



# Gen İfadesinin Yeni Düzenleyicileri Halkasal RNA'ların Apoptotik Yolaklara Olan Etkilerinin Araştırılması

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 215Z081**

Proje Yürütücüsü:  
**Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL**

Danışmanlar:

Prof. Dr. Jens ALLMER  
Doç. Dr. Ayten NALBANT

Bursiyer:

Dr. İpek ERDOĞAN  
Ulvi AHMADOV  
Bilge YAYLAK

NİSAN 2019  
İZMİR



## ÖNSÖZ

Genom projelerinin tamamlanmasına müteakip yapılan genom anotasyon çalışmaları, ökaryotik bir hücrenin sanılandan çok daha fazla bir transkripsiyonel kapasiteye sahip olduğunu ve bu kapasitenin büyük bir kısmını da protein kodlamayan transkriptlerin oluşturduğunu göstermiştir. Protein kodlayan mRNA'ların lineer yapıda olması nedeniyle, ilk anotasyon çalışmaları lineer transkriptler üzerine yoğunlaşmış ve binlerce uzun lineer protein kodlamayan genler tespit edilmiştir. RNA sekanslama teknolojisinde ve bu verilerin biyoinformatik analizlerinde kullanılan yeni programların geliştirilmesine paralel olarak, genomda lineer transkriptlerin yanında halkasal formda RNA'ların da üretildiği raporlanmıştır. TÜBİTAK tarafından desteklenen (215Z081 No.lu) ve bir yürütücü, iki danışman ve farklı zaman dilimlerinde çalışan üç bursiyer olmak üzere toplam altı kişilik bir ekip tarafından yürütülen bu projede HeLa hücreleri model olarak kullanılarak apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan halkasal RNA'lar taranmıştır. Dört farklı ligand ile tetiklenen apoptotik hücrelerde yapılan tarama sonrası bazı adayların validasyonu ve orijin aldığı gen ile etkileşimleri irdelenmiştir. Değişik biyoinformatik analizler ve işlevsel birtakım yaklaşımlar kullanılarak, aday halkasal RNA'lar hakkında moleküler bilgiler toplanmıştır. Bu vesile ile projeye finansal katkıda bulunan TÜBİTAK'a ve projenin yürütüldüğü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

“

## İÇİNDEKİLER

i. Özet (Türkçe).....	IV
ii.Özet (İngilizce).....	v
1. Giriş .....	1
2. Literatür Özeti .....	1
2.1 Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü) .....	1
2.2. Kodlamayan RNA'lar .....	4
2.3. Halkasal RNA'lar.....	7
2.4. Halkasal RNA'lar ve Apoptoz.....	10
3. Gereç ve Yöntem .....	11
3.1. Memeli Hücrelerin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması.....	11
3.2. Apoptozun Akış Sitometresi ve Hücre Sayım Cihazı İle Belirlenmesi.....	12
3.3. Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri .....	13
3.4. Derin Sekans Analizleri.....	13
3.5. Biyoinformatik Analizler .....	14
3.6. Real Time PCR Analizleri ve Halkasal RNA'ların Klonlanarak Doğrulanması ....	14
3.7. Western Blotlama .....	15
3.8. Halkasal RNA'ların Susturulması.....	16
3.9. Polizom Profili.....	17
4. Bulgular .....	18
4.1. HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi.....	18
4.1.1. HeLa Hücrelerinde Apoptozun Akım Sitometresiyle Analizi.....	18
4.1.2. Apoptotik Yolakların Tetiklenmesinin Western Blotlamayla Analizi.....	19
4.1.3. Jurkat ve MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Yolakların Tetiklenmesi .....	20
4.2. Derin Sekanslama İle Farklı İfade Edilen Halkasal RNA'ların Belirlenmesi .....	21
4.2.1. RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri .....	22
4.2.2. Derin Sekans İle Farklı İfade Edilen Halkasal RNA'ların Belirlenmesi .....	22
4.2.3. Aday Halkasal RNA'ların qPCR İle Validasyonu.....	25
4.3. Halkasal RNA'ların Protein Kodlama ve miRNA Süngeri Potansiyellerinin İrdelenmesi.....	28
4.4. Halkasal RNA'ların Polizomlarla Etkileşimlerinin İrdelenmesi.....	30
4.5. Aday Halkasal RNA Susturmasının Apoptoza Etkisinin İrdelenmesi .....	32
5. Tartışma/Sonuç .....	33

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1. Apoptotik Mekanizmada Rol Oynayan Ekstrinsik ve İnstrinsik Faktörler .....	4
Şekil 2. Protein Kodlamayan RNA'ların Sınıflandırılması.....	6
Şekil 3. Halkasal RNA'ların Üretimi ve Geriye Kırılma Yoluyla Üretilmesine Katkıda Bulunan Faktörler .....	8
Şekil 4. Halkasal RNA'ların Önerilen Moleküler Fonksiyonları.....	10
Şekil 5. Apoptotik HeLa Hücrelerinin Akış Sitometri Analizi.....	19
Şekil 6. HeLa Hücrelerinin Apoptozun Tetiklenmesi Sonrası Kaspaz Aktivasyonu....	20
Şekil 7. Jurkat Hücrelerinde Sisplatin, Doksorubisin ve Anti-Fas ile Apoptozun Tetiklenmesi .....	21
Şekil 8. Apoptozun Tetiklendiği HeLa Hücrelerinden RNA İzolasyonu .....	22
Şekil 9. Apoptotik Şartlarda Farklı İfade Edilen Halkasal RNA'lar.....	24
Şekil 10. Halkasal RNA'ların RT-PCR ile Amplifikasyonu.....	26
Şekil 11. Halkasal RNA'ların qPCR Analizi.....	27
Şekil 12. Halkasal RNA Oluşumunun Kalıp mRNA İfadesine Etkisi.....	28
Şekil 13. Potansiyel Halkasal RNA-miRNA Etkileşimlerinin Biyolojik İşlevlere Etkisi.	29
Şekil 14. Hsa_circ_0029693'ün Proteine Çevrilme Potansiyeli.....	30
Şekil 15. Polizom Profili ile hsa_circ_0029693'ün Proteine Çevrilme Potansiyelinin İncelenmesi .....	31
Şekil 16. Circ_HIPK3 ve hsa_circ_0029693 susturmasının apoptoza etkisi .....	33

## TABLolar

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 1. qPCR ve Klonlamada Kullanılan Primerler .....	15
Tablo 2. Apoptotik Hücrelerde Farklı İfade Edilen Aday Halkasal RNA'lar .....	25

## ÖZET

Apoptoz gerek normal gelişimde gerekse kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar gibi bir dizi patolojik olgularda önemli rol oynayan hücresel bir işlemdir. Apoptotik mekanizmalar üzerine yapılan araştırmalar, apoptotik yolların protein kodlayan genler yanında protein kodlamayan genler tarafından da düzenlendiğini göstermektedir. Bu bağlamda miRNA'lar ve uzun kodlamayan transkriptler en iyi karakterize edilmiş kodlamayan RNA türlerini oluşturmaktadır. Son iki yılda derin sekanslama protokollerinde ve ilgili derin sekans verilerinin incelenmesinde kullanılan biyoinformatik algoritmalarda yapılan değişiklikler, lineer kodlamayan transkriptler yanında halkasal formda kodlamayan transkriptlerin (halkasal RNA) keşfine yol açmıştır. Çekirdek ve sitoplazmada lokalize olabilen ve genomun çok farklı bölgelerinden üretilen halkasal RNA'ların biyogenezi, moleküler fonksiyonu, etkileştikleri diğer moleküller ve regülasyonlarıyla ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır.

İnsanda intrinsik ve ekstrinsik yolağın düzenlenmesinde rol oynayan halkasal RNA'ların sistematik bir yaklaşımla belirlenmesini amaçlayan bu projede genetik manipülasyonların kolay olduğu HeLa hücreleri model olarak seçilmiştir. Hipotezler ayrıca Jurkat ve MCF-7 hücrelerinde test edilerek tanımlanan RNA'ların hücreye özgün olup olmadığı araştırılmıştır. HeLa hücrelerinde intrinsik yolak doksorubisin ve sisplatin ile ekstrinsik yolak ise anti-FAS/CD95 antikoru ve TNF-alfa ile tetiklenecek ve izole edilen RNA'lar derin sekans analizine tabi tutulmuştur. Kümeleme çalışmaları, kullanılan liganda göre ifadesi değişen halkasal RNA'lar olduğunu göstermiştir. qPCR ile doğrulanan adaylardan bir tanesi HeLa hücrelerinde susturularak fonksiyonel teste tabi tutulmuştur. Ayrıca biyoinformatik analizler, bazı aday halkasal RNA'ların proteine çevrilme potansiyeli olduğunu gösterirken diğer bazı adayların miRNA süngeri olarak görev yapabileceğine işaret etmektedir.

## ABSTRACT

Apoptosis is a cellular process that plays an important role not only in normal development but also in the pathological cases such as cancer, autoimmune and degenerative diseases. Studies conducted on apoptotic mechanisms have shown that the apoptotic pathways are regulated by non-protein coding genes in addition to the protein coding genes. In that respect, miRNAs and long non-coding RNAs constitute the best characterized types of non-coding RNA species. Over the past two years, the modifications in the pyrosequencing protocols and the algorithms used to analyze the pyrosequencing data have led to the discovery of circular RNAs besides the linear long non-coding RNAs. Circular RNAs are capable of localizing both in the nucleus and cytoplasm and the knowledge on their biogenesis, molecular function, interacting molecules and regulation is quite limited.

In this project, which has aimed to identify the circular RNAs involved in the regulation of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways through a systematic approach, HeLa cells were selected as the model system due to the easiness of genetic manipulations. Hypotheses were also tested on Jurkat and MCF-7 cells to probe the cell specificity of candidate RNAs. The intrinsic pathway was activated with doxorubicin and cisplatin and the extrinsic pathway was induced with anti-Fas/CD95 and TNF-alpha. The total RNAs were then subjected to deep-sequencing. Clustering analyses have shown ligand-specific expression patterns of circular RNAs. One of the candidates, whose expression was validated by qPCR, was subjected to functional studies through silencing. In addition, bioinformatics analyses have revealed the protein coding potential of certain candidate circular RNAs while some other candidates might serve as miRNA sponges.

## 1. GİRİŞ

Apoptoz, insan sağlığının korunmasında çok temel bir göreve sahip bir hücresel işlev olup bu işlevi düzenleyen birçok protein tanımlanmıştır (Gerner ve ark., 2000; Thiede ve Rudel, 2004; Hotchkiss ve ark., 2009). Regülatör bu proteinlerin yanında, apoptozu özellikle transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyen onlarda mikroRNA rapolanmıştır (Subramanian ve Ster, 2010; Erdoğan ve ark., 2018). Laboratuvarımızda yürütülen 113Z371 No.lu proje kapsamında elde ettiğimiz yayımlanmamış veriler ise, apoptozun uzun kodlamayan RNA'lar tarafından da düzenlenebileceğine işaret etmektedir. Düzenleyici RNA moleküllerine en yeni katılan RNA'lar ise halkasal RNA'lar olup, gen ifadesini düzenlemek yanında proteine çevrilme potansiyelleriyle bu alana yeni bir dinamizm kazandırmaktadırlar (Ebbesen ve ark., 2015). Literatürde apoptozu düzenleyen çok az halkasal RNA raporlanmış olup (Holdt ve ark., 2016; Nan ve ark., 2016; Dang ve ark., 2017; Mehta ve ark., 2017), genom kapsamlı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, apoptozu düzenleme potansiyeli bulunan halkasal RNA'ların tüm genom kapsamlı bir şekilde tanımlanması ve fonksiyonel olarak irdelenmesi oldukça önemlidir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Hücre Ölümü Tanımlama Komitesi'nin kararlarına göre ökaryotlarda hücrelerin fiziksel, mekanik ve kimyasal ajanlara maruz kalarak kaza eseri (accidental cell death) veya genetiksel tanımlanmış moleküler mekanizmalara bağlı olarak kontrol edilebilir bir şekilde ölebileceği ifade edilmektedir (Galluzzi ve ark., 2015). Fizikokimyasal veya mekanik etkilerle tetiklenen hücre ölümünü genel olarak geri döndürmek imkansız olmakla birlikte regüle edilen hücre ölümünü kontrol etmek mümkündür. Kontrol edilebilen bu tür hücre ölümü evrimsel olarak bir çok türde muhafaza edilmiş olup ihtiyaç fazlası hücreler ile sağlığı tehdit eden antijenlerin berteraf edilmesi için temel bir göreve sahiptir (Hotchkiss ve ark., 2009; Chao ve ark., 2011; Ouyang ve ark., 2012; Singh ve ark., 2012). Kontrol edilebilir hücre ölüm hızındaki yavaşlamalar kanser ve otoimmün hastalıkların oluşumuna zemin hazırlarken, hücre ölümünün kontrolsüz artması nörodejenaratif hastalıklar ve AIDS gibi hastalıkların oluşumuna yol açabilmektedir. Düzenlenebilir hücre ölümü sadece hastalıklarla ilintili olmayıp normal gelişimin tamamlanması sürecinde doku ve organların şekillenmesine de katkıda



bulunmaktadır (Arya ve White, 2015). Bu sebeplerden dolayı hücre ölüm mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması, gerek insan gelişiminin gerekse patolojik olguların anlaşılması ve tedavisi için çok önemlidir.

Programlı hücre ölümünün ilk örneği 1965 yılında Richard A Lockshin tarafından gelişim sırasında kas ara segmentlerinin oluşumuyla bağlantılı olarak rapor edilmiştir (Lockshin ve Williams, 1965). 1972 yılında, yunanca “düşmek” anlamına gelen apoptosis kelimesi türetilerek, ölen bir hücrenin özellikleri olan sitoplazmik büzülme, kromatin kondenzasyonu, nükleer fragmentasyon, kaynama-benzeri yapılar (blebbing) ve apoptotik cisimcikleri tarif etmek için kullanılmaya başlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Hücre ölümünün morfolojik olarak tanımlanması oldukça erken olmasına rağmen, moleküler seviyede apoptozun düzenlenmesinden sorumlu ilk protein ancak 27 yıl sonra belirlenebilmiştir (Thornberry ve ark., 1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda bazen sınırlarını tam olarak belirlemek zor olsa da üç tip hücre ölümü belirlenmiştir: apoptosis, otofaji ve nekrosis (Eisenberg-Lerner ve ark., 2009; Hotchkiss ve ark., 2009; Maghsoudi ve ark., 2012; Berghe ve ark., 2014; Teng ve Harwick, 2015). Membran bariyerlerinin ya da hücre içi enerji kaynaklarının çok hızlı ve kitle halinde kaybedilmesi sonucu oluşan nekroz tip III hücre ölümü olarak kategorize edilmekte olup, organellerin ve hücrenin şişmesi, parçalanması ve sitoplazmik içeriğin dışarıya taşması ile karakterizedir. Tip II hücre ölümü olarak klasifiye edilen otofaj ise çeşitli hücre organellerinin ve kompartmanlarının lizozomlar vasıtasıyla parçalanmasıyla karakterizedir. Bazen her üç tip hücre ölümünün sınırlarını çizmek zor olup farklılıkları belirlemek için geliştirilmiş bir dizi yöntem bulunmaktadır (Martin ve Henry, 2013; Lalaoui ve ark., 2015).

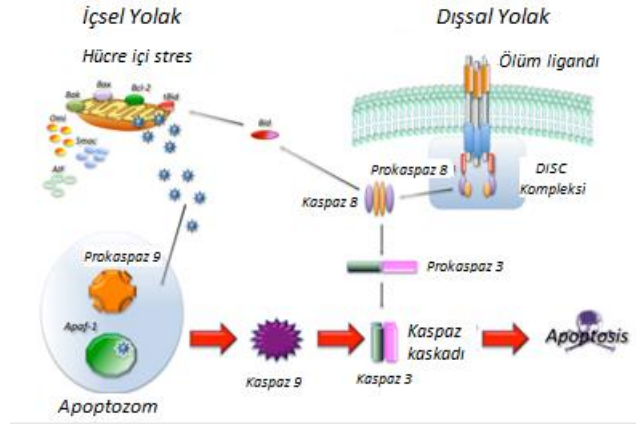
Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarında hücre içinden ve dışından orijin alan etmenler bir dizi biyokimyasal olayları tetikleyerek hücrenin programlı bir şekilde ölmesine yol açmaktadır (Elmore, 2007; Favaloro ve ark., 2012). Hücre türüne göre bazı farklılıklar mevcut olsada, apoptotik ölüm mekanizmaları evrimsel olarak değişik model organizmalarda ve memelilerde korunmuştur. Şu ana kadar yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalarla, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki apoptotik yolak belirlenmiştir (Şekil 1). İntrinsik yolak normal gelişim ve çok hücreli organizmalarda hücre sayısının homeostazinde önemli rol oynar ve ayrıca endoplasmik retikulum stresi, oksidatif stres, DNA hasarı ve büyüme hormonu yokluğu gibi stres şartlarında aktive edilmektedir (Lalaoui ve ark., 2015). İmmun sistem hücrelerinde yaygın olarak bulunan ekstrinsik faktörler ise üç önemli reseptör grubunu etkileyerek sinyal iletim yolunu aktive ederler; TNF (tumor necrosis factor), Fas ve TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) reseptörleri (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Reseptörler fiziksel olarak farklı olsa da, ligandın bağlanması sonrası konformasyon değişikliğine uğrayan



reseptörlerin sitoplazmik kısmında DISC (death inducing silencing complex) kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks, reseptörlerin sitoplazmik yarısında yer alan DD (death domain) ve DED (death effector domain) kısımları ile FADD adaptör proteini ve kaspaz-8 enzimi arasında oluşur. Lokal konsantrasyonu artan caspase-8'in otoproteolitik aktivasyonu sırasıyla diğer caspase enzimlerinin (örneğin caspase-3 ve -7) aktivasyonuna yol açmaktadır. Ekstrinsik yolda hastalık patolojileriyle ilintili olup bu yolda rol oynayan genlerin delesyonu veya mutasyonları otoimmün hastalıklarının oluşumunu tetiklemektedir (Watanabe ve ark., 1992).

Her iki yolağın aktivasyon mekanizmaları farklı olsada, benzer ortak yaşam (BAD) ve ölüm sinyallerinin (BID, BIM, NOXA/PUMA) olduğu görülmektedir. Bu moleküllerden bir kısmı (BAK/BAX) apoptozu pozitif olarak düzenlerken, BCL-2 (Bakshi ve ark., 1985; Wei ve ark., 2001) antiapoptotik bir rol oynamaktadır. Aslında bu iki grup proteinin hücre içi konsantrasyonları apoptozun seyrini belirlemektedir. BAD (Zha ve ark., 1996), BID (Wang ve ark., 1996), BIM (Pputhalakath ve ark., 1999) ve NOXA/PUMA (Nakano ve Vousden, 2001) gibi apoptotik proteinler değişik intrinsik ve/veya ekstrinsik faktörler tarafından aktive edilebilirler. Aktive edilen apoptotik proteinler, normalde BCL-2 (Bakshi ve ark., 1985), BCL-X<sub>L</sub> (Boise ve ark., 1993) ve MCL-1 (Kozopas ve ark., 1993) tarafından inaktif halde tutulan BAK ve BAX proteinlerini aktive ederler. İnaktivasyondan kurtulan BAX/BAK proteinleri endoplazmik retikuluma girerek kalsiyum salınmasına ve mitokondriye girerek ölüm sinyallerinin amplifikasyonuna neden olurlar. Nihayetinde, BAX ve BAK proteinlerinin mitokondride oluşturduğu deliklerden cytochrome (Cyt) c salınır ve salınan cyt c (APAF-2), APAF-1 ve caspase-9 (APAF-3) ile birleşerek apoptozomu oluştururlar (Li ve ark., 1997). Bu aşamada caspase-9 başlatıcı (initiator) kaspaz olarak görev yapar ve akabinde bir dizi efektör kaspaz enzimlerini aktive ederler.

Aktive olan efektör kaspazlar da hücrede ki değişik proteinleri parçalayarak apoptozu yol açarlar. Kaspaz aktivitesi IAP (inhibitor of apoptosis) gibi değişik proteinler tarafından kontrol edilir (Budhidarmo ve Day, 2015). Apoptozun tetiklendiği hücrelerde çekirdek koyulaşması ve DNA fragmentasyonu (DNase II, endonuclease G ve AIF gibi proteinlerce) gibi bir dizi belirgin morfolojik değişiklikler olmaktadır (Enari ve ark., 1998; Li ve ark., 2001). Bütün bu olaylar zincirinden sonra, apoptotik hücre üzerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri sayesinde bu hücreler "yenilmek" üzere tanınırlar ve fagositoz ile bertaraf edilirler.



