

İnsanda Apoptozu Düzenleyen Uzun Kodlamayan RNA'ların Belirlenmesi ve Fonksiyonel Karakterizasyonu

Program Kodu: 1001

Proje No: 113Z371

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL

Danışman:

Yard. Doç. Dr. Ayten NALBANT

Bursiyer:

Ulvi Ahmadov

MAYIS 2016
İZMİR

ÖNSÖZ

Genom projelerinin tamamlanmasına ve sekanslama tekniklerinde kaydedilen gelişmelere paralel olarak ökaryotik bir hücrede ifade edilen RNA çeşitliliğine bakış açımız oldukça değişmiştir. Tüm-genom transkriptomiks çalışmaları, ökaryotik bir hücrede kodlayan genlerden çok daha fazla kodlamayan genlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Daha önce “çöp DNA” olarak tanımlanan bu genomik bölgelerin aslında fonksiyonel RNA üretiminde kullanıldığının anlaşılmasıyla birlikte, kodlamayan RNA'ların fonksiyonları ve hangi fenotiplerde görev aldıklarının araştırılmasına odaklanılmıştır. TÜBİTAK tarafından desteklenen (113Z371 No.lu) ve bir yürütücü, bir danışman ve bir bursiyer olmak üzere toplam üç kişilik bir ekip tarafından yürütülen bu projede HeLa hücreleri model olarak kullanılarak apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan uzun kodlamayan RNA'lar taranmıştır. İfade farklılıkları ve yakın oldukları genler baz alınarak belirlenen aday kodlamayan genlerin susturulması sonrası hücrede meydana gelen apoptotik değişimler belirlenmiştir. Aday uzun kodlamayan genlerin fonksiyonlarını anlayabilmek için, adayların ifadesi susturulmuş ve gen ifadesinde meydana gelen değişimler ikinci tur transkriptomiks çalışmasıyla incelenmiştir. Bu vesile ile projeye finansal katkıda bulunan TÜBİTAK'a ve projenin yürütüldüğü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

“

İÇİNDEKİLER

i. Özet (Türkçe).....	v
ii.Özet (İngilizce).....	vi
1. Giriş	1
2. Literatür Özeti	1
2.1 Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)	1
2.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar	3
2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'ların Sınıflandırması	5
2.2.2. Uzun Kodlamayan RNA'ların Gen İfadesindeki Rollerini	6
2.3. Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Apoptoz	8
3. Gereç ve Yöntem	10
3.1. Memeli Hücrelerin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması.....	10
3.2. Apoptozun Akış Sitometresi, Floresan Mikroskopi ve Hücre Sayım Cihazı İle Belirlenmesi	10
3.3. Hücrelerin GapMer İle Transfeksiyonu	11
3.4. Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri	12
3.5. Derin Sekans Analizleri.....	12
3.6. Biyoinformatik Analizler	13
3.7. Real Time PCR Analizleri	13
3.8. Western Blotlama	13
4. Bulgular	15
4.1. HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi.....	15
4.1.1. Sisplatin İle İntresik Yolağın Tetiklenmesi.....	15
4.1.2. Doksorubisin İle İntresik Yolağın Tetiklenmesi.....	15
4.1.3. Anti-Fas İle Ekstrinsik Yolağın Tetiklenmesi	19
4.1.4. TNF-alfa İle Ekstrinsik Yolağın Tetiklenmesi	19
4.1.5. Apoptotik Yolakların Tetiklenmesinin Western Blotlamayla Analizi.....	21
4.1.6. Jurkat Hücrelerinde Apoptotik Yolakların Tetiklenmesi.....	22
4.2. Derin Sekanslama İle ukmRNA'ların Transkriptomiks Analizi.....	23
4.2.1. RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri	23
4.2.2. Derin Sekans Analizleriyle Farklı İfade Edilen ukmRNA'ların Belirlenmesi.....	23

4.2.3. Aday ukmRNA'ların qPCR İle Validasyonu.....	28
4.3. Aday ukmRNA'ların Fonksiyonel Karakterizasyonu.....	29
4.3.1. Transfeksiyon Verimliliğinin Optimizasyonu.....	29
4.3.2. Gapmer'lerin HeLa Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi.....	30
4.3.3. Gapmer'lerle aday ukmRNA'ların Susturulması.....	31
4.4. Aday ukmRNA'ların Susturulmasının Gen İfadesine Etkisinin Derin Sekanslama İle Belirlenmesi	33
5. Tartışma/Sonuç	36

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Apoptotik Mekanizmada Rol Oynayan İç (İntrinsic) Faktörler	4
Şekil 2. Uzun Kodlamayan RNA'ların Lolasyonları Baz Alınarak Sınıflandırılması	6
Şekil 3. Uzun Kodlamayan RNA Tarafından Gen İfadesinin Kontrolünde Kullanılan Değişik Mekanizmalar.....	8
Şekil 4. HeLa Hücrelerinde Sisplatin Doz Tespiti.....	16
Şekil 5. HeLa Hücrelerinde Doksorubisin Doz Tespiti	17
Şekil 6. HeLa Hücrelerinde Anti-Fas Zaman Tespiti	18
Şekil 7. HeLa Hücrelerinde TNF-alfa/sikloheksimid İle Apoptozun Tetiklenmesi	20
Şekil 8. HeLa Hücrelerinde Apoptoz Sonrası Kaspaz Aktivasyonu	21
Şekil 9. Jurkat Hücrelerinde Sisplatin, Doksorubisin ve anti-Fas İle Apoptozun Tetiklenmesi	22
Şekil 10. Toplam RNA Örneklerinin Kalite Kontrol Analizi	24
Şekil 11. Apoptotik Hücrelerde İfade Edilen ukmRNA'ların Kümelenmesi.....	26
Şekil 12. qPCR İle Derin Sekans Verilerinin Validasyonu.....	28
Şekil 13. Transfeksiyon Verimliliğinin Belirlenmesi	29
Şekil 14. Gapmer Konsantrasyonunun Optimizasyonu	30
Şekil 15. Aday ukmRNA'ların Susturulması ve Fonksiyonel Karakterizasyonu	32
Şekil 16. Aday ukmRNA'ların Susturulması Sonrası Transkriptom Benzerliği	34

TABLULAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1. UkmRNA Derin Sekans Verilerinin İnsan Genomuna Eşleşme Oranları	25
Tablo 2. Apoptotik Hücrelerde Farklı İfade Edilen Bazı ukmRNA'ların Sayısı	25
Tablo 3. Apoptotik Hücrelerde Farklı İfade Edilen ve Kodlayan Genelere Kısmi Olarak Eşleşen veya Intronlarından Köken Alan ukmRNA'lar	27
Tablo 4. Aday ukmRNA'ların Susturulmasının Protein Kodlayan Transkriptoma Etkisi	29

ÖZET

Apoptoz birçok hücrenel fonksiyonların sağlıklı yürütülmesi için oldukça önemlidir. Apoptoz hızındaki azalmalar kanser ve otoimmün hastalıklara, hızlanma ise akut ve kronik dejeneratif hastalıklara ve immün sistemde yetersizliklere yol açmaktadır. Hücrenel homeostazın sağlanmasında görev yapan apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan bir dizi protein ve mikroRNA bilinmesine rağmen, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan protein kodlamayan bu RNA'lar (uzun kodlamayan **RNA**, ukmRNA) tam bilinmemektedir.

Apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan ukmRNA'ları belirlemek için bu çalışmada HeLa hücreleri model olarak kullanılmıştır. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolağın her biri ikiye ayrı ajan ile aktive edilmiştir. Yolakların aktivasyonu sonrası izole edilen RNA'lar derin sekans analizine tabi tutulduğunda, ukmRNA'ların ligand tipine bağlı olarak farklı profil sergilediği gözlemlenmiştir. İfadelerinde farklılık tespit edilen 4 aday ukmRNA'nın susturulması HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında artışa yol açmıştır. İlginç bir şekilde aday ukmRNA ifadesi ile antisense oldukları kodlayan gen ifadesi arasında ters bir korelasyon belirlenmiştir. Aday ukmRNA'ların susturulmasının apoptotik sinyal ileti yolaklarına olan etkilerini belirlemek için bu hücrelerde ikinci bir RNA-seq çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, özellikle GTF2A1-AS susturulmasının apoptotik genlerin ifadesinde değişime yol açtığını göstermiştir. Sonuç olarak, HeLa hücrelerinde apoptozu düzenleyen yeni bir ukmRNA tespit edilmiş ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir.

ABSTRACT

Apoptosis is essential for the proper execution of numerous cellular functions. Decreases in the rate of apoptosis result in cancer or autoimmunity while accelerated cell death leads to acute and chronic degenerative diseases and immunodeficiency. Although there are a number of well-characterized regulatory proteins and microRNAs involved in regulation of apoptosis, a key process in the maintenance of the cellular homeostasis, the long non-coding RNAs (lncRNAs) involved in the regulation of apoptosis are largely unknown.

In order to identify the lncRNAs that play a role in the regulation of apoptosis, HeLa cells have been used as the model system in this study. Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways were activated by two separate agents. When the total RNAs, which were isolated following the activation of the pathways, were subjected to deep sequencing, lncRNAs displayed an expression profile unique to each ligand. Silencing of four candidate lncRNAs resulted in an increase in the rate of apoptosis in HeLa cells. Interestingly, there was an inverse correlation between the expression of the candidate lncRNA and its corresponding coding gene. A second round of transcriptomics study was conducted to unravel the changes in the expression profiles of genes upon the silencing of the candidate lncRNAs. This sequencing showed that especially the silencing of GTF2A1-AS causes changes in the expression of apoptotic genes. As a result, a novel ncRNA that regulates apoptosis has been identified and functionally characterized in HeLa cells.

1. GİRİŞ

İnsan sağlığının korunmasında çok temel bir göreve sahip apoptozu kontrol eden bir dizi protein tanımlanmıştır (Gerner *ve ark.*, 2000; Thiede ve Rudel, 2004; Hotchkiss *ve ark.*, 2009). Literatürde var olan bilgiler, proteinler yanında mikroRNA'ların apoptozu transkripsiyon sonrası aşamada düzenlediğini göstermektedir (Subramanian ve Ster, 2010). Bu alandaki en ilginç gelişmelerden bir tanesi ise, daha önce transkripsiyona uğramadığı için "çöp DNA" diye adlandırılan bölgelerden uzun kodlamayan RNA'ların (ukmRNA) üretilmesi ve bazı ukmRNA'nın apoptozu düzenleme ihtimalinin bulunmasıdır. Aslında genomdan fenotipe bağlı üretilen antisense RNA'larda göz önüne alındığında, apoptoz sadece regülatör proteinler ve miRNA'lar tarafından değil çok değişik türdeki ukmRNA'lar tarafından düzenlenebilmektedir. Literatürde özellikle DNA hasarına bağlı tetiklenen intrinsik yolağın düzenlenmesinde rol oynayan bazı ukmRNA'lar tanımlanmasına rağmen (Huarte *ve ark.*, 2010; Hung *ve ark.*, 2011), sistemik bir yaklaşım kullanılmadığı için bu yolaktaki ukmRNA'ların tamamı bilinmemektedir. En önemlisi, ekstrinsik yolağın düzenlenmesinde görev yapan ukmRNA'lar hiç bilinmemektedir. Bu nedenlerden ötürü, apoptozu düzenleyen ukmRNA'ların kapsamlı bir şekilde tanımlanması sonucu intrinsik ve ekstrinsik yolda rol oynayan ukmRNA'ların belirlenmesi önemlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Evrimsel olarak oldukça muhafaza edilmiş olan hücre ölümü, ihtiyaç fazlası hücreler ile sağlığı tehdit eden antijenlerin vücuttan uzaklaştırılması için oldukça gerekli bir hücrel işlemdir (Hotchkiss *ve ark.*, 2009). Fizyolojik bir süreçte oluşması gereken hücre ölümünün yavaşlaması sonucu kanser ve otoimmün hastalıklar, hızlanması durumunda ise nörodejenaratif hastalıklar ve AIDS gibi hastalıklar şekillenebilmektedir (Chao *ve ark.*, 2011; Ouyang *ve ark.*, 2012; Singh *ve ark.*, 2012). Bu sebeplerden dolayı hücre ölümünün mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması, insan sağlığının korunması için çok önemlidir.

Programlı hücre ölümü ilk defa 1965 yılında belirlenmesine rağmen (Lockshin ve Williams, 1965), apoptozun kontrolünde rol oynayan ilk molekül, morfolojik tanımlamadan ancak 27 yıl sonra tespit edilebilmiştir (Thornberry *ve ark.*, 1992). Hücre ölümünde oluşan bozuklukların hastalıklara yol açığının anlaşılmasından sonra, bu alandaki çalışmalar ivme

kazanmıştır. Bazen sınırları tam olarak çizilememekle birlikte, hücre ölümleri üç grup altında toplanmaktadır: nekroziz (Goldstein ve Kromer, 2007), otofaj (Eisenberg-Lerner ve ark., 2009) ve apoptoz (Hotchkiss ve ark., 2009). Membran bariyerlerinin ya da hücre içi enerji kaynaklarının çok hızlı ve kitle halinde kaybedilmesi sonucu oluşan nekroz, organellerin ve hücrenin şişmesi, parçalanması ve sitoplazmik içeriğin dışarıya taşması ile karakterizedir. Otofaj ise çeşitli hücre organellerinin ve kompartmanlarının lizozomlar vasıtasıyla parçalanması anlamına gelmektedir.

Apoptoz hücre içinden ve dışından gelen değişik sinyaller vasıtasıyla başlatılan biyokimyasal olaylar tarafından kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Elmore, 2007). *C. elegans*, *Drosophila* ve memelilerde yapılan çalışmalar, apoptozun bütün türlerde benzerlikler gösterdiğini ancak hücre türüne göre farklı kontrol noktalarının olduğunu göstermiştir. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki apoptotik yolak belirlemiştir (Şekil 1). Her iki yolda da ortak yaşam (BAD) ve ölüm sinyalleri (BID, BIM, NOXA/PUMA) vardır. Apoptotik BAK/BAX (Wei ve ark., 2001) proteinleri ile antiapoptotik BCL-2 (Bakshi ve ark., 1985) grubu proteinlerinin oranı apoptozu belirler. Değişik intrinsik ve/veya ekstrinsik faktörler BAD (Zha ve ark., 1996), BID (Wang ve ark., 1996), BIM (Puthalakath ve ark., 1999) ve NOXA/PUMA (Nakano ve Vousden, 2001) gibi apoptotik proteinleri aktive ederler. Bu proteinlerde, normalde BCL-2 (Bakshi ve ark., 1985), BCL-X_L (Boise ve ark., 1993) ve MCL-1 (Kozopas ve ark., 1993) gibi antiapoptotik proteinler tarafından inaktif halde tutulan BAK ve BAX proteinlerini aktive ederler. BAX/BAK endoplazmik retikuluma girerek kalsiyum salınmasına ve dolayısıyla hücre şişmesine ve mitokondriye girerek ölüm sinyallerinin amplifikasyonuna neden olurlar. MCL-1 önemli bir kontrol noktası olup, BIM'e bağlı apoptozu önleyici etkisi vardır (Opforman ve ark., 2003). BAX ve BAK proteinlerinin mitokondride oluşturduğu deliklerden cytochrome (Cyt) c salınmasından sonra, APAF-1, cyt c (APAF-2) ve caspase-9 (APAF-3) birleşerek apoptozomu oluştururlar (Li ve ark., 1997). Başlatıcı (initiator) caspase-9, efektör caspase enzimlerini aktive eder ve bu enzimlerde hücrede ki değişik proteinleri parçalayarak apoptozu yol açarlar. Caspase aktivitesi değişik proteinler tarafından kontrol edilebilir. Örneğin *Drosophila*'da caspase enzimlerini inaktive eden değişik IAP (inhibitor of apoptosis) proteinleri (Salvasen ve Duckett, 2002), memelilerde de SMAC/DIABLO (Du ve ark., 2000) ve OMI/HTRA2 (Suzuki ve ark., 2001) isimli 2 adet IAP proteini izole edilmiştir.

Apoptozu uğrayan hücrelerde çekirdek koyulaşması ve DNA parçalanması gibi morfolojik değişiklikler olmaktadır. Memelilerde DNA parçalanması kaspaz tarafından aktive edilen CAD (caspase activated DNase) ve fagositlerin lizozomunda ki DNase II proteinleri tarafından gerçekleştirilir (Enari ve ark., 1998). Kaspaz aktivitesine bağlı olmayan

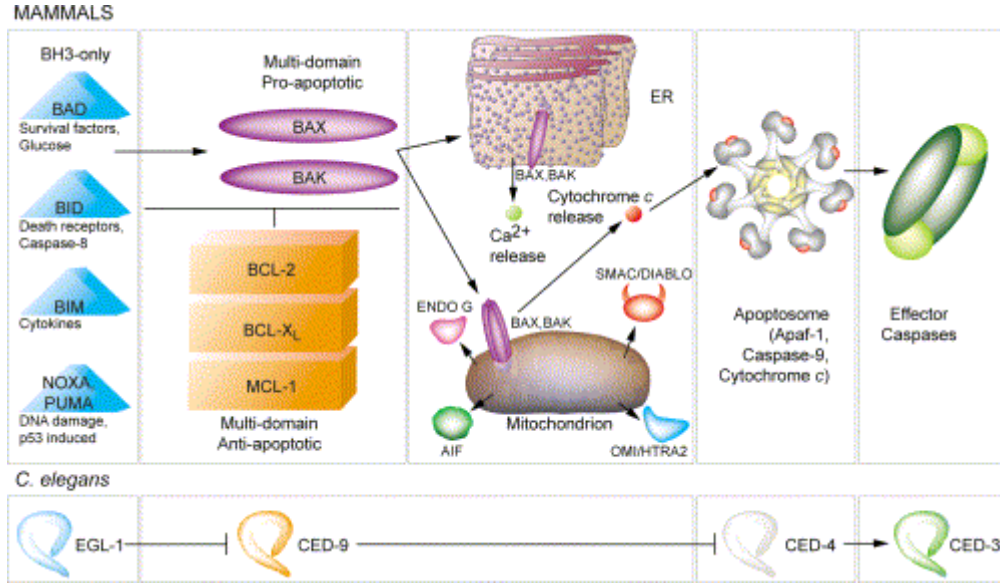
endonuclease G ve AIF (apoptosis-interacting factor) proteinleri de DNA parçalanmasına yol açabilir (Li ve ark., 2001). Bütün bu olaylar zincirinden sonra, apoptotik hücre üzerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri sayesinde bu hücreler “yenilmek” üzere tanınırlar ve fagositoz ile berteraf edilirler.

Ekstrinsik faktörler 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). Her üç yoldaki ortak element ligandın bağlanması sonrası konformasyon değişikliğine uğrayan reseptörlerin sitoplazmik kısmında DISC (death inducing silencing complex) kompleksi oluşmasıdır. 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 diğer caspase enzimlerinin (örneğin caspase-3 ve -7) aktivasyonuna yol açar.

Evrimsel olarak korunmuş olan apoptozun düzenlenmesinde bir dizi regülatör protein ve mikroRNA'lar gibi küçük kodlamayan RNA'ların görev aldığı bilinmektedir (Hotchkiss ve ark., 2009; Su ve ark., 2015). Kendi yaptığımız çalışmalarda, miR-425 ve miR-17*'ın HeLa hücrelerinde kamptotesinle tetiklenen apoptozu düzenlediğini göstermiş bulunmaktayız. Proteomik analizler, 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 ve miRNA'lar tarafından değil uzun kodlamayan RNA'lar tarafından da kontrol edilebileceğine işaret etmektedir (Rossi ve Antonangeli, 2014).

2.2 Uzun Kodlamayan RNA'lar

Genom sekanslarının tamamlanmasına ve sekanslama tekniklerinde kaydedilen teknolojik ilerlemelere paralel olarak genomdan üretilen RNA transkriptleri daha iyi tanımlanmaya başlanmıştır (Birney ve ark., 2007). Genomik transkript tanımlama çalışmalarının en sürpriz sonuçlarından birisi, kompleks organizma olarak tanımlanan memelilerde dahi protein kodlayan transkript sayısının sanılandan çok daha az olmasıdır. Örneğin insan genomunun sadece %2'si mRNA üretiminde kullanılmaktadır (Frith ve ark., 2005). Mevcut bilgiler genomun geri kalan kısmının boyut, miktar ve fonksiyonları değişen bir dizi protein kodlamayan transkript üretiminde kullanıldığını işaret etmektedir. Örneğin insan fibroblast hücrelerinin RNA içeriği derin sekanslamaya tabi tutulduğunda, RNA



Şekil 1. Apoptotik mekanizmada rol oynayan iç (intrinsic) faktörler. Apoptoz mekanizmasını tetikleyen değişik faktörler mavi üçgenlerle gösterilmiştir. Apoptozu tetikleyen/önleyen faktörler ve buna muteakip aktive edilen caspase enzimleri metin içerisinde açıklanmıştır (Danial ve Korsmeyer, 2004).

transkriptlerinin %70'den fazlasının intergenik ve intronik bölgelerden geldiği görülmüştür (Mondal ve ark., 2010). Genom kapsamlı transkript üretilmesinin sadece insanla sınırlı olmayıp *Drosophila*, fare ve mayada da olduğu dolayısıyla milyonlarca yıl önce değişik ökaryot türlerinin ayrıldığı ortak ata canlılarda da bulunduğu düşünülmektedir. Genomun diğer kısımlarından üretilen bu transkriptlerin yüksek ökaryot kompleksliğini algılamakta önemli katkıda bulunacağı ileri sürülmektedir (Wilusz ve ark., 2009).

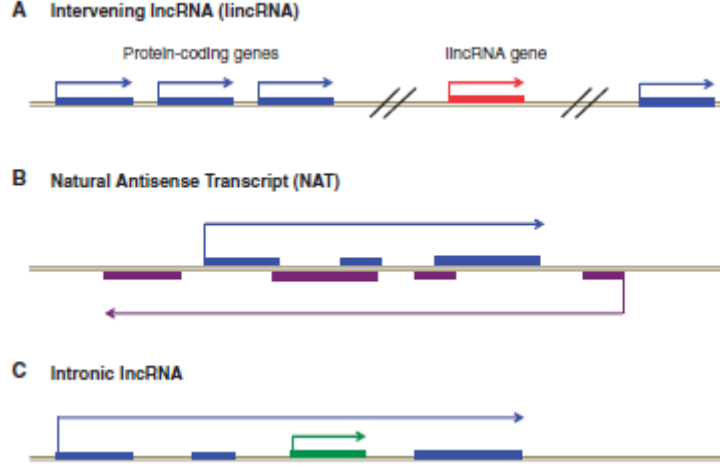
Uzun kodlamayan RNA'lar (ukmRNA'lar), genomik bölgelerin transkripsiyonu sonrası RNA'ya çevrilen, biyolojik olarak öneme sahip ancak proteine dönüştürülmeyen 200 nükleotitten büyük RNA molekülleridir (Costa, 2007). 200 nükleotitten küçük olanlar ise küçük RNA olarak adlandırılmaktadır. Moleküler biyolojinin santral dogmasına göre, bir hücre içerisinde bulunan tipik kodlamayan RNA'lar tRNA (taşıyıcı RNA), snRNA (küçük çekirdek RNA'ları), snoRNA (küçük çekirdekcik RNA'ları) ve rRNA (ribozomal RNA) gibi yapısal RNA'ları içermektedir. Bu RNA'ların dışında ilk kodlamayan RNA 1990 yılında farede tanımlanan *H19* RNA'sıdır (Brannan ve ark., 1990). Maternal ifade edilen ve aşırı ifadesi ölümcül olan *H19* RNA'sının biyolojik öneme sahip olduğu ve ilgili genetik lokusta oluşan defektlerin aşırı büyümeye yol açtığı gösterilmiştir. Genom dizilerinin çıkarılması ve derin sekanslama, tiling mikroarray ve ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) gibi metotsal gelişmelere paralel olarak ökaryotik transkriptomların sanılandan çok daha fazla kodlamayan RNA içerdiği algılanmaya başlamıştır. 7256 derin sekanslama verisinin bir araya getirildiği bir çalışmada, bir insan hücresinde 58,648 adet ukmRNA bulunduğu rapor edilmiştir (Klyer ve ark., 2015).

Bir RNA'yı kodlamayan RNA olarak sınıflandırmakta kullanılan kriterlerden en önemlisi açık okuma bölgesi (open reading frame) uzunluğudur (Dinger ve ark., 2008). Kodlamayan RNA'larda kısa açık okuma bölgeleri bulunma olasılığı ve veritabanlarında ki proteinlerin %95'den fazlasının 100 aminoasitten uzun bir boyuta sahip olması dikkate alınarak, 100 aminoasitten küçük açık okuma bölgesi içeren RNA'lar kodlamayan RNA olarak sınıflandırılmaktadır. Bazı uzun kodlamayan RNA'lar 100 aminoasitten uzun ancak fonksiyonel olmayan açık okuma bölgeleri içerebileceğinden, açık okuma bölgesi homolog varlığı göz önünde bulundurulmaktadır (Dinger, 2008). Ayrıca, aday RNA'da mRNA benzeri yapısal özellikler olup olmadığına da bakılmaktadır. Ancak belki de en sağlıklı yöntem deneysel olarak test yöntemidir. *In vitro* translasyon yöntemi kullanılarak RNA'nın retikülosit ekstraktları tarafından proteine dönüştürülüp dönüştürülmediği test edilebileceği gibi (Galindo ve ark., 2007) aşırı ifade edilen RNA'ların polizomlarda bulunup bulunmadığı araştırılabilir. Nitekim, protein kodlayan genler hücrelerde aşırı ifade edildiğinde, bu genlerden üretilen mRNA'ların polizomlarla etkileşimleri gerekmektedir.

2.2.1 Uzun Kodlamayan RNA'ların Sınıflandırılması

Genomik konumları dikkate alındığında, bazı ukmRNA'ların protein kodlayan genlerin 5' ve 3' uçlarından uzak bölgelerde, bazı ukmRNA'ların ise protein kodlayan genlerin promotör ve ilk intron ve ekzon bölgelerinden başlayarak sentezlendikleri görülmektedir (Moran ve ark., 2012). Bu grup RNA'lar sentezlendikleri genomik bölge ve yöne göre 3 kategoride toplanmaktadır (Şekil 2); (1) Intergenik ukmRNA'lar, protein kodlayan genlerden uzak bölgelerden sentezlenmektedirler. Ehnancer bölgeleriyle etkileşilebilmekle birlikte genellikle protein kodlayan genlerden bağımsız sentezlenmektedir; (2) NATs (Natural Antisense Transcripts, doğal ters yön transkriptleri) protein kodlayan genlerin 5' ve/veya 3' uçlarından sentezlenmekte ve genellikle ilgili genlere ters yönde bulunmaktadır. Ancak sense yönde olan transkriptlerde bulunmaktadır; (3) intronik ukmRNA'lar ise protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinden üretilmektedir.

Bu kadar geniş yelpazede değişik kodlamayan RNA üretilmesine rağmen, deneysel olarak fonksiyonları tanımlanmış kodlamayan RNA sayısı oldukça sınırlıdır. Ancak ukmRNA'ların *cis* ve *trans* formda gen regülasyonu, kromatin yapısını değiştiren proteinlerin yönlendirilmesi, X kromozom inaktivasyonu, genomik imprinting, nükleer kompartman oluşumu, çekirdekten sitoplazmaya molekül taşınması, öncül mRNA kırılması ve translasyonel kontrol gibi oldukça değişik hücresel işlevlerde görev aldıkları gösterilmiştir (Wang ve Chang, 2011; Lee, 2012; Moran ve ark., 2012; Yoon ve ark., 2012). Biyolojik



Şekil 2. Uzun kodlamayan RNA'ların lokasyonları baz alınarak sınıflandırılması. A. LincRNA (long intervening RNA) protein kodlayan genlerden uzak lokuslardan sentezlenmektedir. B. NAT (natural antisense RNA) protein kodlayan genlerin tersi istikamette (antisense) sentezlenmektedir. C. Intronik lincRNA (ukmRNA) ise protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinden sentezlenmektedir (Moran ve ark., 2012)

işlevleri araştırmak için yapılan çalışmalar, ukmRNA'ların hücre spesifik olarak ifade edildiğini, hücrenin değişik kompartmanlarında bulunabileceğini, gelişimi düzenlediğini ve hastalıklarla ilintili olduğunu göstermiştir (Wiluzs ve ark., 2009). Örneğin insanda *HoxA* lokusundan ifade edilen 231 intergenik kodlamayan RNA'nın %64'ü gelişime bağlı olarak farklı ifade edilmektedir (Rinn ve ark., 2007). UkmRNA'lar gelişim, dişilerde doz kompanzasyonu ve hücre siklusu gibi fizyolojik olaylar yanında kanser, metabolik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, ve hipertansiyon gibi önemli hastalıkların patogenezinde de rol oynamaktadır (Wapinski ve Chang, 2011; Harries, 2012).

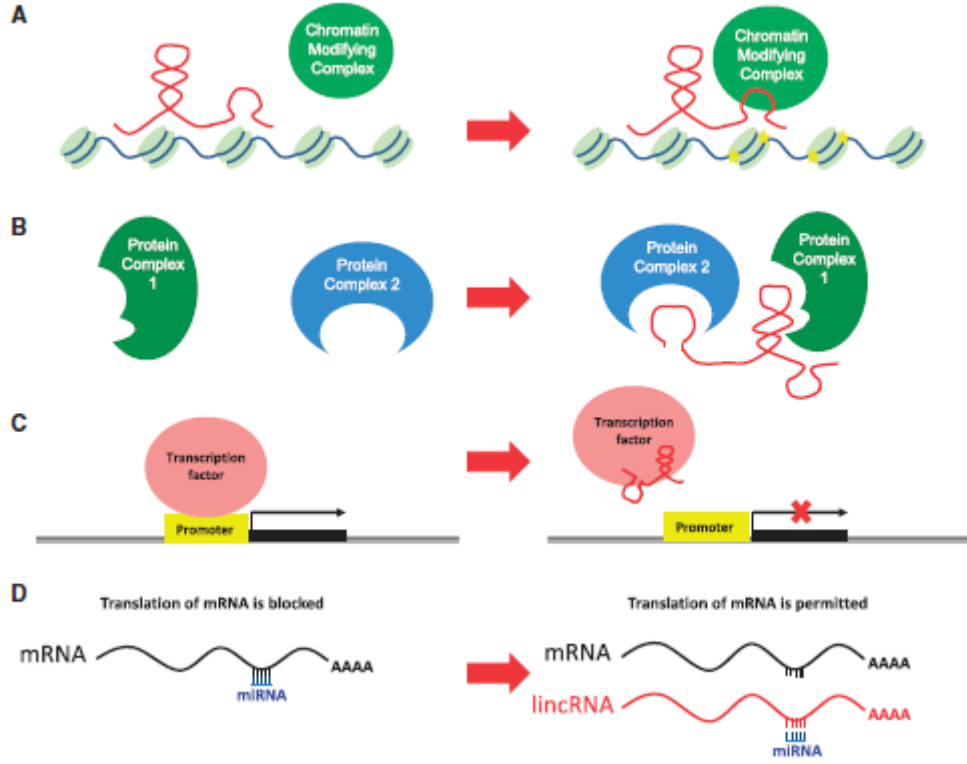
2.2.2 Uzun Kodlamayan RNA'ların Gen İfadesindeki Roller

UkmRNA'ların en şaşırtıcı fonksiyonlarından bir tanesi transkripsiyonel regülatör olarak görev yapmalarıdır (Moran ve ark., 2012; Quinn ve Chang, 2016). Klasik anlamda transkripsiyonel regülasyon düşünüldüğünde ilk akla gelen protein ve DNA etkileşimleridir. Transkripsiyon sonrası fonksiyonel bir protein veya RNA üretilmediği halde, ukmRNA'ların transkripsiyonu sonrası kromatin yapısında meydana gelen lokal değişiklikler nedeniyle yakında bulunan protein kodlayan genlerin ifadesinde değişiklikler oluşabilmektedir (Katayama ve ark., 2005). Bazen ise, bir ukmRNA'nın transkripsiyon ünitesinin bir kısmı protein kodlayan bir genin promotör veya gene kontrol bölgeleriyle çakışabilmektedir. Bu indirekt etkilerin yanında, ukmRNA'lar transkripsiyonu en az üç şekilde direkt olarak düzenleyebilirler (Şekil 3A-C). Birinci yöntemde, ukmRNA'lar transkripsiyon faktörlerini ve/veya ko-faktörlerini (örneğin kromatin düzenleyen proteinler, Şekil 3A) spesifik genomik lokuslara taşıyarak transkripsiyonu düzenlemektedirler. Epigenetik olarak bilinen bu tür

düzenlemelerde genomun nükleotit dizisinde bir değişiklik olmaksızın kimi genomik lokuslar spesifik olarak susturulmaktadır (Prasanth ve Spector, 2007). Örneğin, *Airn* uzun kodlamayan RNA'sı *Slc22a3*, *Slc22a2* ve *Igf2r* genlerini kapsayan bölgeyi kaplayarak G9a metil transferaz enziminin bu lokusa taşınmasını sağlamaktadır (Sleutels ve ark., 2002). İkinci yöntemde, ukmRNA'lar normalde protein-protein etkileşim bölgeleri bulunmayan proteinlerin çekirdekte birbirleriyle etkileşimlerini tetikleyebilirler (Şekil 3B). Nükleer proteinlere bağlanan ukmRNA'lar, proteinlerin aktivitelerini değiştirebilirler, dimerizasyonunu indükleyebilirler veya çekirdek içerisindeki yerlerinin değişimini sağlayabilirler. Bu tür etkileşimler ko-faktörlerin gen kontrol bölgelerine taşınmasında önemli rol oynayacağı gibi, RNA kırılmasında görevli proteinlerin aktivasyonunda da rol oynayabilirler. Örneğin, MALAT ukmRNA'sı çekirdekte özel bölgelere lokalize olmakta ve RNA kırılmasında rol oynayan proteinler için ara yüz molekülü (scaffolding molecule) görev yapmaktadır (Tripathi ve ark., 2010). Üçüncü yöntemde ise ukmRNA'lar transkripsiyon faktörlerinin gen promotör bölgelerine bağlanmalarını düzenleyebilirler (Şekil 3C). Örneğin, insan DHFR kodlamayan RNA'sı protein kodlayan DHFR promotörüne bağlanarak ilgili genin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Martianov ve ark., 2007).

Uzun kodlamayan RNA'ların gen regülasyonunda ki önemli görevlerinden birisi de küçük RNA üretiminde template görevi görmeleridir (Fejes-Toth ve ark., 2009; Quinn ve Chang, 2016). Tek bir transkriptten kökenlenen değişik küçük RNA'lar hücrenin değişik kompartmanlarında lokalize olarak birbirinden farklı fonksiyonları yerine getirebilirler. Örneğin, aslında uzun bir transkript olduğu bilinen ve X kromozom inaktivasyonunda rol oynayan *Xist* ve *Tsix* kodlamayan RNA'larından küçük RNA'larda üretildiği bildirilmiştir (Ogawa ve ark., 2008). İlginç bir şekilde bu küçük RNA'lar gen promotör bölgelerine ve/veya proteinlere bağlanarak transkripsiyonu düzenleyebilmektedirler.

UkmRNA'lar dördüncü yöntemde gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada kontrol edebilirler (Şekil 3B ve D). mRNA'ya veya proteinlere bağlanan ukmRNA'lar, mRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınma verimliliğini, sitoplazmada konumlanma bölgelerini veya translasyona uğrama oranlarını düzenleyebilirler. Örneğin, NRON ukmRNA'sı nükleositoplazmik taşıma proteinlerine bağlanarak NFAT transkripsiyon faktörünün çekirdekte birikmesini önlemektedir (Willingham ve ark., 2005). *Arabidopsis*'de yapılan bir çalışma ise IPS1 ukmRNA'sının miR-399'a bağlanarak ilgili miRNA'nın hedef PHO2 mRNA'sını düzenleme yeteneğini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Franco-Zorrilla ve ark., 2007).



Şekil 3. Uzun kodlamayan RNA tarafından gen ifadesinin kontrolünde kullanılan değişik mekanizmalar. A. UkmRNA'lar kromatin yapısını değiştiren proteinler için yönlendirici ve yastık görevi görebilir. B. Protein-protein etkileşim domaini bulunmayan proteinler için arayüz görevi üstlenebilir. C. Transkripsiyon faktörlerine bağlanan ukmRNA'lar, ilgili faktörlerin promötör bölgelerine bağlanmalarını engelleyebilirler. D. miRNA'lara bağlanan ukmRNA'lar, ilgili miRNA'ların hedef mRNA'larına bağlanmasını engelleyerek gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyebilirler (Moran ve ark., 2012)

2.3 Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Apoptoz

UkmRNA'ların gen regülasyonundaki potansiyel öneminin görülmesiyle birlikte, ukmRNA'ların insan hastalıklarındaki rolü sorgulanmaya başlanmıştır. Bu çabalar, ukmRNA'ların kanser, metabolizm, obezite, nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Harries, 2012; Wapinski ve Chang, 2012).

Literatürde ukmRNA'ların apoptozu düzenlediğine dair sınırlı bilgiler mevcut olup daha ziyade kanser oluşumu çerçevesinde odaklanmaktadır. Sistemik bir inceleme olmaksızın bireysel bazı ukmRNA'ların miktarları ile kanser ve/veya apoptoz-hücre proliferasyonu arasında ilişki kurulmuştur. LOX-IMV1 melanoma hücrelerinde SPRY4-IT1 ukmRNA'sının farklı ifade edildiği ve hücre invazyonu ve apoptozunda rol oynayabileceği gösterilmiştir (Khaitan ve ark., 2011). Açlığa bağlı stres şartlarında üretilen ukmRNA'ların belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada *Gas5* (growth-arrest-specific 5) ukmRNA'sının miktarının arttığı ve glukokortikoid reseptörü vasıtasıyla strese bağlı apoptozda rol

oynayabileceği rapor edilmiştir (Kino ve ark., 2010). Hücre siklusünde rol oynayan CDKN1A promotöründen sentezlenen ukmRNA'ların belirlenmesi için yapılan bir araştırmada, bu spesifik lokustan sentezlenen PANDA ukmRNA'sının NF-YA transkripsiyon faktörüyle etkileşerek apoptoz ve hücre siklusünü düzenlediği gösterilmiştir (Hung ve ark., 2011). P53 yolağında rol oynayan ukmRNA'ların belirlenmesi için farede yapılan bir çalışmada ise, Linc-p21 ukmRNA'sının DNA hasarına bağlı p53 aktivasyonu ve apoptozun tetiklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Huarte ve ark., 2010). Ozgur ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada ise, genotoksik ajanlarla muamele sonrası 10 aday ukmRNA'sından 7 adetinin miktarında değişimler olduğu gözlenmiş ancak fonksiyonel testler yapılmamıştır.

Henüz sistemik bir yaklaşımla apoptotik hücrelerin ukmRNA'larında meydana gelen değişimler rapor edilmemiş olmakla birlikte bireysel bazı ukmRNA'ların apoptotik yollara olan etkileri rapor edilmiştir. Örneğin, çekirdeğe lokalize olan Saf (antisense of Fas) ukmRNA'sı Fas reseptör öncül mRNA'sının kırılmasını düzenleyerek ekzon atlanmasına ve akabinde Fas ile tetiklenen apoptoza direnç yolu açmaktadır (Villamizar ve ark., 2016). Böbrek tümör hatlarında yapılan bir çalışmada ise, INXS ukmRNA'sının apoptotik hücrelerde miktarının arttığı ve ilgili ukmRNA'nın susturulması sonrası kaspaz 3, 7 ve 9 aktivitelerinde azalma olduğu görülmüştür (DeOcesano-Pereira ve ark., 2014). Bu ukmRNA'nın apoptotik yolağı BCL-XS yoluyla düzenlediği belirlenmiştir.

Literatürde mevcut bilgiler apoptozun düzenlenmesinde ukmRNA'ların rol oynayacağını işaret etmekle birlikte, mevcut veriler daha ziyade kanser ve DNA hasarına bağlı çalışmalardan elde edilmiştir. Bütünsel bir yaklaşım kullanılarak, sistemik olarak intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolların tetiklenmesinde rol oynanan ukmRNA'ların tamamı belirlenmemiştir. Özellikle ekstrinsik yolağın düzenlenmesinde rol oynayan ukmRNA'lar bilinmemektedir. HeLa, Jurkat ve MCF-7 hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmada intrinsik ve ekstrinsik yollar paralel olarak tetiklenerek, ukmRNA'ların miktarında meydana gelen değişimler derin sekanslama yöntemiyle belirlenmiştir. Aday ukmRNA'lar HeLa hücrelerinde susturularak apoptozda rol oynadıkları direkt olarak incelenmiştir. Ayrıca, aday ukmRNA susturulması sonrası transkriptom analizi yapılarak, aday ukmRNA'ların hangi hedef genleri düzenledikleri belirlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Memeli Hücrelerinin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması

HeLa, Jurkat ve MCF-7 hücreleri DSMZ GmbH'dan temin edilmiş ve RPMI 1640 (L-Glutamin ilaveli, Gibco) besiyerinde nemli ortamda 5% CO₂ 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 10⁶ hücre) oranında ekilmiş ve kullanım gerektirdiği durumlar Trypsin-EDTA (Gibco, 0.25%) ile kaldırılmıştır.

Hücrelerin apoptoza uğratılması için altı kuyucuklu plaklar kullanılmıştır (Sarsted). 0,3 X 10⁶ adet HeLa hücresi kuyucuklara ekildikten sonra sonra 1 gün büyütülmüştür. Bir sonraki günde 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, Floresan Mikroskopi ve Hücre Sayım Cihazı ile Belirlenmesi

Değişik doz ve zaman aralıklarında ligandlar ile muamele edilen hücrelerde meydana gelen apoptotik değişimler primer olarak akış sitometresinde incelenmiştir (Applied Biosystems Attune veya BD FACS). Erken apoptotik evredeki hücreler Aneksin V (BD), geç apoptotik evredeki hücreler ve ölü hücreler ise 7AAD (BD) ile boyanarak karakterize edilmiştir.. Boyama için Aneksin 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) Aneksin bağlanma 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 Aneksin 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 Aneksin 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 satrifüj 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 Hücrelerin GapMer ile Transfeksiyonu

Transfeksiyonun gerçekleştirileceği bir önceki geceden HeLa hücreleri (20.000 hücre/kuyucuk) 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Transfeksiyon zamanında besi yeri değiştirilerek serum ilaveli besi yeri ile hücreler transfeksiyona hazır hale getirilmiştir. Transfeksiyon reaktifi (FuGENE HD) ile aday ukmRNA'ların susturulmasında kullanılacak GapmeR'lerin (Exiqon) hibridizasyonu serum ilavesiz besiyerde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hacmi toplam olarak 100 ul'ye (her kuyucuk için) ayarlanmıştır. İlk önce oda sıcaklığındaki 98 µl besiyeri bir eppendorf tüpe eklendikten sonra üzerine 0,5 ul Gapmer (0,01 mM) eklenip çok kısa vortekslenmiştir. Besiyeri-GapmeR karışımının üzerine oda sıcaklığına getirilip vortekslenmiş 1,5 ul transfeksiyon reaktifi eklenip kısa bir süre vortekslenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Besiyeri-GapmeR-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 inkubatore (37 °C, %5 CO₂, nemli) konulup 48-72 saat inkübe edilmiştir.

3.4 Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri

Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra soğuk PBS ile iki defa yıkanmıştır. PBS ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 mL TRIzol (Life Technologies) eklenmiştir. Hemen izolasyon yapılamayan durumlarda hücre lisatları -80 °C'de saklanmış ve ekstraksiyon öncesi oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek nükleoproteinlerin tamamen ayrışmaları sağlanmıştır. Akabinde lisata her bir mL TRIzol için 0,2 mL Rnaz içermeyen kloroform (Sigma) ekledikten sonra numuneler 15 saniye elde çalkalanmış ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 12.000 xg'de 15 dk santifügasyon sonrası üst sıvı faz 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 NadoDrop (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.

3.5 Derin Sekan Analizleri

Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen ukmRNA'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 şey ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir numune üç tekrarlı hazırlandığından toplam 15 numune derin sekans için İsviçre'nin Fasteris firmasına gönderilmiştir (Illumina platformu).

Aday ukmRNA'ların gen ifadesini nasıl düzenlediklerini anlayabilmek için, aday ukmRNA'ların susturulduğu örneklerde kodlayan genler için ikinci bir RNA-seq çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada her bir muamele için üçer replika hazırlanmıştır. Negatif Gapmer ile tranfekte edilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Sadece sisplatin ile muamele edilen hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 3 aday Gapmer ile tranfekte edilen hücreler ise

test amaçlı kullanılmıştır (3+3+9=15 örnek). Bu analiz içinde Fasteris firmasından hizmet alımı yapılmış ve Illumina platformu kullanılmıştır.

3.6 Biyoinformatik Analizler

Kütüphanelerin sekanslanması sonrası elde edilen veriler öncelikle Bowtie ve TopHat programları kullanılarak insan genomunun GRCh37 versiyonuna eşleştirilmiştir. Eşleştirme sonrası elde edilen BAM dosyaları Cufflinks ile incelenerek transkriptler tanımlanmıştır. Akabinde Cuffdiff programıyla ilgili transkriptlerin miktarları, karşılaştırmalı analizi ve istatistikleri yapılmıştır. Kontrolle göre ifadesinde farklı olan ukmRNA'lar listelenmiş ve ilginç adaylar qPCR için seçilmiştir.

3.7 Real Time PCR Analizleri

RT-PCR öncesinde 1µg total RNA DNA eliminasyonu (RT2 First Strand Kit, QIAGEN) işlemine maruz bırakılmıştır. Bu amaçla 8 µl (1 µg) RNA örneklerine 2 µl gDNA Elimination Mix eklenip 5 dk 42°C inkübe edilmiştir. Daha sonra buzda 2 dk bekletildikten sonra 10 µl cDNA miks (dH₂O, primer, Revers Transkriptaz) eklenip 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonları, örneklerin 95°C'de 5 dk inkübe edilmesiyle durdurulmuş ve örnekler buzda 5 dk bekletilmiştir. Her bir reaksiyona 91 µl dH₂O eklenmiştir. Oluşan karışımdan 2 µl cDNA, 0,5 µl uygun primer, 3,75 µl dH₂O ve 6,25 µl qPCR Master Mix (QIAGEN) karıştırılıp uygun plakalarına aktarılmıştır. Kısa santrifüj sonrasında plaka LightCycler 480 (Roche) ekipmanına yerleştirilip analiz edilmiştir. Cihaz programı: 1 cycle 10 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, RT olmayan örnekler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Veriler GAPDH'e göre normalize edildikten sonra student's T test ile istatistiki analize tabi tutulmuştur.

3.8 Western Blotlama

Toplam protein izolasyonu için RIPA tamponu (Cell Signalling) kullanılmıştır. Tripsin ile kaldırılmış hücreler 2 defa soğuk PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine RIPA (50 µl /10⁶ hücre) ve 100X pteaz kokteyl (SantaCruz) (1X olacak şekilde) eklenip 20 dk buz üzerinde bekletilere parçalanmıştır. Oluşam süspansiyon 10 dk 4 °C'de 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant 2 veya üçe bölünüp kullanıma kadar -80 °C dolabında muhafaza edilmiştir. Protein konsantrasyonu Bradford Assay ile belirlenmiştir.

Hücre lizatları 4X protein yükleme boyası (40% gliserol, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromfenol mavisi, 5% beta-merkaptotanol) ile uygun oranda karıştırılıp 5 dk 95 °C'de kaynatılmıştır. Sonrasında örnekler %5 üst/%15 alt SDS jelde [dH₂O, 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 membranı (Milipore) arasında 'sandviç' yapılp bir gece transfer tamponunda [25 mM Tris, 190 mM glisin and %20 metanol (h/h)] 30 V uygulanarak proteinlerin membrana geçişi sağlanmıştır. Transfer işleminin kontrolü için membran Poncea S [0.1% (a/h) Ponceau S in 5% (h/h) asetik asit] boyası ile 30 dk inkübe edildikten sonra 10 dk distile su ile yıkanarak proteinlerin transfer verimliliği incelenmiştir. Daha sonra filtreler membran bloklama tamponu (1X TBS, 0.05% Tween20, 0.5% yağsız kuru süt) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanmıştır. Uygun primer antikor 1:5000 oranında %0,5 süt/%0,05 Tween20/1X TBS içerisinde dilue edilerek membran ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sırasında solüsyon çalkalanmıştır. Ardından 45 dk boyunca en az 5 defa 1x TBS-Tween20 ile membranlar yıkanmıştır. Sekonder primerle bir sonraki saat oda sıcaklığında çalkalandıktan sonra yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Son olarak görüntüleme için kemilüminesan SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) membrana 500 µl civarında eklenip 2 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra VersaDoc MP 4000 Molecular Digital Imaging System (BioRad) (IYTE BioMer) veya Fusion SL (PEQLAB) cihazı kullanılarak görüntü alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi

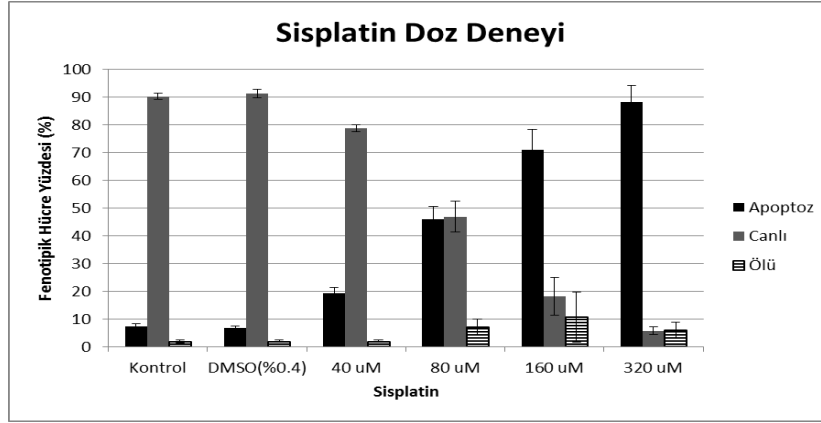
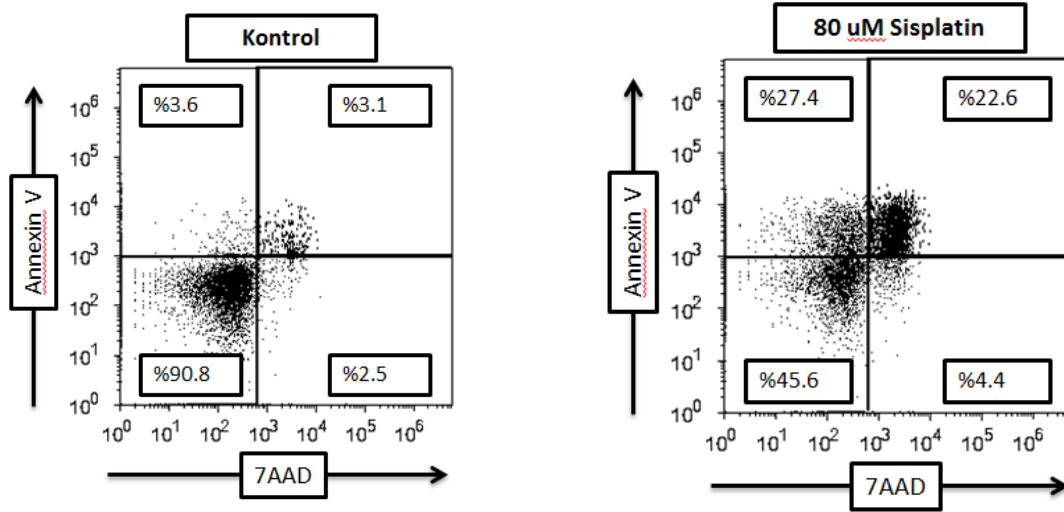
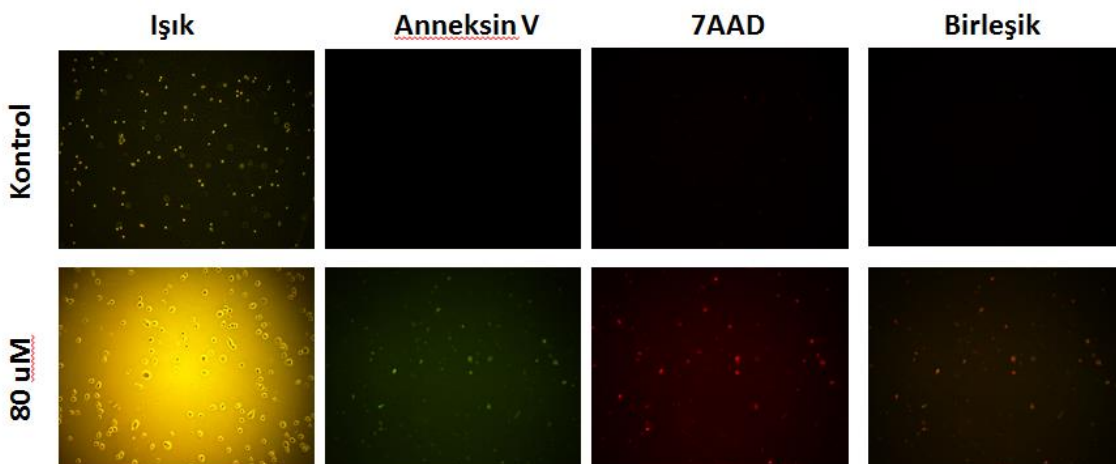
Proje önerisinde belirtildiği üzere, insan hücrelerinde apoptozu tetiklemek için HeLa hücreleri model olarak seçilmiştir. Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana yolak ile tetiklenebileceğinden, her iki yolağı tetiklemek için iki ayrı ajan seçilmiştir: Intrinsik yolağı tetiklemek için sisplatin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

4.1.1 Sisplatin İle İnstrinsik Yolağın Tetiklenmesi

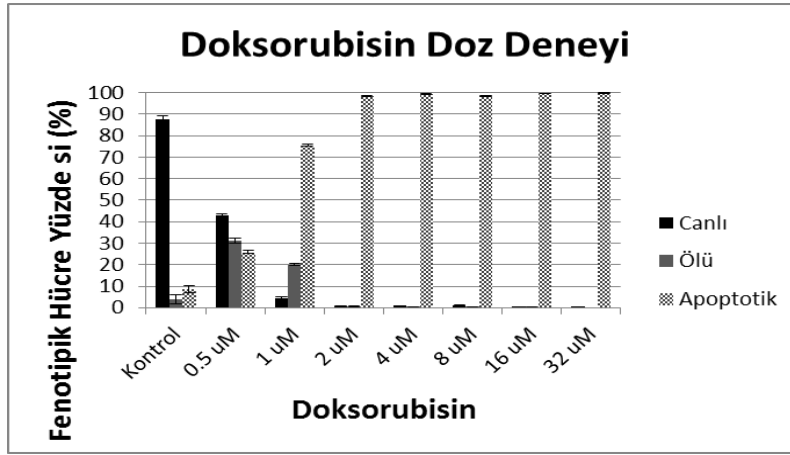
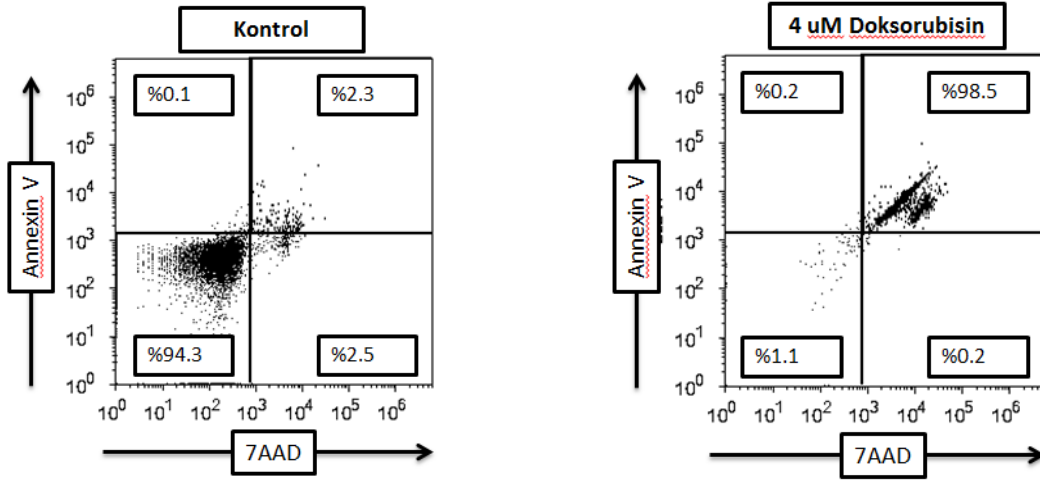
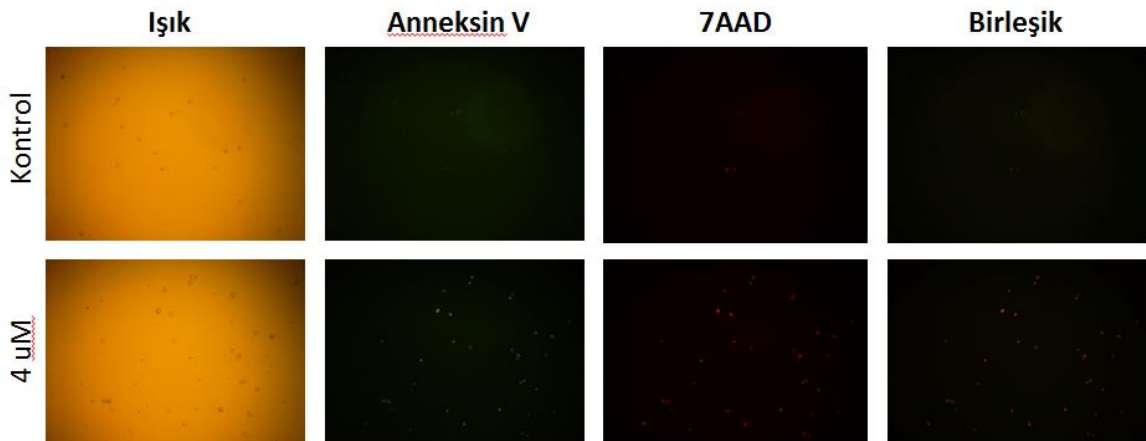
Literatür bilgileri dikkate alındığında 5 µM sisplatin konsantrasyonu apoptozu tetiklemek için yeterli olmakla birlikte, ilk yaptığımız denemeler bu dozun HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemek için yetersiz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle daha yüksek dozlar denenerek 16 saatlik kültür koşulları oluşturulmuştur. Apoptoz oranları akım sitometresinde Annexin V (fosfatidil serin eksternalizasyonu ve dolayısıyla erken apoptotik evre) ve 7AAD boyaması (DNA fragmantasyonu ve dolayısıyla geç apoptotik evre) yapılarak ölçülmüştür. Şekil 4'te görüldüğü üzere, 16 saatlik kültürlerde HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında (Apoptoz oranı= AnnexinV pozitif hücreler + AnnexinV-7AAD duble pozitif hücreler) doza bağlı bir artış görülmüştür. Kontrol hücrelerinde apoptoz oranı %6,7 iken, bu oran 80 µM sisplatin muamelesi ile %50'ye ulaşmıştır (Şekil 4B). Kantitatif bir ölçüm olmamakla birlikte, destekleyici veri sağlaması açısından, apoptozu ölçmek için ayrıca tripan mavisi ile boyama, Countess hücre sayım cihazı ile ölçüm ve floresan mikroskopide kullanılmıştır (Şekil 4C).

4.1.2 Doksorubisin İle İnstrinsik Yolağın Tetiklenmesi

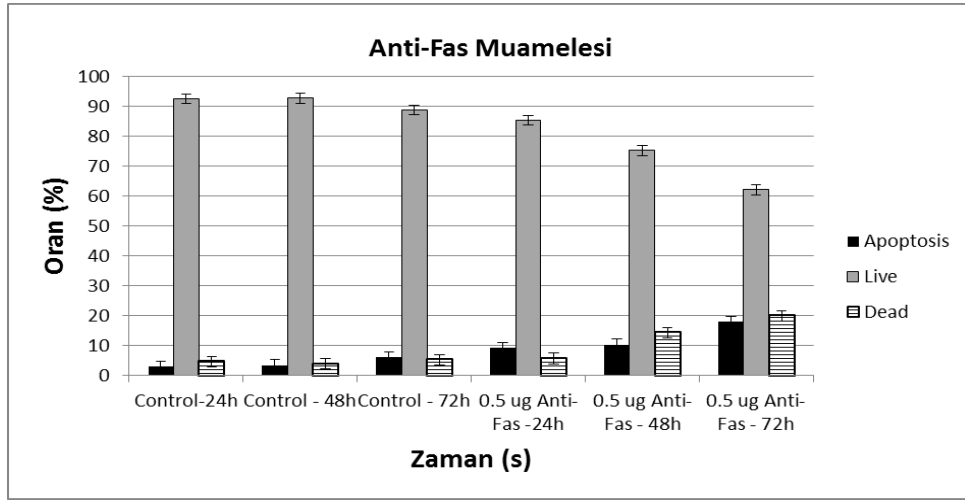
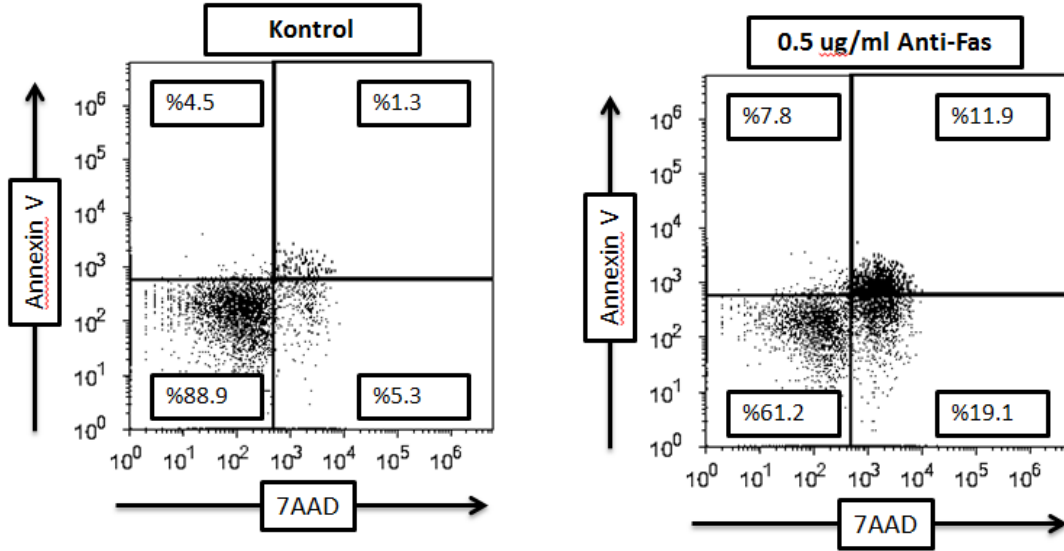
Ön çalışmalar kısa süreli doksorubisin uygulamalarının apoptozu tetiklemek için yeterli olduğunu göstermiştir (2-8 saat). Bu bulgular ve literatür bilgileri ışığında, 0.5-32 uM doksorubisin kullanılarak 4 saatlik kültürler dizayn edilmiş ve hücrelerin apoptoz oranları akım sitometresi ile ölçülmüştür. Sisplatinle muamele de olduğu üzere, kalitatif olarak tripan mavisi ile boyama, Countess cihazı ile hücre sayımları ve floresan mikroskop ile görüntüleme de yapılmıştır. Kantitatif flow sitometrik analizler baz alındığında, Şekil 5'te görüldüğü üzere, HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında doza bağlı bir artış görünmektedir.

A**B****C**

Şekil 4. HeLa hücrelerinde sisplatin doz tespiti. (A) 1 milyon HeLa hücresi 16 saat boyunca değişik konsantrasyonlardaki sisplatin ile apoptoza uğratıldı ve Akış Sitometri yardımıyla fenotipe dayalı analiz edildi. Annexin V ve 7AAD floresan boya ile sağlıklı, apoptotik, ve ölü hücreler ayırt edildi. Her muamele üç defa tekrar edildikten sonra student t test analizi uygulanmıştır. İlaç eklenmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. (B) Akış sitometrisi dot blot analizi. Apoptoz oranlarının hesaplanmasında, Annexin V single pozitif ve Annexin-7AAD çift pozitif hücrelerin toplamı kullanılmıştır (kontrolde %6.7 iken ajanla muamele sonrası %50). (C) Floresan mikroskopik analiz.

A**B****C**

Şekil 5. HeLa hücrelerinde doksorubisin doz tespiti. (A) 1 milyon HeLa hücresi 4 saat boyunca değişik konsantrasyonlardaki doksorubisin ile muamele edilerek apoptoza uğratılmış ve Akış Sitometri yardımıyla Şekil 4'te açıklandığı şekilde fenotipe dayalı analiz edilmiştir. (B) Akış sitometresi dot blot analizi. (C) Elektron mikroskopik görüntüler.

A**B**

Şekil 6. HeLa hücrelerinde anti-fas zaman tespiti. (A) 1 milyon HeLa hücresi değişik zaman aralığında 0.5 ug/mL anti-fas antikoruyla (milipor) muamele edilerek apoptoza uğratılmış ve Akış Sitometri yardımıyla fenotipe dayalı analiz edilmiştir. Annexin V ve 7AAD boyamalarının yardımıyla sağlıklı, apoptotik ve ölü hücreler ayırt edilmiştir. Her muamele üç defa tekrar edildikten sonra ortalama ve standart sapma hesaplanmıştır. İlaç eklenmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. (B) 72 saat süreyle 0.5 ug/mL anti-fas antikoruyla muamele edilen HeLa hücrelerinin Akış sitometresinde dot blot analizi.

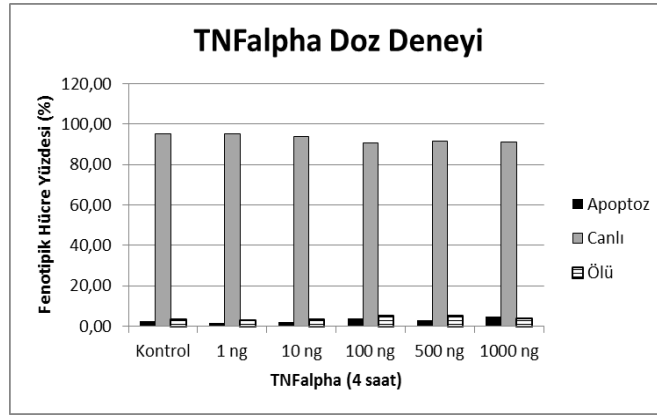
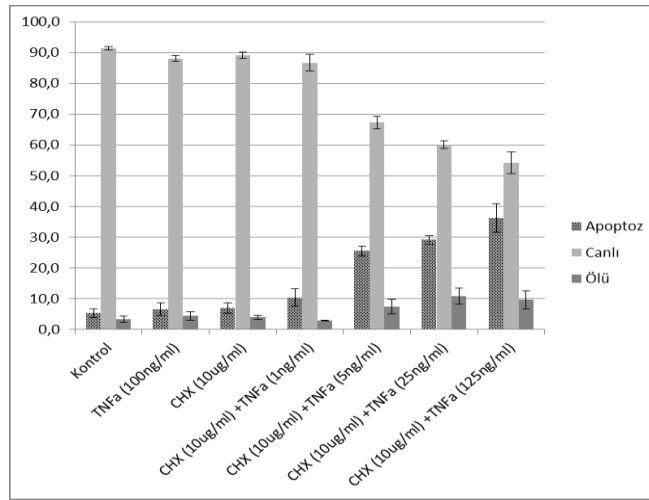
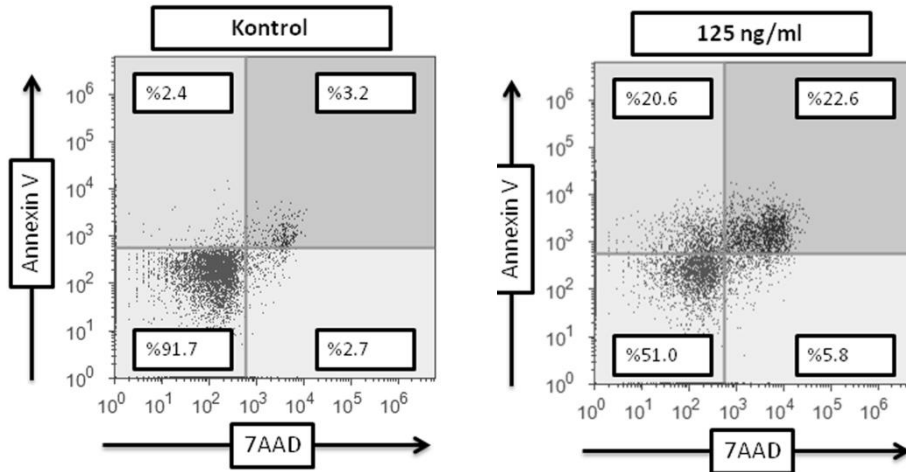
Doksorubisin ile muamele edilen hücreler sisplatin ile muamele edilen hücrelerden farklı davranmakta ve sadece Annexin V pozitif olmadan direkt Annexin-7AAD çift pozitif olmaktadır. Bu nedenle 2 uM doz sonrası hücrelerin büyük bir kısmı (%90 üzeri) Annexin-7AAD çift pozitif olarak kalmaktadırlar. Şekil 5A'da sunulan veri dikkate alındığında, HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemek için 4 uM doz ve 4 saatlik muamelenin uygun olduğu kararına varılmıştır. Bu verinin flow sitometrik analizi Şekil 5B'de, floresan mikroskopik analizin ise Şekil 5C'de sunulmuştur.

4.1.3 Anti-Fas İle Ekstrinsik Yolağın Tetiklenmesi

Literatür verileri ve ticari firmanın önerileri dikkate alınarak 0.5 ug/mL doz kullanımı için doğru zamanın belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanılan antikorun oldukça pahalı olması nedeniyle kısmen sınırlı saat aralığı seçilmiş ve 24-72 zaman aralığında kültürler konulmuştur. 0.5 ug/mL doz kullanımı 72 saat sonunda %19,7 (%7,8 AnnexinV + %11,9 Annexin-7AAD pozitif) apoptozu yol açmıştır (kontrolde % 5,8) (Şekil 6). 72 saatlik anti-fas muamelesine tabi tutulan hücrelerdeki apoptoz oranının flow sitometrik analiz verisi Şekil 6B'de sunulmuştur. Bu kadar uzun süreli muamele sonucu dahi apoptoz oranının %20 civarında kalması literatür verileriyle oldukça uyumludur (Hippe ve ark., 2008). HeLa hücreleri az FAS reseptörü içerdiğinden Jurkat hücreleri gibi duyarlı olmamaktadırlar. Bu nedenle kültür koşulu olarak 0,5 ug/mL ajan ve 72 saatlik süre seçilmiştir.

4.1.4 TNF-alfa İle Ekstrinsik Yolağın Tetiklenmesi

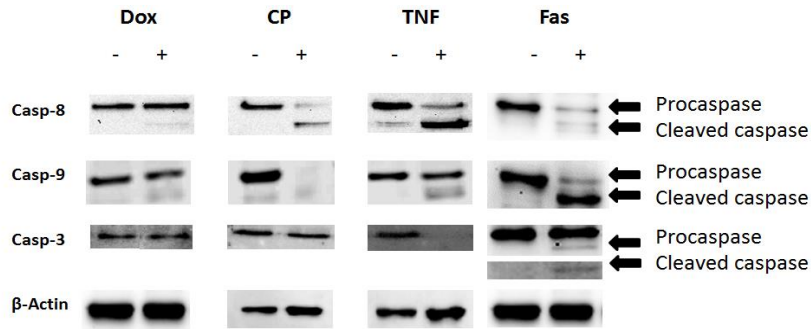
TNF-alfa proje önerisinde ekstrinsik yolağı tetiklemek için ikinci ajan olarak seçilmiştir. Bu amaçla 1-1000 ng/ml dozlarında 4 ve 24 saatlik kültür koşullarında ajan ile muameleler yapılmıştır. Ancak hiçbir doz ve zaman aralığında, kontrol hücrelerine göre artış gösteren bir apoptoz oranı belirlenememiştir (Şekil 6A). Yapılan literatür araştırmasında HeLa hücrelerinde TNF-alfa ile eksternal yolağın tek başına tetiklenemediği, bunun için ikincil ajanların (örneğin protein sentezini bloklayan emetin (Fraisse ve ark., 1998) kullanılması önerilmektedir. Bu bağlamda sikloheksimid ile kombine edilerek 8 saatlik kültürler konulmuştur. Bu ligandın çok pahalı olması nedeniyle kontrolde görülen %5'lik ölümle karşılaştırıldığında TNF-alfa/sikloheksimid ile uyarılan %35'lik ölümün yeterli olacağı şeklinde değerlendirilmiştir.

A**B****C**

Şekil 7. HeLa hücrelerinde TNF-alfa/sikloheksimid ile apoptozun tetiklenmesi. $0,5 \times 10^6$ HeLa hücresi ilaç muamelesinden 24 saat önce altı kuyucuklu flaslara ekilmiştir. Ertesi gün dört (A) veya sekiz (B) saat süreyle TNF-alfa ile muamele edilmiştir. Akım sitometresi kullanılarak fenotipe dayalı apoptotik, canlı ve ölü hücre yüzdeleri belirlenmiştir. CHX, sikloheksimid. (C) 125 ng/mL TNF-alfa (10 ug/mL sikloheksimid ile birlikte) muamelesinin akım sitometrisi dot blot analizi.

4.1.5 Apoptotik Yolakların Tetiklenmesinin Western Blotlamayla Analizi

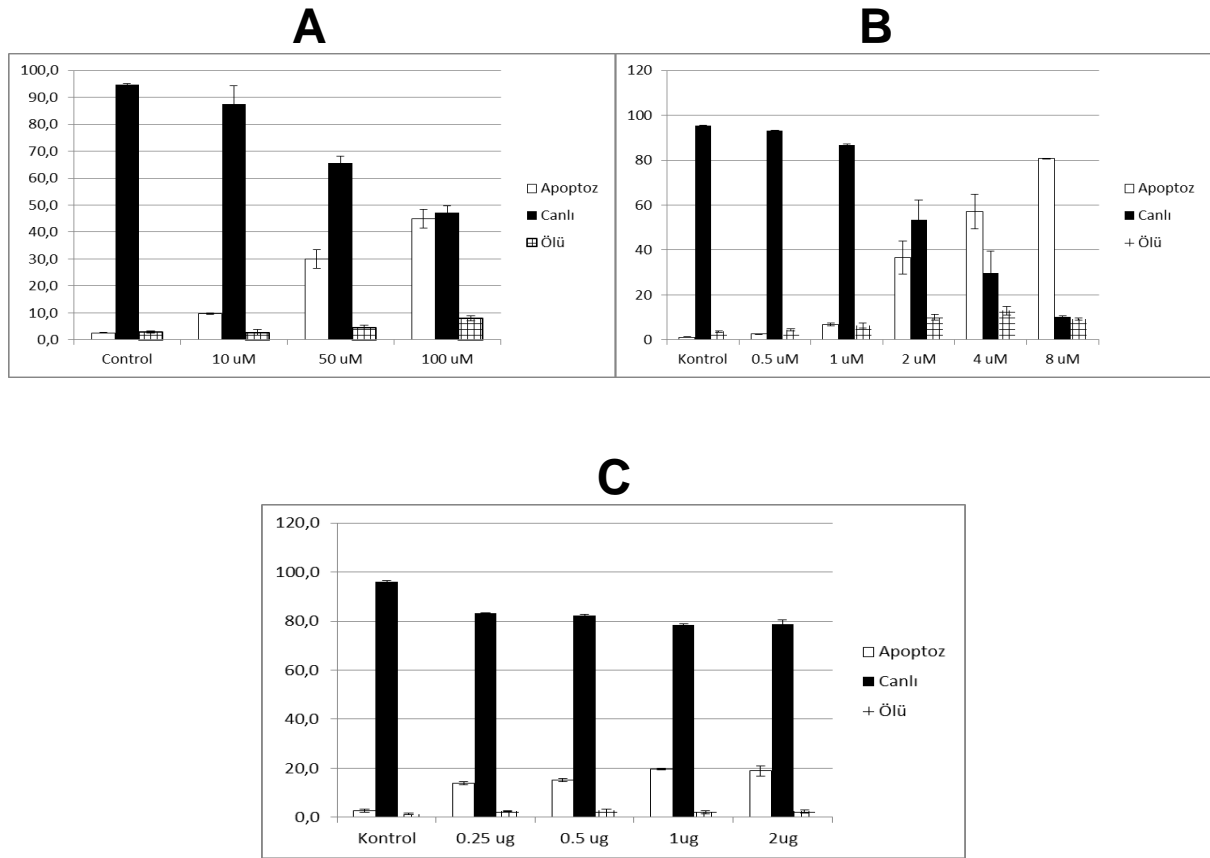
Her bir ajanla muamele sonrası gerekli yolakların tetiklendiğinin anlaşılması için apoptozun tetiklendiğinin önemli göstergelerinden olan kaspaz-8, -9, ve 3 aktivasyonuna bakılmıştır. Öncelikle doğru birincil ve ikincil antikor konsantrasyonlarının tespiti için bir dizi ön çalışmalar yapılmıştır. Deneysel optimizasyon sağlandıktan sonra yapılan çalışmalarda (Şekil 8) ekstrinsik yolağın TNF veya Fas ile aktivasyonu kaspaz 8 aktivasyonuna neden olmuştur. Buna karşın doksorubisin ve CP kısmen daha az aktivasyona yol açmıştır. Kaspaz 9 normalde intrinsik yolağın tetiklenmesinde aktive olmaktadır. Sisplatin ile muamele sonrası beklendiği üzere prokaspaz 9'un azaldığı görülmektedir. Ancak TNF ve Fas muamelesi de muhtemelen çapraz konuşma ile kaspaz 9 aktivasyonuna neden olmaktadır. TNF akabinde dramatik bir şekilde kaspaz 3 aktivasyonu görülmekle birlikte bu aktivasyon deneyin yapıldığı koşullarda sisplatin için sınırlı görülmektedir.



Şekil 8. HeLa hücrelerinde apoptos sonrası kaspaz aktivasyonu. 1 milyon HeLa hücresi Şekil 2'de belirtilen koşullarda apoptoza uğratılmış ve RIPA solüsyonuyla protein ekstraktı elde edilmiştir. 50 ug ekstrakt %10'luk SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra kaspaz 8 (Casp-8), kaspaz 9 (Casp-9) ve kaspaz 3 (Casp-3) antikoruyla inkübe edilmiştir. Beta aktin (b-Actin) normalizasyon için kullanılmıştır. Dox, doksorubisin; CP, sisplatin.

4.1.6 Jurkat Hücrelerinde Apoptotik Yolakların Tetiklenmesi

Farklı ifade edilen uzun kodlamayan RNA'ların hücre-spesifik bir ifadeye tabi olup olmadıklarını araştırmak için adayların ifadeleri HeLa hücreleri yanında Jurkat ve MCF-7 hücre hatlarında da bakılmıştır. Bu hücre hatlarında da HeLa hücrelerine benzer bir doz kinetiği gözlenmiştir. Örneğin, Jurkat hücrelerinde 100 uM sisplatin 16 saat sonunda %44,9 apoptoza yol açmıştır (Şekil 9A). Dört saatlik doksorubisin muamelesi 4 uM konsantrasyonda %57 oranında apoptoza yol açarken (Şekil 9B) anti-Fas uygulaması 1 uM konsantrasyonda %19,6 oranında apoptoza neden olmuştur (Şekil 9C).



Şekil 9. Jurkat hücrelerinde sisplatin, doksorubisin ve anti-Fas ile apoptozun tetiklenmesi. $0,5 \times 10^6$ Jurkat hücresi ilaç muamelesinden 24 saat önce altı kuyucuklu flaklara ekilmiştir. Ertesi gün değişik konsantrasyonlarda sisplatin (Panel A, 16 saat), doksorubisin (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 İle Farklı İfade Edilen ukmRNA'ların Belirlenmesi

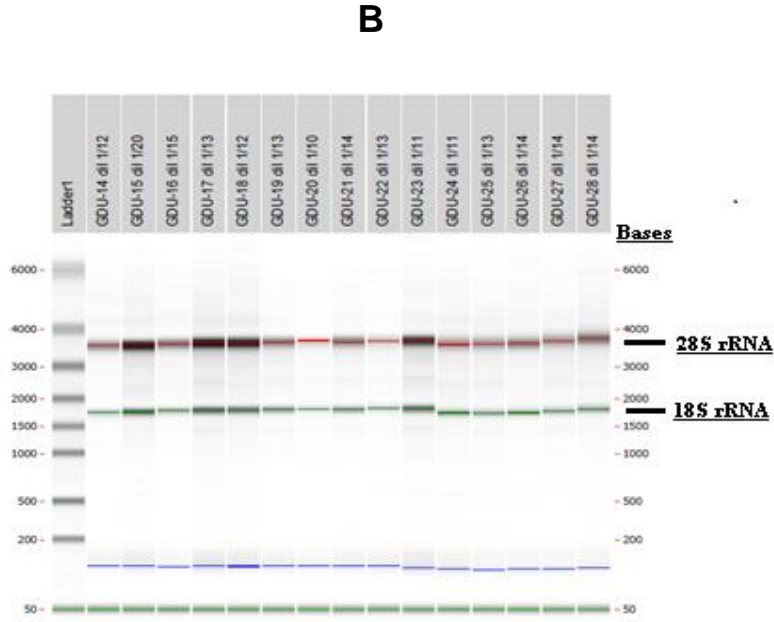
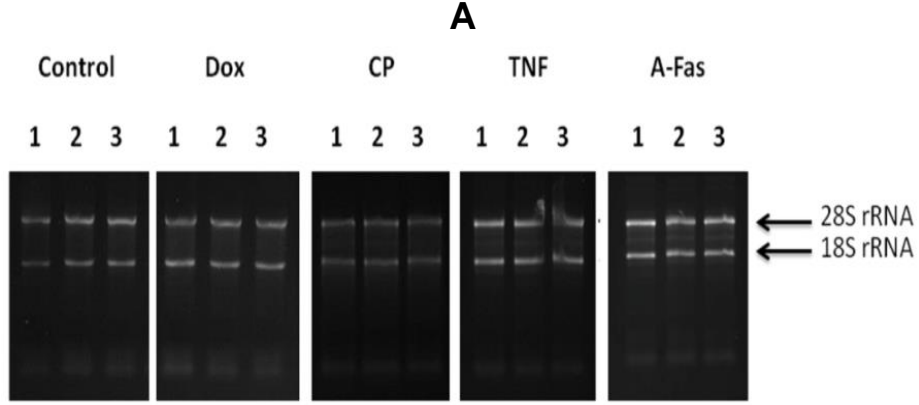
Apoptozun regülasyonunda rol oynayan ukmRNA'ları belirlemek için daha kapsamlı olması bakımından derin sekans analizi kullanılmıştır. Bu bağlamda öncelikle HeLa hücreleri 4.1'de ifade edilen doz ve zaman aralığında 4 farklı ligand ile muamele edilmiştir. Böylece apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan ukmRNA'ların farklı ifadeleri sağlanmıştır. Buna müteakip ilgili hücrelerden RNA izole edilip derin sekans analizi yapılmıştır. Hiçbir ligand ile muamele edilmeyen hücrelerde tespit edilen ukmRNA ifade miktarı baz alınarak ifadelerinde farklılık olan aday ukmRNA'lar dokümente 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 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 10'da 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.

4.2.2 Derin Sekans Analiziyle Farklı İfade Edilen ukmRNA'ların Belirlenmesi

Toplam 15 örnek Illumina platformu kullanılarak RNA-seq çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu çalışma için Fasteris (İsviçre) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. . Elde edilen ham data verilerine göre, bir örnekten en az 663 en fazla 1582 Mb veri elde edilmiş, bu verilen ortalama %93'ü filtrelemeyi %94'ü minimal kalite kontrol 30'u geçmiştir. Bu verilerin yeterli olması nedeniyle detaylı biyoinformatik analizlere geçilmiştir. Biyoinformatik analizler hem bu firmaya hemde Bölümümüz öğretim üyesi Doç. Dr. Jens Allmer grubu olmak üzere iki bağımsız gruba yaptırılmıştır. Verilerin insan genomuna eşleştirilmesi sonrası %95-97 oranında eşleşme elde edilmiştir (Tablo 1). Farklı ifade edilen adaylar, RNA biyotipide dikkate alınarak kantifiye edilmiş ve kontrol grubuna göre apoptozun tetiklendiği hücrelerdeki ukmRNA miktarındaki değişimler belirlenmiştir.



Şekil 10. Toplam RNA örneklerinin kalite kontrol analizi. Beşer milyon HeLa hücreleri 4 μ M doksorubisin ile 4 saat (Dox), 80 μ M cisplatin ile 16 saat (CP), 125 ng/mL TNF- α ile 8 saat (TNF) ve 0.5 μ M anti-fas ile 16 saat (A-Fas) muamele edildikten sonra flow sitometri ile apoptoz oranları belirlenmiştir. Hiç bir ajanla muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür sonrası trizol rejanı kullanılarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA konsantrasyonu Nanodrop ile ölçülmüştür. **(A)** RNA'ların agaroz jelde analizi. Örnekler her bir kuyucukta 1 μ g toplam RNA olacak şekilde %1 agaroz jelde yürütülmüştür. Sıralar 1-3, biyolojik replikalar 1-3. **(B)** RNA'ların Bioanalyzer ile analizi. GDU14-16 kontrol RNA'lar; GDU17-19 cisplatin; GDU20-22 doksorubisin; GDU23-25 TNF- α ve GDU26-28 anti-Fas.

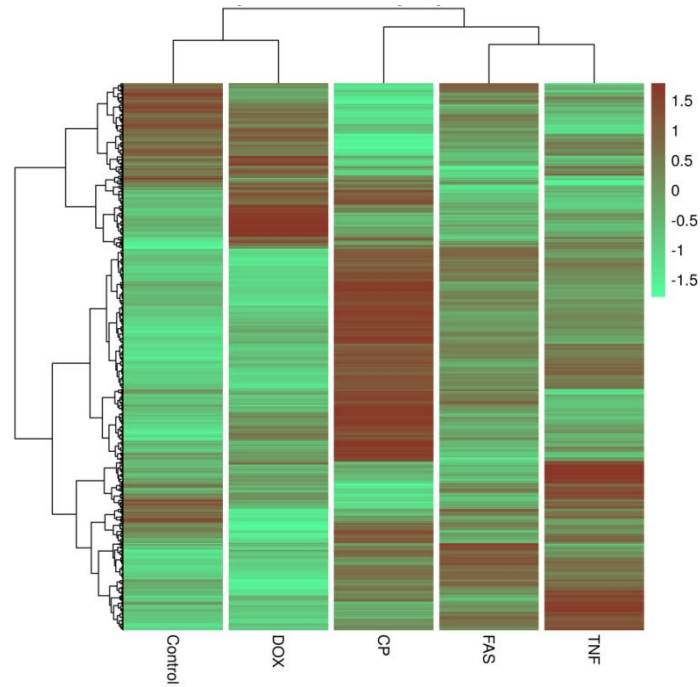
Tablo 1. Derin sekans verilerinin insan genomuna eşleşme oranları

Library	RNA Quality Score	Reads	Primary Mappings	% of Primary Mappings	Alternate mappings
Control (1)	9.3	19,478,665	19,066,837	97.89%	5,031,257
Control (2)	9.2	13,977,569	13,636,817	97.56%	3,451,273
Control (3)	9.4	13,989,348	13,640,586	97.51%	3,476,351
Cisplatin (1)	9.0	16,695,258	15,975,390	95.69%	6,082,994
Cisplatin (2)	9.3	18,871,780	17,888,988	94.79%	7,554,017
Cisplatin (3)	8.9	16,922,803	16,051,158	94.85%	6,122,212
Doxorubicin (1)	7.7	13,255,959	12,888,311	97.23%	3,920,319
Doxorubicin (2)	8.8	13,635,427	13,293,528	97.49%	3,732,917
Doxorubicin (3)	7.9	15,485,199	15,148,239	97.82%	4,883,967
TNF-alpha (1)	8.9	15,720,221	15,243,443	96.97%	4,475,529
TNF-alpha (2)	8.3	19,665,744	18,901,417	96.11%	6,027,820
TNF-alpha (3)	8.6	20,958,445	20,121,618	96.01%	6,417,161
anti-Fas (1)	9.3	22,066,898	21,090,702	95.58%	7,061,540
anti-Fas (2)	8.6	19,332,230	18,460,235	95.49%	5,994,549
anti-Fas (3)	9.1	18,825,067	18,129,644	96.31%	6,015,316

Tablo 2. Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen bazı ukmRNA'ların sayısı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ifadelerinde farklılık olan ukmRNA'lar belirlenmiştir. Fonksiyon tanımlamakta kolaylık olacağı dikkate alınarak kodlayan genlere yakın (sense-intronic ve sense-overlapping) ukmRNA'lara öncelik verilmiştir. Dört muamelede ortak adaylar "total (common)" olarak işaretlenmiştir.

	Cisplatin	Doxorubicin	TNF-alpha	Anti-Fas mAb	Total (common)
Antisense	851	225	368	284	124
Sense-intronic	121	71	47	26	15
Sense-overlapping	26	15	18	10	3
lincRNA	646	195	374	264	100
Total (drug-specific)	1644	506	807	584	242

Öncelikli olarak farklı ifade edilen RNA'lar biyotiplerine göre (örneğin, kodlayan RNA, miRNA, pseudogen, tRNA, kodlamayan RNA..vb) sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma sonrası kodlamayan RNA'lara öncelik verilmiştir. Farklı ifade edilen ukmRNA'lar kümelendiklerinde (Şekil 11), gen ifade örtülerinin TNF-alfa ve anti-Fas muamelelerinde benzer, doksorubisinde ise oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Genomdaki lokasyonlarına göre, genler arası bölgelerden ifade edilen lincRNA'lar ukmRNA'ların büyük çoğunluğunu oluştururken, kodlayan genlerin 5' ve 3' uçlarına düz ve terz oryantasyonda eşleşen ukmRNA'lar ikinci önemli grubu oluşturmaktadır. Ayrıca intronik ukmRNA'larda mevcuttur. Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen ve en bilinen RNA biyotipine sahip aday ukmRNA'ların sayısı Tablo 2'de sunulmuştur. Bu adayların sayısını azaltmak için, öncelikle 4 ligandla muameleden en azından üçünde farklı ifade edilen ve kodlayan genlerin intronlarından köken alan yada bu genler kısmi olarak eşleşen ukmRNA'lardan 20 adet en çok azalan ve 20 adet en çok artan ukmRNA'lar belirlenmiştir (Tablo 3). Bu adaylar apoptotik hücrelerde en az 2 kat farklı ifade edilmekte olup istatistiki analizlere göre bu farklı anlatım istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu adaylar tek tek incelenerek apoptotik yolakta rol oynadığı rapor edilen kodlayan genlere sense veya antisense pozisyonda eşleşen ve dolayısıyla bu genleri düzenleme ihtimali olan ukmRNA'lara öncelik verilmiştir. Bu kriterler dikkate alınarak 4 aday qPCR ile validasyon ve fonksiyonel testler için seçilmiştir (Tablo 3). Bu adaylar GTF2A1, TNFRSF10B, CAMTA1 ve FAF1 kodlayan genleriyle kısmi eşleşen ukmRNA'lardır.



Şekil 11. Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen ukmRNA'ların kümelmesi

Tablo 3. Apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen ve kodlayan genlere kısmi olarak eşleşen veya intronlarından köken alan ukmRNA'lar. (A) miktarları artan ukmRNA'lar. (B) miktarları azalan ukmRNA'lar. Antisense, kodlayan genin 5' veya 3'na ters oryantasyonda transkribe edilen ve kısmi çakışma olan ukmRNA'lar; sense-intronic, ilgili kodlayan genin bir intronundan kodlayan genle aynı oryantasyonda olan ukmRNA'lar; sense-overlapping, yapısal olarak "antisense"e benzer ancak kodlayan genle aynı yönde transkribe edilen ukmRNA'lar. Bu adaylardan GTF2A1, TNFRSF10b, CAMTA1 ve FAF1 kodlayan genlerine yakın olan ukmRNA'lar fonksiyonel testler için aday olarak seçilmiştir.

A

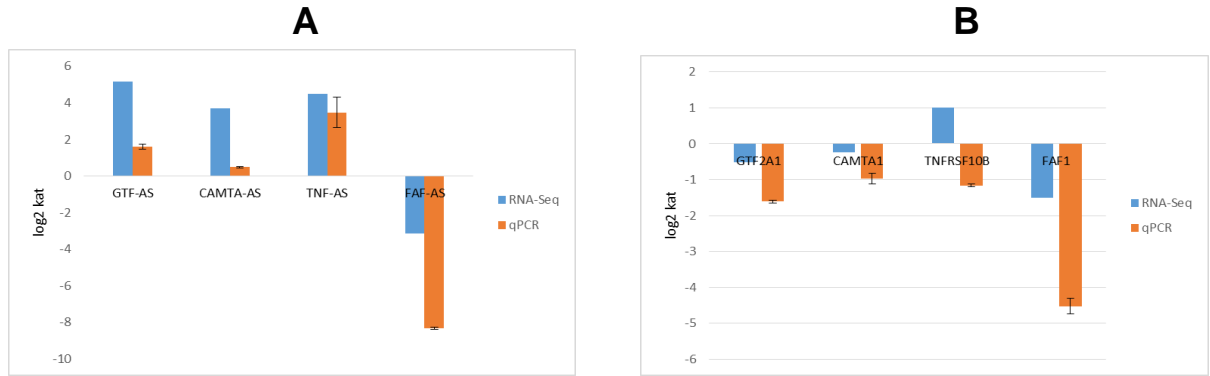
Ensembl ID	Type	Coding Genes in Antisense/Sense Position
ENSG00000273783	antisense	GTF2A1 (general transcription factor IIA, 1, 19/37kDa (TFIIA))
ENSG00000261335	antisense	MXRA7 (matrix-remodelling associated 7)
ENSG00000246130	antisense	TNFRSF10B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b)
ENSG00000261360	antisense	OTULIN (OTU deubiquitinase with linear linkage specificity)
ENSG00000227527	sense-overlapping	FOXJ3 (forkhead box J3)
ENSG00000260898	antisense	ADPGK (ADP-dependent glucokinase)
ENSG00000233230	antisense	FBXO11 (F-box protein 11)
ENSG00000260708	antisense	TBC1D22A (TBC1 domain family, member 22A)
ENSG00000266680	antisense	PTP4A1 (protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1)
ENSG00000260929	antisense	CYLD (cylindromatosis (turban tumor syndrome))
ENSG00000272969	antisense	CLOCK clock circadian regulator
ENSG00000274270	sense-intronic	DLEU1 (deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding))
ENSG00000273010	antisense	LRIF1 (ligand dependent nuclear receptor interacting factor 1)
ENSG00000270068	antisense	COPS7A (COP9 signalosome subunit 7A)
ENSG00000237436	antisense	CAMTA1 (calmodulin binding transcription activator 1)
ENSG00000259818	antisense	C1orf123 (chromosome 1 open reading frame 123)
ENSG00000275457	antisense	XRN2 (5'-3' exoribonuclease 2)
ENSG00000224349	antisense	FAM135A (family with sequence similarity 135, member A)
ENSG00000261485	antisense	PAN3 (PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit)
ENSG00000232536	sense-intronic	TUFT1 (tuftelin 1)

B

Ensembl ID	Type	Coding Genes in Antisense/Sense Position
ENSG00000228237	antisense	EFCAB14 (EF-hand calcium binding domain 14)
ENSG00000264491	antisense	CACNG4 (calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4)
ENSG00000236432	antisense	COL4A3 (collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)) and MF1 (mitochondrial fission factor)
ENSG00000233848	antisense	CDKAL1 (CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1)
ENSG00000244161	antisense	FLNB (filamin B, beta)
ENSG00000272627	sense-intronic	MCU (mitochondrial calcium uniporter)
ENSG00000250354	antisense	NR3C2 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2)
ENSG00000255176	antisense	PHLDB1 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 1)
ENSG00000254453	antisense	NAV2 (neuron navigator 2)
ENSG00000231628	antisense	PREP (prolyl endopeptidase)
ENSG00000180139	antisense	ACTA2 (actin, alpha 2, smooth muscle, aorta)
ENSG00000273035	sense-intronic	MAP4K3 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3)
ENSG00000246859	antisense	STARD4 (StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4) and NREP (neuronal regeneration related protein)
ENSG00000230433	antisense	EXOC2 (exocyst complex component 2)
ENSG00000235984	antisense	GPC5 (glypican 5)
ENSG00000227230	antisense	CEP170 (centrosomal protein 170kDa)
ENSG00000225767	antisense	FAF1 (Fas (TNFRSF6) associated factor 1)
ENSG00000250740	antisense	NPNT (nephronectin)
ENSG00000267690	antisense	LDLRAD4 (low density lipoprotein receptor class A domain containing 4)
ENSG00000257671	antisense	KRT7 (keratin 7, type II)

4.2.3 Aday ukmRNA'ların qPCR ile Validasyonu

Seçilen dört adayın fonksiyonel olarak karakterize edilmesinden önce derin sekans verilerinin ikinci bir yöntem ile valide edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla qPCR yöntemi kullanılmıştır. Öncelikler HeLa hücreleri sisplatin ile muamele edilerek hücrelerde apoptoz tetiklenmiştir. Kontrol hücrelerine göre karşılaştırma yaparak rölatif aday ukmRNA miktarları belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler 4 adaydan üçünün derin sekans verisiyle aynı olduğunu göstermektedir (Şekil 12A). UkmRNA'lar şayet kodlayan genlerle kısmı çakışma yapıyorsa yada kodlayan genlerin intronlarından köken alıyorsa, bu kodlayan genleri düzenleme potansiyellerine sahiptirler. Apoptotik yolakların tetiklenmesi sonrası, aday ukmRNA'ya yakın kodlayan genlerin ifadeleri de derin sekans verileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Nitekim, tam güvenilir olmamakla birlikte, bu derin sekans yaklaşımı, ukmRNA'lar yanında bazı kodlayan genlerin ifadelerini de ölçmektedir. Yapılan qPCR çalışmaları, sisplatin ile HeLa hücrelerinde apoptozun tetiklenmesi sonucu, aday ukmRNA'ların yakınındaki kodlayan genlerin miktarlarında azalma olduğunu göstermiştir (Şekil 12B).



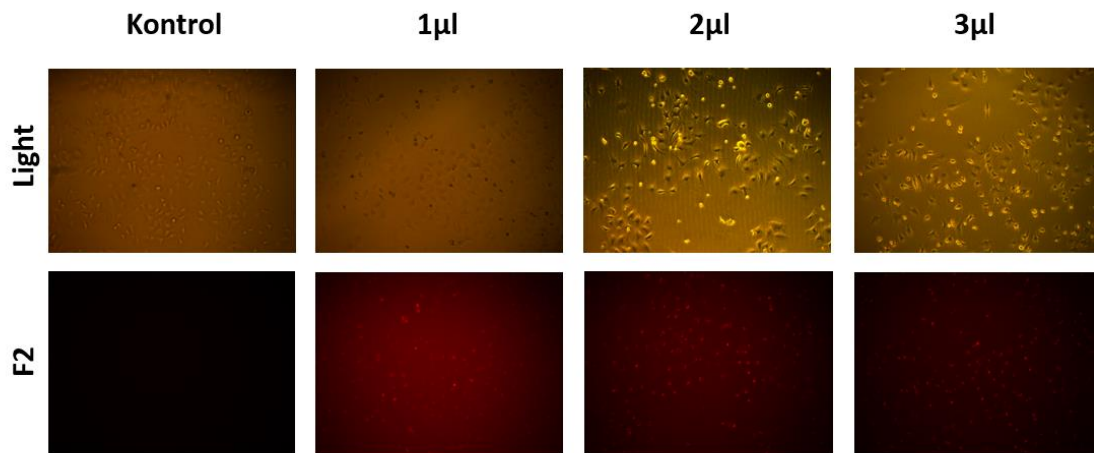
Şekil 12. qPCR ile derin sekans verilerinin validasyonu. Beş milyon HeLa hücresi 80 uM sisplatin ile 16 saat muamele edildikten sonra flow sitometri ile apoptoz oranları belirlenmiştir. Hiç bir ajanla muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür sonrası trizol rejanı kullanılarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Qiagen cDNA kiti ile hazırlanan cDNA'lerden lncRNA qPCR mastır miksi kullanılarak uygun primerlerle qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. GAPDH normalizasyon için kullanılmıştır. Her bir reaksiyon üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol RNA'lara göre ifade farklılıkları log2 kat olarak sunulmuştur. (A) ukmRNA'lar için qPCR; (B) Aday ukmRNA'ların çakıştığı kodlayan genler için qPCR.

4.3 Aday ukmRNA'ların Fonksiyonel Karakterizasyonu

Derin sekanslama verileri apoptotik hücrelerde yüzlerce ukmRNA'nın farklı ifade edildiğini göstermektedir. Bu ukmRNA'lardan 4 adeti qPCR ile valide edilmesine karşın, farklı ifade edilen adayların apoptotik yolları direkt olarak düzenlediklerini söyleyebilmek için, ilgili adayların susturma veya aşırı ifade ile manipüle edilerek apoptoz ile direkt ilişkisinin ortaya konması gerekmektedir. Şu anda ticari olarak var olan imkanlar ve proje süresi dikkate alınarak, kısmen yapılabiliğinin kolay olması nedeniyle, aday ukmRNA'ların susturulması yöntemine karar verilmiştir.

4.3.1 Transfeksiyon Verimliliğinin Optimizasyonu

Aday ukmRNA'ların susturulması ile apoptoz arasında güvenilir bir ilişki kurabilmek için hücreye aktarılan nükleik asitlerin hücre içerisine girdiğinden emin olmak gerekmektedir. Bu bağlamda genellikle işaretli moleküller (floresan ve biyotin gibi) kullanılmaktadır. Ancak, floresan işaretli Gapmer'lerin oldukça pahalı olması ve daha önemlisi bu floresanın hücrenin ölümüne etkisi bilinmediğinden, susturmada floresansız Gapmer'ler kullanılmıştır. Transfeksiyon sırasında olabilecek potansiyel sorunları önceden berteraf edebilmek için, transfeksiyon verimliliği ölçülmüştür. Transfeksiyon sırasında kullanılan Gapmer'lerin kısa nükleik asit olmaları dikkate alınarak, daha önce bir başka projede kullandığımız floresan işaretli tRNA parçaları kontrol olarak kullanılmıştır. HeLa hücreleri bu nükleik asitlerle tranfekte edildiğinde %80 üzerinde bir transfeksiyon verimliliği elde edilmiştir (Şekil 13).

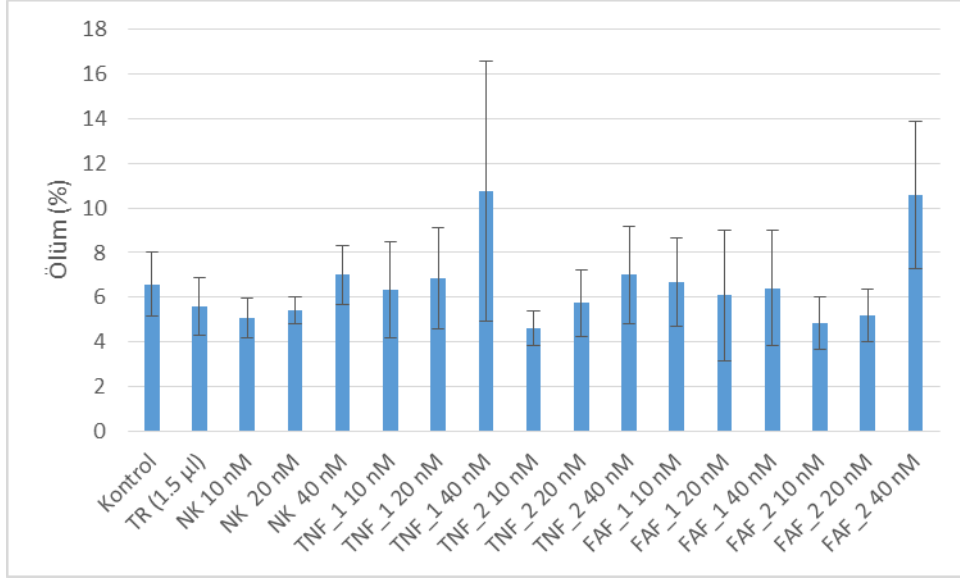


Şekil 13. Transfeksiyon verimliliğinin belirlenmesi. 24-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta kırkbin hücre olacak şekilde HeLa hücresi ekilmiştir. 50 nM floresan işaretli tRNA parçası ve farklı konsantrasyonlarda (1, 2 ve 3 ul) FuGene HD reaktifi kullanılarak tranfeksiyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda ışık (light) ve floresan mikroskopu (F2) kullanılarak transfeksiyon verimliliği belirlenmiştir.

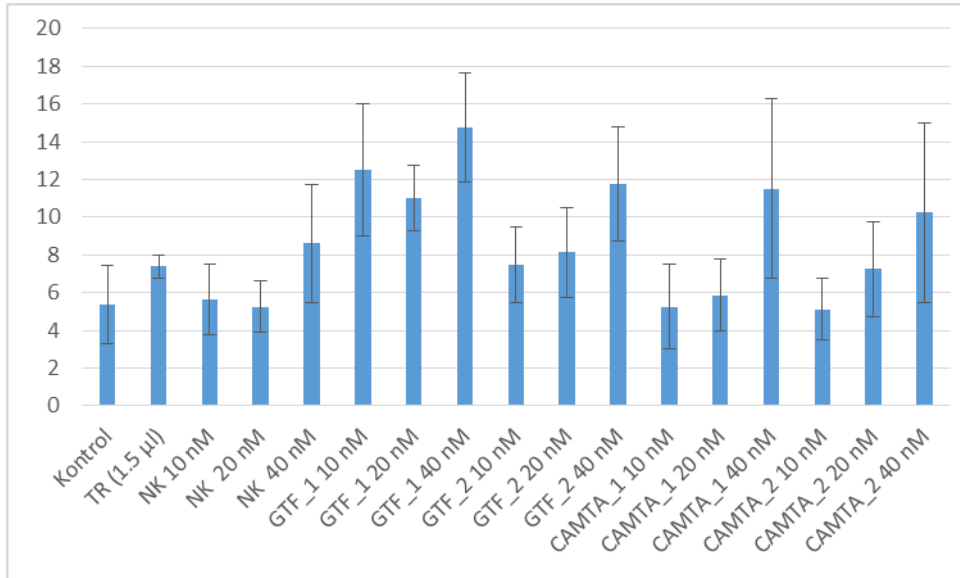
4.3.2 Gapmer'lerin HeLa Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi

ukmRNA alanının yeni olması ve bu genlerin susturulmasında kullanılan yöntemlerin henüz net olarak doğrulanmamış olması nedeniyle şu anda literatürde en sık kullanılan Gapmer yöntemine karar verilmiştir. Ancak, ticari olarak sunulan bu moleküller teker teker fonksiyonel test edilmediği için, hücreye olan toksik etkileri bilinmemektedir. Daha önemlisi,

A



B

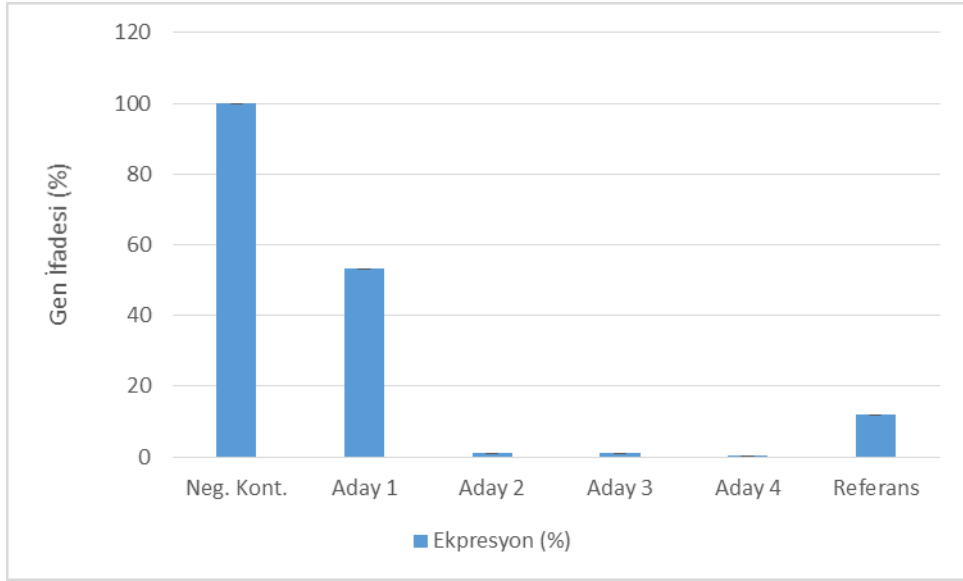
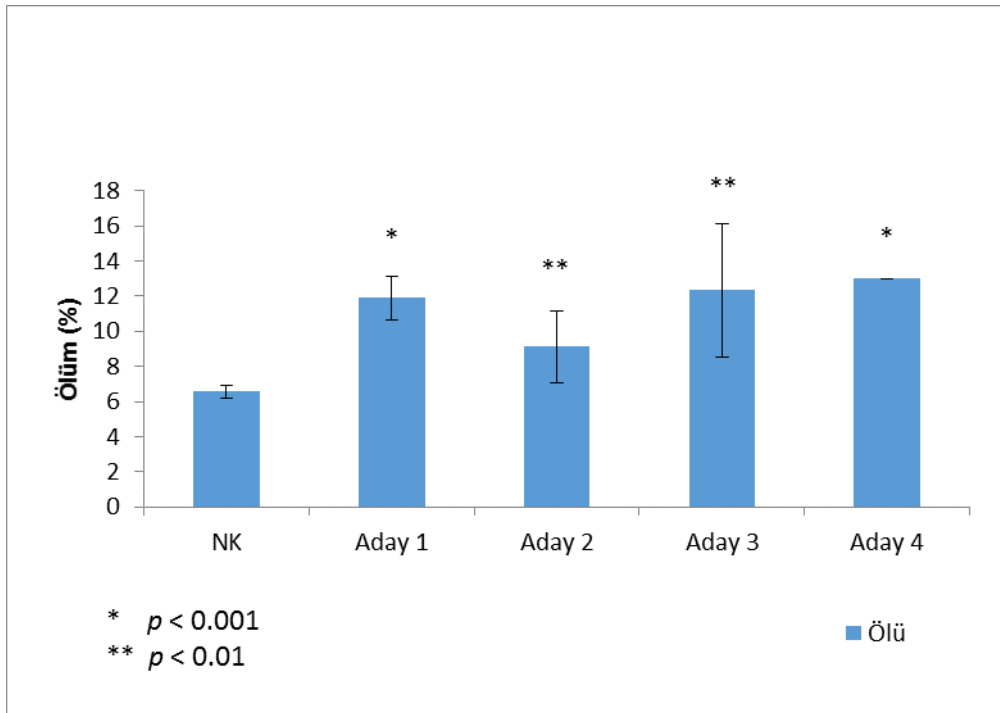


Şekil 14. Gapmer konsantrasyonunun optimizasyonu. 24-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta kırkbin hücre olacak şekilde HeLa hücresi ekilmiştir. 10,20 ve 40 nM Gapmer 1,5 ul FuGene HD transfeksiyon reaktifine karıştırılarak hücrelere aktarıldıktan sonra 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerde apoptoz akış sitometresi ile AnnexinV/7AAD boyaması yapılarak belirlenmiştir. Değerler sadece AnnexinV veya Annexin/7AAD çift pozitif hücrelerin toplamını göstermektedir. Kontrol, sadece hücreler; TR, sadece transfeksiyon reaktifine eklenen hücreler; NK, Negatif kontrol Gapmer;ukmRNA_1 ve ukmRNA_2, 2 farklı Gapmer; örneğin GTF_2 40 nM, GTF genine antisense ukmRNA'nın 2 numaralı Gapmer adayından 40 nM transfeksiyon.

ilgili firmanın hazırladığı yazılımlar kullanılarak dizayn edilen Gapmer'lerin hedef ukmRNA'yı susturup susturmayacağı bilinmemektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için, bir adet negatif kontrol Gapmer, bir adet hedefini susturduğu bilinen pozitif kontrol Gapmer (Hotair) ve her bir aday için 2 adet test Gapmer analize dahil edilmiştir. Literatür bilgileri dikkate alınarak, Gapmer'lerin kullanımını optimize etmek için üç değişik konsantrasyon (10, 20 ve 40 nM) ve her bir ukmRNA için 2 adet Gapmer test edilmiştir. Şekil 14'te sunulan veriler dikkate alındığında, sadece transfeksiyon reaktifinin (TR) hücrelere sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. 10 ve 20 nM negatif Gapmerin apoptozu tetiklememesi olumlu olmasına karşın, bu dozlarda test Gapmer'lerin yeterli etkinliğe sahip olmadığı kaydedilmiştir. İlgili firmanında bildirdiği üzere, aynı gen için dizayn edilen farklı Gapmer'lerin (1 ve 2) farklı yanıtı neden olduğu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol Gapmer'de tespit edilen ölüm oranları dikkate alındığında, TNF_1, FAF_2, GTF2A_1 ve CAMTA1_1 numaralı Gapmerlerin istatistiki olarak anlamlı bir oranda ölüme yol açtıkları görülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda negatif ve test Gapmer'lerin 40 nM dozda kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.3 Gapmer'lerle aday ukmRNA'ların Susturulması

Transfeksiyon reaktiflerinin tek başına HeLa hücrelerinde ölüme neden olmaması ve negatif kontrol Gapmer'lerin minimal etkileri dikkate alınarak, 40 nM test Gapmer ile 4 aday ukmRNA birer birer susturulmuştur. Fonksiyonel testlere geçmeden önce, olası fenotipik değişimlerin ilgili aday ukmRNA'nın susturulmasından kaynaklandığını ileri sürebilmek için susturma sonrası aday ukmRNA'nın miktarı qPCR ile belirlenmiştir. Böylece test Gapmer ile susturma verimlilikleri belirlenmiştir. Yazılım programlarıyla belirlenen test Gapmer'lerin gerçekte susturmaya neden olup olmadığı bilinmediğinden, teknik hataları berteraf etmek için, öncelikli olarak hedef ukmRNA'sını susturduğu fonksiyonel olarak gösterdiği bilinen HOTAIR Gapmer'i pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 15, referans). Pozitif kontrol HOTAIR ukmRNA'sının %90 civarında başarıyla susturulduğu görülmektedir. Adaylardan GTF2A1 (Şekil 15A, Aday 1) yaklaşık yarı yarıya susturulabilirken, CAMTA1, TNFRSF10B ve FAF1'e antisense ukmRNA'lar %99 oranında susturulmuştur. Bu susturmanın apoptoz fenotipine katkısını belirlemek için susturmanın yapıldığı hücrelerdeki tripan mavisi pozitif hücrelerin (geç apoptotik/ölü) oranları belirlenmiştir. Şekil 15B'de sunulan verilere göre negatif kontrol Gapmer sadece %6 ölüme neden olmuştur. Buna karşın, GTF2A1, CAMTA1, TNFRSF10B ve FAF1'e antisense ukmRNA'ların susturulması sırasıyla %12, 9, 12 ve 14 oranında ölüme neden olmuştur.

A**B**

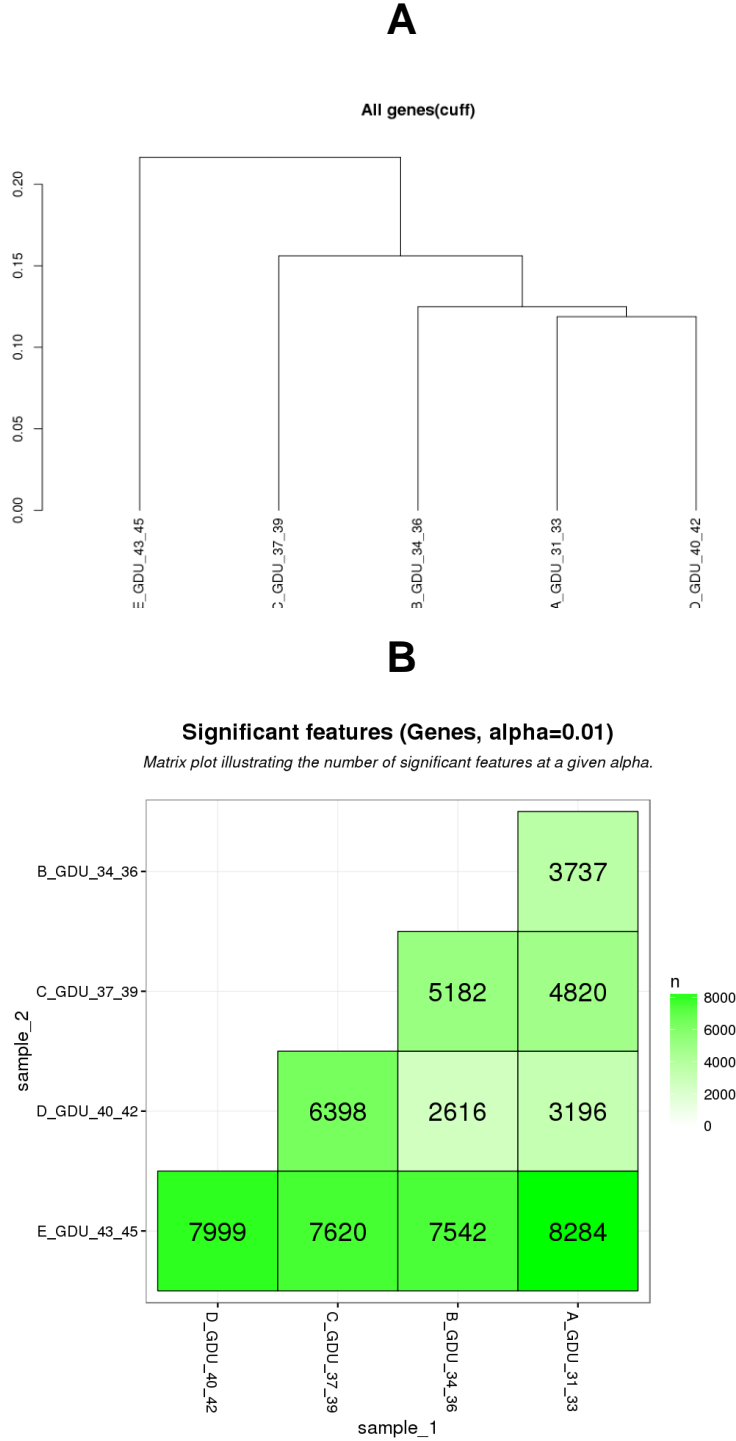
Şekil 15. Aday ukmRNA'ların susturulması ve fonksiyonel karakterizasyonu. 6-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 500 bin hücre olacak şekilde HeLa hücresi ekilmiştir. 40 nM Gapmer 1,5 ul FuGene HD transfeksiyon reaktifıyla karıştırılarak hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin yarısından TRIZOL yöntemiyle toplam RNA izole edilmiştir. Diğer yarısı fenotipik karakterizasyon için kullanılmıştır. Hücrelerde apoptoz Countness hücre sayım cihazı kullanarak tripan mavisi boyama metoduna göre yapılmıştır. (A) qPCR ile aday ukmRNA miktarının belirlenmesi. Susturma sonrası elde edilen toplam RNA cDNA'ya çevrildikten sonra qİağen IncRNA master miks kullanılarak qPCR analizine tabi tutulmuştur. GAPDH normalizasyon için kullanılmıştır. Her bir reaksiyon üçer tekrarlı yapılmıştır. Neg.kont. negatif gapmer; aday 1 GTF2A1; aday 2 CAMTA; aday 3 TNFRSF10B ve aday 4 FAF genlerine antisense ukmRNA'lar. Referans, H gapmer. (B) Susturmanın yapıldığı HeLa hücrelerinde tripan mavisi pozitif hücre oranları. Kodlandırma A panelinde olduğu gibidir.

4.4 Aday ukmRNA'ların Susturulmasının Gen İfadesine Etkisinin Derin Sekanslama İle Belirlenmesi

ukmRNA'lar hücre içerisinde çok değişik mekanizma ve yollarla çalışmaktadır. Aday ukmRNA'ların susturulması ile apoptotik fenotip arasında ilişki kurulmasına müteakip, ukmRNA susturulmasının hücre transkriptomuna etkisini araştırmak için aday ukmRNA'ların susturulduğu HeLa hücrelerinde kodlayan genlerin seviyelerini belirlemek için ikinci bir RNA-seq çalışması yapılmıştır. Bu bağlamda HeLa hücrelerinde öncelikle 80 uM sisplatin ile apoptoz tetiklenmiş ve bu hücrelerdeki kodlayan gen ifadeleri referans olarak kullanılmıştır. Daha sonra HeLa hücreleri negatif kontrol Gapmer ve GTF2A1, TNFRSF10B ve FAF1'e antisense ukmRNA Gapmerleriyle transfekte edilmiş ve elde edilen toplam RNA'lar Illumina platformu kullanılarak tüm genom transkriptomiks çalışmasında kullanılmıştır. Poly(A)-pozitif RNA'ların sekanslaması kodlayan genlerin yanında poly(A)-pozitif kodlamayan RNA'ların sekanslanmasına da imkan tanımıştır.

Negatif kontrol gapmer ile transfekte edilen HeLa hücreleri kontrol olarak kullanılmış ve diğer örneklerdeki bireysel RNA ifadesi kontrol ile karşılaştırılarak ifade farkları Cuffdiff programıyla belirlenmiştir. Tüm farklı ifade edilen genler kümelendiğinde, potent apoptoz indükleyici sisplatin ile muamele edilen HeLa hücrelerinin transkriptomunun Gapmerlerle muamele edilen hücrelerin transkriptomundan en farklı olan grup olduğu görülmüştür (Şekil 15A). Üç aday ukmRNA'sının susturulması kendi aralarında değerlendirildiğinde, FAF1-AS susturulması negatif kontrole en yakın ifade örtüsü sergilerken (Şekil 15A, GDU-31-33 ile GDU-40-42), GTF2A1-AS ve TNFRSF10B-AS ukmRNA'larının susturulması kısmen daha benzer gen ifade örtüsü sergilemiştir. Farklı ifade edilen genlerin sayısına bakıldığında, beklendiği üzere binlerce genin ifadesinde farklılıklar görülmektedir. Log₂ baz alınarak yapılan sıralamaya göre, ifadesinde en fazla artış ve azalma görülen genlerin listesi Tablo 4'te sunulmuştur. Bu 20 gen dikkate alındığında, çok farklı bir patern olduğu, ukmRNA susturulmasının apoptotik/antiapoptotik genleri etkilemediği kanısı uyanmaktadır. Ancak, farklı ifade edilen tüm genler incelendiğinde aday ukmRNA'ların susturulması sonrası oluşan apoptotik transkriptom ile pozitif kontrol sisplatin tarafından indüklenen apoptotik transkriptom arasında benzerlikler de bulunduğu görülmektedir. Örneğin, tıpkı sisplatinle tetiklenen apoptozda olduğu gibi, aday ukmRNA'larının (özellikle GTF2A1-AS) susturulması sonrası elde edilen apoptozda da, apoptotik SERTAD1, HBEGF, PHLDA2 ve CLIC3 genlerinin miktarlarında değişen oranlarda artış olurken, TSPAN18, CCDC146, GREM2, DDR2 ve LAMP3 gibi antiapoptotik genlerin miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir. Tüm bu verilerde, aday ukmRNA'ların susturulması sonrası akım sitometresi ve hücre sayım cihazında görülen

apoptotik fenotipin gen ifadesinde meydana gelen uygun değişimlerle desteklendiğini göstermektedir.



Şekil 16. Aday ukmRNA'ların Susturulması Sonrası Transkriptomların Benzerliği. Gapmerlerle aday ukmRNA'ların HeLa hücrelerinde susturulması sonrası elde edilen toplam RNA'lar RNA-seq analizine tabi tutulmuştur (Fasteris, İsviçre). Kontrolle göre farklı ifade edilen transkriptlerin ifade paternlerine göre (cuffdiff) tüm genler kümelenmiştir. GDU-31-33, 3 replika negatif gapmer; GDU-34-36, üç replika GTF2A1-AS gapmer; GDU-37-39; üç replika TNFRSF10B-AS gapmer; GDU-40-42, üç replika FAF1-AS gapmer; GDU-43-45 pozitif kontrol üç replika sislptatin. **(A)** Dendrogram; **(B)** Sigma matrisi (alpha=0.01).

Tablo 4. Aday ukmRNA'ların Susturulmasının Protein Kodlayan Transkriptoma Etkisi. Sisplatin ile muamele veya 3 aday ukmRNA susturulması sonrası elde edilen apoptotik hücrelerde farklı ifade edilen protein kodlayan genler belirlenmiştir. Log2 fark baz alınarak, İfade farkı en fazla azalan (üst 10 gen) ve artan (alt 10 gen) listelenmiştir.

Sisplatin		GTF2A1-AS		TNFRSF10B-AS		FAF1-AS	
Gen Adı	Log2 Fark	Gen Adı	Log2 Fark	Gen Adı	Log2 Fark	Gen Adı	Log2 Fark
TSPAN18	-7,07	INHBE	-3,68	LINGO2	-5,67	OSCAR	-2,11
CCDC146	-6,84	FGF21	-3,31	PNCK	-5,56	LAMP3	-2,06
LPAR1	-6,76	PAPPA2	-3,07	UNC5B	-4,88	AMIGO2	-2,06
GREM2	-6,72	PDE3A	-3,06	RTN4IP1	-4,87	CSTA	-2,00
GPR141	-6,65	TRMT2B	-3,02	CENPP	-4,58	PTX3	-1,98
DDR2	-6,37	IKZF2	-2,87	TXNDC3	-4,56	IL8	-1,93
PDE7B	-6,36	C2orf48	-2,83	DOCK8	-4,47	RUNX2	-1,91
ZNF521	-6,29	UNC5B	-2,82	PIGZ	-4,38	KLHDC7B	-1,90
LYPD6B	-6,19	WIF1	-2,75	LGSN	-4,24	IL6	-1,87
COL15A1	-5,89	ANO4	-2,70	LPP	-4,14	FGF21	-1,82
SERTAD1	5,67	PADI1	3,08	SP140	4,62	PVRL4	2,85
AOC3	5,70	DKK1	3,13	ANTXR2	4,67	ALPP	2,96
HBEGF	5,79	HIST1H3D	3,24	KRT34	4,75	CLIC3	3,10
TMC1	6,28	PPP1R1B	3,25	DKK1	4,84	NOXA1	3,16
TEX14	6,44	CD70	3,38	HBE1	4,85	TSPAN10	3,17
SOCS1	6,48	HAP1	3,44	HSH2D	4,88	FAM132A	3,26
RAET1L	6,48	KRT15	3,49	CTSS	4,91	HIST1H3D	3,36
TCTE1	6,87	BDKRB1	3,71	ITGBL1	4,93	HIST1H3H	3,38
C13orf40	6,95	C5orf46	3,76	IL24	6,05	LIME1	4,21
CLDN6	8,80	JPH3	4,55	SIGLEC11	8,55	UPK3B	4,86

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Apoptoz hem ihtiyaç fazlası hücreleri hemde sağlığı tehdit eden ajanların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayarak homeostazın sağlanmasında önemli fonksiyonu olan hücrel 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'lar tarafından da düzenlenebileceği anlaşılmasına karşın, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan ukmRNA'lar tam olarak rapor edilmemiştir. HeLa hücrelerinin model olarak kullanıldığı bu projede hücreler değişik ajanlarla apoptoza sürüklenerek genom kapsamlı sekanslama yaklaşımıyla HeLa hücrelerinin ukmRNA transkriptomunda meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Seçilen adaylar alternatif yöntemlerle doğrulandıktan sonra susturularak apoptotik yollara olan etkileri RNA sekanslama çalışmalarıyla ortaya çıkartılmıştır.

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 fenotipe meydana gelen gen ifadesi değişimlerini anlamak oldukça zor olup, elde edilen verilen hücrenin o anki resmini yansıtmakta olup tüm süreç hakkında bilgi vermekte yetersiz kalmaktadır. Tamamlanan bu proje kapsamında çalışmalar Annexin V+ hücreler üzerine yoğunlaştırılarak erken dönemdeki apoptotik hücrelerin ukmRNA profillerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu bağlamda öncelikle doz-zaman kinetik çalışmaları yapılarak, hücrelerin Annexin V veya Annexin V/7AAD duble pozitif hücrede yakalanmasına özen gösterilmiştir. Optimizasyon çalışmaları 80 uM sisplatin (16 saat), 4 uM doksorubisin (8 saat) ve 0,5 ug/mL anti-Fas antikoru (16 saat) uygulamasının bu şartları sağladığını göstermiştir (Şekil 1-3). TNF-alfanın tek başına HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemekte yetersiz kalması nedeniyle hücreler 10 ug/mL sikloheksimid kombine uygulamasıyla (8h) apoptoza duyarlı hale getirilmiştir (Fraisie 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 kapsamalı ve daha güvenilir olması nedeniyle bu çalışmada Illumina platformu kullanılarak derin sekanslama yapılmıştır. Hazırlanan toplam örneklerde elde edilen verilerin ortalama %96'sı insan genomuna eşleşmiş olması önemlidir (Tablo 1). Her bir muameleden üçer replika hazırlanmış olması nedeniyle istatistiki hesaplamalar yapılmış ve istatistiki olarak anlamlı farka sahip ukmRNA'ların listesi elde edilmiştir. Veritabanlarındaki bilgiler dikkate alındığında altmıştan fazla RNA biyotipi bulunmaktadır. RNA'nın protein kodlama kapasitesi, boyutu, işlenmiş olup olmaması, deneysel doğrulanması ve gen tipleri dikkate alınarak biyotipler belirlenmektedir. UkmRNA'lar için en tipik örnekler 5'/ 3' akışanlar (overlapping), antisense/sense, intronik/ekzonik, çok büyük ukmRNA ve genler arası ukmRNA'ları içermektedir (VEGA ve ENSEMBLE biyotipleri). Kendi verilerimizdeki antisense, sense-intronik, sense-çakışan ve genler arası ukmRNA'lar dikkate alındığında sırasıyla farklı ifade edilen ukmRNA'ların sayısı sisplatin uygulamasında sırasıyla 851, 121, 26 ve 646 (toplamda 1644) olmuştur. Her bir ilaç uygulaması sonrası toplam 500'den fazla ukmRNA farklı ifade edilmiştir (Tablo 2).

Literatürde bulunan bilgiler dikkate alındığında, apoptozun sistematik olarak tetiklendiği ve farklı ifade edilen ukmRNA'ların dokümante edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, mevcut proje önerisinin onaylandığı andan itibaren geçen süre zarfında bazı ukmRNA'ların apoptozda rol oynadığı gösterilmiştir. INXS ukmRNA'sındaki artışlar BCL-XS genini düzenleyerek apoptozu tetiklemektedir (DeOcesano-Pereira ve ark., 2014). Bizim verilerimize göre, sisplatin ve TNF-alfa ile muamele bu ukmRNA'nın artışına, doksorubisin ve anti-FAS muamelesi ise azalmaya neden olmaktadır. qPCR ile validasyon yapılmamış olmakla birlikte, derin sekans verilerine göre ajanlar arası farklılıklar görünmektedir. Prostat kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada SOCS2-AS1 ukmRNA'sının apoptozu inhibe ettiği belirtilmesine karşın (Misawa ve ark., 2016), kendi data setimizde bu ukmRNA'nın miktarında bir değişim tespit edilmemiştir. Hep2G hücre hattında yapılan bir çalışmada ise MEG3 ukmRNA'sının aşırı ifadesinin bu hücrelerde apoptozun tetiklenmesine yol açtığı rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2016). Ancak, mevcut projede kullanılan 4 ajandan hiçbirisi bu ukmRNA'nın HeLa hücrelerinde ifadesinde bir farka yol açmamıştır. GAS5 ukmRNA'sının prostat ve meme kanseri gibi bir dizi hücre hattında apoptozu tetikleyici rolü iyi bilinmektedir (Pickard ve ark., 2013). Bu verilerle uyumlu olarak, sisplatin ve anti-FAS antikoru ile apoptozun tetiklendiği hücrelerde bu ukmRNA miktarının sırasıyla 1,9 ve 2,9 kat artmıştır.

UkmRNA alanındaki en büyük zorluk, her bir ukmRNA'nın çok iyi annotate edilmemesi ve spesifik fonksiyonun bilinmemesi nedeniyle transkriptomik bir tarama sonrası belirlenen yüzlerce aday arasında hangisine öncelik verileceğinin bilinmemesidir. Ayrıca, moleküler

tanımlamada kullanılacak qPCR ve susturma primerlerinin hepsinin ticari olarak satılmaması da önemli kısıtlayıcı bir faktördür. Mevcut proje önerisinde bu sorunların önüne geçebilmek için öncelikle kontrol hücrelerine göre apoptotik hücrelerde en yüksek oranda farklı ifade edilen ukmRNA'lar listelenmiş ve genomik lokalizasyonları belirlenmiştir. Yakınında buldukları düzenleme potansiyelleri olması nedeniyle, öncelikle protein kodlayan genlere antisense, 5' veya 3' çakışan yada bu genlerin intronlarından köken alan ukmRNA'lar çalışılmıştır. Nitekim, bu ukmRNA'ların yakınında buldukları veya orijin aldıkları protein kodlayan genleri düzenleme potansiyelleri bulunmaktadır. Elde edilen listede, apoptozda rol oynadıkları bilinen protein kodlayan genlere yakın ukmRNA'lar en öncelikli olarak belirlenmiştir. Bu kriterler ışığında öncelikli olarak 4 aday belirlenmiştir. Bu adaylar GTF2A1, CAMTA, TNFRSF10B ve FAF1 protein kodlayan genlerine yakın ukmRNA'lardır.

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. Bu bağlamda, aday olarak seçilen 4 ukmRNA'nın ifadesi sisplatin ile apoptozun tetiklendiği hücrelerde qPCR ile belirlendiğinde, genel olarak derin sekans verileriyle bir uyum olduğu gözlenmiştir (Şekil 12). Bir kodlayan gen ile çakışması olan yada kodlayan genlerin intronlarından köken alan ukmRNA'ların bu genleri kontrol etme ihtimalleri yüksek olduğundan (Geisler ve Coller, 2013), ligandlarla muamele sonrası bu kodlayan genlerin miktarlarına da bakılmıştır. Öngörüldüğü üzere, apoptotik hücrelerde kodlayan ve kodlamayan genler arasında ters bir korelasyon belirlenmiştir (Şekil 12A-B). Literatürde bu kodlamayan genlerle ilgili bulunmadığından bu verinin oldukça anlamlı olduğu düşünülmektedir.

Kontrol ve apoptotik hücrelerin ukmRNA içeriğini karşılaştırarak ifadesinde fark tespit edilen ukmRNA'ların apoptotik yolları düzenleme potansiyelleri bulunmaktadır. Ancak, bu ilişkinin direkt mi yoksa indirekt mi olduğunu söyleyebilmek için adı geçen ukmRNA'ların bireysel olarak susturulması ve ilgili fenotip ile direkt ilişkilendirilmesi gerekmektedir. ukmRNA alanının kısmen güncel olması nedeniyle henüz ticari olarak tüm ukmRNA'ları susturulabilmesi için siRNA veya kısa saç-toka yapıları bulunmamaktadır. Bu nedenle öncelikle ticari olarak hedef ukmRNA'sını susturduğu deneysel olarak doğrulanmış HOTAIR pozitif kontrol ukmRNA'sı kullanılarak transfeksiyon verimliliği ve susturma etkinliği test edilmiştir. Elde ettiğimiz qPCR sonuçları bu ukmRNA'nın %90' ı geçen oranda başarıyla susturulduğunu göstermektedir (Şekil 15A, Referans). İlgili firmanın önerisi üzerine aday ukmRNA'ları susturmak amacıyla, her bir gen için iki adet GapMer dizayn edilmiş ve öncelikle bu adayların apoptoz fenotipine direkt katkı yapıp yapmadığı test edilmiştir. Şekil 14'de

sunulan veriler, apoptotik hücrelerde miktarı artan bu kodlamayan RNA'ların susturulması sonrası apoptoz oranında yine artış olduğunu göstermiştir (Şekil 14 ve 15B). Negatif kontrol GapMer'in ve qPCR için test amaçlı kullanılan HOTAIR ukmRNA'sının apoptozu tetiklememesi, apoptozda ki bu artışın teknik veya metotsal bir sorundan değil direkt olarak ilgili ukmRNA'nın fonksiyonundan kaynaklanabileceğine işaret etmektedir.

Susturulmaları sonrası hücre ölümünde artışa neden olan 4 adaydan 3 tanesi (GTF2A1, TNFRSF10 ve FAF1'e antisense ukmRNA'lar) daha detaylı incelemeye alınmıştır. Nitekim, susturma sonrası elde edilen ölüm teknik nedenlerden kaynaklanıyorsa, her üç susturma sonrası HeLa hücrelerinde benzer kodlayan gen ifade profili elde edilmedi. Şayet, her bir ukmRNA spesifik olarak apoptotik yolları tetikleyip hücre ölümüne neden oluyorsa, ilgili ukmRNA'ların etkiledikleri yollara bağlı olarak farklı apoptotik sinyal ileti mekanizmalarında değişimler olmalıdır. Bu amaçla, aday ukmRNA'ların susturulduğu örnekler derin sekans analizine tabi tutulmuştur (1 adet negatif kontrol, 1 adet sisplatin pozitif kontrol ve 3 adet test ukmRNA'sı). Apoptotik bir hücrede sinyal ileti yollarında meydana gelen değişimleri paralel olarak izleyebilmek için, sadece sisplatin ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen RNA'lar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Dendogram analizi, sisplatin ile muamelenin hücrelerde dramatik transkriptomik değişimine neden olmuştur (Şekil 16A). Aday ukmRNA'lardan TNFRSF10B ve FAF1-AS susturulması birbirine daha yakın gen ifade profili sergilemiştir. GTF2A1-AS susturulması ise oldukça farklı bir profil sergilemiştir. Üç aday ukmRNA'nın Gapmer ile susturulması, teknik problemlerden kaynaklanan bir hücre ölümünü değil, gen susturmaya özgün bir hücre ölümünü işaret etmiştir. PANTHER programı kullanılarak yapılan "Gene Ontology" analizleri, sisplatin ile muamelenin biz dizi hücre içi "biyolojik işlev" yanında apoptotik yolları etkilediğini göstermiştir. Üç aday benzer analize tabi tutulduğunda, GTF2A1-AS susturulması, apoptotik yollarda rol oynayan yüzden fazla genin ifadesinde değişikliğe neden olmuştur. Bu veri, en azından bu ukmRNA'sının apoptozun düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. İlginç bir şekilde diğer iki adayın susturulması sonrası apoptotik yolak olarak sınıflandırılan biyolojik işlevlerde bir etki göstermemiştir. Daha ziyade hücre dışı komponentlerini, eksozomal salınım ve adezyonu etkileyen genlerin ifadesinde farklılığa neden olmuştur. TNF yolağının hücre adezyonunda bilinen etkisi dikkate alındığında, bu veride uyumlu görünmektedir.

Özetle, bu çalışma ile HeLa hücreleri model olarak kullanılarak yapılan transkriptomik taramada apoptotik yollarda rol oynama potansiyeline sahip yüzlerce potansiyel ukmRNA belirlenmiştir. Bu adaylardan dört adeti daha detaylı olarak çalışılmıştır. Susturma ve fonksiyonel karakterizasyon çalışması en azından GTF2A1-AS ukmRNA'sının apoptotik yolakta rol oynayan genlerin ifadesini düzenlediğini göstermiştir

REFERANSLAR

- Ashenazi, A. ve Dixit, V.M. 1998. "Death receptors: signaling and modulation," *Science*, 281, 1305-1308.
- Bakshi, A., Jensen, Goldman, J.P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. ve 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.
- 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. ve 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.
- Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., Tilghman, S. 1990. "The product of the H19 gene may function as an RNA," *Mol Cell Biol*, 1, 28-36.
- Chao, M.P., Majeti, R., Weissman, I.L. 2011. "Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer" *Nat. Rev. Cancer*, 12, 58-67.
- Chen, R.P., Huang, Z.L., Liu, L.X., Xiang, M.Q., Li, G.P., Feng, J.L., Liu, B. Ve Wu, F.L. 2016. "Involvement of endoplasmic reticulum stress and p53 in MEG3-induced human hepatoma HepG2 cell apoptosis," *Oncol Rep*, doi: 10.3892/or.2016.4919.
- Costa, F.F. 2007. "Non-coding RNAs: Lost in translation?," *Gene*, 386, 1-10.
- Daniel, N.N. ve Korsmeyer, S.J. 2004. "Cell death: critical control points," *Cell* 116, 205-219.
- DeOcesano-Pereira, C., Amaral, M.S., Parrira, K.S., Ayupe, A.C., Jacysyn, J.F., Amarante Mendes, G.P., Reis, E.M. ve Verjovski-Almeida, S. 2014. "Long noncoding RNA INXS is a critical mediator of BCL-XS induced apoptosis," *Nucleic Acids Research*, 42, 8343-8355.
- Dinger, M.E., Pang, K.C., Mercer, T.R. ve Mattick, J.S. 2008. "Differentiating protein-coding and noncoding RNA: Challenges and ambiguities," *PLoS Computational Biology*, 4, e1000176.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. ve Wang, X. 2000. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition," *Cell*, 102, 33-42.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U. ve 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.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. ve Nagata, S. 1998. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD," *Nature*, 391, 43-50.
- Fejes-Toth, K., Sotirova, V., Sachidanandam, R., Assaf, G., Hannon, G.J., Kapranov, P., ve ark., 2009. "Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs," *Nature*, 457, 1028-1032.
- Fraisse, C.S., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B. Ve Vayssiere, J.-L. 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. ve 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," *Eur J Hum Genet*, 2005. 13, 894-897.
- Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A. ve Couso, J.P. 2007. "Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family," *PLoS Biology*, 5, e106.
- Geisler, S., Collier, J. 2013. "RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts," *Nature Rev Mol Cell Biol*, 14, 699-721.

- Gerner, C., Frohwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W. Ve Schulte-Hermann, R. 2000. "The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis," *J Biol Chem*, 275, 39018-39026.
- Golstein, P. ve Kroemer, G. 2007. "Cell death by necrosis: towards a molecular definition," *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- Harries, L.W. 2012. "Long non-coding RNAs and human disease," *Biochemical Society Transactions*, 40, 902-906.
- Hippe, D., Lytovchenko, O., Schmitz, I. Ve Luder, C.G. 2008. "Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by toxoplasma gondii primarily via interference with the mitochondrial amplification loop," *Infection and Immunity*, 76, 2905-2912.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. ve Swanson, P.E. 2009. "Cell death," *N Engl J Med*, 361, 1570-1583.
- Huarte, M., Guttman, M., Fledser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalik, A.M., Zuk, O., Amit, 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.
- Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P. ve ark., 2011. "Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters," *Nature Genetics*, 43, 621-629.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., ve ark., 2005. "Antisense transcription in the mammalian transcriptome," *Science*, 309, 1564-1566.
- Khaitan, D., Dinger, M.E., Mazar, J., Crawford, J., Smith, M.A., Mattick, J.S. Ve Perera, R.J. 2011. "The melanoma-upregulated long non-coding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis in invasion," *Molecular Cellular Pathobiology*, 71, 3852-3862.
- Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N. ve Chrousos, G.P. 2010. "Noncoding RNA ges5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor," *Science Signal*, 3, Ra8.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. ve Craig, R.W. 1993. "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2," *PNAS*, 90, 3516-3520.
- Klyer, M., Niknafs, Y.S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., Barrette, T.R., Prensner, J.R., Evans, J.R., Zhao, S. ve ark., 2015. "The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome," *Nature Genetics*, 47, 199-208.
- Lee, C. ve Kikyo, N. 2012. "Strategies to identify long noncoding RNAs involved in gene regulation," *Cell BioScience*, 2, 37.
- Lee, J.T. 2012. "Epigenetic regulation by long noncoding RNAs," *Science*, 338, 1435-1439.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. ve 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, L.Y., Luo, X. ve Wang, X. 2001. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria," *Nature*, 412, 95-99.
- Lochskin, R.A. ve Williams, C.M. 1965. "Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm," *J. Insect Physiol.*, 11, 123-133.
- 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* vol. 445, pp. 666-670, 2007.
- Misawa, A., Takayaa, K.I., Urano, T. Ve Inoue, S. 2016. "Androgen-induced lncRNA SOCS2-AS1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in prostate cancer cells," *Journal Biological Chemistry*, M116.718536.
- Mondal, T., Rasmussen, M., Pandey, G.K., ISAKSSON, A. ve Kanduri, C. 2010. "Characterization of the RNA content of chromatin," *Genome Research*, 20, 899-907.
- Moran, V.A., Perera, R.J. ve Khalil, A.M. 2012. "Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs," *Nucleic Acids Research*, , 6391-6400.

- Nakano, K. ve Vousden, KH. 2001. "PUMA, o novel pro-apoptotic gene, is induced by p53," *Mol. Cell*, 7, 683-694.
- Ogawa, Y., Sun, B.K. ve Lee, JT. 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. ve 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., ve Bao, J.K. 2012. "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis," *Cell Proliferation*, 45, 487-498.
- Ozgur, E., Mert, U., Isin, M., Okutan, M., Dalay, N. ve Gezer, U. 2012. "Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells," *Clinical Experimental Medicine*, Epub.
- Prasanth, K.V. ve Spector, D.L., 2007. "Eukaryotic regulatory RNAs: An answer to the genome complexity conundrum," *Genes and Development*, 21, 11-42.
- Puthalakath, J., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. ve Strasser, A. 1999. "The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex," *Mol. Cell*, 3, 287-296.
- Quinn, J.J. ve Chang, H.Y. 2016. "Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function," *Nature Reviews Genetics*, 17, 47-62.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Brugmann, S.A., goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., Chang, H.Y. 2007. "Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs," *Cell*, 129, 1311-1323.
- Rossi, M.N. ve Antonangeli, F. 2014. "LncRNAs: New players in apoptosis control," Article ID 473857.
- Singh, R.P., Waldron, R.T., Hahn, B.H. 2012. "Genes, tolerance and systemic autoimmunity," *Autoimmunity Reviews*, 11, 664-669.
- Sleutels, F., Zwart, R. ve Barlow, DP., 2002. "The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes," *Nature*, 415, 810-813.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. Ve Yu, Q. 2015. "MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis," *Oncotarget*, 6(11), 8474-8490.
- Subramanian, S. ve Steer, C.J. 2010. "MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis," *J. Cellular Physiology*, 223, 289-298.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, T. ve Takahashi, R. 2001. "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death," *Mol. Cell*, 8, 613-621.
- Thiede, B. ve 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.
- Wang, K., Yin, M.X., Chao, D.T., Milliman, C.L., ve Korsmeyer, S.J. 1996. "BID: a novel BH3 domain-only death agonist," *Genes & Dev.* 10, 2859-2869.
- Wang, K.C. Ve Chang H.Y. 2011. "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs," *Mol Cell*, 43, 904-914.
- Wapinski, O. ve Chang, H.Y. 2011. "Long noncoding RNAs and human disease," *Trends Cell Biology*, 21, 354-361.
- 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. ve Korsmeyer, S.J. 2001. "Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death," *Science*, 292, 727-730.

Villamizar, A., Chambers, C.B., Riberdy, J.M., Persons, D.A. ve Wilber, A. 2016. "Long noncoding RNA Saf and splicing factor 45 increase soluble Fas and resistance to apoptosis," *Oncotarget*, 7, 13810-13826.

Willingham, A.T., Orth, A.P., Batalov, S., Peters, E.C. 2005. "A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT," *Science*, 309, 1570-1573.

Wilusz, J.E., Sunwoo, H., Spector, D.L. 2009. "Long noncoding RNA: functional surprises from the RNA world," *Genes & Development*, 23, 1494-1504.

Yan, B., Wang, Z., ve Guo, J.T. 2012. The research strategies for probing the function of longcoding RNAs," *Genomics*, 99, 76-80.

Yoon, JH., Abdelmohsen, K. ve Gorospe, M. 2012. "Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA," *J Mol Biol*, epub.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. ve 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.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. BÜNYAMİN AKGÜL
Proje No:	113Z371
Proje Başlığı:	İnsanda Apoptozu Düzenleyen Uzun Kodlamayan RNA'ların Belirlenmesi ve Fonksiyonel Karakterizasyonu
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	AYTEN NALBANT ALDANMAZ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2013 - 01/06/2016
Onaylanan Bütçe:	367500.0
Harcanan Bütçe:	346929.99
Öz:	<p>Apoptoz birçok hücrel fonksiyonların sağlıklı yürütülmesi için oldukça önemlidir. Apoptoz hızındaki azalmalar kanser ve otoimmün hastalıklara, hızlanma ise akut ve kronik dejeneratif hastalıklara ve immun sistemde yetersizliklere yol açmaktadır. Hücrel homeostazın sağlanmasında görev yapan apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan bir dizi protein ve mikroRNA bilinmesine rağmen, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan protein kodlamayan bu RNA'lar (uzun kodlamayan RNA, ukmRNA) tam bilinmemektedir.</p> <p>Apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan ukmRNA'ları belirlemek için bu çalışmada HeLa hücreleri model olarak kullanılmıştır. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolağın her biri ikiye ayrı ajan ile aktive edilmiştir. Yolakların aktivasyonu sonrası izole edilen RNA'lar derin sekans analizine tabi tutulduğunda, ukmRNA'ların ligand tipine bağlı olarak farklı profil sergilediği gözlemlenmiştir. İfadelerinde farklılık tespit edilen 4 aday ukmRNA'nın susturulması HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında artışa yol açmıştır. İlginç bir şekilde aday ukmRNA ifadesi ile antisense oldukları kodlayan gen ifadesi arasında ters bir korelasyon belirlenmiştir. Aday ukmRNA'ların susturulmasının apoptotik sinyal ileti yollarına olan etkilerini belirlemek için bu hücrelerde ikinci bir RNA-seq çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, özellikle GTF2A1-AS susturulmasının apoptotik genlerin ifadesinde değişime yolaçtığını göstermiştir. Sonuç olarak, HeLa hücrelerinde apoptozu düzenleyen yeni bir ukmRNA tespit edilmiş ve fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Apoptoz, HeLa, kodlamayan RNA, derin sekanslama, sisplatin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Kodlamayan RNA'ların ABC'si (Bildiri - Ulusal Konferans - Davetli Konuşmacı), 2- Long non-coding RNAs are differentially expressed during apoptosis in the Jurkat Human acute T-cell leukaemia cell line (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum), 3- Long non-coding RNAs are differentially expressed in a pathway specific manner during apoptosis in human (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum), 4- Long non-coding RNAs are differentially expressed and play a role during apoptosis in human (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- insanda internal apoptotik yolağı düzenleyen uzun kodlamayan rna'ların transkriptomik yaklaşımla belirlenmesi (Bildiri - Ulusal Bildiri - Sözlü Sunum), 6- Long non-coding RNAs: potential regulatory playres of apoptosis (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 7- Identification of long non-coding RNAs that regulate apoptosis in human (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),