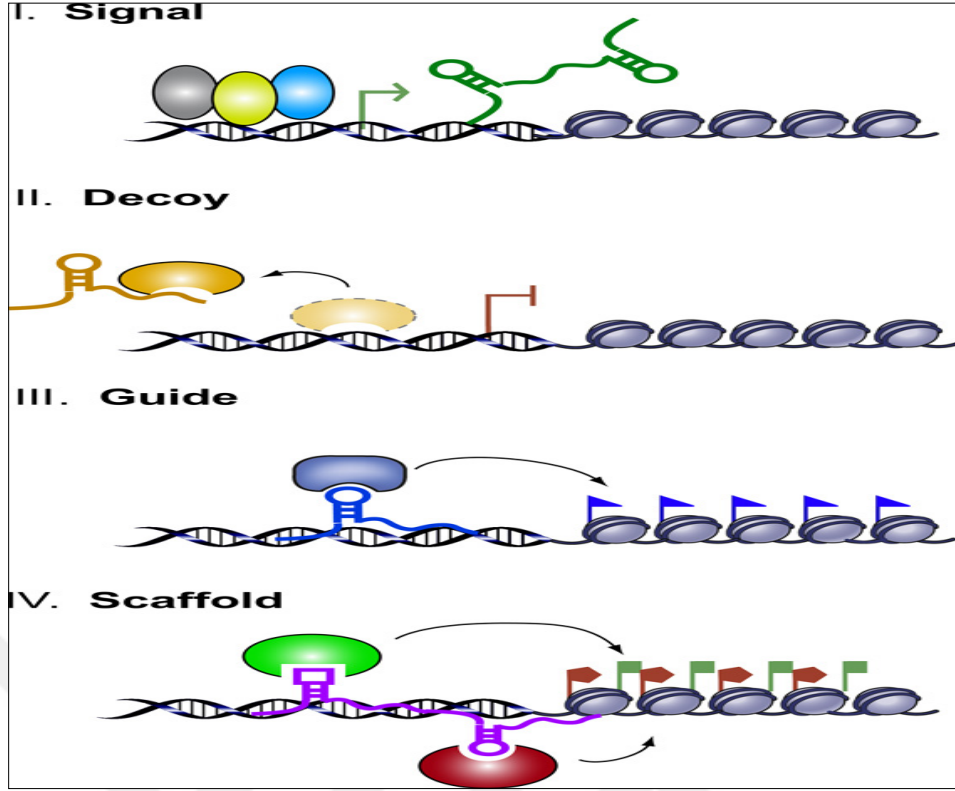
**Yazılımsal düzenleme:** Yazılımsal müdahale (örneğin; DHFR upstream transcripts, SRG1 RNAs, 7SK snRNA, B2 SINE RNA) ve kromatin yeniden şekillenmesi (örneğin; fbp1 (fructose-1,6-bisphosphatase-1) promoter RNAs, Xist, MEG3, GAL10-ncRNA, HOTAIR, HOTTIP and COLDAIR) yoluyla gen transkripsiyonunu düzenleyen çok sayıda lncRNA vardır. Dolayısıyla, yazılımın düzenlenmesinden lncRNA'lar, işleyiş mekanizmalarına göre alt gruplara ayrılabilirler: (i) yazılımsal girişim ve (ii) kromatin yeniden şekillenmesi (Şekil 2.10 A).

**Yazılım sonrası düzenleme:** LncRNA'ların yer aldığı iki yaygın yazılım sonrası düzenleme mekanizması vardır: splicing düzenlenmesi ve translasyonel kontrol (Şekil 2.10 B). mRNA splicing'i etkileyen lncRNA'lar, splicing faktörlerine bağlanma veya değiştirme yoluyla veya splicing işlemini engellemek için mRNA dizileri ile doğrudan hibrid oluşturma yoluyla işlev görebilirler (120-123). MIAT (myocardial infarction associated transcript) ~9–10 kb uzunluğunda olan bir lncRNA'dır ve güçlü intron dal noktası dizileri (UACUAAC tekrarları) içermektedir ve splicing ve spliceosomal karmaşım oluşumunu engellemek için SF1'e (bağlanma faktörü 1) bağlanabilmektedir.

**LncRNA işlevinde diğer mekanizmalar:** Yazılımsal düzenlemeye ve yazılım sonrası düzenlemeye ek olarak, LncRNA'lar protein yerleşimi (124, 125), telomer tıpkıyapımı (126), RNA müdahalesi (127) gibi diğer mekanizmalar yoluyla işlev gösterebilir (Şekil 2.10 C).

### 2.5.2.3. LncRNA mekanizmaları

Son zamanlarda lncRNA işlevinde yer alabilecek moleküler mekanizmaların çeşitli türlerini kategorize etmeye çalışılmıştır. LncRNA'lar, aşağıdaki dört modelden biri veya daha fazlası olarak tanımlanabilir (Şekil 2.11) (128).



**Şekil 2.11.** LncRNA mekanizmasının dört modelinin şematik gösterimi. Model I: Sinyaller olarak, lncRNA ifadesi, transkripsiyon faktörlerinin ya da sinyal yollarının kombinasyonel etkilerini uzay ve zamandaki gen düzenlemesini gösterebilir. Model II: Yıkım olarak, lncRNA'lar, transkripsiyon faktörlerini ve diğer proteinleri kromatin dışına doğru titre edebilir. Model III: Rehberler olarak, lncRNA'lar kromatin değiştirici enzimleri cis veya trans pozisyondaki uzak hedef genlere toplayabilir. Model IV: yapı iskelesi olarak, lncRNA'lar, ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmak için birçok proteini bir araya getirebilir (128).

**Sinyal modeli:** LncRNA'lar moleküler sinyal görevi görebilirler, çünkü bireysel lncRNA'ların transkripsiyonu gelişimsel ipuçlarını entegre etmek, hücrenin içeriğini yorumlamak veya çeşitli uyarılara cevap vermek için çok özel zaman ve yerde gerçekleşir. Bu model lncRNA'lar, işlevsel olarak önemli biyolojik olayların belirteçleri gibi davranabilir (128).

**Yıkım modeli:** Bu lncRNA modeli transkribe edilir ve sonra bir protein hedefini bağlar ve uzaklaştırır, ama başka hiçbir ek işlev göstermez. Muhtemelen bir efektörü olumsuz bir şekilde düzenleyerek hareket eder. Yıkıcılar olarak, lncRNA'lar, miRNA hedef bölgeleri için miRNA'lar ile rekabet edebilir. Gas5, stem-loop yapılarından birinden bir RNA motifi oluşturulması yoluyla glukokortikoid almacını baskılar, böylelikle

Glukokortikoid-sorumlu genlerin promotör bölgelerinde bulunan hormon yanıt elementlerine eşdeğer olan DNA motifini taklit eder (128).

**Rehber modeli:** Bu model lncRNA rehber RNA'dır ve proteinlere bağlanarak lncRNA ribonükleoprotein karmaşımının özgül hedeflere lokalizasyonunu yönlendirir. lncRNA gen ifadesi değişikliklerine cis (komşu genler üzerinde) veya trans (uzakta yerleşik genler) rehberlik ederler ve lncRNA dizisine dayanarak kolayca tahmin edilemez (128).

**Yapı iskelesi modeli:** Yapı iskelesi olarak görev yaparlar. lncRNA'lar, ribonükleoprotein karmaşımlarını oluşturmak için birçok proteini bir araya getirebilir. lncRNA-RNP, histon modifikasyonlarını etkilemek için kromatin üzerinde etki gösterebilir (128).

## 2.6. lncRNA'ların E2F'ler tarafından düzenlenmesi

E2F'ler, hücre döngüsü ilerlemesi için gereken gen ifadesinin zamanında düzenlenmesinde yer aldıkları için en iyi bilinen transkripsiyon faktörleridir (129). E2F ailesinin üyeleri, pRB tümör baskılayıcı aşağı yönde etkileyicileridir. RB/E2F yolağının anormal hücre çoğalmasındaki kritik rolü E2F gen ifadesinde bozukluklara yol açan mutasyonların insan tümörleri arasındaki yaygın insidansı ile dikkat çekmektedir (130). Bu düzenlenmemiş E2F aktivitesi tümör hücrelerinin bir ayırt edici özelliği olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla sonuçlanır. Hücre çoğalmasının temel düzenleyicileri olarak hareket etmenin yanı sıra, E2F'ler, DNA onarımı, farklılaşması ve gelişmesi gibi çeşitli hücresel işlevleri modüle eder (131, 132). E2F ailesinin en az bir üyesi, yani E2F1 apoptozu (129, 133) ve otofajiyi (134-136) tetikleyebilir. E2F1 ile indüklenen apoptoz, hem p53'e bağlı hem de p53'ten bağımsız yollarla gerçekleşebilir (129-132). E2F'lerin hem proliferasyon hem de apoptoz üzerine etkileri uyumlu olarak, E2F1 *in vivo* olarak bağlam-bağımlı bir şekilde bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görür (137). Şu anda, lncRNA'ların E2F1 ile transkripsiyonel olarak düzenlenmesi veya lncRNA'ların E2F1 tarafından düzenlenen biyolojik fonksiyonlarda oynadığı rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Son zamanlarda, E2F1 ve DNA hasarı tarafından aşırı ifadelenen yeni bir lncRNA, ERIC (E2F1 ile düzenlenmiş hücre ölümü önleyicisi) tanımlanmıştır ve ERIC'in baskılanması E2F1 veya bir DNA hasar ajanı tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünü arttırır (11). lncRNA H19'un kendisi,

E2F1'in aşağı yönde S-fazına girişini arttırdığı görülmektedir. Bu da artan büyüme hızı ve tümörigenez ile sonuçlanır (138). Bir başka çalışmada, lncRNA ANRIL, DNA hasarından sonra ATM'ye bağlı şekilde E2F1 transkripsiyon faktörü tarafından yazılımsal olarak aşırı ifade edilir (139).

## **2.7. LncRNA'ların kanserdeki rolleri**

LncRNA'ların, tümör oluşumu, tümör ilerlemesinde, kök hücre pluripotansı, gelişimi, hücre büyümesi ve apoptozisi ve kanser invazyonu ve / veya metastazı gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olabileceğini gösteren çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (140). Bu moleküler aileden gelen en önemli prognostik biyolojik belirteçlerden biri şüphesiz homeobox antisens intergenik RNA'dır (HOTAIR) (141). HOTAIR lncRNA'nın gatrik adenokarsinoma dokularında aşırı ifade seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir (142). Gatrik adenokarsinomlardan ayrı olarak, HOTAIR lncRNA'nın kolorektal kanserde klinik olarak önemli olduğu bulunmuştur (143). HOTAIR hepatocellular karsinomada (HCC) da kötü prognoz ve tümör progresyonu için bir biyolojik belirteç olarak tanımlanmıştır (144-146). Birçok alışmada, HOTAIR'ın meme kanseri ile de korrelasyon gösterdiği bulunmuştur (147, 148).

Kanserde önemli rol oynayan bir başka lncRNA metastaz ile ilişkili akciğer adenokarsinom transkript 1 (MALAT1)'dir (149). Akciğer adenokarsinoma dışında, MALAT1, hepatoselüler karsinom (HCC) gibi diğer tümör türleri ile de ilişkilendirilmiştir (150). MALAT1 lncRNA'nın rolü osteosarkom, rahim endometriyal stromal sarkom, servikal, mesane ve kolorektal kanser dahil olmak üzere diğer birçok tümör modelinde aydınlatılmıştır (4). LncRNA H19, HCC prognozu için güvenilir bir biyobelirteç olarak tanınmıştır (5). H19 lncRNA'nın rolü ayrıca mesane kanserinde de gösterilmiştir (5). Prostat kanseri de onkogenik lncRNA aktivitelerinden doğrudan etkilenmektedir. Kok ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, lncRNA DD3'n prostat tmrl doku örneklerinde yüksek ifade edildiği ortaya konulmuştur (151). Chung ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise prostat kanseri kodlamayan RNA 1 (PRNCR1)'in up-regülasyonu ile prostat karsinom tümörü oluşumu arasında bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir (152). Bir başka çalışmada, prostat kanseri ile ilişkili kodlanmamış transkript 1 (PCAT-1) uzun intergenik kodlamayan RNA'nın tümörün ilerlemesi ile aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Böylelikle, PCAT-1,

prostat kanseri için bir başka potansiyel negatif prognostik biyolojik belirteç olarak tanımlanmıştır (153). LncRNA PTEN pseudogene 1 (PTENP1), prostat ve kolon karsinom tümör modellerinde düşük ifade edilmektedir (154). Diğer tümör baskılayıcı lncRNA'ların, birçok tümör modellerinde prognostik önemi olduğu bulunmuştur. Huarte ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, lncRNA link-p21'in düşük ifadesinin fare sarkom tümör modellerinde, akciğer adenokarsinomu ve lenfomada tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (155). Buna ek olarak, maternal olarak ifade edilen gen (MEG3) lncRNA'nın meningiom ve gliom gibi çeşitli tümör tiplerinde azalan gen ifadesi nedeniyle bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği bulunmuştur (22, 156). Kanserde rol oynayan bazı lncRNA'ların listesi Tablo 5 'te verilmiştir.



**Tablo 2.5.** Kanserde rol oynayan bazı lncRNA'lar (157).

| <b>LncRNA</b> | <b>İşlev</b>                 | <b>Kanser Türü</b>                                  | <b>Kanser Fenotipi</b>                                                                                                            |
|---------------|------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HULC          | Biyobelirteç                 | Hepatoselüler                                       | Bilinmiyor                                                                                                                        |
| PCA3          | Biyobelirteç                 | Prostat                                             | Bilinmiyor                                                                                                                        |
| ANRIL/p15AS   | Onkogenik                    | Prostat, lösemi                                     | Yaşlanmanın INK4A yoluyla bastırılması                                                                                            |
| HOTAIR        | Onkogenik                    | Meme, hepatoselüler                                 | Metastazı teşvik eder                                                                                                             |
| MALAT1/NEAT2  | Onkogenik                    | Akciğer, prostat, meme, kolon                       | Net değil                                                                                                                         |
| PCAT-1        | Onkogenik                    | Prostat                                             | Hücre çoğalmasını destekler; BRCA2'yi baskılar.                                                                                   |
| PCGEM1        | Onkogenik                    | Prostat                                             | Apoptozu baskılar; Hücre çoğalmasını teşvik eder                                                                                  |
| TUC338        | Onkogenik                    | Hepatoselüler                                       | Hücre çoğalmasını ve koloni oluşumunu hızlandırır.                                                                                |
| uc.73a        | Onkogenik                    | Lösemi                                              | Apoptozu baskılar; Hücre çoğalmasını teşvik eder                                                                                  |
| H19           | Onkogenik; Tümör baskılayıcı | Meme, hepatoselüler                                 | Hücresinin büyümesini ve çoğalmasını destekler; cMYC tarafından etkinleşir; Uzamış hücre çoğalması ile aşağı yönlü düzenlenmiştir |
| GAS5          | Tümör baskılayıcı            | Meme                                                | Apoptozu ve büyüme duruşunu uyarır; GR ile uyarılan gen ifadesini önler                                                           |
| linc-p21      | Tümör baskılayıcı            | Akciğer, sarkom, lenfoma fare modelleri             | P53 uyarılmasına aracılık eder; Apoptozu uyarır                                                                                   |
| MEG3          | Tümör baskılayıcı            | Meningiom, hepatoselüler, lösemi, hipofiz tümörleri | P53 uyarılmasına aracılık eder; hücre çoğalmasını baskılar                                                                        |
| PTENP1        | Tümör baskılayıcı            | Prostat, kolon                                      | PTEN'yi baskılayan miRNA'ları bağlar                                                                                              |

## 2.8. Osteosarkomda rol oynayan lncRNA'lar

Osteosarkom, çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen malign kemik tümörüdür. Yapısal kromozom değişiklikleri ile karakterize genetik olarak kararsız ve oldukça malign bir mezenchimal tümörüdür (158, 159). Osteosarkom ağırlıklı olarak ergenlerde ve genç yetişkinlerde görülür ve çocukluk kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturur. Çoğu osteosarkom hastasına 25 yaşın altında teşhis konur ve hastalık erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (160). Bugüne kadar, osteosarkom gelişiminin altında yatan moleküler mekanizma belirsizliğini korumaktadır. Önceki çalışmaların çoğunluğu, önemli bileşenler olarak osteosarkomun ilerlemesi ve metastazında rol oynayan protein kodlayan genlere odaklanmıştır ve kodlanmayan RNA'lar göz ardı edilmiştir. Aynı zamanda, lncRNA'ların osteosarkom osteogenezi, gelişimi, invazyonu, metastazı veya

kemoterapi direncindeki rollerini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Osteosarkomda çeşitli lncRNA'ların gen ifadesinde değişiklikler gözlemlenmiştir. Dong ve ark. MALAT1'in insan osteosarkom dokularında yüksek oranda ifade edildiğini ve ifade düzeyinin pulmoner metastazı ile yakından ilişkili olduğunu bulmuşlardır (161). Üstelik, MALAT1 susturulmasının insan osteosarkom hücresi proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını *in vitro* ve *in vivo* olarak baskıladığını tespit etmişlerdir. Osteosarkomda lncRNA'lara genel bir bakış Tablo 6'da verilmiştir.



**Tablo 2.6.** Osteosarkomda lncRNA'ların genel bir bakış (162).

| LncRNA  | İşlev             | Düşük/yüksek ifade | Düzenleme mekanizması                                                                                                                                                                                                                    |
|---------|-------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H19     | Onkogen           | +                  | H19, Yapı'nın osteosarkom dokuları ve primer osteosarkom hücrelerinde aşırı ifade edilmesi ile uyarılır.                                                                                                                                 |
| MALAT1  | Onkogen           | +                  | MALAT1, osteosarkomun çoğalmasını ve metastazını arttıran bir onkogenik lncRNA olabilir                                                                                                                                                  |
| ANCR    | Onkogen           | +                  | ANCR, hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyerek osteosarkom çoğalmasını teşvik eden bir onkogenik lncRNA olarak işlev yapmaktadır.                                                                                                         |
| HOTAIR  | Onkogen           | +                  | HOTAIR'in aşırı ifade edilmesi, insan osteosarkomunda MMP-2 ve MMP-9 salınımını artırarak tümör büyümesini ve metastazını arttırdı                                                                                                       |
| PACER   | Onkogen           | +                  | PACER'in aşırı ifadesi NF- $\kappa$ B'ye bağımlı bir şekilde COX-2 genini etkinleştirerek osteosarkom hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını arttırdı.                                                                                  |
| SNHG12  | Onkogen           | +                  | SNHG12 ifadesi, primer osteosarkom doku örneklerinde ve bitişik normal dokularda, osteosarkom hücre halleri SAOS-2, MG63, U-2OS'de ve insan osteoblast hücre hattı hFOB(OB3)'de AMOT geninin ifade seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. |
| TUG1    | Onkogen           | +                  | TUG1 osteosarkomlu hastalarda aşırı eksprese edildi                                                                                                                                                                                      |
| MEG3    | Tümör baskılayıcı | -                  | Düşük lncRNA MEG3 ifadesi olan hastalarda daha kısa bir genel sağkalım olduğu görülmüştür. MEG3 osteosarkom hastaların genel sağkalım için bağımsız bir belirleyici olduğu gösterilmiştir.                                               |
| HIF2PUT | Tümör baskılayıcı | -                  | HIF2PUT, osteosarkom kök hücrelerinin yeni bir düzenleyici etmenidir. HIF2PUT, kısmen HIF2 $\alpha$ ifadesini kontrol ederek işlevini yerine getirmiştir.                                                                                |
| TUSC7   | Tümör baskılayıcı | -                  | TUSC7, osteosarkom dokularında önemli derecede düşük ifade edilmektedir.                                                                                                                                                                 |

(+: Yüksek ifade, -: Düşük ifade)

## 2.9. Diğer lncRNA çeşitleri

### 2.9.1. Uzun intergenik kodlamayan RNA'lar

Uzun intergenik kodlamayan RNA'lar (lincRNAs) yeni keşfedilen ncRNA'lardır. Bu alt sınıfın RNA'ları, birkaç yüz ile on binlerce baz arasında değişen uzunluktadırlar ve protein kodlayıcı genlerle çakışmamaları nedeniyle çok dikkat çekmişlerdir. Farklı lincRNA'ların imprinting veya kanser metastazı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığı gösterilmiştir (6, 163, 164). HOTAIR, işlevsel ve mekanik açıdan aydınlatılan ilk

lincRNA'dır (163). Bir HOXC gen kümesinden kopyalanan HOTAIR, trans-etki yoluyla gen ifadesini kontrol eder (163). LincRNA-p21, p21'in yukarı yönünde karşıt iplikten transkribe edilen poliadenilasyona uğramış bir RNA'dır. LincRNA-p21, DNA hasarı ile tetiklenir ve p53 yazılımsal cevabının aşağı yönde düzenleyicisi olarak görev yapar (155). LincRNA-p21, fiziksel olarak 5' ucu ile hnRNP K ile etkileşime girer ve p53 duyarlı apoptotik genleri baskılar (155).

### **2.9.2. Doğal antisens transkriptler (NAT'lar)**

Bunlar, protein kodlayan transkriptlere kısmen veya tamamen tamamlayıcı olan endojen RNA molekülleridir. Genomik orijinlerine göre, aynı genomik bölgeden ancak sense transkriptlere göre karşı sarmaldan transkribe edilen cis-NAT ve farklı genomik bölgeden transkribe edilen trans-NAT'lar olarak ayrılırlar (165, 166). Genellikle sense transkriptlerine kıyasla nispeten düşük düzeyde ifade edilmesine rağmen, NAT'ların protein kodlayan hedeflerinin ifade seviyesini etkili bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir (167). ANRIL, tümör baskılayıcı genler CDKN2A ve CDKN2B'yi kodlayan INK4A-INK4B gen kümesi lokusu tarafından transkribe edilen bir NAT'dır (168). NAT'lar aynı zamanda, splicing gibi yazılım sonrası düzenleme yoluyla gen ifadesini etkiler. Epitelyal-mezenkimal geçiş sırasında, ZEB2 lokusunda bir NAT yazılımsal olarak aktive edilir. Bu ZEB2 NAT, bir iç ribozom giriş bölgesi içeren intronun splicing'ini engeller ve ZEB2 protein ifadesini pozitif olarak düzenler (122). NAT'lar tarafından sense transkriptlerin düzenlenmesi, protein ifadesinin artırılması veya azaltılmasının doğal bir yolunu sağlar (169).

### **2.9.3. Arttırıcı benzeri lncRNA'lar (eRNA'lar)**

Örom ve ark., arttırıcı benzeri lncRNA'ların (eRNA'lar) insan hücre dizilerinde arttırıcıların işlevsel özelliklerine sahip olduklarını bulmuşlardır (170, 171). Bu tip lncRNA'ların (eRNA'lar) ifadesinin azalması, ana transkripsiyon faktörleri TAL1 / SCL, Snail (Snai1) ve Slug (Snai2) da dahil olmak üzere komşu protein kodlayıcı genlerin gen ifadesinin azalmasına neden olmaktadır. Örneğin; ncRNA-a3'ün ifadesinin azalması, hematopoeziste anahtar düzenleyici olan Tal1/ SCL'nin gen ifadesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Buna ek olarak, ncRNA-A7 susturulması hücre yapışması, göçü ve epitel-mezenkimal geçişte önemli bir rol oynayan komşu Snai1 geninin ifadesini azalttığı bulunmuştur (170). Bu bulgular, bu gibi arttırıcı benzeri eRNA'ların

komşu genler için bir yazılımsal aktivatör işlevi sergilediğini göstermektedir. Evf2 lncRNA, Dlx kümesinin gen ifadesini Dlx2 transkripsiyon faktörü ile etkileşim yoluyla düzenleyen diğer bir arttırıcı RNA örneğidir (172). Son zamanlarda, agresif prostat kanserlerinde yüksek seviyede ifade edilen iki lncRNA tanımlanmıştır. PRNCR1 ve PCGEM1 lncRNA'ların androjen reseptörüne bağlanarak yaklaşık olarak 2000 androjen reseptörüne duyarlı genlerin transkripsiyonunu arttırdığı keşfedilmiştir (173).

#### **2.9.4. Aşırı korunmuş bölgelerden transkripte edilen RNA'lar (UCRs)**

Aşırı korunmuş bölgeler (UCR'ler) 200 bp'ten daha uzun korunan genom dizilerinin bir alt kümesine karşılık gelir. Aşırı korunmuş bölgeler insan, sıçan ve fare genomlarının ortolog bölgeleri arasında %100 benzerlikle korunmuştur. Genomik koruma derecesinin yüksek olması genellikle işlevsel önemi olduğunu gösterir, ancak Bejerano ve ark. tarafından tanımlanan 481 aşırı korunmuş bölgenin yarısından fazlası, protein kodlama potansiyeline sahip değildir (174). T-UCR'lerin kanserde önemli roller oynadığı gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Örneğin, insan hepatosellüler karsinomda normal komşu dokulara kıyasla belirgin şekilde artmış olan uc.338 T-UCR, ankorağa bağlı (anchorage-dependent) ve ankorağdan bağımsız (anchorage-independent) hücre proliferasyonunu teşvik eder (175). Hipoksi ile indüklenen bir aşırı korunmuş bölge olan uc.475'nin hipoksik koşullarda hücre çoğalmasını arttırdığı bulunmuştur (176). Buna ek olarak, Ling ve ark. yüksek derecede korunmuş bir "gen çölü" bölgesinden kopyalanan ve kansere bağlı SNP rs6983267 'yi kapsayan CCAT2 olarak adlandırılan yeni bir lncRNA tanımlamışlardır. Son zamanlarda uc.283 + A T-UCR'nin, dizi tamamlayıcısı vasıtasıyla birincil miRNA-195'e (pri-miR-195) bağlanarak miRNA işlemesine müdahale ettiği gösterilmiştir (177). Bu bulgulara rağmen, T-UCR'lerin çoğunluğunun biyolojik aktiviteleri ve işlevsel mekanizmaları halen araştırılmamıştır.

#### **2.9.5. Özendirici bölge ilişkili lncRNA'lar**

Genlerin özendirici bölgeleri transkripsiyon faktörleri ve RNA polimerazlarla etkileşime girerek yazılımı aktive eder (178). Bu lncRNA'lar arasında, CDKN1A TSS'nin 5 kb yukarı yönünden transkribe edilen splicing olmamış 1.5 kb ncRNA PANDA'nın DNA hasarı cevabında işlev gördüğü kanıtlanmıştır (179). İlginç bir şekilde, CDKN1A, hücre döngüsünün durdurulmasına aracılık ederken, PANDA,

transkripsiyon faktörü NF-YA'nın, apoptozu inhibe eden genlerin özendirici bölgelerine bağlamasını önleyerek, DNA hasarına karşı hücre sağkalımını arttırmaktadır (179).

Bu, DNA hasar tepkisini takiben, hem hücre döngüsü durması hem de anti-apoptotik genler (ve muhtemelen diğer işlevlere sahip genler) aynı lokustan indüklenebilir ve karmaşık bir ağ biyolojik fenotipleri belirleyecektir. Başka bir çalışmada, rRNA geni özendirici bölgesine tamamlayıcı bir özendirici bölge ilişkili lncRNA, lncRNA-DNA üçlüsü oluşturmak üzere rRNA genine bağlanır. Bu RNA-DNA üçlüsü, Transkripsiyon Sonlandırma Faktörü 1'in (TTF1) rRNA genine bağlanmasını engeller ve onu susturmak için DNMT3b'yi ortama çağırır (180).

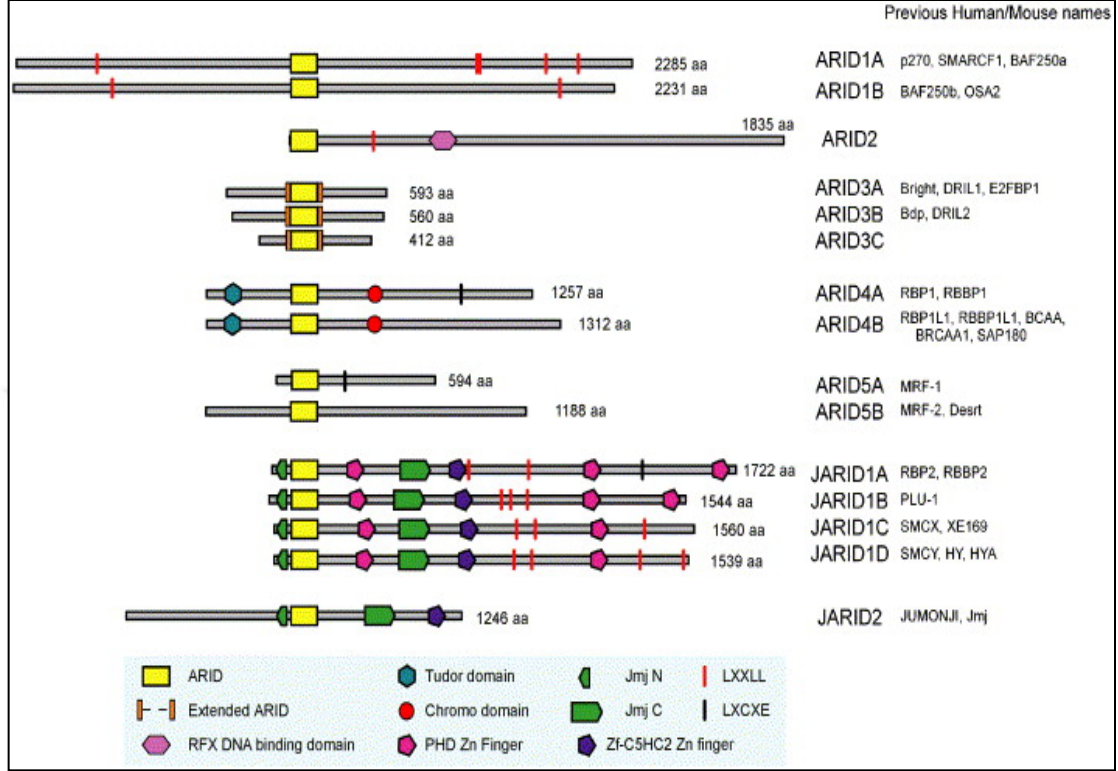
### **2.10. Bükülmüş bir 8q24 genomik bölgesi**

8q24 genom bölgesi sıklıkla, birçok insan kanserinde amplifikasyon, silinme (deletion), viral entegrasyon veya translokasyon ile değiştirilir (181). GWAS (Genome Wide Association Studies) çalışmaları 8q24'ü, SNP'lerin yoğunluğu, kuvveti ve yüksek alel sıklığı nedeniyle kanser ilişkili SNP'ler için sorunlu biri (hotspot) olarak gösteriyor (182). Bununla birlikte, 2 Mb SNP açısından zengin 8q24 bölgesi, MYC proto-onkogeni istisnası dışında, büyük oranda işlevsel olarak açıklanmış genlerin bulunmaması nedeniyle bir 'gen çölü' olarak düşünülmemiştir (183). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, CCAT1, CCAT2, CARLo-5, PVT1, PCAT1 ve PRNCR1 gibi lncRNA'ların bu bölgelerden transkribe edildiğini ortaya koymuştur. Laboratuvarımızda kromozom 8 üzerinde yeni bir lncRNA transkripti bulunmuştur. Uzunluğu 1529 bp'dir.

### **2.11. ARID Ailesi**

ARID (AT-zengin etkileşim bölgesi), tüm sekanslanmış yüksek ökaryotik genomlarda tanımlanan bir milyar yıllık DNA'ya bağlanma bölgesidir (184). ARID uyuşum dizisi, yaklaşık 100 amino asit kalıntısını kapsar ve yapısal çalışmalarda büyük oluk temas yerinin modifiye helix-turn-helix motifi olarak tanımlanmıştır (185-187). Ayrıca, ARID içeren proteinlerin kromatin yeniden şekillenmesi, hücre büyümesi sırasında gen ifadesinin düzenlenmesi, farklılaşma ve gelişim olmak üzere birçok hücresel işlev gösterdiği rapor edilmiştir. ARID ailesi proteinlerinin bir alt kümesi DNA'yı özgül olarak AT-zengin bölgelerinden bağlanır; Geri kalanı DNA'yı özgül olmayan bir biçimde bağlanır. ARID uyuşum dizisi, ilk önce fare B-hücrelerine özgü transkripsiyon faktörü Bright'da tanımlanmıştır (188). Dizi ilişkileri, metazonlarda ARID içeren proteinlerin yedi farklı alt ailesi olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Şekil 2.12 ve Tablo

7’de gösterildiği gibi, memelilerde bunlar ARID1 ila ARID5 ve JARID1 ve JARID2 olarak isimlendirilmiştir.



**Şekil 2.12.** İnsan ARID ailesi proteinleri. Genom dizileme insanlarda 15 adet ARID içeren protein olduğunu ortaya koymaktadır. ARID ailesi proteinleri, ARID bölgesindeki birbirlerine olan benzerliklerine dayanarak alt ailelere gruplanabilir. ARID içeren proteinlerin bir alt kümesi de JmjN ve JmjC bölgeleri içerir ve önerilen isimlendirme bu ilişkileri yansıtır. 15 insan ARID ailesi proteini açık çubuklar ile gösterilmiştir ve ARID dizisinin konumuna göre hizalanmıştır. Diğer iyi karakterize edilmiş bölgelerin ve motiflerin göreceli konumları, şeklin alt kısmında tanımlanan renkli sembollerle gösterilmiştir. Her proteinin amino asit (aa) uzunluğu çubuğun sağında gösterilmiştir (184).

**Tablo 2.7.** İnsan ARID'lerinin isimlendirilmesi (184).

| ARID ailesi | HUGO sınıflandırması (gen/protein) | İnsanda önceki isimleri                                           | Kromozomal yerleşimi |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------|
| ARID1       | <i>ARID1A</i> / ARID1A             | p270, SMARCF1, BAF250a, B120, OSA1, hOsa1, p250, C1orf4, hSWI1    | 1p35.3               |
|             | <i>ARID1B</i> / ARID1B             | pKIAA1235, BAF250b, p250R, hOsa2, hELD/OSA1                       | 6q25.1               |
| ARID2       | <i>ARID2</i> / ARID2               | pKIAA1557, DKFZp686G052                                           | 12q12                |
| ARID3       | <i>ARID3A</i> / ARID3A             | Bright, DRIL1, E2FBP1                                             | 19p13.3              |
|             | <i>ARID3B</i> / ARID3B             | Bdp, DRIL2                                                        | 15q24                |
|             | <i>ARID3C</i> / ARID3C             | LOC138715: similar to E2F binding protein, XM_071061, Bright-like | 9p13.2               |
| ARID4       | <i>ARID4A</i> / ARID4A             | RBP1, RBBP1                                                       | 14q23.1              |
|             | <i>ARID4B</i> / ARID4B             | RBP1L1, BCAA, BRCAA1, SAP180, RBBP1L1                             | 1q42.1–q43           |
| ARID5       | <i>ARID5A</i> / ARID5A             | MRF-1                                                             | 2q11.2               |
|             | <i>ARID5B</i> / ARID5B             | MRF2                                                              | 10q21.2              |
| JARID1      | <i>JARID1A</i> / JARID1A           | RBP2, RBBP2                                                       | 12p11                |
|             | <i>JARID1B</i> / JARID1B           | PLU-1, PUT1, RBBP2H1A                                             | 1q32.1               |
|             | <i>JARID1C</i> / JARID1C           | SMCX, XE169, DXS1272E                                             | Xp11.22–p11.21       |
|             | <i>JARID1D</i> / JARID1D           | SMCY, HY, HYA, KIAA0234                                           | Yq11                 |
| JARID2      | <i>JARID2</i> / JARID2             | jumonji                                                           | 6p24–p23             |

İnsan ve fare ARID ailesi proteinleri, ARID uyuşum bölgeleri içindeki ve bunların tam dizileri (full-length) boyunca dizi benzerliğinin derecesine göre yedi alt aileye gruplanabilir (Şekil 2.12).

### 2.11.1. ARID1A ve ARID1B

Bu proteinlerin ilk alt ailesi ARID1 olarak isimlendirilmiştir. ARID1A ve ARID1B olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır. Bu proteinlerin her biri literatürde çeşitli isimler altında tanımlanmıştır (Tablo 7). Bunlar, memeli SWI / SNF ilişkili kromatin yeniden şekillenme karmaşımının alternatif bileşenleridir (189, 190), ve ARID1A'nın meme ve böbrek tümörlerinde ifadesinin kaybolduğu rapor edilmiştir (189, 191). ARID1A, ARID1B'de tam olarak korunmamış ilave glutamin açısından zengin bölgelere ve birkaç

LXXLL motifine (varsayımsal nükleer hormon reseptör bağlanma bölgeleri) sahip olsada, ARID1A ve ARID1B, ARID içinde %80 benzerdir ve tam uzunluktaki amino asit dizileri boyunca yaklaşık %50 benzerdir (Şekil 2.12).

### **2.11.2. ARID2**

Bu proteinlerin ikinci alt ailesi ARID2 olarak isimlendirilmiştir ve yalnızca bir üyeden oluşmaktadır. İnsan ARID2, DKFZ p686G052 adı altında, maya triplehybrid yöntemi vasıtasıyla siklin A1-CDK1 kompleksinin yeni bir partneri olarak tanımlanmıştır (192). Bu çalışma, özellikle testiste yüksek olmak üzere ARID2'nin geniş ifadesini bildirmektedir.

### **2.11.3. ARID3A, ARID3B ve ARID3C**

Üçüncü memeli ARID alt ailesi ARID3 olarak adlandırılır ve üç üyeden oluşur. ARID3 alt ailesi üyeleri, Drosophila DRI'nın en doğrudan memeli muadilleridir. ARID3A (başlangıçta Bright olarak tanımlanmıştır) ve ARID3B'nin boyutu benzerdir (sırasıyla 75 ve 61 kDa) ve ARID dizilimlerinde %80 özdeşdir. ARID3C daha yakın bir zamanda tespit edilmiş ve daha az çalışılmıştır. İnsan proteininin toplam uzunluğunun 412 amino asit olduğu tahmin edilmektedir. ARID3C, ARID dizisinde ARID3A ve ARID3B'ye yaklaşık olarak %80 oranda benzerdir ve üç protein de kalan amino asit dizisi boyunca yakından ilişkilidir. ARID3 alt ailesi üyeleri doku dağılımı bakımından farklılık gösterir. ARID3A, olgun B hücrelerinde (188, 193) yüksek oranda ifade edilir; burada immünoglobülin ağır zincir intronik arttırıcı EA'yı etkinleştirmek için homeoprotein CUX (CUTL1) 'un yerini değiştirebilir (194). İnsan ARID3A, pRb tarafından kontrol edilen yazılım etmeni E2F1'e bağlanır ve primer murin fibroblastlarında Ras'ın neden olduğu yaşlanmayı baskılar (15). ARID3A'nın aksine, ARID3B geniş bir doku dağılımına sahiptir. ARID3C ifade profili henüz rapor edilmemiştir.

### **2.11.3.1. ARID3A**

ARID3A/BRIGHT/DRIL1/E2FBP1, ARID ailesi DNA-bağlayıcı proteinlerin bir üyesidir. Fare ortologu BRIGHT, B hücresi immünoglobülin ağır zincir transkripsiyonunun düzenleyicisidir (188, 195). Sıçan Bright ifadesi B-hücresi soylarıyla sınırlı olmasına rağmen (188, 196), ARID3A'nın çeşitli dokularda yaygınca ifade edildiği rapor edilmiştir (193, 197), bu da ARID3A'nın diğer dokularda ek biyolojik işlevlere sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda, ARID3A'nın çeşitli hücresel düzenlemelerde rol oynadığını gösteren bir dizi rapor ortaya çıkmıştır. Örneğin, ARID3A, hücre döngüsü kontrolü için gerekli olan bir E2F transkripsiyon faktörü olan E2F-1 (E2FBP1) ile etkileşen bir protein olarak tanımlandı (14). ARID3A, promiyelositik lösemi protein-nükleer cisimlerini (PML-NBs) negatif yönde düzenler ve ARID3A'nın susturulması, PML'ye bağlı erken yaşlanmayı uyarır (198). Buna ek olarak, ARID3A'nın aşırı ifadesi, RAS'ın yol açtığı erken yaşlılığın önüne geçebilir (15). Bu raporlar, ARID3A'nın hücre çoğalmasının idame ettirilmesi için gerekli olduğunu ve onkogenik işlevler ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, farklı çalışmalarda, ARID3A'nın tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. ARID3A DNA hasarını takiben p53'e bağımlı bir şekilde tetiklenmektedir (199). Dahası, transkripsiyonel olarak p21WAF114'ü aktive etmek için p53 ile işbirliği yapar. Şimdiye kadar, ARID3A'nın bir onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı olarak mı görev yaptığı tartışmalıdır.

### **2.11.4. ARID4A and ARID4B**

Dördüncü memeli ARID alt ailesi ARID4 olarak adlandırılmıştır ve ARID4A ve ARID4B olmak üzere iki üye içermektedir. Bu proteinler, ARID bölgelerinde %74 benzerlik göstermektedir ve her protein tam uzunluğu boyunca %40-50 benzerdir. ARID4A, pRb tarafından ortama çağırılan E2F transkripsiyonunun bir baskılayıcı olarak karakterize edilmiştir (200-202). ARID4A yaygın bir şekilde ifade edilmektedir. ARID4B ifadesi normal dokuda oldukça sınırlıdır; sadece testiste bol miktarda ifade edilmektedir. Ancak, ilk olarak insan karsinomalarında sıklıkla dile getirilen bir tümör belirteci olarak gözlemlenmiştir (203).

### **2.11.5. ARID5A ve ARID5B**

Beşinci ARID alt ailesi ARID5, ARID5A ve ARID5B olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır. Her iki protein de, insan sitomegalovirüsünün transkripsiyonel modülatöründe benzer AT-zengin dizilerini bağlama yetenekleri ile karakterize edildi. Bu proteinler ARID sekansları içinde %70'den fazla benzer olmakla birlikte, ARID bölgesi dışında benzer değildirler. ARID dizileri, ARID ailesinin diğer üyelerinden çok, birbirlerine daha fazla benzerlik taşıdıklarından birlikte gruplandırılmıştır (184).

### **2.11.6. JARID1A, JARID1B, JARID1C ve JARID1D**

Altıncı ARID alt ailesi, bu proteinlerin JmjN ve JmjC bölgesi içerdiklerini yansıtacak şekilde JARID1 olarak adlandırılır. JARID1 en büyük ARID alt ailesidir. Dört tane oldukça homolog üye içerir. JmjN ve JmjC bölgeleri, ARID bölgelerini içermeyen en az üç insan proteininde birlikte bulunurken, JmjC yalnız başına birçok başka proteinde mevcuttur (184). Dört JARID1 proteini ARID bölgesinde %80'den fazla amino asit benzerliğine sahiptir ve tam transkript dizileri oldukça benzerdir.

### **2.11.7. JARID2**

Yedinci ARID alt ailesi, JARID2, sadece bir üyeye sahiptir. JARID2, JARID1 alt ailesi ile ortak olan JmjN, JmjC ve çinko parmak -C5HC2 bölgelerine sahip olmakla birlikte JARID1'in üyeleri JARID2'ye göre daha çok birbirine benzediğinden, ayrı bir alt aileye atanmıştır. ARID bölgesinde JARID2, kendi aralarında %80 benzer olan JARID1 grubunun üyelerine yalnızca yaklaşık %25 benzerdir. JARID2 ifadesi, karaciğer ve kalp hücrelerinde gelişimsel olarak önemlidir ve kardiyak miyositlerde siklin D1'in bastırılması için gereklidir; bu, hücrel çoğalmayı düzenleyen bir aktivitedir (204-206).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Hücre hatları ve hücre kültürü

Bu tezde çalışma için 10 hücre hattı seçilmiştir. Seçilen hücrelerin listesi Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Bu hücreler ATCC (American Type Culture Collection, VA, USA)’den satın alınmıştır. hFOB1.19 hariç diğer tüm hücreler 50 U/ml penicillin/streptomisin ve %10 fetal cenin serumu içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Minimum Essential Medium (DMEM) (GIBCO, NY, USA) içerisinde %5 CO<sub>2</sub> 37 °C ‘de kültür edilmiştir. hFOB1.19 hücre hattı 1:1 oranında karışımı hazırlanmış Ham's F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium ile 2.5 mM L-glutamine içeren 0.3 mg/ml G418 ortamda büyütülmüştür. hFOB1.19 hücresi %5 CO<sub>2</sub> ortamda 34 °C’de büyütülmüştür.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.

| No | Hücre İsmi | Hücre tipi | Hücre özellikleri                                                  |
|----|------------|------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1  | MCF7       | Epitel     | Meme, meme bezi ve metastatik bölgeden türevli doku, Adenokarsinom |
| 2  | HCT116     | Epitel     | Kolon, kolorektal karsinom                                         |
| 3  | U2OS       | Osteoblast | Kemik, osteosarkom                                                 |
| 4  | hFOB1.19   | Osteoblast | Kemik, SV40 büyük T antijeni transfekte edilmiş, normal hücre      |
| 5  | A549       | Epitel     | Akciğer, karsinom                                                  |
| 6  | DU-145     | Epitel     | Prostat, metastatik bölgeden türevli doku, karsinom                |
| 7  | HGC-27     | Epitel     | Mide, metastatik bölgeden türevli doku, farklılaşmamış karsinom    |
| 8  | BCPAP      | Epitel     | Zayıf farklılaşmış papiller tiroid karsinomdan (PTC) türevli PTC   |
| 9  | PANC-1     | Epitel     | Pankreas/Duct, karsinom                                            |
| 10 | A-172      | Nöron      | Beyin, Glioblastom                                                 |

#### 3.2. Hücre hatlarından RNA eldesi

Hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaşmasının ardından uygun koşullarda RNA izolasyonu için kaldırılır. Hücre kültüründen RNA eldesi High Pure RNA Isolation

(Roche, Mannheim, Germany) kiti kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyon protokolü şu şekildedir;

- Uygun yoğunluğa ulaşmış hücreler tripsin ile kaldırılır, tripsinin etkisini durdurmak için FCS içeren DMEM eklenir.
- Hücreler 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısım pellet dokunmadan uzaklaştırılır. Kalan pellet 200 µl PBS ile süspanse edilir.
- Bu elde edilen karışım üzerine 400 µl Lysis Buffer eklenerek 15 saniye vorteks yapılır.
- Tüm karışım filtreli tüplere aktarılır, 9200 rpm'de 30 sn santrifüj edilir. Alt kısım atılır.
- Filtreli tüplere 100 µl (10 µl DNase ve 90 µl DNase incubation buffer) DNase karışımı eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında beklenir.
- 500 µl Wash Buffer I eklenerek 30 saniye 9200 rpm'de santrifüjlenir. Alt kısım atılır.
- 500 µl Wash Buffer II eklenerek 30 saniye 9200 rpm'de santrifüjlenir. Alttaki tüp yenisi ile değiştirilir.
- Tekrardan 200 µl Wash Buffer II eklenerek 2 dakika 11800 rpm'de santrifüjlenir. Alttaki tüp atılır ve yeni bir tüp yerleştirilir.
- 50 µl Elution Buffer eklenir ve 1 dk oda sıcaklığında beklenir. 9200 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır. Filtreli tüp atılır.
- RNA miktarını belirlemek için NanoDrop 1000 'de ölçüm yapılır.
- RNA'lar çalışma sürecine kadar -80 °C'de saklanır.

**Tablo 3.2.** Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları gösterilmiştir.

| No | Hücre ismi | ng/μl | 260/280 | No | Hücre ismi | ng/μl | 260/280 |
|----|------------|-------|---------|----|------------|-------|---------|
| 1  | MCF7       | 1502  | 2,07    | 6  | DU-145     | 814   | 2,06    |
| 2  | HCT116     | 1451  | 2,05    | 7  | HGC-27     | 668   | 2,12    |
| 3  | U2OS       | 761   | 2,06    | 8  | BCPAP      | 588   | 2,09    |
| 4  | hFOB1.19   | 336   | 2,02    | 9  | PANC-1     | 263   | 2,05    |
| 5  | A549       | 329   | 2,07    | 10 | A-172      | 1646  | 2,05    |

Bu çalışmada hücre hatlarının yanı sıra 20 farklı insan dokusundan elde edilen RNA örneği kullanılmıştır. Doku RNA paneli Clontech (#636643, Human Total RNA Master Panel II, Clontech Laboratories) firmasından alınmıştır. Bu paneldeki RNA'lar 1 μg/μl konsantrasyonundadır. Paneldeki RNA'lar Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.3.** RNA panelinde bulunan doku türleri.

| No | Doku              | No | Doku          |
|----|-------------------|----|---------------|
| 1  | Kalp              | 11 | Prostat       |
| 2  | Kemik iliği       | 12 | İskelet kası  |
| 3  | Beyin, serebellum | 13 | Dalak         |
| 4  | Beyin (tüm)       | 14 | Tiroid bezi   |
| 5  | Fetal beyin       | 15 | Timus         |
| 6  | Fetal karaciğer   | 16 | Uterus        |
| 7  | Böbrek            | 17 | Kolon         |
| 8  | Karaciğer         | 18 | İnce bağırsak |
| 9  | Akciğer           | 19 | Mide          |
| 10 | Plasenta          | 20 | Adrenal Bez   |

### 3.3. Tek Sarmal cDNA Sentezi

RNA izolasyonu yapılan örneklerden ve doku RNA'larından tek sarmal cDNA sentezi Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1652 (Thermo Scientific) ile yapılmıştır (Tablo 3.4). Hücre kültürü örneklerinden son konsantrasyonda 2 μg/μl RNA olacak şekilde ve doku RNA'larından ise son konsantrasyonda 1 μg/μl RNA olacak şekilde RNA eklenerek cDNA sentezi yapılmıştır.

**Tablo 3.4.** cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.

| Bileşen                                                                                                | Miktar |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Random Hexamer Primer, (100 µM)                                                                        | 1 µl   |
| 10 mM dNTP karışımı                                                                                    | 1 µl   |
| dH <sub>2</sub> O                                                                                      | *      |
| RNA                                                                                                    | **     |
| <b>Toplam</b>                                                                                          | 15 µl  |
| 5X RT Tampon<br>(250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl,<br>15 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT) | 4 µl   |
| Maxima H Minus Enzim karışımı                                                                          | 1 µl   |
| <b>Toplam karışım</b>                                                                                  | 20 µl  |

\* Tablo 3.2'deki RNA miktarlarına göre toplam karışımdaki RNA miktarları 2 µg/µl olacak şekilde her örnek için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tablo 3.3'deki doku RNA panel için 1 µg/µl olacak şekilde hesaplanmıştır.

\*\* Toplam karışım 15 µl olacak şekilde RNA miktarlarına göre nükleaz içermeyen distile su eklenmiştir.

Karışımları hazırlanan örnekler Sensquest PCR cihazında Tablo 3.5'de gösterildiği şekli ile RT-PCR tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.5.** cDNA sentezi tepkime koşulları.

| Aşama               | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) |
|---------------------|---------------|------------|
| İnkübasyon          | 25            | 10         |
| Enzim aktivasyonu   | 50            | 30         |
| Enzim inaktivasyonu | 85            | 5          |

Elde edilen tek sarmal cDNA örnekleri, dondurma çözme işleminin tek sarmal DNA üzerine bozucu etkisinin önüne geçilmesi amacı ile 0,2 ml'lik PCR tüplerine belirli miktarlarda bölünmüştür. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.4. 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 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) geni seçilmiştir. Primerler NCBI veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Tasarımı yapılan primerlerin forward ve reverse dizilimleri, ürün boyutu ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

**Tablo 3.6.** Çalışılacak ilgili genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimlerinin özellikleri (F:Forward, R:Reverse).

| Primer Adı | Primer dizilimi        | Ürün boyutu (bp) | T <sub>m</sub> (°C) |
|------------|------------------------|------------------|---------------------|
| ARID3A-F   | CAACAAGAAGCTGTGGCGTG   | 259              | 60.3                |
| ARID3A-R   | TAGCTTGGGTGAGGAGAGCA   |                  |                     |
| ERICD-F    | AGCCTGTGGCTACCTCCTTT   | 149              | 57                  |
| ERICD-R    | CTTGCAACCCATATGCAGACA  |                  |                     |
| GAPDH-F    | AGACCACAGTCCATGCCATCAC | 456              | 62                  |
| GAPDH-R    | GGTCCACCACCCTGTTGCTGT  |                  |                     |

### 3.5. Kısmi Miktarlara Dayalı RT-PCR Analizleri

#### ARID3A ve ERICD’nın primer optimizasyonu ve RT-PCR koşulları

Primer optimizasyonu için, hem ARID3A hem de ERICD için gradient PCR yapılmıştır. ARID3A ve ERICD için gradient PCR koşulları Tablo 3.7’de gösterilmiştir. Her iki gen için optimum bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra uygun sıcaklıkta PCR gerçekleştirilmiştir. ARID3A ve ERICD genleri için RT-PCR bileşenleri Tablo 3.8’deki gibidir. Aynı zamanda ARID3A ve ERICD genleri için RT-PCR tepkime koşulları Tablo 3.9. ve 3.10’daki gibidir.

**Tablo 3.7.** Gradient PCR tepkime sıcaklık koşulları (ARID3A ve ERICD için).

|                  | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) | Tekrar sayısı |
|------------------|---------------|------------|---------------|
| İlk Denaturasyon | 95            | 03:00      | 1             |
| Denaturasyon     | 95            | 00:30      |               |
| Bağlanma         | 56-61         | 00:30      | 35            |
| Polimerizasyon   | 72            | 00:45      |               |
| Uzama            | 72            | 10:00      | 1             |
|                  | +4            | $\infty$   |               |

**Tablo 3.8.** RT-PCR bileşen ve miktarları (ARID3A ve ERICD için).

| Bileşen                 | Miktar (µl) |
|-------------------------|-------------|
| Saf su                  | 14,875      |
| 10X PCR tamponu         | 2,5         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2           |
| 2 mM dNTPs              | 2,5         |
| İleri primer (F) 10 pM  | 1           |
| Geri primer (R) 10 pM   | 1           |
| 5 U/µl Taq polimeraz    | 0,125       |
| cDNA                    | 1           |
| <b>Toplam hacim</b>     | <b>25</b>   |

**Tablo 3.9.** ARID3A'nın RT-PCR tepkime koşulları.

|                  | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) | Tekrar sayısı |
|------------------|---------------|------------|---------------|
| İlk Denaturasyon | 95            | 03:00      | 1             |
| Denaturasyon     | 95            | 00:30      |               |
| Bağlanma         | 60,3          | 00:30      | 35            |
| Polimerizasyon   | 72            | 00:45      |               |
| Uzama            | 72            | 10:00      | 1             |
|                  | +4            | $\infty$   |               |

**Tablo 3.10.** ERICD'nın RT-PCR tepkime koşulları.

|                  | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) | Tekrar sayısı |
|------------------|---------------|------------|---------------|
| İlk Denaturasyon | 95            | 03:00      | 1             |
| Denaturasyon     | 95            | 00:30      |               |
| Bağlanma         | 57            | 00:30      | 35            |
| Polimerizasyon   | 72            | 00:30      |               |
| Uzama            | 72            | 10:00      | 1             |
|                  | +4            | ∞          |               |

### 3.6. GAPDH'in RT-PCR koşulları

Hamarat (housekeeping) genler, normal ve patofizyolojik koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde sabit ifade seviyesine sahip genler olarak tanımlanmaktadır. Bu sayede, hamarat genler, gen ifade analizlerinde normalizasyon için kullanılmaktadır. ARID3A ve ERICD geninin farklı hücre soylarındaki ve RNA dokularındaki ifade seviyesinin PCR analizlerinde, GAPDH geni hamarat gen olarak kullanılmıştır. GAPDH geninin çoğaltılması için uygun sıcaklık koşulları ve PCR bileşenleri, Tablo 3.11 ve Tablo 3.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.11.** GAPDH'ın RT-PCR bileşen ve miktarları.

| Bileşen                 | Miktar (µl) |
|-------------------------|-------------|
| Saf su                  | 14,875      |
| 10X PCR tamponu         | 2,5         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2           |
| 2 mM dNTPs              | 2,5         |
| İleri primer (F) 10 pM  | 1           |
| Geri primer (R) 10 pM   | 1           |
| 5 U/µl Taq polimeraz    | 0,125       |
| cDNA                    | 1           |
| <b>Toplam hacim</b>     | <b>25*</b>  |

\*Her tepkime yarım ölçü (toplam 12,5 µl) şeklinde yapılmıştır.

**Tablo 3.12.** GAPDH'ın RT-PCR tepkime koşulları.

|                  | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) | Tekrar sayısı |
|------------------|---------------|------------|---------------|
| İlk Denaturasyon | 95            | 05:00      | 1             |
| Denaturasyon     | 95            | 00:30      |               |
| Bağlanma         | 62            | 00:30      | 30            |
| Polimerizasyon   | 72            | 00:30      |               |
| Uzama            | 72            | 5:00       | 1             |
|                  | +4            | $\infty$   |               |

### 3.7. Sonuçların Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Uygun tepkime koşullarında elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektrik akımı verilerek yürütülmüştür. Agaroz jele PCR ürünleri ile birlikte DNA belirteçleri de eklenerek ürünlerin boyutları tespit edilmiştir. Örnekler 140V'da 45 dk yürütülmüştür, sonrasında UV ışığı altında Fusion V marka görüntüleme cihazında görüntüler alınmıştır.

### 3.8. Real-Time PCR (qPCR) Analizleri

Dokularda ve hücre hatlarında hedef genlerin ifade seviyelerini daha etkili olarak belirlemek için qPCR yapıldı. Bu deney için, Rotor Gene Q (QIAGEN, ) Real-Time PCR cihazı kullanıldı. qPCR deneyleri, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (#K0251) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.13'de qPCR analizi için her bir tüpte bulunacak bileşenler ve miktarları gösterilmiştir.

**Tablo 3.13.** qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.

| Bileşen                                    | Miktar (µl) |
|--------------------------------------------|-------------|
| Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) | 7,5         |
| 10 pM F primeri                            | 0.5         |
| 10 pM R primeri                            | 0.5         |
| Nükleaz içermeyen distile su               | 5,5         |
| cDNA ( $\leq 500$ ng)                      | 1           |
| <b>Toplam</b>                              | <b>15</b>   |

Karışım daha etkin bir analiz sonucu alabilmek için buz kalıbı üzerinde hazırlanmıştır. Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazına ölçüm için gerekli program girilerek cihaz çalıştırılmıştır (Tablo 3.14).

**Tablo 3.14.** qPCR için tepkime koşulları.

| Aşama            | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk)                | Tekrar sayısı |
|------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| UDG - ön muamele | 50            | 02:00                     | 1             |
| İlk denatürasyon | 95            | 10:00                     | 1             |
| Denatürasyon     | 95            | 00:15                     | 40            |
| Bağlanma         | 60            | 00:30                     | 40            |
| Uzama            | 72            | 00:30                     | 40            |
| Melting Curve    | 55-99         | Dakikada 1 derece artarak |               |

### 3.9. siRNA ile Gen Susturma

RNA müdahalesi (RNA interference, RNAi), RNA moleküllerinin hedeflenen mRNA moleküllerini nötralize ederek gen ifadesini veya proteine çevrimi (translation) baskılandığı biyolojik bir süreçtir. RNA müdahalesi için iki çeşit küçük ribonükleik asit (RNA) molekülü mevcuttur: MikroRNA (miRNA) ve küçük müdahaleci RNA (small interfering RNA, siRNA). RNA'lar genlerin direk ürünleridir ve küçük RNA'lar diğer mesajcı RNA (mRNA) moleküllerine bağlanabilir ve onların etkinlikleri arttırabilir veya azaltabilir. Örneğin; mRNA'nın proteine çevriminin önlenmesi veya transkriptin yıkımı. RNAi yolağı, hayvanlarda dahil olduğu birçok ökaryot canlıda bulunmuştur. RNAi yolağı, uzun çift zincir RNA moleküllerini (double-stranded RNA, dsRNA) kısa çift zincir ~20 nükleotid uzunluğunda siRNA parçalarına ayıran Dicer enzimi ile başlar.

Her siRNA, gezgin zincir (passenger strand) ve kılavuz zincir (guide strand) olmak üzere iki tek zincir RNA (ssRNA) olarak açılır. Gezgin zincir yıkılır ve kılavuz zincir RNA ile uyarılan susturma karmaşımına (RNA-induced silencing complex, RISC) girer. Bu durumun bilinen en iyi sonucu, kılavuz zincir, mRNA molekülü ile tamamlayıcı dizilim çiftleri oluşturduğunda RISC karmaşımının katalitik bileşeni Argonaute 2 (Ago2) tarafından kesilime uğrayarak hedef genin yazılım sonrası sessizleşmesidir.

Bu çalışmada, ARID3A ve ERICD'yi hedefleyen siRNA çiftleri ve negatif kontrol (siRNA Universal Negative Control, SIC001-5X1NMOL) çiftleri Sigma-Aldrich marka olarak satın alınmıştır. ARID3A ve ERICD'yi hedefleyen siRNA'ların dizilimleri Tablo 3.15'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.15.** Susturma deneylerinde kullanılacak siRNA'ların dizileri görülmektedir. ERICD için iki siRNA kullanılacaktır.

|                  |                                 |
|------------------|---------------------------------|
| <b>siARID3A</b>  | 5'-AACAGAACUCCUGUGUACAUGAUGC-3' |
| <b>siERICD-1</b> | 5'-AAGCCAGCCUGUGGCUACCUCCUUU-3' |
| <b>siERICD-2</b> | 5'-CCCGUGGCAUCGGCUGUCUGCAUAU-3' |

Hücreye aktarmak için, 37°C'de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerince Lipofectamine RNAiMAX (Katalog Numarası:13778-030, Invitrogen) kullanılarak ters aktarım (reverse transfection) ile gerçekleştirilmiştir. siRNA aktarım protokülü aşağıdaki gibidir.

- Hücreler  $1 \times 10^6$  yoğunluğunda 6 kuyucuklu kaplara ekilmiştir. Hedef gen, negatif kontrol, transfeksiyon ajanının toksik etkisini analiz etmek için sadece transfeksiyon ajanı ve boş kontrol olmak üzere 4 kuyucuk kullanılmıştır.
- 1,5 ml'lik ependorf tüpte 150 µl Opti-MEM® Medium ve 9 µl Lipofectamine® RNAiMAX Reagent hazırlanır ve iyice karıştırılır.
- 1,5 ml'lik ependorf tüpte 150 µl Opti-MEM® Medium ve 3 µl ilgili siRNA (10 µM) hazırlanır ve iyice karıştırılır. (Not: ERICD lncRNA'sı için 5 µl siRNA (10 µM) kullanılmıştır).
- Hazırlanan siRNA ve Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 1:1 oranında karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
- siRNA-lipid karmaşımı ilgili hücreye damla damla akıtılır. 6 kuyucuklu kap '8' çizecek şekilde güzelce karıştırılır.
- 37°C'de 1-3 gün inkübe edilir. Sonra aktarım yapılan hücreler analiz edilir.

**Not:** Transfeksiyon ajanının toksik etkisini belirlemek için 1,5 ml'lik ependorf tüpte 9 µl Lipofectamine® RNAiMAX Reagent ve 150 µl Opti-MEM® Medium karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve hücrelere damla damla verildi.

### 3.10. ARID3A'nın Aşırı İfadelendirilmesi (Overexpression)

Klonlanmış ARID3A ve pozitif kontrolü Tokyo Tıp ve Diş Hekimliği Üniversitesi'nden (Tokyo, Japan) Prof. Masa-Aki Ikeda tarafından temin edilmiştir. Klonlanmış gen pEF\_xpress\_ARID3A olarak adlandırılmıştır. Xpress epitop etiketli ARID3A, ARID3A cDNA'sı (5' primer, 5'-CGCGGATCCATGAAACTACAGGCCGTGATGG-3'; 3' primer, 5'-TGGGAGTGATGCGGTTAAGGTCTAGAATA-3') PCR amplifikasyonu ile üretilmiştir ve ardından PCR-bluntII-TOPO vektörüne klonlandı (Invitrogen). Ortaya çıkan klondan elde edilen BamHI ve XbaI parçaları daha sonra pEF / His-ARID3A'yı oluşturmak üzere BamHI-XbaI ile kesilmiş pEF4 / His vektörüne (Invitrogen) bağlandı. Japonya'dan gönderilen plazmid pEF4 / His vektöründe bulunan klonlanmış ARID3A geni, kesim enzimi kullanılarak doğrulandı ve sonrasında midi için hazırlandı. ARID3A'yı içeren vektörün kesim protokolü Tablo 3.16'da verilmiştir.

**Tablo 3.16.** ARID3A klonlanmış geninin doğrulama protokolü.

| Bileşen                      | Miktar (μl)  |
|------------------------------|--------------|
| Plazmid DNA                  | 0,85 (1μg)   |
| 10X buffer                   | 5,0          |
| BamHI                        | 1,0          |
| XbaI                         | 1,0          |
| Nükleaz içermeyen distile su | 42,15        |
| <b>Toplam</b>                | <b>50,0*</b> |

\*Hazırlanan karışım 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir ve sonrasında kesilen bantlar jelde görüntülenmiştir.

Klonlanan genin ve boş vektörün (pEF4/HisC, pozitif kontrol) aktarımı için hücreler aşağıdaki protokole göre Lipofectamine™ 3000 Reagent (Katalog Numarası: L3000008, Invitrogen) ile ters aktarım yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

-6 kuyucuklu kaplara, her kuyuya  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekim yapılır. Bunlardan birisi hedef gen, birisi pozitif kontrol ve birisi de boş kontrol olarak üç kuyucuk kullanılır.

-1,5 ml'lik ependorf tüp içerisinde 125 μl Opti-MEM® Medium ve DNA (2,5 μg/μL) eklenmiştir. Sonrasında, 5 μL P3000™ Reagent (2 μL/μg DNA) eklenip iyice karıştırılır.

- 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisinde 125 µl Opti-MEM® Medium ve 3.75 µl Lipofectamine™ 3000 Reagent eklenmiştir ve iyice karıştırılır.
- Hazırlanan DNA ve Lipofectamine™ 3000 Reagent karışımları 1:1 oranında eklenerek iyice karıştırılır.
- Karışım 10-15 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- İlgili hücre üzerine damla damla hazırlanan karışım eklenir.
- 6 kuyucuklu kap '8' çizecek şekilde güzelce karıştırılır.
- 37°C'de 1-3 gün inkübe edilir. Sonra aktarım yapılan hücreler analiz edilir.

### 3.11. Göç Deneyleri (Yara İyileşmesi Deneyleri)

Göç, normal gelişimde, immun cevapta ve kanser metastazı ve yangı gibi hastalık süreçlerinde önemli olan ve canlı hücrelerin anahtar bir özelliğidir. Hücre göçünü test eden yöntemler kanser biyolojisi, immünoloji, vasküler biyoloji, hücre biyolojisi ve gelişim biyolojisi gibi birçok biyomedikal araştırma alanları için kullanışlı ve önemlidir (207). Hücre göçünü çalışma yolları arasında hücre yara kapanması deneyi en kolaydır. Bu yöntem, bütün hücre kütlelerinin göçünü ölçmek için yararlıdır. Dahası, hücrelerin göç sırasındaki morfolojik karakteristiklerinin incelenmesi açısından da kullanılabilir (208). Yara kapanması analizi sonrasında birçok fenotip ortaya konulabilir. Zamana göre kapanan uzaklığın ölçülmesi ve bu uzaklığın kontrollere göre kıyaslanması özgül göç değişikliklerini veya daha önce bilinmeyen sorunlu bir göç fenotipini ortaya koyabilir. Ayrıca, tek hücre lamellipodium oluşumu, kuyruk geri çekmesi ve hareket yönü hücrelerde neyin sıkıntılı veya artmış olduğu hakkında bilgi verebilir (208).

Bu çalışmada, konfluent hücre tek tabakası üzerinde oluşturulan çizik ile hücre kültürü yara iyileşmesi deneyi çalışılmıştır. Yara iyileşmesinin hızı ve hücre göçü farklı zaman aralıkları ile sıradan bir inverted mikroskop kullanılarak resimlerinin çekilmesi ile elde edilmiştir. Göç deneyleri, ARID3A ve ERICD siRNA'larının yanında, klonlanmış ARID3A geninin osteosarkoma hücrelerinde etkisinin gösterilmesi amacıyla yapılmıştır. Göç deneyleri (yara iyileşmesi deneyleri) için protokol aşağıda verilmiştir.

- Hücreler %0,25 Trypsin-EDTA çözeltisi ile kaldırıldı. 50 ml'lik santrifüj tüplere hücreler aktarıldı ve santrifüj edildi. Supernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücreler büyüme çözeltisi (media) ile tekrar çözdürüldü.

-6 kuyucuklu kaplara, 24 saat sonra %80 yoğunluğa erişecek şekilde  $1 \times 10^6$  hücre ekildi. Not: Hücre türüne ve kullanılan kuyunun büyüklüğüne bağlı olarak %80 birleşme oranına ulaşmak için zaman ve hücre sayısını belirlemek gerekli olabilir.

-Bu yöntemde doğru (forward) aktarım kullanılmıştır. Ters aktarım ile, bütün protokoller aynı uygulanmıştır. Yalnızca ilgili hücreler 1 gün önceden ekilerek hücrelerin kaplara tutunması beklenmiştir.

-100 µl'lik pipet ucu kullanılarak kültür kaplarının ortasından yukarıdan aşağıya doğru bir çizgi çekilmiştir. Yüzeye zarar verebileceği için pipet ucuyla kültür kabına karşı aşırı kuvvet uygulamamak için özen gösterilmiştir.

-Kültür kapları dikkatli bir şekilde HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Hücre kalıntıları uzaklaştırmak için kapların içindeki çözelti aspire edilmiştir. Kuyucuğun altını örtmek ve tutunmuş hücrelerin ayrılmasını önlemek için kuyu duvarına karşı yavaşça 2 ml DMEM eklenmiştir. Yaranın ortaya çıkması ve incelenmesinin ardından ilk resim çekilmiştir ve kültür kapları inkübatöre konulmuştur

-24 saatlik zaman aralıklarında inkübatörden alınan kültür kaplarının içindeki çözelti uzaklaştırılıp inverted mikroskop altında görüntü alınmıştır ve yara kapanma süreci gözlemlenmiştir.

-Anlık çekilen resimlerin elde edilen sonuçlarla yara iyileşmesi analiz edilmiştir. Bir dağılım grafiği veya çubuk grafiği kullanarak zamanla yara kapanışı analiz edilmiştir ve açık bir şekilde gösterilmiştir.

### **3.12. Koloni Oluşum Deneyleri**

Koloni oluşum deneyi (kolojenik deney), tek bir hücrenin koloni oluşturma kapasitesi esasına dayalı in vitro hücre sağkalım deneyidir (209). Koloni 50 hücreden oluşan hücre topluluğu şeklinde tanımlanır. Bu deney esasında hücre popülasyonundaki her bir hücrenin “limitsiz” bir şekilde bölünme kapasitesini test etmektedir. Koloni oluşum deneyi, iyonize radyasyonun yanı sıra hedef genlerin aşırı ifade edilmesi veya susturulmasının hücre kültüründe çoğaltılan farklı hücre hatlarında etkisinin araştırılması için tercih edilen bir yöntemdir. Ekilen hücrelerin yalnızca bir kısmı koloni üretme kapasitesi gösterir.

U2OS hücrelerine 6 kuyucuklu kaplar kullanılarak siARID3A, siERICD, siRNA negatif kontrolleri, pEF\_xpress\_ARID3A, pEF4/ His vektörünün (pozitif kontrol) aktarımı yapılmıştır. 24 saat transfeksiyon sonrasında yeni bir 6 kuyucuklu kaplara, her kuyuya ilgili hücreden 100,000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 2 ml DMEM eklenerek inkübatörde kültür edilmiştir. Besi yeri her üç günde bir değiştirilmiştir. Bir hafta sonrasında besi yeri uzaklaştırılmıştır ve PBS ile iki kez yıkanmıştır. Sonrasında, 2 ml %70'lik etanol ile oda sıcaklığında 30 dk hücreler fıkse edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmıştır. 2 ml %0,5'lik kristal viyole eklenerek oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. Koloniler görünür hale gelinceye kadar dH<sub>2</sub>O ile yıkama yapılmıştır. Kuruduktan sonra, fotoğraf çekilerek koloniler ışık mikroskobu altında sayılmıştır.

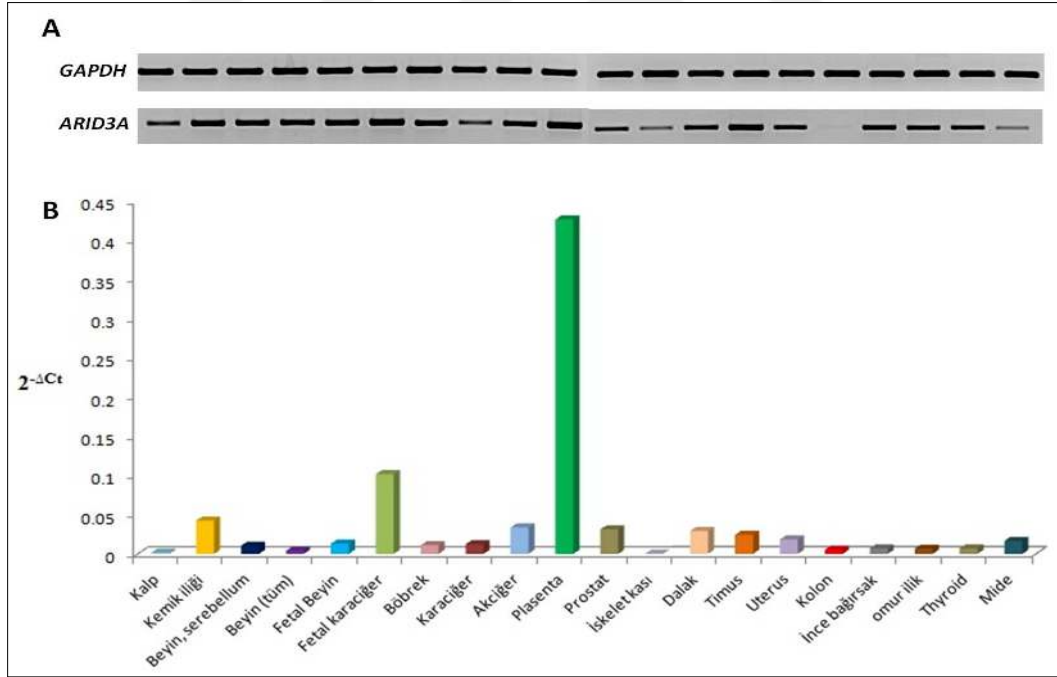


## 4. BULGULAR

### 4.1. Gen İfadesi Sonuçları

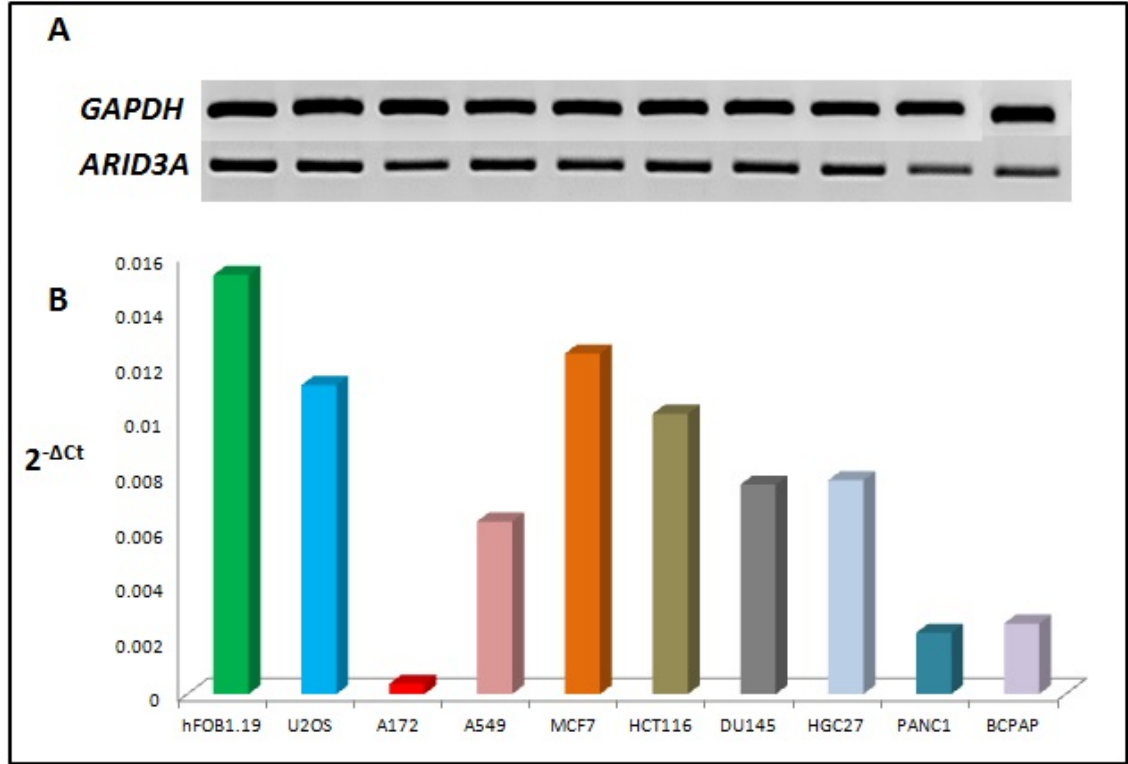
#### 4.1.1. Farklı doku ve hücre hatlarında ARID3A'nın gen ifade sonuçları

ARID3A'nın ifade seviyesi 20 farklı insan dokusunda analiz edilmiştir. Gen ifadesi analizleri hem kısmi-miktarlara dayalı PCR hem de Real-Time PCR yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). ARID3A, normal dokular arasında en fazla plasentada ifade edilirken bunu takiben fetal karaciğer, kemik iliği, akciğer ve prostat dokularında da fazla ifade edildiği gösterilmiştir. ARID3A kolon, iskelet kası, mide ve karaciğer dokularında ise düşük ifade gösterdiği bulunmuştur.



**Şekil 4.1.** ARID3A ve GAPDH genlerinin farklı dokularındaki ifade seviyeleri gösterilmiştir. **A.** RT-PCR yöntemi ile ARID3A ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, ARID3A geninin ifade seviyesi.

ARID3A'nın ifade seviyesi 10 farklı hücre hattında gösterilmiştir. Gen ifadesi analizleri hem kısmi-miktarlara dayalı PCR hem de Real-Time PCR yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). ARID3A, hücre hatları arasında en fazla osteoblast hücre hattında (hFOB 1.19) ifade edilirken, bunu takiben MCF7, U2OS ve HCT116 hücrelerinde de yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir. ARID3A A172, PANC1 ve BCPAP hücre hatlarında ise düşük ifade gösterdiği bulunmuştur.



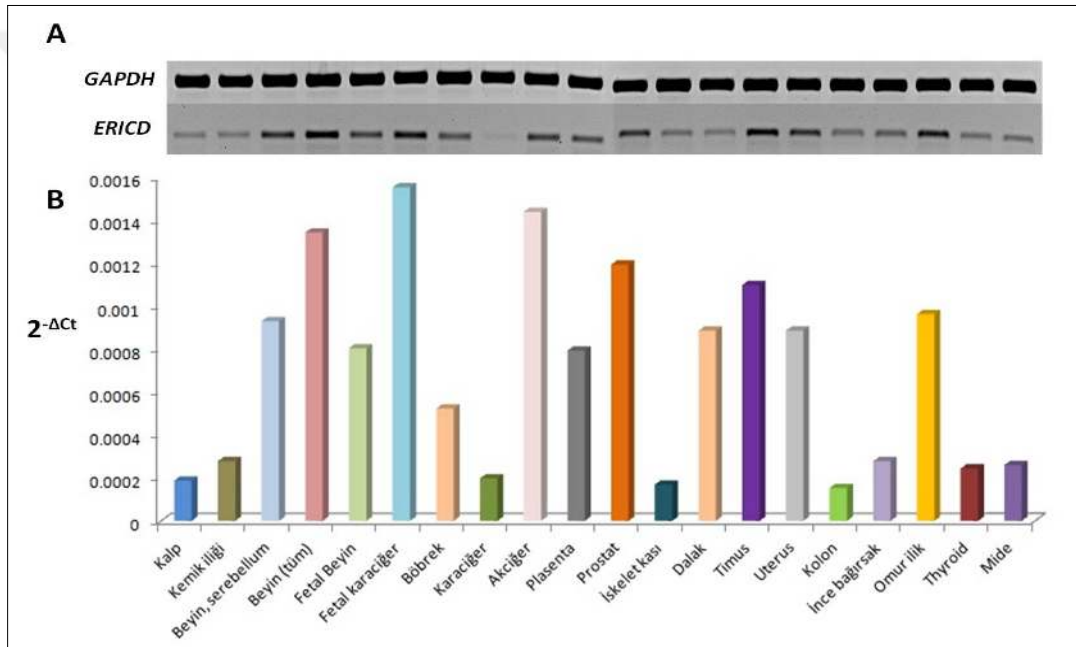
**Şekil 4.2.** ARID3A ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi. **A.** RT-PCR yöntemi ile ARID3A ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, ARID3A geninin ifade seviyesi.

#### 4.1.2. Farklı doku ve hücre hatlarında ERICD'nin gen ifade sonuçları

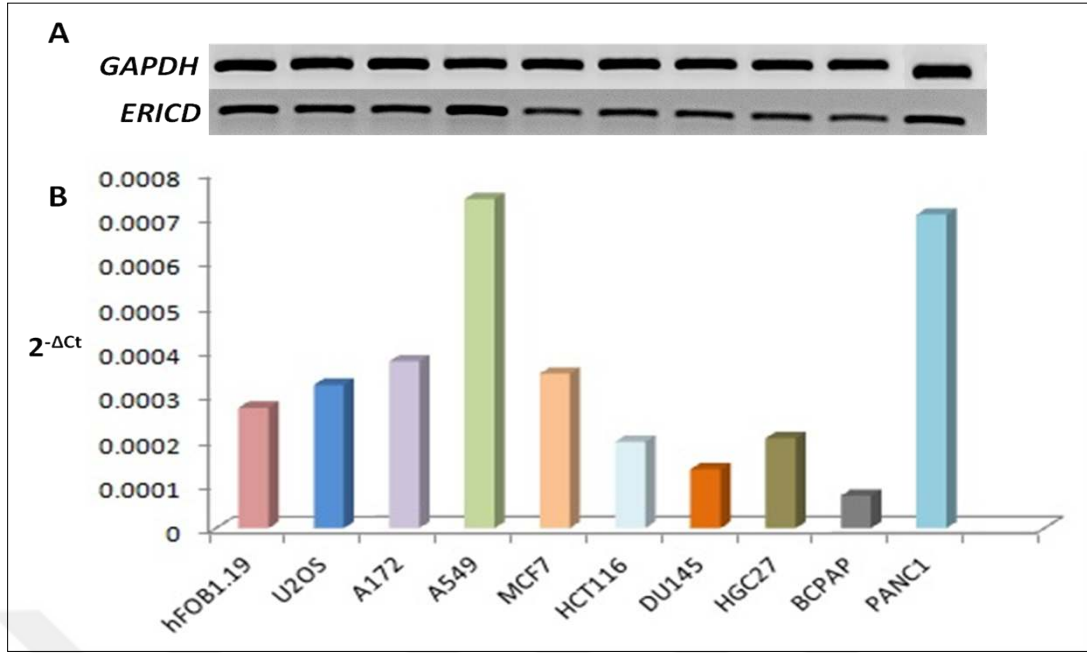
ERICD'nin ifade seviyesi 20 farklı insan dokusunda analiz edilmiştir. Gen ifadesi analizleri hem kısmi-miktarlara dayalı PCR hem de Real-Time PCR yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). ERICD, normal dokular arasında en fazla fetal karaciğerde ifade edilirken bunu takiben beyin (tüm), akciğer, timüs ve omurilik dokularında da fazla ifade edildiği gösterilmiştir. ERICD en düşük karaciğerde ifade

edilirken bunu takiben kalp, kemik iliği ve iskelet kası dokularında da düşük ifade gösterdiği bulunmuştur.

ERICD'nin ifade seviyesi 10 farklı hücre hattında gösterilmiştir. Gen ifadesi analizleri hem kısmi-miktarlara dayalı PCR hem de Real-Time PCR yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). ERICD, hücre hatları arasında en fazla A549 hücre hattında ifade edilirken, bunu takiben PANC1 ve A172 hücrelerinde de yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir. ERICD'nin en düşük BCPAPda ifade edilirken bunu takiben DU-145 ve HCT116 hücre hatlarında da düşük ifade gösterdiği bulunmuştur.



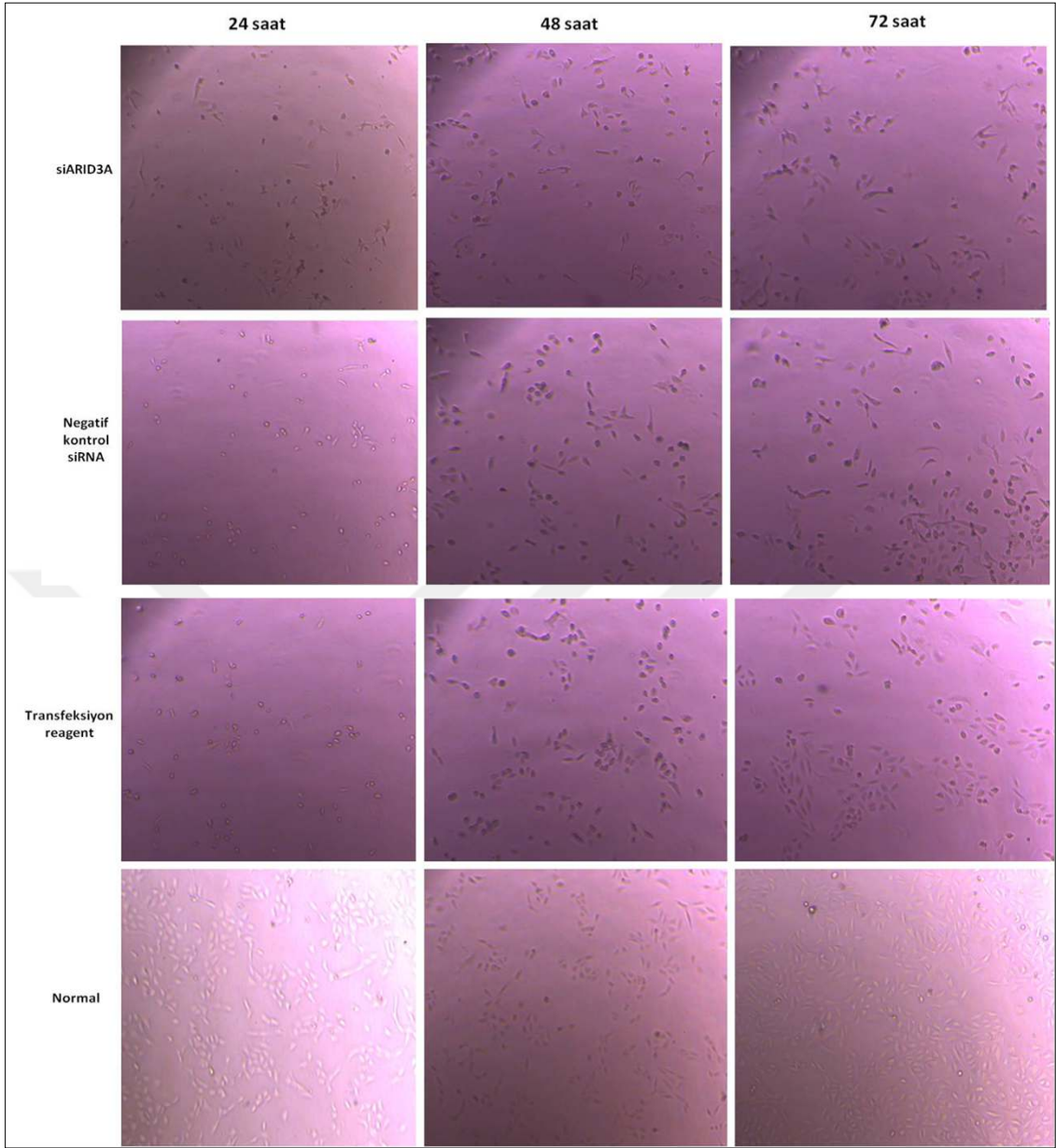
**Şekil 4.3.** ERICD ve GAPDH genlerinin farklı dokularındaki ifade seviyeleri gösterilmiştir. **A.** RT-PCR yöntemi ile ERICD ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, ERICD geninin ifade seviyesi.



**Şekil 4.4.** ERICD ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi. **A.** RT-PCR yöntemi ile ERICD ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, ERICD geninin ifade seviyesi.

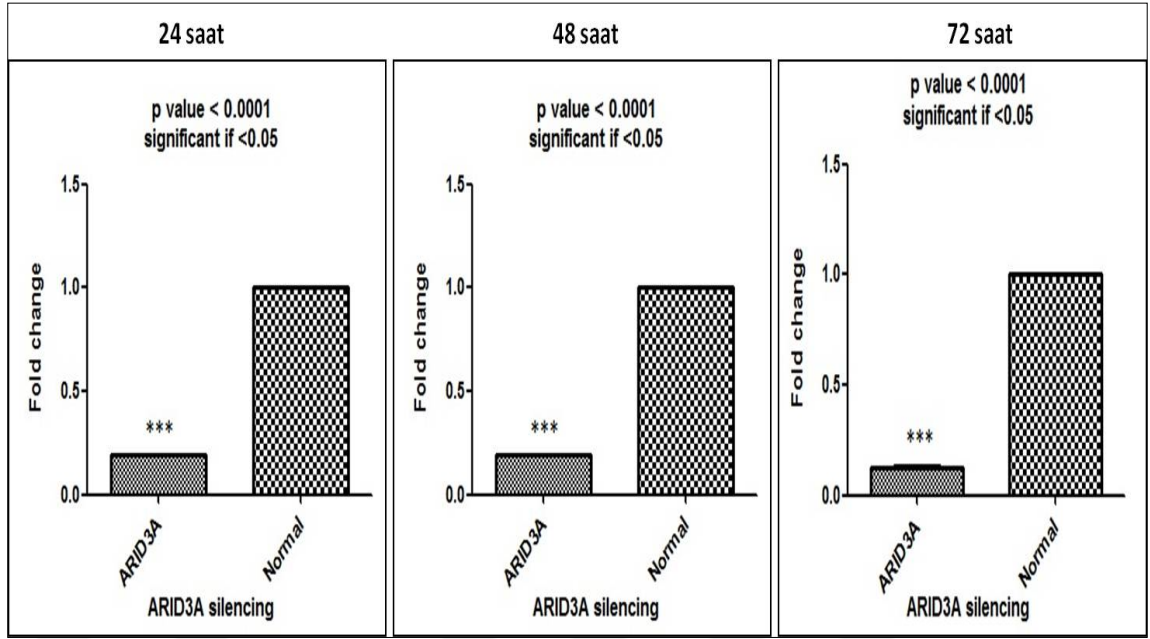
#### 4.2. ARID3A'nın Susturulması ve ERICD Üzerine Etkileri

ARID3A'nın lncRNA ERICD'nin ifadesini düzenleyip düzenlemediğini araştırmak amacıyla ARID3A ve ERICD'de ifade edilen U2OS osteosarkom hücre hattı kullanılmıştır. Aynı zamanda U2OS kolay bir şekilde transfeksiyon yapılabilen bir hücredir. Transfeksiyon sonrası U2OS morfolojisi her gün gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



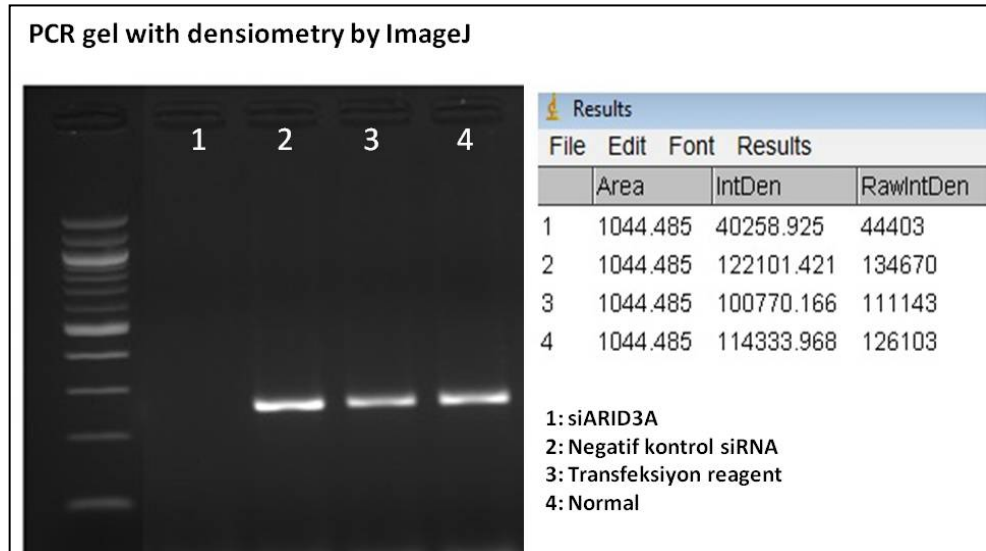
**Şekil 4.5.** U2OS hücre hattının siARID3A, negatif kontrol siRNA, yalnızca transfeksiyon kimyasalı ile transfeksiyonu yapılmış ve normal (transfeksiyon yapılmamış) hücrenin morfoloji ve hücre yoğunluğunun 24, 48 ve 72 saat sonunda gösterilmesi.

Susturulmadan sonra ARID3A'nın ifade seviyesi RT-PCR ve qPCR yöntemleri ile analiz edilmiştir. ARID3A siRNA'sı ile transfeksiyon sonrası ARID3A gen ifadesi analiz edilmiştir ve transfekte edilmemiş normal hücreler ile karşılaştırılmıştır. ARID3A'nın ifade seviyesinin azaldığı bulunmuştur. Aynı zamanda t testi ile bu değişimin istatistiksel olarak 24, 48 ve 72 saatlerde anlamlı olduğu gösterilmiştir ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.6).



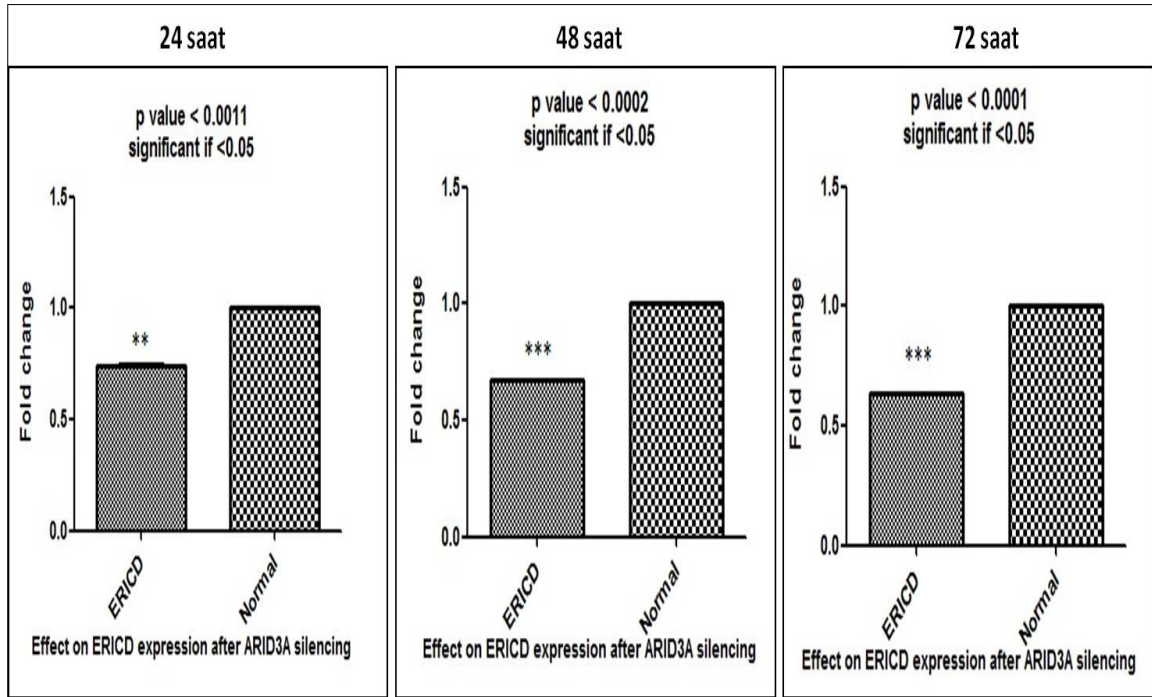
**Şekil 4.6.** U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının qPCR ile gösterilmesi. Gen ifadesi analizleri 24, 48 ve 72 saatler için yapılmıştır.

RT-PCR'da ARID3A'nın tamamen susturulduğu gösterilmiştir. ImageJ programı bant yoğunluklarının ölçülmesi için kullanılmıştır ve ARID3A'nın çoğalmadığı görülmüştür (Şekil 4.7).



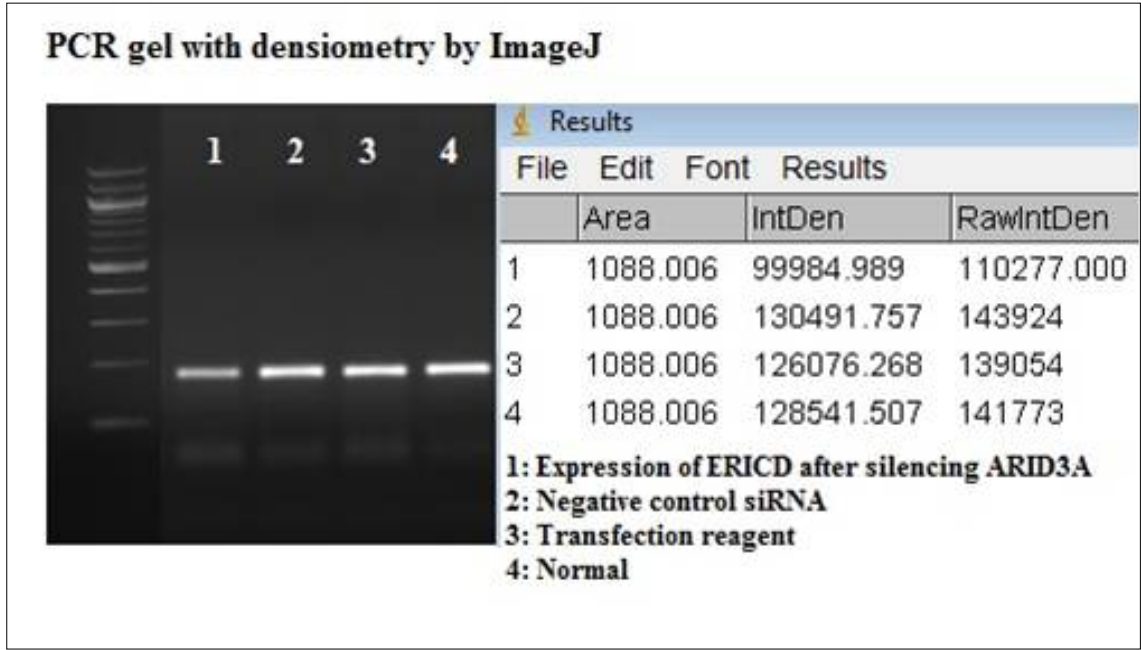
**Şekil 4.7.** U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının RT-PCR ile gösterilmesi. (transfeksiyondan 24 saat sonra). Gen ifadesi analizi jel elektroforezi ve ImageJ programı ile yapılmıştır.

ARID3A'nın susturulmasından sonra ERICD ifadesi üzerine etkileri belirlenmiştir. ERICD'nin gen ifadesi analizi hem RT-PCR hem de qPCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır ve transfekte edilmeyen normal hücrelerle kıyaslanmıştır. ARID3A'nın susturulması sonucu ERICD ifade seviyesinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, t-testi bu sonuçların istatistiksel olarak 24 ( $p < 0.0021$ ), 48 ( $p < 0.0002$ ) ve 72 ( $p < 0.0001$ ) saatler için anlamlı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8). ERICD en düşük ifade seviyesi üçüncü günde gözlemlenmiştir ve bu da 72 saat transfeksiyon sonrası bulunan en anlamlı sonuçtur.



**Şekil 4.8.** ARID3A'nın susturulması sonrasında ERICD'nin ifadesinin düşmesi. Fold change değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

RT-PCR sonuçları siARID3A transfeksiyonu sonrasında ERICD ifadesinin düştüğünü göstermiştir. ImageJ programı bantların yoğunluğunun ölçmek için kullanılmıştır. Normale, negatif kontrol siRNA'ya ve transfeksiyon kimyasalına göre bant yoğunluklarının düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9).



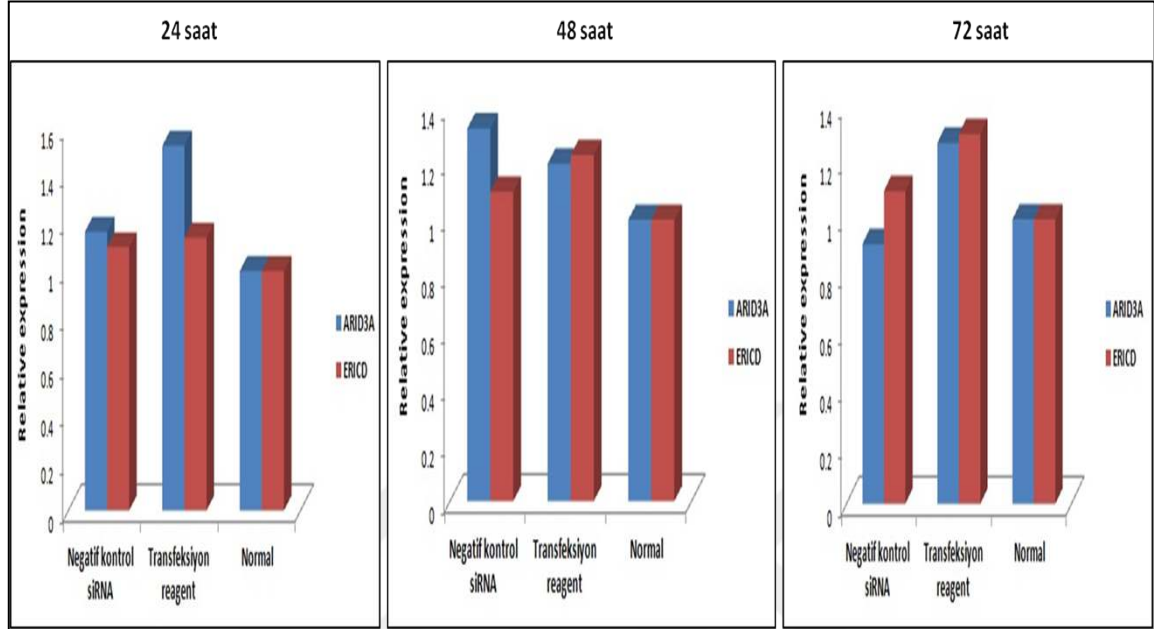
**Şekil 4.9.** ARID3A'nın susturulması sonrasında ERICD'nin ifadesinin düşmesinin RT-PCR ile gösterilmesi.

#### **4.2.1. Negatif kontrol siRNA kullanılarak siARID3A'nın özgüllüğünü kontrol etme ve transfeksiyon kimyasalının hücre üzerindeki toksik etkisini kontrol etme**

Negatif kontrol siRNA özgül olmayan sonuçların olup olmadığını belirlemek için transfekte edilmiştir. Bu kontrolün transfeksiyonundan sonra alınan sonuçlar transfekte edilmeyen (normal) hücrelerin sonuçları ile benzer olmalıdır. Negatif kontrol sonuçlarının çalışmadaki özgül siRNA'dan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması gözlemlenen sonuçların çalışılan siRNA'ya özgül olup olmadığını teyit etmek için kullanılabilir. Transfeksiyon kimyasalının herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığına bakmak için sadece transfeksiyon kimyasalı verilmiştir. Bu kontrolün eklenmesinden sonra elde edilen sonuçlar da transfekte edilmemiş (normal) hücrelerden alınan sonuçlarla aynı olmalıdır.

Bu çalışmada, negatif kontrol siRNA ve yalnızca transfeksiyon kimyasalı sırasıyla, siARID3A'nın özgüllüğünü kontrol etmek için ve transfeksiyon kimyasalının hücrelerdeki gen ifadesi üzerindeki toksik etkisini kontrol etmek için kullanıldı. ARID3A ve ERICD'nin gen ifade seviyeleri negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon

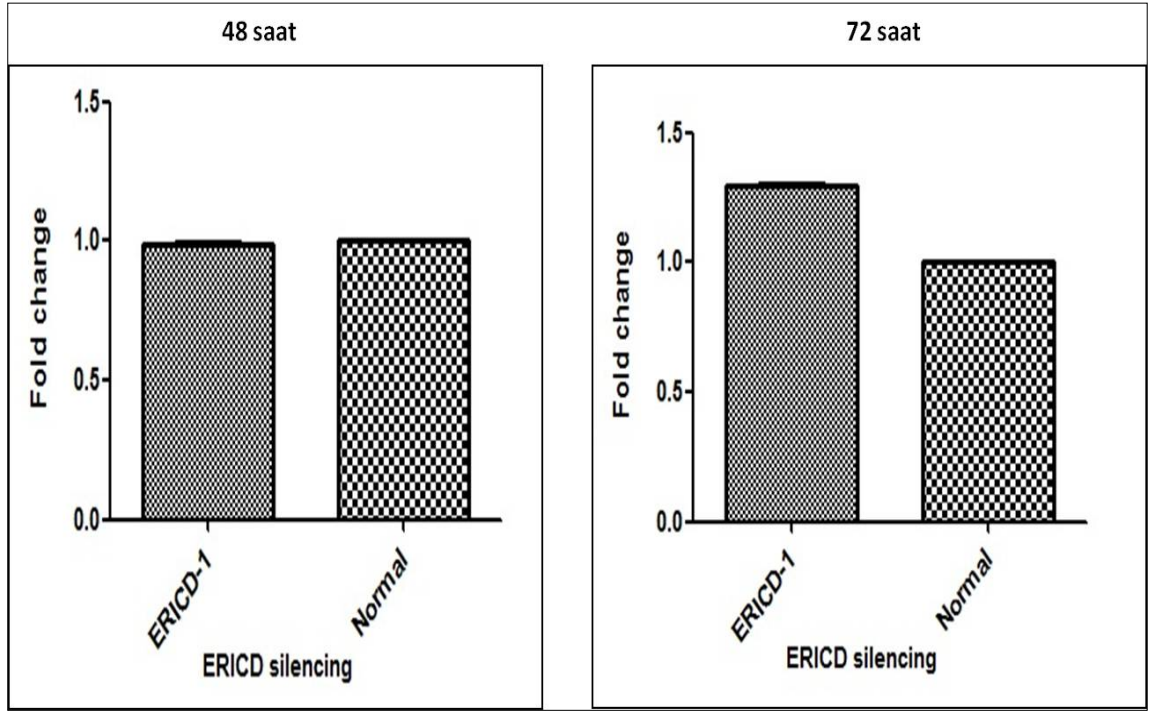
kimyasalı ile muamelesi sonrası sonuçlar transfekte edilmeyen (normal) hücrelere benzer bulunmuştur. Bu da gözlemlenen sonuçların siARID3A'ya özgül olduğunu ve transfeksiyon kimyasalının toksik olmadığını göstermektedir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** ARID3A ve ERICD'nin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalı muamelesi sonrasında göreceli ifade seviyeleri.

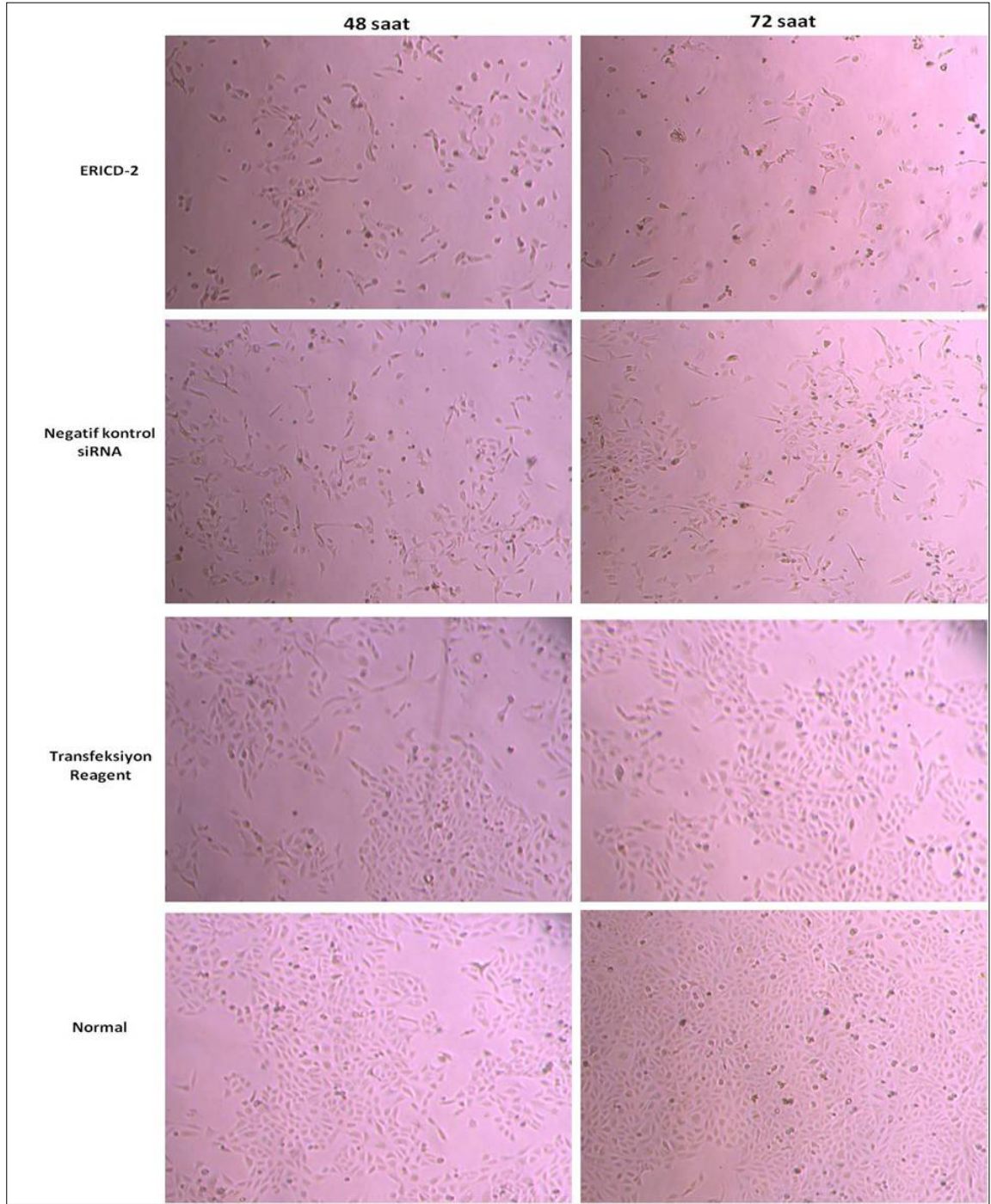
#### 4.2.2. ERICD'nin Susturulması ve ARID3A Üzerine Etkileri

ERICD'nin susturulması amacıyla iki farklı siRNA kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla, siERICD-1 (ERICD-1) ve siERICD-2 (ERICD-2)'dir. Susturulmadan sonra ERICD'nin ifade seviyesi RT-PCR ve qPCR yöntemleri ile analiz edilmiştir. ERICD için ERICD-1 ile transfeksiyon sonrasında ERICD'nin ifade analizi yapılmıştır ve transfekte edilmeyen (normal) hücreler ile kıyaslanmıştır (48 ve 72 saat). ERICD'nin ifade seviyesinin düşmediği bulunmuştur (Şekil 4.11). Dolayısıyla ERICD-1'in ERICD'yi susturmak için uygun olmadığı gösterilmiştir.



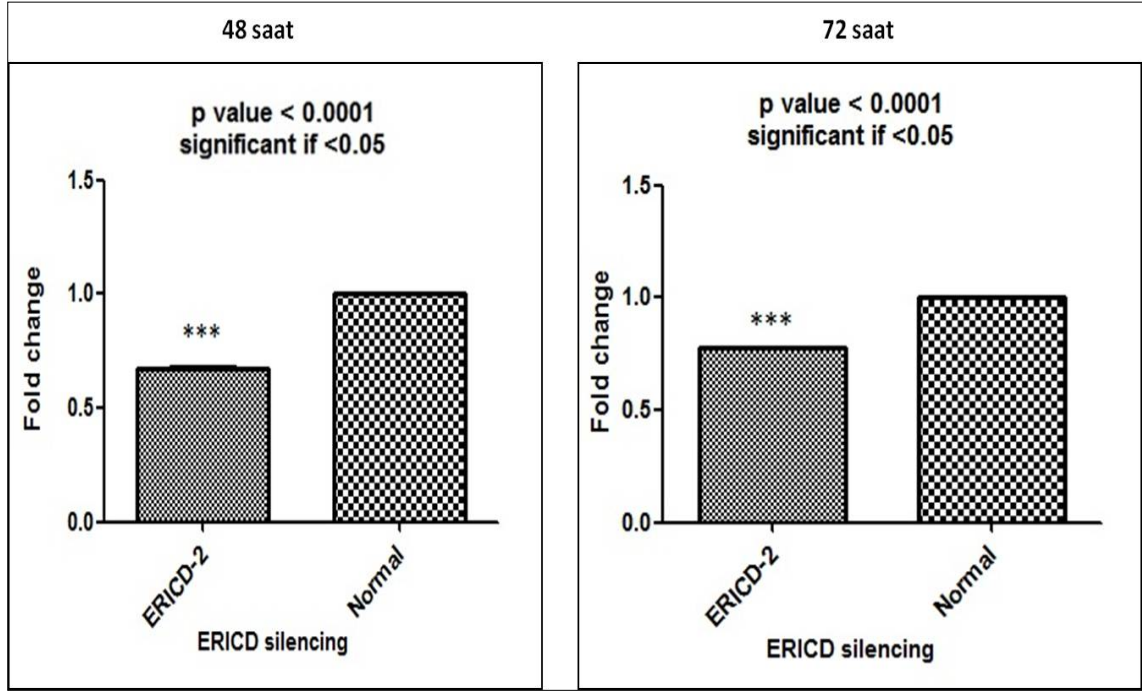
**Şekil 4.11.** siRNA olarak siERICD-1 (ERICD-1) kullanılarak ERICD ifade seviyesinin katlı değişim analizi. Belirgin bir düşüş gözlemlenmemiştir.

ERICD'nin susturulması amacıyla bir başka siRNA olan siERICD-2 (ERICD-2) kullanılmıştır. Transfeksiyondan sonra U2OS hücrelerinin morfolojileri göz önüne alınmıştır ve her geçen gün değişimler gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



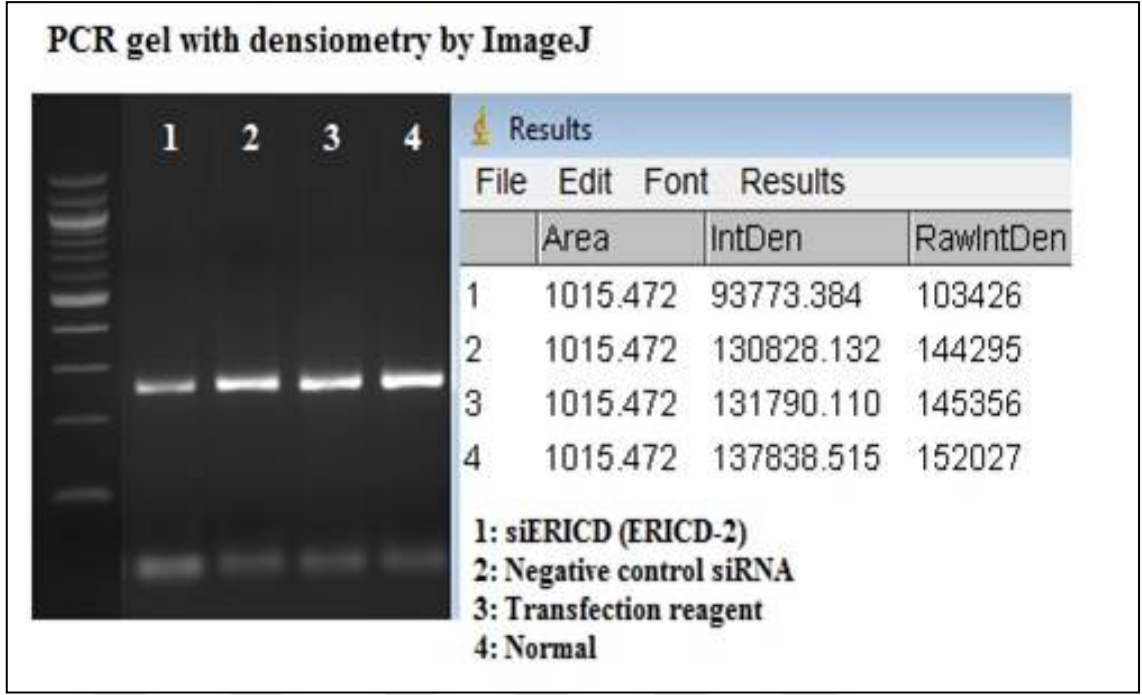
**Şekil 4.12.** siERICD-2 (ERICD-2), negatif kontrol siRNA, transfeksiyon kimyasalının etkisi ve normal (transfeksiyon yapılmamış) U2OS hücrelerinin 48 ve 72 saatlerdeki hücre yoğunluğunun ve morfolojilerinin gösterilmesi.

Susturulma sonrasında ERICD'nin ifade seviyesi hem RT-PCR hem de qPCR ile analiz edilmiştir. ERICD için ERICD-2 ile transfeksiyon sonrasında ERICD'nin ifade analizi yapılmıştır ve transfekte edilmeyen (normal) hücreler ile kıyaslanmıştır (48 ve 72 saat). ERICD'nin ifade seviyesinin düştüğü bulunmuştur. 48 ve 72 saatlik transfeksiyon sonrasında t-testine göre sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.13).



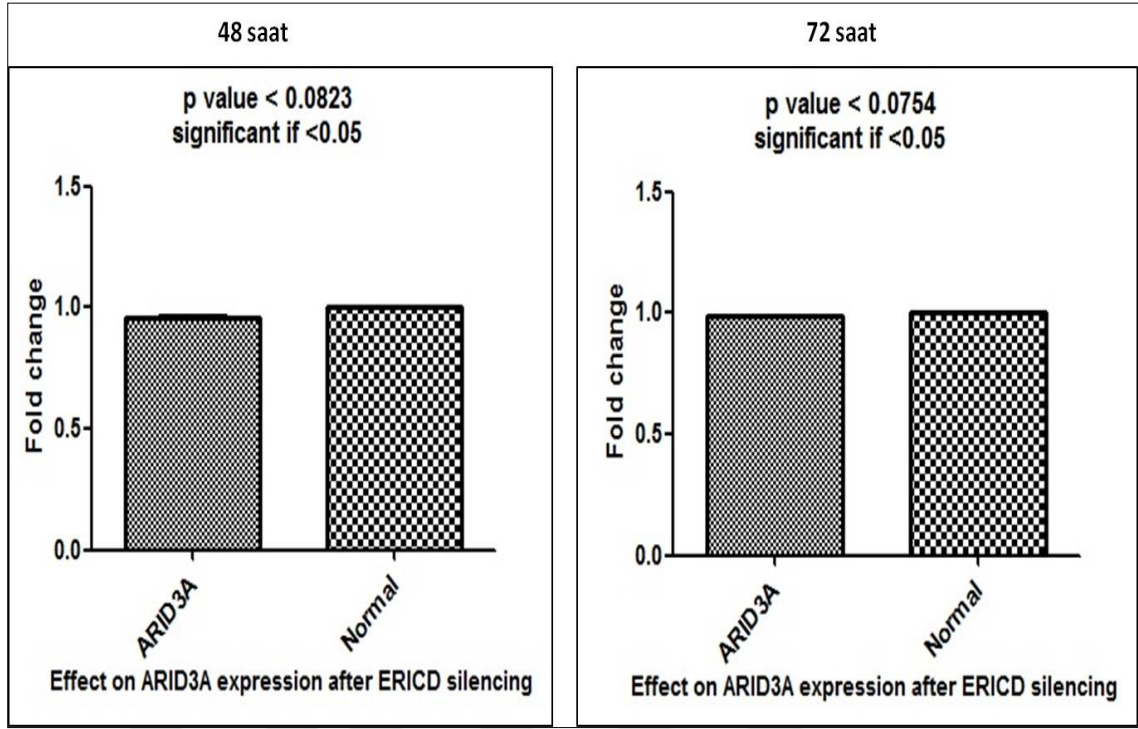
**Şekil 4.13.** qPCR yöntemi ile azalan ERICD ifade seviyesinin gösterilmesi. siERICD-2 (ERICD-2) siRNA olarak kullanılmıştır. Gen ifadesi analizleri 48 ve 72 saatler için yapılmıştır.

RT-PCR ile siRNA transfeksiyonundan sonra ERICD ifade seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. ImageJ programı, bantların yoğunluğunu ölçmek için kullanılmıştır, normale, negatif kontrol siRNA'ya ve transfeksiyon kimyasalına göre bant yoğunluklarının düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.14).



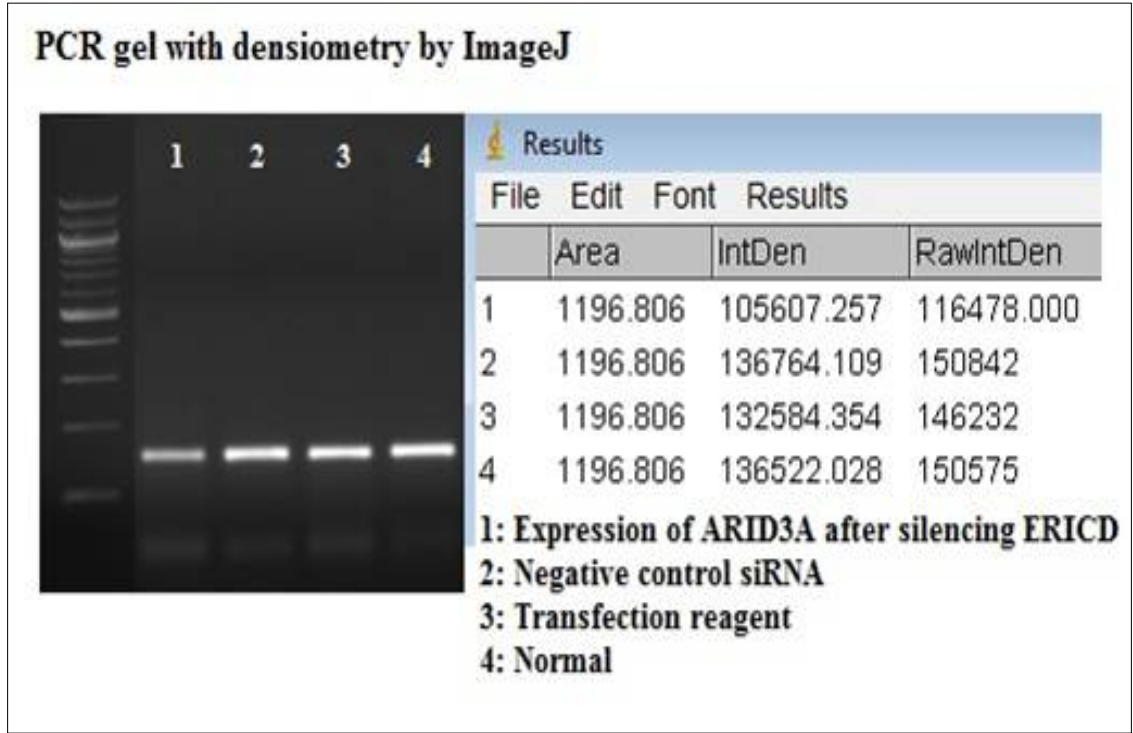
**Şekil 4.14.** RT-PCR kullanılarak azalan ERICD ifade seviyesinin gösterilmesi (72 saat transfeksiyon sonrası). siERICD-2 (ERICD-2), siRNA olarak kullanılmıştır. Gen ifadesi analizi agaroz jel ile ve dansimetri analizi ImageJ programı ile yapılmıştır.

ERICD'nin azalmasının gösterilmesinin ardından, ARID3A ifade seviyesi üzerine etkisine bakılmıştır. ARID3A geninin ifade seviyesinin analizi, transfekte edilmemiş (normal) hücreler ile hem RT-PCR hem de qPCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. ERICD'nin susturulmasının ardından, ARID3A'nın ifade seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, t-testi sonuçlarına göre, 48 saat ( $p < 0.0823$ ) ve 72 saat ( $p < 0.0754$ ) maruziyet sonrasında anlamlı olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** ERICD'nin susturulmasından sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin azalması. Katlı değişim değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildir.

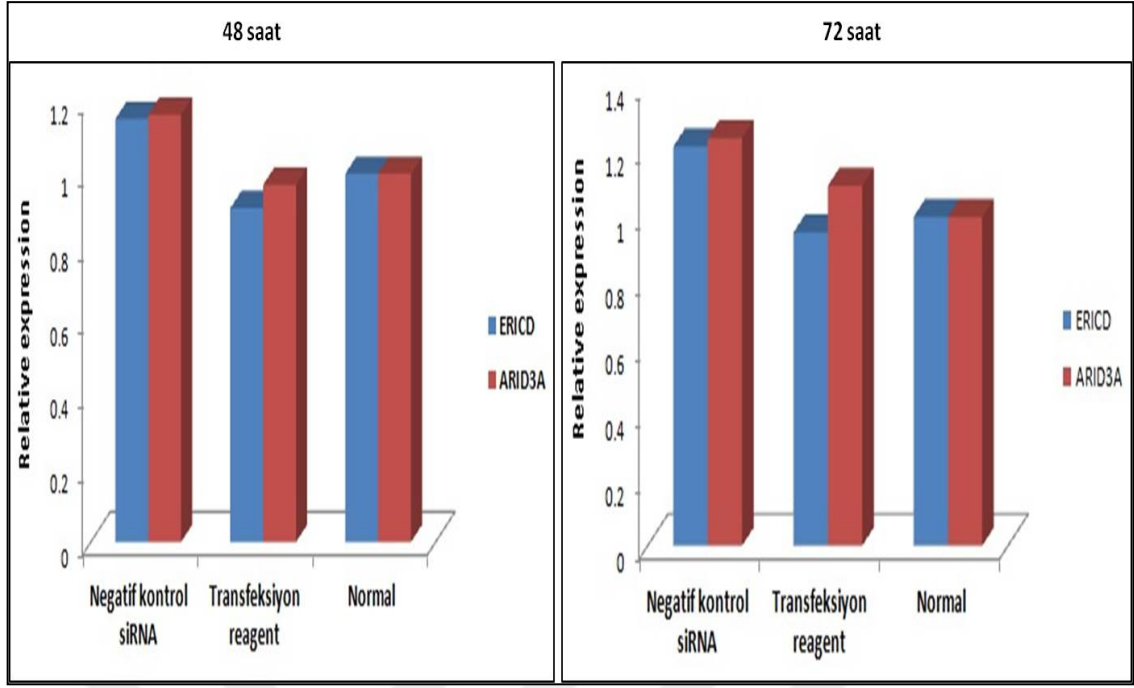
RT-PCR, siERICD-2 (ERICD-2) ile transfeksiyon sonrasında ARID3A'nın ifade seviyesinin azaldığı göstermektedir. ImageJ programı bant yoğunluklarını ölçmek için kullanılmıştır ve normale, negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalına göre daha zayıf bant olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** ERICD'nin susturulmasından sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin azalmasının RT-PCR ile gösterilmesi.

#### **4.2.2.1. Negatif kontrol siRNA kullanılarak siERICD-2 (ERICD-2)'nin özgülüğünü kontrol etme ve transfeksiyon kimyasalının hücre üzerindeki toksik etkisini kontrol etme**

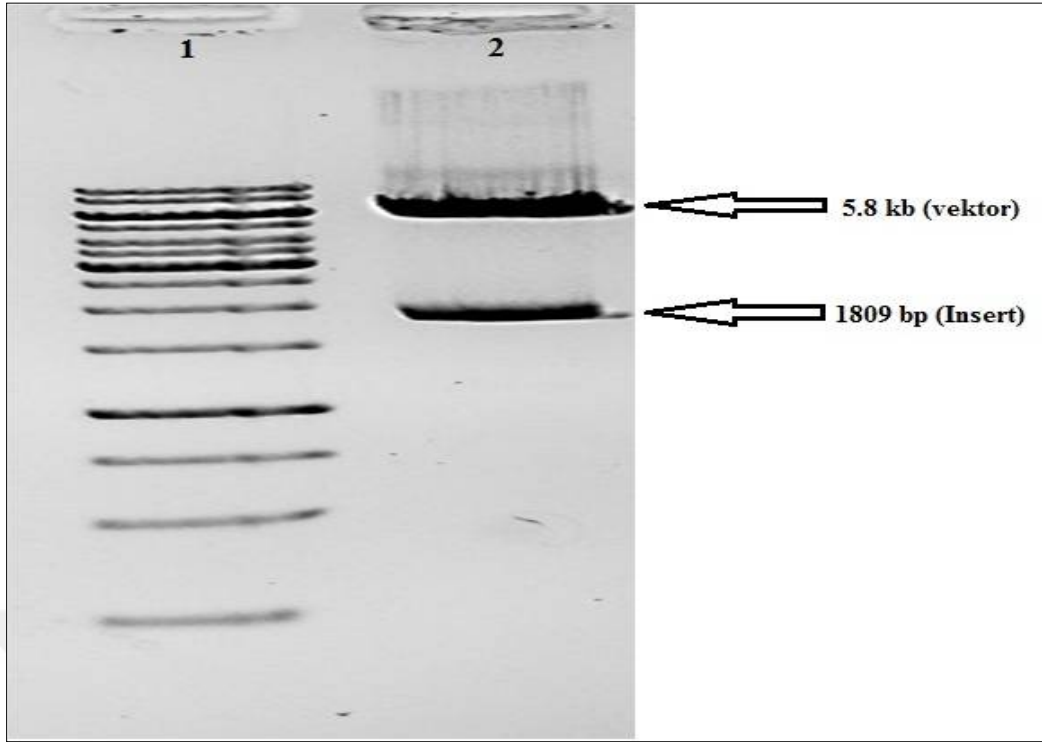
Negatif kontrol siRNA siERICD-2 (ERICD-2)'nin özgülüğünü kontrol etmek için kullanılmıştır. Dahası, hücrelere ve gen ifadesi üzerine toksik etkilerinin belirlenmesi için transfeksiyon kimyasalı kullanılmıştır. Negatif kontrol siRNA kullanılarak ERICD ve ARID3A'nın gen ifade seviyeleri, sadece transfeksiyon kimyasalı maruz bırakılan hücreler ve transfekte edilmemiş (normal) hücreler ile oldukça benzer sonuçlar olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kullanılan siERICD (ERICD-2)'nin özgül olduğu ve transfeksiyon kimyasalının toksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** ARID3A ve ERICD'nin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalı ile muamelesi sonrasında nisbi ifade seviyeleri.

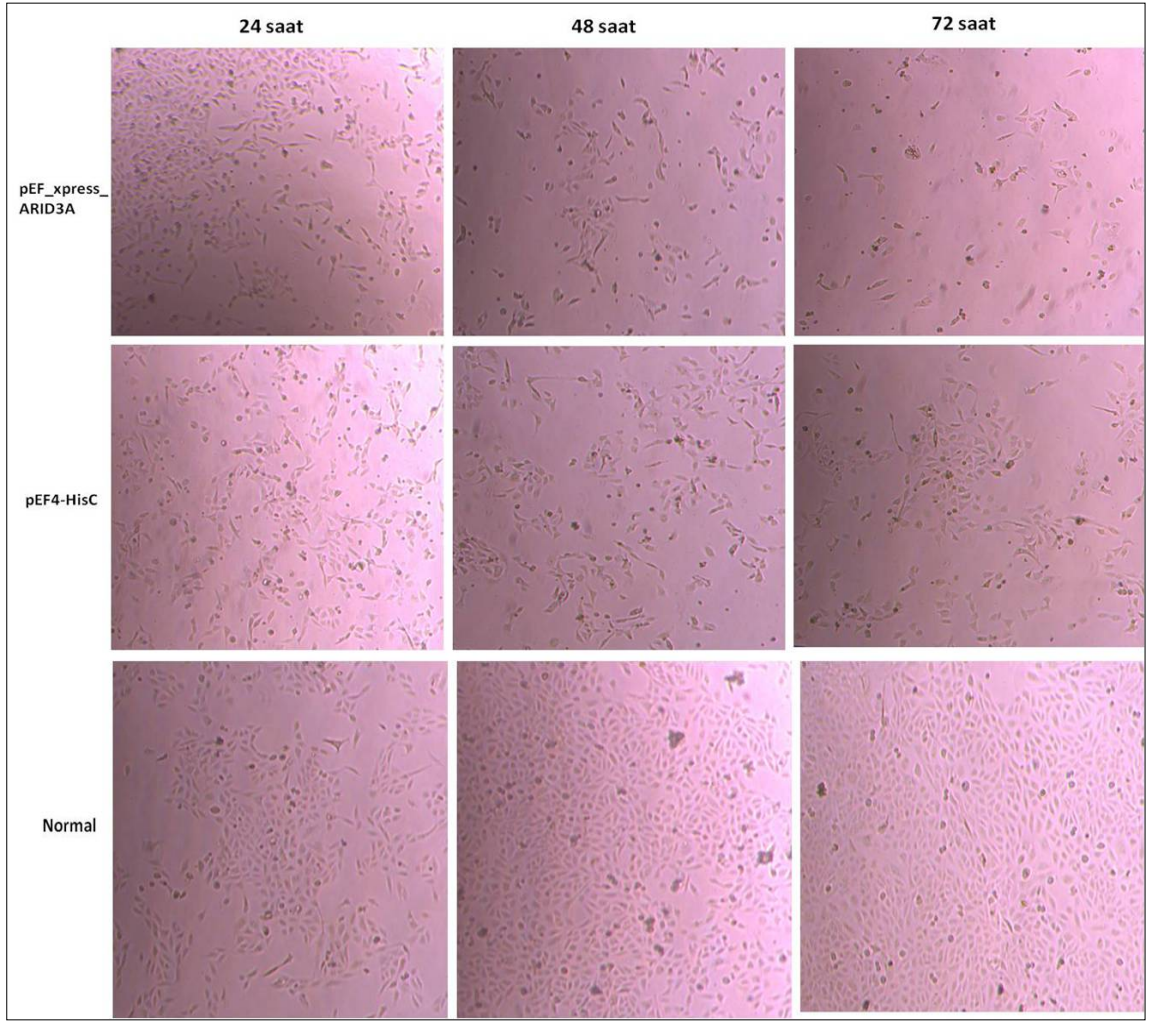
#### 4.3. ARID3A'nın Aşırı İfadelendirilmesi ve ERICD Üzerine Etkisi

Klonlanmış ARID3A geni (pEF\_xpress\_ARID3A), BamH1 ve Xba1 kesim enzimleri ile doğrulanmıştır. Kesilim sonrasında, klonlanmış ARID3A geni 1809 bp ve vektörün 5,8 kb uzunluğunda olduğu bulunmuştur (Şekil 4.18).



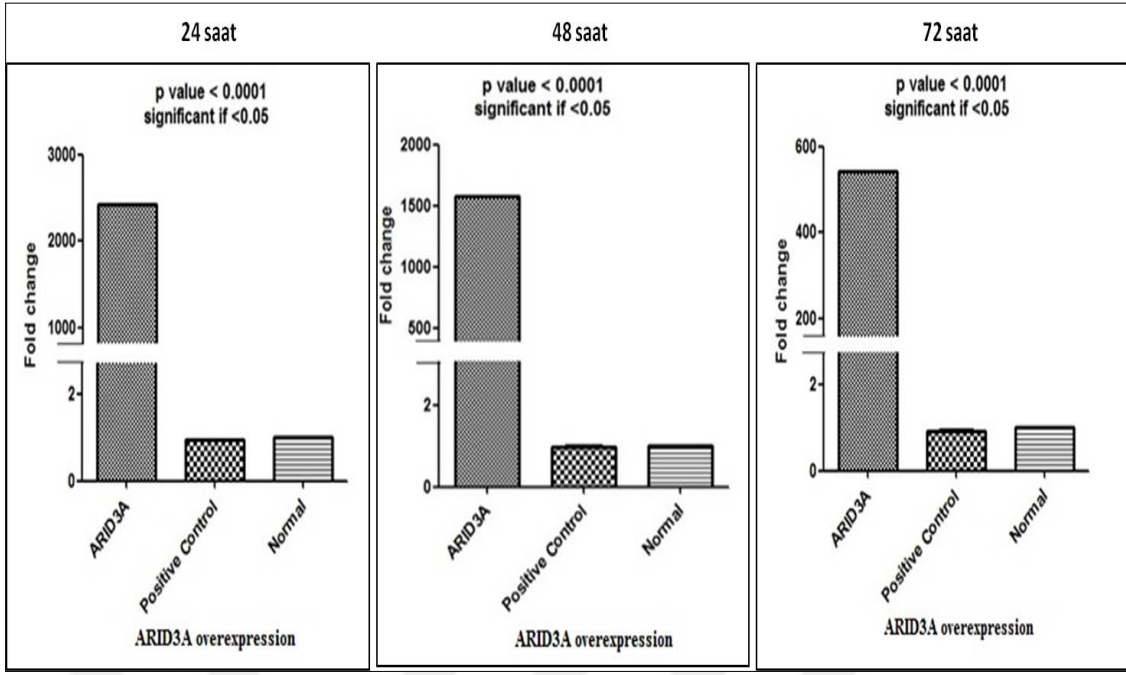
**Şekil 4.18.** Klonlanmış ARID3A geninin kesim enzimleri kullanılarak doğrulanması. **1:** ThermoScientific GeneRuler 1 kb DNA belirteç, **2:** vektör uzunluğu 5,8 kb, eklenti (ARID3A geni) uzunluğu 1809 bp.

Klonlanmış ARID3A geninin doğrulanmasının ardından, ifade seviyesini arttırmak için U2OS hücrelerine transfekte edilmiştir ve ERICD ifadesi üzerine etkileri gözlemlenmiştir. Aşırı ifadelendirme için transfeksiyondan sonra U2OS hücrelerinin morfolojileri gözlemlenmiştir ve günlük değişimlere dikkat edilmiştir (Şekil 4.19).



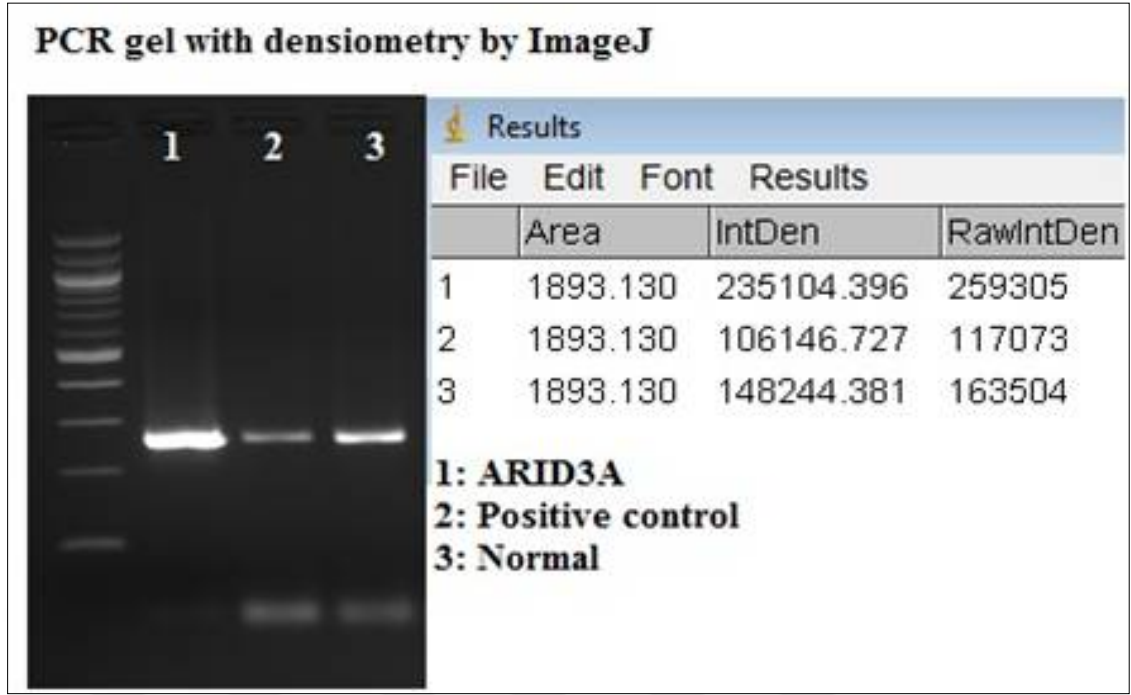
**Şekil 4.19.** 24, 48 ve 72 saatlerde pEF\_xpress\_ARID3A, pozitif kontrol pEF4-HisC ve normal (transfekte edilmemiş) U2OS hücrelerinin morfolojileri ve yoğunlukları gösterilmiştir.

ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi hem RT-PCR hem de qPCR yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Boş vektör pEF4-HisC pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ARID3A için pEF\_xpress\_ARID3A ile transfeksiyonundan sonra, ARID3A geninin ifade seviyesi transfekte edilmeyen (normal) hücreler ile belirli zaman aralıklarında kıyaslanmıştır. ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, 24, 48 ve 72 saatleri için istatistiksel olarak anlamlı olduğu göstermektedir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4.20). Pozitif kontrol pEF4-HisC'deki katlı değişim oranı transfekte edilmemiş (normal) hücrelerde neredeyse eşit bulunmuştur ve böylelikle pEF\_xpress\_ARID3A'nın özgül sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Şekil 4.20).



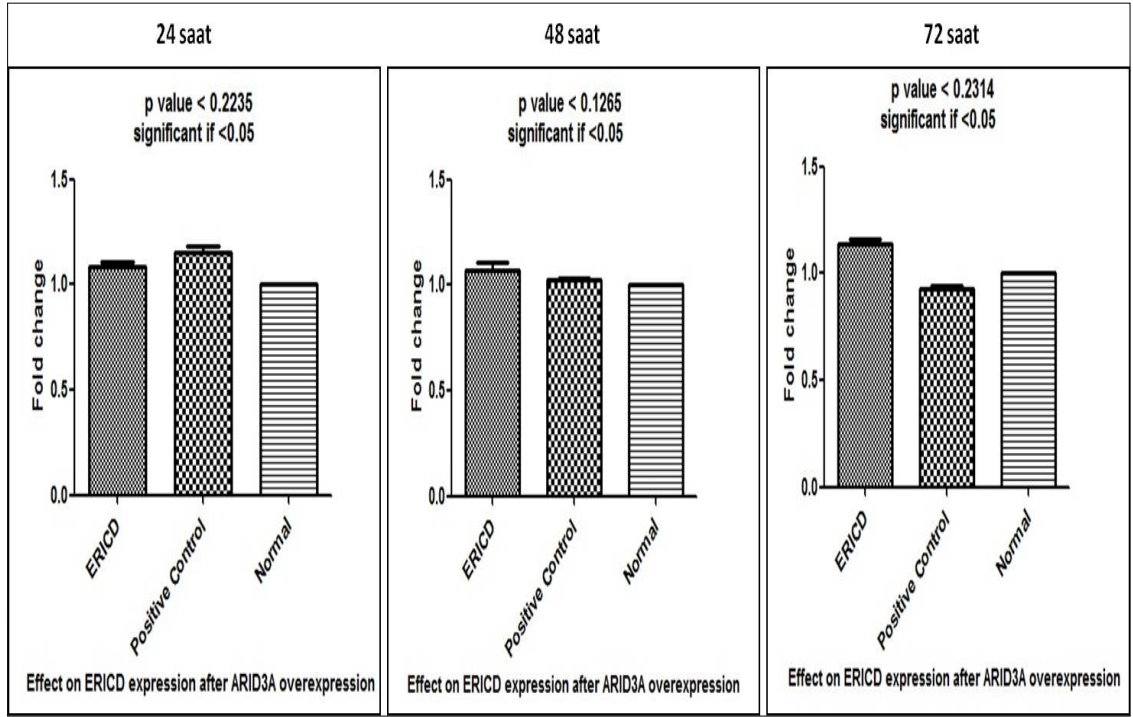
**Şekil 4.20.** qPCR kullanılarak U2OS hücrelerinde ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Pozitif kontrol ifade seviyesi analizi klonlanmış ARID3A'nın özgül olduğunu göstermektedir. Analizler 24, 48 ve 72 saatler için yapılmıştır. p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

RT-PCR, aşırı ifadelendirme deneylerinden sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin arttığını göstermektedir. ImageJ programı bantların parlaklıklarını veya yoğunluklarını ölçmek için kullanılmıştır ve normal ve pozitif kontrole göre daha parlak ve kalın bir bant olduğunu göstermiştir (Şekil 4.21).



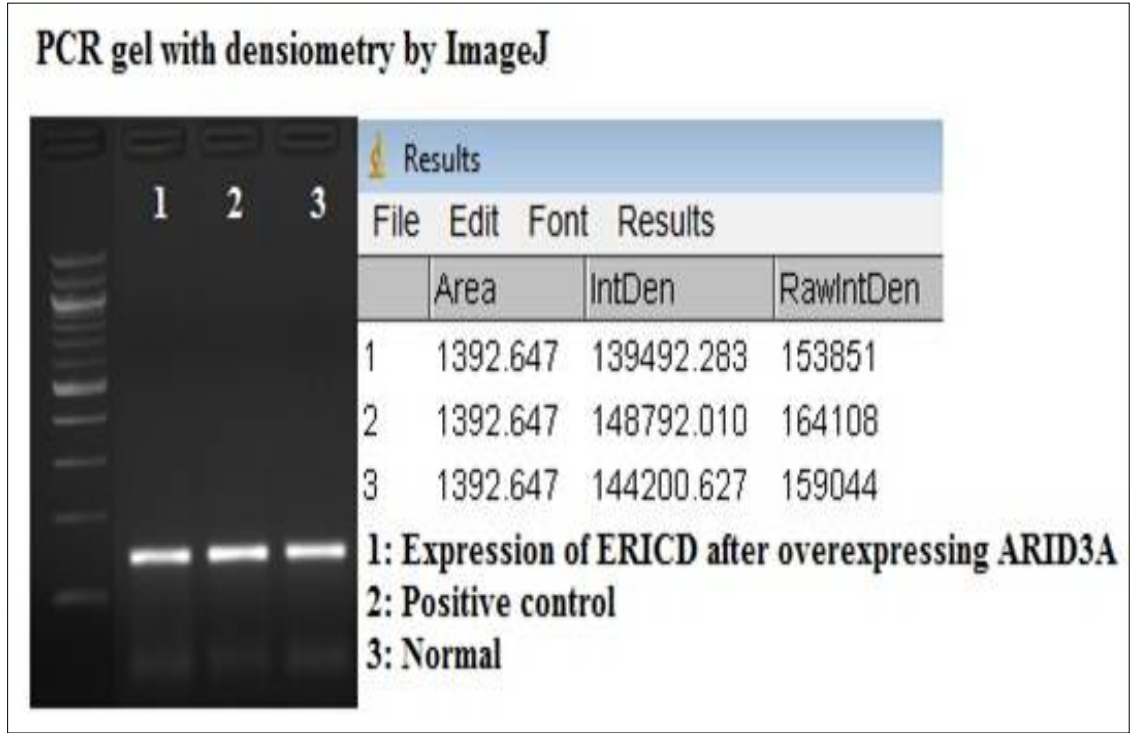
**Şekil 4.21.** RT-PCR kullanılarak ARID3A'nın ifade seviyesindeki artış gösterilmiştir (24 saat transfeksiyon sonrası). pEF4-HisC pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Gen ifadesi analizi agaroz jel ile ve dansimetri analizi ImageJ programı ile yapılmıştır.

ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin gösterilmesinin ardından bu sonuçların ERICD ifade seviyesi üzerine etkisi analiz edilmiştir. ERICD'nin ifade seviyesinin analizi için, hem RT-PCR hem de qPCR yöntemleri kullanılarak belirli zaman aralıklarında transfekte edilmemiş (normal) hücreler ile kıyaslanmıştır. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ERICD'nin ifade seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. t-testi p değerlerinin anlamlı olmadığını göstermektedir. 24, 48 ve 72 saatler için p değerleri sırasıyla 0.2235, 0.1265 ve 0.2314'tür (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ERICD ifade seviyesinin katlı değişim oranları. ERICD ifade seviyesinin anlamlı olarak etkilenmediği gösterilmiştir. t –testi değerleri 24, 48 ve 72 saatler için istatistiksel olarak anlamlı değildir.

RT-PCR ile ERICD ifade seviyesinin pozitif kontrol ve normale göre bant yoğunluklarının farklı olmadığı gösterilmiştir. ImageJ programı bantların parlaklıklarını veya yoğunluklarını ölçmek için kullanılmıştır ve normal ve pozitif kontrole göre bant yoğunluklarının hemen hemen birbirlerine yakın olduğunu göstermiştir (Şekil 4.23).

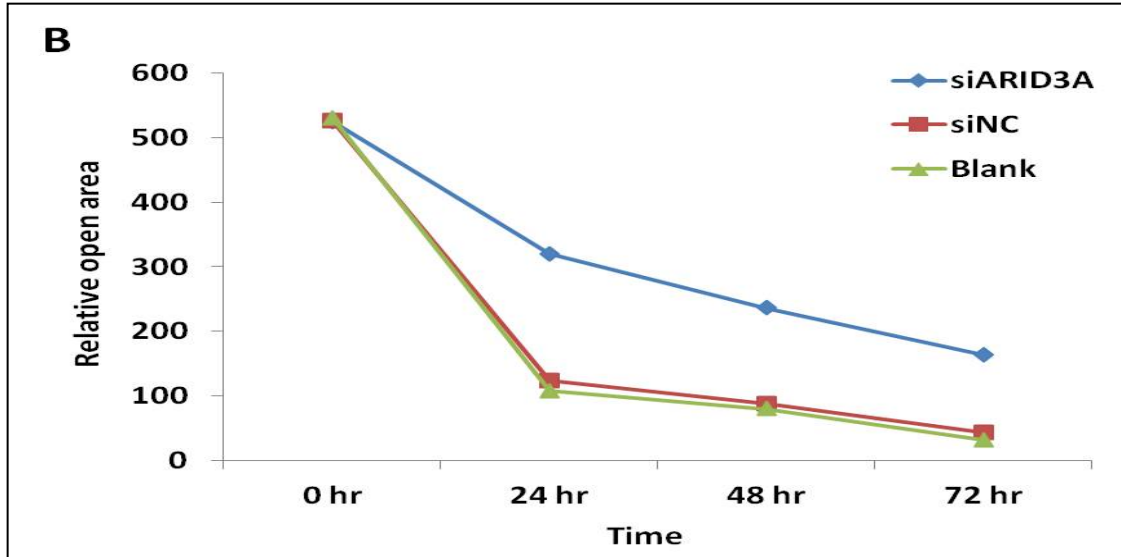
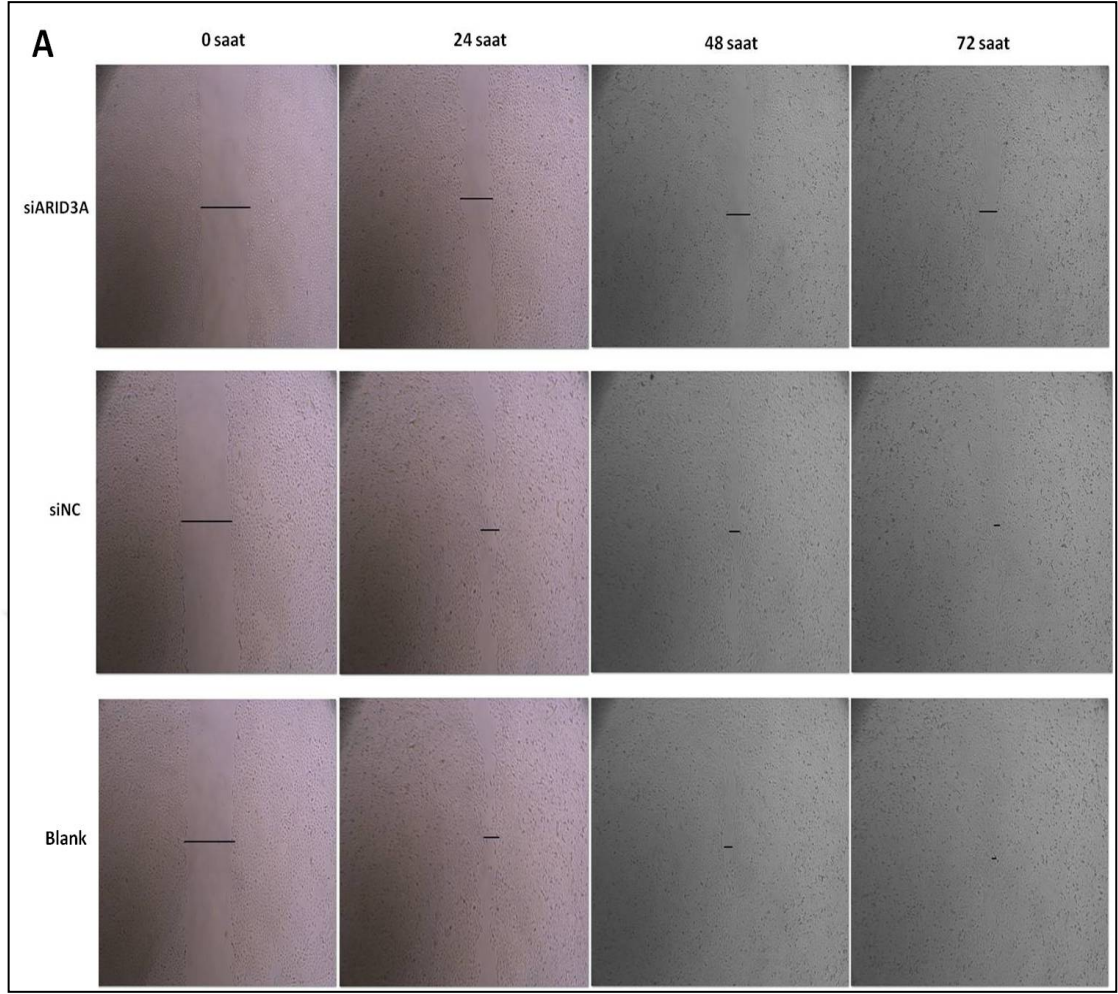


**Şekil 4.23.** RT-PCR kullanılarak, ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ardından ERICD'nin gen ifade analizi. Bant yoğunlukları, ERICD pozitif kontrol ve normal (transfekte edilmemiş) arasında anlamlı bir farklılık olmadığı göstermektedir.

#### 4.4. Yara İyileşmesi Deneyi (Göç Deneyi)

##### 4.4.1. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının göç üzerine etkisi

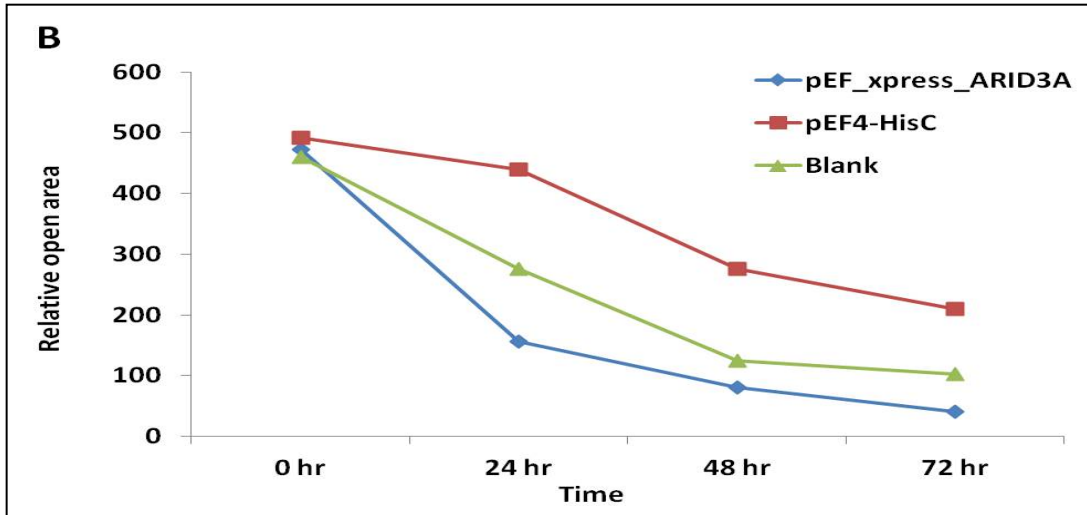
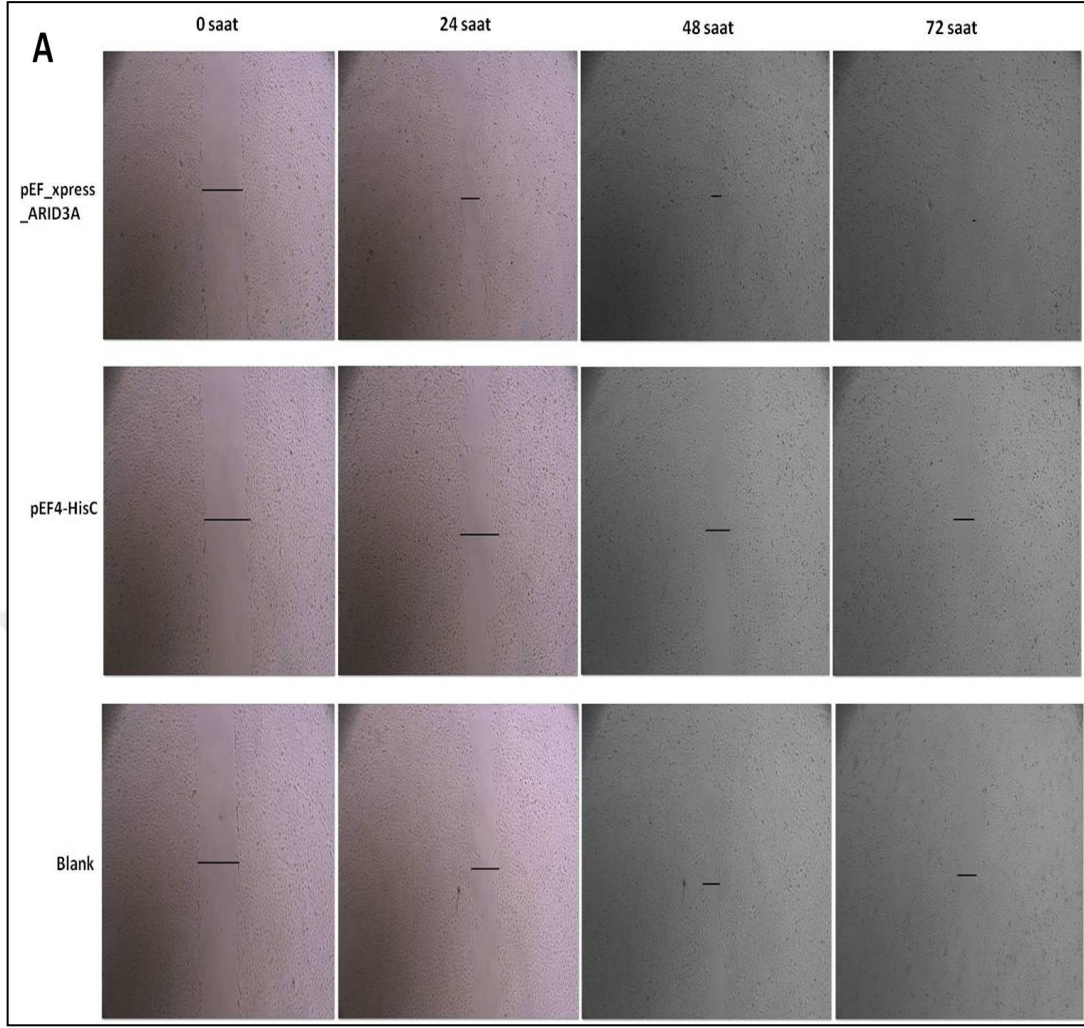
Göç deneyleri U2OS hücrelerinde yapılmıştır. ARID3A'nın susturulmasından sonra hücrelerin göçü üzerine etkisi ardışık üç günde gözlemlenmiştir. ARID3A'nın siRNA aracılı susturulması U2OS hücrelerinde hücre göçünü baskılamıştır. U2OS hücrelerinin göçünün negatif ve boş kontrole kıyasla azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.24 A). Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde susturulmuş ARID3A için daha fazladır (Şekil 4.24 B). Üç günün sonunda bile kullanılan kontrollere göre görünür bir geniş alan vardır. ARID3A için siRNA kullanılması, hücrelerdeki göçü ciddi derecede azaltmıştır.



**Şekil 4.24. (A)** siNC ve boş kontrole kıyasla ARID3A'nın susturulması sonrasında U2OS hücrelerinin göçü. **(B)** Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde ölçülmüştür. siARID3A için, 72 saatin sonunda bile siNC ve transfekte edilmemiş kontrole kıyasla daha fazla boşluk bulunmaktadır.

#### **4.4.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin göç üzerine etkisi**

ARID3A ifadesinin arttırılmasından sonra hücrelerin göçü üzerine etkisi ardışık üç günde gözlemlenmiştir. ARID3A'nın ifadesinin arttırılması U2OS hücrelerinde hücre göçünü arttırmıştır. U2OS hücrelerinin göçünün negatif ve boş kontrole kıyasla daha belirgin olduğu bulunmuştur (Şekil 4.25 A). Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde aşırı ifadelendirilmiş ARID3A için daha azdır (Şekil 4.25 B). ARID3A'nın aşırı ifadesi, U2OS hücrelerinde yara kapanmasında önemli bir teşvik edici olduğunu doğrulamıştır. Üç günün sonunda, kullanılan kontrollere neredeyse görünmeyen bir boşluk vardır. ARID3A'nın ifadesinin arttırılması, hücrelerdeki göçü ciddi derecede hızlandırmıştır.

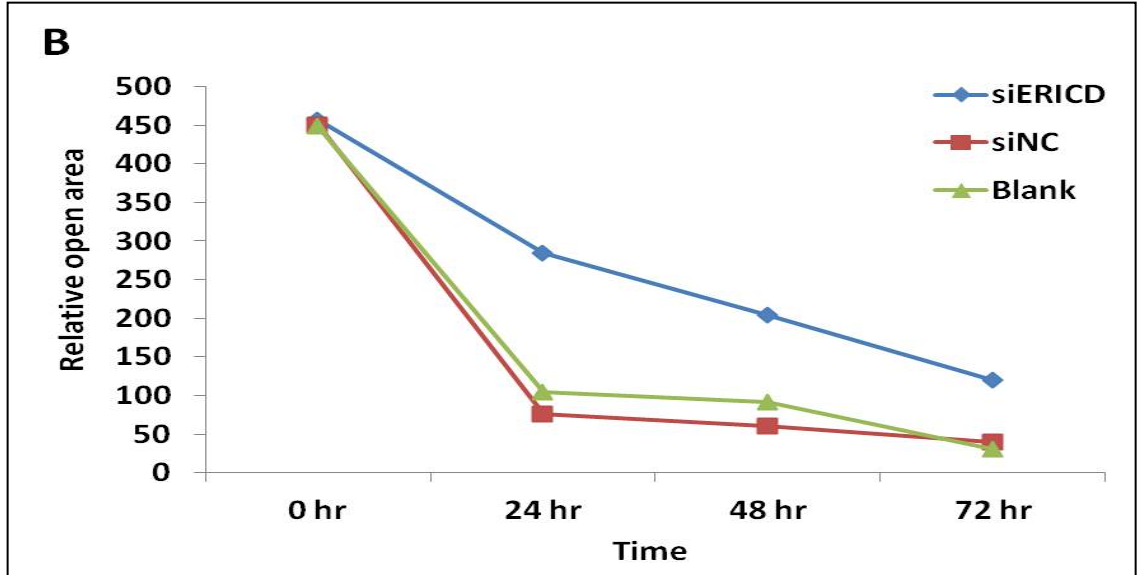
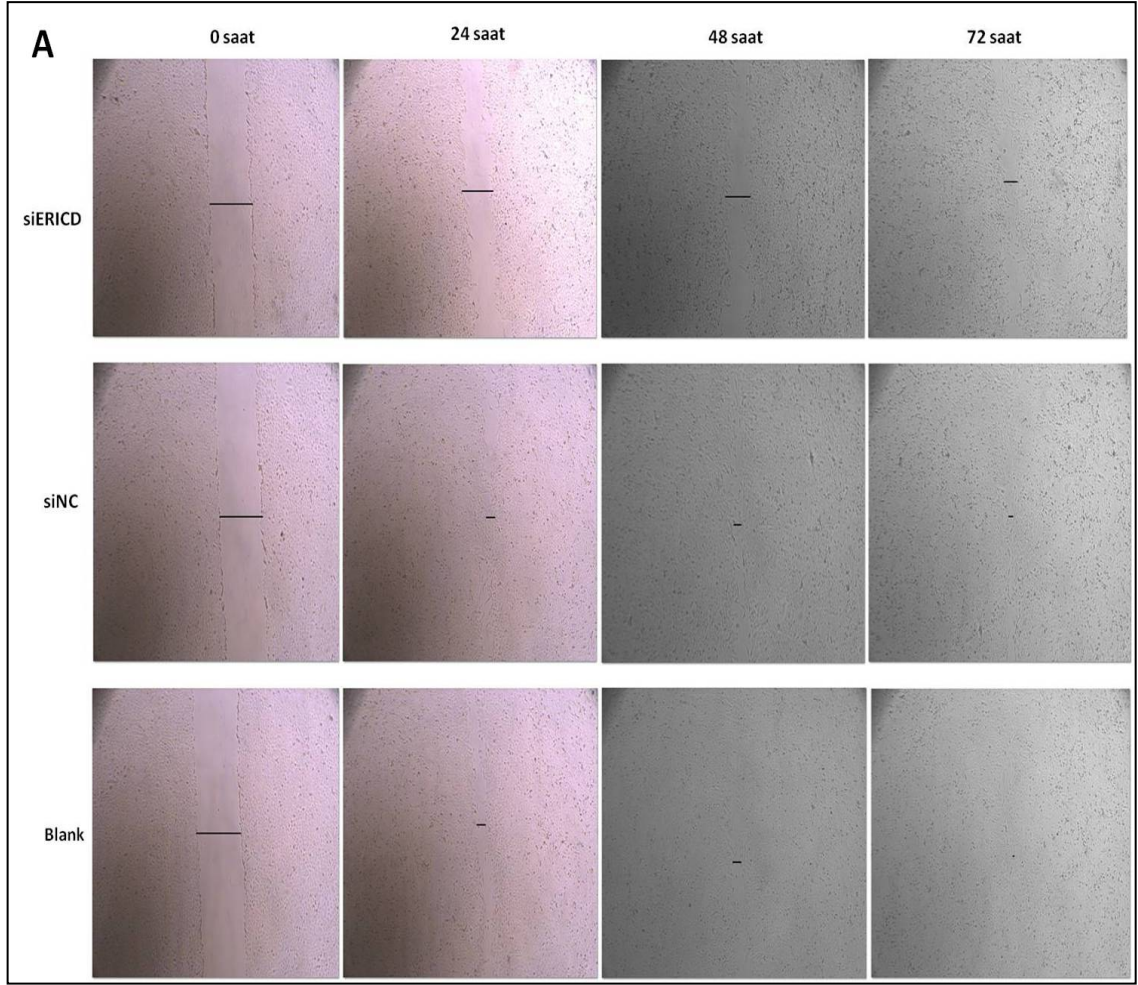


**Şekil 4.25.** (A) Pozitif kontrol ve boş kontrole kıyasla ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi sonrasında U2OS hücrelerinin göçü. (B) Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde ölçülmüştür. pEF\_xpress\_ARID3A için 72 saatin sonunda bile pEF-HisC ve transfekte edilmemiş kontrole kıyasla daha az boşluk bulunmaktadır.

#### 4.4.3. U2OS hücre hattında ERICD'nin susturulmasının göç üzerine etkisi

ERICD'nin susturulmasının U2OS hücre hattında hücre göçü üzerine etkisi gösterilmiştir. ERICD'nin susturulmasından sonra hücrelerin göçü üzerine etkisi ardışık üç günde gözlemlenmiştir. ERICD'nin siRNA aracılı susturulması U2OS hücrelerinde hücre göçünü baskılamıştır. U2OS hücrelerinin göçünün negatif ve boş kontrole kıyasla azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.26 A). Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde susturulmuş ERICD için daha fazladır (Şekil 4.26 B). Üç günün sonunda bile kullanılan kontrollere göre görünür bir geniş alan vardır. ERICD için siRNA kullanılması, hücrelerdeki göçü ciddi derecede azaltmıştır.



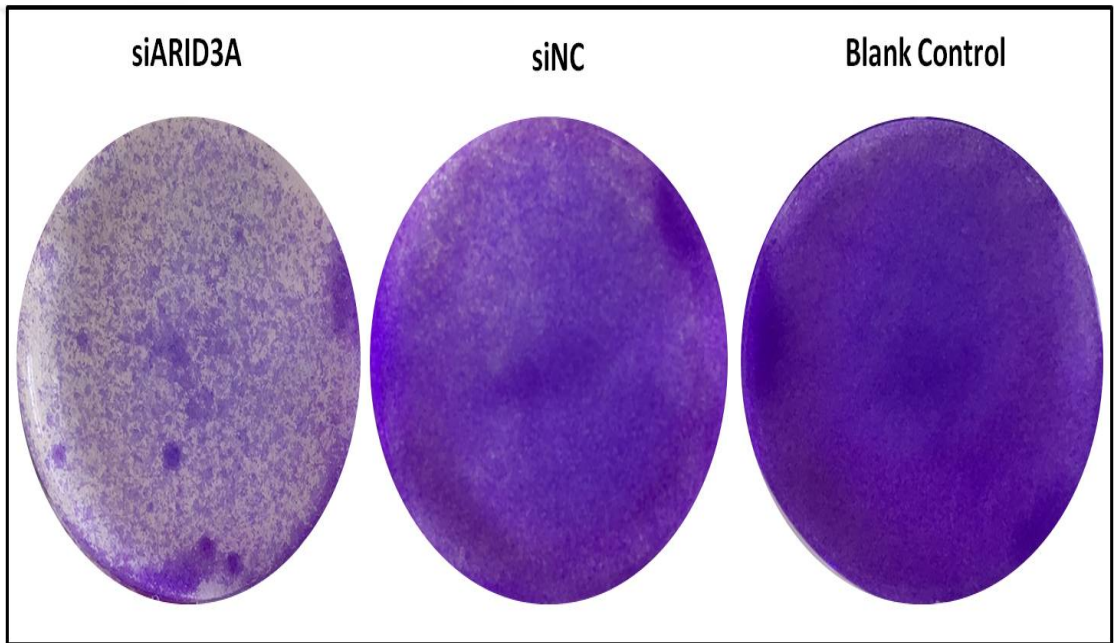


**Şekil 4.26.** (A) siNC ve boş kontrole kıyasla ERICD'nin susturulması sonrasında U2OS hücrelerinin göçü. (B) Oluşturulan yara genişliği 24, 48 ve 72 saatlerde ölçülmüştür. siERICD için, 72 saatin sonunda bile siNC ve transfekte edilmemiş kontrole kıyasla daha fazla boşluk bulunmaktadır.

#### 4.5. Koloni Oluşum Deneyi

##### 4.5.1. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının koloni oluşumu üzerine etkisi

Koloni oluşum deneyleri U2OS hücre hattında yapılmıştır. ARID3A'nın susturulmasının ardından, hücrelerin koloni oluşumu üzerine etkisi gözlemlenmiştir. siRNA aracılı ARID3A'nın susturulması U2OS hücrelerinde koloni oluşumunu baskılamıştır. U2OS hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri negatif kontrol ve boş kontrole kıyasla azalmıştır (Şekil 4.27). ARID3A için siRNA kullanılması koloni oluşumunu ciddi derecede düşürmüştür.

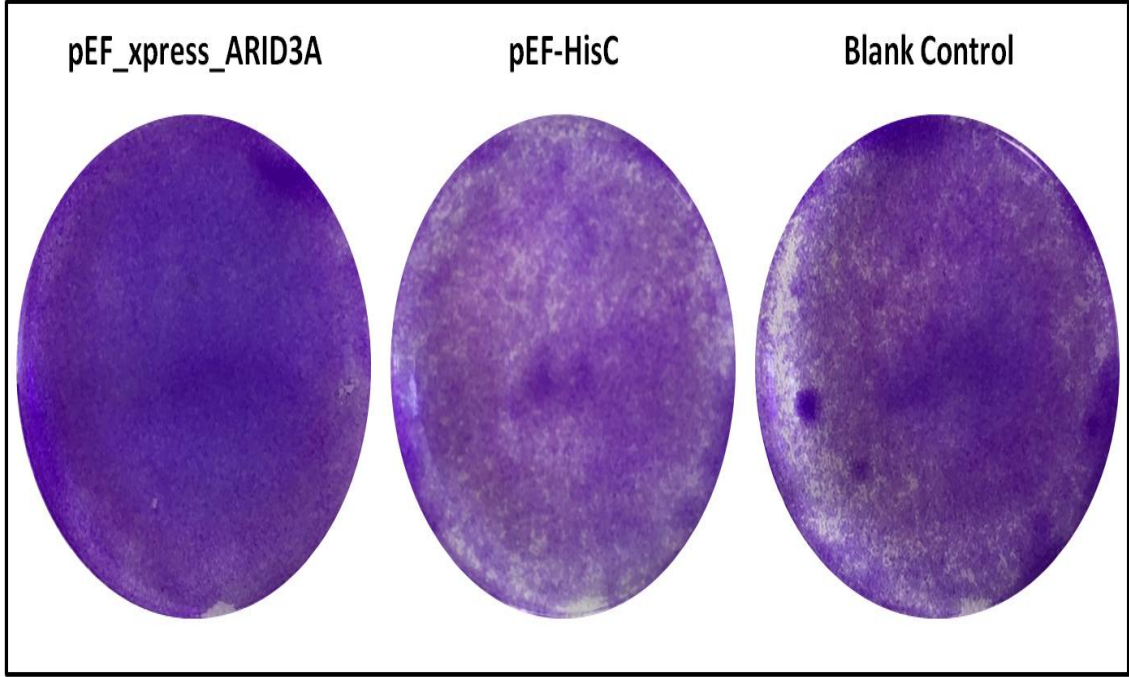


**Şekil 4.27.** siARID3A U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu baskılamıştır. ARID3A'nın susturulmasının ardından U2OS hücreleri siNC ve boş kontrole göre daha az koloni oluşturmuşlardır.

##### 4.5.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin koloni oluşumu üzerine etkisi

ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ardından, hücrelerin koloni oluşumu üzerine etkisi gözlemlenmiştir. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi U2OS hücrelerinde koloni oluşumunu arttırmıştır. U2OS hücrelerindeki koloni sıklığı pozitif kontrol ve boş

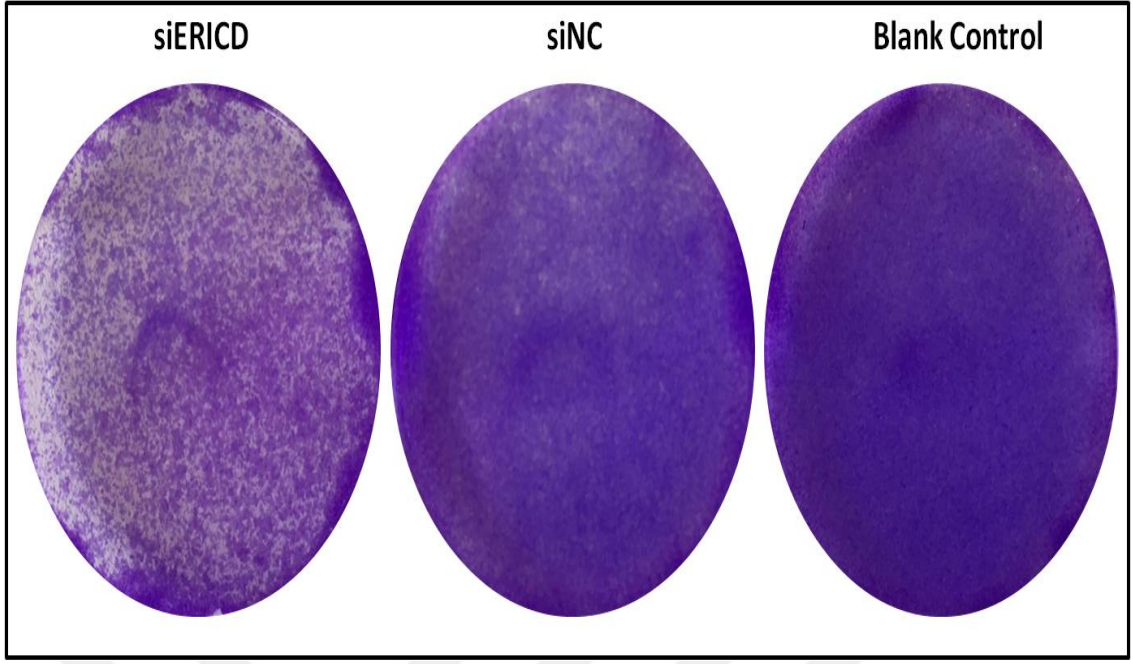
kontrole kıyasla belirgin bir şekilde fazla olduğu bulunmuştur (Şekil 4.28). ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi U2OS hücrelerinde koloni oluşumunu arttırmıştır. U2OS hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerinin kontrollere kıyasla fazla olduğu bulunmuştur. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi koloni oluşumunu ciddi derecede arttırmıştır.



**Şekil 4.28.** ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi (pEF\_xpress\_ARID3A) U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu arttırmıştır. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin ardından U2OS hücreleri pozitif kontrol (pEF-HisC) ve boş kontrole göre daha fazla koloni oluşturmuşlardır.

#### **4.5.3. U2OS hücre hattında ERICD'nin susturulmasının koloni oluşumu üzerine etkisi**

Koloni oluşum deneyleri U2OS hücre hattında yapılmıştır. ERICD'nin susturulmasının ardından, hücrelerin koloni oluşumu üzerine etkisi gözlemlenmiştir. siRNA aracılı ERICD'nin susturulması U2OS hücrelerinde koloni oluşumunu baskılamıştır. U2OS hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri negatif kontrol ve boş kontrole kıyasla azalmıştır (Şekil 4.29). U2OS hücre hattında siERICD ile transfekte edilmiş gruptaki koloni oluşum oranı anlamlı bir şekilde düşmüştür.



**Şekil 4.29.** siERICD U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu baskılamıştır. ERICD'nin susturulmasının ardından U2OS hücreleri siNC ve boş kontrole göre daha az koloni oluşturmuşlardır.

## 5. TARTIŞMA

Protein merkezli dogma protein kodlamayan genom bölgelerini “çöp” olarak değerlendirmekteydi. Transpozonlar, psödogenler ve biyolojik açıdan önemli işlevsel düzenleyici olan basit tekrarlar dahil olmak üzere birçok lncRNA, 'çöp' olarak tabir edilen genom bölgelerinden transkribe edilir (2, 3). Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), 200'den fazla nükleotid uzunluğa sahip protein kodlamayan, geniş ve çeşitli bir transkribe RNA molekül sınıfıdır. lncRNA'lar, kansere ilişkin bir araştırma konusu olarak her geçen gün önem kazanmaktadır. Şu ana kadar kanserlerde rolleri olan birçok lncRNA molekülü tespit edilmiştir. Bazı lncRNA'lar tümör baskılayıcı olarak görev yaparken bazıları onkogenler gibi davranır. Örneğin, lncRNA ANRIL p15'in ifadesini ve dolayısıyla hücre çoğalmasını (yaşlanmayı) baskılayarak lösemi ve prostat kanserinde onkogenik bir role sahiptir (207-209). Akciğer kanseri, kolon kanseri, karaciğer kanseri, göğüs kanseri gibi pek çok kanser türünde onkogen gibi davranan MALAT1, H19 ve HOTAIR gibi birçok lncRNA tanımlanmıştır (5-8, 150). Tümör baskılayıcı gibi davranan birçok lncRNA tanımlanmıştır. MEG3 birçok kanser çeşidinde tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (9). PTCSC3 (Papiller Tiroid Karsinoma Duyarlılığı Aday 3), tiroid kanseri ile ilişkili bir tümör baskılayıcı lncRNA'dır (10). ERICD (E2F1-Regulated Inhibitor of Cell Death) yakın zamanda bulunan bir lncRNA'dır. Kromozom 8 (chr8:141646242-141648531) üzerinde yerleşiktir ve iki ekzondan oluşmaktadır. Transkript boyutu 1745 bp'dir. ERICD'nin E2F (transkripsiyon faktörü 1) tarafından düzenlendiği ve DNA hasarına karşı hücresel yanıtı modüle ettiği bulunmuştur (11). ERICD'nin yukarı tarafındaki insan genomik dizisinin analizi ile, -221 / -214'de bir varsayılan E2F bağlanma yeri tespit edilmiştir. Bu da endojen E2F'lerin ERICD yukarı tarafına bağlandığını düşündürmektedir (12). DNA hasarı karşısında hayatta kalmayı desteklediği için, ERICD kanseri teşvik edici etkilere sahip olabilir, ayrıca kemo-direnç kazandırabilir.

ARID3A, kromatin yeniden şekillenmesi ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan AT zengin etkileşim bölgesi (ARID) DNA-bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, ARID DNA bağlama bölgesi ile karakterizedirler. ARID3A'nın "AATTAA" bağlayıcı bir uzlaşma dizisi vardır (13). ARID3A E2F yazılım etmenine ve

E2F-bağımlı yazılımı etkinleştirir (14). ARID3A, primer murin fibroblastlarında Ras'ın indüklediği erken yaşlanmayı önlemektedir (15). ARID3A, p53 ve DNA hasarı ile transkripsiyonel olarak yazılımsal olarak aktif olur (199). Ayrıca, ARID3A'nın yüksek gen ifadesinin kolorektal karsinomda iyi prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16). ARID3A, E2F hedef gen ifadesinde önemli bir role sahiptir. ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması, E2F1, p107, CDC2 ve CDC6 gibi E2F hedef genlerinin transkripsiyonuna engel olduğu gösterilmiştir. ARID3A susturulmasının, normal insan dermal fibroblastlarının (NHDF'ler) S faz girişini zayıflattığı ve insan tümör hücre hatlarının büyümesini baskıladığı da bulunmuştur. Dolayısıyla tümör baskılayıcı rollerinin olduğu düşünülmektedir (17). Şimdiye kadar, ARID3A'nın bir onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı olarak mı işlev gösterdiği halen tartışmaya açık bir konudur. Pek çok lncRNA'nın birçok biyolojik süreçte DNA bağlama proteinlerini hedef aldığı bilinmektedir (18-20). LncRNA'lar DNA'nın transkripsiyonunu epigenetik olarak düzenlemek için DNA'ya bağlanan proteinlerle birlikte hareket eder (21). ARID3A'nın uzun kodlamayan RNA'larla etkileşimi henüz gösterilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, ARID3A (AT-zengin etkileşim alanı 3A) ile lncRNA ERICD (E2F1-Kontrollü Hücre İnhibitörü) arasında muhtemel etkileşimi bulmayı amaçladık. Her ikisinin üzerinde de E2F varsayılan bağlanma bölgeleri olduğu ve E2F tarafından düzenlendiği bilinmektedir ve çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadıkları rapor edilmiştir. ARID3A ve ERICD DNA hasarı sırasında apoptozda zıt rollere sahiptir ve hücre döngüsü ile düzenlenmektedirler. Bu da hücrel süreçlerde birbirinin tersi yönünde rol oynadıklarını düşünmemizi sağlamaktadır. Bu bulgulara dayanarak, ikisinin arasındaki olası etkileşimi bulmayı amaçladık. Bunun için, henüz literatürde bulunmadığından, ERICD için ifade profili analizini yapmayı amaçladık. Sonuçların karşılaştırılabilmesi için farklı kanser hücre hatları ve normal doku örneklerinde ARID3A'nın ifade profili analizi de yapılmıştır. Olası muhtemel etkileşimlerini bulmak için susturma ve aşırı ifade (overexpression) deneyleri yapıldı.

Normal dokularda ARID3A'nın plasentada en fazla ifade edildiği bulunmuştur ve bu da memeli plasentasının gelişimi ve embriyogenezde rolü olduğunu göstermektedir. ARID3A'nın plasentada aşırı ifade edilmesi, hem içsel hem de dışsal gelişim programlarının düzenlenmesi yoluyla memeli plasental gelişiminde ARID3A'nın korunmuş bir işlevi olduğunu doğrulayan yeni bir çalışma yayınlanmıştır (214). Kemik iliğinde de aşırı ifade edilen ARID3A'nın hematopoezde rolünün olduğu ortaya

konulmuştur. Yeni yayınlanan iki araştırmada, yazılım etmeni ARID3A'nın insan hematopoetik atalarının in vitro farklılaşması için önem taşıdığı ve B lenfosit gelişimi için önemli olduğu belirtilmiştir (215,216). Bizim çalışmamızda akciğerde ARID3A'nın aşırı ifade edilmesi idiopatik pulmoner fibrozlu hastaların akciğerlerdeki yüksek ifadesi ile çelişmektedir (217). Normal insan kolon dokusunda ARID3A'nın ifadesinin düşük olduğu ve kolorektal kanser hücre hattı (HCT116)'da oldukça yüksek ifade edildiği bulunmuştur. Böylece, kolorektal kanserde bu genin rollerinin olduğunu kanıtlamaktadır. Bizim sonuçlarımız ile örtüşen bir biçimde AT-zengin etkileşimli bölge 3A (ARID3A)'nın yüksek ifadesi kolorektal kanserli hastaların iyi hastalık seyri ile ilişkilendirilmiştir (16). Ayrıca, meme kanseri hücre hattında (MCF7) yüksek ifade edilmesi meme kanserinde önemli rolleri olabileceğini göstermektedir. Zang H ve ark. tarafından daha önceden yapılan bir çalışmada bizim bulgularımızı destekler biçimde ARID3A'nın meme kanserinde rolünün olduğu ortaya konulmuştur (218). Kanser hücre hatları arasında ARID3A'nın glioblastoma (A172), pankreas kanseri (PANC1) ve tiroid kanseri (BCPAP) hücrelerinde en düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, ARID3A'nın beyin, pankreas ve tiroid kanserinde rolünün olabileceğini göstermiştir.

Normal dokular arasında, ERICD en fazla fetal karaciğer dokularında ifade edilmektedir ve bu da ERICD'nin memeli prenatal gelişimi sırasındaki hematopoezdeki rolünü göstermektedir çünkü karaciğer prenatal ontogenezin önemli bir sürecinde ana hematopoetik organ olarak hizmet eder. Dokular arasında en düşük ERICD ifadesi karaciğer dokularında bulunmuştur, bu memelilerin prenatal gelişiminde hematopoetik rolünü doğrulamaktadır. Kanser hücre hatları arasında ERICD'nin ifade seviyesi en yüksek akciğer kanseri hücre hattı (A549), pankreas kanseri (PANC1) ve glioblastomada (A172) bulunmuştur ve dolayısıyla bu kanserlerde rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

DNA bağlayıcı protein geni ARID3A ve lncRNA ERICD arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla susturma ve aşırı ifadelendirme deneyleri yapılmıştır. ARID3A ve ERICD'nin gen ifadesi analizlerinde insan osteosarkom hücre hattı U2OS'in koşullu olarak ARID3A ve ERICD'yi ifade ettiği bulunmuştur. Ayrıca, U2OS ideal transfekte edilebilir bir hücre hattıdır. Bu nedenle bu iki gen arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla U2OS hücre hattı seçilmiştir. ARID3A'nın susturulmasının ardından ERICD'nin ifade seviyesi düşük olarak bulunmuştur. Karşılaştırılmış t-testi analizi

kullanılarak t-testi değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (72 saat transfeksiyon için  $p < 0.0001$ ). GraphPad Prism 6.02 programı verilerin analiz edilmesi için kullanılmıştır. ARID3A'nın susturulmasının ardından ERICD'nin ifade seviyesinin azalması bu iki genin birbirleri arasında olası etkileşimlerini göstermektedir. RT-PCR yöntemi ile siARID3A transfeksiyonunun ardından ERICD'nin ifade seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir. ImageJ programı ile ARID3A'nın susturulmasından sonra ERICD ifade seviyesini belirten bandın yoğunluğunun düşük olduğu gösterilmiştir. ERICD ifadesini gösteren bandın toplam yoğunluğu 99984 ve normalin ise 128541'dir ve bu ikisi arasından 28557'lik ciddi bir fark vardır. ARID3A ve ERICD'nin ifade seviyesinin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalının verildiği hücrelerde transfekte edilmemiş (normal) hücrelerde benzer olduğu, dolayısıyla seçilen siRNA'nın ARID3A için özgül olduğu bulunmuştur. Böylece elde edilen sonuçlar siARID3A ve transfeksiyon kimyasalının hücreler için toksik olmadığı göstermektedir. Transfeksiyon kimyasalının toksik olduğu hücrelerde gen ifadesinin etkilendiği ve hedef dışı etkilerin arttığı bulunmuştur (219, 220). Bu nedenle, hücreler hücre ve gen ifadesi üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için yalnızca transfeksiyon kimyasalı ile muamele edilmiştir.

ERICD büyük oranda çekirdekte yerleşik bir RNA'dır ve sitoplazmik genlere kıyasla nükleer bir genin ifadesinin susturulması nispeten daha zordur (11). Bu nedenle ERICD'yi susturmak için iki farklı bölgeden tasarlanan iki farklı siRNA kullandık. Bunların arasından sadece siERICD-2 (ERICD-2) ERICD'yi susturmak için optimize edilebilmiştir. ERICD için diğer siRNA (ERICD-1) ileriki çalışmalara dahil edilmemiştir. ERICD'nin başarılı bir şekilde susturulmasının ardından ARID3A'nın ifade seviyesinin düştüğü bulunmuştur. Ancak, karşılaştırılmış t-testi analizi kullanılarak 48 ( $p < 0,0823$ ) ve 72 ( $p < 0,075472$ ) saatlerde t-testi değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. RT-PCR siERICD'nin transfeksiyonundan sonra ARID3A'nın ifade seviyesinin azaldığı göstermiştir. ImageJ programında ERICD'nin susturulmasından sonra ARID3A'nın ifadesi gösteren bandın yoğunluğunun düşük olduğu gösterilmiştir. ARID3A ifadesini gösteren bandın toplam yoğunluğu 105607 ve normalin ise 136522'dir ve bu ikisi arasından 30915'lik bir fark vardır. Image J programında bulunduğu üzere bant yoğunlukları arasından iyi bir fark (30915) olsa da RT-PCR sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. ERICD-2, ARID3A ve ERICD'nin ifade seviyesinin negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon

kimyasalının verildiği hücrelerde transfekte edilmemiş (normal) hücrelerde benzer olduğu, dolayısıyla seçilen siRNA'nın ARID3A için özgül olduğu bulunmuştur. Böylece elde edilen sonuçların ERICD-2 ve transfeksiyon kimyasalının hücreler için toksik olmadığı göstermektedir.

ARID3A'nın başarılı bir şekilde aşırı ifadelendirilmesinden sonra hem RT-PCR hem de qPCR kullanılarak belirli zaman aralığında ERICD ifadesinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. P değeri istatistiksel olarak anlamlı değildir. ARID3A ve lncRNA ERICD'nin doğrudan bir ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Aslında, hem ARID3A hem de ERICD E2F1 bağlanma bölgelerine sahiptir ve E2F1 tarafından düzenlenmektedir (11,14). Daha önceleri E2F1'in etkinleşmesi ile ERICD ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir (11). Ayrıca, E2F1'in susturulmasının ERICD seviyesini düşürdüğü bulunmuştur. Başka bir çalışmada ARID3A geninin siRNA aracılığı ile susturulmasının E2F1'in yazılımı baskılamak, ARID3A'nın aşırı ifadesinin E2F1'nin yazılımını arttırmadığı bulunmuştur (17). Bu çalışmada, ERICD'nin susturulması ARID3A'nın ifadesinin azalmasına neden olmuştur. ERICD'nin susturulmasının E2F1'i susturduğunu ve dolayısıyla ARID3A'yı dolaylı olarak susturduğunu göstermektedir. Öte yandan, ARID3A'yı susturduğumuzda E2F1'in dolaylı olarak ifadesinin azalması nedeniyle ERICD'nin ifadesinin azalması gerçekleşmiştir. ARID3A'nın aşırı ifade edilmesinin E2F1'i etkilemediği başka çalışmada gösterilmiştir (17). Bu nedenle ARID3A'nın ERICD'yi dolaylı olarak arttırmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak ARID3A ve ERICD E2F1 aracılığı ile dolaylı olarak birbirleri ile ilişkilidir.

ARID3A'nın U2OS'deki onkogenik veya tümör baskılayıcı işlev gösterip göstermediğini ortaya koymak amacıyla hücre göçü ve koloni oluşum deneyleri yapılmıştır. ARID3A susturulmuştur ve aşırı ifade edilmiştir. ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması U2OS hücrelerinin göçünü belirgin bir şekilde baskılamıştır. Diğer bir taraftan, ARID3A'nın aşırı ifade edilmesi U2OS hücrelerinde yara kapanmasında önemli bir tetikleyici olduğu doğrulanmıştır. ARID3A'nın aşırı ifade edilmesi hücrelerin göç kapasitesini arttırdığı bulunmuştur. Göç deneyleri sonuçları ARID3A'nın osteosarkom hücrelerinin hareketliliğini ve göçünü artırarak onkogenik bir rolünün olabileceğini göstermektedir. ARID3A'nın susturulması ve aşırı ifade edilmesi ile koloni oluşum deneyleri de gerçekleştirilmiştir. ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması kolonilerin oluşumunu büyük ölçüde azaltmıştır. ARID3A'nın

susturulmasından sonra U2OS hücrelerinin koloni oluşum kapasitelerinin azaldığı bulunmuştur. Bunun aksine ARID3A'nın aşırı ifadesinin U2OS hücrelerinin koloni oluşum kabiliyetini arttırdığı bulunmuştur. Bu bulgular, ARID3A'nın U2OS'deki onkogenik rolünü açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Aslında, ARID3A'nın onkogenik veya tümör baskılayıcı olduğu halen tartışmaya açık bir konudur. Bazı çalışmalarda ARID3A'nın onkogenik rollerinin olduğu gösterilirken (14, 15, 198) bazı çalışmalarda ise, tümör baskılayıcı işlevlerinin olduğu bildirilmiştir (199). Bizim çalışmamızdaki bulgular ARID3A'nın osteosarkomda onkogenik işlevinin olduğunu göstermektedir.

Ayrıca lncRNA ERICD'nin U2OS hücrelerinde rolleri araştırılmıştır. Hücre göçü ve koloni oluşum deneyleri yapılmıştır. siRNA aracılı ERICD'nin susturulması U2OS hücrelerinin göçünü baskılamıştır. ERICD'nin susturulmasından sonra U2OS hücre hatlarında koloni oluşum deneyleri de yapılmıştır. siRNA aracılı ERICD'nin susturulması U2OS hücrelerinin koloni oluşumunu baskılamıştır. Bu sonuçlar ERICD'nin U2OS hücrelerinde onkogenik rollerinin olduğunu göstermektedir. Bu güne kadar ERICD hakkında yapılan yalnızca bir çalışma mevcuttur (11). Bu veri ERICD'nin kanseri teşvik edici etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu bulgular ile örtüşen, bizim sonuçlarımız da ERICD'nin onkogenik rollerinin olduğunu göstermiştir.

Özetle, ARID3A ve ERICD'nin E2F1 aracılığı ile birbirleri ile dolaylı olarak ilişkili olduğu, ARID3A ve lncRNA ERICD'nin osteosarkomda onkogenik işlevlerinin olduğu ortaya konulmuştur. ARID3A ve lncRNA ERICD arasında bulunan ilişki yeni bir bulgudur ve DNA bağlayıcı proteinleri hedefleyen lncRNA'lar hakkındaki önemli bir kilometre taşıdır. Bizim bulgularımız, osteosarkom tedavisi sırasında hedef onkogenler olarak ARID3A ve ERICD'nin tedavisel olarak önemli olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular kanserin tedavisi açısından umut vericidir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Rinn J and Guttman M. RNA Function. RNA and dynamic nuclear organization. Science. 2014;345:1240-1241.
2. Gong C and Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. Nature. 2011;470:284-288.
3. Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, Drullinger LF, Wagner SD, Kugel JF and Goodrich JA. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. Molecular cell. 2008;29:499-509.
4. Gutschner T, Hammerle M and Diederichs S. MALAT1 -- a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. J Mol Med (Berl). 2013;91:791-801.
5. Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, Ayesh S, Abu-lail R., Hochberg A and Galun E. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. PloS one. 2007;2:e845.
6. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature. 2010;464:1071-1076.
7. Schmidt LH, Spieker T, Koschmieder S, Schaffers S, Humberg J, Jungen D, Bulk E, Hascher A, Wittmer D, Marra A. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011;6:1984-1992.
8. Xu C, Yang M, Tian J, Wang X and Li Z. MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis. International journal of oncology. 2011;39:169-175.
9. Benetatos L, Vartholomatos G and Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. International journal of cancer. Journal international du cancer. 2011;129:773-779.

10. Jendrzewski J, He H, Radomska HS, Li W, Tomsic J, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Nagy R. and de la Chapelle A. The polymorphism rs944289 predisposes to papillary thyroid carcinoma through a large intergenic noncoding RNA gene of tumor suppressor type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:8646-8651.
11. Feldstein O, Nizri T, Doniger T, Jacob J, Rechavi G and Ginsberg D. The long non-coding RNA ERIC is regulated by E2F and modulates the cellular response to DNA damage. *Molecular cancer*. 2013;12:131.
12. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A and Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & development*. 2011;25:1915-1927.
13. Bobbs A, Gellerman K, Hallas WM, Joseph S, Yang C, Kurkewich J and Cowden Dahl KD. ARID3B Directly Regulates Ovarian Cancer Promoting Genes. *PloS one*. 2015;10:e0131961.
14. Suzuki M, Okuyama S, Okamoto S, Shirasuna K, Nakajima T, Hachiya T, Nojima H, Sekiya S and Oda K. A novel E2F binding protein with Myc-type HLH motif stimulates E2F-dependent transcription by forming a heterodimer. *Oncogene*. 1998;17:853-865.
15. Peeper DS, Shvarts A, Brummelkamp T, Douma S, Koh EY, Daley GQ and Bernards R. A functional screen identifies hDRIL1 as an oncogene that rescues RAS-induced senescence. *Nature cell biology*. 2002;4:148-153.
16. Song M, Kim H, Kim WK, Hong SP and Lee C. High expression of AT-rich interactive domain 3A (ARID3A) is associated with good prognosis in colorectal carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2014;21 Suppl 4:S481-489.
17. Saadat KA. Role of ARID3A in E2F target gene expression and cell growth. *Kokubyo Gakkai zasshi. The Journal of the Stomatological Society, Japan*. 2013;80:15-20.
18. Hudson WH. and Ortlund EA. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2014;15:749-760.

19. Yang G, Lu X and Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1839:1097-1109.
20. Brockdorff N. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *Rna*. 2013;19:429-442.
21. Bullock MD, Silva AM, Unaldi PK, Filant J, Rashed MH, Sood A, Berestein GL, Calin GA. Exosomal Non-Coding RNAs: Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Applications in Cancer. *Non-coding RNA*. 2015;1:53-68.
22. Zhang X, Gejman R, Mahta A, Zhong Y, Rice KA, Zhou Y, Cheunsuchon P, Louis DN and Klibanski A. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer research*. 2010;70:2350-2358.
23. Mourtada-Maarabouni M and Williams GT. Role of GAS5 noncoding RNA in mediating the effects of rapamycin and its analogues on mantle cell lymphoma cells. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014;14:468-473.
24. Lu H, He Y, Lin L, Qi Z, Ma L, Li L and Su Y. Long non-coding RNA MALAT1 modulates radiosensitivity of HR-HPV+ cervical cancer via sponging miR-145. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37:1683-1691.
25. Yang N, Fu Y, Zhang H, Sima H, Zhu N and Yang G. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:28151-28163.
26. Jemal A, Siegel R, Xu J and Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010;60:277-300.
27. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66:7-30.
28. Dorak MT and Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Frontiers in genetics*. 2012;3:268.
29. Siegel R, Naishadham D and Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62:10-29.

30. Gutschner T and Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*. 2012;9:703-719.
31. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
32. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
33. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.
34. Subramanya D and Grivas PD. HPV and cervical cancer: updates on an established relationship. *Postgraduate medicine*. 2008;120:7-13.
35. Brooks CL and Gu W. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS letters*. 2011;585:2803-2809.
36. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26:1324-1337.
37. Lowe SW, Cepero E and Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432:307-315.
38. Amaral JD, Xavier JM., Steer CJ and Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*. 2010;9:145-152.
39. Levine B and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132:27-42.
40. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*. 2007;21:2861-2873.
41. Galluzzi L and Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135:1161-1163.
42. Zong WX and Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*. 2006;20:1-15.
43. Grivennikov SI, Greten FR and Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883-899.
44. Amaravadi RK and Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13:7271-7279.

45. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*. 2005;6:611-622.
46. Shay JW and Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2000;1:72-76.
47. Meyne J, Ratliff RL and Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:7049-7053.
48. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB and Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal*. 1992;11:1921-1929.
49. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA and Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature medicine*. 1997;3:1271-1274.
50. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA and Reddel RR. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nature biotechnology*. 2009;27:1181-1185.
51. Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ and Dirks RW. Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *The EMBO journal*. 2003;22:6631-6641.
52. Shay JW and Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33:787-791.
53. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer*. 2003;3:453-458.
54. Talmadge JE and Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*. 2010;70:5649-5669.
55. Klymkowsky MW and Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology*. 2010;174:1588-1593.

56. Polyak K and Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews. Cancer.* 2009;9:265-273.
57. Yilmaz M and Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews.* 2009;28:15-33.
58. Kalluri R and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation.* 2003;112:1776-1784.
59. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119:1420-1428.
60. Egeblad M, Rasch MG and Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology.* 2010;22:697-706.
61. Joyce JA and Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer.* 2009;9:239-252.
62. Kalluri R and Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer.* 2006;6:392-401.
63. Qian BZ and Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39-51.
64. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
65. Baeriswyl V and Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology.* 2009;19:329-337.
66. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2009;29:789-791.
67. Kazerounian S, Yee KO and Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2008;65:700-712.
68. Djebali S, Davis CA., Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489:101-108.

69. Veneziano D, Di Bella S, Nigita G, Lagana A, Ferro A and Croce CM. Noncoding RNA: Current Deep Sequencing Data Analysis Approaches and Challenges. *Human mutation*. 2016;37:1283-1298.
70. Comings DE. The structure and function of chromatin. *Advances in human genetics*. 1972;3:237-431.
71. Ling H, Fabbri M and Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug discovery*. 2013;12:847-865.
72. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*. 2011;12:861-874.
73. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M and Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of translational medicine*. 2012;10:103.
74. Gibb EA, Brown CJ and Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer*. 2011;10:38.
75. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M and Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *The Journal of pathology*. 2010;220:126-139.
76. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854.
77. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson, M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR and Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901-906.
78. Maiorano NA and Hindges R. Non-coding RNAs in retinal development. *International journal of molecular sciences*. 2012;13:558-578.
79. Shukla GC, Singh J and Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology*. 2011;3:83-92.
80. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL and Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*. 2004;14:1902-1910.

81. Saini HK, Griffiths-Jones S and Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:17719-17724.
82. Saini HK, Enright AJ and Griffiths-Jones S. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC genomics*. 2008;9:564.
83. Di Leva G, Garofalo M and Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 2014;9:287-314.
84. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R and Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2012;110:563-574.
85. Sakamoto KM. Knocking down human disease: potential uses of RNA interference in research and gene therapy. *Pediatric research*. 2004;55:912-913.
86. Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends in genetics : TIG*. 2003;19:39-46.
87. Denli AM and Hannon GJ. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28:196-201.
88. Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293-296.
89. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-366.
90. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101:25-33.
91. Nykanen A, Haley B and Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 2001;107:309-321.
92. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N and Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115:199-208.

93. Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*. 2001;15:188-200.
94. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A and Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature materials*. 2013;12:967-977.
95. Faehnle CR and Joshua-Tor L. Argonautes confront new small RNAs. *Current opinion in chemical biology*. 2007;11:569-577.
96. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y and Nakano T. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mechanisms of development*. 2001;108:121-133.
97. Deng W and Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental cell*. 2002;2:819-830.
98. Cheng J, Guo JM, Xiao BX, Miao Y, Jiang Z, Zhou H and Li QN. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412:1621-1625.
99. Cui L, Lou Y, Zhang X, Zhou H, Deng H, Song H, Yu X, Xiao B, Wang W and Guo J. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. *Clinical biochemistry*. 2011;44:1050-1057.
100. Mattick JS and Makunin IV. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. 2006;15 Spec No : R17-29.
101. Meier UT. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma*. 2005;114:1-14.
102. Bachellerie JP, Cavaille J and Huttenhofer A. The expanding snoRNA world. *Biochimie*. 2002;84:775-790.
103. Henras AK, Dez C and Henry Y. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Current opinion in structural biology*. 2004;14:335-343.
104. Kiss AM, Jady BE, Bertrand E and Kiss T. Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery. *Molecular and cellular biology*. 2004;24:5797-5807.

105. Kishore S and Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science*. 2006;311:230-232.
106. Bortolin ML and Kiss T. Human U19 intron-encoded snoRNA is processed from a long primary transcript that possesses little potential for protein coding. *Rna*. 1998;4:445-454.
107. Preker P, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, Schierup MH and Jensen TH. RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science*. 2008;322:1851-1854.
108. Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA and Sharp PA. Divergent transcription from active promoters. *Science*. 2008;322:1849-1851.
109. Morris KV, Santoso S, Turner AM, Pastori C and Hawkins PG. Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells. *PLoS genetics*. 2008;4:e1000258.
110. Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. *Nature*. 2009;457:1028-1032.
111. Hawkins PG, Santoso S, Adams C, Anest V and Morris KV. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic acids research*. 2009;37:2984-2995.
112. Taft RJ, Hawkins PG, Mattick JS and Morris KV. The relationship between transcription initiation RNAs and CCCTC-binding factor (CTCF) localization. *Epigenetics & chromatin* 2011;4:13.
113. Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK and Kurokawa R. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature*. 2008;454:126-130.
114. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453:539-543.

115. Li CH and Chen Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45, 1895-1910.
116. Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M and Pagano A. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in genetics : TIG*. 2007;23:614-622.
117. Ma L, Bajic VB and Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10:925-933.
118. Ponting CP, Oliver PL and Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*. 2009;136:629-641.
119. Wilusz JE, Sunwoo H and Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & development*. 2009;23:1494-1504.
120. Rintala-Maki ND and Sutherland LC. Identification and characterisation of a novel antisense non-coding RNA from the RBM5 gene locus. *Gene*. 2009;445:7-16.
121. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell*. 2010;39:925-938.
122. Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, Bonilla F and de Herreros AG. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & development*. 2008;22:756-769.
123. Tsuiji H, Yoshimoto R, Hasegawa Y, Furuno M, Yoshida M and Nakagawa S. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2011;16:479-490.
124. Watanabe Y and Yamamoto M. *S. pombe* mei2<sup>+</sup> encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell*. 1994;78:487-498.

125. Campalans A, Kondorosi A and Crespi M. Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *The Plant cell*. 2004;16:1047-1059.
126. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269:1236-1241.
127. Hellwig S and Bass BL. A starvation-induced noncoding RNA modulates expression of Dicer-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:12897-12902.
128. Wang KC and Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2011;43:904-914.
129. Polager S and Ginsberg D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends in cell biology*. 2011;18:528-535.
130. Sherr CJ and McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*. 2002;2:103-112.
131. Dimova DK, Stevaux O, Frolov MV and Dyson NJ. Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes & development*. 2003;17:2308-2320.
132. van den Heuvel S and Dyson NJ. Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2008;9:713-724.
133. Hallstrom TC and Nevins JR. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle*. 2009;8:532-535.
134. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P and Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Molecular and cellular biology*. 2007;27:6229-6242.
135. Polager S, Ofir M and Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*. 2008;27:4860-4864.
136. Kusama Y, Sato K, Kimura N, Mitamura J, Ohdaira H and Yoshida K. Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human

autophagy-related genes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14:1165-1175.

137. Johnson DG and Degregori J. Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Current molecular medicine*. 2006;6:731-738.
138. Subramanian M, Jones MF and Lal A. Long Non-Coding RNAs Embedded in the Rb and p53 Pathways. *Cancers*. 2013;5:1655-1675.
139. Wan G, Mathur R, Hu X, Liu Y, Zhang X, Peng G and Lu X. Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway. *Cellular signalling*. 2013;25:1086-1095.
140. Shen XH, Qi P and Du X. Long non-coding RNAs in cancer invasion and metastasis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2015;28:4-13.
141. Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Kubota T. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer research*. 2013;33:3185-3193.
142. Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M and Zeinoddini M. Up-regulation of HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues. *Med Oncol*. 2013;30:670.
143. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer research*. 2011;71:6320-6326.
144. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, Sawada G, Takahashi Y, Kurashige J, Akiyoshi S, Sasaki S, Iwaya T, Sudo T. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*. 2013;29:946-950.
145. Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J and Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *The Journal of international medical research*. 2011;39:2119-2128.
146. Yang Z, Zhou L, Wu LM, Lai MC, Xie HY, Zhang F and Zheng SS. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in

- hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Annals of surgical oncology*. 2011;18:1243-1250.
147. Lu L, Zhu G, Zhang C, Deng Q, Katsaros D, Mayne ST, Risch HA, Mu L, Canuto EM, Gregori G. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;136:875-883.
  148. Chisholm KM, Wan Y, Li R, Montgomery KD, Chang HY and West RB. Detection of long non-coding RNA in archival tissue: correlation with polycomb protein expression in primary and metastatic breast carcinoma. *PloS one*. 2012;7:e47998.
  149. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G, Revenko A, Arun G, Stentrup M, Gross M. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer research*. 2013;73:1180-1189.
  150. Lai MC, Yang Z, Zhou L, Zhu QQ, Xie HY, Zhang F, Wu LM., Chen LM. and Zheng SS. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Med Oncol*. 2012;29:1810-1816.
  151. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW and Schalken JA. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer research*. 2002;62:2695-2698.
  152. Chung S, Nakagawa H, Uemura M, Piao L, Ashikawa K, Hosono N, Takata R, Akamatsu S, Kawaguchi T, Morizono T. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility. *Cancer science*. 2011;102:245-252.
  153. Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, Dhanasekaran SM, Cao Q, Brenner JC, Laxman B, Asangani IA, Grasso CS, Kominsky HD. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nature biotechnology*. 2011;29:742-749.

154. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ and Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 2010;465:1033-1038.
155. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142:409-419.
156. Wang P, Ren Z and Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113:1868-1874.
157. Prensner JR and Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer discovery*. 2011;1:391-407.
158. He H, Ni J and Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). *Oncology letters*. 2014;7:1352-1362.
159. Liu JJ, Liu S, Wang JG, Zhu W, Hua YQ, Sun W and Cai ZD. Telangiectatic osteosarcoma: a review of literature. *OncoTargets and therapy*. 2013;6:593-602.
160. Fu HL, Shao L, Wang Q, Jia T, Li M and Yang DP. A systematic review of p53 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34:3817-3821.
161. Dong Y, Liang G, Yuan B, Yang C, Gao R and Zhou X. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36:1477-1486.
162. Yang Z, Li X, Yang Y, He Z, Qu X and Zhang Y. Long noncoding RNAs in the progression, metastasis, and prognosis of osteosarcoma. *Cell death & disease*. 2016;7:e2389.
163. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129:1311-1323.

164. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:11667-11672.
165. Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*. 2005;309:1564-1566.
166. Wang XJ, Gaasterland T and Chua NH. Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology*. 2005;6:R30.
167. Faghihi MA and Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2009;10:637-643.
168. Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, Vidaud M, Vidaud D and Bieche I. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer research*. 2007;67:3963-3969.
169. Ling H, Vincent K, Pichler M, Fodde R, Berindan-Neagoe I, Slack FJ and Calin GA. Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene*. 2015;34:5003-5011.
170. Orom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*. 2010;143:46-58.
171. Orom UA and Shiekhattar R. Long non-coding RNAs and enhancers. *Current opinion in genetics & development*. 2011;21:194-198.
172. Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P and Kohtz JD. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & development*. 2006;20:1470-1484.

173. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, Merkurjev D, Ohgi KA, Meng D, Zhang J. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature*. 2013;500:598-602.
174. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS and Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*. 2004;304,1321-1325.
175. Braconi C, Valeri N, Kogure T, Gasparini P, Huang N, Nuovo GJ, Terracciano L, Croce CM and Patel T. Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:786-791.
176. Ferdin J, Nishida N, Wu X, Nicoloso MS, Shah MY, Devlin C, Ling H, Shimizu M, Kumar K, Cortez MA. HINCUTs in cancer: hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts. *Cell death and differentiation*. 2013;20:1675-1687.
177. Liz J, Portela A, Soler M, Gomez A, Ling H, Michlewski G, Calin GA, Guil S and Esteller M. Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. *Molecular cell*. 2014;55:138-147.
178. Levine M and Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 2003;424:147-151.
179. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, Horlings HM, Shah N, Umbricht C, Wang P. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics*. 2011;43:621-629.
180. Schmitz KM, Mayer C, Postepska A and Grummt I. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes & development*. 2010;24:2264-2269.
181. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258:818-821.

182. Sur I, Tuupanen S, Whittington T, Aaltonen LA and Taipale J. Lessons from functional analysis of genome-wide association studies. *Cancer research*. 2013;73:4180-4184.
183. Huppi K, Pitt JJ, Wahlberg BM and Caplen NJ. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Frontiers in genetics*. 2012;3:69.
184. Wilsker D, Probst L, Wain HM, Maltais L, Tucker PW and Moran E. Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics*. 2005;86:242-251.
185. Yuan YC, Whitson RH, Liu Q, Itakura K and Chen Y. A novel DNA-binding motif shares structural homology to DNA replication and repair nucleases and polymerases. *Nature structural biology*. 1998;5:959-964.
186. Iwahara J and Clubb RT. Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *The EMBO journal*. 1999;18:6084-6094.
187. Kim S, Zhang Z, Upchurch S, Isern N and Chen Y. Structure and DNA-binding sites of the SWI1 AT-rich interaction domain (ARID) suggest determinants for sequence-specific DNA recognition. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:16670-16676.
188. Herrscher RF, Kaplan MH, Lelsz DL, Das C, Scheuermann R and Tucker PW. The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes & development*. 1995;9:3067-3082.
189. Decristofaro MF, Betz BL, Rorie CJ, Reisman DN, Wang W and Weissman BE. Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *Journal of cellular physiology*. 2001;186:136-145.
190. Wang X, Nagl NG, Wilsker D, Van Scoy M, Pacchione S, Yaciuk P, Dallas PB and Moran E. Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *The Biochemical journal*. 2004;383:319-325.
191. Wang X, Nagl NG Jr, Flowers S, Zweitzig D, Dallas PB and Moran E. Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in

- human tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 2004;112:636.
192. Diederichs S, Baumer N, Ji P, Metzelder SK, Idos GE, Cauvet T, Wang W, Moller M, Pierschalski S, Gromoll J. Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279:33727-33741.
  193. Nixon JC, Rajaiya JB, Ayers N, Evetts S and Webb CF. The transcription factor, Bright, is not expressed in all human B lymphocyte subpopulations. *Cellular immunology.* 2004;228:42-53.
  194. Wang Z, Goldstein A, Zong RT, Lin D, Neufeld EJ, Scheuermann RH and Tucker PW. Cux/CDP homeoprotein is a component of NF- $\mu$ NR and represses the immunoglobulin heavy chain intronic enhancer by antagonizing the bright transcription activator. *Molecular and cellular biology.* 1999;19:284-295.
  195. Rajaiya J, Nixon JC, Ayers N, Desgranges ZP, Roy AL and Webb CF. Induction of immunoglobulin heavy-chain transcription through the transcription factor Bright requires TFII-I. *Molecular and cellular biology.* 2006;26:4758-4768.
  196. Webb CF, Smith EA, Medina KL, Buchanan KL, Smithson G and Dou S. Expression of bright at two distinct stages of B lymphocyte development. *Journal of immunology.* 1998;160:4747-4754.
  197. Kortschak RD, Reimann H, Zimmer M, Eyre HJ, Saint R and Jenne DE. The human dead ringer/bright homolog, DRIL1: cDNA cloning, gene structure, and mapping to D19S886, a marker on 19p13.3 that is strictly linked to the Peutz-Jeghers syndrome. *Genomics.* 1998;51:288-292.
  198. Fukuyo Y, Mogi K, Tsunematsu Y and Nakajima T. E2FBP1/hDril1 modulates cell growth through downregulation of promyelocytic leukemia bodies. *Cell death and differentiation.* 2004;11:747-759.
  199. Ma K, Araki K, Ichwan SJ, Suganuma T, Tamamori-Adachi M and Ikeda MA. E2FBP1/DRIL1, an AT-rich interaction domain-family transcription factor, is regulated by p53. *Molecular cancer research : MCR.* 2003;1:438-444.
  200. Lai A, Marcellus RC, Corbeil HB and Branton PE. RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene.* 1999;18:2091-2100.

201. Lai A, Lee JM, Yang WM, DeCaprio JA, Kaelin WG, Jr Seto E and Branton PE. RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Molecular and cellular biology*. 1999;19:6632-6641.
202. Lai A, Kennedy BK, Barbie DA, Bertos NR, Yang XJ, Theberge MC, Tsai SC, Seto E, Zhang Y, Kuzmichev A. RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Molecular and cellular biology*. 2001;21:2918-2932.
203. Cao J, Gao T, Stanbridge EJ and Irie R. RBP1L1, a retinoblastoma-binding protein-related gene encoding an antigenic epitope abundantly expressed in human carcinomas and normal testis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93:1159-1165.
204. Lee Y, Song AJ, Baker R, Micales B, Conway SJ and Lyons GE. Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development. *Circulation research*. 2000;86:932-938.
205. Kitajima K, Kojima M, Kondo S and Takeuchi T. A role of jumonji gene in proliferation but not differentiation of megakaryocyte lineage cells. *Experimental hematology*. 2001;29:507-514.
206. Anzai H, Kamiya A, Shirato H, Takeuchi T and Miyajima A. Impaired differentiation of fetal hepatocytes in homozygous jumonji mice. *Mechanisms of development*. 2003;120:791-800.
207. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M and Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014
208. Zhang Y, Feng Y, Justus CR, Jiang W, Li Z, Lu JQ, Brock RS, McPeck MK, Weidner DA, Yang LV. Comparative study of 3D morphology and functions on genetically engineered mouse melanoma cells. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 2012;4:1428-1436.
209. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J and van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006;1:2315-2319.

210. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M and Xiong Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2011;30:1956-1962.
211. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP and Cui H. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*. 2008;451:202-206.
212. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ and Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*. 2010;38:662-674.
213. Lestari W, Ichwan SJ, Otsu M, Yamada S, Iseki S, Shimizu S and Ikeda MA. Cooperation between ARID3A and p53 in the transcriptional activation of p21WAF1 in response to DNA damage. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;417:710-716.
214. Rhee C, Edwards M, Dang C, Harris J, Brown M, Kim J and Tucker HO. ARID3A is required for mammalian placenta development. *Developmental biology*. 2016.
215. Ratliff ML, Mishra M, Frank MB, Guthridge JM and Webb CF. The Transcription Factor ARID3a Is Important for In Vitro Differentiation of Human Hematopoietic Progenitors. *Journal of immunology*. 2016;196:614-623.
216. Kurkewich JL, Klopfenstein N, Hallas WM, Wood C, Sattler RA, Das C, Tucker H, Dahl R and Cowden Dahl KD. Arid3b Is Critical for B Lymphocyte Development. *PloS one*. 2016;11:e0161468.
217. Lin L, Zhou Z, Zheng L, Alber S, Watkins S, Ray P, Kaminski N, Zhang Y and Morse D. Cross talk between Id1 and its interactive protein Drill1 mediate fibroblast responses to transforming growth factor-beta in pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*. 2008;173:337-346.
218. Zang H, Li N, Pan Y and Hao J. Identification of upstream transcription factors (TFs) for expression signature genes in breast cancer. *Gynecological*

endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2016;1:1-6.

219. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G and Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*. 2003;21:635-637.
220. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN and Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:6347-6352.



## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hindistanda doğdu. Lisans eğitimine 2006 yılında Jamia Hamdard Üniversitesi, Eczacılık Bölümü'nde başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2013 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. TÜBİTAK (2215-Uluslararası Öğrenciler İçin Lisansüstü Burs Programı) bursu kazanan birisidir.