**Şekil 1. Apoptotik mekanizmada rol oynayan ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) faktörler.** Ekstrinsik yolakta, spesifik reseptörlere ligand bağlanması sonrası DISC kompleksi oluşur ve kaspaz 8 aktif hale getirilir. İntrinsik yolakta ise mitokondriden sitokrom c salınımı apoptozom oluşumunu tetikler ve kaspaz 9 aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspaz 8 ve 9 akabinde efektör kaspazları (örneğin, kaspaz 3) aktive eder. Her iki yolak BID protein vasıtasıyla birbiriyle etkileşim halindedir (Favaloro ve ark., 2012).

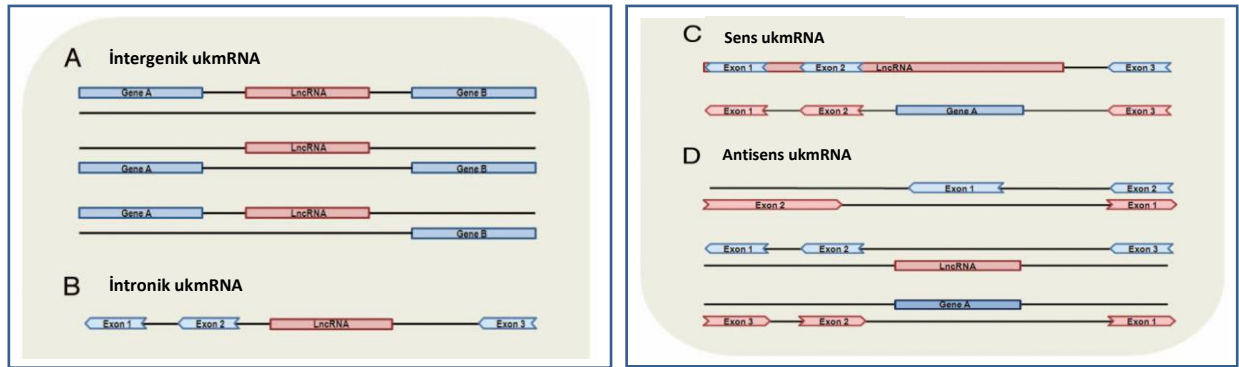
Gerek normal gelişim gerekse otoimmün ve kanser gibi değişik hastalıkların patolojilerindeki önemi dikkate alındığında, hiç şüphesiz ki apoptozun dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Yapılan biyokimyasal ve genetik çalışmalar apoptozun düzenlenmesinde bir dizi regülatör proteinin görev aldığını göstermiştir (Opforman ve ark., 2003; Hotchkiss ve ark., 2009; Budhidarmo ve Day, 2015). Proteomik analizler, apoptozun tetiklendiği bir hücrede yüzden fazla proteinin miktarında değişiklik olduğunu göstermiştir (Thiede ve Rudel, 2004). Genom projelerinin tamamlanmasına paralel olarak elde edilen transkriptom bilgileri ise genlerin (örneğin, apoptozu düzenleyen genler) sadece proteinler değil kodlamayan RNA'lar tarafından da düzenleneceğini göstermiştir (Costa, 2007; Guttman ve Rinn, 2012; Mattick ve Rinn, 2015).

## 2.2 Kodlamayan RNA'lar

Hüresel işlevler çoğunlukla proteinler tarafından yerine getirildiği için, uzun yıllar boyunca protein kodlayan genlerin tanımlanmasına öncelik verilmiş ve genomun protein kodlamayan kısmı yapısal RNA'lar dışında şifresi çözülmemiş bir gizem olarak kenarda bırakılmıştır. Genom sekanslarının tamamlanmasına müteakip özellikle tüm transkriptom verilerinin incelenmesi sonucu, genomda bulunan sekansların tamamının en azından bir hücre tipinde ve yaşamın en az bir aşamasında kullanıldığı tezi kabul görmeye başlamıştır (Birney ve ark., 2007; Gloss ve Dinger, 2015; Mattick ve Rinn, 2015). Genomun protein kodlamayan kısımlarından üretilen bu transkriptlerin yüksek ökaryot kompleksliğini algılamakta önemli katkıda bulunacağı ileri sürülmektedir (Wilusz ve ark., 2009).

Klasik anlamda kodlamayan RNA'lar (kmRNA), genomik bölgelerin transkripsiyonu sonrası RNA'ya çevrilen, çoğunlukla biyolojik olarak öneme sahip ancak proteine dönüştürülmeyen çoğunlukla lineer RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır (Costa, 2007). Bir RNA'yı kmRNA olarak sınıflandırabilmek o kadar kolay olmamakla birlikte, bu ayrımı yapmakta kullanılan en temel kriter kodlamayan genlerin 100 aminoasitten uzun bir açık okuma bölgesi (open reading frame) içermemesidir (Costa, 2007; Dinger ve ark., 2008). Bu kritere uymayan bazı uzun kmRNA'ların bulunması nedeniyle belki de en sağlıklı yöntem, ilgili RNA'dan protein üretilmediğinin deneysel olarak gösterilmesidir. Costa tarafından yapılan sınıflandırmada kmRNA'lar boyutlarına göre küçük kmRNA'lar (20-300 nt) ve uzun kmRNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır (300-10000 nt). 18-30 nt uzunluğundaki küçük kmRNA'lar (miRNA'lar, siRNA'lar ve piRNA'lar) oldukça iyi karakterize edilmiş olup özellikle transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda önemli role sahiptirler (Aravin ve ark., 2006; Ghildiyal ve ark., 2008; Jonas ve Izaurralde, 2015). Özellikle RNA-seq transkriptom çalışmaları, fonksiyonları tam olarak bilinmesede ökaryotik hücrelerde değişik fiziksel lokasyonlardan lineer uzun kmRNA sentezlendiğini göstermiştir (Mercer ve ark., 2009; Alexander ve ark., 2010; Moran ve ark., 2012). Uzun kmRNA sınıflandırmalarında transkript uzunluğu, protein kodlayan genlerle bağlantı durumu, yapısal korunma, intronik olup olmadığı, fiziksel yapısı ve protein kodlayan genlere benzerlik gibi çok değişik kriterler kullanılmıştır (Şekil 2, Laurent ve ark., 2015; Ma ve ark., 2013). Ancak en basit sınıflandırma, genomda fiziksel konumlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Bu bağlamda intergenik kmRNA'lar (Şekil 2A), adından anlaşılacağı üzere, protein kodlayan genlerden uzak bölgelerde konumlanır ve protein kodlayan genlerin enhancer bölgeleriyle etkileşebilmekle birlikte genellikle protein kodlayan genlerden bağımsız sentezlenmektedir. Bu genlerin kendi promotörleri vardır ancak komşu protein kodlayan genlerin ifadesini etkilemezler. Intronik kmRNA'lar ise tamamen protein kodlayan bir genin intronundan sentezlenir ve orjin aldığı protein kodlayan genin transkripsiyon veya kırılmasını düzenleme potansiyeline sahiptir (Şekil 2B). Ters (NATs, natural antisense transcripts) ve düz (sense) yönde olan kmRNA'lar protein kodlarla ya kısmen yada tamamen örtüşürler ve örtüşmenin bulunduğu noktaya bağlı olarak farklı mekanizmalarla gen ifadesini düzenleyebilirler (Şekil 2C,D). Örneğin kodlayan genlerin promotör bölgeleriyle örtüşme olması durumunda ilgili kodlayan genin transkripsiyonu etkilenebilmektedir. İntergenik ve NATs kmRNA'ların biyosentezleri kısmen bilinmekle birlikte intronlardan kökenlenen kodlamayan RNA'lar hakkında sınırlı literatür bilgisi mevcuttur (Gardini ve Shiekhattar, 2015). Kodlayan transkriptlerle karşılaştırıldıklarında, bazı kmRNA'ların şapka (cap) ve çoklu A kuyruğu (polyA tail) bulunurken bazıları daha farklı mekanizmalarla stabil halde korunmaktadır (Wilusz, 2015).

RNA'lar hem sekansları hem de özgül katlanma topolojileriyle iyi bir hücrel aptamer görevi yapmakta ve RNA:protein etkileşimlerinin yanında, RNA:RNA ve RNA:DNA etkileşimleriyle gen ifadesinin regülasyonunda etkin görev almaktadırlar (Dethoff ve ark., 2012). Gen regülasyonunda son 3 yıllık süredeki ilginin özellikle genom anotasyonu açısından uzun kmRNA transkriptlerinin fonksiyonel olarak karakterizasyonu yönüne doğru kaydığını görmekteyiz. Biosentezlenme yöntemlerindeki heterojenliğe paralel olarak, uzun kmRNA'ların fonksiyonlarında da bir heterojenlik vardır. Nitekim, kmRNA'ların *cis* ve *trans* formda gen regülasyonu, kromatin yapısını değiştiren proteinlerin yönlendirilmesi, X kromozom inaktivasyonu, genomik imprinting, nükleer kompartman oluşumu, çekirdekte sitoplazmaya molekül taşınması, öncül mRNA kırılması ve translasyonel kontrol gibi oldukça değişik hücrel işlevlerde görev aldıkları bilinmektedir (Yoon ve ark., 2012; Geisler ve Coller, 2013; Gardini ve Shiekhattar, 2015). Gen regülasyonu açısından kmRNA'ların transkripsiyonel regülasyondaki rolleri kısmen iyi tanımlanmıştır (Bonasio ve Shiekhattar, 2015). Eğer uzun kmRNA yakında bulunan kodlayan bir gene antisense ise veya kısmen örtüşme (overlap) var ise, transkripsiyonu fiziksel olarak engelleyebileceği gibi (RNA polimerazı meşgul ederek veya direkt DNA dizilerine eşleşerek), sentezlenen kmRNA'ya bazı proteinler bağlanarak yakınlarda bulunan RNA polimerazların aktivitesini düzenleyebilir (Martianov ve ark., 2007; Tripathi ve ark., 2010). mRNA'ya veya proteinlere bağlanan kmRNA'lar, mRNA'ların çekirdekte sitoplazmaya taşınma verimliliğini, sitoplazmada konumlanma bölgelerini veya translasyona uğrama oranlarını düzenleyerek gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada da düzenleyebilirler (Franco-Zorrilla ve ark., 2007; Geisler ve Coller, 2013). Belki de kmRNA'ların genlerin ifadesini düzenlemekte kullandıkları en ilginç yöntemlerden bir tanesi küçük kmRNA üretiminde template görevi görmeleridir. Örneğin,



**Şekil 2. Protein kodlamayan RNA'ların sınıflandırması.** (A) *İntergenik* uzun kmRNA'lar (lncRNA) protein kodlayan genler (Gene A ve Gene B) arasında her iki iplikcikten sentezlenebilirler. (B) *Intronik* protein kodlayan genlerin intronlarından sentezlenirler. (C) *Düz* (sense) kmRNA'lar protein kodlayan genlerle aynı oryantasyonda sentezlenir ve protein kodlayan genlerle kısmen yada tamamen örtüşme olmaktadır. (D) *Ters* (antisense) kmRNA'lar ise kodlayan genlere aksi istikamette sentezlenirler ve protein kodlayan genlerin intron veya ekzon sekanslarıyla kısmen veya tamamen örtüşebilirler (Ma ve ark., 2013).



aslında uzun bir transkript olan ve X kromozom inaktivasyonunda rol oynayan *Xist* ve *Tsix* kmRNA'larından üretilen küçük RNA'lar gen promotör bölgelerine ve/veya proteinlere bağlanarak transkripsiyonu düzenleyebilmektedirler (Ogawa ve ark., 2008).

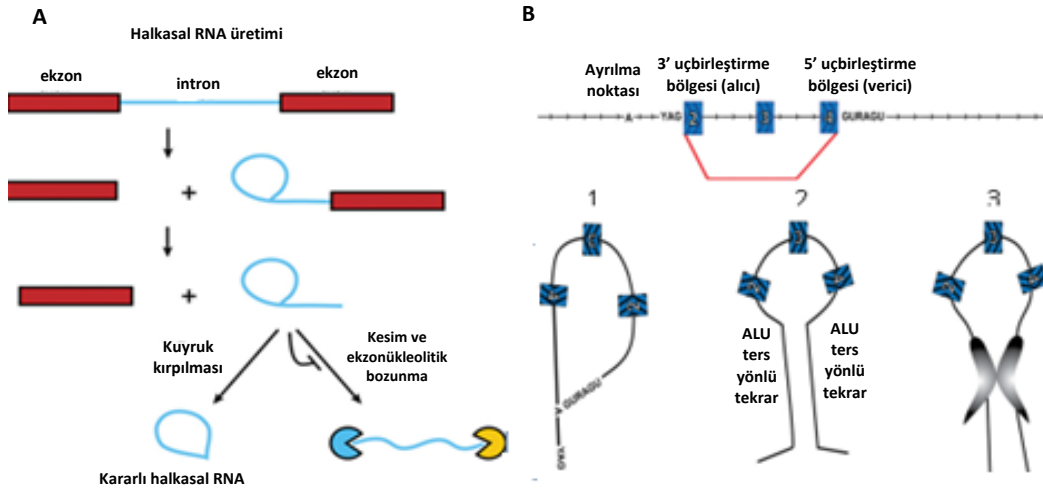
Uzun kmRNA'ların gen regülasyonundaki rolleri dikkate alındığında, gelişimde ve insan hastalıklarında anahtar görevlerde bulunmaları beklenmektedir. KmRNA'ların hücre-spesifik ifade edilmeleri ve hücrenin değişik alt kompartmanlarında bulunmaları da bu hipotezi desteklemektedir. Nitekim son 3 yılda yapılan araştırmalar, kmRNA'ların normal gelişim yanında kanser, metabolizm, obezite, nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Pauli ve ark., 2011; Harries, 2012; Gloss ve Dinger, 2015). Literatürde yapılan çalışmalar kmRNA'ların apoptozun düzenlenmesinde de rol oynayabileceğini göstermektedir. Sistemik bir yaklaşımla yapılmış bir çalışma olmasa da bireysel bazı uzun kmRNA'larla yapılan çalışmalarda özellikle hücre proliferasyonu, kanser ve DNA hasarına bağlı fenotiplerde kmRNA'ların düzenleyici görev yaptıklarına dair çalışmalar dikkati çekmektedir (Huarte ve ark., 2010; He ve ark., 2011; Khaitan ve ark., 2011). Şu anda yürütmekte olduğumuz 113Z371 No.lu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında değişik ligandlarla intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolları tetikleyerek farklı ifade edilen kodlamayan RNA'ları tanımlamaya ve fonksiyonel olarak karakterize etmeye çalışmaktayız. Bizim çalışmamızda kmRNA kütüphanesi hazırlamakta kullandığımız protokol dahil özellikle 2013'e kadar kullanılan tüm protokoller lineer kmRNA tanımlanması için optimize edilmiştir (Zhang ve ark., 2013; Lasda ve Parker, 2014). Son iki yılda yapılan çalışmalar genomdan lineer kmRNA yanında halkasal kmRNA'ların sentezlendiğini ve bu RNA'ların gen regülasyonunun düzenlenmesinde önemli görevler üstlendiğini işaret etmektedir.

### 2.3 Halkasal RNA'lar

Halkasal RNA'lar yeni keşfedilen endojen kodlamayan RNA transkriptleri olup, şapka (cap) ve poly(A) kuyruğu ihtiva eden lineer transkriptlerin aksine 5' ve 3' polariteden yoksun kovalent bağla kapanmış halkasal yapılardır (Şekil 3A, Lasda ve Parker, 2014; Ebbesen ve ark., 2015; Qu ve ark., 2015). İlk olarak bitki viroidlerinde keşfedilen bu yapılar (Sanger ve ark., 1976), daha sonra memelilerde de tespit edilmiş fakat RNA kırılması sırasında oluşan ve fonksiyonu olmayan moleküler bir artefakt olarak algılanmıştır (Cocoquerelle ve ark., 1993). INK4a/ARF transkriptinden oluşan halkasal RNA'ların ateroskleroz oluşumunda rol oynadığının rapor edilmesinden sonra bu moleküllerinde fonksiyonel olabileceği sorgulanmaya başlanmıştır (Burd ve ark., 2010). RNA sekanslama tekniklerinde kaydedilen

ilerlemelere paralel olarak geriye kırılan ekzonlardan hücre tipine özgün yüzlerce halkasal RNA üretildiği tespit edilmiştir (Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2013).

Halkasal RNA'ların günümüze kadar keşfedilememesinin en önemli nedeni, şu ana kadar kullanılan genetik, biyokimyasal ve bioinformatik tanımlama yöntem ve algoritmalarının lineer RNA yapısına göre dizayn edilmesidir (Jeck ve Sharpless, 2014). Halkasal yapılar amplifikasyon ve fragmentasyonla tanımlanamadığı gibi, 5' şapka ve 3' poly(A) kuyruğunun olmaması da poly(A)'ya bağlı zenginleştirme yada RACE (rapid amplification of cDNA ends) gerektiren RNA-seq çalışmalarında bu yapıların göz ardı edilmesine neden olmuştur. Çok daha önemlisi, kullanılan bioinformatik algoritmalarda geriye-kırılma (back-splicing) sonrası oluşan diziler filtrelenip atıldığı için, aslında fonksiyonel olan bu moleküller RNA-seq gibi güçlü genomik yaklaşım çalışmalarda da artekt olarak değerlendirilmiştir. Nitekim, şu anda yürütmekte olduğumuz 113Z371 No.lu TÜBİTAK projesi kapsamında kullanılacak RNA-seq çalışması da lineer protein kodlamayan RNA'ların belirlenmesi için optimize edildiği için, halkasal RNA'ların tanımlanmasına imkan vermemektedir. 113Z371 No.lu proje kapsamında elde ettiğimiz veriler, elde edilen RNA-seq okumalarının %98'den fazlasının lineer yapılar olduğunu göstermektedir ki bu veride lineer RNA tanımlamaya göre optimize olan protokollerin halkasal yapıları tanımlamakta oldukça yetersiz kaldığının sağlam bir göstergesidir (geriye kalan %2 ise kontaminasyon, sekans



**Şekil 3. Halkasal RNA'ların üretimi ve geriye kırılma (back-splicing) yoluyla üretilmesine katkıda bulunan faktörler.** A, Protein kodlayan bir RNA'nın çekirdekte kırılması sırasında oluşan lariatların kuyrukları kırılır ve kalan halkasal yapı uçlarında inverted tekrar olması veya bir protein bağlanması sonrası stabil bir durum kazanır. B, Geriye kırılma yöntemiyle halkasal RNA üretimine katkıda bulunan RNA özellikleri. (1) Öncül mRNA kırılması esnasında ekzon atlama (exon skipping) sürecinin bir parçası olarak oluşturulan lariat yapısı, (2) Atlanan ekzon sekanslarının kenarlarında bulunan inverted sekansların halkasal yapıya katkısı (complementarity), (3) İntron yakınlardaki sekanslara bağlanan proteinlerin halkasallaşmayı desteklemesi (Lasda ve Parker, 2014).



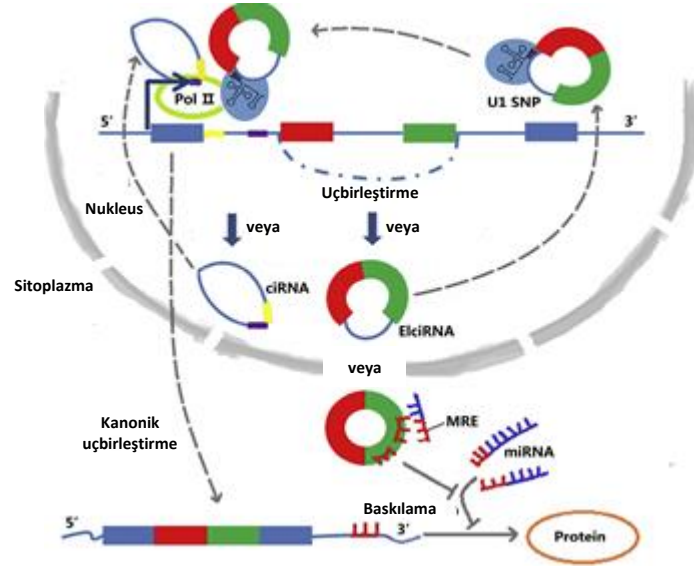


hataları veya değişik sekans kombinasyonları olabilir). Ayrıca halkasal RNA'lar hücrelerde çok düşük konsantrasyonlarda ifade edilmektedir. Örneğin, bir RNA'nın hem halkasal hem de lineer formu var ise, çoğunlukla halkasal RNA'nın lineer RNA'ya oranı %0,1 ile %10 arasında değiştiğinden zenginleştirme yapılmayan çalışmalarda identifikasyon zorlaşmaktadır (Jeck ve ark., 2013; Guo ve ark., 2014). Tüm bu gerekçelerden dolayı, halkasal RNA yapılarını tanımlamak için tavsiye edilen yaklaşım, RNAz R ile lineer RNA'ları uzaklaştırdıktan sonra karışık ekzon (scrambled exon) yapılarının varlığının RNA-seq, RT-PCR veya northern blotlama ile gösterilmesidir. Şayet RNA-seq gibi genomik bir yaklaşım kullanılacaksa, karışık ekzon (scrambled exon) yapılarını tanımlamak için özel geliştirilmiş biyoinformatik algoritmaların (örneğin MapSlide) kullanılması gerekmektedir (Salzman ve ark., 2012; Jeck ve ark., 2013).

Tüm canlıları dikkate aldığımızda kategorik olarak beş tip halkasal RNA yapılarının varlığı dikkati çekmekte ve bunların bir kısmı virüslerde ve bakterilerde bulunmaktadır (Lasda ve Parker, 2014). Ökaryotlarda ise iki tip halkasal RNA tanımlanmıştır. İlk grubu halkasal intronik RNA'lar (hiRNA) oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2013). İnsan genomunun yaklaşık %20'sine tekabül eden intron sekansları, şapka ve poly(A) kuyruğu içermeyen uzun kodlamayan ve halkasal RNA üretilmesinde template görevi yapar. Özellikle kırılma sonrası oluşan ve lineer olmayan lariat yapıları normalde debranching enzimleriyle bozularak çekirdekte parçalanır ve hücreden uzaklaştırılırlar (Rodrigues-Trelles ve ark., 2006). Ancak bir kısım intronik lariat yapıları debranching enzim aktivitesinin module edilmesi nedeniyle kararlı bir halkasal RNA olarak korunur ve çekirdekte lokalize olan bu hiRNA'lar muhtemelen orijin aldıkları kodlayan genin transkripsiyonunu düzenlerler (Zhang ve ark., 2013). Çekirdekte bulunan intronik halkasal RNA'lar yanında, öncül mRNA'ların spliceosome'lar tarafından kırılması sırasında geri kırılma (back-splicing) ürünü olarak üretilen ve sitoplazmada lokalize olan halkasal RNA'lar ise ikinci grubu oluşturmaktadır (Jeck ve ark., 2013; Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2013). İlginç bir şekilde aynı transkriptten birden fazla halkasal RNA üretilmektedir (Zhang ve ark., 2014). Şu andaki veriler, insan genomunda bulunan transkriptlerin %14'ünden fazlasından halkasal RNA üretildiğine ve halkasal RNA sayısının 25,000 civarında olduğuna işaret etmektedir (Jeck ve ark., 2013).

Halkasal RNA'ların biyogenezi ve hücre içi konumları yeni tanımlanmaya başlamıştır. Halkasal RNA'lar genellikle öncül RNA kırılması esnasında üretilmektedir (Şekil 3A). Çoğu intronik sekanslar çekirdekteki RNA parçalama mekanizmaları tarafından ortamdan uzaklaştırılırken bazı sekanslar stabil kalırlar. Bir RNA'da stabiliteyi etkileyen iki önemli özellik tespit edilmiştir (Şekil 3B). Ekzon atlamalarına bağlı oluşan lariat yapıları özellikle debranching enzim aktivitesinin azalması sonrası kararlı özelliklerle kazanırlar. Ayrıca atlanan

ekzon sekanslarının her iki tarafında *ALU* dizileri gibi halkasallaşmayı destekleyecek inverted sekanslar (Şekil 3B-2) veya protein bağlanma bölgeleri var ise (Şekil Şekil 3B-3), oluşum lariatlar daha kararlı bir özellik kazanmaktadır. Biyogenez sonrası bazı halkasal RNA'lar çekirdekte kalarak transkripsiyonu ve alternatif mRNA kırılmasını düzenleyebilirler (Şekil 4, Ashwal-Fluss ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014). Bazı halkasal RNA'ların ise sitoplazmaya taşındığı ve gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada düzenleme potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Jeck ve ark., 2013; Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2013; Guo ve ark., 2014). Sitoplazmik halkasal yapıların en iyi tanımlanmış fonksiyonları, bir sünger görevi yaparak miRNA'ların aktivilerini düzenleme potansiyelleridir (Şekil 4). miRNA bağlanma bölgesi taşıyan halkasal RNA'lar, ilgili miRNA'ları tutarak bloklamakta ve bu miRNA'ların hedef mRNA'ları düzenlemelerini önlemektedirler (Hansen ve ark., 2013). Ayrıca, halkasal RNA'lar diğer proteinlere veya moleküllere bağlanarak sitoplazmada ilgili moleküllerin ayrıştırılması, depolanması ve taşınması gibi değişik görevlerde de bulunabilme potansiyeline sahiptirler (Hentze ve Preiss, 2013). Bu alandaki en ilginç gelişmelerden bir tanesi ise, halkasal RNA'ların proteine çevrilme potansiyeline sahip olmalarıdır.



**Şekil 4. Halkasal RNA'ların önerilen moleküler fonksiyonları.** Çekirdekte bulunan bir halkasal RNA ya direkt olarak yeni sentezlenen bir transkriptte bağlanarak ya da U1 SNP vasıtasıyla RNA polimeraz II aktivitesini arttırabilir. Sitoplazmik konumlanan halkasal RNA'lar miRNA bağlanma bölgeleri içeriyorlarsa, bir sünger gibi miRNA'ları ortamdan uzaklaştırarak miRNA'ların hedeflerini baskılamalarını önlerler (Qu ve ark., 2015).

## 2.4 Halkasal RNA'lar ve apoptoz

Apoptotik yolları regüle eden moleküller dikkate alındığında bu yolların düzenlenmesinde rol oynayan bir dizi proteinler ve miRNA'ların önemli görevler üstlendikleri bilinmektedir (Hotchkiss ve ark., 2009; Subramanian ve Ster, 2010). Özellikle kanser ve DNA hasarı/proliferasiyona bağlantılı olarak bazı apoptotik yollarda lineer kodlamayan RNA'ların





rol oynadığına dair verilerde bulunmaktadır (Huarte ve ark., 2010; Khaitan ve ark., 2011; Rossi ve Antonangeli, 2014). Laboratuvarımızda 113Z371 No.lu proje kapsamında elde edilen ve yayınlanma aşamasında olan RNA-seq verileride 500'den fazla lineer uzun kodlamayan RNA'nın farklı ifade edildiğini göstermektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi, sekanslama öncesi kütüphane hazırlamakta kullanılan protokolün lineer formları sekanslamak için optimize edilmesi nedeniyle halkasal RNA'ların tanımlanması mümkün olmamıştır (verilerin %98'den fazlası lineer sekansları uyumuş, geri kalanın bir kısmı HeLa'da bulunan papilloma virus genomuna ait bir kısmı ise sekans hatalarıdır; dolayısıyla beklendiği üzere halkasal RNA'lar tespit edilememiştir).

Literatürde mevcut bilgiler incelendiğinde, proje önerisi yapıldığı an itibarıyla apoptozu düzenlediği rapor edilen halkasal RNA'lar henüz rapor edilmemişti. Ancak, geçen üç sene içerisinde, sistematik bir tarama olmaksızın bazı halkasal RNA'lar apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Holdt ve ark., 2016; Nan ve ark., 2016; Dang ve ark., 2017; Mehta ve ark., 2017). Apoptoz ile ilişkili ilk genom kapsamlı transkriptomiks çalışma, mevcut proje kapsamında elde edilen veriler ışığında grubumuz tarafından yayımlanmıştır (Yaylak ve ark., 2019). Moleküler manipülasyonlarının oldukça kolay olması nedeniyle HeLa hücrelerinin model olarak kullanıldığı bu projede, dört farklı ligand ile apoptozun tetiklenmesi sonrası genom kapsamlı transkriptomiks tarama yapılmış ve bazı adayların ifadesi qPCR ile doğrulanmıştır. Biyoinformatik analizler ile aday halkasal RNA'ların sünger benzeri işlev göstererek miRNA'ları düzenleme ve proteine çevrilme potansiyelleri irdelenmiştir. Ayrıca, polizom ve gen susturma yöntemleri kullanılarak bazı işlevsel veriler toplanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Memeli Hücrelerinin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması

Daha önce DSMZ GmbH'dan temin edilen ve hali hazırda laboratuvarımızda var olan HeLa, Jurkat ve MCF-7 hücreleri RPMI 1640 (L-Glutamin ilaveli, Gibco) besiyerinde nemli ortamda 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C inkubatorde büyütülmüştür. Besiyerine 10% inaktif fetal bovin serum (FBS) (Gibco) ve 1% penisilin-streptomisin (Gibco) takviye edilmiştir. HeLa hücreleri her iki günde 1/3 veya 1/4 (2.0 – 2.5 x 10<sup>6</sup> hücre) oranında ekilmiş ve kullanım gerektirdiği durumlarda Trypsin-EDTA (Gibco, 0.25%) ile kaldırılmıştır.

Hücreler, laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan prodesürler takip edilerek altı kuyucuklu plaklarda apoptoza uğratılmıştır (Yaylak ve ark., 2019). Kısaca,  $0,3 \times 10^6$  adet HeLa hücresi kuyucuklarda 1 gün büyütüldükten sonra apoptozu tetikleyen ajanlarla muamele edilerek zaman ve doz kinetik analizleri yapılmıştır. Her bir muamele en az 3 defa tekrarlanarak Student's T test analizine tabi tutulmuştur. DMSO içerisinde 83,2 mM stok olarak hazırlanan sisplatin (SantaCruz), kimyasal kararsızlığı nedeniyle her kullanımda taze olarak hazırlanmıştır. 2-320 uM doz ve 4-24 saatlik zaman aralığı test edilmiştir. Dnaz ve RNAz içermeyen suda çözünen ve 5 mM stok halinde hazırlanan doksorubisin solüsyonları - 20 °C'de saklanmıştır. Apoptozu tetiklemek için 0,0625-32 uM doz ve 4-24 saat zaman aralığı kullanılmıştır. TNF-alfa ligandı tek başına HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemek için yeterli olmadığı için sikloheksimid ile birlikte kullanılmıştır. Sikloheksimid toksisitesi 5-80 ug/mL doz ve 4-24 saat aralıklarında test edildikten sonra TNF-alfa ile apoptozu tetiklemek için 1-125 ng/mL doz aralığı kullanılmıştır. Benzer zaman aralıkları kullanılarak 0,125-2 ug/mL dozlarında Fas antikoru ile apoptoz tetiklenmesi sağlanmıştır.

### 3.2 Apoptozun Akış Sitometresi ve Hücre Sayım Cihazı İle Belirlenmesi

Değişik doz ve zaman aralıklarında ligandlar ile muamele edilen hücrelerde meydana gelen apoptotik değişimler primer olarak akış sitometresinde incelenmiştir (Merck Muse veya BD FACS). Erken apoptotik evredeki hücreler Anneksin V (BD), geç apoptotik evredeki hücreler ve ölü hücreler ise 7AAD (BD) ile boyanarak karakterize edilmiştir. Boyama için Anneksin V PBS ile 1:5, 7AAD ise PBS ile 1:10 oranında dilue edilmiştir. Boyanacak hücreler Tripsin ile kaldırıldıktan sonra PBS ile iki defa yıkanıp yeteri miktarda (200-300 µl, en az 50 µl) Anneksin bağlama tamponunda çözülüp 50 µl boyama için eppendorfa aktarılmıştır. Hücreleri içeren eppendorflara her bir boyadan uygun dilüsyonda ki boyadan 5 µl eklenip 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben numunelere 200 µl PBS daha eklenip analiz akış sitometresinde okuma işlemine geçilmiştir. Analiz sonucunda sadece Anneksin V pozitif hücreler erken apoptoz evresinde; her iki boyanın pozitif olduğu hücreler geç apoptoz evresinde; sadece 7AAD pozitif olan hücreler ölü/ölmekte olan hücreler; her iki boyanın negatif olduğu populasyon ise canlı hücreler olarak kabul edilmiştir.

Apoptozun ve floresan boyamanın doğrulanması için Floresan Mikroskopu kullanılmıştır. Akış Sitometresi analizinde kullanılan boyama prosedürüyle hazırlanan örneklerden 10 ul hücre-boya karışımı lamele yayılıp lamel ile kapatıldıktan sonra Olympus IX70 (Filtre 2 7AAD için ve Filtre 4 Anneksin V için) Floresan Mikroskopu ile analiz edilmiştir. Gerekli olduğu durumlarda sadece tripan mavisini ile geç apoptotik evredeki hücreleri belirlemek için hücre sayım cihazı kullanılmıştır. Tripsinle kaldırılmış hücreler 5 dk satrifüj



(800 RPM) sonrasında 1 ml PBS ile yıkanıp tekrar santrifüj yapılmıştır. Üst fazı atılıp hücreler yeteri miktarda PBS ile seyreltilip 10 µl numune eşit miktarda tripan mavisini (1:1 dilüsyon, Invitrogen) ile karıştırılmıştır. Karışımdan 10 µl Countess Slide Chamber'lara yerleştirildikten sonra Countess (Invitrogen) hücre sayımı cihazı ile ölü-diri hücrelerin oranı (yüzde olarak) belirlenmiştir. Tripan mavisine içine almış hücreler ölü veya ölmekte olan hücreler kabul edilmiştir.

### 3.3 Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri

Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra soğuk PBS ile iki defa yıkanmıştır. PBS ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra derin sekans analizinde kullanılacak hücrelere RNAlater solüsyonu eklenerek kuru buz içerisinde gönderi yapılmıştır. Diğer deneylerde kullanılan toplam RNA'lar TRIzol (Life Technologies) ile izole edilmiştir. Üzerlerine 1 mL TRIzol eklenen hücreler vortekslendikten sonra, her bir mL TRIzol için 0,2 mL RNaz içermeyen kloroform (Sigma) ilavesi yapılmıştır. Numuneler 15 saniye elde çalkalanmış ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 12.000 xg'de 15 dk santrifüjasyon sonrası üst sıvı yeni bir tüpe aktarılmış ve RNA'lar 0,5 mL izopropanol ile çöktürülmüştür. Etanol ile yıkanan pelet hava ile 5-10 dk kurutulduktan sonra DNaz ve RNaz içermeyen suda çözüldükten sonra daha sonraki kullanıma kadar -80 °C'de saklanmıştır.

RNA kalite kontrol analizleri için öncelikle NanoDrop (Thermo Scientific) ile spektrofotometrik analiz yapılmıştır.  $A_{260/280}$  ve  $A_{260/230}$  değerleri sırasıyla protein ve alkol kontaminasyonlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu oranların sırasıyla yaklaşık 2 ve 2,0-2,2 arasında olmasına özen gösterilmiştir. Gerekmesi durumunda RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görsel kalite kontrolüne tabi tutulmuştur (smear olmaması ve 18/28S rRNA bantlarının keskinliği). Derin sekans analizinde kullanılacak RNA'lar hizmet alımı yapılan firma tarafından Bioanalyzer ile daha detaylı kalite kontrol analizine tabi tutulmuştur. Bu analizlerde RIN (RNA Integrity Number) sayıları 7-10 aralığında olan RNA örnekleri derin sekans analizinde kullanılmıştır.

### 3.4 Derin Sekans Analizleri

Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen halkasal RNA'ları belirlemek için sisplatin, doksorubisin, TNF-alfa ve Anti-Fas ligandlarıyla muamele edilen HeLa hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lar derin sekans analizine tabi tutulmuştur. Hiçbir ligand ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir numune üç tekrarlı hazırlandığından toplam 15 numune derin sekans için Hong Kong'da bulunan Novogene firmasına



gönderilmiştir (Illumina HiSeqTM2500). RNA-seq çalışması için, daha önceden halkasal RNA'lar için optimize edilmiş bir protokol takip edilmiştir (Szabo ve Salzman, 2016).

### 3.5 Biyoinformatik Analizler

Bilinen ve yeni halkasal RNA'ların tanımlanması için CIRCexplorer programı kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2014). Bu programda, genome eşleşmeyen ve potansiyel halkasal RNA olduğu varsayılan sekanslarda, tophat kullanılarak geri-kırılmalar (back-splicing) taranmaktadır. Herbir örnekteki normalize halkasal RNA ifadesini belirlemek için, Deseq2'nin 1.6.3 versiyonu kullanılarak "milyonda bir transkript" (TPM, transcript per million) hesaplaması yapılmıştır (Love ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2010). İstatistiksel olarak anlamlı transkriptleri belirlemek için  $p_{adj} < 0,05$  değeri baz alınmıştır.  $\log_2$  oranları baz alınarak K-means ve SOM (self-organizing maps) kümeleri yapılmıştır. Halkasal RNA'ların translasyon potansiyellerini irdellemek için CirclInteractome, Ensembl, NCBI ORF finder ve SRAMP programlarından yararlanılmıştır. Potansiyel miRNA:halkasal RNA etkileşimlerini irdellemek için StarBase kullanılmıştır.

### 3.6 Real Time PCR Analizleri ve Halkasal RNA'ların Klonlanarak Doğrulanması

Belirlenmiş halkasal RNA adayları için geri birleşim dizisini doğrulamak adına ıraksak primerler dizayn edilmiştir. 3  $\mu\text{g}$  sisplatin ile muamele edilmiş RNA ve DMSO kontrol RNA'dan cDNA yapılmıştır (First strand cDNA sentez kiti, Thermo Scientific). Bu amaçla üçer mikrogram RNA örneklerine 2  $\mu\text{l}$  dNTP karışımı 1  $\mu\text{l}$  random primer 1  $\mu\text{l}$  revers transkriptaz, 4  $\mu\text{l}$  5x buffer eklenmiş ve sırasıyla 1 saat 42 °C'de ve akabinde 5 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım 1:1 oranında seyreltilmiştir ve final karışımdan her bir real time PCR reaksiyonu için 1  $\mu\text{l}$  kullanılmıştır. 1  $\mu\text{l}$  cDNA ya 12,5  $\mu\text{l}$  Go Taq qPCR Master Mix (2X), 1  $\mu\text{l}$  25mM ıraksak primer karışımı ve 10,5  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O karıştırılıp uygun plakalara eklenmiştir. Kısa santrifüj sonrasında plaka LightCycler 480 (Roche) ekipmanına yerleştirilip analiz edilmiştir. Cihaz programı: 1 cycle 2 dk 95 °C, 40 cycle 15 sn 95 °C ve 1 dk 60 °C, ve 1 cycle 10 dk erime eğrisi olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir reaksiyon 3 replika şeklinde hazırlanmış, kalıp bulunmayan örnek negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Veriler GAPDH'e göre normalize edildikten sonra student's T test ile istatistiki analize tabi tutulmuştur.

Geri birleşim dizilerinin klonlama ile doğrulanması için 1  $\mu\text{l}$  cDNA, 1  $\mu\text{l}$  ıraksak primer mix, 2,5  $\mu\text{l}$  DreamTaq buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  dNTP mix, 0,125 U DreamTaq Polymerase'e 20,37  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. PCR cihaz programı: 1 cycle 3 dk 95 °C, 35 cycle: 30 sn 95 °C, 30 sn 60 °C ve 1 dk 72 °C; adenilasyon için 1 cycle 30 dk 72 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Jelden

kesilip temizlenen PCR ürünleri pCR® II vektöre yerleştirilmiştir (TA Cloning® Kit with pCR® II Vector, Thermo Scientific). Hazırlanan vektörler kimyasal kompetent DH5 $\alpha$  hücrelerine transforme edilmiş ve mavi-beyaz seçim için IPTC- X-gal ile muamele edilmiş LB agar plakalara ekilmiştir. Beyaz koloniler sıvı LB kültüründe büyütülmüş, plazmid izolasyonu yapılmış (Nucleospin Plazmid Miniprep Kit, MN) ve geri birleşim dizisinin uzunluğu restriksiyon endonükleaz enzimi *EcoRI* (Takara) ile kesilerek ve ayrıca Sanger dizileme yöntemiyle sekanslanmış (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomer) doğrulanmıştır.

Tablo 1. qPCR ve klonlamada kullanılan primerler. a, yakınsak (convergent) primerler; b, qPCR iraksak (divergent) primerleri; c, klonlamada kullanılan iraksak primerler.

	İleri primer	Geri primer
<b>hsa_circ_0012992</b>	AGGCTTGGATCTTCAGCCATT	AGGTGGATGCACAAAATCTCAG
<b>circ-HIPK3</b>	TATGTTGGTGGATCCTGTTCCGGCA	TGGTGGGTAGACCAAGACTTGTGA
<b>Beta-actin<sup>a</sup></b>	CTGGGACGACATGGAGAAAA	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC
<b>hsa_circ_0014824</b>	ATCACAGGACCCAAACCTCTG	CTTGCGCTCTGGTGCAGAAT
<b>hsa_circ_0029693<sup>b</sup></b>	TGCTAATGAATCGGGCACCT	TCTTTCCCTCCATTTTTGTAGTTCC
<b>hsa_circ_0029693<sup>c</sup></b>	AAGCCTTGAGGGAAATCAGA	TGGCCTCATTGTTAGTCCAG
<b>GAPDH<sup>c</sup></b>	ACTCCTCCACCTTTGACGC	GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC

### 3.7 Western Blotlama

Toplam protein izolasyonu için 1XRIPA tamponu (Cell Signalling) kullanılmıştır. Tripsin ile kaldırılmış hücreler 2 defa soğuk 1XPBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine RIPA (50  $\mu$ l/10<sup>6</sup>hücre) ve 100X proteaz inhibitör kokteyl (SantaCruz) (1X olacak şekilde) eklenip örnekler 1'er dakika vortekslenmiş ve 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. İşlem sonrasında oluşan süspansiyon 15 dk 4°C'de 14.000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant 2 veya üçe bölünüp kullanıma kadar -20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Protein konsantrasyonu Bradford Assay ile belirlenmiştir.

Protein örnekleri 4X protein yükleme boyası (%40 gliserol, 240 mM Tris/HCl pH 6,8, %8 SDS, %0,04 bromofenol mavisi, %5 beta-merkaptotanol) ile uygun oranda karıştırılıp 5 dk 95°C'de kaynatılmıştır. Sonrasında örnekler %5 üst/%15 alt SDS jelde [dH<sub>2</sub>O, tampon çözelti: %30 Akrilamid (Sigma), %10 SDS (Applichem), TEMED (Sigma), %10 APS (Applichem)] 2 saat 100 V'da yürütücü tamponla [25 mM Tris, 192 mM Glisin, %1 SDS (a/h)] yürütülmüştür. Her defasında iki jel hazırlanarak jellerden bir tanesi Coomassie mavisi solüsyonu [1 mg/ml Coomassie Mavisi (Sigma), %10 asetik asit (h/h), %30 metanol (h/h)] ile boyanarak protein bantları görsel olarak incelenmiştir. Diğer jel ise Whatman ve PVDF

membran (Millipore) arasında 'sandviç' yapıp bir gece transfer tamponunda [25 mM Tris, 190 mM glisin ve %20 metanol (h/h)] 30 V uygulanarak proteinlerin membrana geçişi sağlanmıştır. Transfer işleminin kontrolü için membran Ponceau S [%0,1 (a/h) Ponceau S içeren %5 (h/h) asetik asit] boyası ile 20 dk inkübe edildikten sonra 3 kez 5'er dakika %0,05 (h/h) Tween20 içerikli 1XTBS [50 mM Tris Baz, pH 7,6 ve 150 mM NaCl] tamponunda yıkanarak proteinlerin transfer verimliliği incelenmiştir. Daha sonra filtreler membran bloklama tamponu (1X TBS, %0,05 Tween20, %0,5 yağsız kuru süt tozu) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanmıştır. Uygun primer antikor, optimize edilen oranda %0,5 süt/%0,05 Tween20/1X TBS içerisinde seyreltilerek membran ile gece boyu (16 saat) +4°C'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Membranlar inkübasyon bitiminde 5 dakika aralıklarla 5 defa 1X TBS-Tween20 tamponu ile yıkanmıştır. Uygun konakçı formatındaki HRP-konjuge sekonder antikorla bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilen membran, sonrasında tekrar 1X TBS-Tween20 tamponu ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Görüntüleme için kemilüminesan olarak Luminata Forte (Millipore) kullanılmıştır. Membran üzerine 750 µl kemilüminesan eklenip 2 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra Fusion SL (Vilber Lourmat) cihazı ile görüntü alınmıştır.

### 3.8 Halkasal RNA susturulması

Transfeksiyon işleminden bir gün önce HeLa hücreleri (80.000 hücre/kuyucuk) 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Transfeksiyon zamanında besiyeri değiştirilerek serum ilaveli besi yeri ile hücreler transfeksiyona hazır hale getirilmiştir. Transfeksiyon reaktifi (FuGENE HD) ile aday circRNA'ların susturulmasında kullanılacak siRNA'ların (Dharmacon) hibridizasyonu serum ilavesiz besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hacmi toplam olarak 150 µl/kuyucuk olarak ayarlanmıştır. İlk önce oda sıcaklığındaki 144,7 µl besiyeri bir eppendorf tüpe eklendikten sonra üzerine 0,8 µl siRNA (40 nM) eklenip çok kısa vortekslenmiştir. Besiyeri-siRNA karışımının üzerine oda sıcaklığına getirilip vortekslenmiş 4,5 µl transfeksiyon reaktifi eklenip kısa bir süre vortekslenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Besiyeri-siRNA-Transfeksiyon reaktifi karışımı inkübasyon sonunda kuyucuğa damlatma yöntemiyle eklenip her tarafa eşit dağılımını sağlamak için çok kısa sekiz yazar gibi karıştırılmıştır. Transfeksiyon işleminin tamamlanmasına müteakip plakalar inkübatörde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>, nemli) 48 saat bekletilmiştir.



### 3.9 Polizom profili

Polizom analizleri daha önce rapor edilen protokollere göre yapılmıştır (Tu ve Akgül, 2005). Kısaca, 100mM NaCl<sub>2</sub> (Applichem), 10mM MgCl<sub>2</sub> (Applichem), 30mM Tris-HCl (pH 7, Applichem) ve 10U/ml Superase RNase inhibitor (Ambion) içeren %5 ve %70'lik sükröz çözeltileri hazırlanmıştır. Programlanabilir Dansite Gradient Sistemi (ISCO) ile hazırlanan çözeltilerden oluşturulan gradientler +4°C'de bir gece bekletilmiştir.

HeLa hücreleri, %10 FBS, 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içerikli RPMI besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C ortamında çoğaltılmıştır. Sisplatin ve DMSO kontrol gruplarının oluşturulması için 5 adet 100 mm çapındaki hücre kültürü plakasına, plaka başına 2\*10<sup>6</sup> hücre denk gelecek şekilde ekim yapılmış ve gece boyu yüzeye tutunan hücrelere, son konsantrasyonu 80 µM olacak şekilde sisplatin eklenmiştir. Kontrol grubunu oluşturan hücrelere ise %0,1 oranında DMSO eklenmiştir. 16 saatlik inkübasyon (%5 CO<sub>2</sub>, 37°C ve nemli koşullarda) sonunda hücre gruplarına, ribozom kaybı görülmemesi için, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak hacimde sikloheksimid uygulaması yapılarak hücreler 10 dakika boyunca %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Sonrasında besiyerleri toplanan hücreler, 10 µg/ml sikloheksimid içerikli soğutulmuş RNase-DNase free 1XPBS ile yıkanmış ve tripsin-EDTA ile yüzeyden toplanmıştır. Hücre gruplarından 10'ar µl örnek alınarak Annexin V PE ve 7AAD ile boyanmış ve Muse hücre analiz sisteminde apoptoz yüzdeleri belirlenmiştir.

Ölçümü yapılan hücreler, kendi içlerinde de iki gruba ayrılarak iki farklı lizat oluşturma yöntemi uygulanmıştır. 4 grup hücrenin üzerine 1'er ml olmak üzere 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl (pH 7), 30 U/ml SUPERase-in RNase inhibitor, %1 Triton-X 100, %1 sodyum deoksikolat (NaDOC), 100 µg/ml sikloheksimid içerikli liziz tamponu eklenmiştir. Bir grup tampon içinde 15 saniye vortekslenirken, diğer grup 15 kez 26G'lik insülin şırıngasından geçirilmiştir. Her iki grup da işlemler sonrasında 8 dakika buzda bekletildi ve inkübasyon sonunda 12.000 rpm'de +4°C'de 8 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar, önceden oluşturulan gradientlerin üzerine pipetle eklendi ve ultrasantrifüjde (Beckman Coulter Optima L-XP) Beckman SW28 rotor ile 27.000 rpm'de +4°C'de 2 saat 55 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında örnekler, dansite gradient fraksiyonlama (ISCO) sistemi ile 254nm absorbansta ölçülmüş ve fraksiyonlar, her tüpe 30 damla örnek gelecek şekilde mikrosantrifüj tüplerine toplanmıştır. A254 te oluşan grafiğe göre örnekler nonpolizom (mRNP, 40S, 60S ve 80S) ve polizom olmak üzere 2 grupta toplanmıştır. Fraksiyonlar 150 mM NaCl<sub>2</sub> ve %0,5 SDS içerecek şekilde ayarlandıktan sonra oluşan hacme eşit miktarda fenol/kloroform/izoamilalkol 25:24:1 (pH 4.5, Applichem) eklenip 1 dk vortekslenmiştir. 3.000 rpm ve 24°C koşullarında 5 dk yapılan santrifüjden sonra hafif

olan ve RNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol 25:24:1 (pH 4.5) eklenip bir önceki basamakta belirtilen koşullarda santrifüj edilmiştir. Üst faza eşit hacimde kloroform eklenip aynı koşullarda ekstrakte edildikten sonra 3M NaOAC (ph: 7) ve 2 kat hacimde, soğutulmuş %100 etanol eklenip, gece boyu -20°C'de inkübasyona bırakılmıştır. RNA'lar 30ml poliallomer tüplerde Beckman SW28 rotor kullanılarak 12.000 g ve 4°C koşullarında 20dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Son aşamada %70'lik etanol yıkamasından sonra etanolü kuruyan örnekler 50µl DEPC'li su içinde çözülmüştür.

## 4. BULGULAR

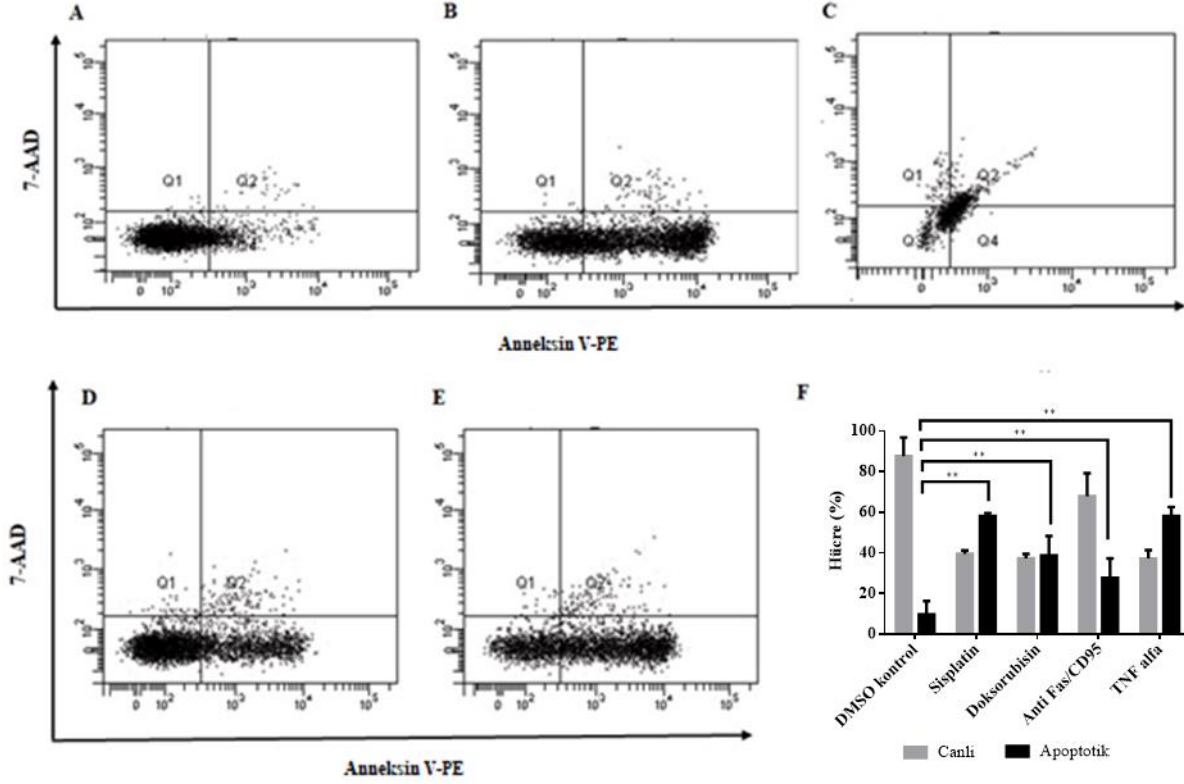
### 4.1 HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi

Proje önerisinde belirtildiği üzere, insan hücrelerinde apoptozu tetiklemek için HeLa hücreleri model olarak seçilmiştir. Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana yolak ile tetiklenebileceğinden, her iki yolağı tetiklemek için iki ayrı ajan seçilmiştir: Intrinsik (içsel) yolağı tetiklemek için sisplatin ve doksorubisin ajanları; ekstrinsik (dışsal) yolağı tetiklemek için anti-fas ve TNF-alfa ligandının kullanılması önerilmiştir.

#### 4.1.1 HeLa Hücrelerinde Apoptozun Akım Sitometresiyle Analizi

Gerek intrinsik gerekse ekstrinsik yolakları tetiklemek için kullanılan ligand muameleleri sonrası, hücre membranında yer alan Anneksin V eksternalizasyonu akım sitometresi ile ölçülerek erken evredeki apoptotik hücrelerin oranları belirlenmiştir. Yapılan doz kinetik çalışmaları sonucunda, sisplatin için 80 µM/16 saat; doksorubisin için 0,5 µM/4 saat; anti-Fas mAb için 0,5 µg/mL/16 saat ve TNF-alfa için 125 ng/mL/8 saat en uygun dozlar olarak belirlenmiştir. HeLa hücrelerinde TNF-alfa tek başına apoptozu tetiklemek için yeterli olmadığı için 10 µg/mL sikloheksimid ile kombinasyon halinde uygulanmıştır (Fraisse ve ark., 1998). %0,1 DMSO ile muamele edilen hücreler kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır. Bu şartlar altında yapılan ligand muameleleri sonucu, hücrelerde %27-58 arasında değişen apoptoz oranları belirlenmiştir (Şekil 5). Sisplatin ve TNF-alfa yaklaşık %58 oranında



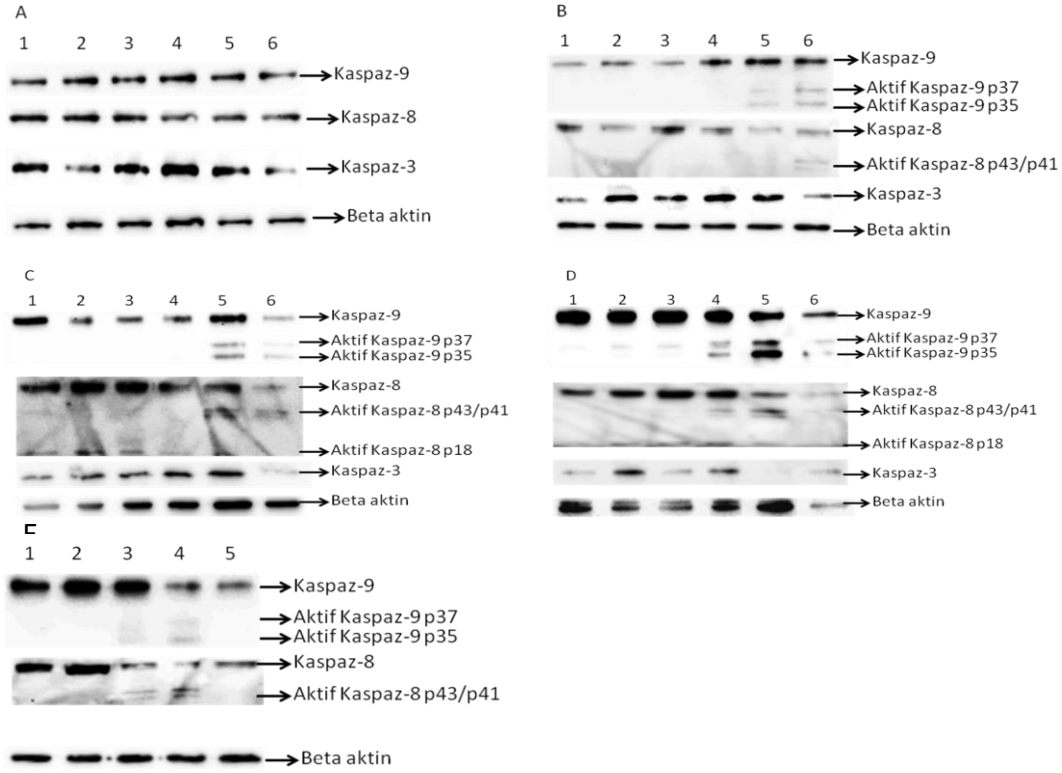


**Şekil 5. Apoptotik HeLa hücrelerinin akış sitometri analizi.** HeLa hücreler, A. %0,1 DMSO (kontrol grubu) ile 16 saat B. Sisplatin (80 µM) ile 16 saat, C. Dokсорubisin ile (0.5 µM) 4 saat, D. Anti-Fas mAb (0.5 µg/ml) ile 16 saat ve E. TNF-α (125 ng/ml) ile 8 saat inkübe edilmişlerdir. Annexin V ve 7-AAD ile boyama sonrası akış sitometrik analizler yapılmıştır. F. Apoptoz yüzde grafiği. Tüm deneyler 3 replika halinde gerçekleştirilmiştir. p<0.005.

apoptoza yol açarken, bu oran anti-Fas mAb ile muamele edilen hücrelerde maksimum %27 olmuştur. HeLa hücreleri Fas reseptörü ile apoptotik yolların tetiklenmesine karşı desensitize olduğu için (Holmstrom ve ark., 1999), mevcut koşullar optimum koşul olarak kabul edilerek RNA izolasyonuna karar verilmiştir.

#### 4.1.2 Apoptotik Yolların Tetiklenmesinin Western Blotlamayla Analizi

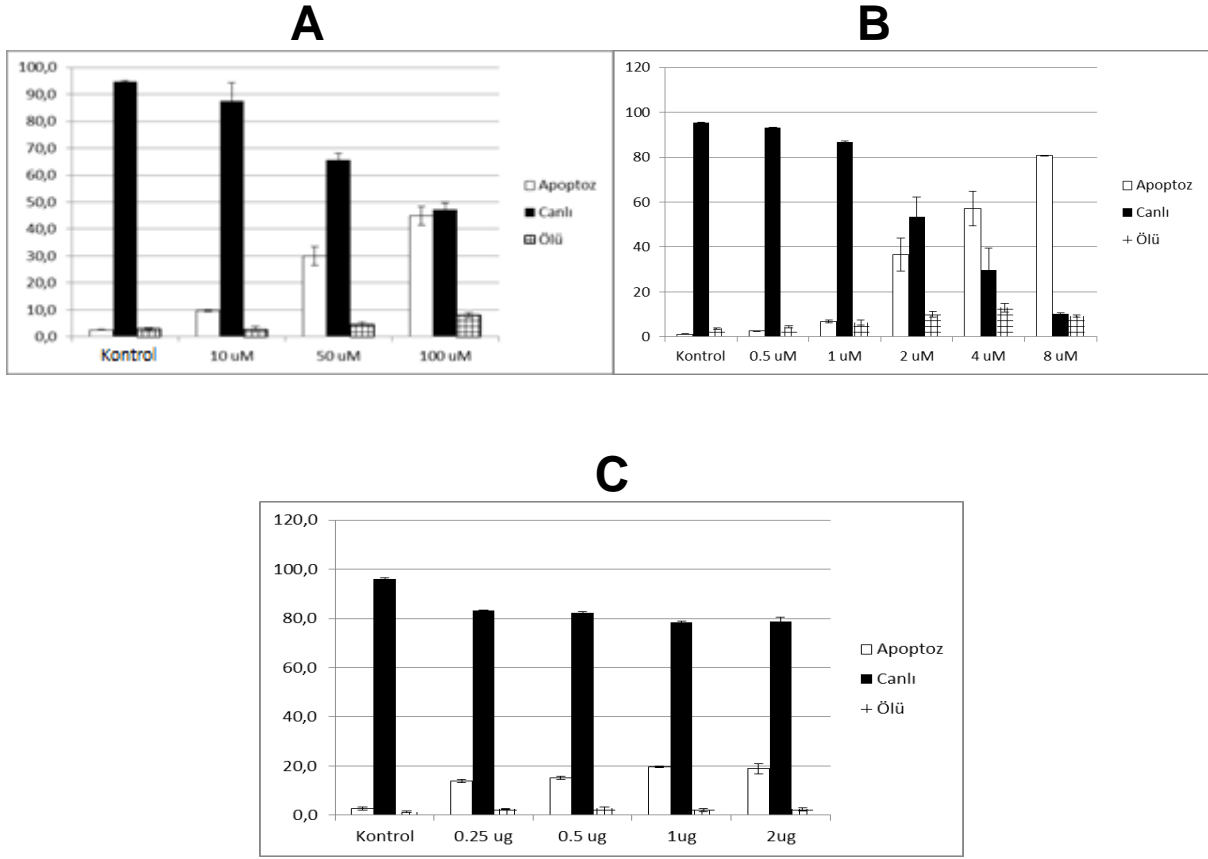
Her bir ajanla muamele sonrası gerekli yolların tetiklendiğinin anlaşılması için apoptozun tetiklendiğinin önemli göstergelerinden olan kaspaz-8, ve -9 aktivasyonuna bakılmıştır. Kaspaz aktivasyonu oldukça dinamik bir süreç olduğu için, özellikle sisplatin ile muamele edilen hücrelerde zaman kinetiği çalışmaları yapılmıştır (Şekil 6A-D). Bu sonuçlara göre, HeLa hücrelerinin 16 saat sisplatin ile muamele edilmeleri kaspaz 8 ve 9 aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 6D, sıra 4). Ayrıca diğer kimyasallar ile muamele de proje kapsamında uygulanan koşullarda kaspaz aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 6E).



**Şekil 6. HeLa hücrelerinde apoptozun tetiklenmesi sonrası kaspaz aktivasyonu.** 1 milyon HeLa hücresi değişik doz ve zamanlarda sisplatin (A-D) veya doksorubisin, anti-Fas ve TNF-alfa (E) ile muamele edilerek apoptoza uğratılmış ve RIPA solüsyonuyla protein ekstraktı elde edilmiştir. 50 ug ekstrakt %10'luk SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3 antikoruyla inkübe edilmiştir. GAPDH protein yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kaspazların inaktif ve aktif formları belirtilmiştir. Panel A-D, Sırasıyla 4, 8, 12 ve 16 saat inkübasyon; Kuyucuklar 1-6 (Panel A-D), sırasıyla, sadece hücre kontrol, DMSO kontrol, 40, 80, 160 ve 320 uM sislptatin uygulanan örnekler; Kuyucuklar 1-5 (Panel E), sırasıyla, sadece hücre, DMSO kontrol, doksorubisin, anti-Fas ve TNF-alfa uygulanan örnekler.

#### 4.1.3 Jurkat ve MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Yolakların Tetiklenmesi

Farklı ifade edilen halkasal RNA'ların hücre-spesifik bir ifadeye tabi olup olmadıklarını araştırmak için adayların ifadelerinin, HeLa hücreleri yanında Jurkat ve MCF-7 hücre hatlarında da incelenmesi planlanmıştır. Bu hücre hatlarında da HeLa hücrelerine benzer bir doz kinetiği gözlenmiştir. Örneğin, Jurkat hücrelerinde 100  $\mu$ M sislptatin 16 saat sonunda %44,9 apoptoza yol açmıştır (Şekil 7A). Dört saatlik doksorubisin muamelesi 4  $\mu$ M konsantrasyonda %57 oranında apoptoza yol açarken (Şekil 7B) anti-Fas uygulaması 1  $\mu$ M konsantrasyonda %19,6 oranında apoptoza neden olmuştur (Şekil 7C). MCF7 hücrelerinde de benzer bir doz-zaman kinetiği gözlenmiştir.



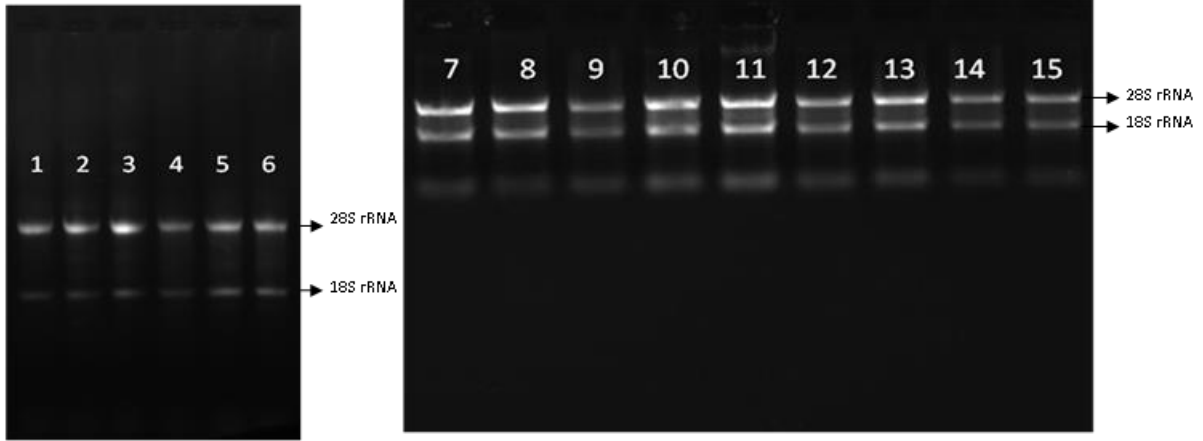
**Şekil 7. Jurkat hücrelerinde sisplatin, dokсорubisin ve anti-Fas ile apoptozun tetiklenmesi.**  $0,5 \times 10^6$  Jurkat hücresi ilaç muamelesinden 24 saat önce altı kuyucuklu flasklara ekilmiştir. Ertesi gün değişik konsantrasyonlarda sisplatin (Panel A, 16 saat), dokсорubisin (Panel B, 4 saat) ve anti-Fas antikoruyla (Panel C, 16 saat) muamele edilmişlerdir. Akım sitometresi kullanılarak fenotipe dayalı apoptotik, canlı ve ölü hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Her bir deney en az 3 kez tekrarlanmış ve Student's t test analizine tabi tutulmuştur.

#### 4.2 Derin Sekanslama ile Farklı İfade Edilen Halkasal RNA'ların Belirlenmesi

Apoptozun regülasyonunda rol oynayan halkasal RNA'ları belirlemek için daha kapsamlı olması bakımından derin sekans analizi kullanılmıştır. Bu bağlamda öncelikle HeLa hücreleri 4.1'de ifade edilen doz ve zaman aralığında 4 farklı ligand ile muamele edilmiştir. Böylece apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan halkasal RNA'ların farklı ifadeleri sağlanmıştır. Buna müteakip ilgili hücrelerden RNA izole edilip derin sekans analizi yapılmıştır. Hiçbir ligand ile muamele edilmeyen hücrelerde tespit edilen halkasal RNA ifade miktarı baz alınarak ifadelerinde farklılık olan aday ukmRNA'lar dokümanete edilmiştir.

#### 4.2.1 RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri

Kontrol ve ligandlarla muamele sonrası TRIzol yöntemi kullanılarak 15 numuneden toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir muameleden üçer replika hazırlanmıştır. İzole



**Şekil 8. Apoptozun tetiklendiği HeLa hücrelerinden RNA İzolasyonu.** Beşer milyon HeLa hücresi DMSO kontrol (1-3), 80  $\mu$ M sisplatin (4-6), 0,5  $\mu$ M doksorubisin (7-9), 0,125 ng/mL TNF-alfa (10-12) ve 0,5  $\mu$ g/mL anti-Fas ile muamele edildikten sonra TRIzol ile toplam RNA izole edilmiş ve 500 ng RNA %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

edilen RNA'lar üç tur RNA kalite kontrol analizine tabi tutulmuştur. Birinci aşamada NanoDrop ile spektrofotometrik olarak konsantrasyon,  $A_{260/280}$  ve  $A_{260/230}$  oranları belirlenmiştir. Bu oranları 1,8-2,1 arasında olan örnekler ikinci aşamada %1 agaroz jelde yürütülerek görsel kalite kontrolüne tabi tutulmuştur. Şekil 8'de görüldüğü üzere 18S ve 28S rRNA bantlarının keskinliği ve bir "smear" olmaması dikkate alınarak RNA'ların yeterli görsel kalite kontrolüne sahip olduğuna karar verilmiştir. Üçüncü aşamada ise, ilgili örnekler Bioanalyzer ile kalite kontrolüne tabi tutulmuşlar ve RIN (RNA Integrity Numer) numarası 8 ve üzerinde olan örnekler derin sekanslamada kullanılmışlardır (Novogene, Hong Kong).

#### 4.2.2 Derin Sekans ile Farklı İfade Edilen Halkasal RNA'ların Belirlenmesi

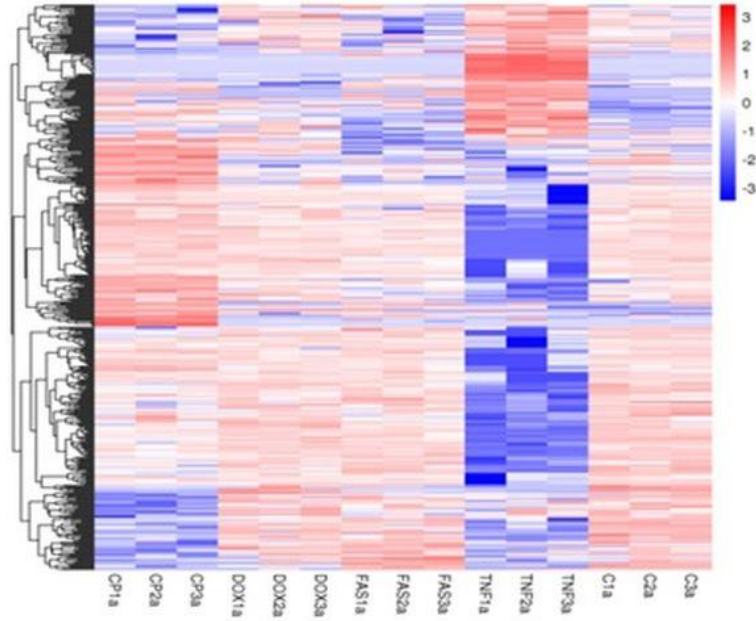
Toplam 15 örnek Illumina platformu kullanılarak RNA-seq çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu çalışma için Novogene (Hong Kong) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Elde edilen ham data verilerine göre, bir örnekten elde edilen ham okuma miktarı 81.360.972 ile 106.246.444 arasında değişmektedir. Temiz okuma miktarı ise 79.147.032 ile 103.277.920 arasında değişmektedir. Sekans hata oranı %0,02-0.03 olup Q30 değerleri %91-94,43 arasında değişmektedir. Genome eşleşen okuma oranları ise %68,77-%94,3



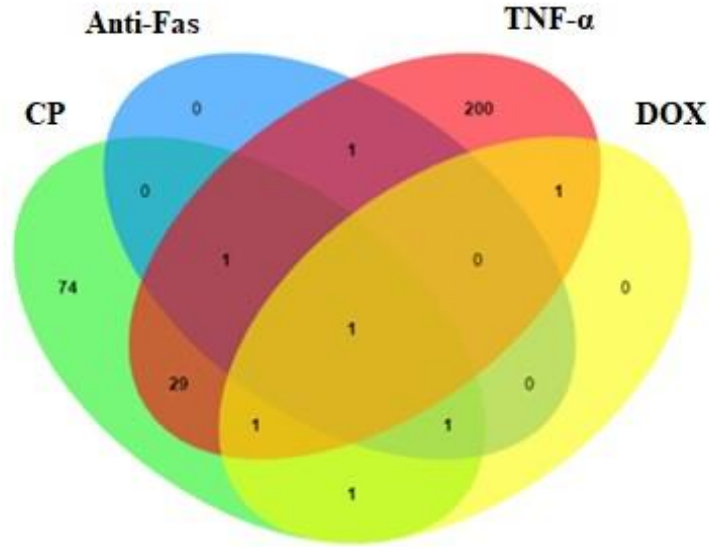
arasındadır. Bu değerlendirmeler sonrası, derin sekans verileri güvenilir kabul edilip daha sonrası analizlere geçilmiştir.

Halkasal RNA'ların primer olarak intronlardan kaynaklandığı gözlenmektedir. Ancak, ekzon ve genler arası bölgelerden kaynaklanan halkasal RNA'larda mevcuttur. Normalize halkasal RNA ifadesini belirlemek için TPM (transcript per million) hesaplamaları yapılmış (Şekil 9A) ve elde edilen veriler input olarak kullanılarak K-means ve SOM kümelemeleri yapılmıştır. Şekil 9'da görüldüğü üzere, HeLa hücrelerinde kullanılan liganda bağlı olarak farklı ifade edilen halkasal RNA örüntüsü değişim göstermektedir. Daha sonra, P değerleri baz alınarak bir filtreleme yapılmış ve kontrol hücrelere göre ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren halkasal RNA'lar belirlenmiştir (Şekil 9B). Bu analize göre, sisplatin ve TNF-alfa muameleri, bizim deneysel koşullarımızda, HeLa hücrelerinde sırasıyla 109 ve 236 halkasal RNA'nın farklı ifade edilmesine yol açmıştır. Ancak, anti-Fas ve doksorubisin sırasıyla sadece 4 ve 5 farklı halkasal RNA ifadesine yol açmıştır.

Özellikle sisplatin ve TNF-alfa ile muamele edilen hücrelerde onlarca farklı ifade edilen halkasal RNA belirlenmiştir. Ancak, proje kapsamında kullanılan ligandlar, apoptoz yanında stres, proliferasyon ve hücre siklüsü gibi değişik hücresel fenotipleride etkilediklerinden, apoptozda rol oynama potansiyeli bulunan halkasal RNA'ları seçmek için bir dizi filtreleme kriterleri belirlenmiştir. Bu bağlamda (1) kontrol ve ligandlarla muamele edilen hücrelerde ifade farkı en fazla olan adaylara; (2) istatistiksel olarak farklı ifade miktarı anlamlı olan adaylara; ve (3) apoptozda rol oynadığı raporlanan RNA'lardan köken alan adaylara öncelik verilmiştir. Bu kriterler dikkate alınarak, 10 aday belirlenmiştir (Tablo 2). Derin sekans verilerinde göre, bu adaylardan hsa\_circ\_0099768, hsa\_circ\_0083543, hsa\_circ\_0043795, hsa\_circ\_0051666 ve hsa\_circ\_0014824'ün ifadelerinde artış görülürken diğer 5 adayın ifadesinde azalma tespit edilmiştir.



B



**Şekil 9. Apoptotik şartlarda farklı ifade edilen halkasal RNA'lar.** A. TMP kümeleme analizi. Analiz  $\log_{10}(\text{TPM}+1)$  değeri baz alınarak yapılmıştır. Kırmızı bölgeler yüksek, mavi bölgeler düşük ifade seviyesine sahip halkasal RNA'ları göstermektedir. Kırmızıdan maviye doğru ifade seviyeleri azalmaktadır. B. Venn diagram analizi. Halkasal RNA adaylarının apoptotik HeLa hücrelerinde dağılımı. CP, sisplatin; FAS, anti-Fas mAb; TNF, TNF-alfa and DOX, doksorubisin ile muamele edilmiş HeLa hücrelerini göstermektedir. CP1, 2, 3; biyolojik replikaları ifade etmektedir.

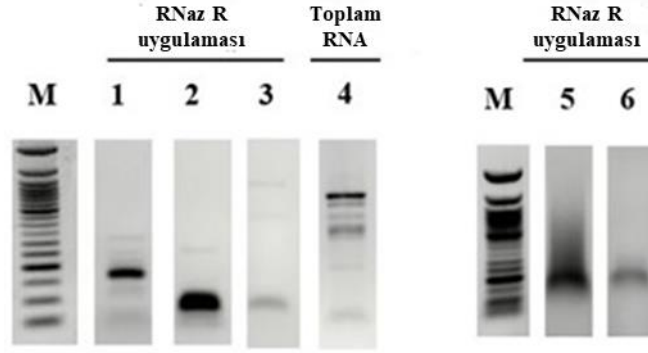
#### 4.2.3 Aday Halkasal RNA'ların qPCR ile Validasyonu

Tipik bir transkriptomiks analiz sonrası seçilen adayların fonksiyonel olarak karakterize edilmesinden önce, derin sekans verilerinin ikinci bir yöntem ile valide edilmesi gerekmektedir. Bu validasyon halkasal RNA'lar için daha da büyük bir önem arz etmektedir. Zira, potansiyel tandem duplikasyonlar ile gerçek halkasal RNA'ların birbirinden ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda öncelikle circ-HIPK3 pozitif kontrol, beta-aktin ise negatif kontrol olarak seçilmiştir. Literatürde iyi tanımlanmış bu halkasal RNA'nın HeLa hücrelerinde de ifade edildiği raporlanmıştır (Li ve ark., 2017). Halkasal RNA'larda görülen ters-kırılma birleşme noktalarının (back-splicing junction) amplifikasyonunu sağlayacak şekilde tasarlanan ıraksak (divergent) primerler kullanılarak iki grup RNA'dan RT-PCR analizi yapılmıştır. Birinci grup RNA'lar RNAz R ile muamele edilmedikleri için, lineer ve halkasal RNA'ları ihtiva etmektedirler. İkinci grup RNA'lar ise RNAz R ile muamele edildiklerinden

Tablo 2. Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen aday halkasal RNA'lar. \*Dört ligand ile farklı ifade edilenler; \*\* üç ligand ile farklı ifade edilenler; \* yok ise, en az bir ligand ile farklı ifade edilenler. Kalıp mRNA, halkasal RNA'nın orijin aldığı protein kodlayan gen.

Adaylar	P-değeri	Log değişim	Kalıp mRNA
hsa_circ_0099768*	2,29E-04	71.045	FGF14
hsa_circ_0083543**	0.00053703	50.376	XPO7
hsa_circ_0043795	0.00068894	49.662	STAT5A
hsa_circ_0051666	0.0004384	50.975	BBC3
hsa_circ_0014824	9,18E-01	55.021	ARHGEF11
hsa_circ_0029693	0.00038011	-36.338	LATS2
hsa_circ_0081300	0.00039188	-36.291	TRRAP
hsa_circ_0012992	0.00014162	-53.499	USP33
hsa_circ_0080853	0.00011961	-53.925	PTPN12
hsa_circ_0097866	0.0001054	-54.228	TMEM132C



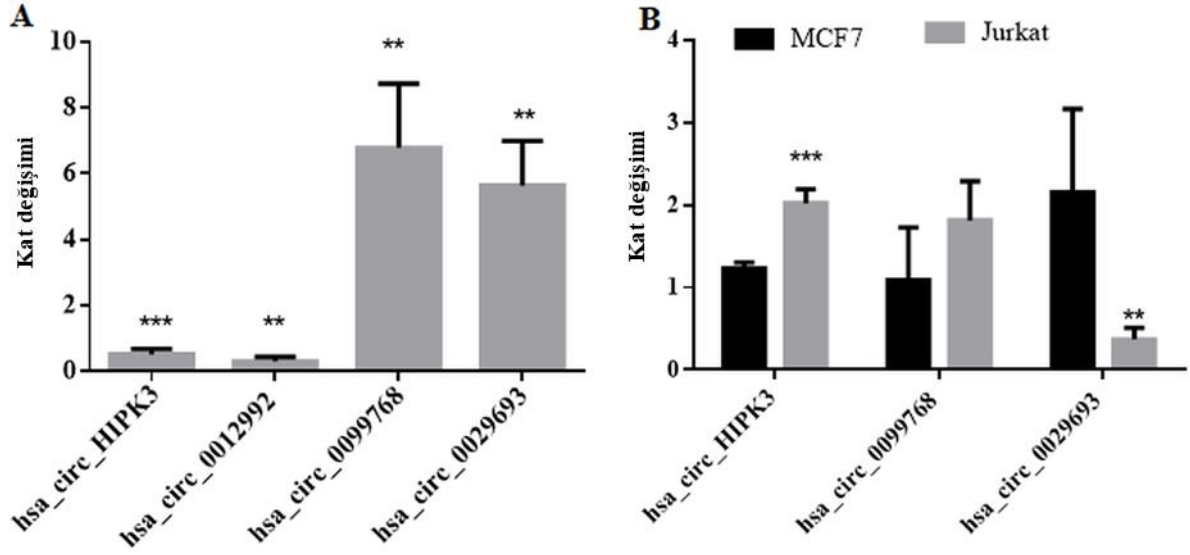


**Şekil 10. Halkasal RNA'ların RT-PCR ile amplifikasyonu.** RNaz R ile lineer RNA'ların uzaklaştırıldığı (RNaz R uygulaması) ve uzaklaştırılmadığı (toplam RNA) RNA'lardan hazırlanan cDNA'ler ve iraksak primeler kullanılarak halkasal RNA'lar RT-PCR ile çoğaltılmıştır. Örnekler %1 agaroz jelde yürütülmüştür. Beta aktin (3 ve 4 no'lu örnekler sırasıyla RNaz R uygulaması yapılmış ve yapılmamış örneklerdir) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 1, 2, 5 ve 6 no'lu örnekler sırasıyla hsa\_circ\_0012992, hsa\_circ\_HIPK3, hsa\_circ\_0014824 ve hsa\_circ\_0029693 adaylarına aittir.

minimal düzeyde lineer RNA içermekte ve dolayısıyla halkasal RNA yönünden zenginleştirilmişlerdir. RT-PCR verilerine göre, B aktin mRNA'sı RNaz R ile muamele edilen örneklerde tamamen yok olmaktadır (Şekil 10, sıra 3 ve 4). Ancak, test edilen adaylardan hiçbirinde RNaz muamelesi PCR ürünlerinin yok olmasına vesile olmamaktadır (Şekil 10, sıralar 1, 2, 5 ve 6). Bu sonuçlar da derin sekans analizi sonrası belirlenen aday halkasal RNA'ların HeLa hücrelerinde ifade edildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar sonrası aday halkasal RNA'lara ait PCR ürünleri jelden pürifiye edilerek TA klonlama ile plasmidlere klonlanmış ve sekans analizine tabi tutularak "back-splicing junction" varlığı doğrulanmıştır.

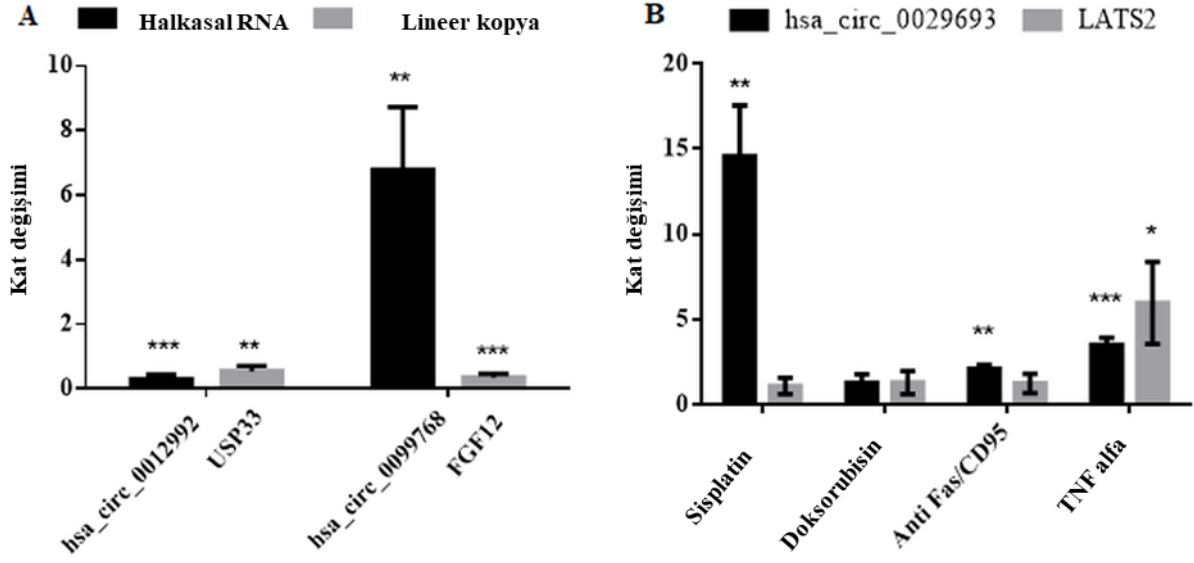
Halkasal RNA'ların varlığı doğrulandıktan sonra, DMSO kontrol ve sisplatin ile muamele edilen HeLa hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinde üç adet aday halkasal RNA miktarları qPCR ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler, hsa\_circ\_HIPK3 ve hsa\_circ\_0012992 ifadelerinin HeLa hücrelerinde sırasıyla 2 ve 3,3 kat azaldığını göstermektedir (Şekil 11A). Buna karşın, hsa\_circ\_0099768 ve hsa\_circ\_0029693 ifadeleri sırasıyla 6,7 ve 5,6 kat anlamlı olarak artmıştır. Bu verilerin hücreye özgün olup olmadığını test etmek için, üç aday halkasal RNA miktarı, sisplatin ile muamele edilen MCF7 ve Jurkat hücrelerinde de qPCR ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Hsa\_circ\_0029693, sisplatin muamelesi sonrası, HeLa ve MCF7 hücrelerinde sırasıyla 5,6 ve 2,1 kat artış gösterirken, Jurkat hücrelerinde 2,7 kat azalış göstermiştir (Şekil 11A-B). Bu verilerde bize, en azından test edilen aday halkasal RNA'ların hücreye özgün ifade profillerine sahip olduğunu göstermektedir.





**Şekil 11. Halkasal RNA'ların qPCR analizi.** DMSO ve sisplatin ile muamele edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar önce RNAz R ile muamele edilmiş ve akabinde random primerler kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Promega qPCR master mix kullanılarak üçer biyolojik tekrarlı yapılan qPCR sonrası elde edilen veriler DMSO ve GAPDH'e normalize edilmiştir. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. (A) HeLa hücreleri; (B) MCF7 ve Jurkat hücreleri.

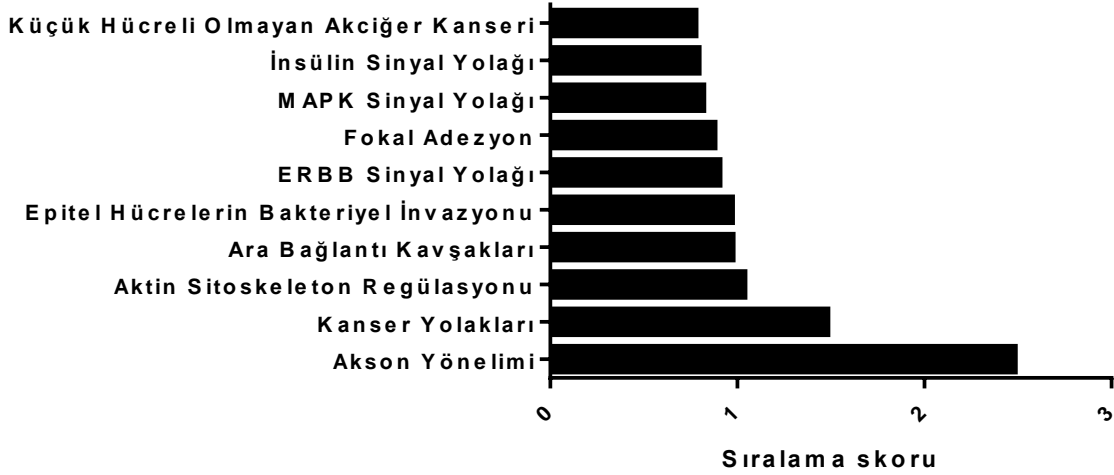
Halkasal RNA biyogenezinin moleküler detayları henüz tam aydınlatılmamıştır. Ancak, yapılan bazı çalışmalarda halkasal RNA üretiminin, köken aldığı lineer kalıp mRNA'nın hücre içi miktarında değişime yol açabileceği raporlanmıştır (Aufiero ve ark., 2018). Bu nedenle bizde ligandlar apoptozun tetiklendiği HeLa hücrelerinde, halkasal RNA ifadesinin kalıp mRNA ifadesine etkisini inceledik. Şekil 12A'da görüldüğü üzere, hsa\_circ\_0012192 ve köken aldığı USP33 lineer mRNA ifadeleri birbirine paralel bir seyir izlemektedir. Buna karşın, sisplatin muamelesi sonrası hsa\_circ\_0099768 ifadesinde görülen 6,7 kat artış lineer transkript miktarından bağımsız bir seyir göstermektedir. Bu da bize, hsa\_circ\_0099768 biyogenezinin FGF12 transkripsiyon hızından bağımsız olarak şekillendiğine işaret etmektedir. Değişik ligandlar ile oluşan halkasal RNA'ların kalıp mRNA miktarına etkilerini irdelemek için, hsa\_circ\_0029693 ve köken aldığı LATS2 mRNA ifadeleri incelenmiştir. Şekil 12B'de görüldüğü üzere, doksorubisin dışında, halkasal RNA oluşumu LATS2 transkripsiyon oranından bağımsız olarak şekillenmektedir. Tüm bu verilerde, bizim deneysel koşullar altında incelediğimiz halkasal RNA'ların bir mRNA kırılma yan ürünü olmadığı ve hücrel fenotipe yanıt olarak spesifik olarak sentezlenmiş olabileceklerine işaret etmektedir.



**Şekil 12. Halkasal RNA oluşumunun kalıp mRNA ifadesine etkisi.** DMSO kontrol ve dört değişik ligand ile muamele edilen HeLa hücrelerden izole edilen RNA'lar önce RNAz R ile muamele edilmiş ve akabinde random primerler kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Promega qPCR master mix kullanılarak üçer biyolojik tekrarlı qPCR yapılmış ve elde edilen veriler DMSO ve GAPDH'e normalize edilmiştir. Lineer transkriptlerin analiz edildiği örneklerde RNAz R muamelesi yapılmamıştır. \* P < 0,5, \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001. (A) sisplatin muamelesi; (B) sisplatin, doksorubisin, anti-Fas ve TNF-alfa muamelesi.

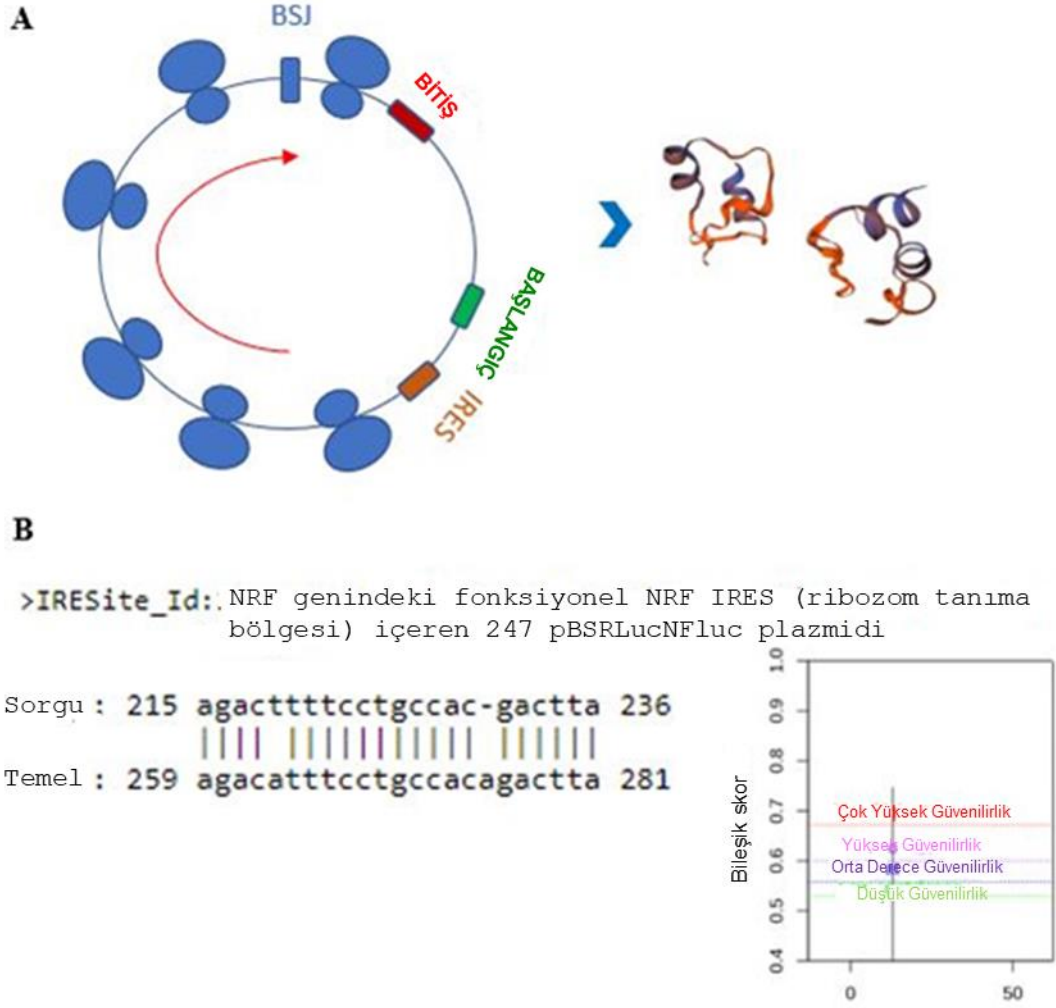
#### 4.3 Halkasal RNA'ların Protein Kodlama ve miRNA Süngerı Potansiyellerinin İrdelenmesi

Halkasal RNA'ların en bilinen potansiyel fonksiyonlarından iki tanesi (1) miRNA'lar için sünger görevi görerek onları ortamdaki uzaklaştırmaları ve böylece miRNA hedef RNA'larının fonksiyonlarını arttırmaları ve (2) uygun 5' sekans taşımaları durumunda proteine çevrilerek tranke protein üretimine yol açmalarıdır (Chen ve ark., 2016; Pamudurti ve ark., 2017). Dört ligandla muamele sonrası farklı ifade edilen halkasal RNA'ların, miRNA'lar için sünger görevi yaparak apoptozu düzenleme potansiyelini irdelenmek için, halkasal RNA'lar üzerinde bulunan potansiyel miRNA bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Hiç şüphesiz ki, bir halkasal RNA'nın sünger olarak tanımlanabilmesi için, tek bir miRNA için birden fazla bağlanma bölgesi içermesi gerekmektedir (Chen, 2016; Li ve ark., 2017). Sisplatinin kanser kemoterapötik etkisinden dolayı öncelikle sisplatinin olası etkisi incelenmiştir. Farklı ifade edilen 109 halkasal RNA'dan (Şekil 9B) 71 adeti miRNA bağlanma bölgesi içermektedir. Bu halkasal RNA'lardan en az 5 miRNA bağlanma bölgesi içerenler KEGG fonksiyonel anotasyonuna tabi tutularak, halkasal RNA-miRNA etkileşimleri sonrası etkilenmiş olabilecek hedef mRNA'ların görev yaptığı biyolojik işlevler belirlenmiştir. Bu analizler sonrası, bizim deneysel koşullarımız altında, olası halkasal RNA-miRNA etkileşimlerinin kanser, hücre yapışması ve MAPK sinyal ileti yolları gibi işlevleri etkileyebileceği belirlenmiştir (Şekil 13).



**Şekil 13. Potansiyel halkasal RNA-miRNA etkileşimlerinin biyolojik işlevlere etkisi.** Sisplatin ile muamele edilen HeLa hücrelerinde farklı ifade edilen halkasal RNA'larda en az beş bağlanma bölgesi içeren miRNA'lar ve bu miRNA'ların deneysel olarak doğrulanmış hedef mRNA'ları belirlenmiştir. Bu hedef RNA'lar KEGG analizine tabi tutularak olası halkasal RNA-miRNA etkileşimlerinin biyolojik işlevlere olan etkileri belirlenmiştir.

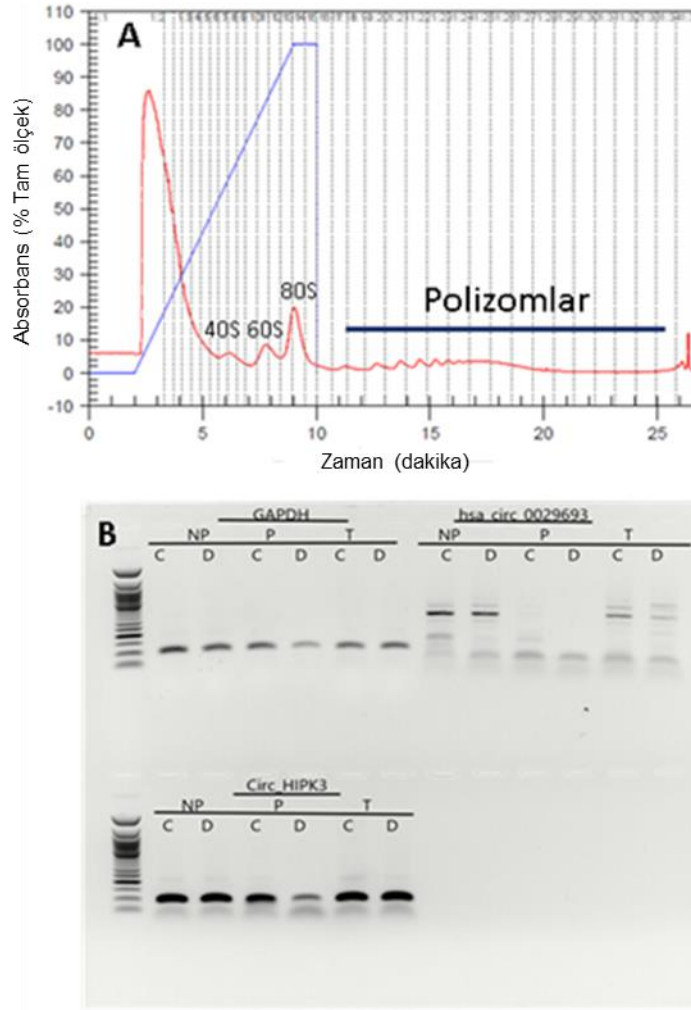
Farklı ifade edilen halkasal RNA'ların proteine çevrilme potansiyellerini biyoinformatik araçlarla belirlemek için, daha önce transle olan halkasal RNA'larda varlığı raporlanan özellikler bakımından bir tarama yapılmıştır. Literatürde var olan bilgiler, (1) ilk ekzonu ve dolayısıyla AUG translasyon başlangıç kodonunu içerenler, (2) 5' UTR (untranslated region) kısmında IRES (internal ribosome entry site) içerenler ve (3) potansiyel m<sup>6</sup>A metilasyon bölgesi içerenlerin transle olma ihtimalleri daha yüksektir (Zhou ve ark., 2016 Pamudurti ve ark., 2017). Bu kriterler alınarak yapılan filtreleme sonrası, hsa\_circ\_0029693 halkasal RNA'nın proteine çevrilme potansiyeli bulunmaktadır (Şekil 14).



**Şekil 14. Hsa\_circ\_0029693'ün proteine çevrilme potansiyeli.** Ensemble kullanılarak halkasal RNA'nın ekzon sınırları belirlenmiştir. IRESite (iresite.org/) veritabanı kullanılarak IRES (ribozom tanıma bölgesi) içerme potansiyeli ve SRAMP (cuilab.cn/sramp/) veritabanı kullanılarak m<sup>6</sup>A bölgeleri belirlenmiştir. (A) hsa\_circ\_0029693 halkasal RNA'sı ve protein ürünlerinin 3D modelleri. (B) IRES ve m<sup>6</sup>A metilasyon motifini içeren sekanslar.

#### 4.4 Halkasal RNA'ların Polizomlarla Etkileşimlerinin İrdelenmesi

Biyoinformatik analizler en azından bir halkasal RNA'nın proteine çevrilme potansiyeli olduğuna işaret etmekle birlikte, bu hipotezi doğrulamak için deneysel verilere ihtiyaç vardır. Bu bağlamda deneysel olarak halkasal RNA'ların proteine çevrilme olasılıklarını irdellemek için iki genel yaklaşım kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar (1) endojen protein ürününün kütle spektrofotometri veya western blot gibi yöntemlerle gösterilmesi veya (2) halkasal RNA'ların polizomlarla etkileştiğinin gösterilmesidir. Henüz elimizde potansiyel protein ürünlerine karşı bir antikör veya aşırı ifade vektörleri olmadığı için, birinci seçeneği kullanma imkanımız bulunmamaktadır. Ancak, halkasal RNA'ların polizomlar ile etkileşip etkileşmediklerini irdellemek için sukroz yoğunluk gradyanı kullanılarak halkasal RNA'ların hücresel



**Şekil 15. Polizom profili ile hsa\_circ\_0029693'ün proteine çevrilme potansiyelinin incelenmesi.** (A) Polizom profili. DMSO ve sisplatin ile muamele edilen HeLa hücreleri parçalandıktan sonra elde edilen sitozolik ekstrat %5-70 sukroz gradyanı üzerinde fraksiyonlara ayrılmış ve fraksinasyon esnasında okunan  $A_{254}$  değerleri baz alınarak mRNP, 40S, 60S, 80S ve polizomları içeren fraksiyonlar belirlenmiştir. Polizom dışı tüm fraksiyonlar "nonpolizomal" fraksiyon olarak birleştirilmiştir. Sadece DMSO ile muamele edilen hücrelerden elde edilen elektroferogram gösterilmiştir. (B) Halkasal RNA'ların RT-PCR analizi. Nonpolizomal ve polizomal fraksiyonlardan elde edilen RNA'lardan ve kontrol olarak kullanılan toplam RNA'lardan Şekil 11'de açıklandığı şekilde ancak qPCR yerine RT-PCR analizi yapılmıştır. NP, nonpolizomal RNA; P, polizomal RNA; T, toplam RNA; C, sisplatin; D, DMSO.

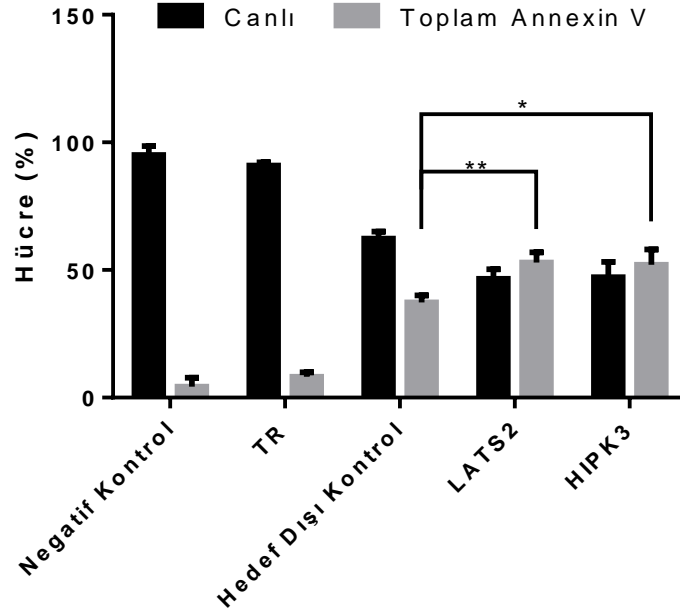
translasyon üniteleri olan polizomlarla etkileşimleri incelenmiştir. Bu bağlamda DMSO ve sisplatin ile muamele edilen HeLa hücreleri %5-70 sukroz gradyanı üzerinde fraksiyonasyona tabi tutulduktan sonra,  $A_{254}$  okumaları baz alınarak fraksiyonlar polizomal ve nonpolizomal fraksiyonlara ayrılmıştır (Şekil 15A). Her iki fraksiyondan elde edilen toplam RNA'lar ile RT-PCR yapılarak irdelenen RNA'nın hangi fraksiyonda olduğu belirlenmiştir. Bu analizlerde GAPDH, lineer mRNA'lar ve deney için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Şekil 15B'de görüldüğü üzere, beklendiği gibi, DMSO ve sisplatin ile muamele edilen hücrelerde GAPDH hem polizomal hem de nonpolizomal fraksiyonlarda bulunmaktadır. Literatürde çok iyi tanımlanan circ\_HIPK3 yine bir kontrol olarak kullanılmıştır. Circ\_HIPK3 halkasal RNA'da her iki fraksiyonda yer almaktadır. Dolayısıyla proteine çevrilme potansiyeli mevcuttur.



Ancak, biyoinformatik analizler sonrası proteine çevrilme ihtimali olduğunu düşündüğümüz hsa\_circ\_0029639 hem DMSO hem de sisplatin ile muamele edilen hücrelerde sadece nonpolizomal fraksiyonlarda tespit edilebilmiştir. Bu verilerde, bizim deneysel koşullarımız altında bu halkasal RNA'nın proteine çevrilme ihtimalinin oldukça zayıf olduğunu göstermektedir. Ancak, polizomal ekstrakt hazırlanması sırasında çekirdek ortamdaki uzaklaştırılarak sadece sitozolik ekstrakt kullanıldığından, test edilen iki halkasal RNA'nın da en azından bir kısmının sitoplazma da konumlandığını belirlemiş bulunmaktayız.

#### 4.5 Aday Halkasal RNA Susturmasının Apoptoza Etkisinin İrdelenmesi

RNA-seq verilerine göre yüzlerce halkasal RNA'nın ifadesinde farklılık tespit etmiş olmamıza karşın, tüm farklı ifade edilen halkasal RNA'ların apoptozda rol oynama ihtimalleri bulunmamaktadır. Nitekim, sisplatin ya da TNF-alfa gibi ligandların apoptoz yanında proliferasyon, hücre döngüsü, hücre motilitesi ve stress gibi bir dizi hücresel işlevleri de etkilemesi beklenmektedir. Aday halkasal RNA'ların apoptoza olan direkt etkilerini irdelemek için, bir adet halkasal RNA adayı, hsa\_circ\_0029693, siRNA ile HeLa hücrelerinde susturularak susturmadan 48 saat sonra hücrelerin apoptoz oranları akım sitometresi ile incelenmiştir. Şekil 16'da görüldüğü üzere, sadece hücrelerin (negatif kontrol) ya da transfeksiyon reaktifile muamele edilen hücrelerin (TR) toplam Annexin V+ oranları oldukça düşük (%8-12) olmasına karşın, negatif siRNA 40 nM kullanıldığı zaman %37 oranında ölüm görülmektedir. Ancak, negatif siRNA ile karşılaştırıldığında, hem circ\_HIPK3 hem de hsa\_circ\_0029693 siRNA'sı ile transfekte edilen HeLa hücrelerin apoptoz oranlarında, transfeksiyondan 48 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı bir oranda artış görülmektedir (Negatif siRNA ile %37 iken, circ\_HIPK3 siRNA'sı %53, hsa\_circ\_0029693 siRNA'sı %52,  $P < 0,05$ ). Ancak bu hücrelerden elde edilen toplam RNA ile yaptığımız qPCR sonuçlarına göre, circ\_HIPK3 miktarında %26 azalma görülürken, hsa\_circ\_0029693'da %75 azalma olduğu belirlenmiştir. Negatif siRNA'da var olan ölümü minimize edebilmek için, susturma deneylerinin daha optimal şartlar altında validasyonu gerekmektedir.



**Şekil 16. Circ\_HIPK3 ve hsa\_circ\_0029693 susturmasının apoptoza etkisi.** HeLa hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 80.000 hücre/kuyucuk olarak şekilde bir gün önceden ekildikten sonra 40 nM siRNA (Dharmacon) ile tranfekte edilmiştir. Tranfeksiyondan 48 saat sonra Annexin V ve 7AAD boyaması yapılarak hücrelerin ölüm oranları akım sitometresi ile analiz edilmiştir. Negatif kontrol, sadece hücreler; TR, transfeksiyon reaktifile muamele edilmiş hücreler; non-targeting kontrol, negatif siRNA. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

## 5. TARTIŞMA/SONUÇ

Apoptoz hem ihtiyaç fazlası hücreleri hem de sağlığı tehdit eden ajanların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayarak homeostazın sağlanmasında önemli fonksiyonu olan hücresel bir işlevdir (Elmore, 2007). Klasik moleküler biyoloji tanımlamasında gen fonksiyonları proteinler ve küçük kodlamayan RNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Nitekim apoptozun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen bir dizi regülatör protein ve miRNA vardır (Hotchkiss ve ark., 2009; Subramanian ve Ster, 2010). Genom anotasyonlarına paralel olarak genlerin ukmRNA ve halkasal RNA'lar tarafından da düzenlenebileceği anlaşılmasına karşın, proje önerisi aşamasına kadar apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan halkasal RNA'lar tam olarak rapor edilmemiştir. HeLa hücrelerinin model olarak kullanıldığı bu projede hücreler değişik ajanlarla apoptoza sürüklenerek genom kapsamlı sekanslama yaklaşımıyla HeLa hücrelerinin halkasal RNA transkriptomunda meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Elde edilen ilk verilerimiz *Frontiers in Genetics* dergisinde yayımlanmıştır (Yaylak ve ark., 2019). Ayrıca proje önerisi kapsamında fonksiyonel bazı verilerde elde edilmiştir.





Hücre içinden ve/veya dışından gelen sinyallerle başlatılan biyokimyasal olaylar zinciri olan apoptoz, hücrelerde membran bütünlüğünde bozulma ile başlar ve DNA ve organellerin parçalanması sonrası hücrenin tamamen ortadan kaldırılmasıyla son bulur. Apoptozun meydana geldiği hücre tipine ve fizyolojik/patolojik olguya bağlı olarak apoptotik hücrelerden değişik moleküller salgılanabileceği gibi apoptotik hücreler etraftaki hücrelerin değişik sinyal molekülleri salgılamasına da vesile olabilir. Dolayısıyla, hücre ölümü gibi dramatik bir fenotipte meydana gelen gen ifadesi değişimlerini anlamak oldukça zor olup, elde edilen veriler, hücrenin o anki resmini yansıtmakta olup tüm süreç hakkında bilgi vermekte yetersiz kalmaktadır. Tamamlanan bu proje kapsamında çalışmalar Anneksin V+ hücreler üzerine yoğunlaştırılarak erken dönemdeki apoptotik hücrelerin halkasal RNA profillerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu bağlamda öncelikle doz-zaman kinetik çalışmaları yapılarak, hücrelerin Annexin V-pozitif aşamada yakalanmasına özen gösterilmiştir. Optimizasyon çalışmaları 80  $\mu$ M sislipatin (16 saat), 0,5  $\mu$ M doksorubisin (8 saat) ve 0,5  $\mu$ g/mL anti-Fas antikoru (16 saat) uygulamasının bu şartları sağladığını göstermiştir (Şekil 5). TNF-alfanın tek başına HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemekte yetersiz kalması nedeniyle hücreler 10  $\mu$ g/mL sikloheksimid kombine uygulamasıyla (8h) apoptoza duyarlı hale getirilmiştir (Fraisse ve ark., 1998).

Bir fenotipe bağlı olarak hücrelerin transkriptomunda meydana gelen değişimleri ölçmek için qPCR, SAGE (serial analysis of gene expression), mikroarray ve derin sekanslama gibi değişik metotlar kullanılmaktadır. Tüm genomu kapsamı ve daha güvenilir olması nedeniyle bu çalışmada Illumina platformu kullanılarak derin sekanslama yapılmıştır. Derin sekans verilerinin Q30 değerlerinin %91-94,43 gibi yüksek oranlara sahip olması, sekanslamanın ne kadar güvenilir bir şekilde tamamlandığına işaret etmektedir. Her bir muameleden üçer replika hazırlanmış olması nedeniyle istatistiki hesaplamalar yapılmış ve istatistiki olarak anlamlı farka sahip halkasal RNA'lardan aday seçimi gerçekleştirilmiştir. Sislipatin ve TNF-alfa ile muamele edilen hücrelerde sırasıyla 109 ve 236 halkasal RNA'nın farklı ifade edildiği belirlenmesine karşın (Şekil 9), bu sayı anti-Fas mAb ve doksorubisin ile muamele edilen hücrelerde 4 ve 5 gibi düşük bir sayıda kalmıştır. Bu iki tür muamelenin tüm biyolojik replikalarında düşük sayıda halkasal RNA belirlendiğinden, bu sayının düşüklüğünün deneysel bir hatadan kaynaklanmadığını düşündürmektedir. Ancak, bu gözlemin biyolojik bir öneme sahip olup olmadığını iddia edebilmek için ilave deneylerin yapılması gerekmektedir.

Literatürde mevcut bilgiler incelendiğinde, proje önerisi yapıldığı an itibarıyla apoptozu düzenlediği rapor edilen halkasal RNA'lar henüz rapor edilmemişti. Ancak, geçen üç sene içerisinde, sistematik bir tarama olmaksızın bazı halkasal RNA'lar apoptoz ile



ilişkilendirilmiştir (Holdt *ve ark.*, 2016; Nan *ve ark.*, 2016; Dang *ve ark.*, 2017; Mehta *ve ark.*, 2017). Apoptoz ile ilişkili ilk genom kapsamlı transkriptomiks çalışma, mevcut proje kapsamında elde edilen veriler ışığında grubumuz tarafından yayımlanmıştır (Yaylak *ve ark.*, 2019). Mikroarray gibi hibridizasyon tabanlı taramalara göre derin sekans verilerinin güvenilirliği daha yüksek olmasına karşın, bu tip genom kapsamlı taramalarda ikinci ve mümkünse üçüncü farklı yöntemler verilerin validasyonu büyük önem arz etmektedir. Özellikle halkasal RNA tespitinde kullanılan biyoinformatik programlar, halkasal RNA'lar ile tandem duplikasyonları %100 güvenilirlikte ayırt edemediklerinden, bu tür çalışmalarda validasyonda daha da büyük bir önem arz etmektedir. Özellikle daha önce hiç raporlanmamış halkasal RNA'ların raporlanabilmesi için validasyon neredeyse şart koşulmaktadır. Bu bağlamda ayrıca, amplifiye edilen PCR ürünlerinin klonlanarak "back-splicing junction" larının Sanger sekanslama ile doğrulanması gerekmektedir. Validasyon şartlarını optimize edebilmek için, literatürde iyi tanımlanmış *circ\_HIPK3* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Li *ve ark.*, 2017). RT-PCR ile çoğaltılan ürünler TA-klonlama vektörlerine klonlandıktan sonra Sanger sekanslamaya tabi tutularak ters-kırılma birleşme bölgeleri doğrulanmıştır (Şekil 10). Bu analizler aday halkasal RNA'lar ilede tekrarlanarak, aday halkasal RNA'ların HeLa hücrelerinde sentezlendikleri belirlenmiştir (Şekil 10). Daha sonra, HeLa, Jurkat ve MCF7 hücrelerinde bazı aday halkasal RNA'ların sisplatin ile tetiklenen apoptotik hücreler altında ifadeleri qPCR ile belirlenmiştir (Şekil 11). Bu analizler, halkasal RNA ifadesinin hücreye özgün olarak değişebileceğini işaret etmektedir. İlginç bir şekilde, bazı halkasal RNA'ların biyosentezi, köken aldığı kalıp mRNA sentezini de etkilemektedir (Şekil 12).

Halkasal RNA'ların en iyi bilinen potansiyel fonksiyonlarından iki tanesi (1) miRNA'lar için sünger görevi görerek onları ortamdaki uzaklaştırmaları ve böylece miRNA hedef RNA'larının fonksiyonlarını arttırmaları ve (2) uygun 5' sekans taşımaları durumunda proteine çevrilerek tranke protein üretimine yol açmalarıdır (Chen *ve ark.*, 2016; Pamudurti *ve ark.*, 2017). Proje önerisi kapsamında aday halkasal RNA'ların miRNA'lar için sünger görevi görme potansiyelleri biyoinformatik araçlar kullanılarak irdelenmiştir. Bir dizi aday halkasal RNA'da tek bir miRNA için 5 ve daha fazla bağlanma bölgesi mevcut olup, bu miRNA'ların deneysel doğrulanmış hedef genleri arasında *MAKP*, *aderens* ve kanser ile ilgili genler bulunmaktadır (Şekil 13). Ancak biyoinformatik bulguların deneysel olarak test edilmesi gerekmektedir. Yapılan ilave biyoinformatik analizler bazı adaylarımızın proteine çevrilme potansiyellerinin olduğuna işaret etmekle beraber (Şekil 14), bu adayların polizomlarda bulunmaması (Şekil 15) muhtemelen bu adayların yabancı pozitif aday olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, test edilen iki halkasal RNA'nın non-polizomal fraksiyonlarda



bulunması, bu adayların en azından bir kısmının sitoplazmik bir konuma sahip olduğu göstermektedir.

Sisplatin ya da TNF-alfa gibi ligandların apoptoz yanında proliferasyon, hücre döngüsü, hücre motilitesi ve stress gibi bir dizi hücresel işlevleri de etkilemesi beklendiğinden, bir adet yeni belirlediğimiz aday (hsa\_circ\_0029693) ve bir adet literatürde raporlanmış halkasal RNA (circ\_HIPK3) fonksiyonel analizlere tabi tutulmuştur. Bu bağlamda her iki halkasal RNA HeLa hücrelerinde siRNA ile susturulduktan 48 saat sonra akım sitometresinde hücrelerin apoptoz oranları belirlenmiştir. Negatif siRNA ile karşılaştırıldığında, hem circ\_HIPK3 hem de hsa\_circ\_0029693 siRNA'sı ile transfekte edilen HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında, transfeksiyondan 48 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı bir oranda artış görülmektedir (Negatif siRNA ile %37 iken, circ\_HIPK3 siRNA'sı %53, hsa\_circ\_0029693 siRNA'sı %52,  $P < 0,05$ ). Bu hücrelerden elde edilen toplam RNA ile yaptığımız qPCR sonuçlarına göre, circ\_HIPK3 miktarında %26 azalma görülürken, hsa\_circ\_0029693'da daha etkin susturma (yaklaşık %75) gerçekleşmiştir. Özellikle negatif siRNA'nın yol açtığı ölümü minimize edebilmek için susturma deneylerinin daha optimal şartlar altında (örneğin siRNA ile doz ve zaman kinetiği yapılarak) tekrar edilmesi gerekmektedir. Hem susturma işlemleri hem de aday halkasal RNA'ların uygun aşırı ifade vektörlerine klonlanma işlemleri, Bursiyer Bilge Yaylak'ın doktora tez konusu olarak yapılmaya devam edilmektedir. Bu işlemler tamamlandığında yeni proje önerilerine esin kaynağı olacak verilerin toplanması öngörülmektedir.

Sonuç olarak, HeLa hücrelerinin model olarak kullanıldığı bu proje kapsamında (1) dört farklı ligand ile apoptozun tetiklendiği HeLa hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lar derin sekans analizine tabi tutularak halkasal RNA profilleri elde edilmiş; (2) aday halkasal RNA varlığı RT-PCR ve Sanger sekanslama ile doğrulanmış; (3) aday halkasal RNA'ların ifade miktarları HeLa, MCF7 ve Jurkat hücrelerinde belirlenmiş; (4) aday halkasal RNA'ların miRNA'lar için sünger olma potansiyelleri biyoinformatik araçlarla irdelenmiş; (5) aday halkasal RNA'ların proteine çevrilme potansiyelleri biyoinformatik araçlarla ve ayrıca deneysel olarak irdelenmiş ve (6) iki halkasal RNA susturularak fonksiyonel olarak incelenmiştir. Dolar kurunda yaşanan ciddi yükselmeler nedeniyle, aday halkasal RNA susturması sonrası ikinci tur RNA-seq çalışması yapılamamış ancak bunun yerine sitoplazmik konumlanan adayların polizomlarla etkileşimleri irdelenmiştir. Proje kapsamında bir adet mastır tezi üretilmiş (Yaylak, 2018) ve bir adet araştırma makalesi yayımlanmıştır (Yaylak ve ark., 2019). Elde edilen veriler Moleküler Biyoloji Kongresi 2018 (İzmir), Hücre Ölümü ve Araştırma Kongresi 2018 (İzmir) ve Complex Life of RNAs Kongresi (Almanya)'nde sözlü ve poster bildirileri olarak paydaşlar ile paylaşılmıştır. Aday halkasal RNA'ların

fonksiyonel olarak detaylı olarak irdelenmesi ve özellikle kanser gibi hastalık perspektifinde analizi de yeni projelere esin kaynağı olmak açısından oldukça heyecan vericidir.

## REFERANSLAR

Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., Gerstein, M. B. 2010. "Annotating non-coding regions of the genome," *Nature Review in Genetics*, 11, 559-571.

Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Ionivo, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Miagawa, S., Nakano, T. ve ark., 2006. "A novel class of small RNAs bind to MILI protein in Mouse testes," *Nature*, 442, 203-207.

Arya, R., White, K. 2015. "Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 12-19.

Ashkenazi, A., Dixit, V. M. 1998. "Death receptors: signaling and modulation," *Science*, 281, 1305-1308.

Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, NR., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., Evantel, N., Memczal, S., Rajewsky, N., Kadener, S. 2014. "circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing," *Molecular Cell*, 56, 55-66.

Aufiero, S., can den Hoogenhof, M. M. G., Rechman, Y. J., Beggali, A., can der Made, I., Kluin, J., Khan, M. A. F., Pinto, Y. M., Creemers, E. E. 2018. "Carcinoma circRNAs arise mainly from constitutive exons rather than alternatively spliced exons", *RNA*, 24, 815-827.

Bakshi, A., Jensen, Goldman, J. P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., Korsmeyer, S. J. 1985. "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18," *Cell*, 41, 899-906.

Berghe, TV., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. 2014. "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways," *Nature in Molecular and Cell Biology*, 15, 135-147.

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., ve ark., 2007. "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project", *Nature*, 447, 799-816.

Boise, L. H., Gonzales-Garcia, M., Postena, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C. B. 1993. "Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death," *Cell*, 74, 597-608.

Bonasio, R., Shiekhatar, R. 2014. "Regulation of transcription by long noncoding RNAs," *Annual Review in Genetics*, 48, 433-455.

Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S., Tilghman, S. 1990 "The product of the H19 gene may function as an RNA," *Molecular Cell*, 1, 28-36.

Budhidarmo, R., Day, C. L. 2015. "IAPs: Modular regulator of cell signalling," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 80-90.

Burd, C. E., Jeck, W. R., Liu, Y., Sanoff, H. K., Wang, Z., Shapless, N. E. 2010. "Expression of linear and novel circular forms of an INK4a/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk", *PLOS Genetics*, 6, e1001233.

Chao, M. P., Majeti, R., Weissman, I. L. 2011. "Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer" *Nature Reviews in Cancer*, 12, 58-67.

Chen, L. L. 2016. "The biogenesis and emerging roles of circular RNAs", *Nature Reviews in Molecular and Cell Biology*, 17, 205-211.

Chen, Y., Fu, L. L., Liu, B., Huang, J., Wang, J. H., Wei, Y. Q. 2014. "Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy", *Apoptosis*, 19(8), 1177-1189.

Chu, C., Spitale, R. C., Chang, H. Y. 2015. "Technologies to probe functions and mechanisms of long noncoding RNAs", *Nature Review in Structural and Molecular Biology*, 22, 29-35.

- Cococquerelle, C., Mascrez, B., Hetin, D., Bailleul, B. 1993. "Mis-splicing yields circular RNA molecules", *FASEB Journal*, 7, 155-160.
- Costa, F. F. 2007. "Non-coding RNAs: Lost in translation?", *Gene*, 386, 1-10.
- Dang, Y., Quyang, X., Zhang, F., Wang, K., Lin, Y., Sun, B., Wang, Y., Wang, L., Huang, Q. 2017. "Circular RNAs expression profiles in human gastric cancer", *Scientific Reports.*, 7, 9060.
- Dethoff, E. A., Chugh, J., Mustoe, A. M., Al-hashimi, HM. 2012. "Functional complexity and regulation through RNA dynamics", *Nature*, 482, 322-330.
- Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R., Mattick, J. S. 2008. "Differentiating protein-coding and noncoding RNA: Challenges and ambiguities", *PLoS Computational Biology*, 4, e1000176.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U., Kimchi, A. 2009. "Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them", *Cell Death Differentiation*, 16, 966-975.
- Elmore, S. 2007. "Apoptosis: A review of programmed cell death", *Toxicological Pathology*, 35, 495-516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD", *Nature*, 391, 43-50.
- Erdoğan, İ., Coşacak, M. İ., Nalbant, A., Akgül, B. 2018. "Deep sequencing reveals two Jurkat subpopulations with distinct miRNA profiles during camptothecin-induced apoptosis", *Turkish Journal of Biology*, 42, 113-122.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. 2012. "Role of apoptosis in disease", *Aging*, 4, 330-349.
- Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., Gewirtz, D. A. 1994 "Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells", *Molecular Pharmacology*, 45, 649-656.
- Fraisse, C. S., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, V., Vayssiere, JL. 1998. "TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades", *Oncogene*, 17, 1639-1951.
- Franco-zorrilla, J. M., Vali, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J. A, Paz-Ares, J. 2007. "Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity", *Nature Genetics*, 39, 1033-1037.
- Frith, M.C., Pheasant, M., Mattick, J.S., 2005. "The amazing complexity of the human transcriptome", *European Journal of Human Genetics*, 13, 894-897.
- Galluzi, L., Pedro J.M., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Penruzzelli, M., Baehrecke, E. H. *ve ark.*, 2015. "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCDD 2015", *Cell Death Differentiation*, 22, 58-73.
- Gardini, A., Shiekhatar, R. 2015. "The many faces of long noncoding RNAs", *FEBS Letters*, 282, 1647-1657.
- Geisler, S., Collier, J. 2013. "RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts", *Nature Reviews in Molecular and Cell Biology*, 14, 699-712.
- Gerner, C., Frohwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W., Schulte-Hermann, R. 2000. "The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis", *Journal of Biological Chemistry*, 275, 39018-39026.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E., Zapp, M. L., Weng, Z. *ve ark.*, 2008. "Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells", *Science*, 320, 1077-1081.
- Gloss, B. S., Dinger, M. E. 2016. "The specificity of long noncoding RNA expression", *Biochimie Biophysics Acta*, 1859, 16-22
- Guil, S., Esteller, M. 2015. "RNA-RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players", *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 248-256.
- Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., Bartel, DP. 2014. "Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs", *Genome Biology*, 15, 409.

- Guttman, M., Rinn, J. L. 2012. "Modular regulatory principles of large non-coding RNAs", *Nature*, 482, 339-346.
- Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., Kjems, J. 2013. "Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges", *Nature*, 495, 384-390.
- Harries, L. W. 2012. "Long non-coding RNAs and human disease", *Biochemical Society Transactions*, 40, 902-906.
- He, W., Yuan, B., Flygare, J., Lodish, HF. 2011. "Long noncoding RNA-mediated anti-apoptotic activity in murine ehythroid terminal differentiation", *Genes Development*, 25, 2573-2578.
- He, X., Chen, X., Duan, X., Pan, T., Ju, Q, Zhang, Y., Zhong, F., Liu, J., Zhang, H., Luo, J. *ve ark.*, 2015. "An Lnc RNA (GAS5)/SnoRNA-derived piRNA induces activation of TRAIL gene by site-specifically recruiting MLL/COMPASS-like complexes", *Nucleic Acids Research*, 43: 3712-3725.
- Henry, C. M., Hollville, E., Martin, S. J. 2013. "Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry", *Methods*, 61, 90-97.
- Hentze, M. W., Preiss, T. 2013. "Circular RNAs: splicing's enigma variations", *EMBO Journal*, 32, 923-925.
- Holdt, L. M., Stahinger, A., Sass, K., Pichler, G., Kulak, N. A., Wilfert, W., Kohlmaier, A., Herbst, A., Northoff, B. H., Nicolaou, A. *ve ark.*, 2016. "Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans", *Nature Communications*, 7, 12429.
- Holmström, T. H., Tran, S. E. F., Jonhson, V. L., Ahn, N. G., Chow, S. C., Eriksson, J. E. 1999. "Inhibition of Mitogen-Activated Kinase Signaling Sensitizes HeLa Cells to Fas Receptor-Mediated Apoptosis", *Molecular and Cellular Biology*, 19, 5991-6002.
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., Swanson, P. E. 2009. "Cell death", *New England Journal of Medicine*, 361, 1570-1583.
- Huarte, M., Guttman, M., Fledser, D., Garber, M., Koziol, MJ., Kenzelmann-Broz, D., Khalik, A. M., Zuk, O., Amiy, I., Rabani, M. *ve ark.*, 2010. "A large intergenic non-coding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response", *Cell*, 142, 909-919.
- Jagetia, G. C., Nayak, V. 2000 "Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formatin in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation", *Strahlentherapie und Onkologie*, 176, 422-428.
- Janicke, R., Sprengart, M. L., Wati, M. R., Porter, A. G. 1998. "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis", *Journal of Biological Chemistry*, 273, 9357-9360.
- Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F., Sharpless, N. E. 2013. "Circular RNAs are abundant, conserved and associated with ALU repeats", *RNA*, 19, 141-157.
- Jeck, W. R., Sharpless, N. E. 2014. "Detecting and characterizing circular RNAs," *Nature Biotechnology*, 32(5), 453-463.
- Jonas, S., Izauralde, E. 2015. "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing", *Nature Reviews in Genetics*, 16, 421-422.
- Kerr, J. F., Whyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Khaitan, D., Dinger, M. E., Mazar, J., Crawford, J., Smith, M. A., Mattick, J. S., Perera, R. J. 2011. "The melanoma-upregulated long non-coding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis in invasion", *Molecular Cellular Pathobiology*, 71, 3852-3862.
- Kim, Y.-K., Yeo, J., Kim, B., Ha, M., Kim, V. N. 2012. "Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells", *Molecular Cell*, 46, 893-895.
- Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., Craig, R. W. 1993." MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2", *PNAS*, 90, 3516-3520.
- Lalaoui, N., Lindqvist, L. M., Sandow, J. J., Ekert, P. G. 2015. "The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis", *Seminars in Cell and Developmental Biogyl*, 39, 63-69.



TUBITAK

- Lasda, E., Parker, R. 2014. "Circular RNAs: diversity of form and function", *RNA*, 20, 1829-1842.
- Laurent, G. S., Wahledtedt, C., Kapranow, P. 2015. "The landscape of long noncoding RNA classification", *Trends in Genetics*, 31, 239-251.
- Li, LY., Luo, X., Wang, X. 2001. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria", *Nature*, 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. 1997. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade", *Cell*, 91, 479-489.
- Li, Y., Zheng, F., Xiao, X., Xie, F., Tao, D., Huang, C., Liu, D., Wang, M., Wang, L., Zeng, F., Jiang, G. 2017. "CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells", *EMBO Reports.*, 18, 1646-1659.
- Lockshin, R. A., Williams, C. M. 1965. "Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm", *Journal of Insect Physiology*, 11, 123-133.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. 2014. "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2", *Genome Biology*. 15, 550.
- Ma, L., Bajic, V. B., Zhang, Z. 2013. "On the classification of long non-coding RNAs", *RNA Biology*, 10, 924-933.
- Maghsoudi, N., Zakeri, Z., Lockshin, R. A. 2012. "Programmed cell death and apoptosis-Where it came from and where it is going: From Elie Metchnikoff to the control of caspases", *Experimental Oncology*, 34(3), 146-152.
- Martianov, I., Ramadas, A., Serra Barros, A., Chow, N., Akoulitchev, A. 2007. "Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript", *Nature*, 445, 666-670.
- Martin, S. J., Henry, C. M. 2013. "Distingusihing between apoptosis, necrosis and necroptosis and other cell death modalities", *Methods*, 61, 87-89.
- Mattick, J. S., Rinn, J. L. 2015. "Discovery and annotation of long non-coding RNAs", *Nature in Structural and Molecular Biology*, 22, 1-5.
- Mehta, S.L., Pandi, G., Vemuganti, R. 2017. "Circular RNA expression profiles alter significantly in mouse brain after transient focal ischemia", *Stroke*, 48, 2451-2548.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Tort, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, LH., Munschauer, M. *ve ark.*, 2013. "Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency", *Nature*, 495, 333-342.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., Mattick, J. S. 2009. "Long non-coding RNAs: insights into functions", *Nature Reviews in Genetics*, 10, 155-159.
- Mondal, T., Rasmussen, M., Pandey, G. K., Isakssoni A., Kanduri, C. 2010. "Characterization of the RNA content of chromatin", *Genome Research*, 20, 899-907.
- Moran, V. A., Perera, R. J., Khalil, A. M. 2012. "Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs", *Nucleic Acids Research*, 40, 6391-6400.
- Nakano, K., Vousden, K. H. 2001. "PUMA, o novel pro-apoptotic gene, is induced by p53", *Molecular Cell*, 7, 683-694.
- Nan, A., Chen, L., Zhang, N., Liu, Z., Yang, T., Wang, Z., Yang, C., Jiang, Y. 2016. "A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, MiR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis", *Archives in Toxicology*, 91, 1671-1684.
- Ogawa, Y., Sun, BK., Lee, J. T. 2008. "Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways", *Science*, 320, 1336-1341.
- Opforman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., Korsmeyer, S. J. 2003. "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires anti-apoptotic MCL-1", *Nature*, 426, 671-676.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K. 2012. "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis", *Cell Proliferation*, 45, 487-498.



- Pauli, A., Rinn, J. L., Schier, A.F. 2011. "Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis", *Nature Reviews in Genetics*, 12, 136-149.
- Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., Hanan, M., Wyler, E., Perez-Hernandez, D., Ramberger, E. *ve ark.*, 2017. "Translation of CircRNAs", *Molecular Cell*, 66, 9-21.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Arver, B., Havemann, W. J., Pandolfi, P. P. 2010. "A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulate tumor biology", *Nature*, 465, 1033-1038.
- Pruefer, F. G., Lizarraga, F., Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J. 2008. "Participation of Omi Htra2 serine protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells", *Journal of Chemotherapy*, 20, 348-354.
- Puthalakath, J., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., Strasser, A. 1999. "The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex", *Molecular Cell*, 3, 287-296.
- Qu, S., Yang, X., Li, X., Wang, J., Gao, Y., Shang, R., Sun, W., Dou, K., Li, H. 2015. "Circular RNA: A new star of noncoding RNAs", *Cancer Letters*, 365, 141-148.
- Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C., Badge, R. M. 2009. "A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification", *BioTechniques*, 46, 277-284.
- Rodrigues-Trelles, F., Tarrío, R., Ayala, F. J. 2006. "Origins and evolution of spliceosomal introns," *Annual Reviews in Genetics*, 40, 47-76.
- Rossi, M., Antonangeli, F. 2014. "LncRNAs: New players in apoptosis control", *International Journal in Cell Biology*, Article ID: 473857.
- Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., Brown, P. O. 2012. "Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types", *PLOS ONE*, 7, 30733.
- Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L., Brown, P. O. 2013. "Cell-type specific features of circular RNA expression," *PLOS Genetics*, 9, e1003777.
- Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., Kleinschmidt, A. K. 1976. "Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures", *PNAS*, 73, 3852-3856.
- Singh, R. P., Waldron, R. T., Hahn, B. H. 2012. "Genes, tolerance and systemic autoimmunity", *Autoimmunity Reviews*, 11, 664-669.
- Subramanian, S., Steer, C. J. 2010. "MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis", *Journal of Cellular Physiology*, 223, 289-298.
- Suzuki, H., Zuo, Y., Wang, J., Zhang, M. Q., Malhotra, A., Mayeda, A. 2006. "Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing", *Nucleic Acids Research*, 34, e63.
- Szabo, L., Salzman, J. 2016. "Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges", *Nature Review in Genetics*, 17, 679-692.
- Teng, X., Hardwick, J. M. 2015. "Cell death in genome evolution", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 3-11.
- Thiede, B., Rudel, T. 2004. "Proteome analysis of apoptotic cells," *Mass Spectrometry Reviews*, 23, 333-349.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. *ve ark.*, 1992. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes," *Nature*, 356, 768-774.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M, Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., *ve ark.*, 2010. "The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation", *Molecular Cell*, 39, 925-938.
- Tu, C. P., Akgül, B. 2005. "Drosophila glutathione S-transferases", *Methods in Enzymology*, 401, 204-226.
- Van Heesch, S., van Iterson, M., Jacobi, J., Boymans, S., Essers, P. B., de Bruijn, E., Hao, W., MacInnes, A. W.,





- Cuppen, E., Simonis, M. 2014. "Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes", *Genome Biology*, 15, R6.
- Wang, K. C., Chang H. Y. 2011. "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs," *Molecular Cell*, 43, 904-914.
- Watanabe, F. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S. 1992. "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis", *Nature*, 356, 314-317.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., Korsmeyer, S.J. 2001. "Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death", *Science*, 292, 727-730.
- Wesierska-Gadek, J. W., Kramer, M. P., Schmid, G. 2008. "A combined treatment of HeLa cells with the farnesyl protein transferase inhibitor L-744,832 and cisplatin significantly increases the therapeutic effect as compared to cisplatin monotherapy," *Journal of Cell Biochemistry*, 104, 189-201.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., Spector, D. L. 2009. "Long noncoding RNA: functional surprises from the RNA world", *Genes & Development*, 23, 1494-1504.
- Wilusz, J. E. 2016. "Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability", *Biochimie and Biophysics Acta*. 1859, 128-38.
- Yap, K., Lim, Z. Q., Khandelia, P., Friedman, B., Makeyev, E. V. 2012. "Coordinated regulation of neuronal mRNA steady state levels through developmentally controlled intron retention", *Genes & Development*, 26, 1209-1223.
- Yaylak, B., Erdogan, I., Akgul, B. 2019. "Transcriptomics analysis of circular RNAs differentially expressed in apoptotic HeLa cells", *Frontiers in Genetics*, 10, 176.
- Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. 2013. "Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA", *Journal of Molecular Biology*, 425, 3723-3730.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S. J. 1996. "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)", *Cell*, 87, 619-628.
- Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Fin, Q.-F., Xing, Y.-H., Zhu, S., Yang, L., Chen, L.-L. 2013. "Circular intronic long noncoding RNAs", *Cell*, 51, 792-806.
- Zhang, X. O., Wang, H. B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L., Yang, L. 2014. "Complementary sequence-mediated exon circularization", *Cell*, 159, 134-147.
- Zhou, L., Chen, J., Li, Z., Li, X., Hu, X., Huang, Y., Zhao, X., Liang, C., Wang, Y., Sun, L. *et al.*, 2010. "Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma", *PLOS ONE*, 5, e15224.
- Zhou, Y., Zeng, P., Li, Y.H., Zhang, Z., Cui, Q. 2016. "SRAMP: prediction of mammalian N6-methyladenosine (m6A) sites based on sequence-derived features", *Nucleic Acids Research*, 44, e91.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. BÜNYAMİN AKGÜL
Proje No:	215Z081
Proje Başlığı:	Gen İfadesinin Yeni Düzenleyicileri Halkasal RNA'ların Apoptotik Yolaklara Olan Etkilerinin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	AYTEN NALBANT ALDANMAZ, JENS ALLMER (Yurt Dışı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2016 - 01/04/2019
Onaylanan Bütçe:	582718.0
Harcanan Bütçe:	460550.05
Öz:	<p>Genom projelerinin tamamlanmasına müteakip yapılan genom anotasyon çalışmaları, ökaryotik bir hücrenin sanılandan çok daha fazla bir transkripsiyonel kapasiteye sahip olduğunu ve bu kapasitenin büyük bir kısmını da protein kodlamayan transkriptlerin oluşturduğunu göstermiştir. Protein kodlayan mRNA'ların lineer yapıda olması nedeniyle, ilk anotasyon çalışmaları lineer transkriptler üzerine yoğunlaşmış ve binlerce uzun lineer protein kodlamayan genler tespit edilmiştir. RNA sekanslama teknolojisinde ve bu verilerin biyoinformatik analizlerinde kullanılan yeni programların geliştirilmesine paralel olarak, genomda lineer transkriptlerin yanında halkasal formda RNA'ların da üretildiği raporlanmıştır. TÜBİTAK tarafından desteklenen (215Z081 No.lu) ve bir yürütücü, iki danışman ve farklı zaman dilimlerinde çalışan üç bursiyer olmak üzere toplam altı kişilik bir ekip tarafından yürütülen bu projede HeLa hücreleri model olarak kullanılarak apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan halkasal RNA'lar taranmıştır. Dört farklı ligand ile tetiklenen apoptotik hücrelerde yapılan tarama sonrası bazı adayların validasyonu ve orijin aldığı gen ile etkileşimleri irdelenmiştir. Değişik biyoinformatik analizler ve işlevsel bir takım yaklaşımlar kullanılarak, aday halkasal RNA'lar hakkında moleküler bilgiler toplanmıştır. Bu vesile ile projeye finansal katkıda bulunan TÜBİTAK'a ve projenin yürütüldüğü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.</p>
Anahtar Kelimeler:	Halkasal RNA, apoptoz, HeLa, RNA-seq
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır