

**Anti-apoptotik GTF2A1-AS Uzun Kodlamayan RNA'sının
Hücreiçi Konumunun ve Etkileştiği Komplekslerin
Tanımlanması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 216Z137

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL

Bursiyer:
Osama Sweef

TEMMUZ 2018
İZMİR

ÖNSÖZ

Sekanslama yöntemlerinde ve yüksek hacimli verilerin analizinde elde edilen gelişmeler, tüm genom transkriptomiks çalışmalarını hızlandırmış ve fenotipe özgün RNA'ların tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Böyle bir tarama sonrası (113Z371 No.lu TÜBİTAK projesi) HeLa hücrelerinde yüzlerce uzun kodlamayan RNA'nın farklı ifade edildiği belirlenmiştir. TÜBİTAK tarafından desteklenen (216Z137 No.lu) ve bir yürütücü ve bir bursiyer olmak üzere toplam iki kişilik bir ekip tarafından yürütülen bu projede ise, HeLa hücreleri model olarak kullanılarak GTF2A1-AS uzun kodlamayan RNA'nın apoptozun düzenlenmesindeki etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda, öncelikle GTF2A1-AS transkriptinin 5' ve 3' sekansları ile hücre içi lokasyonu belirlenmiştir. GTF2A1'in susturulması sonrası mRNA ifadelerinde meydana gelen transkriptomik değişimler PANTHER ve Pathway Studio programlarıyla irdelenerek etkilenen sinyal ileti yolları belirlenmiştir. Bu yollarda görevli genlerin protein seviyesinde ifadeleri incelenerek, biyoinformatik olarak elde edilen veriler deneysel olarak doğrulanmıştır. Ayrıca, GTF2A1-AS transkripti ile etkileşme potansiyeli bulunan bazı proteinler tanımlanmıştır. 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. Kodlamayan RNA'lar	4
2.3. Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Apoptoz	6
2.4. GTF2A1-AS ve Apoptoz	7
3. Gereç ve Yöntem	9
3.1. Memeli Hücrelerin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması	9
3.2. Apoptozun Akış Sitometresi, Floresan Mikroskopi ve Hücre Sayım Cihazı İle Belirlenmesi.....	9
3.3. 5'/3' RACE ile GTF2A1-AS Geninin Tam Sekansının Belirlenmesi	10
3.4. RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrol Analizleri.....	12
3.5. GTF2A1-AS Aşırı İfade Yaıplarının Oluşturulması ve GapmeR ile Susturulması	13
3.6. Real Time PCR Analizleri	13
3.7. Biyoinformatik Analizler	14
3.8. Western Blotlama	14
3.9. GTF2A1-AS ile Etkileşen Komplekslerin Belirlenmesi.....	15
4. Bulgular	15
4.1. HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi ve RNA İzolasyonu	15
4.2. GTF2A1-AS Transkriptinin Tam Sekansı	19
4.3. GTF2A1-AS Transkriptinin Hücre İçi Lokalizasyonu	19
4.4. GTF2A1-AS'in Aşırı İfadesi ve Susturulması Sonrası Gen İfadesinde Değişimler	20
4.4.1. GTF2A1-AS'in GapmeR ile Susturulması	20
4.4.2. GTF2A1-AS'in Aşırı İfadesi.....	21
4.4.3. GTF2A1-AS'in GapmeR ile Susturulması Sonrası Gen İfadesinde Değişimler.....	24
5. Tartışma/Sonuç.....	26

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Apoptotik Mekanizmada Rol Oynayan Ekstrinsik ve İntrinsik Faktörler.....	3
Şekil 2. Protein Kodlamayan RNA'ların Sınıflandırılması	6
Şekil 3. GTF2A1-AS'in Genomik Lokalizasyonu	8
Şekil 4. RNA Oligoları Ekleyerek 5' Uçların Çoğaltılması	11
Şekil 5. Sisplatin Uygulaması Sonrası Akım Sitometre Analizi ve RNA İzolasyonu	16
Şekil 6. GTF2A1 Sense ve GTF2A1-AS Antisens Genlerinin Yapısı ve İlaçlar ile Muamelesi Sonrası İfade Miktarları	17
Şekil 7. GTF2A1-AS Sekansının RACE Yaklaşımıyla Eldesi	18
Şekil 8. GTF2A1-AS cDNA Sekansı	20
Şekil 9. GTF2A1-AS Transkriptinin Hücreiçi Lokasyonu	21
Şekil 10. GTF2A1-AS Geninin GapmeR ile Susturulmasına Bağlı Apoptoz	22
Şekil 11. GTF2A1-AS Aşırı İfade Yapısının Oluşturulması.....	23
Şekil 12. GTF2A1-AS Aşırı İfadesinin HeLa Hücrelerinde Apoptoza Etkisi	24
Şekil 13. GTF2A1-AS Geninin Susturulması Sonrası Farklı İfade Edilen Genlerin İlişkileri ...	25
Şekil 14. GTF2A1-AS'in Susturulması Sonrası Aday Proteinlerin Western Blotlaması	25
Şekil 15. Apoptotik HeLa Hücrelerinde GTF2A1-AS ile Etkileşen Proteinlerin SDS-PAGE analizi.....	27

TABLULAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1. cDNA Sentezi PCR Amplifikasyonu ve Sekanslama da Kullanılan Primerler	11

ÖZET

Apoptoz gerek normal gelişim esnasında, gerekse patolojik olgularda hücre sel dengenin sağlanmasında oldukça önemlidir. Nitekim, apoptozun yavaşlaması veya engellenmesi kanser ve otoimmün hastalıklara yok açar iken, apoptoz oranında meydana gelen hızlanmalar akut ve kronik dejeneratif hastalıklara ve immün sistemde yetersizliklere yol açmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, apoptozun düzenlenmesinde çok değişik makromoleküller görev yapmaktadır. Bu düzenlemeden sorumlu proteinlerin varlığı uzun süredir bilinmekte olup son yapılan çalışmalar kodlamayan RNA'ların da bu düzenlemede aktif rol oynadıklarını işaret etmektedir. Daha önce tamamlanan 113Z317 No.lu proje kapsamında yaptığımız transkriptomik bir tarama, GTF2A1 kodlayan genine antisense olan bir RNA transkriptinin (GTF2A1-AS olarak adlandırılmıştır) apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceğine işaret etmiştir.

GTF2A1-AS protein kodlamayan transkriptinin apoptozun düzenlenmesinde oynadığı rolün moleküler mekanizmasını aydınlatmak için yapılan 216Z137 No.lu bu TÜBİTAK projesinde HeLa hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu transkriptin koordinatları tam olarak raporlanmadığı için, öncelikle RACE (rapid amplification of cDNA ends) yaklaşımı kullanılarak transkriptin uç sekansları elde edilmiş ve RNA sekans verileriyle karşılaştırılmıştır. Sisplatin ile miktarında artış belirlediğimiz transkript çekirdekte lokalize olmaktadır. GapmeR ile susturma sonrası miktarı değişen mRNA transkriptleri PANTHER yazılımı ile incelendiğinde apoptotik işlevlerde değişim olduğu gözlenmiştir. İlave biyoinformatik analizler, etkilenen yolların BCL2-p53 aksı üzerinde olabileceğini işaret etmiştir. Western blot sonuçları da bu verileri doğrulamaktadır. GTF2A1-AS transkriptinin etkileştiği proteinleri belirlemek için yapılan immünoçöktürme çalışmalarında, GTF2A1-AS'in HIST2H4A, HNRNP-K ve HNRNPA2B1 proteinleriyle birlikte çöktüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak, HeLa hücrelerinde apoptozu düzenleme potansiyeline sahip GTF2A1-AS kodlamayan transkriptinin tam sekansı elde edilmiş, hücre içi lokalizasyonu ve etkileştiği proteinlerin bir kısmı tanımlanmıştır.

ABSTRACT

Apoptosis is highly important both for the normal development as well as the maintenance of the cellular homeostasis in pathological situation. Thus, a slow-down or shut-down in apoptosis leads to cancer or autoimmunity while accelerated cell death leads to acute and chronic degenerative diseases and immunodeficiency. For these reasons, a various types of macromolecules are involved in the regulation of apoptosis. The involvement of proteins in this regulation is long appreciated and recent studies point the the involvement of noncoding RNAs as well. A transcriptomic profiling completed as part of a previous TUBITAK project (113Z371) showed a potential role for GTF2A1-AS, a transcript antisense to the GTF2A1 protein coding gene, in regulating apoptosis.

In this project (216Z137) where it is intended to unravel the potential role of GTF2A1-AS in the regulation of apoptosis, HeLa cells are used as the model organism. Because the coordinates of this transcript was not previously reported, the end sequences of the transcript were determined by RACE (rapid amplication of cDNA ends) and the results were compared with RNA-seq data. Cisplatin-induced transcript is localized in the nucleus. The analysis by PANTHER of mRNAs that are differentially expressed upon GapmeR-mediated silencing of GTF2A1-AS revealed changes in the apoptotic processes. Additional bioinformatics analyses showed that the affected pathways are on the axis of BLC2-p53. Immunoprecipitations assays showed that GTF2A1-AS precipitate with HIST2H4A, HNRNP-K and HNRNPA2B1. As a result, we determined the full-length cDNA sequence, intracellular localization and interacting protein partners of GTF2A1-AS, which has a potential to regulate apoptosis in HeLa cells.

1. GİRİŞ

İnsan sağlığının korunmasında ok temel bir greve sahip apoptozu kontrol eden bir dizi protein kodlayan gen tanımlanmıştır (Gerner ve ark., 2000; Thiede ve Rudel, 2004; Hotchkiss ve ark., 2009). Son zamanlarda elde edilen veriler, proteinler yanında mikroRNA'ların apoptozu transkripsiyon sonrası aşamada düzenlediğini göstermektedir (Subramanian ve Ster, 2010). Genom anotasyonlarının tamamlanmasına müteakip, "p DNA" diye adlandırılan bölgelerden protein kodlamayan transkriptlerin üretildiği bulunmuş ve uzun kodlamayan RNA'lar (ukmRNA) olarak adlandırılmışlardır. Özellikle DNA hasarına bağlı tetiklenen intrinsik yolağın düzenlenmesinde rol oynayan bazı ukmRNA'lar raporlanmıştır (Huarte ve ark., 2010; Hung ve ark., 2011). 113Z371 No.lu proje kapsamında ise, kendi grubumuz tarafından sistemik bir yaklaşım kullanılarak intrinsik ve ekstrinsik yolaktaki ukmRNA'lar taranmış ve apoptozu düzenleme potansiyeline sahip bazı aday ukmRNA'lar (rneğin GTF2A1-AS) belirlenmiştir. Bu adayların moleküler seviyede irdelenmesi, apoptotik yolakların ukmRNA'lar tarafından nasıl düzenlendiğini anlayabilmek açısından önemlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

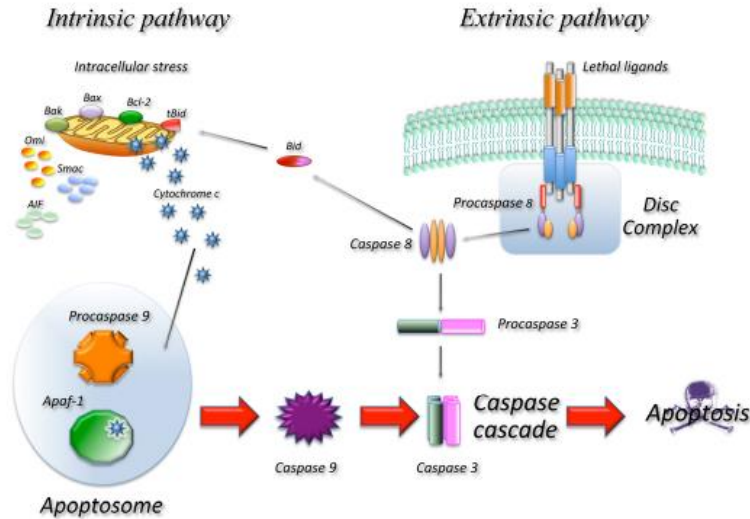
2.1 Apoptoz (Programlı Hücre lm)

Hücre lm Tanımlama Komitesi'nin almış olduğu kararlar, ökaryotlarda iki tür hücre ölümü belirlemiştir: (1) fiziksel, mekanik ve kimyasal ajanlara maruziyet sonrası kaza eseri (accidental cell death) lm ve (2) genetiksel tanımlanmış moleküler mekanizmalara bağlı olarak kontrol edilebilir lm (Galluzzi vd. 2015). Kontrol edilebilir ölüm ökaryotik organizmaların gelişiminde çok önemli rol oynadığı gibi (Arya ve White, 2015), bu mekanizmaların hızlanması veya yavaşlaması bir dizi hastalıkların patolojisine önemli katkıda bulunmaktadır (Chao vd. 2011; Hotchkiss vd. 2009; Ouyang vd. 2012; Singh vd. 2012). Örneğin kanser ve otoimmün hastalık oluşumunda kontrol edilebilir hücre ölüm hızındaki yavaşlamalar önemli rol oynarken, hücre ölümünün kontrolsüz artması nörodejeneratif hastalıklar ve AİDS gibi hastalıkların oluşumuna yol açabilmektedir. Dolayısıyla kontrol edilebilir hücre ölüm mekanizmalarının ve bu mekanizmaların nasıl kontrol edildiklerinin anlaşılması insan sağlığının kalitesinin arttırılması bakımından oldukça önemlidir.

Literatürde ilk programlı hücre ölüm örneğinin 1965 yılında Richard A Lockshin tarafından gelişime bağlı kas ara segmentlerinin oluşumuyla bağlantılı olarak rapor edildiği görülmektedir (Lockshin ve Williams, 1965). Ölen bir hücrenin fenotipik özellikleri incelendiğinde bu hücrelerin sitoplazmik büzüşme, kromatin kondenzasyonu, nükleer fragmentasyon, kaynama-benzeri yapılar (blebbing) ve ölüm cisimciklerine sahip olduğu görülmüş ve bu olguları tanımlamak için “düşmek” anlamına gelen apoptozis kelimesi türetilmiştir (Kerr vd. 1972). Apoptozis gelişim ve hastalıkların patolojisinde etkin bir rol oynamasına karşın, moleküler seviyede apoptozu düzenleyen bir protein Lockshin’in apoptozu tanımlamasından 27 yıl sonra tanımlanabilmiştir (Thornberry vd. 1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda bazen sınırlarını tam olarak çizmek zor olmakla birlikte kategorik olarak üç tip hücre ölümü belirlenmiştir: apoptosis, otofaji ve nekrosis (Berghe vd. 2014; Eisenberg-Lerner vd. 2009; Hotchkiss vd. 2009; Maghsoudi vd. 2012; Teng ve Harwick, 2015).

Evrimsel olarak korunmuş olan apoptotik hücre ölüm mekanizmalarında, hücre içinden ve dışından tetiklenen bir dizi biyokimyasal olaylar sonucu hücrenin programlı bir şekilde ölmesi sağlanmaktadır (Elmore, 2007). Şu ana kadar yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalarla, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana apoptotik sinyal ileti yolağı belirlenmiştir (Şekil 1). İntrinsik yolak normal gelişim ve çok hücreli organizmalarda hücre sayısının homeostazinde önemli rol oynar ve ayrıca endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres, DNA hasarı ve büyüme hormonu yokluğu gibi stres şartlarında aktive edilmektedir (Lalaoui vd. 2015). İmmun sistem hücrelerinde yaygın olarak bulunan ekstrinsik faktörler TNF (tumor necrosis factor), Fas ve TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) reseptörleri vasıtasıyla görev yaparlar ve bu yolaktaki genlerde meydana gelen delesyon veya mutasyonlar ciddi otoimmün hastalıklarına yol açmaktadır (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Watanabe vd. 1992). Normalde her iki yolağın aktivasyon mekanizmaları oldukça farklıdır. Ancak, her iki yolda da görev yapan ortak yaşam (BAD) ve ölüm sinyalleri (BID, BIM, NOXA/PUMA) bulunmaktadır. Yaşam ve ölüm sinyallerinin hücre içi konsantrasyonları nihayetinde apoptozun seyrini belirlemektedir. Örneğin, BAD (Zha vd. 1996), BID (Wang vd. 1996), BIM (Puthalakath vd. 1999) ve NOXA/PUMA (Nakano ve Vousden, 2001) gibi apoptotik proteinlerin intrinsik ve/veya ekstrinsik faktörler tarafından aktive edilmesi, normalde BCL-2 (Bakshi vd. 1985), BCL-X_L (Boise vd. 1993) ve MCL-1 (Kozopas vd. 1993) tarafından inaktif halde tutulan BAK ve BAX proteinlerinin aktivasyonuna neden olur. BAX/BAK proteinleri endoplazmik retikuluma girerek kalsiyum salınmasına ve mitokondriye girerek ölüm sinyallerinin amplifikasyonuna neden olurlar. BAX ve BAK proteinleri mitokondriye girdiklerinde mitokondri membranında delik oluştururlar ve bu deliklerden apoptotik süreçte anahtar role sahip cytochrome (Cyt) c salınır.

cyt c (APAF-2), APAF-1 ve caspase-9 (APAF-3) ile birleşmesi apoptozom adı verilen bir kompleksin oluşumuna yol açar (Li vd. 1997). Apoptozom kompleksinin oluşması caspase-9 başlatıcı (initiator) kaspazının aktive olması anlamına gelir ki bu süreci izleyen olaylarda diğer bazı efektör kaspaz enzimleri aktive edilir. Başlatıcı kaspazlar tarafından aktive olan efektör kaspazlar hücre içerisinde bulunan proteinleri parçalayarak hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Apoptozun tetiklendiği hücrelerde çekirdek koyulaşması ve DNA



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

DNA fragmentasyonu (DNase II, endonuclease G ve AIF gibi proteinlerce) gibi bir dizi belirgin morfolojik değişiklikler olmaktadır (Enari vd. 1998; Li vd. 2001). Bütün bu olaylar zincirinden sonra, apoptotik hücre üzerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri sayesinde bu hücreler “yenilmek” üzere tanınırlar ve fagositoz ile bertaraf edilirler.

Bir hücrenin varlığı ve yokluğu arasında önemli bir moleküler mekanizma olan apoptotik süreçlerin dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Nitekim, bu süreçteki hızlanma veya yavaşlamalar insan sağlığını direkt olarak etkilemektedir. Yapılan biyokimyasal ve genetik çalışmalar apoptozun düzenlenmesinde bir dizi regülatör proteinin görev aldığını göstermiştir (Budhidarmo ve Day, 2015; Hotchkiss vd. 2009; Opforman vd. 2003). Proteomik analizler, apoptozun tetiklendiği bir hücrede yüzden fazla proteinin miktarında değişiklik olduğunu göstermiştir (Thiede ve Rudel, 2004). Genom projelerinin tamamlanmasına paralel olarak elde edilen transkriptom bilgileri ise genlerin (örneğin, apoptozu düzenleyen genler) sadece proteinler değil kodlamayan RNA’lar tarafından da düzenleneceğini göstermiştir (Guttman ve Rinn, 2012, Mattick ve Rinn, 2015).

2.2 Kodlamayan RNA'lar

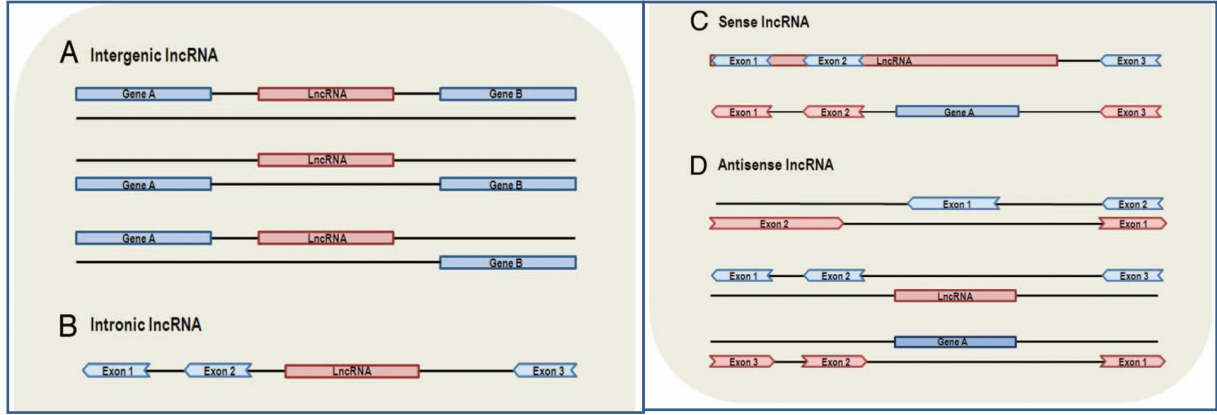
Uzun yıllar boyunca hücre içerisinde fonksiyonel makromolekülün proteinler olduğu varsayıldığından genetik ve biyokimyasal çalışmalar primer olarak protein kodlayan genler üzerine yoğunlaşmıştır. Maya genomunun sekanslanmasıyla ortaya çıkan “çöp DNA” tanımlaması insan genomunun sekanslanmasıyla farklı bir boyut kazanmıştır. İnsan genomunun %96-97'sinin protein kodlamayan dizilerden oluşması bu sekansların fonksiyonel olabileceği tezini ortaya çıkarmıştır. Özellikle tüm transkriptom verilerinin incelenmesi sonucu, genomda bulunan sekansların tamamının en azından bir hücre tipinde ve yaşamın en az bir aşamasında kullanıldığı tezi kabul görmeye başlamıştır (Birney *vd.* 2007; Gloss ve Dinger, 2015; Mattick ve Rinn, 2015).

Costa (2007) kodlamayan RNA'ları (kmRNA) biyolojik öneme sahip ancak proteine çevrilmeyen RNA molekülleri olarak tanımlamaktadır. Bu tanımlamada aranan en önemli kriter, aday kmRNA'da 100 aminoasitten uzun açık okuma bölgesi içermemesidir. Biyoinformatik olarak bu kriteri uygulayarak sınıflandırma yapmam mümkün olmakla birlikte, en sağlıklı yöntem deneysel olarak proteine çevrimin olmadığı gösterilmesidir. Kategorik olarak kmRNA'lar küçük kmRNA'lar (20-300 nt) ve uzun kmRNA'lar (300-10000 nt) olarak iki grup altında toplanmaktadır. 18-30 nt uzunluğundaki küçük kmRNA'lar (miRNA'lar, siRNA'lar ve piRNA'lar) iyi karakterize edilmiş olup özellikle miRNA'ların transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda önemli rol oynadıkları rapor edilmiştir (Ghildiyal *vd.* 2008; Aravin *vd.* 2006; Jonas ve Izaurralde, 2015). Sekans analizlerinde kaydedilen ilerlemeler ve buna paralel geliştirilen biyoinformatik programlar, tüm transkriptom çalışmalarının önünü açmış ve ökaryotik bir hücrede ifade edilen RNA'ların aynı anda sekanslanmasına imkan tanımıştır. Okuma derinliğinde kaydedilen ilerlemeler ise, oldukça düşük konsantrasyonda ifade edilen ukmRNA'ların güvenilir bir şekilde kantifiye edilmesine olanak sağlamıştır.

Uzun kmRNA sınıflandırmalarında çok değişik kriterler kullanılmıştır. Örneğin, transkript uzunluğuna göre küçük-uzun, protein kodlayan genlerle bağlantı durumuna göre sense-antisense veya çakışan, gen içerisindeki konumuna göre intronik gibi çok değişik kriterler kullanılmıştır (Şekil 2, Laurent *vd.* 2015; Ma *vd.* 2013). Bütün bu sınıflandırmalar içerisinde basit olması nedeniyle en yaygın sınıflandırma tipi genomda fiziksel konumlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Genomdaki fiziksel konumlarına göre en yaygın ukmRNA tipi intergenik kmRNA'lar (Şekil 2A) olup bu RNA'lar protein kodlayan genlerden oldukça uzak bölgelerde lokalize olmaktadır. Protein kodlayan genlerin enhancer bölgeleriyle etkileşme potansiyelleri olmakla birlikte, konumları dolayısıyla fonksiyonlarını tahmin etmesi en zor ukmRNA grubunu oluşturmaktadırlar. Bu RNA'lar diğer protein kodlayan genlerden bağımsız

olarak sentezlenmektedirler çünkü bu genlerin kendi promotörleri vardır. İntronik ukmRNA'lar ise tamamen protein kodlayan bir genin intronundan sentezlenir ve orjin aldığı protein kodlayan genin transkripsiyon veya kırılmasını düzenleme potansiyeline sahiptir (Şekil 2B). Ters (NATs, natural antisense transcripts) ve düz (sense) yönde olan kmRNA'lar protein kodlarla ya kısmen yada tamamen örtüşürler ve örtüşmenin bulunduğu noktaya bağlı olarak farklı mekanizmalarla örtüşükleri genlerin ifadesini düzenleyebilirler (Şekil 2C,D). Kodlayan transkriptlerle karşılaştırıldıklarında, bazı kmRNA'larda şapka (cap) ve çoklu A kuyruğu (polyA tail) bulunurken bazıları daha farklı mekanizmalarla stabil halde korunmaktadır (Wiluzs, 2015).

Gen ifadesi perspektifinde RNA makromoleküllerinin en ilginç yönleri, sadece spesifik sekansları nedeniyle değil özgül katlanma topolojileri nedeniyle de iyi bir hücrel aptamer olma potansiyellerinin bulunmasıdır. Bilinen tipik RNA:protein etkileşimlerinin yanında, RNA:RNA ve RNA:DNA etkileşimleriyle hücre içi moleküler mekanizmaları düzenleyebilmektedirler (Dethoff *vd.* 2012). Bu mekanizmalar arasında *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 hücrel işlevler bulunmaktadır (Geisler ve Coller, 2013; Yoon *vd.* 2012; Gardini ve Shiekhattar, 2015). Gen regülasyonu açısından kmRNA'ların transkripsiyonel regülasyondaki rolleri kısmen iyi tanımlanmıştır (Bonasio ve Shiekhattar, 2015). Eğer uzun kmRNA yakında bulunan kodlayan bir gene antisense ise veya kısmen örtüşme (overlap) var ise, transkripsiyonu fiziksel olarak engelleyebileceği gibi (RNA polimerazı meşgul ederek veya direkt DNA dizilerine eşleşerek), sentezlenen kmRNA'ya bazı proteinler bağlanarak yakınlarda bulunan RNA polimerazların aktivitesini düzenleyebilir (Martianov *vd.* 2007; Tripathi *vd.* 2010). mRNA'ya veya proteinlere bağlanan kmRNA'lar, mRNA'ların çekirdekten sitoplazmaya taşınma verimliliğini, sitoplazmada konumlanma bölgelerini veya translasyona uğrama oranlarını düzenleyerek gen ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada da düzenleyebilirler (Geisler ve Coller, 2013; Franco-Zorrilla *vd.* 2007). Belki de kmRNA'ların genlerin ifadesini düzenlemekte kullandıkları en ilginç yöntemlerden bir tanesi küçük kmRNA üretiminde template görevi görmeleridir. Örneğin, aslında uzun bir transkript olan ve X kromozom inaktivasyonunda rol oynayan *Xist* ve *Tsix* kmRNA'larından üretilen küçük RNA'lar gen promotör bölgelerine ve/veya proteinlere bağlanarak transkripsiyonu düzenleyebilmektedirler (Ogawa *vd.* 2008).



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

2.3 Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Apoptoz

Uzun kmRNA'ların gen regülasyonundaki rolleri dikkate alındığında, aktivitesini düzenlediği gen/genlere bağlı olarak hem gelişimde hem de bir dizi hastalıkların patolojisinde rol oynama potansiyelleri bulunmaktadır. Literatürde mevcut bilgiler ukmRNA'ların normal gelişim yanında kanser, metabolizm, obezite, nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıklar gibi birçok hastalığın oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Gloss ve Dinger, 2015; Harries, 2012; Pauli vd. 2011).

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 vd. 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 vd. 2010). Hücre siklusunda 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 siklusunu düzenlediği gösterilmiştir (Hung vd. 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 vd. 2010). Ozgur vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise,

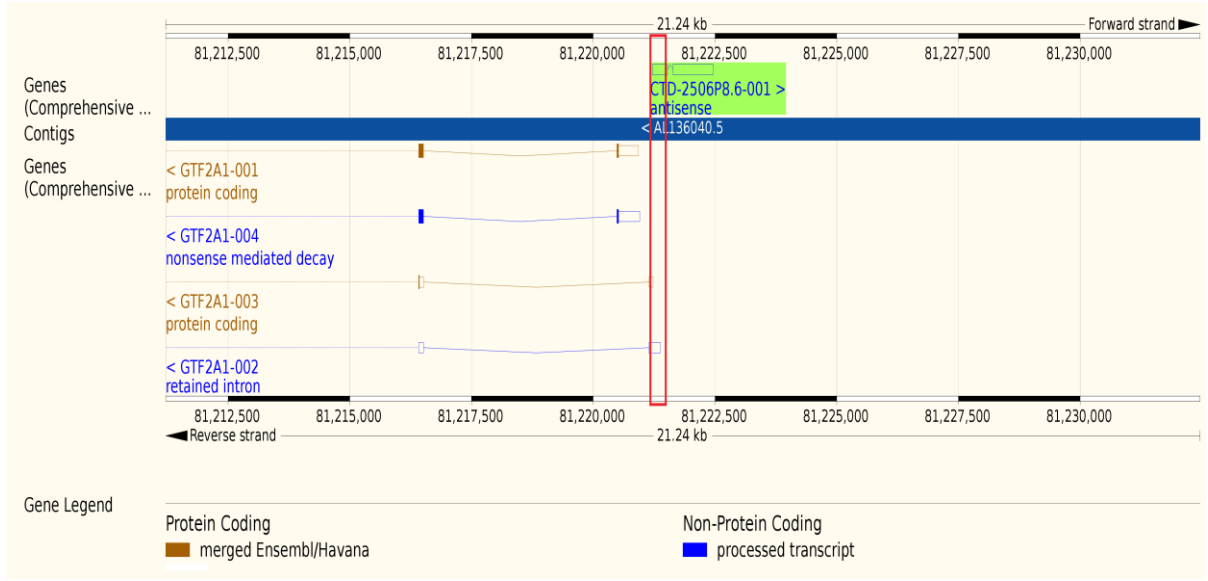
genotoksik ajanlarla muamele sonrası 10 aday ukmRNA'sından 7 adetinin miktarında değişimler olduğu gözlenmiş ancak fonksiyonel testler yapılmamıştır.

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 *vd.* 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 *vd.* 2014). Bu ukmRNA'nın apoptotik yolağı BCL-XS yoluyla düzenlediği belirlenmiştir.

Literatürde mevcut bilgiler apoptozun düzenlenmesinde ukmRNA'ların rol oynayacağını işaret etse de, 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. Kendi laboratuvarımızda yürüttüğümüz ve 2016'da tamamlanan 113Z371 No.lu TÜBİTAK projesi kapsamında HeLa hücreleri dört farklı ajanla (sisplatin, doksorubisin, TNF-alfa ve anti-Fas antikoru) muamele edilerek apoptoz tetiklenmiş ve farklı ifade edilen ukmRNA'lar RNA-seq yöntemiyle belirlenmiştir. Buldukları genomik lokasyon (örneğin apoptozu düzenleyen kodlayan genlere yakınlık) ve 4 ajanla ortak düzenlenme profilleri dikkate alınarak 4 aday ukmRNA belirlenmiştir. Bu adayların GapMer (Exiqon) teknolojisiyle susturulması sonrası HeLa hücrelerinde ölümün kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Ancak, 113Z371 No.lu proje kapsamında bu adaylar ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmamıştır.

2.4 GTF2A1-AS ve Apoptoz

GTF2A1-AS (Ensemble Gen ID: ENSG0000027378) 113Z371 No.lu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında belirlediğimiz 4 aday genden birisidir. Şekil 3'te görüldüğü üzere bu gen, önemli bir transkripsiyon faktörü olan GTF2A1 ile antisense yönünde çalışmaktadır. GTF2A1-AS ile ilgili literatürde yayın bulunmamasıyla birlikte, GTF2A çok iyi bilinen bir bazal transkripsiyon faktörü olup TFIID ile promotör etkileşimlerini pozitif yönde etkilemekte ve özellikle INR'ye bağlı transkripsiyon başlangıçlarında önemli görevler üstlenmektedir (Malecova *vd.* 2015).



Şekil 3. GTF2A1-AS'in genomik lokalizasyonu. ENSEMBLE veri tabanında GTF2A1-AS (CTD-2506P8.6-001) anotasyon çalışması yapılmıştır. Bu genin antisense olarak çıktığı GTF2A1 gen bölgesi kırmızı dikdörtgen ile işaretlenmiştir.

113Z371 No.lu TÜBİTAK projesi kapsamında elde ettiğimiz iki önemli veri, GTF2A1-AS'in apoptozu düzenleme potansiyeli olduğuna işaret etmektedir. İlk veriye göre, GTF2A1-AS susturulması HeLa hücrelerini ölüme sürüklemesidir. GTF2A1-AS'in apoptozu düzenleme potansiyeli olduğuna işaret eden ikinci önemli gözlem, GTF2A1-AS geninin susturulduğu hücrelerle yapılan RNA-seq çalışmasından elde edilmiştir. GTF2A1-AS geni Gapmer ile susturulduktan sonra elde edilen RNA'lar sekanslamaya tabi tutulmuştur. Negatif gapmer ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, GTF2A1-AS'in susturulduğu hücrelerde 3737 genin (kodlayan ve kodlamayan) ifadesinde farklılıklar belirlenmiştir. Farklı ifade edilen genlerin hangi fenotiplerde rol oynadığını belirlemek için, PANTHER programı ile Gen Ontoloji çalışması yapılmıştır. İlginç bir şekilde, bu genlerden yaklaşık 150 adeti apoptotik yollarda rol oynadığı bilinen kodlayan genlerden oluşmaktadır.

Literatürde GTF2A1-AS'in fiziksel yapısı, hücre içi lokasyonu ve oluşturduğu kompleksler ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Aynı şekilde GTF2A1-AS'in apoptozu düzenlediğini direkt gösteren herhangi bir çalışmada bulunmamaktadır. 113Z371 No.lu proje kapsamında toplanan verilerin bu gen ile ilgili kısmının etki değeri daha yüksek dergilerde yayımlanabilmesi için, GTF2A1-AS RNA'sının hücre içi konumunun, oluşturduğu komplekslerin ve bu kompleks bileşenlerinin apoptotik sinyal ileti yollarıyla

bağlantısının ortaya çıkartılması büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla, mevcut proje kapsamında HeLa hücreleri model olarak kullanılarak GTF2A1-AS ukmRNA'sının fiziksel yapısı, hücre içi konumu ve etkileşim gösterdiği kompleksler araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Memeli Hücrelerinin Bakımı ve Apoptoza Uğratılması

Bakım, propagasyon ve genetik manipülasyonlarının çok ucuz, kolay ve hızlı olması nedeniyle model sistem olarak HeLa hücreleri kullanılmıştır (Rahbari ve ark., 2009). HeLa 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.

Kendi laboratuvar tecrübelerimize göre 80 uM sisplatin (16 saat) uygulaması HeLa hücrelerinde LD50'ye ulaşmak için yeterli olmaktadır (113Z371 No.lu TÜBİTAK projesi bitirme raporu; Literatür önerisi; 5 µM sisplatin, WesierskGadek vd. 2008). Bu nedenle, doz ve zaman kinetiği yapmaya gerek kalmaksızın yukarıda ifade edilen dozlarda apoptotik yolaklar tetiklenmiştir.

3.2 Apoptozun Akış Sitometresi, Floresan Mikroskopisi ve Hücre Sayım Cihazı İle Belirlenmesi

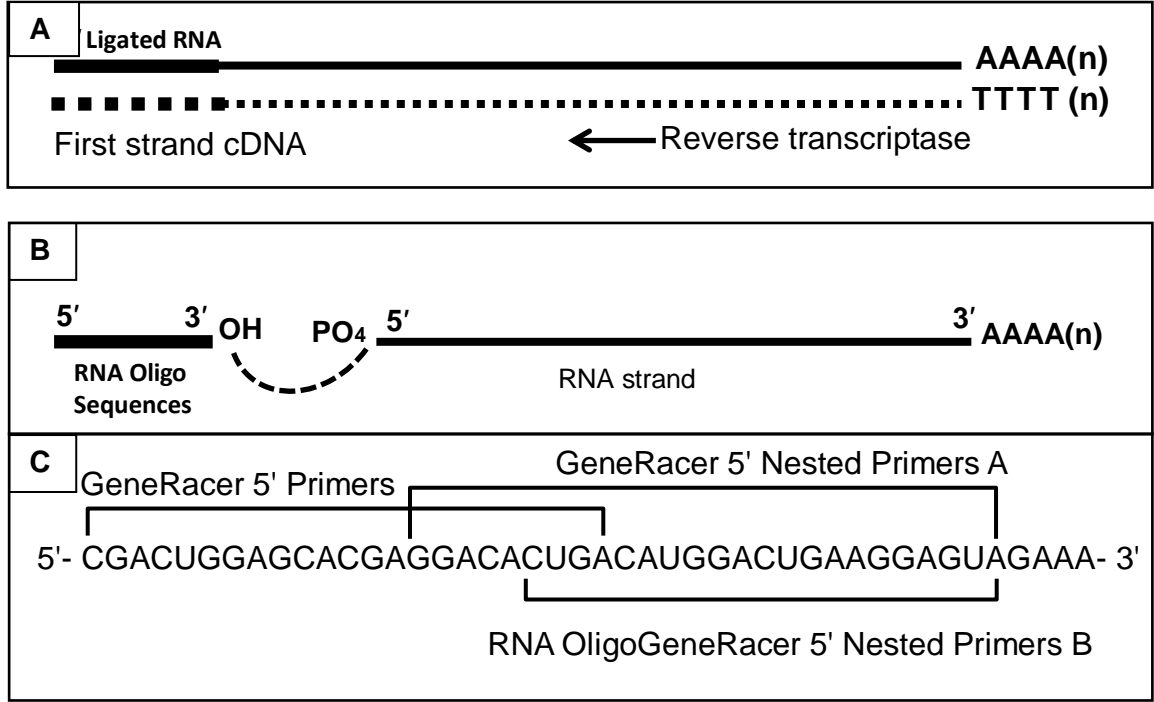
HeLa hücrelerinde tetiklenen apoptotik değişimler primer olarak akış sitometresinde incelenmiştir (Applied Biosystems Attune veya BD FACS). Erken apoptotik evredeki hücreler Aneksin V (BD), geç apoptotik evredeki hücreler ve ölü hücreler ise 7AAD (BD) ile boyanarak karakterize edilmiştir. Boyama için 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 yeterli 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 öneklerden 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 mavisini içine almış hücreler ölü veya ölmekte olan hücreler kabul edilmiştir.

3.3 5'/3' RACE ile GTF2A1-AS Geninin Tam Sekansının Belirlenmesi

RACE deneyi GeneRacer™ kiti (Invitrogen) kullanılarak, birebir üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Transkriptin 3' sekanslarına ulaşmak için oligod(T) ile cDNA hazırlanmış (Şekil 4A), gen spesifik primerler ile amplifikasyon yapılmıştır. Transkriptin 5' ucunu çoğaltmak için, beş mikrogram RNA'dan sırasıyla 5' fosfat ve şapka yapıları uzaklaştırılmıştır (Şekil 4B). Elde edilen ürünlere RNA oligoları eklendikten sonra, bu oligolara antisense primerler ve gene özgü primerler kullanılarak cDNA'nın ikinci iplikciği sentezlenmiştir. PCR ile çoğaltılan ürünler TOPO klonlama vektörüne klonlandıktan sonra İYTE BİYOMER merkezinde sekans analizine tabi tutulmuştur. FinchTV programıyla analiz edilen sekans verileri insan genom veri tabanlarına eşleştirilmiştir.



Şekil 4. RNA oligoları ekleyerek 5' uçların çoğaltılması. cDNA ya oligodT (Panel A) ya da gene özgü primerler (Tablo 1) kullanılarak hazırlanmıştır. Defosforilasyon ve dekapping (B) sonrası eklenen RNA oligo sekansı Panel C'de gösterilmiştir. 5' uçların amplifikasyonu esnasında cDNA'nın ikinci iplikciğinin sentezinde kullanılan primer sekansları (Nested) belirtilmiştir (Panel C). Kullanılan tüm primerlerin sekansları Tablo 1'de verilmiştir.

Table 1: cDNA sentezi, PCR amplifikasyon ve sekanslama da kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sekansı	Boyut CG%
3'GTF.AS GSP forward primer	5'CCCACCAGCCTTTGGATTGTAACAGCAC3'	28 bp 54%
3'GTF.AS Nested A GSP forward primer	5'CCCACCAACTCGCATGGCCTCTCGCTAT3'	28 bp 61%
3'GTF.AS Nested B GSP forward primer	5'CGACCTTGCAAGCAGAACAGAGAATGC3'	27 bp 52%
5'GTF.AS GSP reverse primer	5' GGCAGGATTTGCTTGGGCAGAACAAGTC 3'	28 bp 54%
5'GTF.AS Nested A GSP reverse primer	5' GAGAGGCCATGCGAGTTGGTGGGTCAAG 3'	28 bp 61%
5'GTF.AS Nested B GSP reverse primer	5'GCCTAGTAGAGGACTAACCTCTGGGTAAC3'	29 bp 52%
GeneRacer 3' end reverse primer	5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG3'	25 bp 52%
GeneRacer 3' end Nested A reverse primer	5'CGCTACGTAACGGCATGACAGTG3'	23 bp 57%
GeneRacer 3' end Nested B reverse primer	5' GTAACGGCATGACAGTGTT 3'	19 bp 47%
GeneRacer 5' end forward primer	5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA3'	23 bp 61%
GeneRacer 5' end Nested A forward primer	5' GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'	26 bp 50%
GeneRacer 5' end Nested B forward primer	5' CTGACATGGACTGAAGGAGTA 3'	21 bp 48%
Human β -actin Control A forward primer	5'GCTCACCATGGATGATGATATCGC3'	24 bp 50%
Human β -actin Control B.1 reverse primer	5'GACCTGGCCGTCAGGCAGCTCG3'	22 bp 73%
M13 Forward primer (-20)	5'GTAAAACGACGGCCAG3'	16 bp 56%
M13 Reverse primer	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	17 bp 47%
T3 Reverse primer	5'ATTAACCTCACTAAAGGGA3'	20 bp 40%
T7 Forward primer	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	20 bp 40%

3.4 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 santrifügasyon 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.

Sitoplazmik ve nükleer RNA'lar kit yardımıyla pürifiye edilmiştir (Cytoplasmic and Nuclear RNA Purification Kit, Norgen Biotek, Kanada). Kit kullanım kılavuzuna göre $2,8 - 3 \times 10^6$ hücre lizis tamponu ile çözülüp, 10 dakika buz üzerinde inkübasyon sonrasında 4 °C'de 18.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sitoplazmik RNA'yı içeren süpernatant kısmı ve nükleer RNA'yı içeren çökelti kısmı birbirine karıştırılmadan ayrıldı. Uygun lizis tampon eklenerek kolon yardımıyla pürifikasyon gerçekleştirilmiştir. 50 µl elüsyon tamponunda çözülen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop ile ölçülmüştür. RNA kalitesi ise agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. İzole edilen nükleer RNA'ların agaroz jelde analizi ciddi genomik DNA kontaminasyonu olduğunu gösterdiğinden, Nükleer RNA örnekleri, RNAz içermeyen DNaz enzimiyle muamele edilmiştir (Turbo DNA-free kit, Invitrogen, ABD). Kullanım kılavuzuna göre yapılan uygulamada DNaz I enzimi eklenen örnekler 37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra +4 °C'de 11.000 RPM'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrılmıştır. DNaz I enzimi uygulanan nükleer RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

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).

