



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOSARKOM'DA ARID3A, PTEN ve AKT1 ARASINDAKİ
OLASI ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ**

AMANI KANJO

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğretim Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

Gaziantep

2018

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

**OSTEOSARKOM'DA ARID3A, PTEN ve AKT1 ARASINDAKİ OLASI
ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ**

AMANI KANJO

Tez Savunma Tarihi: 04.05.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

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

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

Dr. Öğretim Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

1. Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

2. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

3. Dr. Öğretim Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

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.

Tarih: 04.05.2018

İmza:

Ad Soyadı: AMANİ KANJO

TEŞEKKÜR

Akademik yaşıntım boyunca bana destek olan herkese çok teşekkür ederim. Çalışmamın her anında yanımda olan tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR'a büyük şükranlarımı sunarım. Bu çalışmanın tamamlanması sırasında canım hocam oldukça sabırlı davranıp, önerileri ve katkılarını benden esirgememiş, her zorlandığım anda yanımda olmuştur.

Ayrıca çalışmalarım süresince her türlü yardım ve destek için yanımda olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI' ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana çeşitli bilimsel rehberlikler sunan sayın Prof. Dr. Ahmet ARSLAN, Dr. Kaiffee ARMAN'a, teknik desteklerinden dolayı Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'a ve Ceyda OKUDU' ya çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca kararlılıkla engellerin üstesinden gelmemi sağlayan, beni şefkat ve tutku ile büyüten canım babama ve hayatımın henüz erken yıllarında onun sesini duyarak güç kazandığım, kalem tutmayı bile bana ilk öğreten kişi olan canım anneme ne kadar teşekkür etsem azdır. Beni her zaman büyük coşkularla cesaretlendirip teşvik eden, canım kardeşlerim Muhammed ve Ayman'a sonsuz kez teşekkür ederim. Açıktır ki, ailemin göstermiş olduğu olağanüstü tolerans ve sabır dolayısıyla başarımlarım şu anki seviyesine ulaşmış bulunmaktadır.

Bana inanan ve beni küçük tatlı sözlerle teşvik edip tezi tamamlamamda katkı sağlayan ve ayrıca akademik ilerleyişimde güçlü motivasyon ve destek sunan sevgili arkadaşlarım Dr. Adolsalam, Dr. Ahmad, Eng. Adham, Hamid, Wael, Hossein, Lama, Yara, Kinda, Judy, Maya, Zekiye, Yunus, Nesil, Murat, Seçil, Gizem, ve ismini sayamadığım arkadaşlarıma en derin şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu çalışmayı “Özgür Suriye Bölgesi” nin “Özgür Suriye Savunması”na ve şehitlerinin ruhuna adamaktan gurur duyarım.

Sarsılmaz destekleriniz için hepinize çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser.....	5
2.2. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri.....	5
2.2.1. Çoğalma Uyarısının Devamlılığı.....	5
2.2.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış.....	6
2.2.3. Hücre Ölümüne Direnme.....	6
2.2.4. Replikatif Çoğalmayı Sağlama.....	8
2.2.5. İnvasyon ve Metastazın Aktive Edilmesi.....	8
2.2.5.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT).....	9
2.2.6. Anjiyogenezin Uyarılması.....	9
2.3. ARID Ailesi.....	10
2.3.1. ARID1.....	12
2.3.2. ARID2.....	13
2.3.3. ARID3.....	13
2.3.3.1. ARID3A.....	14
2.3.4. ARID4.....	15
2.3.5. ARID5.....	15
2.3.6. JARID1.....	15
2.3.7. JARID2.....	16

2.4. Osteosarkom Genetiği.....	16
2.4.1. Osteosarkom Gelişiminin Moleküler Mekanizmaları.....	17
2.4.2. Osteosarkomda PI3K/Akt Sinyal Yolağı.....	19
2.4.2.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağının Etkinleşmesi.....	20
2.4.2.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağının Negatif Düzenleyicisi Olarak PTEN	22
2.4.3. Osteosarkom Patogeneğinde PI3K/Akt Yolağının Rolü	24
2.4.4. Osteosarkomda PI3K/Akt Yolağının Tedavilerde Hedeflenmesi	25
2.4.4.1. PI3K İnhibitörleri.....	25
2.4.4.2. Çift Yönlü PI3K/mTOR İnhibitörleri.....	26
2.4.4.3. Akt İnhibitörleri.....	26
2.4.4.4. mTOR İnhibitörleri.....	26
2.4.4.5. PTEN Aktivatörleri.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	28
3.1. Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Çoğaltılması.....	28
3.2. siRNA ile Gen Susturma.....	28
3.3. ARID3A'nın Aşırı İfade Edilmesi.....	28
3.4. Susturulmuş ve Aşırı İfade Edilmiş ARID3A Taşıyan U2OS Hücrelerinde RNA İzolasyonu.....	29
3.5. cDNA Sentezi.....	30
3.6. Primer Tasarımı.....	31
3.7. Sonuçların Agaroze Jelde Görüntülenmesi.....	32
3.8. Real-Time PCR (qPCR) Analizleri.....	32
3.9. İstatistiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. ARID3A'nın Susturulması.....	34
4.1.1. ARID3A'nın Susturulmasının AKT1 Üzerine Etkileri.....	36
4.1.2. ARID3A'nın Susturulmasının PTEN Üzerine Etkileri	37
4.1.3. siARID3A'nın Özgüllüğünün ve Transfeksiyon Kimyasalının Toksisitesinin Kontrol Edilmesi	38
4.2. ARID3A'nın Aşırı İfade Edilmesi	39
4.2.1. ARID3A'nın Aşırı İfadesinin AKT1 Üzerine Etkileri.....	43
4.2.2. ARID3A'nın Aşırı İfadesinin PTEN Üzerine Etkileri.....	44
5. TARTIŞMA.....	46

6. KAYNAKLAR.....	49
7.EKLER.....	61
7.1.EK1.....	61
7.2.EK2.....	62
7.3. EK 3.....	63
8. ÖZGEÇMİŞ.....	64



SİMGE VE KISALTMALAR

AMPK	AMP-Aktifleştirici Protein Kinaz
ARID3A	AT-Rich Interaction Domain 3A
ATP	Adenosine triphosphate
CTGF	Connective-Tissue Growth Factor
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
DMEM	Dulbecco's modifiye eagle's medium
dsRNA	Double Stranded RNA
ECM	Hücre dışı matriks
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
FBS	Fetal Bovin Serum
FOXO1	Forkhead Box Protein O1
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HPV	Human Papillomaviruses
MDM2	Mouse Double Minute 2
MPT	Mitokondriyal Geçirgenlik Bağlantısı
miRNA	Micro RNA
MCL	Mantle cell lymphoma
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTEN	Phosphatase ve Tensin Homolog
qPCR	Quantitative PCR
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNAi	RNA müdahalesi, RNA interference
RT-PCR	Real Time PCR
siRNA	Small interference RNA
ssRNAs	Single stranded RNAs
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Sitozolik ve mitokondriyal p53'ün apoptotik yollarının gösterimi	7
Şekil 2.2. ARID ailesi proteinler ve domeyn yapıları	11
Şekil 2.3. Osteosarkomdaki sinyol yolları ve anahtar genler	19
Şekil 2.4. AKT ve PTEN proteinlerinin şematik yapısı	21
Şekil 2.5. PI3K/ AKT sinyal yolağı	23
Şekil 2.6. PI3K/ AKT yolağının aktivasyonu osteosarkom başlamasında ve gelişiminde düzenlediği patolojik süreçler	24
Şekil 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.....	33
Şekil 4.1. U2OS hücre hattının siARID3A ile transfeksiyon sonrası morfolojik yapısı	34
Şekil 4.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının qPCR ile gösterilmesi.....	35
Şekil 4.3. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının RT-PCR ile gösterilmesi.....	36
Şekil 4.4. ARID3A'nın susturulması sonrasında AKT1 ifadesindeki değişimin gösterilmesi.....	37
Şekil 4.5. ARID3A'nın susturulması sonrasında PTEN ifadesindeki değişimin gösterilmesi	38
Şekil 4.6. ARID3A, AKT1 ve PTEN'in negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon ajanı ile muamelesi sonrasında göreceli ifade seviyeleri	39
Şekil 4.7. Klonlanmış ARID3A geninin kesim enzimleri kullanılarak doğrulanması	40
Şekil 4.8. pEF_xpress_ARID3A, pozitif kontrol pEF4-HisC ve normal (transfekte edilmemiş) U2OS hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarının gösterilmesi	41
Şekil 4.9. qPCR kullanılarak U2OS hücrelerinde ARID3A geninin ifade seviyesinin gösterilmesi	42

Şekil 4.10. RT-PCR kullanılarak ARID3A'nın ifade seviyesindeki değişimin gösterilmesi.....	43
Şekil 4.11. qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadesinin AKT1 ifade seviyesi üzerine katlı değişim oranlarının gösterilmesi	44
Şekil 4.12. qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadesinin PTEN ifade seviyesi üzerine katlı değişim oranlarının gösterilmesi	45



TABLO LİSTESİ

	Sayfa
	No
Tablo 2.1. İnsan ARID genlerinin isimlendirilmesi.....	12
Tablo 3.1. ARID3A genini hedefleyen siRNA dizisi.....	28
Tablo 3.2. ARID3A klonlanmış geninin doğrulama protokolü.....	29
Tablo 3.3. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları.....	30
Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.....	30
Tablo 3.5. cDNA sentezi tepkime koşulları.....	31
Tablo 3.6. Gen ifadesi analiz edilecek genlerin primer dizilimleri	31
Tablo 3.7. ARID3A'nın RT-PCR tepkime koşulları.....	32
Tablo 3.8. qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.....	33
Tablo 3.9. qPCR için tepkime koşulları.....	33

ÖZET

OSTEOSARKOMDA ARID3A, PTEN VE AKT1 ARASINDAKİ OLASI ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ

AMANİ KANJO

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

Mayıs 2018, 66 sayfa

Çocuklarda en yaygın malignant tümörlerden biri osteosarkomdur. Lokal tümör büyümesini ve tümör hücrelerinin farklı dokulara metastazını inhibe etmek için ve hastaların hayatta kalma oranını artırmak için etkili tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Tümör gelişimi ve hücre göçünde yer alan moleküller ve onların uyarı mekanizmaları yeni ve etkili terapötik uygulamaların geliştirilmesi için anahtar role sahiptir. ARID3A/DRIL1/Bright, farklı biyolojik süreçlerde yer alan, AT zengin etkileşim domaini (ARID) DNA-bağlanma proteinleri ailesinin üyelerinden biridir. Bir proto-onkogen olarak serin/treonin kinaz AKT1 metabolizma, büyüme, çoğalma, hayatta kalma, transkripsiyon ve protein sentezinde kritik role sahip olduğundan dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. Ek olarak tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN), fosforilasyonunu önleyerek Akt aktivasyonunu negatif yönde düzenler. Bu çalışmada, osteosarkomda ARID3A' nın Akt1 ve PTEN ile bir etkileşimi ve fonksiyonel bir bağlantısı olabileceği hipotezini kurduk. Osteosarkom hücre hattında (U2OS) ARID3A' nın susturulması ve aşırı ifadelendirilmesi yapılmıştır. ARID3A' nın susturulmasının osteosarkomda Akt1 ifadesini azalttığını ve aşırı ifadelendirilmesinin ise Akt1 ifadesini artırdığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, ARID3A' nın susturulması ve aşırı ifadelendirilmesi PTEN üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre ARID3A osteosarkomda Akt1' i doğrudan düzenlemektedir. Bu çalışma ARID3A aracılığıyla Akt1' in hedeflenerek osteosarkom tedavisi için bir fikir vermektedir. Bu sebeple Akt1 ifadelенmesini doğrudan kontrol ettiği için ARID3A' nın osteosarkomda terapötik bir ajan olarak kullanılabilmesini umut etmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: AKT1, ARID3A, Aşırı ifadelенme, Osteosarkom, PTEN, Susturma.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF POSSIBLE INTERACTIONS BETWEEN ARID3A, PTEN AND AKT1 IN OSTEOSARCOMA

AMANI KANJO

Master Thesis, Department of Medical Biology

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

May 2018, 66 Pages

One of the most common malignant tumor is osteosarcoma in children. Effective treatment strategies are needed to inhibit local tumor growth and tumor cells' metastasis to different tissues and to improve patient survival rates. To find out the molecules and their signaling mechanisms involved in the tumor development and tumor cell migration are of key importance for improving new and effective therapeutic approaches. ARID3A/DRIL1/Bright is a member of the AT rich interaction domain (ARID) DNA-binding proteins that are involved in different biological processes. The serine/threonine kinase AKT1, is a proto-oncogene, has become an important point due to its critical role in metabolism, growth, proliferation, survival, transcription and protein synthesis. In addition, tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) negatively regulates Akt activation by preventing its phosphorylation. In this thesis, we hypothesized that ARID3A might have an interaction and functional connection with AKT1 and PTEN in osteosarcoma. Silencing and overexpression of ARID3A in osteosarcoma cell line (U2OS) was demonstrated. We noticed that silencing and overexpression of ARID3A decreased and increased the expression of AKT1 respectively in osteosarcoma. However, the silencing and overexpression of ARID3A had no impact on PTEN. The obtained results indicate that ARID3A regulates AKT1 directly in osteosarcoma. Our study has given one more option in the treatment of osteosarcoma by targeting AKT1 via ARID3A. Thus we hope that ARID3A can be used as a therapeutic target in osteosarcoma as it controls the expression of AKT1 directly.

Keywords: AKT1, ARID3A, Osteosarcoma, Overexpression, PTEN, Silencing.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

ARID (AT-zengin etkileşim bölgesi), yüksek ökaryotik genomlarda DNA bağlanma bölgesidir. ARID ortak dizisi, yaklaşık 100 amino asitlik alanı kapsamaktadır. ARID3 ailesi üyelerinden olan ARID3A proteini en çok B lenfositlerde ve testislerde ifadenir. ARID3A'nın "AATTAA" bağlayıcı bir ortak dizisi vardır (1). Primer murin fibroblastlarında Ras tarafından uyarılan erken yaşlanmayı önlediği bir çalışmayla öne sürülen ARID3A, p53 ve DNA hasarı ile transkripsiyonel olarak etkinleşir (2,6). p53 ile ARID3A bazı durumlarda korele çalıştığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. p53 bağlanma bölgesinin ARID3A geninin ikinci intronunda bulunması p53 ile ARID3A'nın bazı durumlarda birlikte işlev gördüğünü desteklemekte olup yapılan çalışmalara göre ARID3A p53 hedef geni olan p21'in transkripsiyonel aktivasyonunda yardımcı role sahip olmuştur. E2F hedef gen ifadesinde önemli bir role sahip olan ARID3A, E2F-bağımlı transkripsiyonu aktifleştirir (3). ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması ile E2F1, p107, CDC2 ve CDC6 gibi E2F hedef genlerinin transkripsiyonu da baskılanmıştır (4). Ayrıca, normal insan deri fibroblast hücre hatlarında susturulan ARID3A bu hücrelerin S faz girişini azaltmış olduğu ve yine tümör hücre hatlarının büyümesini yavaşlattığı daha önceki yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (5). Bu bulgular, ARID3A'nın tümör baskılayıcı rollerinin olduğunu destekler niteliktedir.

p53 tümör baskılayıcı proteini hücre döngüsünü durdurma ve apoptoz gibi farklı hücresel sonuçları ortaya koyan genleri kontrol ederek hücresel strese cevapta anahtar role sahiptir. RB ise hücre döngüsünde G1/S evresinin önemli bir düzenleyicisidir. RB, hücre döngü sürecinin düzenlenmesinde merkez role sahip olan E2F transkripsiyon faktörünün aktivitesini baskılar. Büyüme teşvik edici genler E2F aktivitesini kontrol ederken, RB aktivitesi ise p21 gibi CDKs ve CDK inhibitörleri tarafından düzenlenir. RB inaktivasyonu sebebiyle oluşan E2F'in anormal aktivasyonu bir p53 aktivatör proteini olan p14ARF'ı indükler. Bu protein onkogen aktivasyonu ve DNA hasarına cevap olarak oluşan hücre döngüsünü durdurmak ve apoptozu indüklemek için p53 aracılı apoptozu yol açar. E2F aktivitesi bozulmasına duyarlı bu hücresel savunma sisteminin kanserleşmeden korunmak için kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Yüksek sıklıkta görülen p53 mutasyonundan dolayı, E2F aktivitesinin bozulmasına duyarlı kontrol noktası mekanizmasının osteosarkomda ortadan kalktığı görülmektedir. ARID3A hücre farklılaşmasını inhibe ettiği ve proliferasyonu teşvik ettiği yonde de bazı çalışmalar

yapılmıştır ve bu ARID3A' nın tümör teşvik edici yani onkogenik rolünü ortaya koymuştur. Bununla birlikte ARID3A susturulmasının gelişimsel plastisiteyi teşvik ettiği bildirilmiştir. B hücreli akut lenfoblastik lösemide miR-125b ile ARID3A' nın baskılanması hücre farklılaşmasını ve apoptozu inhibe etmiş ve hücre çoğalmasını teşvik etmiştir (70).

E2FBP1/DRIL1/ARID3A köken olarak bir E2F1-bağlanma proteini olarak izole edilmiştir (2). ARID3A doğrudan bir p53 hedef geni olarak görülmektedir ve UV ile indüklenen DNA hasarı ya da p53-bağımlı bir yolda doksorubisin uygulaması gibi bazı özel etkilere cevap olarak aktive edilmektedir (6). ARID3A transkripsiyonel olarak p53 ve DNA hasarı tarafından aşırı düzenlenir ve ARID3A' nın bu ektopik ifadenmesi normal p53 ifadelenen U2OS hücrelerinde büyümenin durmasını indükler ancak p53 eksik olan Saos-2 hücrelerinde indüklemeyiz. ARID3A, p53 ile birlikte çalışarak hücre döngüsünün durdurulması için önemli bir p53 hedef geni olan p21WAF1' i transkripsiyonel olarak aktive eder. ARID3A, p21WAF1 promotorunda bağlanma bölgesine bağlanır ve normal p53 ifadeleyen U2OS hücrelerinde p21WAF1 transkripsiyonunu indüklerken p53 eksik Saos-2 hücrelerinde bu transkripsiyonu indüklemeyiz (7). Bu sonuçlar ARID3A' nın p53 ile birlikte çalışıp yaygın hedef genlere doğrudan bağlanarak p53-bağımlı transkripsiyonu aktifleştirmek için p53' ü düzenleyen bir transkripsiyonel aktivatör olduğunu göstermektedir. Ayrıca ARID3A transkripsiyonel aktivatör ya da baskılayıcı olarak çeşitli gelişimsel süreçte yer almaktadır. Bu genin fonksiyon kaybı mutasyonları embriyonik ölüm ile sonuçlanmaktadır.

ARID3A E2F transkripsiyon faktörüne bağlanır ve E2F-bağımlı transkripsiyonu aktifleştirir. ARID3A E2F ile birlikte çalışarak E2F hedef genlerinin aktifleşmesinde rol oynar ve E2F bağımlı transkripsiyonda ve hücre döngüsü sürecinde kritik role sahiptir (5). ARID3A primer fare fibroblastlarında (MEFs) etikli bir şekilde hem kendiliğinden oluşan hem de aktifleşmiş RAS ile indüklenen yaşlanmayı atlatarak Rb/E2F yolağını yeniden düzenler. ARID3A' nın hem hücresel çoğalmayı hem de büyümenin durdurulmasını teşvik etmedeki asıl fonksiyonunun yanı sıra hem Rb/E2F1 hem de p53 tümör baskılayıcı yollarına işlevsel bağlanması ARID3A aktivitesinin ve bağlanma eğiliminin ne kadar kritik ve inceden inceye ayarlanmış bir düzenleme olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte ARID3A fonksiyonunu düzenleyici bazı mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir (3).

Bir proto-onkogen olan serin/treonin kinaz Akt metabolizma, büyüme, çoğalma, hayatta kalma, transkripsiyon ve protein sentezini içeren çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde kritik role sahip olduğundan dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur (8). Ek olarak, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN) Akt aktivitesini inhibe eder (9). PI3K/Akt yolağının bozulması kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik hastalıklar gibi çok sayıdaki insan hastalıklarında gösterilmiştir. Kanserde PI3K' nın intrinsik kinaz aktivitesini artıran iki mutasyon tespit edilmiştir. Ayrıca Akt üzerinde de mutasyonlar olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca PTEN insan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrar ya da kaybolur. Akt geninin yüksek derecede ilişkili üç izoformu vardır (Akt1, Akt2, Akt3). Akt hücre büyümesini TSC1/TSC2 kompleksi ve mTORC yolağı üzerindeki etkileri yoluyla düzenlemektedir. Akt CDK inhibitörleri p21 ve p27 nin fosforilasyonu ile hücre çoğalmasına katkıda bulunur (10).

Akt, transkripsiyon faktörleri tarafından oluşturulan pro-apoptotik proteinlerin ya da pro-apoptotik sinyallerin inhibisyonunu yöneterek hücre canlılığının önemli araçlarından biridir. Akt kritik olarak metabolizmanın düzenlenmesinde ve nöronal fonksiyon için gerekli proteinlerin düzenlenmesinde rol oynar. Akt paktin ve vimentinin fosforilasyonu yoluyla hücre göçüne ve invazyona katkıda bulunmaktadır (11). Diğer taraftan DNA hasarı ya da onkogenik stres varlığında apoptozu indükleyebilen Akt fare çift dakika 2 homolog (MDM2) genini aşırı düzenler ve daha sonra p53' ün serbest kalmasını azaltır. Akt, farklı hücre fonksiyonları düzenlemedeki bu kritik rolünden dolayı insan hastalıklarının tedavisinde önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir.

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağının insan kanserlerinde önemli bir onkogenik yolak olduğu düşünülmektedir. Bu yolağın osteosarkomda sıklıkla aşırı aktifleştiği ve hastalıkların başlamasına ve tümörleşme, proliferasyon, invazyon, hücre döngüsü sürekliliği, apoptoz inhibisyonu, damarlanma, metastaz ve kemoterapi dirençliliği gibi birçok durumun ilerlemesine katkıda bulunduğu şimdiye kadar yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (12). Bu yolağın inhibisyonu osteosarkom için cazip bir olası terapötik uygulama olabilir.

PTEN, fosforilasyonunu önleyerek Akt aktivasyonunu negatif düzenler. PTEN tümör hücresi çoğalmasını, hücre göçü ve invazyonu inhibe eder ancak tümör hücre apoptozunu artırır (13,14). Bu sebeple PTEN kaybı tümör büyümesini ve kemiğe yayılımını

kolaylaştırıyor olabilir. Bir tümör baskılayıcı olarak PTEN bir çift özellikli protein ve fosfolipid fosfataz olarak işlev görür ve çeşitli hücrel süreçleri ve sinyal iletim yollarını düzenler (11,15). PTEN fonksiyonunun kaybı meme, prostat, akciğer, mide, kolon, deri ve endometrial kanseri gibi farklı kanser türlerinde sıklıkla tespit edilmiş olup bunun yanı sıra kemik metastazı, multipl myelom ve osteosarkomu içeren kemik malignansilerinde PTEN fonksiyon kaybı bildirilmiştir. Gen mutasyonu, heterozigotluk kaybı, promotor hipermetilasyonu ve mikroRNA aracılı negatif düzenlemeyi kapsayan genetik ve genetik olmayan değişikliklere dayandırılabilen PTEN kaybının, tümörleşme ve kanser ilerlemesinde onkogenik PI3K/Akt/mTOR yolağının aktivasyonuna yol açmasının önemi daha önceki çalışmalarla vurgulanmıştır (15).

Buradan yola çıkarak, bu gözlemler Rb/E2F1 ve p53 tümör baskılayıcı yolların fonksiyonel bağlayıcısı olarak osteosarkomda Akt1 ve PTEN ile bir etkileşime sahip olabilen ARID3A' yı göstermektedir. Bu genin bazı etkileşimleri ve bu etkileşimlerin mekanizması henüz açığa çıkmamıştır. Bu çalışmada osteosarkomda ARID3A, Akt1 ve PTEN arasındaki olası etkileşimin incelenmesini amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

KontROLSÜZ çoğalma ile karakterize olan kanser hastalığı tüm dünyada kritik bir hastalık haline gelmiştir (16, 17). Tüm dünyada bir çok kanserle savaş ve kanser toplulukları oluşturulmuş olup kanserle ilgili çeşitli istatistikler ve tedavi ile ilgili gelişmeler bu topluluklar aracılığıyla insanlara sunulmaktadır (17-19). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, yeni kanser vakalarının önümüzdeki 20 yıl içinde %70 artması beklenmektedir. Kanserin en yaygın olduğu organlar erkekte ve kadında farklılık göstermektedir. Örneğin erkekte en yaygın akciğer ve prostat bürülürken kadında en yaygın meme ve kolon kanseri gözlenmektedir. Hem çevresel hem de kalıtsal özellik taşımasından ötürü multifaktöriyel bir hastalık olan kanserin en sıradışı özelliği lokal çevresinin dışında uzak doku ve organlarda büyüyen anormal hücrelerin oluşturmasıdır. Tümör oluşumu çok aşamalı bir süreçtir ve normal hücreler aşamalı olarak neoplastik aşamaya geçer. Bu süreç boyunca, tümörojenik olmasını sağlayan özel karakterler kazanırlar (20).

2.2. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri

2000 yılında Hanahan ve Weinberg, kanserin oluşumunda etkili altı karakteristik özelliği bildirmişlerdir (21). Bu özellikler; (i) çoğalma uyarısının devamlılığı, (ii) büyüme baskılayıcılardan kaçış, (iii) replikatif çoğalmayı sağlama, (iv) invazyon ve hücre göçünün etkinleşmesi, (v) damarlanmanın uyarılması ve (vi) hücre ölümüne direnme şeklindedir (22).

2.2.1. Çoğalma Uyarısının Devamlılığı

Kanser hücrelerinin en temel özelliği kronik proliferasyon sürdürme yeteneğidir. Kanser hücreleri çeşitli yöntemlerle proliferatif uyarıyı sürdürme yeteneğini başarabilmektedir. Örneğin; kendi kendilerine büyüme faktör ligandları üretebilirler. Ayrıca kanser hücreleri tümör ilişkili stromayı destekleyerek normal hücreleri uyarmak için sinyal gönderebilmektedir. Reseptör sinyalleri, kanser hücre yüzeyinde görülen reseptör protein seviyesinin yükseltilmesiyle kısıtlamalardan kurtulabilmektedir.

2.2.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış

Birçok tümör baskılayıcı hücre büyümesini ve proliferasyonunu çeşitli yollarla düzenlemektedir. Tümör baskılayıcılarının fonksiyon kazanım ya da kaybı çalışmaları tümör baskılayıcı gen olup olmadıklarını doğrulamaktadır. RB ve p53 tümör baskılayıcıları hücre döngüsünde hücrenin çoğalacağına mı yoksa yaşlanma veya apoptoza mı gideceğine karar veren merkez kontrol noktalarıdır (23).

RB proteini hücre içi ve dışından gelen sinyalleri birleştirir ve sonuç olarak hücrenin büyüme ve bölünme döngüsüne girip girmeyeceğine karar verir. RB, çoğunluğu hücre dışından gelen büyüme inhibitör sinyallerini aktarırken, p53 hücrenin intrasellüler sistemlerindeki anormal uyarı ve strese giriş alır; genomun hasar derecesi büyük olursa ya da nükleotid havuzunun seviyesi, büyüme yönlendirici sinyaller, glikoz ya da oksijen optimalin altında ise p53 şartlar normale dönene kadar hücre döngüsünü durdurabilir (24, 25).

2.2.3. Hücre Ölümüne Direnme

Apoptotik sistem yukarı yönlü düzenleyiciler ve aşağı yönlü efektör komponentlerin bir bileşimidir. Düzenleyiciler iki büyük döngüye ayrılır: 1- hücre dışı ölüm indükleyici sinyalleri alma ve işleme (ekstrinsik yolak) ve 2- hücre içi kaynaklı sinyalleri birleştirme ve algılama (intrinsik yolak). Her iki yolak da latent bir proteazın aktivasyonu ile sonuçlanır (kaspaz 8 ve 9) (26, 27).

Düzenleyiciler ve efektörler arasındaki sinyalleri ileten apoptotik tetikleyici Bcl-2 ailesinin pro- ve antiapoptotik üyeleri mevcuttur. Bcl-2 ve onun yakın akrabaları (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) apoptoz inhibitörleridir. Bunlar proapoptotik tetikleyici olan Bax ve Bak' ı baskılar. Bax ve Bak mitokondri dışı zarına gömülüdür. Antiapoptotik akrabalarının yaptığı inhibisyon azaldığında Bax ve Bak dışı mitokondri zarının bütünlüğünü bozar ve proapoptotik sinyal proteinlerinin (en önemlisi sitokrom c) serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan sitokrom c kaspazların kaskadını aktiveleştirir. Bu da apoptotik programla ilişkili çeşitli hücrenel değişiklikleri indüklemek için kendi proteolitik aktiviteleri yoluyla olmaktadır. Bax ve Bak, BH3 motifleri adı verilen protein-protein etkileşim domainleri ve çeşitli fiziksel etkileşimlerini sağlayan Bcl-2 benzer proteinleri paylaşır. Sadece BH3 motifli ilişkili protein alt ailesinin aktivitesi hücrenel anormal sensörlerle birleşir. Bu “sadece-BH3” proteinleri ya antiapoptotik Bcl-

2 proteinleri ile çatışarak ya da bu ailenin proapoptotik üyelerini uyararak etki gösterir. (26)

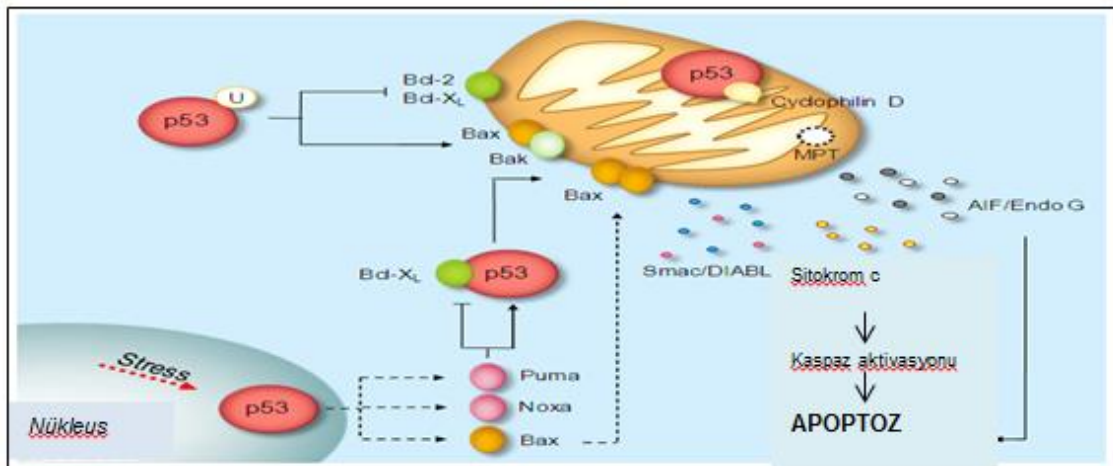
Hücrel koşullar apoptozu tetiklemesine rağmen bazı anormal sensörler tümör gelişiminde anahtar rol oynar. En önemlisi p53 tümör baskılayıcısı yoluyla işleyen DNA-hasar sensörüdür (23).

P53, sadece BH3 taşıyan Noxa ve Puma ekspresyonunu artırarak apoptozu indükler (Şekil 2.1) (28).

Bundan sorumlu olan DNA kırıkları ve diğer kromozom anomalileridir. Alternatif olarak eksik canlılık sinyalleri (örneğin lenfositlerde yetersiz IL-3 seviyesi ya da epitelde yetersiz IGF1/2 seviyesi) Bim adlı sadece BH3 proteini yoluyla apoptoz meydana gelebilir. Hücre ölümüne yol açan diğer bir koşul ise Myc gibi apoptozu tetikleyen onkoproteinlerin hiperaktif sinyalleridir.

Tümör hücreleri çeşitli yollarla apoptozdan kaçabilir: p53' ün fonksiyon kaybı, proapoptotiklerin baskılanması, antiapoptotiklerin ekspresyonunun artması ya da ekstrinsik ligand indükleyici ölüm yolağının kısa devre yapması, çalışmaması gibi.

Hücre ölüm mekanizmalarının diğeri ise otofajidir. Otofaji, apoptoz gibi hücrede bazal seviyede meydana gelen fizyolojik bir olaydır. Ancak besin yetersizliği gibi belirgin hücrel stres durumlarında güçlü bir şekilde indüklenebilir. Otofajik program hücrelere ribozom, mitokondri gibi organelleri parçalama olanağı verir. Oluşan katabolitler geri dönüşümlüdür ve biyosentez ve enerji metabolizması için kullanılır (29-33).



Şekil 2.1. Sitolitik ve mitokondriyal p53'ün apoptotik yollarının gösterimi (28).

2.2.4. Replikatif oğalmayı Sağlama

Vücuttaki pek çok normal hücre soyunun limitli büyüme ve bölünme döngüsünün aksine kanser hücreleri makroskobik tümörleri oluşturabilmek için sınırsız çoğalma potansiyeline sahiptir. Normal hücrelerdeki bu büyüme sınırlaması iki farklı bariyerle ilişkilidir: yaşlılık ve hücre ölümünü kapsayan kriz evresi. Dolayısıyla hücreler kültürde ürettiğinde hücre bölünmesinin tekrarlayan döngüleri öncelikle yaşlılığın indüklenmesine yol açar ve daha sonra bu bariyeri aşmayı başaran hücrelerde kriz fazına yol açar. Kromozom uçlarını koruyan telomerler sınırsız proliferasyon yeteneğine sahiptir (34, 35). Çeşitli ardışık heksanükleotid tekrarların birleşimi olan telomerler kültürde üreyen ölümsüz olmayan hücreleri devamlı kısaltır, zamanla kromozomal DNA uçlarını bir uçtan bir uca füzyonlardan koruma yeteneğini kaybederek disentrik kromozomlar oluşturabilmektedir (36). Telomerik DNA uçlarına telomere tekrar dizileri ekleyen özelleşmiş DNA polimeraz olan telomeraz ölümsüzleşmemiş hücrelerde hemen yoktur ancak insan kanser hücrelerini içeren kendiliğinden ölümsüzleşmiş hücrelerin yaklaşık %90' ından fazlasında fonksiyonel olarak önemli derecede ifadelenir. Telomerazın aktifleştiğı bu ölümsüz hücreler yaşlanma ve kriz/apoptoza karşı direnç kazanır. Bu iki proliferasyon bariyeri preneoplastik ve neoplastik hücrelerin dışarı yayılışını engellemede önemli antikanser savunma olduğu makul kabul edilmiştir (37-40).

2.2.5. İnvazyon ve Metastazın Aktive Edilmesi

Kanser hücrelerinde görülen en önemli belirteçlerden biri de uzak doku ve organlara hücre göçü olan metastaz ve doku istilasını olan invazyon yeteneğidir. Oldukça karmaşık şamaları içeren bu iki durumda da en karakterize değişiklik hücre-hücre adezyonunda anahtar olan E-kaderin kaybıdır (41,42). Bunun yanı sıra N-kaderin gibidiğer hücre-hücre ve hücre-matriks adezyon molekülleri ise E-kaderinin aksine metastaz yapan tümör hücrelerinde aşırı ifadelenmektedir. İnvazyon ve metastazın çok aşamalı süreci sık sık invazyon-metastaz kaskadı olarak adlandırılan bir dizi aşamalarla şematize edilir. Bu tasvir; lokal invazyonla başlayan, daha sonra kanser hücrelerinin komşu kan ve lenfatik damarlara intravazasyonu, lenfatik ve hematojen sistemlere doğru kanser hücrelerinin geçişi, daha sonra kanser hücrelerinin bazı damar lümeninden uzak doku parankimasına kaçıışı (ekstravazasyon), kanser hücrelerinin küçük nodüllere şekillenmesi

(mikrometastaz) ve son olarak mikrometastatik lezyonların makroskopik tümörlere büyümesi (kolonizasyon) şeklinde birbirini izleyen biyolojik değişiklikleri göstermektedir (43-45).

2.2.5.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

“Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)” olarak adlandırılan gelişimsel düzenleyici bir program, invaziv olma, apoptoza direnç gösterme ve yayılma yeteneklerini başaran transforme epitel hücrelerin olduğu biyolojik bir süreç anlamına gelmektedir (46. 47). Snail, Slug, Twist ve Zeb1/2’ yi içeren transkripsiyonel faktör olarak rol alan pleiotropik bir set EMT’ yi organize eder ve embriyogenez sırasındaki göçme süreci ile ilişkilidir. bu transkripsiyonel düzenleyiciler malignant tümör türlerinde çeşitli kombinasyonlarda ifadelenirler. EMT’ yi indükleyen transkripsiyon faktörleri invazyon-metastaz kaskadının çoğu aşamasını yönettiği gibi bu aşamalarda kilit rol alan E-kaderin ifadenmesini de düzenlemektedir (48-51).

2.2.6. Anjiyogenezin Uyarılması

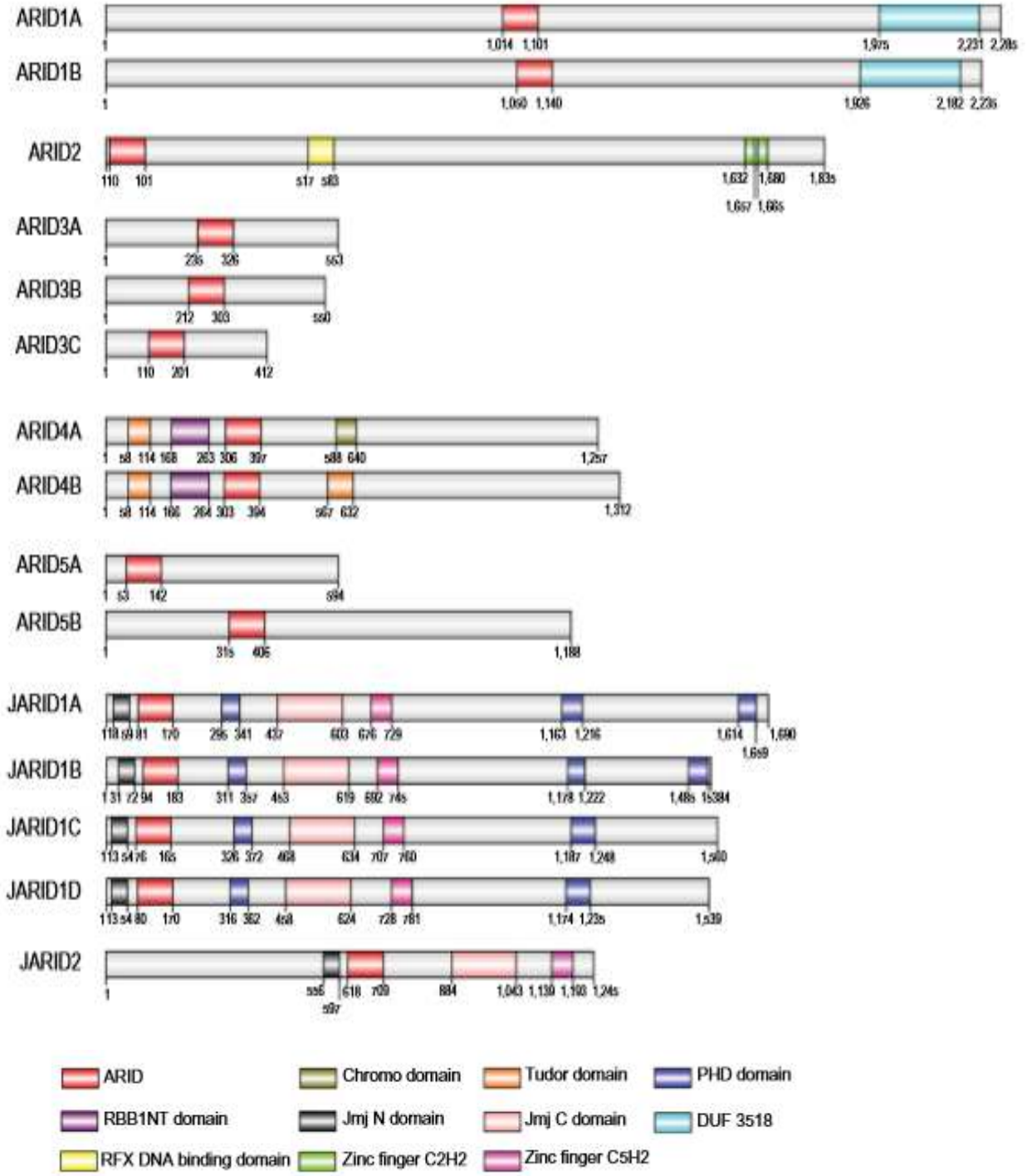
Normal dokular gibi tümörler de metabolik atık ve CO₂ dışarı atma yeteneğinin yanı sıra besin ve oksijene ihtiyaç duyar. Anjiyogenez süreciyle oluşan tümör ilişkili yeni damar oluşumu bu ihtiyaçları göstermektedir. Embriyogenezde yeni endotelial hücrelerin oluşumunu sağlayan damarlanma bu süreçten sonra uzun süre pasif kalırken yetişkin dönemde sadece yara iyileşmesi ve dişi üreme döngüsünde anlık olarak aktifleşir. Bunun aksine tümör hücrelerinde damarlanma ya da “anjiyogenik düğme” sürekli aktiftir ve neoplastik büyümeye yardım eden sürekli yeni damar oluşumu için açıktır (52).

Damarlanma, anjiyogenezi indükleyen ya da baskılayan moleküllerin ifadenmesi ile yönetilir. En iyi bilinen anjiyogenez indükleyici VEGF-A ve baskılayıcı ise TSP-1’ dir (53, 54). VEGF-A geni embriyonik ve postnatal gelişim esnasında ve daha sonra yetişkinlerde patolojik ve fizyolojik durumların yanı sıra endotelial hücrelerin homeostatik canlılığında yeni kan damarı büyümesinin yönetilmesinde gereken ligandları kapsar. TSP-1 ise anjiyogenik düğmeyi dengeleyen bir anahtardır, endotelial hücreler tarafından sunulan transmembran reseptörlere bağlanır ve dolayısıyla proanjiyogenik uyarıyı etkisizleştirebilen baskılayıcı sinyallere yol açar. Tümör hücrelerinde damarlanma; erken gelişmiş kapiller filizlenme, bükümlü ve büyük damar dallanması,

biçimsiz ve genişleyebilen damarlar, dengesiz kan akışı, mikrohemoraji (kanama), sızdırma ve anormal seviyede hücre proliferasyonu ile karakterizedir (55).

2.3. ARID Ailesi

ARID (AT-zengin etkileşim bölgesi), yüksek ökaryotik genomlarda DNA bağlanma bölgesidir (56). ARID ortak dizisi, yaklaşık 100 amino asitlik alanı kapsamaktadır. Büyük oluk temas yeri ise değişmiş sarmal-dönüş-sarmal motifi olarak tanımlanmıştır (57-59). ARID içeren proteinlerin kromatin yeniden şekillenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, farklılaşma ve gelişim üzerinde birçok hücresel işlev gösterdiği daha önceki yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. ARID ortak dizisi, ilk olarak fare B-hücresine özgü transkripsiyon faktörü Bright'da tanımlanmıştır (60). ARID ailesi dizi ilişkilerine bağlı olarak gruplanan yedi alt aileye ayrılmıştır. Bunlar ARID1, ARID2, ARID3, ARID4, ARID5, JARID1 ve JARID2 olarak adlandırılmıştır. Yine bu alt aileler de kendi arasında gruplara ayrılmıştır. Şekil 2.2 ve Tablo 2.1'de gösterildiği gibi, memelilerde bunlar ARID1 ila ARID5 ve JARID1 ve JARID2 olarak isimlendirilmiştir. İnsanlarda 15 adet ARID içeren protein olduğu genom dizileme çalışmalarıyla ortaya konmuştur (123).



Şekil 2.2. ARID ailesi proteinler ve domeyn yapıları (123).

Tablo 2.1. İnsan ARID genlerinin isimlendirilmesi (56).

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 ARID ailesi proteinleri, ARID ortak bölgeleri içindeki dizi benzerliğinin derecesine göre yedi alt aileye gruplanabilir (Şekil 2.2) (56).

2.3.1. ARID1

ARID1 ailesi ARID1A ve ARID1B olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır. ARID1A ve ARID1B kromozomda sırasıyla 1p35.3 ve 6q25.1 bölgelerinde lokalize olup kodladıkları proteinler %66 benzerlik göstermektedir. Yapı olarak birbirine benzemelerine rağmen ARID1A ve ARID1B içeren kompleksler işlevsel olarak birbirinden çok farklıdır (61, 62).

ARID1A hem sitoplazma hem de nükleusta bulunur. Nükleer ARID1A sitoplazmik ARID1A' dan daha az stabildir çünkü nükleusta ubiquitin-proteozom sistemi ile hızlıca parçalanmaktadır. ARID1A mutasyonunun ortak nükleer taşıma sinyalini etkilediği ve ARID1A protein seviyesinin durağan seviyede kalmasını azalttığı gözlenmiştir. ARID1A normal insan dokularında oldukça yaygın ifadenirken; insan tümör dokularında ve hücre hatlarında önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Yapılan son çalışmalar ARID1A' nın bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü bildirmiş aynı zamanda hücre döngüsü durdurulmasında temel rol oynadığı gözlemlenmiştir.

Yapısal olarak birbirine çok benzeyen ARID1A ve ARID1B işlevsel olarak zıt rollerde yer alır. Örneğin ARID1A hücre döngü durdurulmasını tetiklerken ARID1B hücre döngüsü aktivatörü olarak rol alır. ARID1B bu işlevinin aksine pankreatik kanserde tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır (61, 63).

2.3.2. ARID2

ARID2 alt ailesi yalnızca bir üyeden oluşur. ARID2 12q12' de lokalizedir. ARID2, insan dokularında yaygın olarak ifadenmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, hepatosellüler karsinom ve pankreatik kanser gibi bazı kanser türlerinde yüksek derecede mutasyona uğramıştır. ARID2, IFITM1 gibi interferon-düzenleyici gen ifadenmesinin düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır (64).

2.3.3. ARID3

ARID3 alt ailesi ARID3A, ARID3B ve ARID3C olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır. Bu proteinlerin genleri 1kromozom üzerinde sırasıyla 9p13.3, 15q24 ve 9p13.3 bölgesinde lokalizedir. Bu üç üyenin de kodladığı proteinler amino asit dizilimi açısından birbirine çok benzer olup genişlemiş ARID bölgesi (çekirdek ARID' in C ve n ucuna alfa-heliksler eklenerek oluşmuş) ile karakterizedirler (60, 65).

ARID3A proteini temel olarak B lenfositlerde ve testislerde ifadenmektedir. P53 bağlanma bölgesinin ARID3A geninin ikinci intronunda bulunması p53 ile ARID3A' nın bazı durumlarda birlikte işlev gördüğünü desteklemekte olup yapılan çalışmalara göre ARID3A p53 hedef geni olan p21' in transkripsiyonel aktivasyonunda yardımcı role sahip olmuştur. Ayrıca ARID3A' nın hücre farklılaşmasını bloke ettiği, proliferasyonu teşvik ettiğinin gösterildiği çalışmalar doğrultusunda ARID3A' nın bir tümör teşvik edici olarak rol aldığı gösterilmiştir (66).

ARID3B ise en fazla lökosit ve testislerde gözlenmiştir. ARID3B' nin kanserdeki rolü tartışmalıdır. Bazı çalışmalar ARID3B' nin yumurtalık kanserinde invazyonu ve meme kanserinde metastazı teşvik etmesi neticesinde bir onkogen olarak rol aldığını savunurken; yapılan bazı çalışmalarda ARID3B aşırı ifadenmesinin yumurtalık kanserinde TNF- α seviyesini artırdığını ve TRAIL aracılı apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (123).

Henüz yeni keşfedilmiş bir üye olan ARID3C B bağlantılı lenfositlerde ifadenmektedir. Brightlike ve Brightlike delta 6 olmak üzere iki izoformu vardır ve ARID3C ve kanser ilişkili ayrıntılı çalışmalar henüz yaygın değildir (123).

2.3.3.1. ARID3A

ARID3 ailesi üyelerinden olan ARID3A proteini en çok B lenfositlerde ve testislerde ifadenir. ARID3A'nın "AATTAA" bağlayıcı bir ortak dizisi vardır (60, 67). Primer murin fibroblastlarında Ras tarafından uyarılan erken yaşlanmayı önlediği bir çalışmayla öne sürülen ARID3A, p53 ve DNA hasarı ile transkripsiyonel olarak etkinleşir (2,6). p53 ile ARID3A bazı durumlarda korele çalıştığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. p53 bağlanma bölgesinin ARID3A geninin ikinci intronunda bulunması p53 ile ARID3A' nın bazı durumlarda birlikte işlev gördüğünü desteklemekte olup yapılan çalışmalara göre ARID3A p53 hedef geni olan p21' in transkripsiyonel aktivasyonunda yardımcı role sahip olmuştur. E2F hedef gen ifadesinde önemli bir role sahip olan ARID3A, E2F-bağımlı transkripsiyonu aktifleştirir (68).

ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması ile E2F1, p107, CDC2 ve CDC6 gibi E2F hedef genlerinin transkripsiyonu da baskılanmıştır. Ayrıca, normal insan deri fibroblast hücre hatlarında susturulan ARID3A bu hücrelerin S faz girişini azaltmış olduğu ve yine tümör hücre hatlarının büyümesini yavaşlattığı daha önceki yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (5). ARID3A hücre farklılaşmasını inhibe ettiği ve proliferasyonu teşvik ettiği yönde bazı çalışmalar yapılmıştır ve bu ARID3A' nın tümör teşvik edici yani onkogenik rolünü ortaya koymuştur. Bununla birlikte ARID3A susturulmasının gelişimsel plastisiteyi teşvik ettiği bildirilmiştir. B hücreli akut lenfoblastik lösemide miR-125b ile ARID3A' nın baskılanması hücre farklılaşmasını ve apoptozu inhibe etmiş ve hücre çoğalmasını teşvik etmiştir (70).

2.3.4. ARID4

ARID4 alt ailesi ARID4A ve ARID4B olmak üzere iki üyeye sahiptir ve bunlar sırayla kromozom üzerinde 14q23.1 ve 1q42.1-q43 bölgesinde lokalizedir. ARID4A RB proteini ve mSIN3-histon deasetilaz kompleksleri ile etkileşim yoluyla hücre büyümesinde ve migrasyonda önemli rol oynamaktadır. ARID4A, RB protein ailesi üyelerine mSIN3-histon deasetilazları biriktirerek E2F bağımlı transkripsiyonu baskılar ve hücre büyümesi durdurulmasında ana rol oynar (71-73). ARID4B de ARID4A gibi mSIN3-histon deasetilaz kompleksi ilişkili proteindir ve ARID4B *meme kanseri ilişkili antijen 1 (BRCA1)* olarak da bilinmektedir. Birçok kanser dokusunda yüksek seviyede ifadelenirken normal insan dokusunda az seviyede ifadelenmektedir (74).

2.3.5. ARID5

ARID5, ARID5A ve ARID5B olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır ve bunların lokalizasyonu sırasıyla 2q11.2 ve 10q21.2 şeklindedir. ARID5A inflamatuvar süreçlerde önemli rol oynamaktadır ve kanser ile ilişkisi henüz rapor edilmemiştir. ARID5B ise insan dokularında yaygın olarak ifadelenmektedir. Histon deasetilaz-I ARID5B ile ilişkili bulunmuştur lösemi başta olmak üzere birçok malignant hastalıklar ARID5B ile yakın ilişkili bulunmuştur (56, 123).

2.3.6. JARID1

Jumonji ARID1 (JARID1) dört üyeye (JARID1A, JARID1B, JARID1C ve JARID1D) sahip olan en büyük ARID alt üyesidir. Bu üyeler kromozomda sırasıyla 4q42, 1q32.1, Xp11.22-p11.21 ve Yq11 bölgelerinde lokalizedir. ARID4A gibi JARID1A bir RB bağlanma proteindir ve RB' ya bağlanarak hücre farklılaşmasını teşvik eder. Notch sinyal yolağının hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eden RBP-J ile fiziksel olarak etkileşim içinde bulunan JARID1A ayrıca histon H3' ün 4. Lizininin demetilasyonunu düzenlemektedir. JARID1A kanser ilişkili sinyal yolları ile yüksek derecede ilişkili bulunmuştur. Diğer JARID üyelerinin aksine JARID1B' nin normal dokularda ifadelenmesi düşük seviyededir. JARID1B' nin özellikle meme kanserinde BRCA-1 ve kemokin ligand 14 (CCL14) gibi tümör baskılayıcı genleri baskıladığı bildirilmiştir. Mesane kanserinde JARID1B' nin baskılanması kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamış sub-G1 fazdaki hücre sayısını artırmıştır. JARID1C mutasyonu büyük ölçüde

X-bağımlı zeka geriliğinde çalışılmış olup bunun yanı sıra kanserle de yüksek ilişkisi olduğu rapor edilmiştir. JARID1C, TGF- β /SMad3 sinyal yolağı yoluyla tümörleşmeye katkıda bulunduğu bildirilmiştir. JARID1D ve kanser hakkında çok az veri literatürde yer almaktadır (56, 123).

2.3.7. JARID2

JARID2 sadece bir üye içermektedir ve 6q24-p23 bölgesinde lokalizedir. Bu genin kodladığı protein ARID domaini, JmjN ve JmjC domaini ve Zf-C5HC2 çinko parmak domaini içermektedir. JARID2 diğerlerinin aksine histon metiltransferaz aktivitesi içerir. Yapılan son çalışmalar JARID2' nin tümör baskılayıcı rolünü ortaya koymaktadır. Histon H3' ün 9. lizinini metilasyonu ile siklin D1 transkripsiyonunu baskılayarak proliferasyonu negatif yönde düzenlemektedir (75-77).

2.4. Osteosarkom Genetiği

Osteosarkom genel olarak yetişkinlerde nadir görülürken çocukluk ve ergenlik döneminde en yaygın rastlanan kanser türlerinden biridir (78). Kemiğin en yaygın primer tümörüdür ve kemiğin tüm malignant tümörlerinin %19' undan ve tüm primer malignant tümörlerinin %40-60' ından sorumludur. Ergenlik döneminde en yaygın solid tümördür ve tüm ergenlik dönemi kanserlerinin %7' sini oluşturarak çocuklarda üçüncü en yaygın malignensidir (79). 20 yıl önce, çok ajanlı kemoterapi ve bacak koruyucu cerrahi gibi disiplinlerarası uygulamaların ilerleyişi osteosarkom hastalarının hayatta kalma oranını büyük ölçüde artırmıştır (80). Üzücü bir şekilde, o tarihten itibaren 5 yıl hayatta kalma yaklaşık %70' de yatay bir seyre geçmiştir ve sonuçlar önemli derecede geliştirilememiştir; aslında yoğun kemoterapi uygulanan osteosarkomlu hastalardan hayatta kalanların uzun dönem komplikasyonları artmıştır. Bununla beraber hastaların metastatik prognozu ya da bu hastaların lokal nüksetmesi durumu daha da kötüleştirmiştir; eğer hastalar ekstra pulmoner metastaz geliştirmişse bu hastalardan hayatta kalan olmamıştır (81). Göreceli nadirliğine rağmen osteosarkom, tümör baskılayıcı genler RB1 ve TP53' ün keşfinde önemli rol oynamışlardır. Aslında çok sayıda kanser genleri insan kanserlerinin sadece %10 luk kısmını oluşturan diğer kanser türlerinden çok lösemi, lenfoma ve sarkomalarda tanımlanmıştır (82). Osteoblastlardaki rasgele genetik ve epigenetik değişimlerle ilişkili olarak normal bir kemik hücresinin bir kanser hücresine dönüşmesinin sebepleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Sırasıyla

RB1 ve TP53 genlerindeki mutasyonların yol açtığı ailesel retinoblastoma ve Li-Freumeni Sendromu gibi kalıtsal hastalıklar görülen hastalarda osteosarkom oluşma riskinin arttığı bulunması, RB ve p53 tümör baskılayıcı genlerinin kaybının osteosarkom oluşma sürecinin en önemli basamağı olduğunu öne sürmektedir.

2.4.1. Osteosarkom Gelişiminin Moleküler Mekanizmaları

Diğer kanser türlerinin yanı sıra osteosarkom gelişiminde de çeşitli sinyal yolları rol oynamaktadır. Osteosarkom patogenetik mekanizmaların anlaşılmasına önemli derecede engel olan aşırı genetik instabilite ile karakterizedir. Osteosarkomun osteoblastlardan hatta hücre farklılaşma sürecindeki bozulmadan dolayı pluripotent öncül hücrelerden geliştiğine inanılmaktadır. Bu, osteosarkomda hücre çoğalması ve farklılaşmasında temel olarak bilinen Wnt sinyal yolağının rolünü göstermektedir. Wnt yolağı c-Myc, CCND1 ve c-MET gibi onkogenleri uyarak proliferasyonu aşırı düzenler. Diğer kritik yolak ise hücre döngüsünün düzenlenmesinden ve apoptozdan sorumlu FoxO sinyal yolağıdır. Bu yolak Wnt uyarı silsilesi sırasında aktiveşebilirken PI3K/Akt/mTOR (kök hücre proliferasyonu ve osteosarkom gelişiminde yer alan) yolağı tarafından baskılanabilir (83). Osteosarkomdaki önemli bir rol de osteoblast farklılaşması ve osteoblast kök hücre korunmasını da içeren hücre farklılaşma olaylarının kontrolünden sorumlu Notch sinyal yolağına aittir (84). NFκB yolağı, hücre farklılaşması, apoptoz korunması, hasar ajanlarına ve sitokinlere karşı cevaptan sorumlu çeşitli genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumlu olup osteosarkom patogenezinde temel role sahiptir (83). Rb1 genindeki mutasyonlar osteosarkomda büyük sıklıkta meydana gelir (%20-40 olgu). Rb bir tümör baskılayıcıdır ve hücre döngüsünün negatif düzenleyicisidir. Rb' yı dolaylı olarak aktiveştiren CDKN2A, osteosarkomda sıklıkla delesyonlu iken negatif Rb düzenleyeci CDK4 ve CCND1' in bazı agresif osteosarkomlarda ifadenme düzeyi artmıştır (85).

Osteosarkomdaki bir diğer önemli mekanizma ise DNA hasar cevabında, hücre döngüsü durdurmada, apoptoz ve tümör baskılamada yer alan p53-bağımlı yolaktır. P53 genindeki mutasyonlar osteosarkom olgularında %20-50 oranında bulunmuştur. P53' ün negatif düzenleyicisi olan MDM2, osteosarkomda sıklıkla aşırı düzenlenmiştir. Aynı zamanda MDM2 inhibitörü CDKN2A tüm osteosarkom olgularının yaklaşık %10' unda eksiktir. Osteosarkom gelişimi ayrıca çeşitli hücre döngüsü ve apoptoz sinyal yollarının

(PI3K/Akt yolağı gibi) büyüme faktörleri (IGF, TGF, CTGF gibi) ile aktivasyonunu gerektirmektedir. Büyüme faktörü indükleyici cevap vakuolleşme ve damarlanma için temel olup Hif-1 yolağının ve öncü-damarlanma faktörü VEGF' nin aktivasyonu için bu iki süreç gereklidir. VEGF antiapoptotik protein Bcl-2 (ERK/ NFκB ve PI3K/Akt yolakları ile birlikte)' nin aktivasyonunda yer alır (84).

VEGF biyosentezi, osteosarkomdaki yüksek ifadelenmesinin zayıf hastalık prognozu ile bağlantılı olan STAT3 transkripsiyon aktivasyon faktörünü gerektirir (85). Genelde proliferasyon ve damarlanma uyarılmasının ve apoptoz baskılanmasının altında yatan mekanizmalar osteosarkom patogenezinde değişken bir rol oynar. Bir taraftan bu mekanizmalar tümör büyümesini ve metastazı teşvik ederler. Diğer taraftan ilk radyografide metastaz tespit edilemese dahi osteosarkomun cerrahi olarak çıkarıldığı hastalar cerrahi müdahaleden sonraki 6 ay ile 3 yıl arasındaki sürede sıklıkla akciğer ve diğer tür metastazlar geliştirir. Başka bir deyişle osteosarkom sesil metastazlar ve tümör hücrelerinin varlığıyla karakterizedir. Proliferasyon baskılanması ve apoptoz kısa süreliğine bu metastaz gelişimini önler ve bazı hücreleri hücre bölünmesine aktif olarak girmesini etkilediğinden kemoterapi etkisine girmekten saklar. Tümör hücrelerinin apoptoz ve hayatta kalma arasındaki dengesi antiapoptotik protein Bcl-2, Wnt, ve NFκB yolaklarının aktivitesine ve MAPK ve PI3K/Akt yolakları aktiviteleri arasındaki orana bağlıdır (84-86).

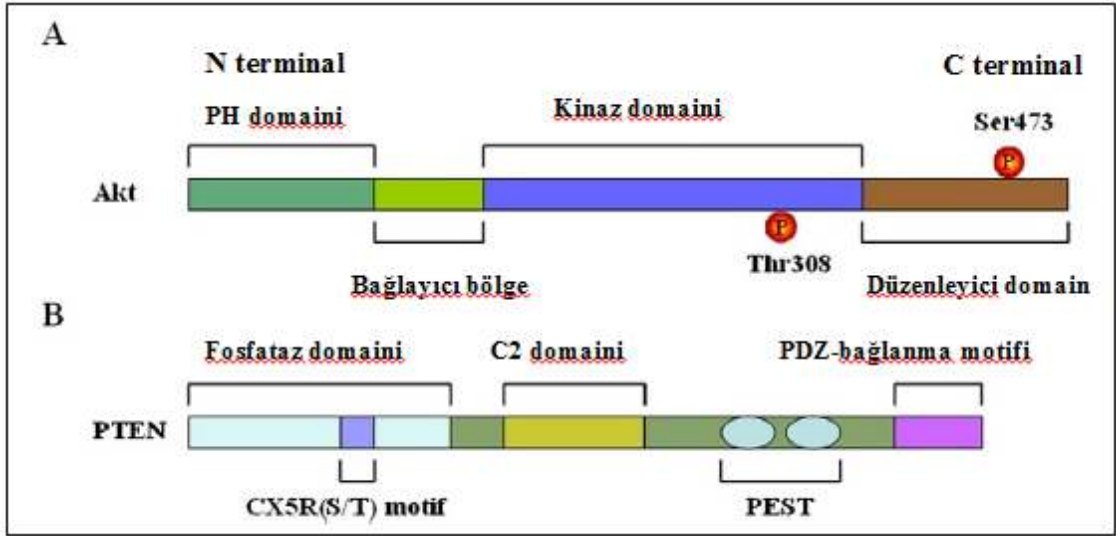
Osteosarkom patogenezindeki önemli sinyal yolakları ve mekanizmalar Şekil 2.3' de gösterilmiştir.

Diğer önemli bir proliferatif etmen çok fonksiyonlu bir protein olan YBX-1' dir. Bu protein salgılandığında hücre göçünü ve çoğalmayı teşvik eder.

hastalıkların %100'ünde ve yerleşmiş hastalıkların çoğunda yeniden düzenlenmiştir. Bu da osteosarkom ilerleyişi için bu yolaktaki değişikliklerin bir ön gereksinim olabileceğini göstermektedir (85). Günümüzde PI3K/Akt yolağını hedefleyen birçok küçük molekül birleşimi geliştirilmiş ve osteosarkom hastaları için ümit vadeci olmuştur.

2.4.2.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağının Etkinleşmesi

PI3K lar bir lipid kinaz ailesini teşkil eder ve substrat tercihlerine ve sekans homolojilerine göre üç sınıfa ayrılır (I-III). Bunlar arasında sınıf I PI3K lar kanserle en ilişkili olan kinazlardır. İki alt sınıfa ayrılır: sınıf IA (PI3K α , PI3K β ve PI3K δ) ve sınıf IB (PI3K γ). Bu sınıf I PI3K lar katalitik bir alt ünite ve düzenleyici bir alt üniteden oluşan heterodimer bir yapı gösterir. Katalitik alt ünite sırasıyla PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG ve PIK3CD genlerini kodlayan p110 α , β , γ ve δ içerir (90). Düzenleyici alt ünite ise sırasıyla PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genlerini kodlayan p85 α (p85 α , p55 α , p50 α), p85 β ve p55 γ içermektedir. İn vitro koşullarda, her p110 altünitesi düzenleyici alt ünitelerin herhangi birine bağlanma yeteneğine sahiptir. PI3K α , PI3K β ve PI3K δ , platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü (PDGFR), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü (EGFR) gibi reseptör tirozin kinazlar (RTKlar) tarafından aktifleştirilir; bununla beraber PI3K γ G-protein-bağlı reseptörleri (GPCRler) ve küçük GTPaz Ras tarafından aktifleştirilir (91). Aktifleştiğinde PI3K ların katalitik alt ünitesi fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) substratını fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürür (92). Daha sonra PIP3 plazma zarına plekstrin homoloji (PH) domaini ile birlikte sinyal proteinleri biriktirir. Bu proteinler fosfoinositid-bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt' tır.



Şekil 2.4. AKT ve PTEN proteinlerinin şematik yapısı (12).

Akt amino asit seviyesinde yüksek homoloji gösteren ve iki anahtar fosforilasyon olayı ile aktifleşen 3 izoform (Akt1, Akt2 ve Akt3) içerir. Akt kısmen kinaz domainindeki treonin 308' in (Thr308) PDK-1 tarafından başlangıç fosforilasyonu ile kısmen aktifleşir ve daha sonra PDK-1, integrin bağlı kinaz (ILK), DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK), mTORC2 gibi bazı olası kinazlar tarafından ya da Akt ın kendisi tarafından C-terminal düzenleyici domainindeki serin 473' ün (Ser473) fosforilasyonu ile Akt tam olarak aktifleşir (Şekil 2.4A). Daha sonra aktifleşmiş Akt çeşitli hücre fonksiyonları düzenlemek için hücre zarından sitoplazmaya ve aşağı yöndeki hedeflere fosforlama, aktifleştirme ya da baskılama yapabileceği nükleusa geçer (12).

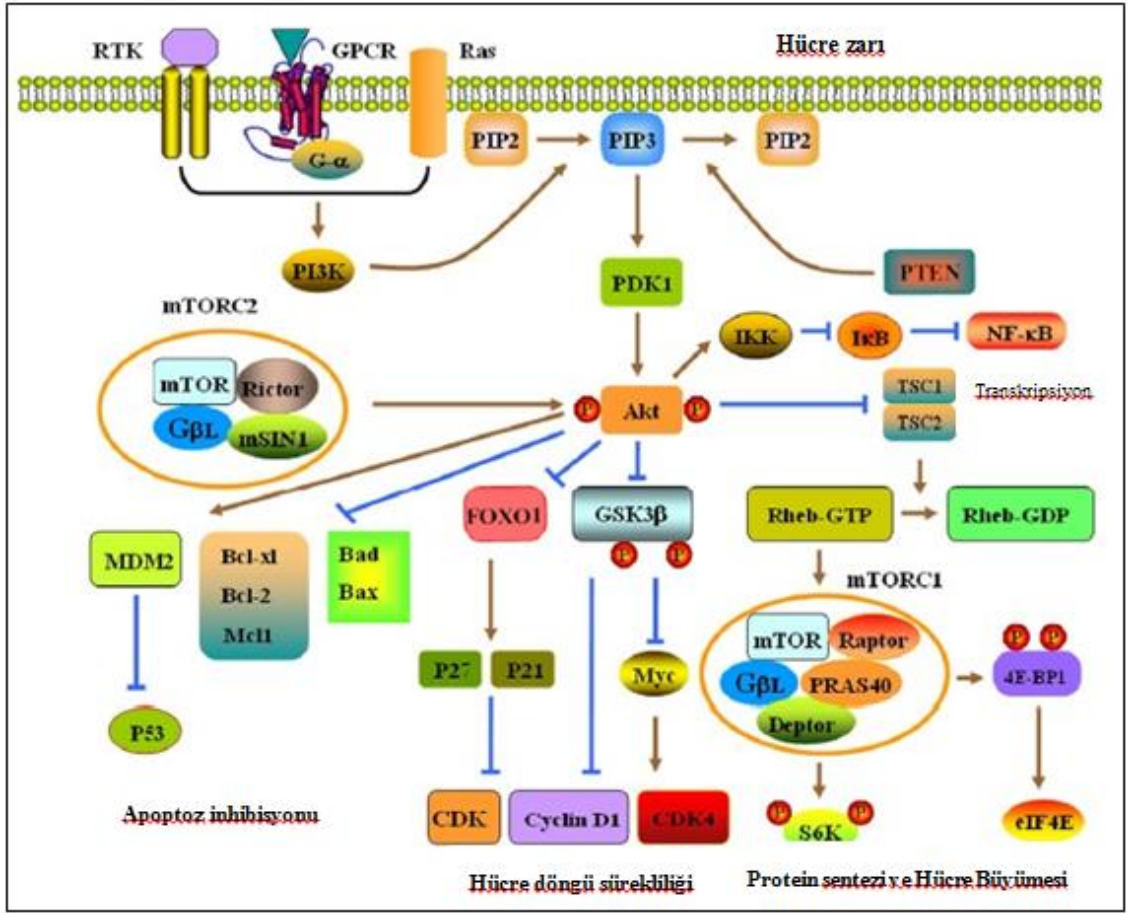
Akt yolağının aşağı yöndeki en önemli efektörü olan mTOR 289 kDa ağırlığında serin/treonin kinazdır. Memeli hücrelerinde iki multi protein birleşimleri halindedir: mTORC1 ve mTORC2. mTORC1 osteosarkomu içeren birçok kanser türünün kanserleşme sürecinde kritik role sahiptir ve mTOR düzenleyici-ilişkili protein (Raptor), mTOR, memeli LST8/G-protein β -altünite benzer protein (G β L), prolin-zengin Akt substrat 40 (PRAS40) ve DEP domaini içeren mTOR etkileşim proteini (Deptor)' un bileşiminden oluşmaktadır (95). mTOR' a ek olarak Akt, siklin D1 ve Myc artmasına yola açan bir serin treonin kinaz olan glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)' yı fosforiller ve inaktifleştirir. Myc, siklin bağımlı kinazları (CDK) aşırı düzenleyen bir onkoproteindir. Forkhead kutusu O1 (FOXO1)' in Akt aracılı inhibisyonu hücre döngüsünü önemli derecede hızlandıran Cdk inhibitörleri p27 ve p21' in baskılanmasını teşvik eder (97). Akt tarafından aktifleştirilen diğer hedef ise nüklear faktör- κ B (NF- κ B), yüksek derecede

agresif malignansilerde ilaca dirençli fenotiplerin kazanılmasının yanı sıra insan kanserlerinin gelişimi ve progresyonunda yer alan merkez sinyal faktörüdür (90). Akt, I κ B fosforilasyonunu ve parçalanmasına yol açan κ B (I κ B) kinaz (IKK) inhibitör aktivitesini artırır ve NF- κ B serbest kalır. NF- κ B serbest kaldığında hızlıca nükleusa geçer ve birçok hedef genin transkripsiyonunu tetikler. Akt ayrıca hücrel apoptozun baskılanmasında önemli bir role sahiptir. Bir taraftan pro-apoptotik Bad ve Bax seviyelerini azaltır ancak anti-apoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2), Bcl-x1 ve myeloid hücre lösemi1 (Mcl1) seviyelerini artırır (98). Diğer taraftan Mürin çift dakika 2 (MDM2) ekspresyonunu aşırı düzenler ve sonra DNA hasarı ya da onkogenik stres varlığında apoptozu indükleyen p53' ün serbest kalmasını azaltır (99). PI3K/akt yolağının tüm bu etkileri hücrel replikasyonu ve hayatta kalmayı artırır ve büyümenin önlenmesi ve apoptozu ise azaltır (Şekil 2.5).

2.4.2.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağının Negatif Düzenleyicisi Olarak PTEN

Tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN) birçok insan kanserinde mutasyonlar ya da heterozigotluk kaybı ile hasargören bir genom bölgesi olan kromozom 10q23 üzerinde yer alıp bir 200 kb lık gen tarafından kodlanır (100). Somatik kanserlerde sıklıkla görülen inaktivasyonundan dolayı PTEN p53' den sonra ikinci en çok mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olarak sıraya koyulmuştur. P53 ve dire tümör baskılayıcılara benzer şekilde, PTEN' de görülen germline mutasyonları Cowden ve Bannayan-Riley-Ruvalcaba kanser yatkınlık sendromlarına sebep olmaktadır (101,102). Çift özellikli bir fosfataz olarak PTEN protein fosfataz ve lipid fosfataz aktivitelerine sahiptir. PTEN fonksiyon kaybı kolorektal kanser, mide kanseri, herediter kanserler ve mem kanseri gibi birçok kanser türünün gelişimini etkileyen ana belirleyicidir. İnsan PTEN genikromozom 10q23.3' de lokalizedir ve 9 ekzon içerir. 403 amino asitlik bir açık okuma çerçevesine (ORF) sahip 5.5 kb lık bir mRNA kodlar. Translasyon ürünü 53 kDa luk bir protein olup bu protein tensin ve protein tirozin fosfataz (PTPlar) ile homoloji gösterir. Protein ürünü bir n-ucu fosfataz domaini, bir C-ucu C2 domaini, bir PDZ (PSD-95, DLG1 ve ZO-1)- bağlanma motifi ve protein parçalanmasında gerekli olan iki PEST (prolin, glutamik asit, serin ve treonin) dizilerini içerir (Şekil 2.4 B) (103). CX5R(S/T) motifi PTEN lipid fosfataz aktivitesi için temeldir ve üç temel kalıntı ile katalitik belirteçle çevrelenmiş bir aktif bölge ile yerleşmiştir. PTEN ve onun seçmiş olduğu asidik fosfolipid substratlar özellikle PIP3 yapıyı oluşturur. PTEN PIP3' ü tekrar PIP2' ye

dönüştürür (Şekil 2.5) (104). Bu yüzden PTEN kaybı PI3K/Akt yolağının sürekli aktivasyonuuna yol açar.

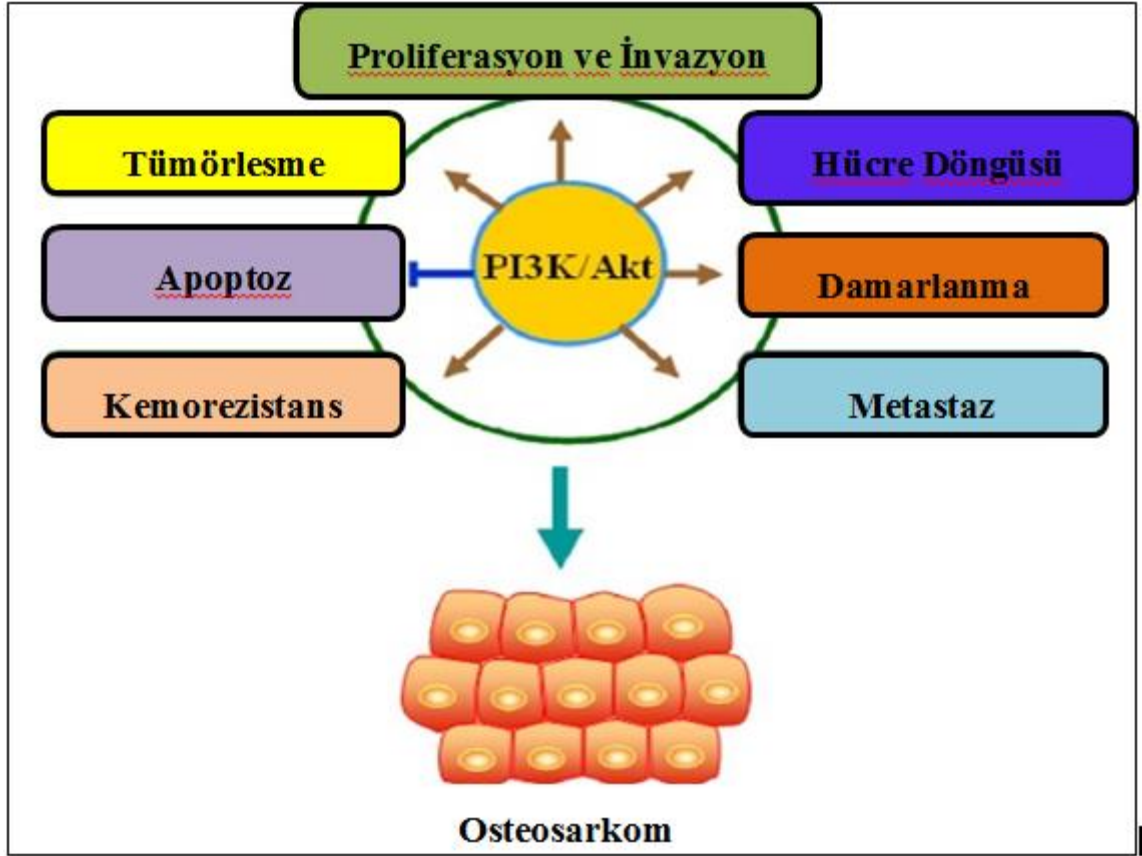


Şekil. 2.5. PI3K/AKT sinyal yolağı. Aktivasyondan sonra PI3K PIP2' yi PIP3' e dönüştürür ancak PTEN bu süreci tersine çevirir. PIP3 Akt' ı PDK1-bağımlı biçimde fosforiller ve aktiveleştirir ve mTORC2 de Akt aktivasyonuuna katkıda bulunur. Aktifleşmiş Akt TSC1/TSC2 heterodimer şekillenmesini inhibe ederek Rheb-GTP seviyelerini artırır ve mTORC1 aktivasyonunua yol açar. mTORC1 sonradan S6K ve 4E-BP1'in fosforilasyonuna aracılık eder ve eIF4E' nin serbest kalmasını teşvik eder. Bu protein sentezindeki ve hücre büyümesindeki artışla sonuçlanır. Akt tarafından indüklenen IKK aktivitesindeki artış NF-κB' nin gen transkripsiyonu için serbest kalma ve nükleusa girişine sebep olan IκB' nin parçalanmasını kolaylaştırır. Akt negatif olarak GSK3β ve FOXO1' i düzenler. Azalmış GSK3β siklin D1 ve Myc ifadenmesini artırır, ayrıca CDK4 seviyesinin önemli derecede artışına yol açar. Aynı zamanda FOXO1 baskılanması p27 ve p21 içeriğini azaltır ve CDK ifadenmesini artırır. Sonuç olarak bu moleküllerin aşırı düzenlenmesi önemli ölçüde hücre döngü sürecini yönetir. Ek olarak

Akt; Bad, Bax ve p53' ü baskılamanın yanı sıra Bcl-x1, Bcl-2 ve Mcl1' i aşırı düzenleyerek apoptozu inhibe eder (12).

2.4.3. Osteosarkom Patogenezinde PI3K/Akt Yolağının Rolü

Normal hücre fizyolojisinde PI3K/Akt yolağının önemli rolüne atfen bu yolağın birçok kanser türünde yeniden düzenleniyor olması şaşırtıcı değildir. Kinom tanımlamaOsteosarkom hücre hatlarının büyük kısmında aktif Akt sinyali tespit etmiştir (105). Günümüzde, birçok çalışma bu yolağın bozulmasının osteosarkomda tümörleşme, proliferasyon, invazyon, hücre döngüsü sürekliliği, apoptoz, damarlanma, metastaz ve kemoresistans gibi çeşitli patolojik süreçlerde yer aldığını göstermektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu osteosarkom başlamasında ve gelişiminde düzenlediği patolojik süreçler (12).

2.4.4. Osteosarkomda PI3K/Akt Yolağının Tedavilerde Hedeflenmesi

On yılı aşkın süredir osteosarkomda neoadjuvan kemoterapi girişimi yarar göstermesine rağmen uzun dönem hayatta kalma oranı osteosarkom hastalarında düşük kalmıştır, bu da yeni terapötik uygulamalar için araştırma ihtiyacının önemini vurgulamaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi PI3K/Akt yolağının aktivasyonu osteosarkom başlamasında ve ilerleyişinde kritik bir onkogenik role sahiptir. Bu sebeple, osteosarkom ya da diğer malignansilerde tedavi için bu yolağı inhibe edecek birçok bileşim geliştirilmektedir.

2.4.4.1. PI3K İnhibitörleri

İki tür PI3K inhibitörü vardır: pan-PI3K ve izoform-spesifik inhibitörler. PI3K inhibitörlerinin ilki olarak bilinen Pan-inhibitörleri, Wortmannin (fungal bir metabolit) ve tüm sınıf I PI3K lara bağlanabilen LY294002 gibi bileşimleri içermektedir. Wortmannin ile otofaji inhibisyonunun MG-63 hücrelerinde, *Dendropanax morbifera* Leveille bitkisinin yaprak ve köklerinden izole edilen dendropanoksit ile indüklenen hücre apoptozunu artırdığı bildirilmiştir (106). PI3K yolağının etkili bir şekilde inhibisyonu ve anti-osteosarkom aktivitesinin gösterilmesine rağmen bu pan-inhibitörler zayıf çözünme, instabilite ve yüksek toksisite gibi çok zayıf farmakokinetik özelliklerinden dolayı tam bir antikanser ilaç olarak geliştirilememektedir. Farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için PI3K p110 α , β , δ ya da γ katalitik alt ünitelerini seçici olarak inhibe edebilen izoform-spesifik inhibitörler ortaya çıkmıştır. Bu daha büyük özgüllük yan etki azalma olasılığını ortaya koymakta ve bu sebeple daha yüksek dozlara dayanma gücü sağlamaktadır. BYL719 yeni bir spesifik PI3K α inhibitörü olup ATP bölgesini bloke eder. BYL719' un HOS ve MOS-J hücrelerinde apoptoz üzerinde belirgin etkileri olmaksızın hücre döngüsünü G0/G1 evresinde bloke ederek hücre proliferasyonunu azalttığı ve osteosarkomun fare gibi klinik öncesi modellemelerinde tümör ektopik kemik şekillenmesini inhibe ettiği gösterilmiştir (107). BKM120 de bir PI3K α inhibitörüdür. BKM120 uygulanan MG-63 hücrelerinde hücre canlılığı ve invazyonunda önemli derecede azalma gözlenmiştir (108). GSK2636771 gibi PI3K β inhibitörleri henüz klinik olarak geliştirilmektedir ve bir faz I/IIa, ilk insan çalışmasında PTEN-eksik ileri solid tümörlü hastalarda yürütülmektedir (109). Bununla birlikte GSK2636771' in anti-osteosarkom etkileri henüz bilinmemektedir.

2.4.4.2. Çift Yönlü PI3K/mTOR İnhibitörleri

Çift yönlü PI3K/mTOR inhibitörleri PI3K' nın tüm p110 izoformlarının ATP bölgesini hedeflediği gibi mTOR komplekslerini de hedeflemekte, böylece tüm PI3K/Akt/mTOR uyarı yolağının tamamıyla inhibisyonunu sağlamaktadır. Çift yönlü sınıf I PI3K/mTOR inhibitörü olan NVP-BEZ235' in osteosarkom hücre göçü ve metastazını baskıladığı ve vinkristin ile kombinasyonunun antimetastatik etkilerini daha da artırdığı gösterilmiştir (110). Daha sonraki bir çalışmada ise Gobin ve ark., NVP-BEZ235 uygulaması in vivo ve in vitro osteosarkom hücre büyümesini inhibe edebileceğini göstermişlerdir (111). GDC-0980 ise başka bir çift yönlü PI3K/mTOR inhibitörüdür.

2.4.4.3. AKT İnhibitörleri

PI3K' nın önemli bir aşağı yönlü uyarı bağlantısı olan Akt, PI3K sinyali inhibisyonu için başka bir açık hedef sağlamaktadır. Son zamanlarda çok sayıda allosterik ve ATP-yarışçı Akt inhibitörleri geliştirilmiştir. ATP yarışçı Akt inhibitörleri, Akt' ın üç izoformunu da inhibe edebilen ATP yarışarak çalışan Akt' ı özgüllükle sınırlayan küçük molekül inhibitörler arasında yer almaktadır. Henüz yapılan bir çalışmada ATP yarışçı Akt inhibitörü GSK690693' ün osteosarkomda hücre proliferasyonunu in vitro koşullarda azalttığı, tümör büyümesini inhibe ettiği ve bir ksenograft fare osteosarkom modelinde hayatta kalma oranını artırdığı bildirilmiştir (112). Allosterik Akt inhibitörleri Akt' ın PH domainine bağlanabilmektedir, böylece zara yerleşmesini ya da PDK-1 bağımlı fosforilasyona girişini önleyerek enzimin inaktif formunu teşvik etmektedir. MK-2206, faz II klinik uygulamalara geçen ve geçerli dayanma gücü ile meme kanseri büyümesini baskıladığı gösterilen küçük allosterik Akt inhibitör molekülüdür (113).

2.4.4.4. mTOR İnhibitörleri

mTOR, PI3K/Akt yolağının en önemli aşağı yönlü molekülü olup mTOR inhibitörleri bu uyarı silsilesinin inhibisyonu için oldukça yararlıdır. Keşfedildiği 1975 yılından beri rapamisin güçlü bir mTOR inhibitörü olarak bilinmektedir, çünkü FK506-bağlanma proteini (FKBP12) ile bir kompleks oluşturmaktadır ve daha sonra mTOR' un C-terminal bölgesine bağlanmaktadır. Böylece mTORC1 aktivasyonuna müdahale ederken mTORC22 yi etkilememektedir (114). MG-63 hücrelerinin rapamisine maruz bırakılması hücre canlılığının önemli derecede baskılanması ve cis-diamindikloroplatinum (CDDP) aracılı hücre ölümünün artması ile sonuçlanmıştır (115).

2.4.4.5. PTEN Aktivatörleri

PTEN PI3K/Akt yolağının negatif düzenleyicisi olarak rol oynar ve PTEN aktivitesinin kaybı osteosarkomda sıklıkla keşfedilmiştir (116). Bu sebeple PTEN aktivatörleri osteosarkomda yolak baskılanması için alternatif bir uygulama olabilir. Gerçekte 5-azasitidin uygulaması PTEN ekspresyonunu önemli derecede aşırı düzenlemektedir ve daha sonra MG-63 hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (117). Benzer şekilde Akt yolağının aşağı yönü 5-azasitidin tarafından inaktifleştirilmiştir (117). Tepoksalin 5-lipoksijenaz (5-LOX)' ın bir inhibitörüdür ve köpek dişi osteosarkom ksenograft büyümesini yavaşlattığı gözlenmiştir. Tepoksalin uygulaması köpek dişi osteosarkom hücre hatlarında Akt inhibisyonuna ve apoptozu uyarımına yol açarak PTEN' in alkilasyonu ya da oksidasyonunu önleyerek PTEN aktivitesini artırabilmektedir. (118). Ayrıca HOs hücrelerine kafein eklenmesi PTEn aracılı Akt inhibisyonunu teşvik ederek tümör hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (119). Bununla birlikte, daha önce PI3K/Akt yolağında ilaçsal hedef olarak bir fikir olmamasına rağmen osteosarkom tedavisi için PTEN aşırı düzenlenmesi üzerinde odaklanan çalışmalar günümüzde devam etmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Bu çalışmada kullanılması hedeflenen osteosarkoma hücre hattı (U2OS) (ATCC® HTB-96™) (American Type Culture Collection, VA, USA)’den temin edilmiştir. Hücreler uygun koşullar altında (%5 CO₂ ve 37 °C) %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir.

3.2. siRNA ile Gen Susturma

Bu çalışmada, ARID3A 5’-AACAGAACUCCUGUGUACAUGAUGC-3’ sekansını hedefleyen siRNA ve negatif kontrol siRNA (Universal Negative Control, SIC001-5X1NMOL) Sigma-Aldrich ticari firması tarafından sentezletilmiştir. Ayrıca ARID3A’yı hedefleyen siRNA’ nın dizilimleri Tablo 3.1’te de gösterilmektedir. Bu gen susturma deneyi, aşağıda bahsedilen siRNA kullanılarak şahsım ve Dr. Kaifee Arman tarafından yapılmıştır. Bu deneyde kullanılan cDNA benim yüksek lisans tezimde kullanıldığı gibi Dr. Arman’ın doktora tezinde de kullanılmıştır (124).

Tablo 3.1. ARID3A genini hedefleyen siRNA dizisi

siARID3A	5’-AACAGAACUCCUGUGUACAUGAUGC-3’
----------	---------------------------------

Hücreye aktarmak için, 37°C’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerince Lipofectamine RNAiMAX (Katalog Numarası:13778-030, Invitrogen) kullanılmış ve ters aktarım (reverse transfection) gerçekleştirilmiştir. siRNA aktarım protokülü tezin sonunda ekte gösterilmiştir (ek 1).

3.3. ARID3A’nın Aşırı İfade Edilmesi

Klonlanmış ARID3A ve pozitif kontrolü Tokyo Tıp ve Diş Üniversitesi’nden (Tokyo, Japonya) Prof. Masa-Aki Ikeda’ dan temin edilmiştir. Klonlanmış gen “pEF_xpress_ARID3A” olarak adlandırılmaktadır, ARID3A cDNA’sının PCR ile çoğaltılmasıyla, Xpress epitop etiketli ARID3A üretilmiş ve bu ürün PCR-bluntII-TOPO

vektörüne klonlanmıştır (Invitrogen). pEF / His-ARID3A'yı oluşturmak üzere, ortaya çıkan klondan elde edilen BamHI ve XbaI parçaları BamHI-XbaI ile kesilmiş ve pEF4 / His vektörüne (Invitrogen) bağlanmıştır. Japonya'dan gönderilen ve restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrulanan plazmid pEF4 / His vektöründe bulunan klonlanmış ARID3A geni daha sonra midi plazmid izolasyonu için hazırlanmıştır. ARID3A'yı içeren vektörün kesim protokolü Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. ARID3A klonlanmış geninin doğrulama protokolü.

Bileşen	Miktar (µl)
Plasmid DNA	0,85 (1µg)
10X buffer	5.0
BamHI	1.0
XbaI	1,0
Nükleaz içermeyen distile su	42,15
Toplam	50,0*

*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.

Bu aşırı ifade deneyi, yukarıda bahsedilen plazmit kullanılarak şahsım ve Dr. Kaiffee Arman tarafından yapılmıştır. Bu deneyde kullanılan cDNA benim yüksek lisans tezimde kullanıldığı gibi Dr. Arman'ın doktora tezinde de kullanılmıştır (124). Bu aşırı ifade deney protokolü bu tezin ekler kısmında verilmiştir. (Ek 2)

3.4. Susturulmuş ve Aşırı ifade Edilmiş ARID3A Taşıyan U2OS Hücrelerinde RNA İzolasyonu

Osteosarkom hücre hatlarından RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation (Roche, Mannheim, Germany) kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. İzolasyon aşamaları şu şekildedir:

Elde edilen hücre kültürü RNA örnekleri, RNA miktar ve kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü (Tablo 3.3). Kalite ve miktar tayini NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer cihazı kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.3. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları

No.	Hücre Soyadı	260/280	ng/μL
1	U-2OS (siARID3A)	2.05	650,5
2	U-2OS (Negatif kontrol)	2.03	411,4
3	U-2OS (Transfekt Edilmemiş)	2.02	416.6
4	U-2OS (Ov-ARID3A)	2.01	432.3
5	U-2OS (Pozitif kontrol)	2.02	352.1
6	U-2OS (Transfekt Edilmemiş)	2.01	414.2

3.5. cDNA Sentezi

Ede edilen RNA' lardan Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1652 (Thermo Scientific) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır (Tablo 3.4). Hücre kültürü örneklerinden 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)	1μl
10 mM dNTP karışımı	1 μl
dH ₂ O	*
RNA	**
Toplam	15 μl
5X RT Tampon (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 μl

Maxima H Minus Enzim karışımı	1 µl
Toplam karışım	20µl

* Tablo 3.3'teki RNA miktarlarına göre toplam karışımdaki RNA miktarları 1 µg/µl olacak şekilde her örnek için ayrı ayrı 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, 0,2 ml'lik PCR tüplerine eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

3.6. Primer Tasarımı

Gen ifade seviyelerini belirlemek için ilgili genlerin bazı bölgelerine özgül primerler tasarlanmıştır. RNA izolasyonu sırasında olası DNA kirliliğini önlemek ve sadece RNA transkriptini çoğaltmak için primerler ekzon-ekzon bağlantı bölgelerine tasarlanmıştır. Referans gen olarak Gliseraldehit 3-faofat dehidrogenaz (GAPDH) geni seçilmiştir. Primerler NCBI veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Tasarımı yapılan primerlerin ileri ve geri dizilimleri, ürün boyutu ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Gen ifadesi analiz edilecek genlerin primer dizilimleri (F:Forward, R:Reverse).

Primer Adı	Primer dizilimi	Ürün boyutu (bp)	Tm (°C)
ARID3A-F	CAACAAGAAGCTGTGGCGTG	259	60.3

ARID3A-R	TAGCTTGGGTGAGGAGAGCA		
AKT1-F	CAAAGAAGTCAAAGGGGCTGC	188	60
AKT1-R	TGTACTCCCCTCGTTTGTGC		
PTEN-F	CTGCAGAAAGACTTGAAGGCG	395	60
PTEN-R	GGGAATAGTTACTCCCTTTTGTGTC		
GAPDH-F	AGACCACAGTCCATGCCATCAC	456	60.1
GAPDH-R	GGTCCACCACCCTGTTGCTGT		

U2OS hücre hattında aşırı ifade edilmiş ve susturulmuş ARID3A, RT-PCR (semi-kantitatif PCR) kullanılarak hesaplanmıştır. RT-PCR için tepkime koşulları Tablo 3.7’ de verilmiştir.

Tablo 3.7. 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	∞	

3.7. Sonuçların Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Elde edilen RT-PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde 140V’ da 45 dk yürütülmüştür. Sonrasında UV ışığı altında Fusion V marka görüntüleme cihazında görüntüler alınmıştır. Ürün boyutları agaroz jelde DNA belirteçleri eklenerek tespit edilmiştir.

3.8. Real-Time PCR (qPCR) Analizleri

ARID3A’ nın U2OS hücre hattında aşırı ifade edilmesi ve susturulmasının ardından bu genin AKT1 ve PTEN genleri üzerindeki etkisi Real Time-PCR (qPCR) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu deney için, Rotor Gene Q (QIAGEN) Real-Time PCR cihazı kullanıldı. qPCR deneyleri, AMPLIQON RealQ Plus 2x Master Mix Green (A323402) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.8’de

qPCR analizi için her bir tüpte bulunacak bileşenler ve miktarları gösterilmiştir. qPCR tepkime koşulları ise Tablo 3.9’ da verilmiştir.

Tablo 3.8. qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
RealQ Plus 2x Master Mix	7,5
10 pM F primeri	0.5
10 pM R primeri	0.5
Nükleaz içermeyen distile su	5,5
cDNA (≤500 ng)	1
Toplam	15

Tablo 3.6. qPCR için tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Tekrar sayısı
İlk denatürasyon	95	15:00	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. İstatistiksel Analizler

qRT-PCR yöntemi ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. AKT1 ve PTEN genlerinin ifade seviyesini belirlemek için referans gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) kullanılmıştır. qRT-PCR sonuçlarına istatistiksel analiz (fold change değerlerini) belirlemek için ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır (Şekil 3.1).

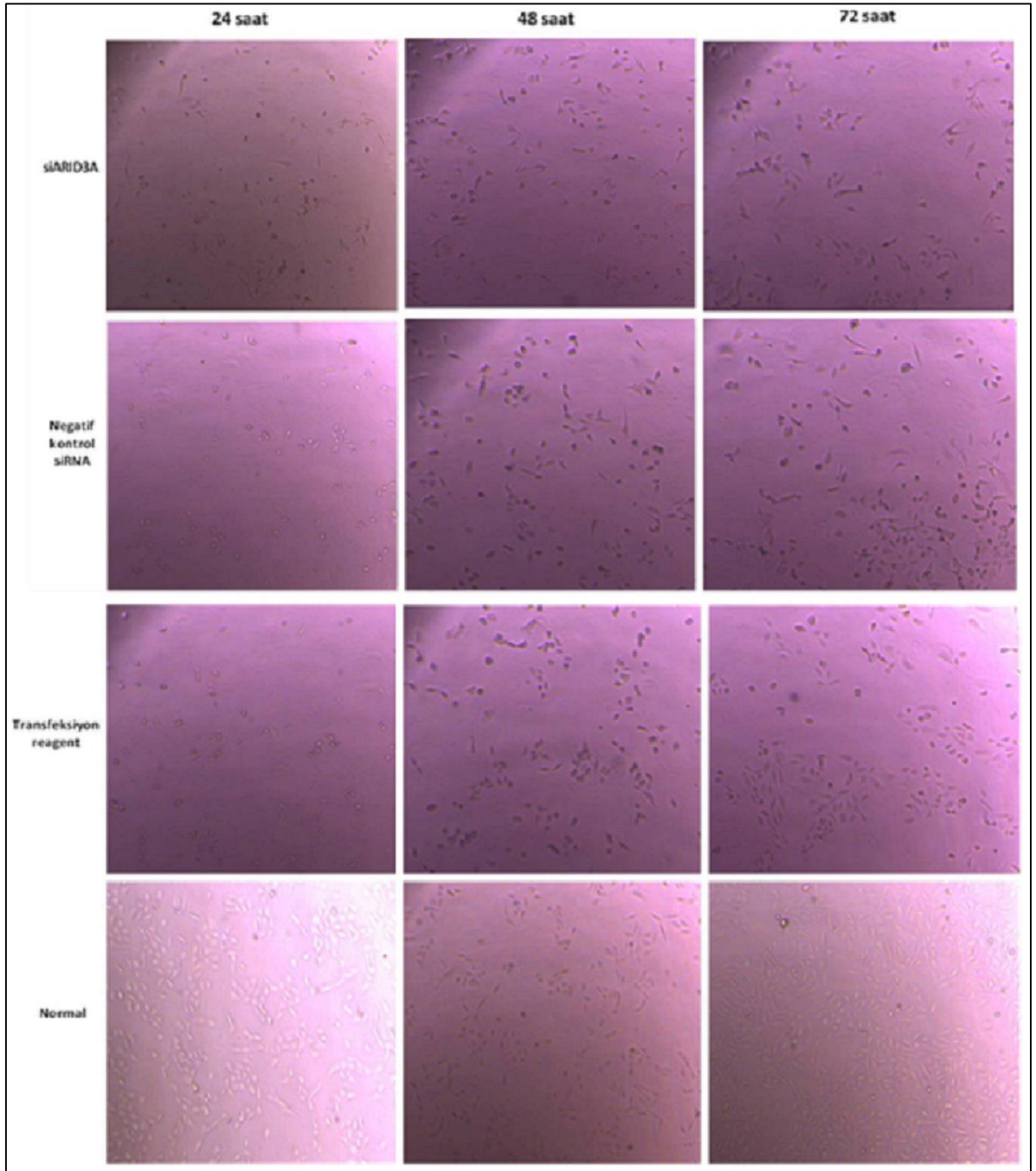
$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

Şekil 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü

4. BULGULAR

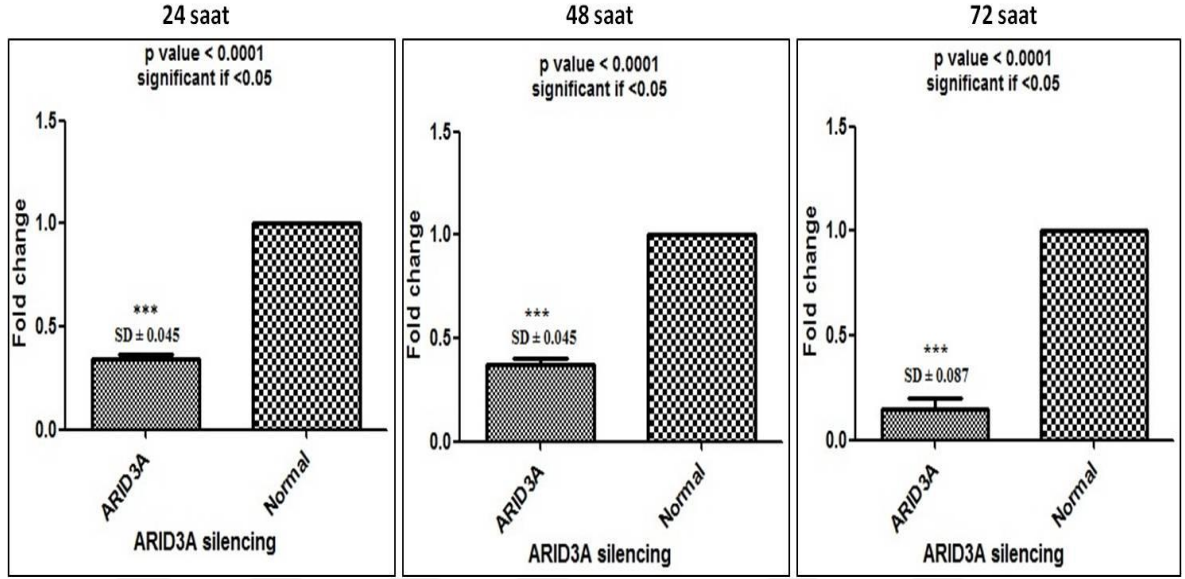
4.1. ARID3A'nın Susturulması

ARID3A, AKT1 ve PTEN arasındaki olası etkileşimin incelenmesi için ARID3A susturulmuş ve bunun Akt1 ve PTEN üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Transfeksiyon sonrası U2OS morfolojisi her gün gözlemlenmiştir (büyütme x4) (Şekil 4.1).



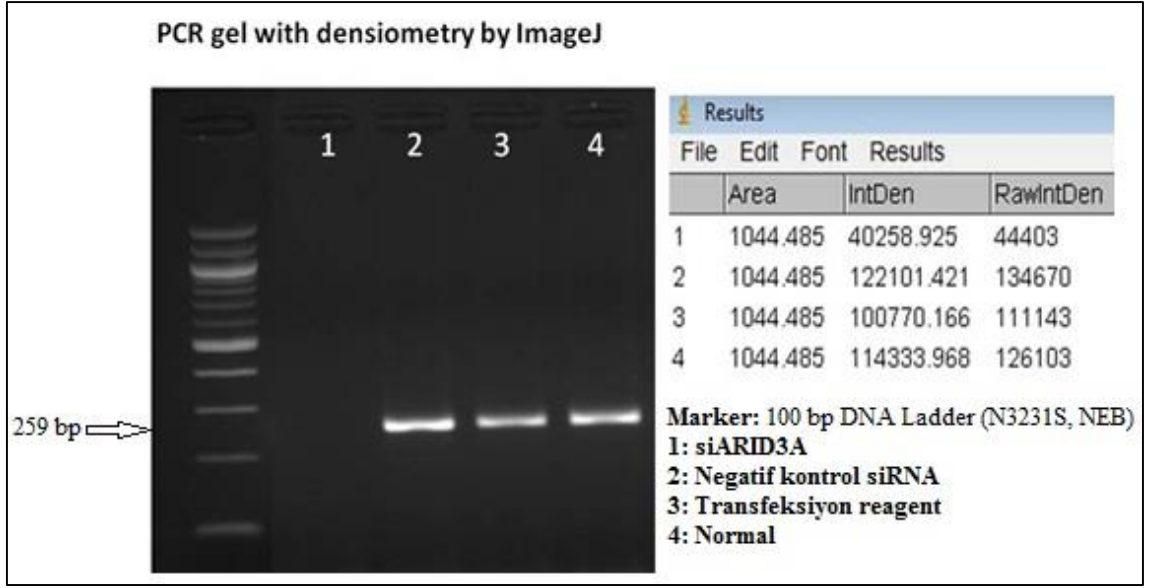
Şekil 4.1. U2OS hücre hattının siARID3A ile transfeksiyon sonrası morfolojik yapısı

Susturulmadan sonra ARID3A'nın ifade seviyesi RT-PCR ve qPCR yöntemleri ile analiz edilmiştir. U2OS hücre hatlarının ARID3A siRNA'sı ile transfeksiyonu sonrası, ARID3A gen ifade seviyesi analiz edilmiş ve ARID3A siRNA ile transfekte edilmemiş normal hücreler ile karşılaştırılmıştır. Transfekte edilen hücrelerde ARID3A'nın ifade seviyesinin azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda t testi ile bu değişimin istatistiksel olarak 24, 48 ve 72 saatlerde anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0,0001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının qPCR ile gösterilmesi. Gen ifadesi analizleri 24, 48 ve 72 saatler için yapılmıştır. (SD: Standard deviation) Note: Eğer iki örnek arasındaki p değeri <0,05 ise bir yıldız (*), eğer <0.01 ise iki yıldız (**) ve eğer <0.001 ise üç yıldız (***) ile göstermektedir.

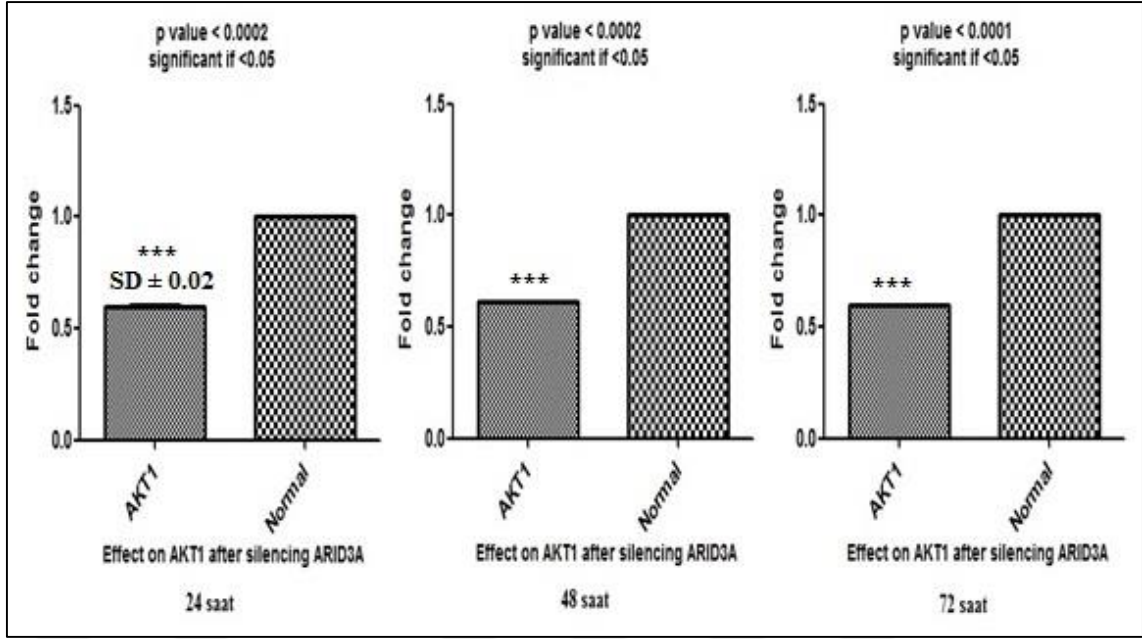
RT-PCR yapılarak U2OS hücrelerinde ARID3A'nın tamamen susturulduğu gösterilmiştir. Bu işlem sonrasında ImageJ programı kullanılarak bant yoğunlukları ölçülmüş ve susturmanın yapıldığı hücre hatlarında ARID3A'nın çoğalmadığı görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. U2OS hücre hattında ARID3A'nın susturulmasının RT-PCR ile gösterilmesi. Transfeksiyondan 24 saat sonra jel elektroforezi ve ImageJ programı kullanılarak gen ifade analizi yapılmıştır.

4.1.1. ARID3A'nın Susturulmasının AKT1 Üzerine Etkileri

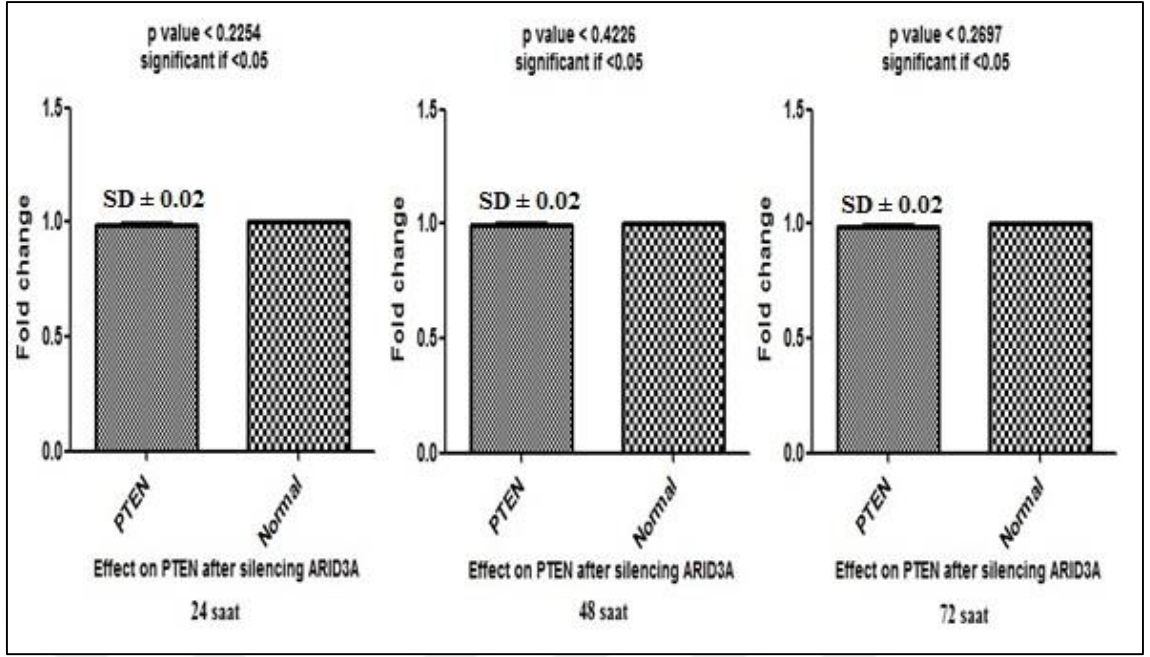
ARID3A'nın susturulmasının AKT1 gen ifadesi üzerine etkisi qPCR kullanılarak analiz edilmiştir ve hiçbir uygulama yapılmayan normal hücreler ile karşılaştırılmıştır. ARID3A'nın susturulması sonucu U2OS hücre hatlarında AKT1 gen ifade seviyesinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, t-testi bu sonuçların istatistiksel olarak 24 ($p < 0,0002$), 48 ($p < 0,0002$) ve 72 ($p < 0,0001$) saatler için anlamlı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. ARID3A'nın susturulması sonrasında AKT1 ifadesindeki değişimin gösterilmesi. Kat değişim değerleri istatistiksel olarak (t-test kullanılarak) anlamlı (significant) bulunmuştur. Note: Eğer iki örnek arasındaki p değeri <0,05 ise bir yıldız (*), eğer <0.01 ise iki yıldız (**) ve eğer <0.001 ise üç yıldız (***) ile göstermektedir. (SD: Standard deviation).

4.1.2. ARID3A'nın Susturulmasının PTEN Üzerine Etkileri

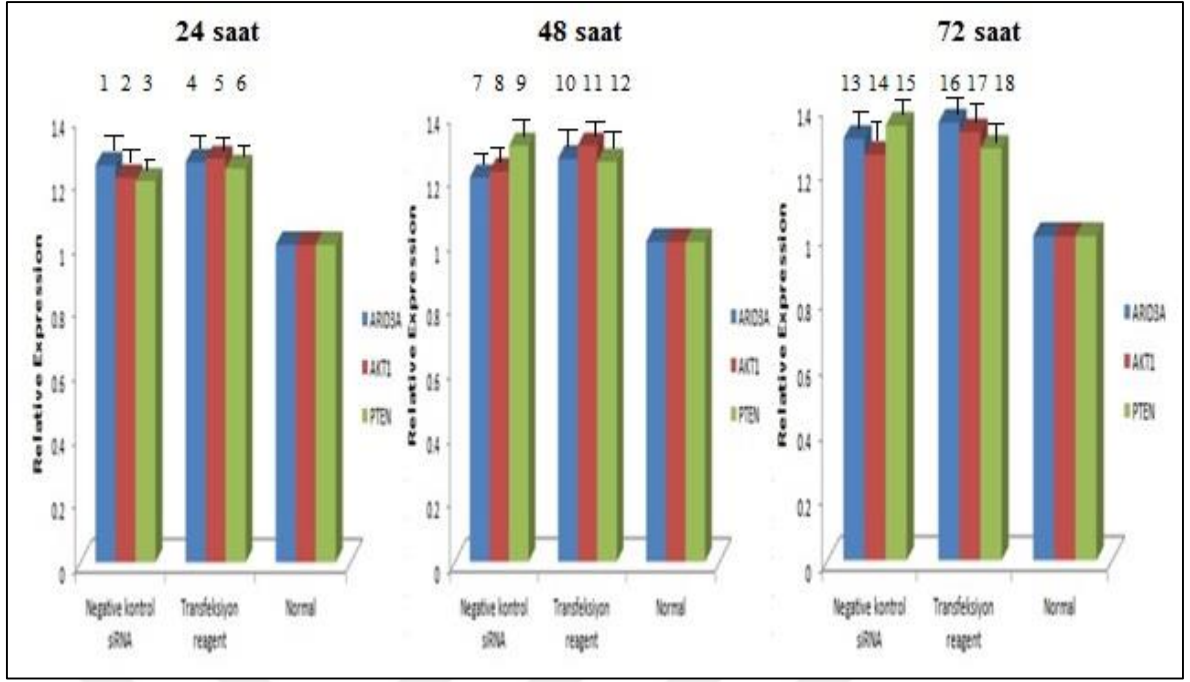
ARID3A'nın susturulmasının PTEN gen ifadesi üzerine etkileri qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir ve siRNA ile susturulmayan normal hücrelerle karşılaştırılmıştır. ARID3A'nın susturulması PTEN'in ifade seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Yapılan t-testi analizi ile p değerlerinin anlamlı olmadığı bulunmuştur. 24, 48 ve 72 saatler için p değerleri sırasıyla 0,2254, 0,4226 ve 0,2697'dir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. ARID3A'nın susturulması sonrasında PTEN ifadesindeki değişimin gösterilmesi. PTEN ifade seviyesinin anlamlı olarak etkilenmediği gösterilmiştir. t –testi değerleri 24, 48 ve 72 saatler için istatistiksel olarak anlamlı değildir. (SD: Standard deviation).

4.1.3. siARID3A'nın Özgüllüğünün ve Transfeksiyon Kimyasalının Toksisitesinin Kontrol Edilmesi

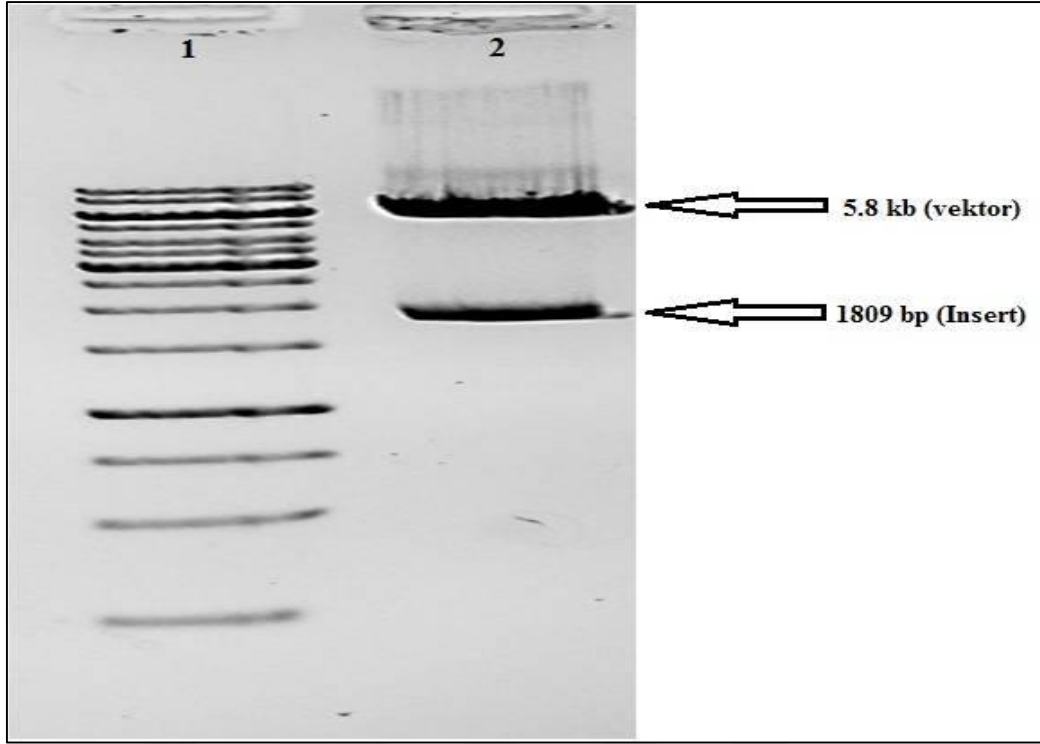
siARID3A'nın özgüllüğünü kontrol etmek için negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalının hücrelerdeki gen ifadesi üzerindeki toksisitesini kontrol etmek için hücrelere yalnızca transfeksiyon kimyasalı verilmiştir. Nitekim bunlardan elde edilen sonuçlar hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerden elde edilen sonuçlarla aynı olmalıdır. Bu şekilde siRNA'nın özgüllüğü ve transfeksiyon ajanının toksisitesi değerlendirilmektedir. ARID3A, AKT1 ve PTEN'in gen ifade seviyeleri negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon kimyasalı ile muamelesi sonrası sonuçlar hiçbir uygulama yapılmayan yani normal hücrelere benzer bulunmuştur. Aynı zamanda 24 (0,342), 48 (0,368) ve 72 (0,421) saatlerde t-testi, p değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu da gözlemlenen sonuçların siARID3A'ya özgül olduğunu ve transfeksiyon kimyasalının toksik olmadığını göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. ARID3A, AKT1 ve PTEN'in negatif kontrol siRNA ve transfeksiyon ajanı muamelesi sonrasında göreceli ifade seviyeleri. (Standard deviation (SD); 1: SD $\pm$ 0.02, 2: SD $\pm$ 0.01, 3: SD $\pm$ 0.01, 4: SD $\pm$ 0.03, 5: SD $\pm$ 0.035, 6: SD $\pm$ 0.025, 7: SD $\pm$ 0.02, 8: SD $\pm$ 0.03, 9: SD $\pm$ 0.04, 10: SD $\pm$ 0.03, 11: SD $\pm$ 0.035, 12: SD $\pm$ 0.03, 13: SD $\pm$ 0.035, 14: SD $\pm$ 0.025, 15: SD $\pm$ 0.04, 16: SD $\pm$ 0.043, 17: SD $\pm$ 0.04, 18: SD $\pm$ 0.035)

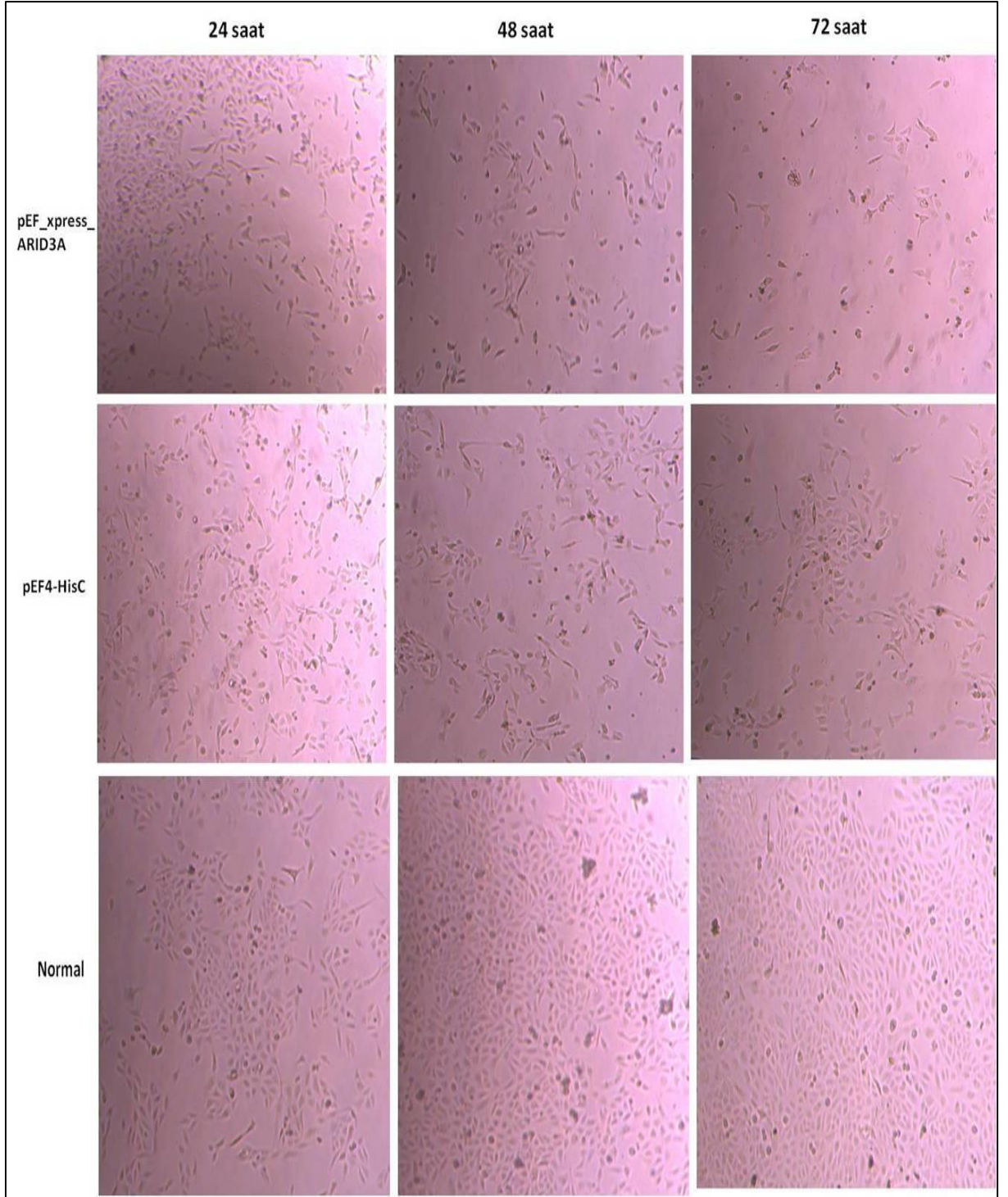
4.2. ARID3A'nın Aşırı İfade Edilmesi

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 4.7).



Şekil 4.7. 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.

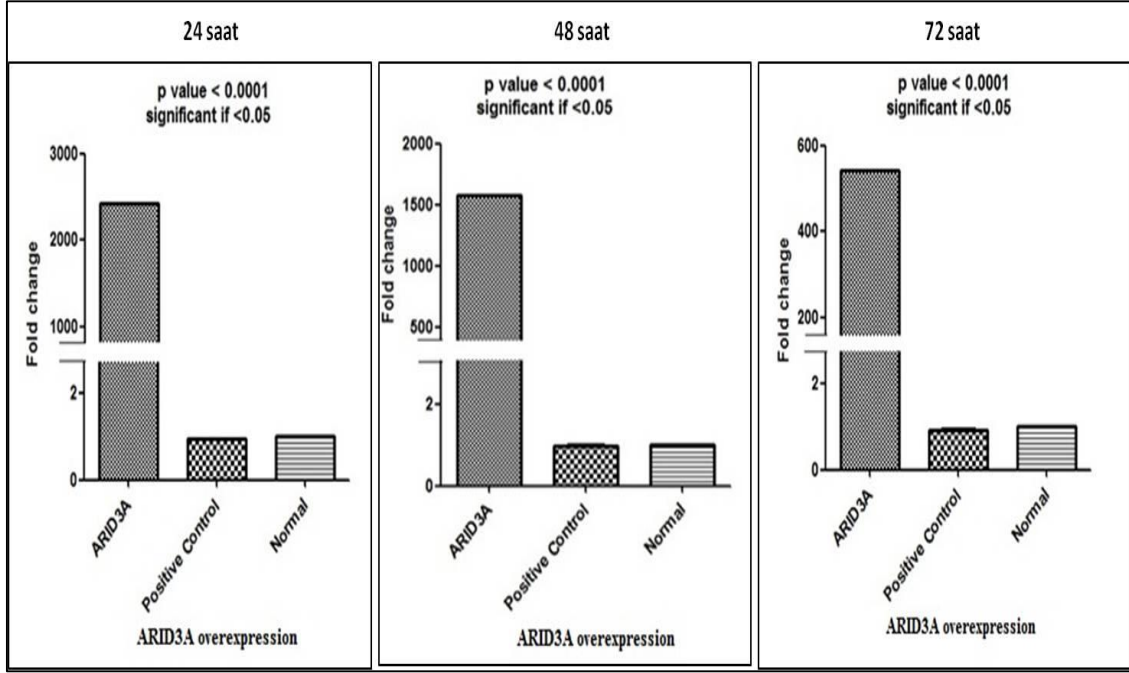
Klonlanmış ARID3A geninin doğrulanmasının ardından, U2OS hücrelerine ifade seviyesini arttırmak için transfekte edilmiştir ve AKT1 ifadesi üzerine etkileri gözlemlenmiştir. Transfeksiyondan sonra U2OS hücrelerinin morfolojileri gözlemlenmiştir ve günlük değişimlere dikkat edilmiştir (büyütme x4) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. pEF_xpress_ARID3A, pozitif kontrol pEF4-HisC ve normal (transfekte edilmemiş) U2OS hücrelerinin morfoloji ve yoğunluklarının gösterilmesi.

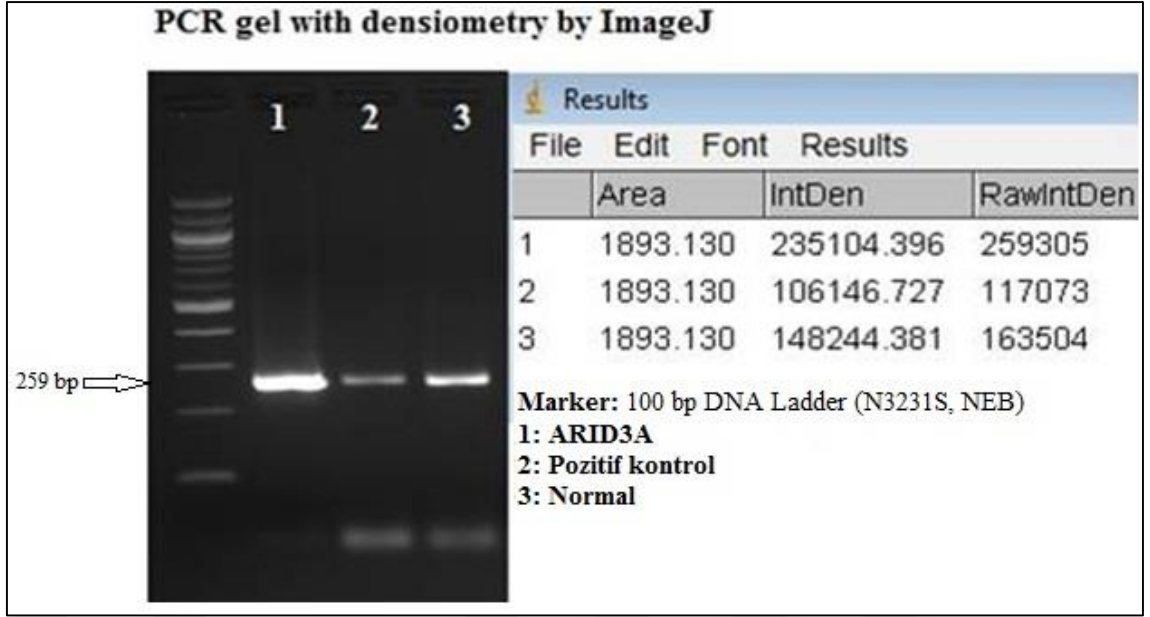
ARID3A'nın aşırı ifade edilmesi hem RT-PCR hem de qPCR yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak boş vektör pEF4-HisC kullanılmıştır. ARID3A için pEF_xpress_ARID3A ile transfeksiyonundan sonra, ARID3A geninin ifade seviyesi

transfekte edilmeyen (normal) hücreler ile belirli zaman aralıklarında kıyaslanmıştır. Bu duruma göre ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda sonuçların 24, 48 ve 72 saatleri için istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. ($p < 0,0001$) (Şekil 4.9). 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 4.9).



Şekil 4.9. qPCR kullanılarak U2OS hücrelerinde ARID3A geninin ifade seviyesinin gösterilmesi. qPCR kullanılarak U2OS hücrelerinde ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı görülmüştür. Pozitif kontrol ifade seviyesi analizi klonlanmış ARID3A'nın özgül olduğunu göstermektedir. Analizler 24, 48 ve 72 saatler için yapılmıştır. p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

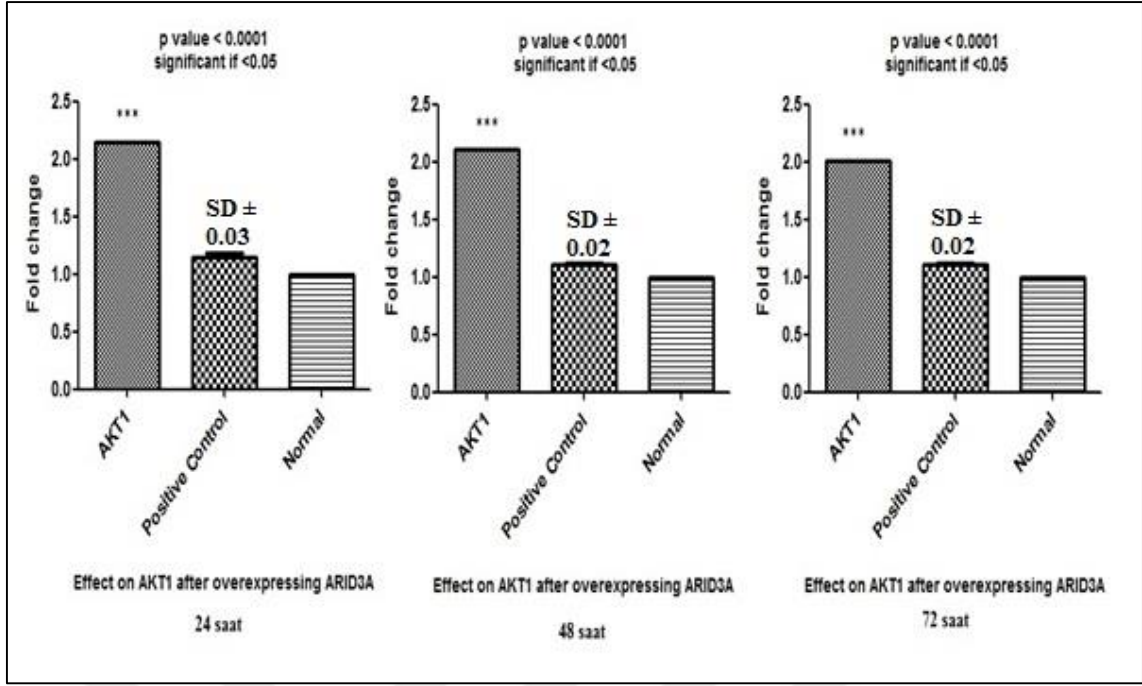
RT-PCR kullanılarak ARID3A'nın ifade seviyesindeki artış gösterilmiştir. ImageJ programı bantların parlaklıklarını veya yoğunluklarını ölçmek için kullanılmıştır ve normal ve pozitif kontrole göre daha parlak ve kalın bir bant olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. RT-PCR kullanılarak ARID3A'nın ifade seviyesindeki değişimin gösterilmesi. 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.

4.2.1. ARID3A'nın Aşırı İfadesinin AKT1 Üzerine Etkileri

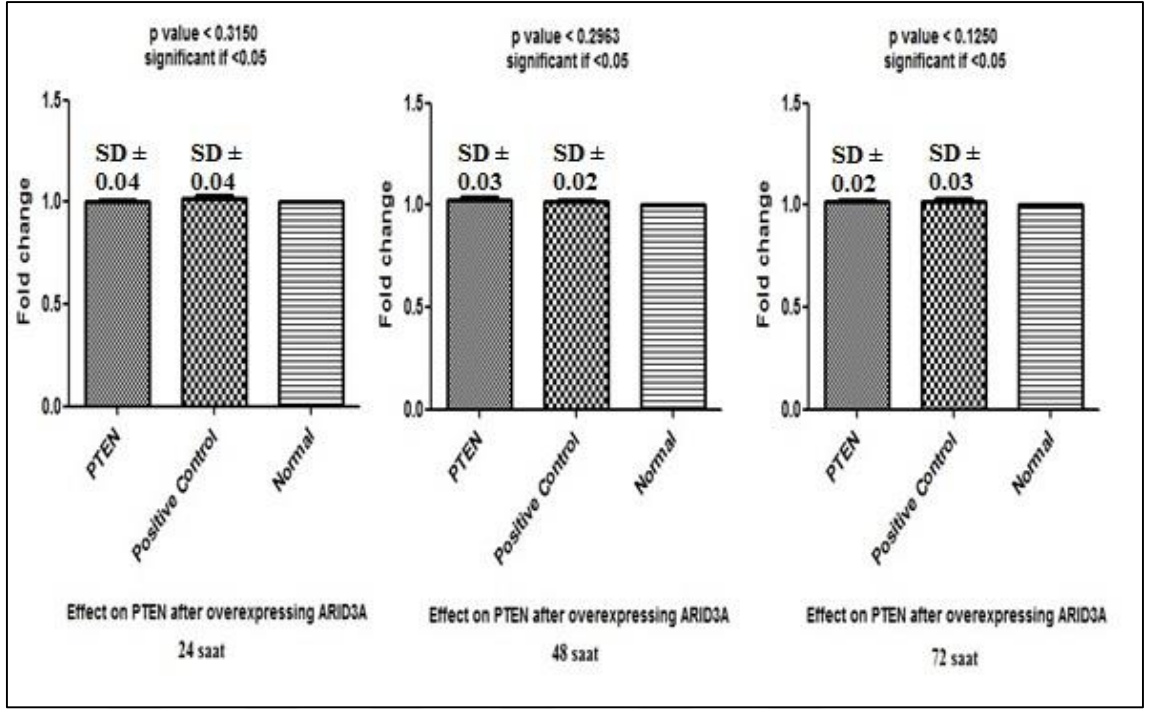
ARID3A'nın aşırı ifadesinin gösterilmesinin ardından bu sonuçların AKT1 ifade seviyesi üzerine etkisi analiz edilmiştir. AKT1'in ifade seviyesinin analizi için, qPCR yöntemleri kullanılarak belirli zaman aralıklarında transfekte edilmemiş (normal) U2OS hücrelerindeki ifade ile kıyaslanmıştır. ARID3A'nın aşırı ifade sonucunun AKT1 ifade seviyesini arttırdığı bulunmuştur. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin AKT1'in ifade seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, t-testi bu sonuçların istatistiksel olarak 24 ($p < 0,0001$), 48 ($p < 0,0001$) ve 72 ($p < 0,0001$) saatler için anlamlı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin AKT1 ifade seviyesinin katlı değişim oranlarının gösterilmesi. AKT1 ifade seviyesinin anlamlı olarak etkilendiği gösterilmiştir. Analizler 24, 48 ve 72 saatler için yapılmıştır. p değeri istatistiksel olarak anlamlıdır. Note: Eğer iki örnek arasındaki p değeri <0,05 ise bir yıldız (*), eğer <0.01 ise iki yıldız (**) ve eğer <0.001 ise üç yıldız (***) ile göstermektedir. (SD: Standard deviation).

4.2.2. ARID3A'nın Aşırı İfadesinin PTEN Üzerine Etkileri

ARID3A'nın aşırı ifadesinin gösterilmesinin ardından bu sonuçların PTEN ifade seviyesi üzerine etkisi analiz edilmiştir. PTEN'in gen ifadesi analizi qPCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır ve transfekte edilmeyen normal hücrelerle kıyaslanmıştır. ARID3A'nın aşırı ifadesinin PTEN ifade seviyesi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. t-testi, p değerlerinin anlamlı olmadığını göstermektedir. 24, 48 ve 72 saatler için p değerleri sırasıyla 0,3150, 0,2963 ve 0,1250'tir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. qPCR yöntemi kullanılarak ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesi PTEN ifade seviyesinin katlı değişim oranlarının gösterilmesi. PTEN ifade seviyesinin anlamlı olarak etkilenmediği gösterilmiştir. t-testi değerleri 24, 48 ve 72 saatler için istatistiksel olarak anlamlı değildir. (SD: Standard deviation).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Osteosarkom çocukluk çağı ve ergenlik döneminde en sık görülen primer kötü huylu kemik tümörüdür. Amerika Kanser Topluluğu istatistik verilerine göre yerleşmiş osteosarkomlu hastalarda 5 yıl hayatta kalma oranı modern tedavilerin ardından %60-80 arasındadır. Bununla birlikte metastaz yapan hastaların hayatta kalma oranı sadece 15%-30% arasındadır (<http://www.cancer.org/cancer/osteosarcoma>). Lokal tümör büyümesini inhibe etmek için ve tümör hücrelerinin akciğere yayılımını inhibe etmek için ve hastaların hayatta kalma oranını artırmak için etkili tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Tümör gelişimi ve metastazında yer alan moleküller ve onların uyarı mekanizmaları yeni ve etkili terapötik uygulamaların geliştirilmesi için anahtar role sahiptir.

ARID3 ailesi üyelerinden olan ARID3A proteini en çok Blenfositlerde ve testislerde ifadelenir. ARID3A'nın "AATTAA" bağlayıcı bir ortak dizisi vardır (1). Primer murin fibroblastlarında Ras tarafından uyarılan erken yaşlanmayı önlediği bir çalışmayla öne sürülen ARID3A, p53 ve DNA hasarı ile transkripsiyonel olarak etkinleşir (2,6). P53 ile ARID3A bazı durumlarda korele çalıştığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. p53 bağlanma bölgesinin ARID3A geninin ikinci intronunda bulunması p53 ile ARID3A'nın bazı durumlarda birlikte işlev gördüğünü desteklemekte olup yapılan çalışmalara göre ARID3A p53 hedef geni olan p21'in transkripsiyonel aktivasyonunda yardımcı role sahip olmuştur.

E2F hedef gen ifadesinde önemli bir role sahip olan ARID3A, E2F- bağımlı transkripsiyonu aktifleştirir (2). ARID3A'nın siRNA aracılığı ile susturulması ile E2F1, p107, CDC2 ve CDC6 gibi E2F hedef genlerinin transkripsiyonu da baskılanmıştır. ARID3A hücre farklılaşmasını inhibe ettiği ve proliferasyonu teşvik ettiği yönde bazı çalışmalar yapılmıştır ve bu ARID3A'nın tümör teşvik edici yani onkogenik rolünü ortaya koymuştur (5).

Bununla birlikte ARID3A susturulmasının gelişimsel plastisiteyi teşvik ettiği bildirilmiştir. B hücreli akut lenfoblastik lösemide miR-125b ile ARID3A'nın baskılanması hücre farklılaşmasını ve apoptozu inhibe etmiş ve hücre çoğalmasını teşvik etmiştir. Şimdiye kadar, ARID3A'nın bir onkogen olarak mı yoksa tümör baskılayıcı olarak mı işlev gösterdiği halen tartışmaya açık bir konudur.

Bir proto-onkogen olan serin/treonin kinaz Akt metabolizma, büyüme, çoğalma, hayatta kalma, transkripsiyon ve protein sentezini içeren çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde kritik role sahip olduğundan dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. Akt hücre büyümesini TSC1/TSC2 kompleksi ve mTORC yolu üzerindeki etkileri yoluyla düzenlemektedir. Akt CDK inhibitörleri p21 ve p27 nin fosforilasyonu ile hücre çoğalmasına katkıda bulunur.

Ek olarak, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN) fosforilasyonunu önleyerek Akt aktivitesini inhibe eder. Bu sebeple PTEN kaybı tümör büyümesini ve metastaza yayılımını kolaylaştırmaktadır. PTEN tümör hücre proliferasyonunu, hücre göçü ve invazyonu inhibe ederken tümör hücrelerinin apoptozunu artırmaktadır (120). Henüz yapılan bir çalışmada PTEN' in sadece tümör hücrelerini hedeflemediği aynı zamanda osteosarkomogenez sırasında tehlikeli döngünün kesilmesine yol açan osteoklast aracılı kemik yıkımını engellediği gösterilmiştir (120).

ARID3A hem Rb/E2F1 hem de p53 tümör baskılayıcı yollar arasında fonksiyonel bir bağlayıcıdır (2, 5-7). Bu gözlemler ARID3A, Akt1 ve PTEN' in farklı kanserlerde önemli rollere sahip oldukları bazı yaygın yollar olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu tezde osteosarkomda ARID3A' nın Akt1 ve PTEN ile bir etkileşim ve fonksiyonel bir bağ kurabileceği hipotezini kurduk. ARID3A, Akt1 ve PTEN arasındaki olası etkileşim rollerini açıklamak için osteosarkom hücre hattında (U2OS) ARID3A' nın susturulması ve aşırı ifadelendirilmesi deneylerine yer verildi. Sonuç olarak ARID3A' nın Akt1 ve PTEN üzerine etkileri analiz edildi. siRNA ile susturulması hedeflenen ARID3A hiçbir uygulama yapılmayan normal hücrelerle kıyaslandığında ifadelendirilmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca t testi kullanılarak 24, 48 ve 72 saatlerde anlamlı bir değişim söz konusu olduğu doğrulanmıştır. ($p < 0,0001$).

siRNA ile ARID3A' nın susturulması sırasında AKT1 geninin ifadellenme düzeyi analiz edildiğinde 0.6 kat azalma gözlemlenmiştir. Karşılaştırılmış t-testi analizi kullanılarak 24 ($p < 0,0002$), 48 ($p < 0,0002$) ve 72 ($p < 0,0001$) saatler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, ARID3A' nın susturulması PTEN' in ifade seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. 24 (0,224), 48 (0,4226) ve 72 (0,2697) saatlerde t-testi, p değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Negatif kontrol siRNA ve sadece transfeksiyon ajanı verilen ve ayrıca hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerde

ARID3A, AKT1 ve PTEN gen ifade seviyelerinin benzer olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla burdan siRNA' nın ARID3A' ya özgül olduğu ve transfeksiyon ajanının hücrede herhangi bir toksisite oluşturmadığını sonucuna ulaşılmaktadır. Transfeksiyon kimyasalının toksik olduğu hücrelerde gen ifadesinin etkilendiği ve hedef dışı etkilerin arttığı bulunmuştur (121, 122). Bu nedenle hücreler, hücre ve gen ifadesi üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için yalnızca transfeksiyon kimyasalı ile muamele edilmiştir.

ARID3A aşırı ifadelendirilmesi için pEF_xpress_ARID3A ile transfeksiyondan sonra, hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle karşılaştırıldığında ARID3A geninin ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, 24, 48 ve 72 saatleri için istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0001$). ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin doğrulanması üzerine bu hücrelerde AKT1 gen ifade seviyesine bakıldığında; AKT1 ifade seviyesinin 2 kat arttırdığı bulunmuştur. ARID3A'nın aşırı ifadelendirilmesinin AKT1'in ifade seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, t-testi bu sonuçların istatistiksel olarak 24 ($p < 0,0001$) , 48 ($p < 0,0001$) ve 72 ($p < 0,0001$) saatler için anlamlı olduğunu göstermiştir. Aynı durum PTEN geni için değerlendirildiğinde ise. ARID3A aşırı ifadelendirilmesinin PTEN'in ifadelene düzeyinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. t-testi, p değerlerinin anlamlı olmadığını göstermektedir. 24, 48 ve 72 saatler için p değerleri sırasıyla 0,3150, 0,2963 ve 0,1250'dir.

Osteosarkomda ARID3A' nın susturulması ve aşırı ifadelendirilmesi Akt1 ifadelenemesini sırasıyla azaltmış ve artırmıştır. Bununla birlikte ARID3A' nın susturulması ve aşırı ifadelendirilmesi PTEN üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır. Elde edilen sonuçlar açık bir şekilde osteosarkomda ARID3A' nın Akt1' i doğrudan düzenlediğini göstermektedir. Sonuç olarak, ARID3A' nın osteosarkomda Akt1' in onkogenik aktivitesini düzenleyici bir role sahip olduğu söylenebilir. Bu çalışma ARID3A aracılığıyla Akt1' in hedeflenerek osteosarkom tedavisinde kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Bu sebeple Akt1 ifadelenemesini doğrudan kontrol eden ARID3A, osteosarkomda terapötik bir ajan olarak kullanılma yönünde umut vaat etmektedir. Bununla beraber ARID3A' nın Akt1' i kontrol ettiği temel mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir ve ileriki çalışmalarda ortaya çıkarılması ile ilgili yoğun çalışmaların yapılmasını ümit etmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. 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.
2. 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;17:853-65.
3. 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. *Nat Cell Biol*. 2002;4:148-53.
4. Song M, Kim H, Kim WK, Hong SP, Lee C and Kim H. High expression of AT-rich interactive domain 3A (ARID3A) is associated with good prognosis in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2014;4: Suppl:481-9.
5. Saadat KA. Role of ARID3A in E2F target gene expression and cell growth. *Kokubyo Gakkai Zasshi*. 2013;80:15-20.
6. 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. *Mol Cancer Res*. 2003;1:438-44.
7. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417:710-6.
8. Hers I, Vincent EE and Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011;23:1515-27.
9. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W and Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:187-98.

10. Wander SA, Hennessy BT and Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest.* 2011;121:1231-41.
11. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:627-44.
12. Zhang J, Yu XH, Yan YG, Wang C and Wang WJ. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta.* 2015;444:182-92.
13. Dillon LM and Miller TW. Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function. *Curr Drug Targets.* 2014;15:65-79.
14. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer.* 2010;1:1170-7.
15. Xi Y and Chen Y, Oncogenic and Therapeutic Targeting of PTEN Loss in Bone Malignancies. *J Cell Biochem.* 2015;116:1837-47.
16. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E, Cancer statistics. *CA Cancer J Clin,* 2010;60:277-300.
17. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:7-30.
18. Dorak MT and Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet.* 2012;3:268.
19. Siegel R, Naishadham D and Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
20. Gutschner T and Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 2012;9:703-19.
21. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100: p.57-70.
22. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
23. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253:49-53.
24. Subramanya D, and Grivas PD, HPV and cervical cancer: updates on an established relationship. *Postgrad Me.* 2008;120:7-13.

25. Brooks CL and Gu W. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Lett.* 2011;585:2803-9.
26. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26:1324-37.
27. Lowe SW, Cepero E and Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature.* 2004;432:307-15.
28. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ and Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 2010;9:145-52.
29. Levine B and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132:27-42.
30. Mizushima N, Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21:2861-73.
31. Galluzzi L, and Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell.* 2008. 135:1161-3.
32. Zong WX and Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006;20: 1-15.
33. Grivennikov SI, Greten FR, and Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140:883-99.
34. Shay JW and Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:72-6.
35. Meyne J, Ratliff RL and Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:7049-53.
36. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB and S Bacchetti. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992;11:1921-9.
37. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* 1997;3:1271-4.

38. 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. *Nat Biotechnol.* 2009;27:1181-5.
39. Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ, Dirks RW. Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *EMBO J.* 2003;22:6631-41.
40. Shay JW and Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33:787-91.
41. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:453-8.
42. Talmadge JE and Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010;70:5649-69.
43. Klymkowsky MW and Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009;174:1588-93.
44. Polyak K and Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:265-73.
45. Yilmaz M and Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:15-33.
46. Kalluri R and Neilson EG, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1776-84.
47. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009. 119:1420-8.
48. Egeblad M, Rasch MG and Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22:697-706.
49. Joyce JA and Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009. 9:239-52.
50. Kalluri R and Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:392-401.

51. Qian BZ and Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010. 141:39-51.
52. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-64.
53. Baeriswyl V and Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:329-37.
54. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:789-91.
55. Kazerounian S, Yee KO, and Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:700-12.
56. Wilsker D, Probst L, Wain HM, Maltais L, Tucker PW and Moran E. Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics*. 2005;86:242-51.
57. 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. *Nat Struct Biol*. 1998;5:959-64.
58. Iwahara J and Clubb RT. Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *EMBO J*. 1999;18:6084-94.
59. 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. *J Biol Chem*, 2004. 279(16): p. 16670-6.
60. 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 Dev*. 1995;9:3067-82.
61. 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. *J Cell Physiol*, 2001. 186:136-45.

62. Wang X, Nagl NG Jr, Wilsker D, Scoy MV, Pacchione S, Peter Yaciuk, Dallas PB, and Moran E, Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J.* 2004;383:319-25.
63. Wang X, Nagl NG Jr, Flowers S, Zweitzig D, Dallas PB, Moran E., Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *Int J Cancer.* 2004;112:636.
64. Diederichs S, Bäumer N, Ji P, Metzelder SK, Idos GE, Cauvet T, Wang W, Möller M, Pierschalski S, Gromoll J, Schrader MG, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex. *J Biol Chem.* 2004. 279:33727-41.
65. Nixon JC, Rajaiya JB, Ayers N, Evetts S, Webb CF. The transcription factor, Bright, is not expressed in all human B lymphocyte subpopulations. *Cell Immunol.* 2004;228:42-53.
66. Wang Z, Goldstein A, Zong RT, Lin D, Neufeld EJ, Scheuermann RH, Tucker PW. Cux/CDP homeoprotein is a component of NF- μ NR and represses the immunoglobulin heavy chain intronic enhancer by antagonizing the bright transcription activator. *Mol Cell Biol.* 1999;19:284-95.
67. Rajaiya J, Nixon JC, Ayers N, Desgranges ZP, Roy AL, Webb CF. Induction of immunoglobulin heavy-chain transcription through the transcription factor Bright requires TFII-I. *Mol Cell Biol.* 2006. 26:4758-68.
68. Webb CF, Smith EA, Medina KL, Buchanan KL, Smithson G, Dou S. Expression of bright at two distinct stages of B lymphocyte development. *J Immunol.* 1998;160:4747-54.
69. Kortschak RD, Reimann H, Zimmer M, Eyre HJ, Saint R, 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;51:288-92.
70. Fukuyo Y, Mogi K, Tsunematsu Y, Nakajima T. E2FBP1/hDrill1 modulates cell growth through downregulation of promyelocytic leukemia bodies. *Cell Death Differ.* 2004;11:747-59.

71. Lai A, Marcellus RC, Corbeil HB, Branton PE., RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 1999;18:2091-100.
72. 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. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6632-41.
73. Lai A, Kennedy BK, Barbie DA, Bertos NR, Yang XJ, Theberge MC, Tsai SC, Seto E, Zhang Y, Kuzmichev A, Lane WS, Reinberg D, Harlow E, Branton PE. 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. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2918-32.
74. Cao J, Tian-wen Gao Eric J. Stanbridge Reiko Irie. RBP1L1, a retinoblastoma-binding protein-related gene encoding an antigenic epitope abundantly expressed in human carcinomas and normal testis. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1159-65.
75. Lee Y, Song AJ, Baker R, Micales B, Conway SJ and Lyons GE. Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development. *Circ Res*. 2000;86:932-8.
76. Kitajima K, Kojima M, Kondo S, and Takeuchi T. A role of jumonji gene in proliferation but not differentiation of megakaryocyte lineage cells. *Exp Hematol*. 2001. 29:507-14.
77. Anzai H, Kamiya A, Shirato H, Takeuchi T and Miyajima A. Impaired differentiation of fetal hepatocytes in homozygous jumonji mice. *Mech Dev*. 2003;120:791-800.
78. Ferguson WS and Goorin AM. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest*. 2001;19:292-315.
79. Kager L, Zoubek A, Pötschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branschoid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jürgens H, Gadner H, Bielack SS; Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol*. 2003;21:2011-8.

80. Hadjipavlou A, Lander P, Srolovitz H and Enker IP. Malignant transformation in Paget disease of bone. *Cancer*. 1992;70:2802-8.
81. Provisor AJ, Ettinger LJ, Nachman JB, Krailo MD, Makley JT, Yunis EJ, Huvos AG, Betcher DL, Baum ES, Kisker CT, Miser JS. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*. 1997;15:76-84.
82. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004;4: 177-83.
83. He JP, Hao Y, Wang XL, Yang XJ, Shao JF, Guo FJ, Feng JX, Review of the molecular pathogenesis of osteosarcoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014;15:5967-76.
84. Zhu L, McManus MM, and Hughes DP, Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front Oncol*. 2013;3:230.
85. Zhou W, Hao M, Du X, Chen K, Wang G, Yang J. Advances in targeted therapy for osteosarcoma. *Discov Med*. 2014;17:301-7.
86. Ouellet V and Siegel PM. CCN3 modulates bone turnover and is a novel regulator of skeletal metastasis. *J Cell Commun Signal*. 2012;6:73-85.
87. Kushlinskii NE, Fridman MV and Braga EA, Molecular Mechanisms and microRNAs in Osteosarcoma Pathogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2016;81:315-28.
88. Porta C, Paglino C and Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64.
89. Yuan TL and Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497-510.
90. Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert R, Padhye SB, Sarkar FH. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-kappaB signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13:1002-13.

91. Dobbin ZC and Landen CN. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14:8213-27.
92. Rubashkin MG, Cassereau L, Bainer R, DuFort CC, Yui Y, Ou G, Paszek MJ, Davidson MW, Chen YY, Weaver VM. Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res.* 2014;74:4597-611.
93. Majchrzak A, Witkowska M, and Smolewski P, Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: current knowledge and clinical significance. *Molecules.* 2014;19:14304-15.
94. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307:1098-101.
95. Heras-Sandoval D , Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal.* 2014;26:2694-701.
96. Zhu Q, Yang J, Han S, Liu J, Holzbeierlein J, Thrasher JB, Li B. Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *Prostate.* 2011;71:835-45.
97. Boreddy SR, KC Pramanik, and Srivastava SK, Pancreatic tumor suppression by benzyl isothiocyanate is associated with inhibition of PI3K/AKT/FOXO pathway. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1784-95.
98. Atif F, Yousuf S, and Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;146:62-73.
99. Ji H, Ding Z, Hawke D, Xing D, Jiang BH, Mills GB, Lu Z. AKT-dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin- and MDM2-mediated p53 stability and cell apoptosis. *EMBO Rep.* 2012;13:554-60.
100. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine

- phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997;275:1943-7.
101. Waite KA and Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet*, 2002;70:829-44.
 102. Zbuk KM and Eng C. Hamartomatous polyposis syndromes. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007;4:492-502.
 103. Matsuda S, Kobayashi M, and Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol*. 2013; 2013:472432.
 104. Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, Matsuda S., PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv Hematol*. 2012;2012:843085.
 105. Kuijjer ML, Akker B, Hilhorst R, Mommersteeg M, Buddingh EP, Serra M, Bürger H, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen AM. Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy. *BMC Med Genomics*. 2014;7:4.
 106. Lee JW, Kim KS, An HK, Kim CH, Moon HI, Lee YC, Dendropanoxide induces autophagy through ERK1/2 activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. *PLoS One*. 2013;8:e83611.
 107. Gobin B, Huin MB, Lamoureux F, Ory B, Charrier C, Lanel R, Battaglia S, Redini F, Lezot F, Blanchard F, Heymann D. BYL719, a new alpha-specific PI3K inhibitor: single administration and in combination with conventional chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2015;136:784-96.
 108. Liu B, Wu Y, Zhou Y, Peng D. Endothelin A receptor antagonism enhances inhibitory effects of anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody on invasiveness and viability of human osteosarcoma cells. *PLoS One*. 2014;9:e93576.
 109. Edlind MP and Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl*. 2014;16:378-86.

110. Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, Lollini PL, Maira SM, García-Echeverría C, Mercuri M, Picci P, Scotlandi K., NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2010;16:530-40.
111. Gobin B, Battaglia S, Lanel R, Chesneau J, Amiaud J, Rédini F, Ory B, Heymann D. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumor development in vivo with an improved survival rate. *Cancer Lett*, 2014;344:291-8.
112. Carol H, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Billups C, Smith MA, Houghton PJ, Lock RB, Initial testing (stage 1) of the Akt inhibitor GSK690693 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55:1329-37.
113. Hernandez-Aya LF and Gonzalez-Angulo AM, Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist.* 2011;16:404-14.
114. Paplomata E and O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2014;6:154-66.
115. Xie ZG, Xie Y, and Dong QR. Inhibition of the mammalian target of rapamycin leads to autophagy activation and cell death of MG63 osteosarcoma cells. *Oncol Lett.* 2013;6:1465-1469.
116. Nielsen-Preiss SM, Silva SR, and Gillette JM. Role of PTEN and Akt in the regulation of growth and apoptosis in human osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 2003;90:964-75.
117. Song D, Ni J, Xie H, Ding M, Wang J. DNA demethylation in the PTEN gene promoter induced by 5-azacytidine activates PTEN expression in the MG-63 human osteosarcoma cell line. *Exp Ther Med.* 2014;7:1071-1076.
118. Loftus JP, Cavatorta D1, Bushey JJ1, Levine CB1, Sevier CS2, Wakshlag JJ1. The 5-lipoxygenase inhibitor tepoxalin induces oxidative damage and altered PTEN status prior to apoptosis in canine osteosarcoma cell lines. *Vet Comp Oncol.* 2016;14:e17-30.

119. Miwa S, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Yachie A, Tsuchiya H. Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF-kappaB and MAPK pathways. *Anticancer Res.* 2012;32:3643-9.
120. Xi Y and Chen Y. PTEN Plays Dual Roles As a Tumor Suppressor in Osteosarcoma Cells. *J Cell Biochem.* 2017,118:2684-2692.
121. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003;21:635-7.
122. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6347-52.
123. Lin C, Song W, Bi X, Zhao J, Huang Z, Li Z, Zhou J, Cai J, Zhao H. Recent advances in the ARID family: focusing on roles in human cancer. *OncoTargets*
124. Mohammad Kaifee A. Role of ARID3A in the regulation of lncRNA ERICD. 2017, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora thesis. Tez No: 473977 (Prof. Dr. Ecir Ali Çakmak).

7. EKLER

7.1. EK 1: Lipofectamine RNAiMAX protokolü

1. Hücreler 1×10^6 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.
2. 1,5 ml'lik ependorf tüpte 150 μ l Opti-MEM® Medium ve 9 μ l Lipofectamine® RNAiMAX Reagent hazırlanır ve iyice karıştırılır.
3. 1,5 ml'lik ependorf tüpte 150 μ l Opti-MEM® Medium ve 3 μ l ilgili siRNA (10 μ M) hazırlanır ve iyice karıştırılır.
4. Hazırlanan siRNA ve Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 1:1 oranında karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
5. siRNA-lipid karmaşımı ilgili hücreye damla damla akıtılır. 6 kuyucuklu kap '8' çizecek şekilde güzelce karıştırılır.
6. 37°C'de 1-3 gün inkübe edilir. Sonra aktarım yapılan hücreler analiz edilir.

Not: Transfeksiyon ajanının toksisitesini belirlemek için 1,5 ml'lik tüpte 9 μ l Lipofectamine ajanı ve 150 μ l Opti-MEM® Medium karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve hücrelere damla damla verildi.

7.2. Ek 2: Lipofectamine™ 3000 Reagent Protokol

1. 6 kuyucuklu kaplara, her kuyuya 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Bunlardan birisi hedef gen, birisi pozitif kontrol ve birisi de boş kontrol olarak üç kuyucuk kullanılır.
2. 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.
3. 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisinde 125 µl Opti-MEM® Medium ve 3.75 µl Lipofectamine™ 3000 Reagent eklenmiştir ve iyice karıştırılır.
4. Hazırlanan DNA ve Lipofectamine™ 3000 Reagent karışımları 1:1 oranında eklenerek iyice karıştırılır.
5. Karışım 10-15 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
6. İlgili hücre üzerine damla damla hazırlanan karışım eklenir.
7. 6 kuyucuklu kap '8' çizecek şekilde güzelce karıştırılır.
8. 37°C'de 1-3 gün inkübe edilir. Sonra aktarım yapılan hücreler analiz edilir.

7.3. Ek 3: High Pure RNA Isolation Protokol

1. İstenen yoğunluğa ulaşmış hücreler tripsin ile kaldırılarak tripsinin etkisini durdurmak için FCS içeren DMEM eklenir.
2. Hücreler 3500 rpm'de 5 dk çevrilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet 200 µl PBS ile süspanse edilir.
3. Elde edilen karışım üzerine 400 µl parçalama tamponu eklenerek 15 sn vortekslenir.
4. Tüm karışım filtreli tüplere aktarılır, 9200 rpm'de 30 sn çevrilir. Alt kısım atılır.
5. Filtreli tüplere 100 µl (10 µl DNaz ve 90 µl DNaz inkübasyon tamponu) DNaz karışımı eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında beklenir.
6. 500 µl yıkama tamponu I eklenip 30 saniye 9200 rpm'de çevrilir. Alt kısım atılır.
7. 500 µl yıkama tamponu II eklenip 30 saniye 9200 rpm'de çevrilir. Alttaki tüp yenisi ile değiştirilir.
8. 200 µl yıkama tamponu II eklenip 2 dk 11800 rpm'de çevrilir. Alttaki tüp atılır ve yeni bir tüp yerleştirilir.
9. 50 µl elüsyon tamponu eklenir ve 1 dk oda sıcaklığında beklenir. 9200 rpm'de 1 dk çevrilir. Filtreli tüp atılır.
10. RNA miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür ve RNA'lar çalışma sürecine kadar -80 °C'de saklanır. and Therapy. 2014;7:315-324.

8. ÖZGEÇMİŞ



Amani Kanjo

Address: Umut Apart, Marşal Fevzi Çakmak, Sarıgüllük
Mh, Şehitkamel, Gaziantep, Turkey.

Personal Detail:

First Name: Amani
Last Name: Kanjo
Date of Birth: 4-1-1990
Sex: Female
Marital status: single
Email: amani.kanjo@gmail.com
Tel: 0090 5378603893

Educational Qualifications:

2014 -2018	MSc Student in Medical Biology University of Gaziantep, Turkey.
2007-2013	Biotechnology Engineering University of Aleppo, Aleppo, Syria.
2006 -2007	Bachelor's degree (average 94.1%).

Work Experience:

- Aug 2012 Oct 2012 Kebbewar Laboratory for Genetics and Biochemical analysis, Aleppo, Syria.
- Nov 2013 Jan 2014 Trainee at Dept. of Medical Biology and Genetics, University of Gaziantep, Turkey as laboratory technician.
- June 2015 May 2017 Family Planning & Gender-Based Violence Project Coordinator.
- June 2017 Present Family Planning & Gender-Based Violence Project Manager in Syria Relief and Development.

Laboratory Techniques:

- Data Analysis
- DNA Electrophoresis
- PCR and RT-PCR
- DNA Isolation
- microRNA Isolation
- RNA Isolation
- Vector transformation

- Gene cloning
- Blood tests (Chemistry, Glucose, Hormones, CBC).
- Transfection

Research and Publication:

- July 2012 Electrochemiluminescence Technology (ECL) Graduation Thesis (Aleppo University).
- ARID3A Directly Regulates AKT1 but not PTEN in Osteosarcoma in 1st INTERNATIONAL CONGRESS on CANCER & ION CHANNELS September 21 – 23, 2017, Sanliurfa, TURKEY
- Married too soon: Early marriage in the Syrian conflict in CARE International web site; <https://www.care-international.org/news/stories-blogs/married-too-soon-early-marriage-in-the-syrian-conflict>

Trainings and Affiliations:

- Sep. 2007 – Mar 2013 Member of Student Union of University of Aleppo
- May – June 2016 PHC Master Diploma Course (Inc. Nutrition, Reproductive Health, Health Information, Pedagogy, Local Planning) by Health Cluster Turkey Hub (Syria)
- Aug 2016 Managing Gender-Based Violence Programmes in Emergencies E-Learning by UNFPA
- December 2016 Co-facilitating GBV SOP Workshop for Health Providers GBV Sub-Cluster and SRH Sub-Group Funded by UNFPA
- May 2016 _ March 2017 Capacity Building Initiative with Gender-Based Violence Sub cluster Turkey Hub (Syria) and UNFPA (Inc. GBV PSS, SOPs, Case Management, Clinical Management of Rape)

Volunteering and extra curriculum activity:

- Volunteer in Syrian Red Crescent.
- Volunteer in Syria Relief and Development as Project Coordinator in Reproductive Health Sector.
- Multiple courses in upper intermediate English by Accad Institute and Higher Institute of Languages, University of Aleppo 2008–2011.

IT Skills:

- Microsoft Office (very good)
- Internet Skills (very good)

Personal Data:

Language Skills:

- English (advanced)
- Turkish (upper-intermediate)
- Arabic (native)

Hobbies:

Ping-Pong, swimming, and travelling.

References: Furnished upon request.