3.5 GTF2A1-AS Aşırı İfade Yapılarının Oluşturulması ve GapmeR ile Susturulması

RACE sonuçlarımız ve var olan veri tabanları bilgileri kullanılarak GTF2A1-AS cDNA sekansı sentetik olarak sentezletirilmiş (Epoch Life Science, USA) ve pcDNA3.1 vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen klonun sekansı doğrulanmıştır. Transfeksiyon deneyleri daha önce 113Z371 No.lu projede belirtilen şartlarda 40 nM GapmeR veya 1500 ng plasmid kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 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 GapmeR'lerin (Exiqon) (veya plasmid DNA'ların) hibridizasyonu serum ilavesiz besiyerde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hacmi toplam olarak 100 µl'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 inkube edilmiştir. Besiyeri-GapmeR-Transfeksiyon reaktifi karışımı inkubasyon sonunda kuyucuğa damlatma yöntemiyle eklenip her tarafa eşit dağılımını sağlamak için çok kısa sekiz yazar gibi karıştırılmıştır. Transfeksiyon işleminin tamamlanmasına müteakip plakalar inkubatöre (37 °C, %5 CO₂, nemli) konulup 48-72 saat inkübe edilmiştir. İnsert içermeyen vektörler veya negatif GapmeR'ler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6 Real Time PCR Analizleri

RT-PCR öncesinde, gerekli olması durumunda, 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 inkube 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 ul 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.

3.7 Biyoinformatik Analizler

113Z371 No.lu proje kapsamında, negatif ve test GapmeR ile GTF2A1-AS'in susturulduğu hücreler ile transkriptomiks analiz yapılmış ancak veriler detaylı olarak incelenememiştir. Susturma sonrası RNA sekans verisinde \log^2 kat değişimi pozitif ve negatif yönde 0,6 olan genler taranmıştır. Gene Ontology veritabanı (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>) kullanılarak ifadesi değişen genlerin işlevlerine göre sınıflandırması yapılmıştır. Bu analiz sonrası hücre ölümü ile ilgili olduğu belirlenen 195 gen Pathway Studio programıyla analiz edilerek hücre ölümüyle ilgili etkilenen yollar irdelenmiştir.

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 μ l /10⁶ hücre) ve 100X proteaz kokteyl (SantaCruz) (1X olacak şekilde) eklenip 20 dk buz üzerinde bekletilerek parçalanmıştır. Oluşum 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-merkaptoetanol) 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' yapılarak 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 Ponceau 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 blokajı tamponu (1X TBS, 0.05% Tween20, 0.5% yağsız kuru süt) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklanmıştır. Uygun primer antikör 1:5000 oranında %0,5 süt/%0,05 Tween20/1X TBS içerisinde dilüe 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) (İYTE BioMer) veya Fusion SL (PEQLAB) cihazı kullanılarak görüntü alınmıştır.

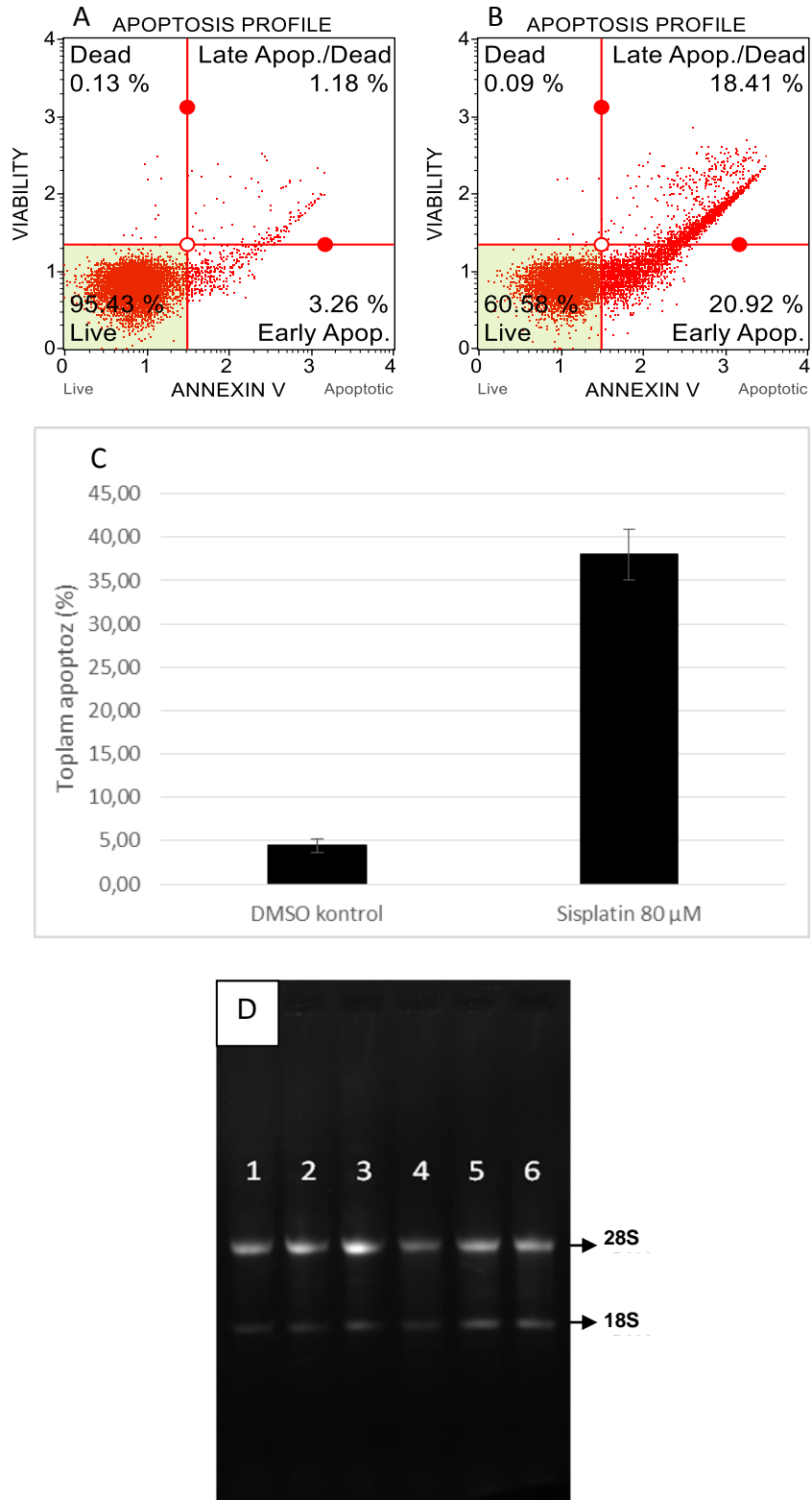
3.9 GTF2A1-AS ile Etkileşen Komplekslerin Belirlenmesi

GTF2A1-AS:protein komplekslerini çöktürmek için transkriptin yüksek miktarda ifade edildiği sisplatin ile muamele edilmiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Çöktürme işlemleri için GTF2A1-AS transkriptine antisense 20-nt uzunluğundaki prob lar 3' uçlarından biyotin işaretli olup 60-80 nt aralıklarla tüm ukmRNA'yı kapsayacak şekilde dizayn edilmiştir (www.singlemoleculfish.com, Raj vd. 2008). Negatif prob seti ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Transkriptin çekirdekte lokalize olması nedeniyle, nükleer hücre lizatı ve EZ Magna ChIRP RNA Interactome Kit kullanılarak çöktürme işlemi yapılmıştır. Kısaca, 40 milyon HeLa hücresi %1 glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası 1/10 hacimde 1.25 M glisin ile karıştırılan örnekler 2000 RCF'de 5dk döndürülüp sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurulmuştur. Daha sonra hücreler proteaz inhibitörü, PMSF ve RNaz inhibitörü içeren lizis tamponunda (pelet ağırlığının 10 katı hacim) süspansiyon haline getirilmiş ve sonike edilerek kromatinin parçalanması sağlanmıştır. Hücre fiksasyonu, lizisi ve sonikasyonu sonrası elde edilen ve ukmRNA:protein (veya kromatin) komplekslerini içeren ekstratlar bir sonrası aşamada biyotinle işaretli ve ukmRNA'ya antisense primerlerle hibridize edilmiştir (1 mL ekstrat için 100 pmol prob, 37°C'de 4 saat). 4 saatlik inkübasyon sonrası 100 µL C-1 manyetik boncukları eklenerek 30 dk daha inkübasyon yapılmıştır. 5 tur yıkama sonrası DynaMag-2 manyetik stripler kullanılarak RNA:protein kompleksleri çöktürülmüştür. Elde edilen pelletten protein izolasyonu yapılarak İYTE Kütle Merkezi'nde kütle spektrofotometri analizine tabi tutulmuştur.

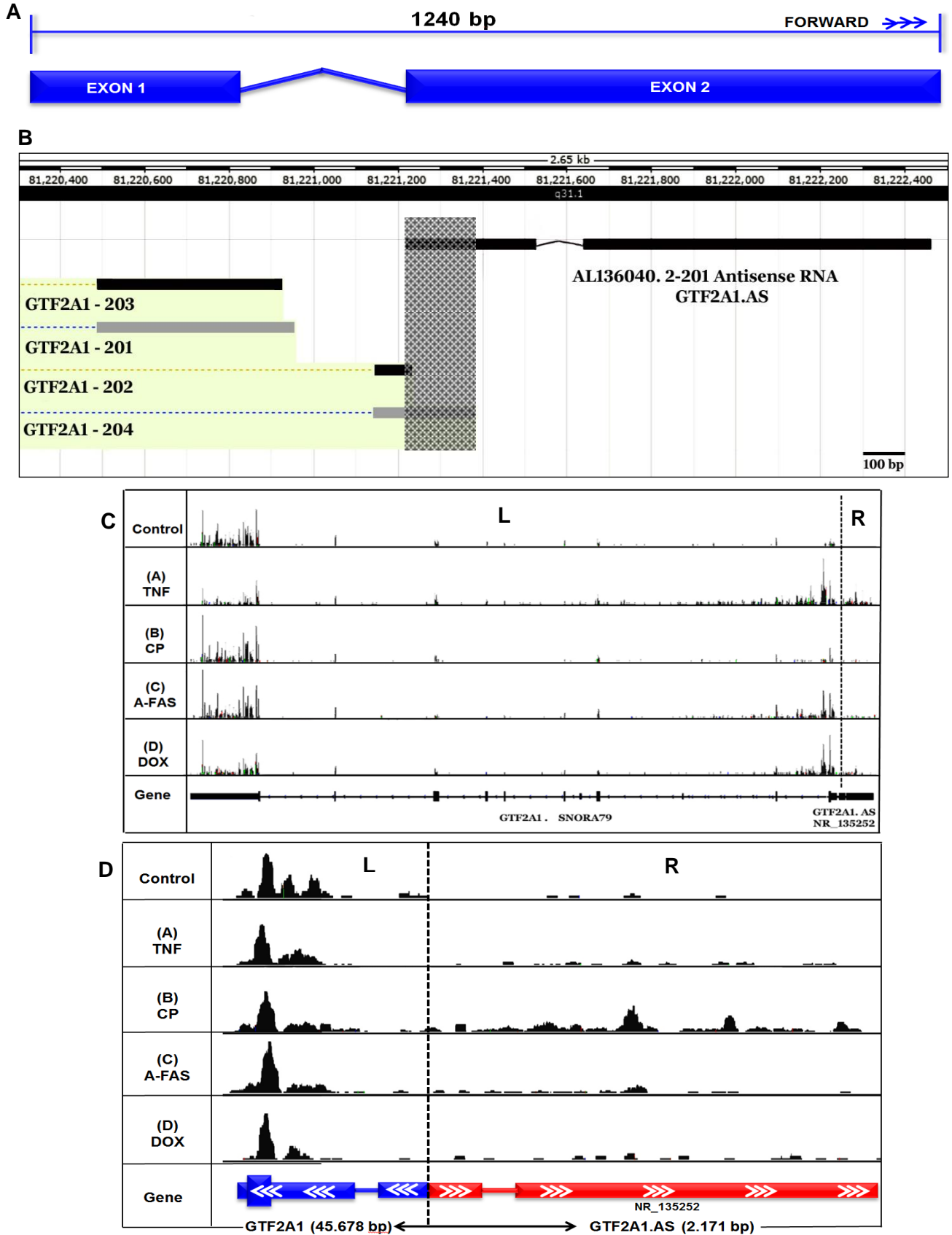
4. BULGULAR

4.1 HeLa Hücrelerinde Apoptozun Tetiklenmesi ve RNA İzolasyonu

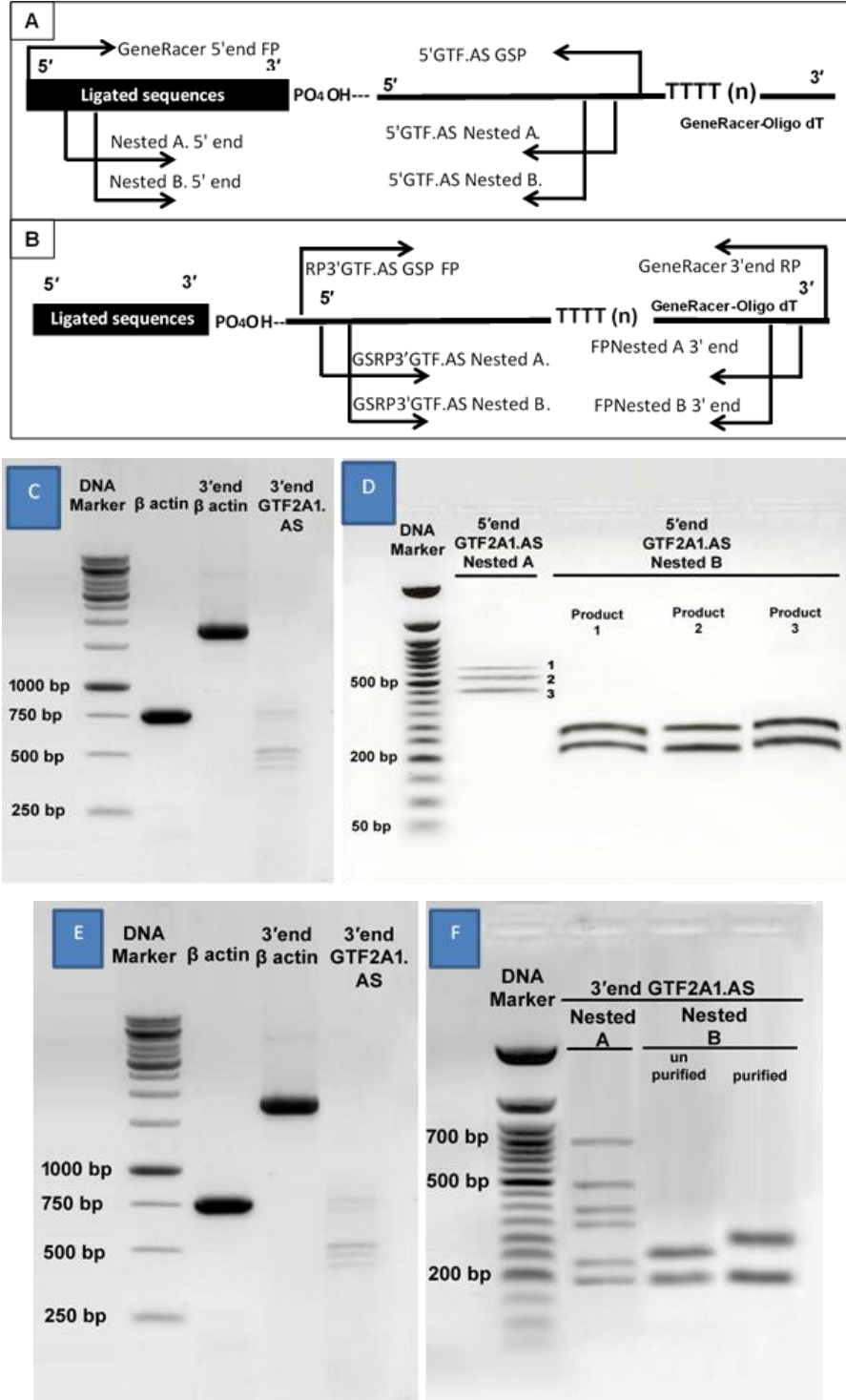
Proje önerisinde belirtildiği üzere, insan hücrelerinde apoptozu tetiklemek için HeLa hücreleri model olarak seçilmiştir. GTF2A1-AS transkripti apoptotik şartlarda indüklendiğinden, RACE ve hücre içi lokalizasyon deneylerinde sisplatin ile apoptozun tetiklendiği hücreler kullanılmıştır. Bu bağlamda HeLa hücreleri 80 µM sisplatin ile 16 saat



Şekil 5. Sisplatin uygulaması sonrası akım sitometre analizi ve RNA izolasyonu. 80 μM sisplatin ile veya DMSO (kontrol) ile 16 saat uygulama sonrası hücreler MUSE akım sitometresi ile analiz edilmiştir. (A) DMSO negatif kontrol grubu, (B) 80 μM sisplatin ile 16 saat uygulama yapılan hücre grubu, (C) Hücrelerin apoptoz yüzdeleri, (D) Hücrelerden izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jelde analizi. İlaç muamelesi üçer replika halinde yapılmış olup bir replikaya ait akım sitometre verileri sunulmuştur.



Şekil 6. GTF2A1 sense ve GTF2A1-AS antisens genlerinin yapısı ve ilaçlar ile muamele sonrası ifade miktarları. Ensemble verilerine göre GTF2A1-AS'in ekzon yapısı (A) ve GTF2A1 kodlayan gen ile fiziksel ilişkisi (B). 1137371 No.lu TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan transkriptomiks çalışmasında 4 ilaç ile [TNF, CP (sisplatin), A-FAS (anti-FAS) ve DOX (doksorubisin)] muamele sonrası GTF2A1 ve GTF2A1-AS ifade miktarları (C). Panel D, Panel C'nin büyütülmüş halidir.



Şekil 7. GTF2A1-AS sekansının RACE yaklaşımıyla eldesi. 5' (A) ve 3' (A) RACE deneyi için kullanılan strateji ve gen spesifik primerler gösterilmiştir. Defosforilasyon, decapping, cDNA sentezi ve PCR ile amplifikasyon aşamaları için B-aktin (Panel C ve E) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 5' RACE sonrası elde edilen cDNA ürünleri (C) kullanılarak iki tur nested PCR yapılmıştır (D). 3' RACE ile elde edilen cDNA (E) ile de nested PCR yapılmıştır (F). En son aşamada elde edilen PCR ürünleri TOPO plasmidine klonlanmış ve sekans analizine tabi tutulmuştur.

inkübe edildikten sonra Annexin V/7AAD ile boyama yapılarak apoptoz tetiklenmiş ve üç replika halinde hazırlanan örneklerden RNA izole edilmiştir (Şekil 5). Akım sitometre verilerine göre % 39 apoptoz oranına ulaşılmıştır (Anexin V pozitif ve AnexinV/7AAD double pozitif hücre topluluğu).

4.2 GTF2A1-AS Transkriptinin Tam Sekansı

GTF2A1-AS transkriptinin tam sekansı henüz bilinmemektedir. cDNA sekansına ulaşabilmek için öncelikle RNA-seq verilerinden istifade edilmiştir. 113Z371 No.lu proje kapsamında sisplatin ilacı ile muamele sonrası yapılan RNA-seq verisi kullanılarak, insan genomunun hangi koordinatlarından GTF2A1-AS transkriptinin üretildiği belirlenmiştir. RNA-seq verilerimize göre 1243 nükleotitlik bir transkriptte sahip olan GTF2A1-AS, iki ekzon arasında 113 nt intron bölgesi içermektedir (Şekil 6A-B). RNA-seq verilerinde, özellikle sisplatin ile muamele sonrası sekans piklerinde meydana gelen artışlar rahatça görülebilmektedir (Şekil 6D, GTF2A1-AS (R) pik yüksekliğinin Control ile CP karşılaştırması).

Bu veriler ışığında, sisplatin ile muamele edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak, defosforilasyon ve decapping sonrası RNA'ların 5' ve 3' uçlarına bir oligo RNA eklendikten sonra uygun primerler kullanılarak cDNA sentezlenmiştir (Şekil 7A). Akabinde gene özgün primerler kullanılarak 5' ve 3' uçlar amplifiye edilmiştir (Şekil 7C ve E). Pozitif kontrol olarak kullanılan B-aktin keskin ve tek bir bant verirken, muhtemelen ifade miktarının çok düşük olması nedeniyle, GTF2A1-AS birden fazla bant vermiştir. Bir dizi nested PCR sonrası doğru bantlar beklediği boyutta çoğaltılmış (Şekil 7D ve F) ve jelden izole edilerek TOPO plasmidine klonlanarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekans verisi RNA-seq ile uyumlu olup çoklu transkripsiyon başlama olguları tespit edilmemiştir. Transkripsiyon başlama bölgesinden yukarı sekanslar incelendiğinde ökaryotlarda yoğun olarak kullanılan TATA kutusu da tespit edilememiştir (Şekil 8). Ancak, GC-zengin sekanslar belirlenmiştir.

4.3 GTF2A1-AS Transkriptinin Hücre İçi Lokalizasyonu

Uzun kodlamayan RNA'ların hücre içi lokasyonları ile potansiyel görevleri arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Örneğin, transkripsiyonel düzenlemede görevli ukmRNA'lar çekirdekte yer alır iken, transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda görevli ukmRNA'lar sitoplazmada yer almaktadırlar. Bu bağlamda, GTF2A1-AS transkriptinin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek için DMSO kontrol ve sisplatin ile muamele sonrası apoptozun tetiklendiği HeLa hücrelerinden nükleer ve sitoplazmik RNA izole edilmiştir (Şekil 9A).

-121.-180	CGTGGCGAGGCGCGCCGGGGCGGAGGCCCGCGGAGCCGCGTGTGTCACGCGCGGTGGCG
-61.-120	GGTACTGGACTGGCGGAGCCCGGGAGTGAAGTAGTGAATCGGACCTACGCCCTCCAA
0.-60	CGCTCGCGTGATCACGTGGTTGGCACCCAGGCGGAAGTCTGCGGCAGTTCTTTGCGGTGA
1-60	AGGTGGGACCGCCTCCTGTGCGACGTTTCCGCTGGTCCCGCGCTTTAGGAGCTAGGAAA
61-120	TGTGACAGAGGCGGTGCCTACTGCCTCGCTAGGAATGGCCGCGGAGGAGGACTGGTCAG
121-180	TGGCGTGGCTTCCGGCCTCTGGCGCGTTCCTATTCGGGAAGGTTTAAATGCGGAGTCAT
181-240	CTCTTGATTTGTCAGCGAGGCTTTGACTGTGAGCTTCGCGCGTTCGCGCCTCACCGCCT
241-300	CACCGAGGGTGGGTCTTTCGCGCGCAGAATTGTGTAGGATTTTCCAAAGGGAGTAAAAGC
301-360	CGATCGGGGCCTACTTTTAAACATCCACAATTAGTAACGTCTGATTTCGTTTGTTCACA
361-420	GTGGGTACGCTGCGAAGACTAGGCTTATGTTACCCAGAGGTTAGTCCCTACTAGGCCAC
421-480	GTACTTTAAATAATTTATCACGCTAGTGGAAATGCGGGGTGGAAGAAAACCCACCAGCC
481-540	GTACTTTAAATAATTTATCACGCTAGTGGAAATGCGGGGTGGAAGAAAACCCACCAGCC
541-600	TTTGGATTGTAACAGCACAGTAACCTTTCCCTGGTTTTTAAAAATATTGCCAAAATACTGC
601-660	GACTCCATGTGGCCAACGTATAGTGACTGATCCTTTGAAATGCATGCCCTTGACCCACC
661-720	AACTCGCATGGCCTCTCGCTATAAGAGAGCAAGCCGGTGTGTCCATGTTCAATTCAAT
721-780	AAGTGCAATTCATAAAGCTTTTGACTTGTCTGCCAAGCAAAATCCTGCCTTTATATCGA
781-840	CCTTGCAAGCAGAACAGAGAATGCTGTTTGAAGGCAGAAATTCATAGTACCTAGTTTTCT
841-900	TGTCCCTGGGAATTTTGAGGGACTTGAATGTGCGCGTGGATGAGGGAGTTTGTCTT
901-960	CCAGAGACAAAGCAAAACGAAACGTCAAAGTCTGTGCTGGTGAACAGATTGAAGAA
961-1020	TATCAAAGGCGCTTACCAAAGAGGAAAAAATGCATCTTGCCAAGACTTGAAGAAAGG
1021-1080	GATTAGAGAAACCAGAGGCCTTGAATACTCAGAAAATGGGAGATTGTGAATGGGTGTAGA
1081-1140	GGATATCTATGAACCTTGACATTTCTTTTACGCCAAGTCCATTCGCCCTGTACAGTTG
1141-1200	CTTCCCAGTTTCTGCACAGCTGCATGGTCTGGGACACTTAAAGAAAAAATCACAGGAA
1201-1243	ATCAGTGTCTTGGTATATTATATAAAGTTATGATTCTATCAA
1244-1303	CATTTGTAATTCATTTAATATTCAGGTGACAGCCCGAAAATTTACACTAAACAATACCAT
1304-1363	TCCTGTTAAGTTTACTACATATTGAGAGGACTTCTTGTACCTCCCTATTACATACTCC
1364-1423	CAAACGCTTTCACATGGAATCCCTCACCTTCCACCTAGTTTTTCCCCCTACTATTGATA

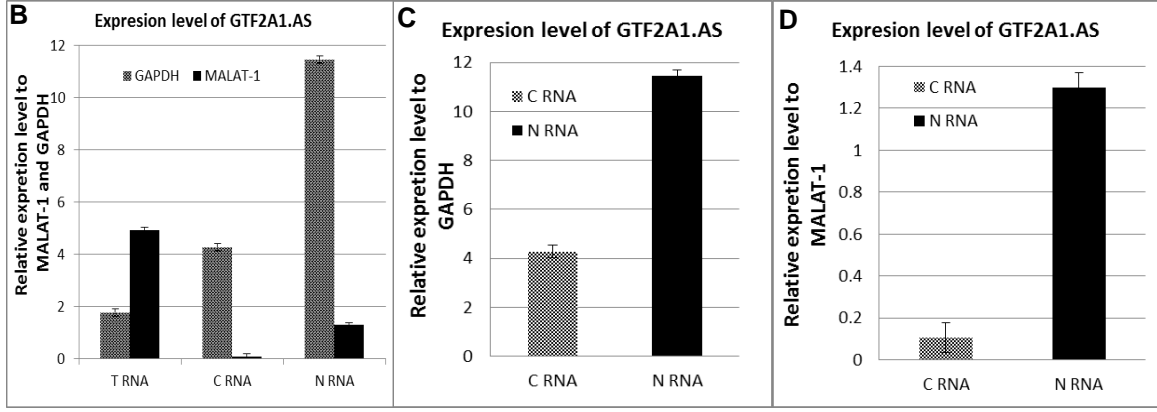
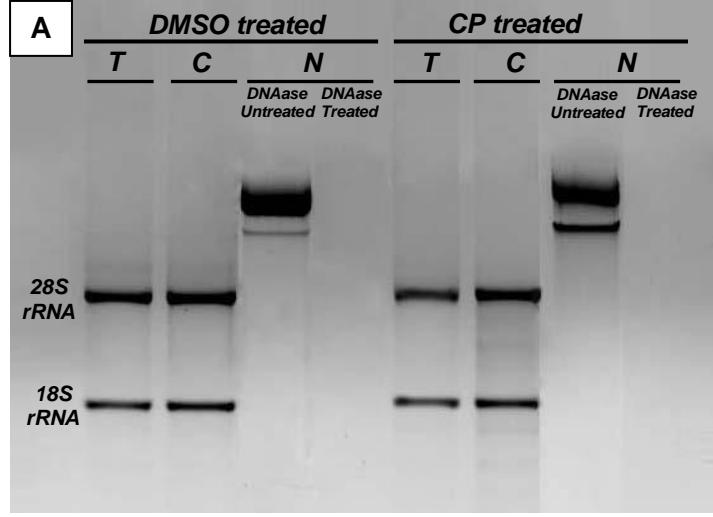
Şekil 8. GTF2A1-AS cDNA sekansı. Transkripsiyon başlama yeri öncesi ve transkripsiyon bitimi sonrası 121 bp'lik kısım sarı ile işaretlenmiştir.

Nükleer RNA'da genomik DNA kontaminyasyonu olması nedeniyle bu örnekler RNAz içermeyen DNAz ile muamele edilmiştir. Aynı zamanda, herhangi bir ayırımın olmadığı toplam RNA örnekleri de karşılaştırma için kullanılmıştır. MALAT-1 ve GAPDH transkriptleri sırasıyla nükleer ve sitoplazmik konumlanma için belirteç olarak kullanılmıştır. Kalite kontrol analizlerimize göre, literatür ile uyumlu bir şekilde, MALAT-1 nükleer fraksiyonda ve GAPDH ise sitoplazmik fraksiyonda lokalize olmaktadır (Şekil 9B). Her iki transkripte göre yapılan normalizasyon sonrası, GTF2A1-AS transkriptinin ağırlıklı olarak çekirdekte lokalize olduğu belirlenmiştir (Şekil 9C ve D).

4.4 GTF2A1-AS'in Aşırı İfadesi ve Susturulması Sonrası Gen İfadesinde Değişimler

4.4.1 GTF2A1-AS'in GapmeR İle Susturulması

Daha önce tamamlanan 113Z371 No.lu proje verilerine göre, HeLa hücrelerinde sispaltin ile apoptozun tetiklenmesi GTF2A1-AS transkriptinin miktarında artışa neden olmaktadır (Şekil 6C-D). Transkript miktarında meydana gelen değişimin biyolojik bir fonksiyonu olup olmadığını araştırmak için bu genin GapmeR ile susturulması sağlanmıştır. Bir önceki proje verilerin paralel olarak HeLa hücrelerinde apoptoz oranlarında artış

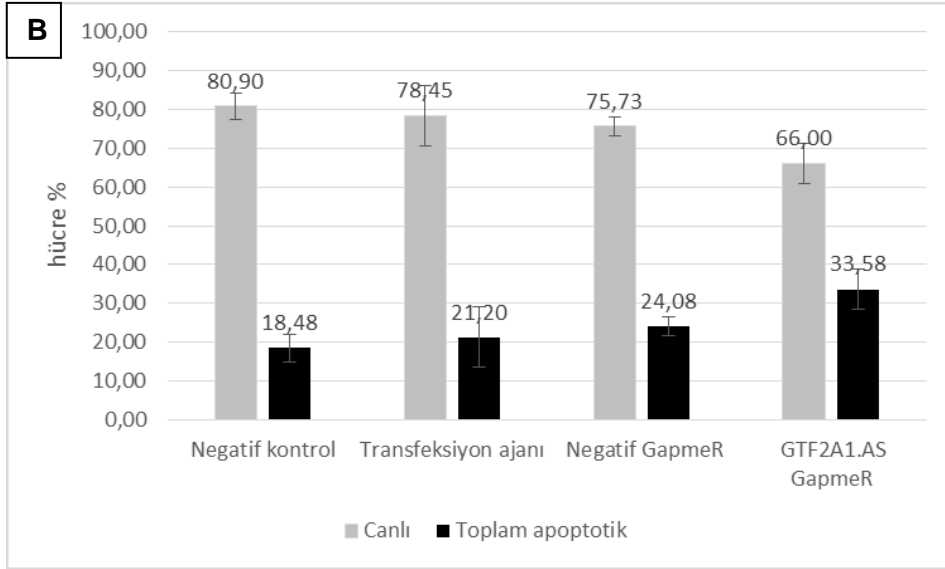
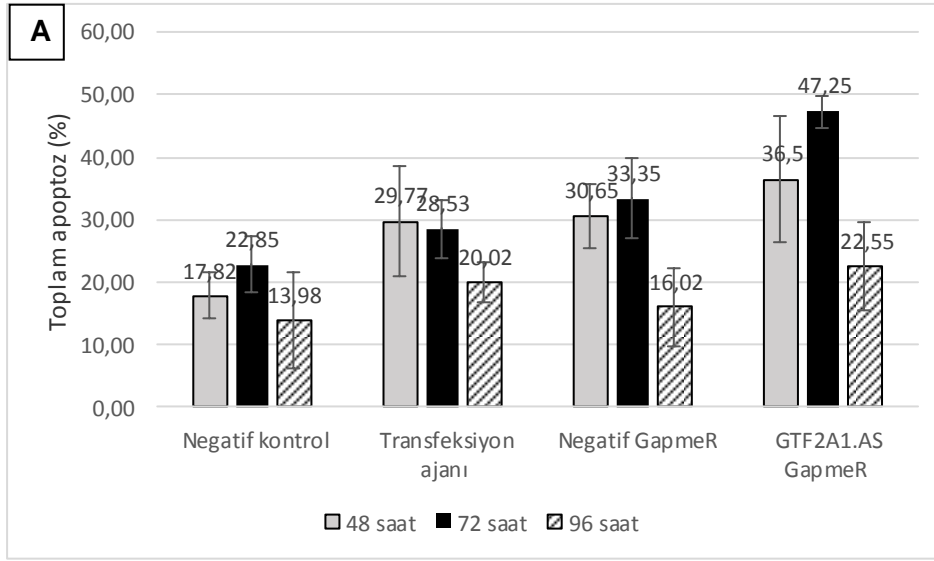


Şekil 9. GTF2A1-AS transkriptinin hücre içi lokasyonu. DMSO kontrol ve sisplatin ile muamele edilen HeLa hücrelerinden nükleer toplam (T), nükleer (N) ve sitoplazmik (C) RNA izo edilmiş ve %1'lik agarozda kalitatif incelenmiştir (Panel A). Her bir grup RNA'dan cDNA sentezledikten sonra qPCR ile GTF2A1-AS, MALAT-1 ve GAPDH mRNA miktarları belirlenmiştir. Herbir deney üç defa tekrarlanmıştır. MALAT-1 ve GAPDH için ayrı ayrı normalizasyon yapılmıştır.

belirlenmiştir (Şekil 10). 48, 72 ve 96 saat susturma yapıldığında, özellikle 72 saatlik muamele sonrası negatif gapmer ile karşılaştırıldığında, istatistiki olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir (Şekil 10A, Negatif gapmer %33 iken Test gapmer %47, $P < 0,05$). Bu nedenle tüm susturma işlemleri üçer biyolojik replika halinde bu şartlarda yapılmış ve protein ve RNA izolasyonları bu hücrelerden gerçekleştirilmiştir (Şekil 10B).

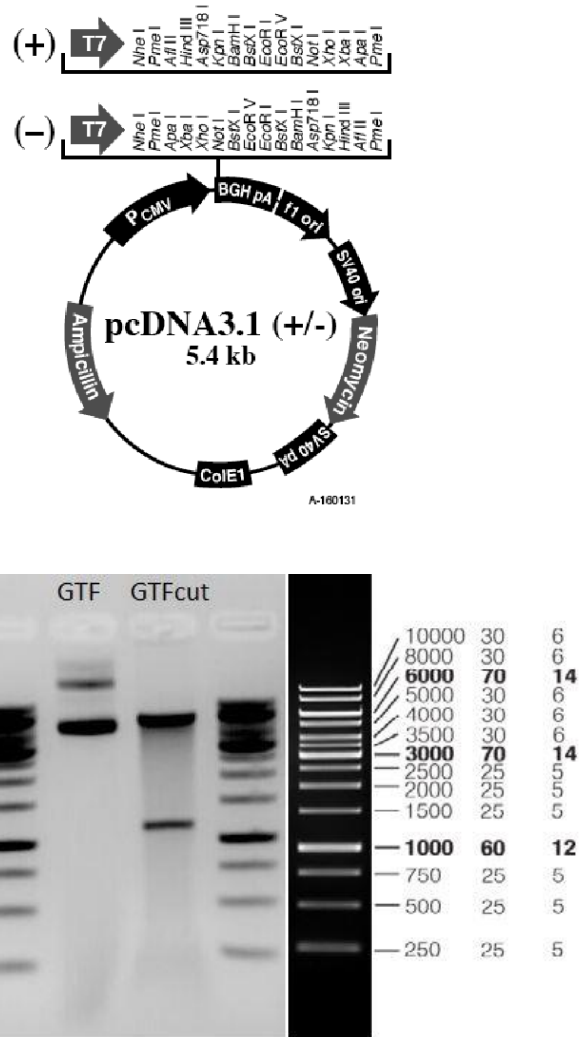
4.4.2 GTF2A1-AS'in Aşırı İfadesi

Sisplatin ile apoptozun tetiklendiği durumda GTF2A1-AS transkriptinde artış olduğu için, bu genin susturulmasının apoptoza direnç yol açması beklenmektedir. Ancak, 4.4.1 kısmında sunduğumuz veriler, beklenmedik bir şekilde, GTF2A1-AS'in susturulmasının apoptoza yol açtığını göstermektedir. Bu duruma farklı bir açıdan yaklaşmak için, proje

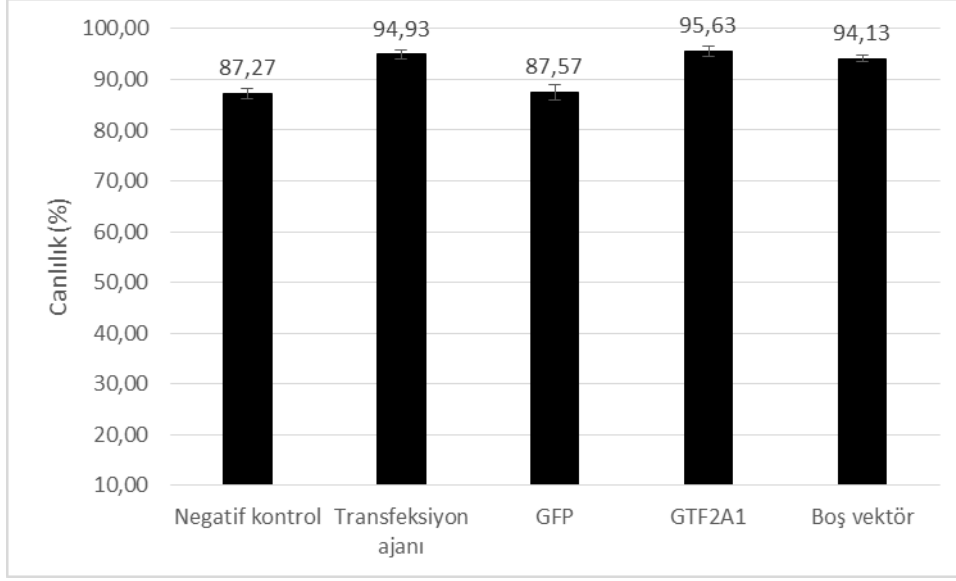


Şekil 10. GTF2A1.AS geninin GapmeR ile susturulmasına bağlı apoptoz. (A) 40 nM negatif ve test GapmeR ile transfekte edilen HeLa hücreleri, transfeksiyondan 48, 72 ve 96 saat sonra MUSE akım sitometresi ile incelenerek apoptoz (AnexinV+ ve Anexin/7AAD duble pozitif hücreler) oranları ölçülmüştür. (B) Zaman kinetiğine göre 72 saatin anlamlı fark oluşturması nedeniyle bu şartlarda transfekte edilen HeLa hücreler sonraki aşamalarda (qPCR ve western blotlama) kullanılmıştır. Sadece hücreler (Negatif kontrol) ve sadece transfeksiyon ajanı ile transfekte edilen hücreler (Transfeksiyon ajanı), negatif GapmeR ile transfekte edilen hücreler ile birlikte kontrol olarak kullanılmıştır. Örnekler 3 replika halinde hazırlanmıştır.

önerisinde olmamakla birlikte, GTF2A1-AS aşırı ifadesi olması durumunda hücre canlılığının izlenmesi planlanmıştır. Bu bağlamda, öncelikle GTF2A1-AS geninin cDNA'sı pcDNA3.1 plasmidine klonlandıktan sonra fragman varlığı restriksiyon enzim ile kesim yapılarak doğrulanmıştır (Şekil 11). Daha sonra Sanger sekanslama ile nükleotit seviyesinde doğrulama yapılmıştır. GFP ifadesi referans olarak alındığında yaklaşık %40'lık bir transfeksiyon oranının gerçekleştiği belirlenmiştir. Fragman içermeyen boş vektör ve GFP ekspresyon vektörü kontrol olarak kullanıldığında, GTF2A1-AS aşırı ifadesinin HeLa hücrelerinin apoptoz oranlarında bir değişim yapmadığı belirlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 11. GTF2A1-AS aşırı ifade yapısının oluşturulması. 1243 nt cDNA sekansı sentetik üretildikten sonra pcDNA3.1'in *NheI-XhoI* bölgesine klonlanmış ve sekanslama ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon için tek kolonilerden büyük ölçekli kültürler yapılarak endotoksin içermeyen kit ile plasmid izolasyonu yapılmış (MN NucleoBond Xtra EF, Almanya) (GTF) ve *NheI-XhoI* kesimiyle (GTFcut) insert varlığı doğrulanmıştır.

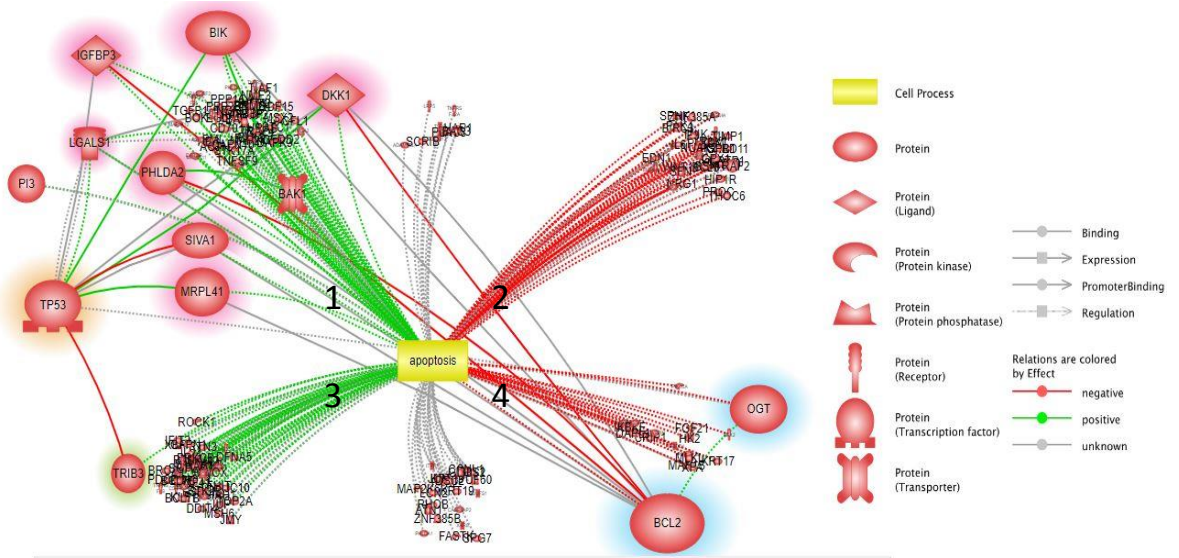


Şekil 12. GTF2A1-AS aşırı ifadesinin HeLa hücrelerinde apoptoza etkisi. 1500 ng boş vektör, GFP plasmidi ve GTF2A1-AS aşırı ifade plasmidi (GTF2A1) ile transfeksiyondan 48 saat sonra MUSE akım sitometre ile Anexin V/7AAD boyaması yapılarak apoptoz oranları belirlenmiştir. Negatif kontrol, plazmid içermeyen hücreler. Örnekler üçer replika halinde hazırlanmıştır.

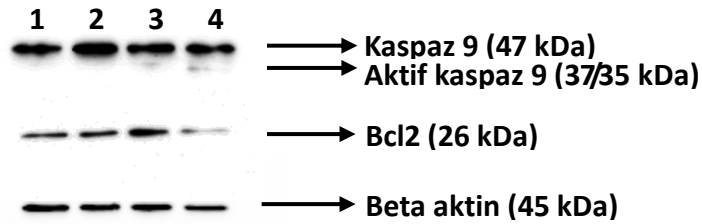
4.4.3 GTF2A1-AS'in GapmeR İle Susturulması Sonrası Gen İfadesinde Değişimler

GTF2A1-AS ifadesi ile apoptoz fenotipi arasında bağlantı kurabilmek adına şu ana kadar elde ettiğimiz veriler (1) sisplatin uygulaması HeLa hücrelerinde GTF2A1-AS transkript miktarını arttırmaktadır (Şekil 6C-D); (2) GTF2A1-AS geninin HeLa hücrelerinde aşırı ifadesi apoptozu etkilememektedir (Şekil 12) ve (3) GTF2A1-AS geninin GapmeR ile susturulması HeLa hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir (Şekil 10).

GTF2A1-AS susturulması sonrası flow sitometresi ile tespit edilen apoptotik değişimlerin moleküler mekanizmasını anlayabilmek için, 113Z371 No.lu proje kapsamında ikinci bir RNA-seq çalışması yapılmış ancak veriler tam irdelenmemiş ve doğrulanmamıştır. Negatif ve test GapmeR ile GTF2A1-AS'in susturulduğu örnekler RNA-seq analizine tabi tutularak apoptotik fenotip ile gen ifadesinde oluşam değişimler arasında bağlantı kurulması hedeflenmiştir. Negatif gapmere göre log₂ kat değişimi 0,6 olarak alındığında, 1547 genin miktarında artış ve 1464 genin miktarında azalış belirlenmiştir. Bu veriye biyolojik anlam kazandırabilmek için öncelikle PANTHER programı ile Gene Ontoloji çalışması yapılmıştır. Bu analiz sonrası, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücre döngüsü ve hücre farklılaşması gibi işlevlerin etkilendiği belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, hücre ölümü ile ilgili 195 genin ifadesinde değişim belirlenmiştir. Apoptoz ile assosiyeli 195 gen Pathway Studio programıyla analiz edildiğinde, p53-BCL2 aksı üzerinde ki yolların etkilenebileceği belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. GTF2A1-AS geninin susturulması sonrası farklı ifade edilen genlerin ilişkileri. Susturma sonrası apoptoz ile bağlantılı 195 adet gen Pathway Studio programıyla analiz edilmiştir. 1 ve 3 numaralı bağlantıların olduğu genler hücre ölümünü pozitif yönde etkilerken, 2 ve 4 numaralı bağlantılar negatif yönde etkilemektedir. 1 ve 2 numaralı genler, GTF2A1 geni susturulduğunda RNA sekansı verilerine göre miktarı artan, 3 ve 4 numaralı genler miktarı azalan genleri göstermektedir.



Şekil 14. GTF2A1-AS'in susturulması sonrası aday proteinlerin western blotlaması. 1. Sadece hücreler, 2. Transfeksiyon ajanı ile transfeksiyon, 3. Negatif GapmeR ile transfeksiyon ve 4. GTF2A1-AS GapmeR ile transfeksiyon. GapmeR konsantrasyonu 40 nM, transfeksiyon süresi 72 saattir. Transfeksiyon ajanı grubu GapmeR içermemektedir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

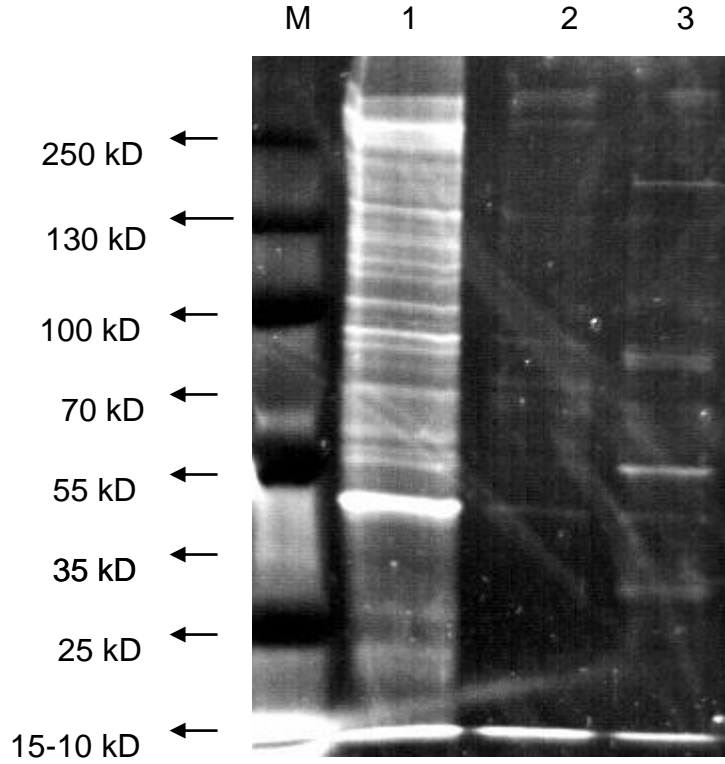
RNA-seq verilerini ve biyoinformatik analizlerle elde edilen verileri doğrulamak için bazı proteinlerin miktarlarında/aktivitelerinde meydana gelen değişimler western blotlama ile incelenmiştir. Kaspaz 8 ve 3 aktivasyonunda bir değişim belirlenmemiştir. Ancak, negatif gapmer ile transfekte edilen hücreler ile karşılaştırıldığında, test gapmer ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde aktif kaspaz 9 miktarında artış belirlenmiştir (Şekil 14, Sıra 4). Biyoinformatik analizlerle uyumlu bir şekilde BCL2 miktarında da azalış belirlenmiştir (Şekil 14, Sıra 4).

4.5 GTF2A1-AS ile Etkileşen Proteinlerin Belirlenmesi

GTF2A1-AS transkriptinin etkileştiği proteinleri belirlemek için, ifade miktarının daha fazla olması nedeniyle, sisplatin ile apoptozun tetiklendiği HeLa hücreler kullanılmıştır. Öncelikle Stellaris firmasından, GTF2A1-AS transkriptine hibridize olan biyotin işaretli primer seti sipariş edilmiştir. Merck firması tarafından üretilen ve biyotin işaretli primerler ile uyumlu olarak çalışan RIP kiti kullanılarak, GTF2A1-AS ile etkileşen proteinler çöktürülmüş ve SDS jelde yürütülerek SYPRO Ruby (Thermo Scientific) ile boyaması yapılmıştır (Şekil 15). Ne yazık ki her hangi bir antisense prob ile inkübe edilmemiş hücreler kullanıldığında, yıkama sayısı arttırılsa dahi, manyetik boncuklara spesifik olmayan bazı bağlanmalar olduğu görülmüştür. Ancak, bu spesifik olmayan bağlanma, negatif veya test antisense problemlerle inkübe edilen lizatlarda daha az görülmüştür. Negatif kontrole göre farklı çöken bazı bantlar jelden ayrı ayrı kesilerek ve ayrıca tüm çöken proteinler karışım halinde kütle spektrofotometrik analize tabi tutulmuştur. Muhtemelen bizden kaynaklı keratin kontaminasyonu dışında, üç adet proteinin kimlikleri elde edilebilmiştir. Bu proteinler, HIST2H4A (103 aa), HNRNP-K (463 aa) and HNRNPA2B1 (353 aa) olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Apoptoz hem ihtiyaç fazlası hücreleri hemde sağlığı tehdit eden ajanların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayarak homeostazın sağlanması önemli fonksiyonu olan hücresel bir işlemdir (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 paralel olarak apoptozu kontrol eden ukmRNA taramaları başlamıştır. Grubumuz tarafından tamamlanan 113Z371 No.lu proje kapsamında, apoptotik HeLa hücrelerinde farklı ifade edilen yüzlerce ukmRNA



Şekil 15. Apoptotik HeLa hücrelerinde GTF2A1-AS ile etkileşen proteinlerin SDS-PAGE analizi. HeLa hücrelerinde sisplatin ile apoptozun tetiklenmesi sonrası elde edilen nükleer lizat ile negatif ve test biyotin işaretli antisense proplar hibridize edilmiş ve streptavidin konjuge manyetik boncuklar ile çöktürülmüştür. Elde edilen pelet SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra SYPRO Ruby ile boyanmıştır. M, markör; 1. Antisense prob kullanılmayan negatif kontrol; 2. Negatif antisense prob ile çöktürme; 3. Test antisense prob ile çöktürme.

tanımlanmıştır. Bu RNA'lardan en ilginç olanlarından birisi ise, GTF2A1 genel transkripsiyon faktörü ile kısmi çakışma gösteren GTF2A1-AS ukmRNA'sıdır.

GTF2A1-AS ukmRNA'sı hakkında literatürde henüz bir yayın bulunmamaktadır. Mevcut verilerimizi yayına dönüştürebilmek için, öncelikle ilgili genin fiziksel olarak tanımlanması gerekmektedir. Bu bağlamda RNA-seq verileri baz alınarak, kontrol ve apoptotik hücrelerde transkripte ait okuma elde edilen genomik koordinatlar tespit edilmiştir. Şekil 6'da görüldüğü üzere, yaklaşık 1240 nükleotitlik bir alandan sekans verisi elde edilmektedir. GTF2A1-AS transkriptinin tam cDNA sekansını elde etmek için, 5'/3' RACE yaklaşımı kullanılmış ve apoptotik şartlar altında üretilen transkriptin nükleotit seviyesinde sekanslanmıştır. RNA-seq ve RACE yöntemleriyle elde edilen cDNA sekansında bir uyum tespit edilmiştir (Şekil 6 ve 8).

UkmRNA'lar gen ifadesini tam transkripsiyon seviyesinde, hemde transkripsiyon sonrası aşamada düzenleyebilmektedirler (Geisler ve Coller, 2013; Yoon vd. 2012; Gardini ve Shiekhattar, 2015). Transkripsiyonel regülasyonda rol oynayam ukmRNA'lar çekirdekte lokalize olur iken, transkripsiyon sonrası regülasyonda görev yapan ukmRNA'lar sitozolik konuma sahiptirler. Bir ukmRNA'nın hücre içi konumu ile moleküler fonksiyonu arasında böyle bir bağ olması nedeniyle, GTF2A1-AS transkriptinin hücre içi konumu belirlenmiştir. Sisplatin ile gen ifadesi tetiklendikten sonra, toplam, nükleer ve sitoplazmik RNA ayrı ayrı izole edilmiş ve her bir fraksiyondaki GTF2A1-AS ifade miktarı belirlenmiştir. Elde edilen veriler bu transkriptin çekirdekte lokalize olduğunu göstermiştir (Şekil 9). Kontrol olarak kullanılan MALAT-1 ve GAPDH ise literatür ile uyumlu bir şekilde sırasıyla çekirdek ve sitozolde bulunmaktadır (Tripathi vd., 2010; Jagannathan vd., 2011). Mevcut proje önerisi kapsamında olmayan bazı diğer ukmRNA'lar incelendiğinde ise, bazı adayların sitoplazmada konumlandığı görülmektedir. Bu verilerde, potansiyel fonksiyona bağlı olarak ukmRNA'nın konumunun değiştiğini doğrulamaktadır.

Proje kapsamında kullanılan RIP kiti (Merk) tarafımıza ne yazık ki 6 ay gibi çok uzun bir süre sonunda ulaştırılmıştır. Bu kitin alternatifinin olmaması nedeniyle, bu bekleme esnasında süreyi değerlendirebilmek adına, proje önerisi kapsamında olmamakla birlikte, GTF2A1-AS'in susturulması ve aşırı ifadesi sonrası hücre fenotipinde ve gen ifadesinde oluşan değişimler irdelenmiştir. GapmeR teknolojisi kullanılarak GTF2A1-AS transkripti suturulduğunda, HeLa hücrelerinin apoptoz oranında, negatif GapmeR'e kıyasla bir artış görülmüştür (Şekil 10B, $P < 0,05$). HeLa hücrelerinin sisplatin ile muamelesi sonrası GTF2A1-AS transkript miktarında artış görüldüğünden, bu genin susturulmasının apoptoza yol açması beklenmemektedir. GTF2A1-AS-apoptoz ilişkisini değişik bir açıdan irdelemek için, aşırı ifade yapıları hazırlanmış ve HeLa hücrelerinde bu genin aşırı ifadesi sağlanmıştır. İlginç bir şekilde, GTF2A1-AS aşırı ifadesinin HeLa hücrelerinin apoptozunda bir farka yol açmadığı belirlenmiştir (Şekil 12). Literatürde her hangi bir fenotipik şartta miktarı sadece artan yada azalan bir genin, hem susturma hemde aşırı ifade yapıldığında aynı fenotipi oluşturabileceğine dair yayınlar mevcuttur. Örneğin, SRPK1 geninin hem susturulması hemde aşırı ifade edilmesi Akt defosforilasyonuna yol açarak kanser oluşumuna yol açmaktadır (Wang ve ark., 2014). Ancak, GTF2A1-AS aşırı ifadesi apoptoza yol açmadığından, daha değişik bir regülasyon olduğu şeklinde değerlendirilmektedir.

GTF2A1-AS geninin susturulması sonrası gen ifadesinde meydana gelen değişimler 113Z371 No.lu proje kapsamında RNA-seq yöntemiyle belirlenmiş ancak yolak analizleri yapılmamıştır. Genin susturulması sonrası gen ifadesinde meydana gelen değişimlere biyolojik anlam kazandırabilmek için PANTHER ve Pathway Studio analizleri yapılmıştır. Bu

analizler, p53-BCL2 aksında ki yolakların etkilenmiş olabileceğine işaret etmektedir (Şekil 13). P53 ve BCL2 genlerinin apoptozun düzenlenmesinde oynadıkları rol dikkate alındığında, sonuçların anlamlı olduğu düşünülmektedir. Biyoinformatik yollarla elde edilen bu verileri doğrulamak için, kaspazlar, p53, BCL2 ve FLIP gibi bazı proteinlerin ifade miktarları western blotlama ile incelenmiştir. Şekil 14'te görüldüğü üzere, GTF2A1-AS geninin susturulması sonrası oluşan apoptotik şartlarda kaspaz 9 aktivasyonu ve BCL2 miktarında azalma belirlenmiştir. P53 ve FLIP ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

Tarafımızca çekirdekte lokalize olduğu ve p53-BCL2 aksında yolakları etkilediğini düşündüğümüz GTF2A1-AS'in etki mekanizması hakkında ilave bilgi toplamak için, bu transkript ile etkileşen proteinler tanımlanmıştır. Bu bağlamda ilgili transkriptte hibridize olan biyotin işaretli primerler kullanılarak GTF2A1-AS:protein kompleksleri çöktürülmüştür. Negatif primer setleri kontrol olarak kullanılarak, çökme verimliliğinde fark olan proteinlerin kimlikleri kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Çöken proteinler arasında en ilginç protein adayı HNRNP-K proteindir. Nitekim, bu protein, p53 ile indüklenen başka bir ukmRNA ile de etkileşmektedir (Huarte ve ark., 2010). GTF2A1-AS geninin susuturulması sonrası gen ifadesinde oluşan değişimlerin de p53-BCL2 aksı üzerinde etkili olduğu dikkate alındığında, HNRNP-K proteini ile GTF2A1-AS transkriptinin etkileşimi apoptozun düzenlenmesi perspektifinde anlamlı görünmektedir. Ancak, bu etkileşimin floresan işaretli prob setleri kullanılarak immunositokimya ile gösterilmesi faydalı olacaktır. Ayrıca, proje önerisinde de ifade edildiği şekilde, HNRNP-K susturulması sonrası GTF2A1-AS transkriptinin lokalizasyonu ve apoptoz fenotipinde olan değişimlerin irdelenmesi gerekmektedir. Ancak, RIP kitinin tahmin edilen süreden çok geç gelmesi (1002 proje süresi de uzatılamamaktadır) ve dolar kurunda olan ciddi değişimler nedeniyle proje önerisinin bu kısmı tamamlanamamıştır.

Sonuç olarak, literatürde mevcut bilgilere göre, daha önce herhangi bir hücresel fenotipe ilişkilendirilmemiş GTF2A1-AS ukmRNA'sının HeLa hücrelerinde apoptoz ile ilişkilendirilmesine yönelik yaptığımız bu proje kapsamında (1) ilgili transkriptin tam cDNA sekansı belirlenmiş, (2) ilgili transkriptin hücre içi lokalizasyonu belirlenmiş, (3) susturma ve aşırı ifade sonucu apoptoza olan etkileri irdelenmiş ve özellikle susturulması sonrası HeLa hücrelerinde görülen apoptotik yolaklara ilgili bilgiler toplanmış ve (4) ilgili transkript ile etkileşme potansiyeline sahip bazı proteinler tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Ionivo, N., ve ark., 2006. "A novel class of small RNAs bind to MILI protein in Mouse testes", *Nature*, 442, 203-207.
- Arya, R. ve White, K. 2015. "Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms", *Sem Cell Dev Biol*, 39, 12-19.
- Ashkenazi, A. ve Dixit, V.M. 1998. "Death receptors: signaling and modulation", *Science*, 281, 13.5-1308.
- 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.
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. ve Vandenabeele, P. 2014. "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways", *Nat Mol Cell Biol*, 15, 135-147.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., Thurman, R.E., ve ark., 2007. "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project", *Nature*, 447, 799-816.
- Boise, L.H., Gonzales-Garcia, M., Postena, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. 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.
- Bonasio, R. ve Shiekhatar, R. 2014. "Regulation of transcription by long noncoding RNAs", *Annu Rev Genet.*, 48, 433-455.
- Budhidarmo, R. ve Day, C.L. 2015. "IAPs: Modular regulator of cell signalling", *Sem Cell Dev Biol*, 39, 80-90.
- 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, Y., Fu, L.L., Liu, B., Huang, J., Wang, J.H. ve Wei, Y.Q. 2014. "Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy", *Apoptosis*, 19(8), 1177-1189.
- Chu, C., Quinn, J. ve Chang, Y. 2012. "Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP)", *JOVE*, 61, e3912.
- Costa, F.F. 2007. "Non-coding RNAs: Lost in translation?", *Gene*, 386, 1-10.
- 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.
- Dethoff, E.A., Chugh, J., Mustoe, A.M. ve Al-hashimi, H.M. 2012. "Functional complexity and regulation through RNA dynamics", *Nature*, 482, 322-330.
- Elmore, S. 2007. "Apoptosis: A review of programmed cell death", *Toxicological Pathology*, 35, 495.
- 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.
- 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.
- 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.
- Galluzi, L. ve ark., 2015. "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCDD 2015", *Cell Death Differentiation*, 22, 58-73.
- Gardini, A. ve Shiekhatar, R. 2015. "The many faces of long noncoding RNAs", *FEBS Letters*, 282, 1647-1657.
- Geisler, S. ve Coller, J. 2013. "RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 699-712.

- 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.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, MD., Li, C., ve ark., 2008. "Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells", *Science*, 320, 1077-1081.
- Gloss, BS. ve Dinger, ME. 2015. "The specificity of long noncoding RNAs", *BBA*, epub.
- Guttman, M. ve Rinn, JL. 2012. "Modular regulatory principles of large non-coding RNAs", *Nature*, 482, 339-346.
- Harries, LW. 2012. "Long non-coding RNAs and human disease", *Biochemical Society Transactions*, 40, 902-906.
- Henry, CM., Hollville, E., ve Martin, SJ. 2013. "Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry," *Methods*, 61, 90-97.
- 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, MJ., 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, MF., 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.
- Jagannathan, S., Nwosu, C. ve Nicchitta, C.V. 2011. "Analyzing subcellular mRNA localization via cell fractionation", *Methods Mol Biol*, 714, 301-321.
- Jonas, S. ve Izzauralde, E. 2015. "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing", *Nat Rev Genet*, 16, 421-422.
- Kashi, K., Henderson, L., Bonetti, A. ve Carninci, P. 2016. "Discovery and functional analysis of lncRNAs: methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome", *BBA*, 1859, 3-15.
- Kerr, J.F., Whyllie, A.H. ve Currie, A.R. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Khaitan, D., Dinger, ME., Mazar, J., Crawford, J., Smith, MA., Mattick, JS. Ve Perera, RJ. 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, KM., Yang, T., Buchan, HL., Zhou, P. ve Craig, RW. 1993. "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2", *PNAS*, 90, 3516-3520.
- Lalaoui, N., Lindqvist, L.M., Sandow, J.J. ve Ekert, P.G. 2015. "The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis", *Sem Cell Dev Biol*, 39, 63-69.
- Laurent, GS., Wahledtedt, C. ve Kapranow, P. 2015. "The landscape of long noncoding RNA classification", *Trends Genet*, 31, 239-251.
- 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 caspase", *Cell*, 91, 479-489.
- Li, LY., Luo, X. ve Wang, X. 2001. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria", *Nature*, 412, 95-99.
- Lockshin, RA. ve Williams, CM. 1965. "Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyl silkworm", *J. Insect Physiol*, 11, 123-133.
- Ma, L., Bajic, VB., ve Zhang, Z. 2013. "On the classification of long non-coding RNAs", *RNA Biology*, 10, 924-933.
- Maghsoudi, N., Zakeri, Z. ve Lockshin, R.A. 2012. "Programmed cell death and apoptosis-Where it came from

- and where it is going: From Elie Metchnikoff to the control of caspases”, *Exp Oncol*, 34(3), 146-152.
- Malecova, B., Caputo, V.S., Lee, D.F., Shieh, J.J. ve Oelgesschlager, T. 2015. “Taspase 1 processing alters THIA cofactor properties in the regulation of TFII”, *Transcription*, 6, 21-32.
- Marin-Bejar, O. ve Huarte, M. 2015. “Long noncoding RNAs: from identification to functions and mechanisms”, *Advances Genomics Genetcs*, 5, 1-18.
- Martianov, I., Ramadas, A., Serra Barros, A., Chow, N., Akoulitchev, A. 2007. “Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript”, *Nature*, 445, 666-670.
- Mattick, J.S. ve Rinn, J.L. 2015. “Discovery and annotation of long non-coding RNAs”, *Nat Struc Mol Biol*, 22, 1-5.
- Nakano, K. ve Vousden, K.H. 2001. “PUMA, o novel pro-apoptotic gene, is induced by p53”, *Mol. Cell*, 7, 683-694.
- Ogawa, Y., Sun, BK. ve Lee, JT. 2008. “Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways”, *Science*, 320, 1336-1341.
- Opforman, JT., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, MD., Ong, CC. ve Korsmeyer, SJ. 2003. “Development and maintenance of B and T lymphocytes requires anti-apoptotic MCL-1”, *Nature*, 426, 671-676.
- Pauli, A., Rinn, JL. ve Schier, AF. 2011. “Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis”, *Nat Rev Genet*, 12, 136-149.
- 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.
- Ozgun, 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.
- Pastori, C., Peshcansky, V.J., Barbooth, D., Mehta, A., Silva, J.P. ve Wahlestedt, C. 2013. “Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome”, *Human Genetics*, 133, 59-67.
- Pauli, A., Rinn, JL. ve Schier, AF. 2011. “Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis,” *Nat Rev Genet*, 12, 136-149.
- Puthalakath, J., Huang, DC., 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.
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, SA., van Oudenaarden, A. ve Tyagi, S. 2008. “Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes”, *Nat Methods*, 5, 877-879.
- Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C. ve Badge, RM. 2009. “A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification”, *BioTechniques*, 46, 277-284.
- Rossi, M. ve Antonangeli, F. 2014. “LncRNAs: New players in apoptosis control”, *Int J Cell Biol*, Article ID: 473857.
- Singh, R.P., Waldron, R.T., Hahn, B.H. 2012. “Genes, tolerance and systemic autoimmunity“, *Autoimmunity Reviews*, 11, 664-669.
- Subramanian, S. ve Steer, CJ. 2010. “MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis”, *J. Cellular Physiology*, 223, 289-298.
- Teng, X. ve Hardwick, J.M. 2015. “Cell death in genome evolution”, *Sem Cell Devel Biol*, 39, 3-11.
- 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, AD., 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, JD., Shen, Z., Song, DY., Pan, Q., Watt, AT., Freier, SM, Bennett, CF., Sharma, A., Bubulya,

- PA., ve ark., 2010. "The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation", *Molecular Cell*, 39, 925-938.
- Van Heesch, S., van Iterson, M., Jacobi, J., Boymans, S., Essers, PB., de Bruijn, E., Hao, W., MacInnes, AW., Cuppen, E. ve Simonis, M. "Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes", *Genome Biology* vol. 15, pp. R6, 2014.
- 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.
- Wang, P., Zhou, Z., Hu, A., Albuquerque, C., Zhou, Y., Hong, L., Sierecki, E., Ajiro, M., Kruhlik, M., Harris, C., Guan, K.-L., Zhen, Z.M., Newton, A.C., Sun, P., Zhou, H. ve Fu, Z.-D. 2014. "Both decreased and increased SRPK1 levels promote cancer by interfering with PHLPP-mediated dephosphorylation of Akt", *Mol Cell*, 54, 378-391.
- Watanabe, FR., Brannan, Cl., Copeland, NG., jendkins, NA., Nagata, S. 1992. "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis", *Nature*, 356, 314-317.
- Wesierska-Gadek, JW., Kramer, MP., Schmid, G. 2008. "A combined treatment of HeLa cells with the farnesyl protein transferase inhibitor L-744,832 and cisplatin significantly increases the therapeutic effect as compared to cisplatin monotherapy", *J Cell Biochemistry*, 104, 189-201.
- Wiluzs, JE. 2015. "Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability", *BBA*, Epub.
- Yap, K., Lim, ZQ., Khandelia, P., Friedman, B., ve Makeyev, EV. 2012. "Coordinated regulation of neuronal mRNA steady state levels through developmentally controlled intron retention", *Genes Development*, 26, 1209-1223.
- 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, SJ. 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:	216Z137
Proje Başlığı:	Anti-Apoptotik GTF2A1-AS Uzun Kodlamayan RNA'sının Hücreçi Konumunun ve Etkileştiği Komplekslerin Tanımlanması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/06/2017 - 01/06/2018
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29999.0
Öz:	<p>Apoptoz gerek normal gelişim esnasında, gerekse patolojik olgularda hücre sel dengenin sağlanmasında oldukça önemlidir. Nitekim, apoptozun yavaşlaması veya engellenmesi kanser ve otoimmün hastalıklara yol açar iken, apoptoz oranında meydana gelen hızlanmalar akut ve kronik dejeneratif hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, apoptozun düzenlenmesinde çok değişik makromoleküller görev yapmaktadır. Bu düzenlemeden sorumlu proteinlerin varlığı uzun süredir bilinmekte olup son yapılan çalışmalar kodlamayan RNA'ların da bu düzenlemede aktif rol oynadıklarını işaret etmektedir. Daha önce tamamlanan 113Z317 No.lu proje kapsamında yaptığımız transkriptomik bir tarama, GTF2A1 kodlayan genine antisense olan bir RNA transkriptinin (GTF2A1-AS olarak adlandırılmıştır) apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceğine işaret etmiştir.</p> <p>GTF2A1-AS protein kodlamayan transkriptinin apoptozun düzenlenmesinde oynadığı rolün moleküler mekanizmasını aydınlatmak için yapılan 216Z137 No.lu bu TÜBİTAK projesinde HeLa hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu transkriptin koordinatları tam olarak raporlanmadığı için, öncelikle RACE (rapid amplification of cDNA ends) yaklaşımı kullanılarak transkriptin uç sekansları elde edilmiş ve RNA sekans verileriyle karşılaştırılmıştır. Sisplatin ile miktarda artış belirlediğimiz transkript çekirdekte lokalize olmaktadır. GapmeR ile susturma sonrası miktarda değişen mRNA transkriptleri PANTHER yazılımı ile incelendiğinde apoptotik işlevlerde değişim olduğu gözlenmiştir. İlave biyoinformatik analizler, etkilenen yolların BCL2-p53 aksı üzerinde olabileceğini işaret etmiştir. Western blot sonuçları da bu verileri doğrulamaktadır. GTF2A1-AS transkriptinin etkileştiği proteinleri belirlemek için yapılan immünçöktürme çalışmalarında, GTF2A1-AS'in HIST2H4A, HNRNP-K ve HNRNPA2B1 proteinleriyle birlikte çöktüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak, HeLa hücrelerinde apoptozu düzenleme potansiyeline sahip GTF2A1-AS kodlamayan transkriptinin tam sekansı elde edilmiş, hücre içi lokalizasyonu ve etkileştiği proteinlerin bir kısmı tanımlanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	GTF2A1-AS, Kodlamayan RNA, Apoptoz, HeLa
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır