

**Hepatit B Virüsü X proteini varlığında
ekspresyonunda artış gözlenen ve özgün-yeni bir gen olan
“Up-Regulated-Gene-4” (URG4)’ün
RNA interferans yöntemi kullanılarak gen sessizleştirilmesi
sonrasında, onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki
mekanizmasının mikroarray ve protein western array
yöntemleri ile araştırılması**

Proje No: 104S259

Doç. Dr. N. Lale Şatıroğlu-Tufan
Firdevs Usul
Prof. Dr. Mark A. Feitelson

Nisan 2011
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Güncel moleküler kanser araştırmaları, Hepatit B virüsü (HBV) X proteininin multi-step hepatoselüler karsinogenezde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Fonksiyonu tam olarak ortaya konulamadığı için X olarak isimlendirilen bu proteinin, hücre proliferasyonunda etkili çeşitli genlerin ekspresyonunu trans-aktivasyon mekanizması ile değiştirdiği pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. 2002 yılında yayınlanmış olan araştırma projemizde HB X pozitif ve HB X negatif HepG2 hücre dizinleri arasındaki gen ekspresyon profilleri “polimeraz zincir reaksiyonu seçici komplamenter DNA çıkartma (PCR select cDNA subtraction)” metodu ile karşılaştırmıştır. Elde ettiğimiz deney sonuçlarında, HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen tanımlanmış ve “Up-Regulated-Gene-4 (URG4)” olarak isimlendirilmiştir. Temel yapı karakterizasyonu yapılan URG4’ün tam sekansının 3.607 kb olduğu ve sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Ayrıca URG4’ün 7. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur. Fonksiyona yönelik yapılmış olan araştırma sonuçları URG4’ün hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce yapmış olduğumuz araştırmanın devamı olarak tamamladığımız bu projede, URG4’ün RNA interferans yöntemi kullanılarak gen sessizleştirilmesi gerçekleştirilmiş, ardından da mikroarray ve protein array yöntemleri ile URG4’ün onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizmasında rol alan pek çok önemli veri elde edilmiştir.

Çalışmamız, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB), 3501 Kariyer Programı, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 104S259 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Önsöz.....	2
İçindekiler.....	3
Şekiller Dizini.....	5
Tablolar Dizini.....	6
Özet	7
Abstract.....	8
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
2.1 Kullanılan hücre dizinleri ve hücre kültürü koşulları.....	13
2.2 Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu.....	14
2.3 URG4'e özgün çift sarmal siRNA sentezi.....	14
2.4 siRNA'ların transfeksiyonu ve URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesi.....	17
2.5 RNA izolasyonu ve multipleks semikantitatif RT-PCR.....	17
2.6 Real-time RT- PCR.....	18
2.7 Protein izolasyonu ve Western Blot.....	20
2.8 Akım Sitometrisi.....	21
2.9 Mikroarray Analizi.....	21
2.10 Proteomiks "Kinex Antibody Microarray" Analizi.....	21
3. BULGULAR.....	21
3.1 HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 RNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi	22
3.2 URG4'e özgün çift sarmal siRNA'ların HepG2 hücrelerine transfeksiyonu ve URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesi.....	26
3.3 RNA interferans sonrasında ilgili hücre dizinlerindeki RNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ve Real-time RT-PCR ile tespiti.....	28
3.4 RNA interferans sonrasında ilgili hücre dizinlerindeki protein ifadesinin tespiti.....	31
3.5 URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi.....	33
3.6 Akım Sitometrisi tekniği ile siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre içi DNA miktarının tayini.....	34
3.7 Mikroarray deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan URG4 geninin sessizleştirilmiş olduğu HepG2 hücre gruplarında, RNA interferans deneyinin kontrolünün hücre içi bazı fonksiyonel analizlerle yapılması.....	36

3.8 URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmiş olduğu hücreler kullanılarak mikroarray deneylerinin yapılması	39
3.8.1 Mikroarray kalite kontrol analizi	39
3.9 URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmiş olduğu hücreler kullanılarak proteomiks “Kinex Antibody Microarray” deneylerinin yapılması.....	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
5. REFERANSLAR.....	55
6. PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	61

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1	URG4 kodlanan gen dizisi.....	14
Şekil 2	URG4 primer tasarımı.....	21
Şekil 3	HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 gen ifadesinin Multiplex RT-PCR ile belirlenmesi.....	24
Şekil 4	HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 gen ifadesinin Multiplex RT-PCR ile belirlenmesi.....	26
Şekil 5	siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığının kontrolü.....	27
Şekil 6	RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi.....	28
Şekil 7	RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 mRNA ifadesinin Real-time RT-PCR ile belirlenmesi.....	29-30
Şekil 8	RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 protein ifadesinin Western blot ile belirlenmesi.....	31
Şekil 9	URG4’ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesinin sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi.....	33
Şekil 10	Akım Sitometrisi tekniği ile siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre içi DNA miktarının tayini.....	34
Şekil 11	URG4’ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında Silin D1 mRNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi....	37
Şekil 12	Mikroarray kalite kontrol analizi.....	38-40
Şekil 13	Görüntülerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	41
Şekil 14	MA Grafikleri.....	42
Şekil 15	A ve B grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü.....	43
Şekil 16	A ve C grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü.....	44
Şekil 17	B ve C grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü.....	45

Şekil 18	Tüm gruplara ait kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü.....	46
Şekil 19	“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde artış veya azalış gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri.....	48
Şekil 20	“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde artış gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri.....	49
Şekil 21	“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde azalma gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri.....	50
Şekil 22	“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde farklılık gözlemlenen MAPK yolağında rol alan proteinlerin etkileşimleri.....	51

TABLolar

Sayfa

Tablo 1.	Primer Dizileri.....	17
Tablo 2.	Real time RT-PCR koşulları.....	18
Tablo 3.	URG4 Tag 1.....	21
Tablo 4.	URG4 Tag 2.....	22
Tablo 5.	URG4 Tag 3.....	22
Tablo 6.	URG4 Tag 4.....	22
Tablo 7.	URG4 Tag 5.....	23
Tablo 8.	URG4 Tag 6.....	23
Tablo 9.	URG4 Tag 7.....	23
Tablo 10.	A ve B grupları “limma” analiz sonuçları.....	43
Tablo 11.	A ve C grupları “limma” analiz sonuçları.....	44
Tablo 12.	B ve C grupları “limma” analiz sonuçları.....	45
Tablo 13.	Tüm gruplara ait “limma” analiz sonuçları.....	46
Tablo 14	Antibody Microarray sonuçları	47

ÖZET

Hepatit B virüsü (HBV) X proteininin multi-step hepatoselüler karsinogenezde önemli katkıları bulunmaktadır. Moleküler etki mekanizması ve fonksiyonu tam olarak ortaya konulamadığı için X olarak isimlendirilen bu proteinin, hücre proliferasyonunda rol alan çeşitli genlerin ekspresyonunu trans-aktivasyon mekanizması ile değiştirdiği pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından yapılmış olan araştırmada HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen tanımlanmış ve “Up-Regulated-Gene-4 (URG4)” olarak isimlendirilmiştir. Temel yapı karakterizasyonu yapılan URG4’ün tam sekansının 3.607 kb olduğu ve sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Ayrıca URG4’ün 7. kromozomun kısa kolunda (7p13) lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur (GeneID: 55665, Entrez Nükleotid ID NM_017920). URG4’ün HepG2 hücre dizinine over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu ve hayatiyeti arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu uyardığı ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Temel fonksiyona yönelik araştırma sonuçlarımız, URG4’ün hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceğini göstermektedir. Hepatoselüler kanser olguları kullanılarak yapılmış olan araştırmalarda; URG4 protein ekspresyonunun hem periferik kanda, hem de karaciğer tümör dokusunda normal olgulara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. URG4’ün hepatoselüler karsinogenezin tanısında ve tedavisinde kullanılabilecek bir belirteç olduğunu düşünülmektedir. Ayrıca grubumuz ve grubumuz dışında yapılmış olan araştırmalar da URG4’ün sadece karaciğer kanseri gelişiminde değil, mide kanseri ve osteosarkom gelişiminde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu projemizde, HepG2 ve RNA interferans metodu kullanılarak URG4’ün onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizmasının araştırılması gerçekleştirilmiştir. Mikroarray ve protein array deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlar, URG4’ün hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptozda, invazyon ve metastazda rol alan yollardaki bazı önemli gen ifadeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: URG4, Hepatoselüler kanser

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) encoded X antigen (HBxAg) may contribute importantly to the development of multi-step hepatocellular carcinoma (HCC). However, the molecular mechanism(s) responsible for this hepatocellular transformation have yet to be identified and characterized. It has been shown in current publications that HBxAg may contribute to the development of hepatocellular carcinoma (HCC) by trans-activating the expression of selected cellular genes that promote hepatocellular growth and survival. Satiroglu-Tufan and her colleagues have identified and characterized a novel gene, which is up-regulated in the presence of HBxAg, and named as URG4 (Up-regulated gene-4). The full-length URG4 clone was 3.607 kb and encodes a polypeptide of 922 amino acids with a predicted molecular weight of 104 kDa. Analysis of the novel full-length URG4 sequence showed no homology with other previously published genes and localized in the short arm of human chromosome 7 (7p13) (GeneID: 55665, Entrez Nukleotid ID NM_017920). It has been shown that over-expression of URG4 in HepG2 cells promoted hepatocellular growth and survival in tissue culture (in the presence or absence of growth factors) and stimulated colony formation in soft agar, and accelerated tumor development in nude mice. Hence, URG4 may be a natural effector of HBxAg and a putative oncogene that contributes importantly to multi-step hepatocarcinogenesis. In HCC cases URG4 protein expression has shown to be upregulated in both peripheral blood and liver tumor tissue in comparison to normal cases. It is hypothesized that URG4 may be utilized as a marker in diagnosis and treatment of HCC. In addition, studies by our group and others have strongly suggested that URG4 is involved not only in hepatocellular carcinoma, but also in gastric cancer and osteosarcoma.

In this project, oncogenic function and molecular mechanisms of URG4 has been analyzed by HepG2 cell line and RNA interference method. Results of microarray and protein array studies revealed that URG4 is involved in expression of genes associated with cell proliferation, cell cycle, apoptosis, invasion, and metastasis.

Key words: URG4, Hepatocellular Carcinogenesis

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Hepatit B virüsü (HBV) hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı bir DNA virüsü olup kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom oluşumunda en önemli etiyolojik faktörlerden biridir [ARBUTHNOT, 2001; BEASLEY, 1984]. Hepatoselüler karsinom primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign tümördür. Tüm dünyada hepatoselüler karsinom görülme sıklığı coğrafi bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle birlikte, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler olan Asya, Afrika ve Uzak Doğu bu hastalığın en çok görüldüğü yerlerdir. Tüm dünyada yılda ortalama bir milyondan fazla yeni vaka tanı almaktadır ve bunların sağ kalım oranları 5 yıl için %3'den azdır. Bazı araştırmalara göre, her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir [CHEN, 1997]. Kronik hepatit B virüsü taşıyıcılarında hepatoselüler karsinom gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bu bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken-kanser oluşum riski ilişkisidir [BEASLEY 1984; BEASLEY 1988].

HBV'nin hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [ARBUTHNOT, 2001; BEASLEY, 1984; CHEN, 1997; BEASLEY 1988; FEITELSON, 1997]. Günümüzde kabul edilen model sistem, viral enfeksiyon süresince HBV DNA'sının belirli parçalarının konakçı hepatosit DNA'sına entegre olması ve bunun sonucunda konakçı hepatosit DNA'sında çeşitli değişiklikler/hasarlar meydana gelmesidir. Bu değişikliklerin özellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan pek çok gen üzerinden olduğu düşünülmektedir. Viral-konakçı DNA entegrasyonunun özel bir yerde lokalize olduğu gösterilmemiştir ve bu olay değişik veya rastgele bölgelerde olabilir. HBV genomu, uzun sarmalı üzerinde Yüzey-Surface (S), Kor-Cor (C), X ve Polimeraz olarak adlandırılan dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine "open reading frame" (ORF) sahiptir. HBV X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. Transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonu ile HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu destekleyen 16 kDa molekül ağırlığındaki HB X proteini, hepatokarsinogenez oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir [CASELMANN, 1997; HENKLER, 1996]. Ayrıca Hepatit B X gen bölgesi konakçı DNA'sına en çok entegre olan HBV DNA parçasıdır. Bu entegrasyonlar pek çok farklı bölgelerden olabilir ve sonucunda enfekte karaciğer ve karaciğer tümör dokusunda çoğunlukla X bölgesine ait mRNA oluşumuna yol açar [MATSUBARA, 1990; DIAMANTIS, 1992; PATERLINI, 1995; KATAYAMA, 1989; VITVITSKI, 1988; WANG, 1991; WANG, 1991a]. Çeşitli araştırmalar HB X protein pozitifliğinin hastalığın ağırlığı ile doğru orantılı olduğu göstermiştir [FEITELSON, 1993]. HB X proteini yüksek miktarda eksprese edilen "HB X transgenik hayvan" modellerinde de hepatoselüler karsinom oluşumu gözlemlenmiştir [KOIKE, 1994; UEDA, 1995]. Hepatoselüler karsinom olgularından izole edilen HBV X

genine ait DNA bölgesi, in vitro şartlarda karaciğer hücre dizinine transfekte edildiği durumunda da, bu hücrelerde transformasyon gözlemlenmiştir [HOHNE, 1990; LUBER, 1996]. Bu birbirinden bağımsız olarak yapılmış araştırmalar HB X proteininin hepatoselüler kanser oluşumunda önemli bir rolü olduğunu ve bu katkının HB X proteininin transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşebileceğini düşündürmektedir [CASELMANN, 1995; HENKLER, 1996; ROSSNER, 1992].

HB X proteini sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT) [BENN, 1994; LUCITO, 1992; NATOLI, 1994; LEE, 1998]. Çekirdekte ise TATA bağlayan protein, RNA polimeraz II'nin bir alt yapısı, ATF-2 ve diğer bazal transkripsiyon komponentleri gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir [CHEONG, 1995; QADRI, 1995; MAGUIRE, 1991; HAVIV, 1995; HAVIV, 1996]. DNA tamirinde görev yapan “ultraviolet induced DNA binding protein” ve “p53/excision-repair cross-complementing type 3 protein” kompleksine bağlanması ile yeterli “transkripsiyona bağımlı DNA tamirinin” yapılamayacağı ve böylelikle pek çok mutasyon birikimine neden olabileceği düşünülmektedir [LEE, 1995; WANG, 1994]. Negatif büyüme regülatörlerinden p53 [WANG, 1994; FEITELSON, 1993] ve p55sen [SUN, 1998] ile fonksiyon baskılayıcı ilişkiye geçmesi, ve ayrıca siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21WAF1/CIP1/SDI1 [FEITELSON, 1999] ve translasyon başlatıcı faktör olan sui1'in (translation initiation factor, sui1) [LIAN, 1999], hücre içi ekspresyonlarının HB X proteini varlığında azalması, hücre çoğalmasının kontrolünde çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Ayrıca HB X proteininin apoptoz ve hücre siklusu regülasyonu üzerine de pek çok etkileri gösterilmiştir [ELMORE, 1997; KIM, 1998; SIRMA, 1999; GOTTLOB, 1998; BENN, 1995]. Yapılan son araştırmalar HB X proteininin pek çok değişik mekanizma ile hücre içi gen ekspresyonlarını değiştirdiğini ve bu fonksiyonlarını özgün-yeni veya daha önce tanımlanmış genler üzerinden yaptığını düşündürmektedir.

Şatiroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından, 2002 yılında yayınlanmış olan araştırmada [SATIROGLU-TUFAN, 2002], HBV X proteini pozitif ve negatif HepG2 hücre dizinleri model sistem olarak kullanarak “polimeraz zincir reaksiyonu seçici komplementer DNA çıkartma (PCR select cDNA subtraction)” tekniği ile HB X pozitif ve HB X negatif HepG2 hücre dizinleri arasındaki gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. Bu deneyler sonucunda HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen, Şatiroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından “Up-Regulated-Gene-4 (URG4)” olarak isimlendirilmiş ve Amerika'daki National Center for Biotechnology Information-Gen Bankasına (NCBI-GenBank, Entrez GeneID: 55665 ve Entrez Nükleotid ID NM_017920) olarak kayıt edilmiştir. Bu araştırmada Up-Regulated-Gene-4 (URG4) olarak isimlendirdikleri özgün-yeni genin temel yapı

karakterizasyonu kısaca özetlenmiştir. Öncelikle PCR seçici komplementer DNA çıkartma metodu ile elde edilen ve HB X pozitif HepG2 hücre dizinindeki “Up-Regulated-Gene-4 (URG4)” ekspresyonunun HB X proteini varlığında arttığı sonucu, aynı hücre dizinleri kullanılarak birbirinden farklı moleküler deneylerle tekrar doğrulanmıştır (örneğin, Northern Blot, in situ hibridizasyon ve immunohistokimya). Ekspresyon artışının farklı moleküler deneylerle onaylanmasından sonra, URG4’ün tam sekansı (full-length), “Rapid Amplification of 5’ and 3’ cDNA Ends (RACE)” yöntemi ile elde edilmiştir ve 3.607 kb’lık gen klonlanmıştır (NCBI Gen Bankası-Entrez GeneID: 55665). İnsan gen bankası araştırma sonuçları, Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından elde edilen URG4 sekans sonuçları ile karşılaştırıldığında, URG4’ün 7. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur (Entrez Nükleotid ID NM_017920). Ayrıca URG4’ün sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Çeşitli bilgisayar programları yardımıyla URG4’ün cDNA’sı kullanılarak antijenik peptitler seçilmiş ve URG4’e karşı spesifik antikor geliştirilmiştir. İmmünohistokimya metodu kullanılarak yapılan deneylerde, HBV ile enfekte olan karaciğer ve hepatoselüler karsinom olgularında yoğun miktarda URG4 protein ekspresyonu gözlemlenirken, HBV ile enfekte olmayan karaciğer dokularında çok az miktarda URG4 protein ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, RNA düzeyinde Northern Blot ve beraberinde in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan deney sonuçları ile de desteklenmiştir. Ayrıca hepatoselüler karsinom olgularında URG4 ve HBV X protein ekspresyonunun aynı hücrelerde ko-lokalize oldukları saptanmıştır. Bu aşamaya kadar elde edilen araştırma sonuçlarının tümü URG4’ün in vivo ortamda HB X proteininin doğal bir efektörü olabileceği hipotezini güçlendirmiştir. In vitro hücre kültür ortamında yapılan deneylerde, URG4’ün HepG2 hücre dizinine transfekte edilip over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu gerçekleştirdiği ve immun sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. Bütün bu deney sonuçlarında gözlemlenen özellikler onkogenlerin karakteristik fonksiyonlarından olduğundan, HBV X proteini varlığında ekspresyonu artan URG4’ün multi-step hepatokarsinogenezde önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceği düşünülmektedir.

Ocak 2010 tarihinde Human Genome Organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee URG4’ün ismini “Upregulator of Cell Proliferation (URGCP)” GeneID: 55665 olarak onaylanmıştır. Bu nedenle bu tarihten itibaren bazı veri tabanlarında URG4, URGCP olarak da taranmaya başlamıştır.

http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=30890)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=55665&log\\$=databasead&logdbfrom=nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=55665&log$=databasead&logdbfrom=nucore))

Grubumuz ve grubumuz dışında yapılmış olan farklı araştırmalarda da URG4'ün sadece karaciğer kanseri gelişiminde değil, mide kanseri ve osteosarkom gelişiminde de etkili olduğu gösterilmiştir [SATIROGLU-TUFAN, 2002; SONG J, 2006; HUANG J, 2009; SATIROGLU-TUFAN, 2010].

Song ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada [SONG J, 2006]; mide kanseri dokularında, neoplastik olmayan komşu dokulara göre daha fazla URG4 eksprese edildiği immunohistokimyasal teknik ile gösterilmiştir. Ayrıca, URG4'ü fazla eksprese edildiği tespit edilen mide kanseri olgularının, URG4 ekspresyonu az olanlara göre daha yüksek PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) indeksinin olduğu gösterilmiştir. URG4'ün fazla ekspresyonunun sağlandığı GES-1 (immortalize insan mide epitelial mukoza) hücre dizininde de, HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinindeki benzer olarak büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunun ve yumşak agar besi yerinde koloni oluşumunun arttığı tespit edilmiştir. Yine RNA interferans tekniği ile ilgili hücre dizinlerinde URG4'ün sessizleştirmesinin sağlandığında (gene knock-down) bu etkiler tümüyle ortadan kalkmıştır. URG4'ün fazla ekspresyonunun sağlandığı GES-1 hücrelerinde de Siklin D1 ifade artışı tespit edilmiştir. Yazarlar bu verilerle, URG4'ün mide kanseri gelişiminde Siklin D1 ifadesinin regülasyonunda etkili olabilecek potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini ifade etmektedirler.

Huang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer araştırmada ise [HUANG J, 2009] çalışma kapsamındaki osteosarkom olgularının %86.96'sında fazla URG4 ekspresyonu saptanmış ve özellikle bu olgularda da metastaz ve nüks riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, osteosarkomlarda tespit edilen fazla URG4 ekspresyonunun, mide kanseri olgularına benzer olarak yüksek PCNA indeksi ile ilişkili olduğu belirtmiş, ancak mikro damar yoğunluğu ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Yine bu sonuçlara göre URG4'ün osteosarkom gelişiminde de etkili olabileceği ve prognoz tayininde kullanılabilecek bir moleküler belirteç olabileceği ifade edilmiştir.

Gen sessizleştirilmesinde veya başka bir deyişle transkripsiyon sonrası gen azaltılmasında ("Post Transcriptional Gene Knockdown") kullanılan RNA interferans tekniği, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen genlerin araştırılmasında son zamanlarda sıklıkla kullanılmaya başlanan en yeni, özgün ve hızlı bir yöntemdir [COGONI, 2000]. RNA

interferans çalışma prensibinde hedef genlerin sekansına komplementer olarak hazırlanan kısa çift sarmal RNA'nın, hedef genlere ait protein translasyonunu baskılaması ve mRNA'nın degradasyonu temel teşkil etmektedir [GURU, 2000; HAMMOND, 2001]. Bu yöntem kullanılarak yapılan gen sessizleştirilmesinde, organizma içinde hedef aldığımız gende oluşan "loss-of-function" mutasyonu sonucunda gördüğümüz etkiye benzer bir etki gözlemlenir. İlk yapılan RNA interferans çalışmalarında bitki ve omurgasız hayvanlar model sistem olarak seçilmiş olmasına rağmen, son iki yılda kültüre edilmiş memeli hücre dizinleri ve erişkin farelerde de başarı ile kullanılabilir [YANG, 2001; PADDISON, 2002; ELBASHIR, 2001]. Bunun nedeni ise ilk zamanlarda RNA interferans tekniğinde kullanılan uzun çift sarmal RNA parçalarının, memeli hücrelerinde hızlı bir interferon cevabı oluşturarak, spesifik olmayan bir mekanizma ile, içinde bulunduğu hücreyi hızla apoptoza yönlendirmesidir. Kısa ve sekans spesifik 21-23 nükleotid içeren çift sarmal RNA parçaları (short/small interfering" RNAs- siRNA) memeli hücrelerinde yukarıda bahsettiğimiz spesifik olmayan ve istenmeyen etkiyi oluşturmadan gen sessizleştirmesini "Post Transcriptional Gene Knockdown (PTGN)" gerçekleştirebilmektedir.

Daha önceki araştırmalarımızın devamı olarak planlanmış olan bu deneysel projede, HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış tespit ettiğimiz URG4'ün RNA interferans yöntemi kullanılarak gen sessizleştirilmesinin ardından mikroarray ve protein antibody array yöntemleri ile URG4'ün onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizmasının araştırılması yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM:

2.1 Kullanılan hücre dizinleri ve hücre kültürü koşulları:

Projemiz kapsamında kullanılan insan hepatosellüler kanser hücre dizinleri aşağıda özetlenmiştir:

- HepG2 (sade-plain)
- HepG2-pcDNA3 (Vektör Kontrol)
- HepG2-pcDNA3-URG4
- HepG2-pcDNA3-HBx

Tip II kollajen (Collagen R solution 47254.01, Serva) ile kaplanmış hücre kültür kaplarına yapışarak çoğalan bu hücreler, uygun besi yerinde, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda üretilmiştir.

Hücre dizinlerinin büyümesi için kullanılan besi yeri detay bilgileri:

- Earle's Minimum Essential Medium (EMEM) w/o L-Glutamine (01-025-1A, Biological Industries)
- %10 FBS (Fetal sığır serumu) (04-121-1B, Biological Industries)
- 0.1 mM Non-Essential Amino Acids Solution (01-340-1B, Biological Industries)
- 2 mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
- 1 mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
- 100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

2.2 Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu:

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-URG4, HepG2-pcDNA3-HBx vb. hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (2'li kontrolü olarak-duplicate) ekilerek, büyüme faktörleri varlığında (EMEM + 10% FBS) ve/veya büyüme faktörleri yokluğunda (EMEM) olmak üzere iki farklı besi yerinde üretilmiştir. 5 gün süresince, canlı hücre sayısı günlük hemasitometre sayımları yapılarak tripan blue boyama tekniği ile belirlenmiştir.

Ayrıca, hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri için ilgili hücreler; “HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+URG4 siRNA, HepG2-pcDNA3-URG4, HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+GAPDH Kontrol siRNA, HepG2-pcDNA3+Non-targeting siRNA” Tip II kollajen (Collagen R solution 47254.01, Serva) ile kaplanmış 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre proliferasyonu “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile araştırılmıştır. Kit içeriğinde reaktif madde olarak tetrazolium tuzu olan “XTT” içermektedir. siRNA transfeksiyonunu takip eden 1-2-3-4-5-6 günlerde, aktive edilmiş XTT solüsyonu aynı saatte eklenip ve hücreler 2 ve/veya 4 saat 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan renk reaksiyonu 450nm'da 96 kuyucuklu eliza okuyucuda tespit edilmiştir.

2.3 URG4'e özgün çift sarmal siRNA sentezi:

RNA interferans deneyleri için gerekli olan URG4'e özgün çift sarmal siRNA sentezi “Dharmacon” firmasından temin edilmiştir. HepG2-pcDNA hücre hattında URG4 geninin sesizleştirilmesi için ilgili firma tarafından sentezlenen/üretilen pek çok değişik alternatif arasından da, ON-TARGETplus SMARTpool insan URG4 siRNA'sı (Cat # L-017108-01) seçilmiştir. SMARTpool teknolojisi ile, ilgili genin 4 farklı bölgesine yönelik, özgün tasarlanmış ve yüksek derecede fonksiyonel duplex'ler hep birlikte-aynı anda kullanılabilir. İlgili gene ait 4 adet özgün ve farklı siRNA duplex kullanımı, genin içindeki olası SNPlar'ın (single

nucleotide polymorphisms) varlığıyla fonksiyonel olmayan siRNA duplex oluşumunda etkili olabileceğinden, sessizleştirme potansiyelinin ve deney sonuçlarının daha güçlü ve doğru olabilmesi için avantajlıdır.

Referans olarak kullanılan URG4 Sekansı:

GenBank GenelID: 55665:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55665>

URG4 Transcript Variant 3 - GenBank mRNA tam dizin mRNA sekansı: NM_017920

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001077663.1

REFERENCE 2 (bases 1 to 3606)

AUTHORS: Satiroglu-Tufan,N.L., Lian,Z., Liu,J., Pan,J., et al.

TITLE Hepatitis Bx antigen stimulates expression of a novel cellular gene, URG4, that promotes hepatocellular growth and survival

JOURNAL Neoplasia 4 (4), 355-368 (2002)

(<http://www.neoplasia.org/cover.php?issue=v04i04>)

PUBMED 12082552

Şekil 1.

URG4 kodlanan gen dizisi (Coding DNA Sequence)

```
1 gagccgcggc cgcgcggagg aagcgaagga ggcgggagcg gagacctcgc tgcgctcatg
61 gcgtcgcgcc ggatagaagt ggaattactg ggcaaagggc attcagattt gggagaagta
121 gccccagaaa taaaagcatc agagagacga acagctgtgg ccattgcaga tttggaatgg
181 agagaaatgg aaggagatga ttgagagttc cgttatggag atggtacaaa tgaggctcag
241 gacaatgatt ttccaacagt ggagagaagc aggcttcaag aaatgctgtc acttttgggc
301 ctagagacgt accaggtcca gaaactcagc ctccaggact ctctgcagat cagttttgac
361 agtatgaaga actgggcccc tcaggttccc aaagacttgc cctggaattt cctcaggaag
421 ttgacggccc tcaatgctga tgccaggaat accactatgg tgctggacgt gctcccagac
481 gccagggcctg tggagaagga gagccagatg gaagaggaga tcatctactg ggaccagct
541 gatgaccttg ctgccgacat ttattccttt tctgagctgc ccaccctga tacgccagt
601 aacccttag accttctctg tgccctgctg ctctcctcag acagtttct gcaacaagaa
661 atagcgttga aaatggcct ctgccagttt gcactcccac tcgtgttgcc tgactcggag
721 aaccactacc atacatttct gctgtgggccc atgccccgca ttgtgaggac atggtgggtcc
781 cagcccccaa gggcatggg gagcttccgg gaagacagcg tggctctgtc cagggcgccc
841 gccttcgect tcgtgcgcat ggacgtcagt agcaactoca agtcccagct tctcaacgcc
901 gtctcagacc cgggccacag gcagtgggac tgcttctggc atcgggacct caacttgggc
961 accaatgccc gggagatttc ggatgggttg gtagaaattt cctgggtttt tcccagcgga
1021 agggaggact tggacatttt ccagaacct gtggcctttc tgaacctgag aggtgacatc
1081 ggtctcact ggctgcagt taagctcttg acagaaatct cctccgctgt gtttatattg
1141 actgacaata tcagtaagaa ggaatacaaaa ttgctgtact ccatgaagga gtaaccaca
1201 aaatactact tcatcctgag tccctaccgt gggaaagcga acacaaacct gagatttctg
1261 aataagttaa ttctgtgct gaaaatagac cactcacatg tctgggtaaa ggtcagcagc
1321 actgacagcg acagcttctg gaagaggatc cgggccatcg ttgggaatgt gctgcgggca
1381 ccctgcagcg gggatctctg ggaggacatg gcgcacgcag cccgcaaact gggcctaaag
1441 gtcgacgagg actgtgagga gtgtcagaaa gcgaaagacc ggatggagag gattaccagg
1501 aaaatcaaag actcggatgc ctacagaagg gacgagctga ggctgcaggg ggacccttgg
1561 agaaaggcag cccaagtgga gaaggagtcc tgccagctcc agtgggcccgt ggacccttcc
1621 gagaagcaca gggctgagct gaggcggcgg ctgctagaac ttcgaaatgca gcagaacggc
1681 catgatccct cctcgggggt gcaggagttc atctcgggga tcagcagccc ctctctgagt
1741 gagaagcagt acttctgag ttggatggag tggggcctgg cacgggtggc ccagcccgca
1801 ctgagacagc ctccggagac gcttctcacc ctgagaccaa agcatggggg caccacagac
```

```

1861 gtgggggagc cgctctggcc tgagccccta ggggtggaac acttcttgcg ggagatggga
1921 cagttttatg aggctgagag ctgtcttggt gaggcaggga ggctgccggc aggccagagg
1981 cgttttgccc acttcccagg cttggcctcg gagctgctgc tgacagggct gcctctggag
2041 ctaatcgatg ggagcacgct gagcatgccc gtccgctggg tcacagggct cctgaaggag
2101 ctgcaactcc gactggagag acggtcaagg ctggtgggtc tgtcaaccgt cggggtgcca
2161 ggcacgggca agtccacact cctcaacacc atgtttgggc tgcggtttgc cacaggggaag
2221 agctgcggtc ctgagggggc cttcatgcag ctcatcacag tggctgaggg cttcagccag
2281 gacctgggct gtgaccacat cctggtgata gactccgggg gcttgatagg tggggccttg
2341 acgtcagctg gggacagatt tgagctggag gcttccttgg cactctgct catgggactg
2401 agcaatgtca ccgtgatcag tctagctgaa accaaggaca ttccagcagc tattctgcat
2461 gcatttctga ggttagaaaa aacggggcac atgcccact accagtttgt ataccagaac
2521 cttcatgatg tatctgttcc cggccctagg cccagagaca agagacagct cctggatcca
2581 cctggtgacc tgagcagggc tgacgccag atggagaaac agggcgacgg cttccgggca
2641 ctggcaggcc tggccttctg cgaccctgag aagcagcaca tctggcacat cccaggcctg
2701 tggcaccggag cacctcccat ggccgcagtg agcttggcct acagtgaagc cataattgaa
2761 ttgaagagat gcctactcga aaacatcagg aacggcttgt cgaacaaaaa caaaaacatc
2821 cagcagctca ttgagctggt gagacggctg tgagtgtgca gaaaaccca gttcaggtgt
2881 aggaggctgc tgtgggcagc cctgtctgat ggggcacccg tgtggggctg tgctctggtg
2941 cctgagaatg gctggtgccc aatcgacatg agaagacgag gaaaagacag ggtttggagt
3001 ctctcaaca gtgttaaaag aggaagtgac ctacagacc agctcagaga tgttaccag
3061 aatatcacag cccccagggt agggagacaa gcagcagttt gttctgtctc agctcctgtc
3121 aaggatcctg cggggtgggc cctctgtata gctgctctc gtcactggcc cctggagtgg
3181 gagcagcgtc cttagtcaact gcaggcccag gcgggcaggt ggtcccagga cagaggtggg
3241 gaagtgtcc tgaggaagca gaagtaggcc ttgctcccgc ccaacccaag gcctccagt
3301 ggaccagcat tcaagatgtg agtgccctg gtgtgcaagg cactcccatt gcaccgtatt
3361 tattgactga tctgtgaagg cttcccctgac ccctgccag gaagagttca ctggtcgctc
3421 tggtgtgccc cacagcactt tgttatacct ctgccacaca cttcacgcag cgggtttaa
3481 ctcatgtgtt tacatgtctg tccccccaga ctgtgagctc cttgagggca gggactgtac
3541 attctccagc tctgtgtccc cagggcctgg cacattgtag acgcttaata aatgtctgtt
3601 aaatgaatga gtgcacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

//

ON-TARGETplus SMARTpool insan URG4 siRNA'sı (Cat # L-017108-01) kullanılan 4 adet siRNA duplex sekansları aşağıda özetlenmiştir.

siRNA duplex 1:

Sense: G.C.C.U.A.A.A.G.G.U.C.G.A.C.G.A.G.G.A.U.U
Anisense: 5'-P.U.C.C.U.C.G.U.C.G.A.C.C.U.U.U.A.G.G.C.U.U

siRNA duplex 2:

Sense: U.G.A.C.C.U.U.G.C.U.G.C.C.G.A.C.A.U.U.U.U
Anisense: 5'-P.A.A.U.G.U.C.G.G.C.A.G.C.A.A.G.G.U.C.A.U.U

siRNA duplex 3:

Sense: G.G.A.G.U.G.U.C.A.G.A.A.A.G.C.G.A.A.A.U.U.U
Anisense: 5'-P.U.U.U.C.G.C.U.U.U.C.U.G.A.C.A.C.U.C.C.U.U

siRNA duplex 4:

Sense: A.A.C.A.A.G.A.A.A.U.A.G.C.G.U.U.G.A.A.U.U
Anisense: 5'-P.U.U.C.A.A.C.G.C.U.A.U.U.U.C.U.U.G.U.U.U.U

2.4 siRNA'ların transfeksiyonu ve URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesi:

RNA interferans deneylerinde yukarıda detayları ile anlatılmış olan URG4'e özgü siRNA'ların yanı sıra;

- pozitif kontrol olarak ON-TARGETplus siCONTROL İnsan GAPDH Kontrol siRNA (Cat # D 001830-10-05),
- negatif kontrol olarak siCONTROL Non-Targeting siRNA #1 (Cat # D-001210-01-05) veya ON-TARGETplus siCONTROL Non-targeting siRNA (Cat # 001810-10-05) kullanılmış ve HepG2-pcDNA3 hücre dizinlerine ayrı ayrı olarak transfekte edilmiştir.

Kullanılan bütün siRNA'ların geçici (transient) transfeksiyonu için DharmaFECT 1 (Cat # T-2001-02) transfeksiyon malzemesi kullanılmış ve firmanın önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

RNA interferans deneyleri iki ayrı hücre kültür kabı platformunda gerçekleştirilmiştir. (96 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu). Transfeksiyonun optimizasyonu, ilgili deney protokolündeki farklı parametrelerin (transfeksiyon malzemesi ve/veya siRNA konsantrasyonu, transfeksiyon süresi, antibiyotikli ve antibiyotiksiz besi yeri kullanımı, vb.) tek tek değiştirilmesi ile yapılmıştır.

2.5 RNA izolasyonu ve multipleks semikantitatif RT-PCR:

İlgili hücre dizinlerinden TRI-Reagent (Sigma) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA kalitesi ve miktarları belirlendikten sonra, Tablo 1'de detaylandırılmış olan amplikonlar OneStep RT-PCR kit (Cat# 210212, Qiagen) kullanılarak, tek aşamalı multiplex semikantitatif RT-PCR reaksiyonu ile çoğaltılıp, EtBr ile boyanmış %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Tablo 1.
Primer Dizileri

Gen ismi	Primer Dizisi	Amplikon büyüklüğü (Bç)	Annealing derecesi (°C)
URG4 (1)	URG4 (1) F: 5'-CGGGAGATGGGACAGTTTAA-3' URG4(1)R: 5'-CATGGTGTTGAGGAGTGTGG-3'	285	55
URG4 (2)	URG4 (2) F: 5'-CTTCATCCTGAGTCCCTACCG-3' URG4 (2) R: 5'-GCCGTTCTGCTGCATTTCG-3'	472	55
GAPDH	GAPDH F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3' GAPDH R: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'	98	55
Cyclin D1	CyclinD1_F: 5'AGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAAAC-3' CyclinD1_R: 5'AGTGTTCAATGAAATCGTGCGGGGT-3'	480	60

2.6 Real-time RT- PCR:

Total RNA'ları elde edilen örneklerden, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında elde edilen cDNA kullanılarak, hedeflenen gen bölgeleri Light Cycler PCR Master Mix ve TaqMan metodu temel alınarak real-time PCR ile amplifiye edilmiştir. Aynı bir PCR'da aynı cDNA örneği kullanılarak, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) cDNA'sı housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Elde edilen ürün, RNA kontrolü ve rölatif kantitasyon için kullanılmıştır. Herbir örneğin kantitasyonu, örneğin floresan rezonans enerjisi Light Cycler Kantitasyon Software'ı (LCQuant, Roche Diagnostics) kullanılarak ölçülmüştür. İncelenen örnekte, ilgili genlerin mRNA miktarının ölçülmesi için rölatif kantitasyon kullanılmıştır. Amplifiye edilen DNA'nın kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplanmıştır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa

geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmiştir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen GAPDH'in 7 farklı standardı ile (108, 107, 106, 105,104 103 ve 102) bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına (CP) göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlenmiştir. İlk olarak, hedef miktarı; hedef (T) gen kopyalarının housekeeping (H) gen kopyalarına oranı şeklinde ölçülmüştür. İkinci basamakta, örnekteki hedefin housekeeping gen kopyalarına oranı (T/H), her reaksiyonda koşulan kontrol RNA'nın T/H oranına bölünmesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar, örnekteki T/H oranını ifade etmektedir. Uygulanan *TaqMan* PCR protokolü; aşağıda detaylandırılmış olan Denatürasyon, Amplifikasyon ve Soğutma aşamalarını içermektedir (Tablo 2).

Tablo 2.
Real time RT-PCR koşulları

Denatürasyon			
Döngü Programı Verileri		Değer	
Döngü		1	
Analiz Modu		-	
Hedef Dereceleri		Segment 1	
Hedef Derece (°C)		95	
İnkübasyon zamanı (s:dk: sn)		600	
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)		20.0	
İkinci hedef derece (°C)		0	
Basamak derecesi (°C)		0.0	
Döngüler		0	
Kazanç modu		-	
Amplifikasyon			
Döngü Programı Verileri		Değer	
Döngü		40	
Analiz Modu		Kantitasyon	
Hedef Dereceleri		Segment 1	Segment 2
Hedef Derece (°C)		94	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)		20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)		0	0
Basamak derecesi (°C)		0.0	0.0
Döngüler		0	0
Kazanç modu		-	Tek

Soğuma	
Program Verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0
İkinci Hedef Derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

2.7 Protein izolasyonu ve Western Blot:

İlgili siRNA transfeksiyonundan 96 saat sonrasında, hücre dizinlerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, hücreler soğuk (ice-cold) PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 10 dakika RİPA solüsyonu [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet, 0.5% sodium deoxycholate, 1% SDS, proteaz inhibitörleri (1 mM phenyl-methanesulfonyl fluoride (PMSF), 10 ug/ml leupeptin, 20 ug/ml aprotinin), ve fosfataz inhibitörü (0.2 mM sodium orthovanadate)] ile buz üstünde bekletilmiştir. 10.000 rpm ve 4°C'de santrifüj sonrasında hücre debris çöktürülmüş ve total protein elde edilmiştir. Protein konsantrasyonu BioRad Protein assay kit (Bradford dye-binding procedure) yardımı ile yapılmıştır. İzolasyonu yapılmış olan protein örnekleri (her birinden 50 veya 100ug) SDS-PAGE'e (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – 8% resolving gel-(BioRad)) tabii tutulduktan sonra PVDF membrana (Millipore) geçirilmiştir. Proteinleri içeren PVDF membran, taze hazırlanmış PBS + 5% yağsız süt tozu + 0.05% Tween-20 içinde ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. PBS yıkamaları sonrasında, birincil antikor olarak 1:1000 oranında anti-URG4 (kendi ürettiğimiz) veya 1:1000 – 1:5000 oranında anti-β-aktin (Rabbit polyclonal, AbCam) ve sonrasında horseradish peroxidase (HRP) konjuge ikincil antikorlar (goat anti-rabbit IgG – Accurate Chemical & Scientific Corporation) kullanılmıştır. Sonuçlar “enhanced chemiluminescence” (SuperSignal siRNA Chemiluminescent Detection) tekniği ile görüntülenmiştir.

2.8 Akım Sitometrisi:

6 kuyucuklu hücre kaplarında üretilen ve siRNA transfeksiyonu yapılan hücre dizinleri kullanılarak “Akım Sitometri” “FACS Analysis” Floresans Activated Cell Sorting” deneyleri yapılmıştır. Deney prensibi olarak ilgili her hücre dizini siRNA transfeksiyonunu takip eden 24 ve 48 saatlerinde fikse edilmiş ve sonrasında Propidium Iodide ile boyandıktan sonra ve hücre içindeki DNA miktarı-içeriği hücre döngüsündeki bölümler çerçevesinde % olarak ölçülmüştür.

2.9 Mikroarray Analizi:

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+URG4 siRNA, HepG2-pcDNA3-URG4 hücre gruplarından “2’şer grup halinde (duplicate)” RNA izolasyonu (TRI-Reagent-Sigma) yapıldıktan sonra kuru buz varlığında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne gönderilmiş ve Affymetrix Human Genome U133 2.0 Plus chip platformu kullanılarak mikroarray deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne gönderilen örnekler; ilk olarak RNA miktar, bütünlük ve temizlik dereceleri için “Agilent Bioanalyzer” platformunda değerlendirilmiştir. Bu değerler mikroarray-ifade profillemesi çalışmalarından alınacak sonuçların kalite ve güvenilirliği ile doğrudan ilişkilidir. Bu analiz sonucunda, RNA örneklerimizin degrade olmadığı, yeterli temizlik ve miktarda olduğu onaylandıktan sonra mikroarray deney işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.10 Proteomiks “Kinex Antibody Microarray” Analizi:

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+URG4 siRNA, HepG2-pcDNA3-URG4 hücre gruplarından “2’şer grup halinde (duplicate)” hücre pelleti elde edildikten sonra örnekler kuru buz varlığında Kanada’da bulunan KİNEXUS firmasına gönderilmiş ve “Kinex Antibody Microarray” tekniği ile yaklaşık 800 adet proteinin (300 phospho-specific + 500 pan-specific antikor) ifadesine ve fosforilasyon durumu analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

RNA interferans deneyleri öncesinde, kullanılacak hücrelerin temel karakterizasyonu, “HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 gen ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi (Stabil transfeksiyonun kontrolü)” ve “hücre büyüme eğrileri” ile kendi laboratuvarımız koşullarında yapılmıştır.

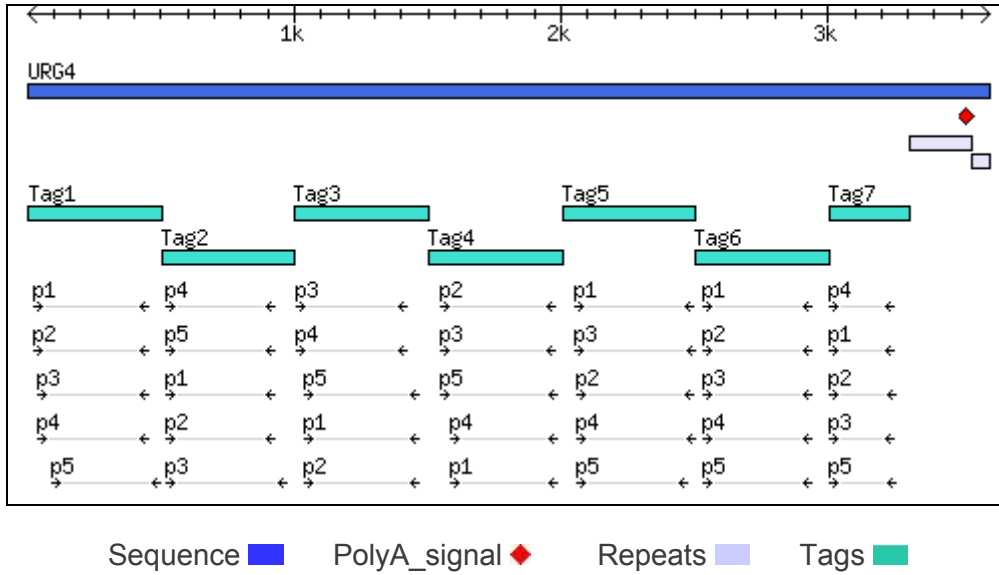
3.1 HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 RNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi (Stabil transfeksiyonun kontrolü):

Yaklaşık 3600 bç olan URG4 dizisi hedef dizi olarak kullanılarak, çeşitli bilgisayar programları yardımıyla 7 farklı URG4 gen ifadesi kontrol parçaları (Tag) hazırlanmıştır. RT-PCR analizinin kolayca yapılabilmesi için genin tam uzunluğu yaklaşık 200-450 bç'lik parçalara ayrılmış (toplam 7 parça) ve her bir parça için 5 farklı primer çifti tasarlanmıştır. Aşağıda primer tasarımı detayları ile açıklanmıştır (Şekil 2).

Şekil 2.

URG4 primer tasarımı

(Symbol: URG4, Accession: NM_017920.2, Map: 7p13, Lenght: 3606)



Tablo 3. URG4 Tag 1

Primers	Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%
P1	LEFT	ggcattcagatttgggagaa	27	20	423	60.014	45.000
	RIGHT	tctccttccatctggctc	449	20		59.486	55.000
P2	LEFT	ggcattcagatttgggagaa	27	20	421	60.014	45.000
	RIGHT	tctccttccatctggctc	447	20		59.486	55.000
P3	LEFT	gatttgggagaagtagcccc	35	20	413	59.903	55.000
	RIGHT	tctccttccatctggctc	447	20		59.486	55.000
P4	LEFT	gatttgggagaagtagcccc	35	20	415	59.903	55.000
	RIGHT	tctccttccatctggctc	449	20		59.486	55.000
P5	LEFT	ttcagatttggaatggaga	93	20	402	59.200	40.000
	RIGHT	aataaatgtcggcagcaag	494	20		60.096	45.000

Tablo 4. URG4 Tag 2

Primers		Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%
P1		LEFT	tacgccagtgaacccttag	20	20	406	60.125	55.000
		RIGHT	ttctaccaacccatccgaaa	425	20		60.301	45.000
P2		LEFT	tacgccagtgaacccttag	20	20	407	60.125	55.000
		RIGHT	tttctaccaacccatccgaa	426	20		60.301	45.000
P3		LEFT	tacgccagtgaacccttag	20	20	447	60.125	55.000
		RIGHT	atgtccaagctcccttcc	466	20		60.314	55.000
P4		LEFT	atacgccagtgaaccctta	19	20	407	59.452	50.000
		RIGHT	ttctaccaacccatccgaaa	425	20		60.301	45.000
P5		LEFT	atacgccagtgaaccctta	19	20	408	59.452	50.000
		RIGHT	tttctaccaacccatccgaa	426	20		60.301	45.000

Tablo 5. URG4 Tag 3

Primers		Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%
P1		LEFT	tgacagaaatctcctccgct	37	20	427	59.950	50.000
		RIGHT	tcgtcccttctgtaggcac	463	20		60.218	55.000
P2		LEFT	gacagaaatctcctccgctg	38	20	426	59.950	55.000
		RIGHT	tcgtcccttctgtaggcac	463	20		60.218	55.000
P3		LEFT	ggctcactggctgcagttt	10	20	412	60.453	55.000
		RIGHT	atcctctccatccggctctt	421	20		59.896	50.000
P4		LEFT	ggctcactggctgcagttt	10	20	413	60.453	55.000
		RIGHT	aatcctctccatccggctctt	422	20		59.896	50.000
P5		LEFT	ttgacagaaatctcctccgc	36	20	428	60.340	50.000
		RIGHT	tcgtcccttctgtaggcac	463	20		60.218	55.000

Tablo 6. URG4 Tag 4

Primers		Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%
P1		LEFT	gaacttcgaatgcagcagaa	84	21	401	60.015	47.619
		RIGHT	gtgctcccatcgattagctc	484	20		59.803	55.000
P2		LEFT	ctgagaagcacagggtga	46	19	431	60.278	57.895
		RIGHT	atcgattagctccagaggca	476	20		59.939	50.000
P3		LEFT	ctgagaagcacagggtga	46	19	432	60.278	57.895
		RIGHT	catcgattagctccagaggc	477	20		59.939	55.000
P4		LEFT	agaacttcgaatgcagcaga	83	20	402	58.751	45.000
		RIGHT	gtgctcccatcgattagctc	484	20		59.803	55.000
P5		LEFT	ctgagaagcacagggtga	46	19	439	60.278	57.895
		RIGHT	gtgctcccatcgattagctc	484	20		59.803	55.000

Tablo 7. URG4 Tag 5

		Start: 2005	End: 2505	Length(pb): 500				
Primers	Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%	
P1	LEFT	gtcaaggctggtggttctgt	50	20	444	60.159	55.000	
	RIGHT	tgtctctgtctctgggcct	493	20		59.986	55.000	
P2	LEFT	aggctggtggttctgtcaac	54	20	440	60.159	55.000	
	RIGHT	tgtctctgtctctgggcct	493	20		59.986	55.000	
P3	LEFT	gtcaaggctggtggttctgt	50	20	446	60.159	55.000	
	RIGHT	gctgtctctgtctctgggc	495	20		60.143	60.000	
P4	LEFT	aggctggtggttctgtcaac	54	20	442	60.159	55.000	
	RIGHT	gctgtctctgtctctgggc	495	20		60.143	60.000	
P5	LEFT	aggctggtggttctgtcaac	54	20	417	60.159	55.000	
	RIGHT	gccggaacagatacatcat	470	20		59.780	50.000	

Tablo 8. URG4 Tag 6

		Start: 2506	End: 3006	Length(pb): 500				
Primers	Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%	
P1	LEFT	cagcccagatggagaaacag	28	20	407	60.791	55.000	
	RIGHT	tgaggagactccaaccctc	434	20		59.228	55.000	
P2	LEFT	cagcccagatggagaaacag	28	20	404	60.791	55.000	
	RIGHT	ggagactccaaccctctgtc	431	21		60.103	57.143	
P3	LEFT	cagcccagatggagaaacag	28	19	407	59.771	52.632	
	RIGHT	tgaggagactccaaccctc	434	20		59.228	55.000	
P4	LEFT	cagcccagatggagaaacag	28	20	407	60.791	55.000	
	RIGHT	tgaggagactccaaccctct	434	21		60.237	52.381	
P5	LEFT	cagcccagatggagaaacag	28	20	406	60.791	55.000	
	RIGHT	gaggagactccaaccctctg	433	21		60.237	57.143	

Tablo 9. URG4 Tag 7

		Start: 3007	End: 3306	Length(pb): 299				
Primers	Oligo	Seq	Start	Length(pb)	Product Size	TMel	GC%	
P1	LEFT	ggtagggagacaagcagcag	4	20	239	60.012	60.000	
	RIGHT	tcttgaatgctgtccactg	242	20		59.831	50.000	
P2	LEFT	ggtagggagacaagcagcag	4	20	243	60.012	60.000	
	RIGHT	cacatcttgaatgctgtcc	246	20		59.090	50.000	
P3	LEFT	ggtagggagacaagcagcag	4	20	241	60.012	60.000	
	RIGHT	catcttgaatgctgtccac	244	20		59.090	50.000	
P4	LEFT	aggtagggagacaagcagc	2	20	241	60.786	60.000	
	RIGHT	tcttgaatgctgtccactg	242	20		59.831	50.000	
P5	LEFT	ggtagggagacaagcagcag	4	20	242	60.012	60.000	
	RIGHT	acatcttgaatgctgtccac	245	21		59.989	47.619	

Multiplex Semikantitatif RT-PCR reaksiyonunda, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ifadesi “kontrol gen ifadesi (housekeeping gene expression)” olarak kullanılmıştır.

HepG2, HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-URG4 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücre dizilerinden TRI-Reagent (Sigma) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA kalitesi ve miktarları belirlendikten sonra, seçilmiş URG4 gen ifadesi kontrol parçası [Tag 4 (Primer 5, 439 bç), Tag 7 (Primer 3, 241 bç)] ve GAPDH (98 bç) OneStep RT-PCR kit (Cat# 210212, Qiagen) kullanılarak tek aşamalı multiplex semikantitatif RT-PCR reaksiyonu ile çoğaltılıp, EtBr ile boyanmış %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Tek aşamalı semikantitatif RT-PCR reaksiyonu sıcaklık profili:

Reverse Transkripsiyon: 50°C → 30 dak
PCR Aktivasyonu : 95°C → 15 dak
94°C → 1 dak } 30 Döngü
55°C → 1 dak }
72°C → 1 dak }
72°C → 10 dak

Dana önce yapmış olduğumuz deney sonuçlarımıza paralel olarak, HepG2 ve HepG2-pcDNA3 hücre dizilerine kıyasla HepG2-pcDNA3-HBx ve HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizilerinde URG4 gen ifade fazlalığı (over-expression) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, HepG2-pcDNA3-URG4 hücrelerinde URG4'ün stabil ifadesinin devamlılığını ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerinde ise HBx varlığında URG4'ün up-regülasyonunu teyit etmiştir. Sonuçları temsil eden jel görüntüsü Şekil 3'de gösterilmiştir.

Şekil 3.
HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 gen ifadesinin Multiplex RT-PCR ile belirlenmesi.
Tag 4 (Primer 5, 439 bç), Tag 7 (Primer 3, 241 bç) ve GAPDH (98 bç).



Marker
1. HepG2
2. HepG2-pcDNA3
3. HepG2-pcDNA3-URG4
4. HepG2- pcDNA3-HBx
5. (-) Kontrol
6. HepG2
7. HepG2-pcDNA3
8. HepG2-pcDNA3-URG4
9. HepG2- pcDNA3-HBx
10. (-) Kontrol

Tag 7 ve GAPDH Multiplex (1-5. Kuyucuklar)
Tag 4 ve GAPDH Multiplex (6-10. Kuyucuklar)

Ayrıca aşağıda dizileri verilen farklı URG4 primerleri tasarlanmış ve RT-PCR deneyleri tekrarlanmıştır. Sonuçları temsil eden jel görüntüsü Şekil 4'de gösterilmiştir.

URG4 (1) Primeri

URG4 (1) F: 5'-CGGGAGATGGGACAGTTTTTA-3'
URG4 (1) R: 5'-CATGGTGTGAGGAGTGTGG-3'

URG4 (2) Primeri

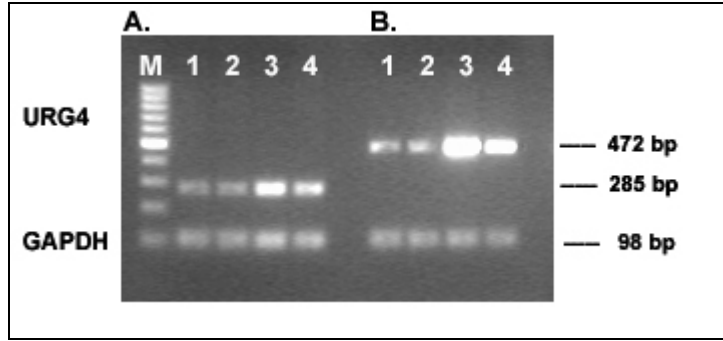
URG4 (2) F: 5'-CTTCATCCTGAGTCCCTACCG-3'
URG4 (2) R: 5'-GCCGTTCTGCTGCATTCG-3'

GAPDH Primeri

GAPDH F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'
GAPDH R: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'

Şekil 4.

HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan URG4 gen ifadesinin Multiplex RT-PCR ile belirlenmesi. URG41 (285bç) URG42 (472bç) ve GAPDH (98 bç).



Marker

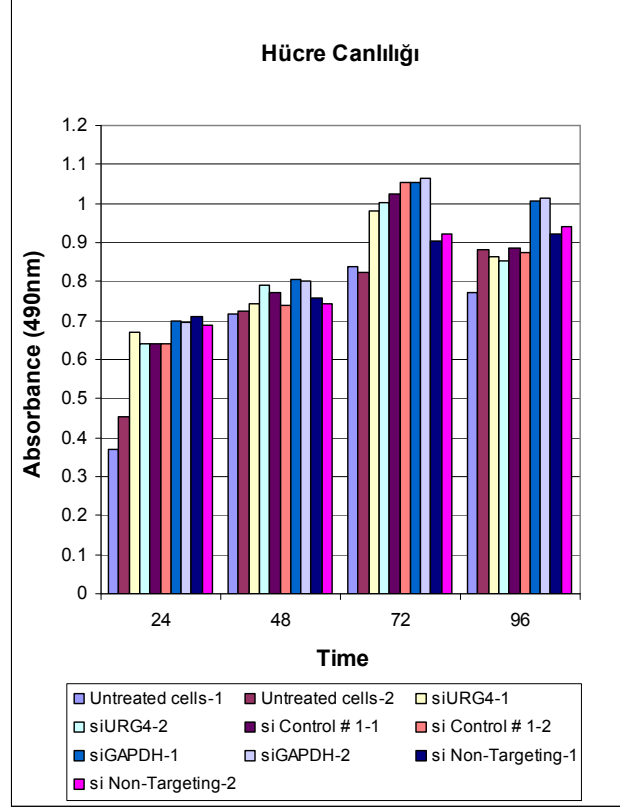
1. HepG2
 2. HepG2-pcDNA3
 3. HepG2-pcDNA3-URG4
 4. HepG2- pcDNA3-HBx
- (-) Kontrol

3.2 URG4'e özgün çift sarmal siRNA'ların HepG2 hücrelerine transfeksiyonu ve URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesi:

RNA interferans deneyleri iki ayrı hücre kültür kabı platformunda gerçekleştirilmiştir. (96 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu). Transfeksiyonun optimizasyonu, ilgili deney protokolündeki farklı parametrelerin (transfeksiyon malzemesi ve/veya siRNA konsantrasyonu, transfeksiyon süresi, antibiyotikli ve antibiyotiksiz besi yeri kullanımı, vb.) tek tek değiştirilmesi ile yapılmıştır. İlk olarak siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığı kontrol edilmiştir. Elde ettiğimiz deney sonuçlarımıza göre transfekte edilen siRNA'lar hücrelerde yaşamla bağdaşmış ve öldürücü/toksik bir etki göstermemiştir (Şekil 5).

Şekil 5.

siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığının kontrolü



3.3 RNA interferans sonrasında ilgili hücre dizinlerindeki URG4 RNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ve Real-time RT-PCR ile tespiti (URG4'ün HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesinin kontrolü):

RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 ve GAPDH mRNA ifadesi Multiplex Semikantitatif RT-PCR ve Real-time RT-PCR ile belirlenmiştir (Şekil 6 ve 7).

Kullanılan Primerler:

URG4 Primeri: Amplikon 472 bç

URG4 F: 5' CTTTCATCCTGAGTCCCTACCG 3'

URG4 R: 5' GCCGTTCTGCTGCATTTCG 3'

GAPDH primeri: Amplikon: 98 bç

GAPDH F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'

GAPDH R: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'

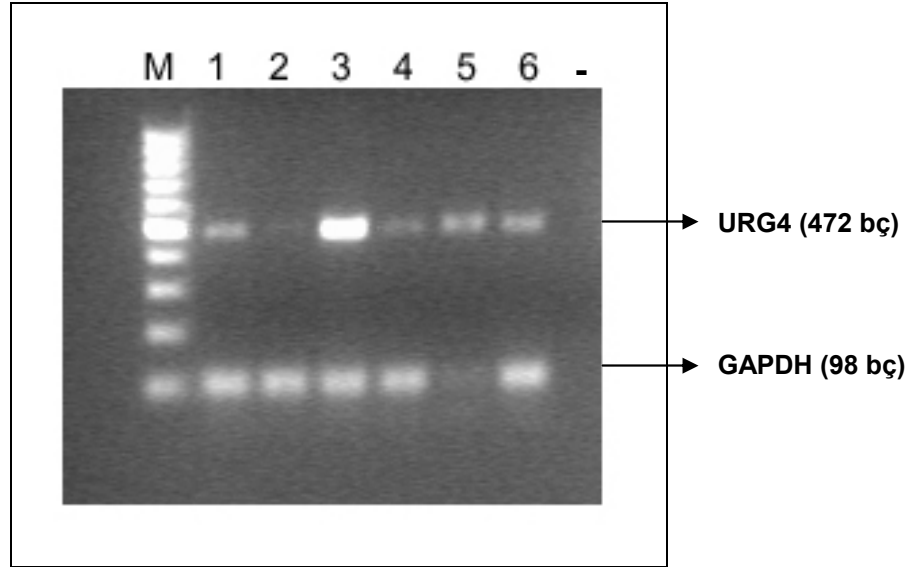
Multiplex Semikantitatif RT-PCR reaksiyonunda, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ifadesi "kontrol gen ifadesi (housekeeping gene expression)" olarak kullanılmıştır.

URG4, GAPDH ve β -Aktin - Tek aşamalı semikantitatif RT-PCR reaksiyonu sıcaklık profili:

Reverse Transkripsiyon: 50°C → 30 dak
PCR Aktivasyonu : 95°C → 15 dak
94°C → 1 dak } 30 Döngü
55°C → 1 dak }
72°C → 1 dak }
72°C → 10 dak

Şekil 6.

RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 mRNA ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi. URG4 (472 bç) ve GAPDH (98 bç).



Kuyucuklar:

M. Marker

1. HepG2-pcDNA3

2. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA *

3. HepG2-pcDNA3-URG4

4. HepG2-pcDNA3-URG4+ URG4 siRNA **

5. HepG2-pcDNA3+GAPDH Kontrol siRNA ***

6. HepG2-pcDNA3+Non-targeting siRNA ****

- RNA olmaksızın RT-PCR, negatif kontrol

* HepG2-pcDNA3 hücre dizinine URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır.

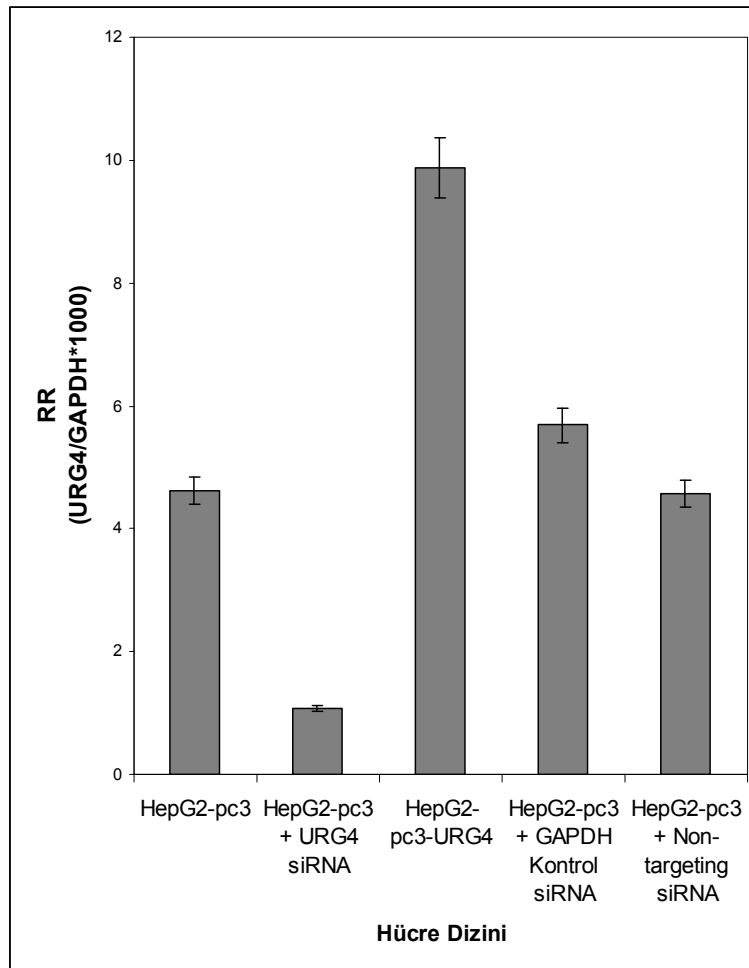
** HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinine URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır.

*** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine GAPDH Kontrol siRNA transfeksiyonu sonrasında GAPDH mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır ve URG4 mRNA'sında değişiklik olmamıştır.

**** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine Non-targeting siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 ve GAPDH mRNA'sında değişiklik olmamıştır.

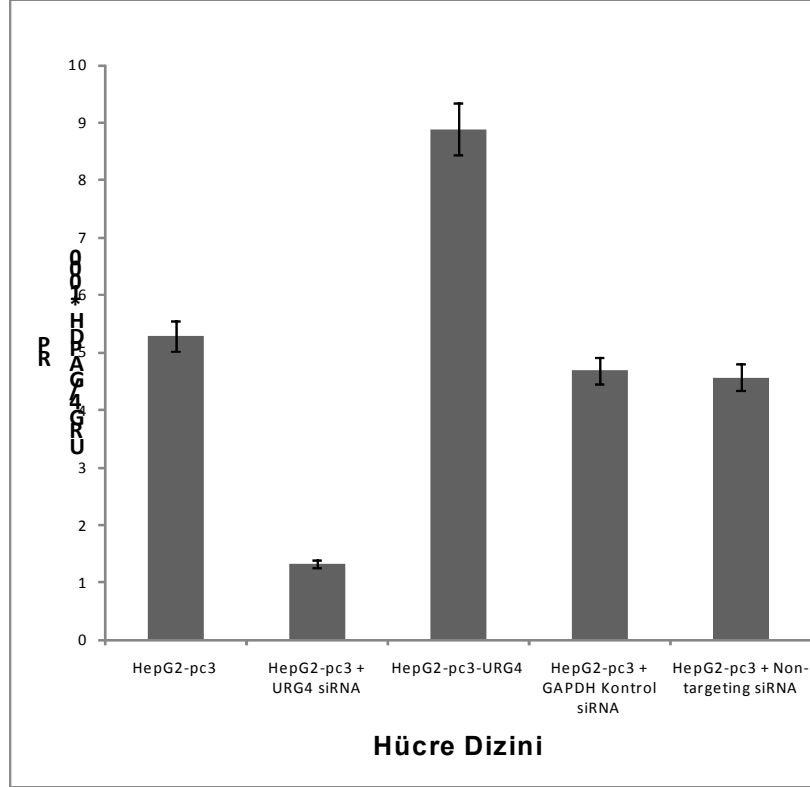
Şekil 7.

RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 mRNA ifadesinin Real-time RT-PCR ile belirlenmesi:



Şekil 7A.
24 Saat

Şekil 7B. 48 Saat



* HepG2-pcDNA3 hücre dizinine URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 mRNA'sı belirgin şekilde (\cong % 80) azalmıştır.

** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine GAPDH Kontrol siRNA transfeksiyonu sonrasında GAPDH mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır.

*** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine Non-targeting siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 ve GAPDH mRNA'sında değişiklik olmamıştır.

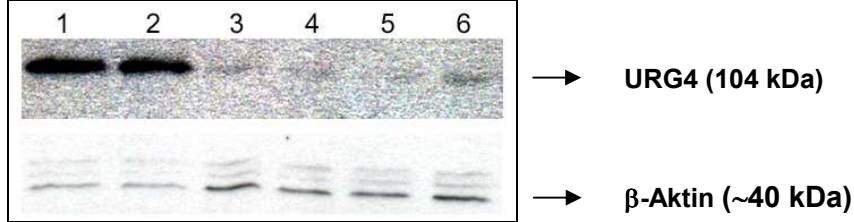
3.4 RNA interferans sonrasında ilgili hücre dizinlerindeki protein ifadesinin tespiti (URG4'ün HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmesinin kontrolü):

RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 ve β -Aktin protein ifadesi Western blot ile belirlenmiştir (Şekil 8).

Şekil 8.

RNA interferans deneylerinde kullanılan hücre dizinlerindeki URG4 ve β -Aktin protein ifadesinin Western blot ile belirlenmesi. URG4 (104 kDa) ve β -Aktin (~40 kDa)

8A

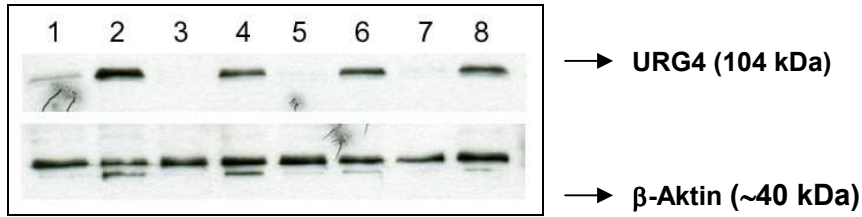


Kuyucuklar:

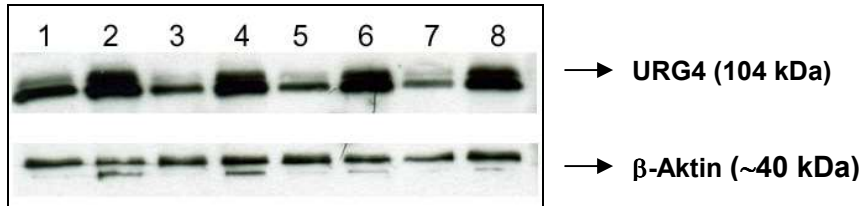
1 ve 2. HepG2-pcDNA3

3-6. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA *

8B. Kısa süreli film (exposure)



8C. Uzun süreli film (exposure)



Kuyucuklar:

1. HepG2-pcDNA3-URG4+ URG4 siRNA **

2. HepG2-pcDNA3-URG4

3. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA *

4. HepG2-pcDNA3

5. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA *

6. HepG2-pcDNA3+GAPDH Kontrol siRNA ***

7. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA *

8. HepG2-pcDNA3+Non-targeting siRNA ****

* HepG2-pcDNA3 hücre dizinine URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 protein ifadesi belirgin şekilde azalmıştır.

** HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinine URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 protein ifadesi belirgin şekilde azalmıştır.

*** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine GAPDH Kontrol siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 ve β -Aktin protein ifadesinde değişiklik olmamıştır.

**** HepG2-pcDNA3 hücre dizinine Non-targeting siRNA transfeksiyonu sonrasında URG4 ve β -Aktin protein ifadesinde değişiklik olmamıştır.

3.5 URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi:

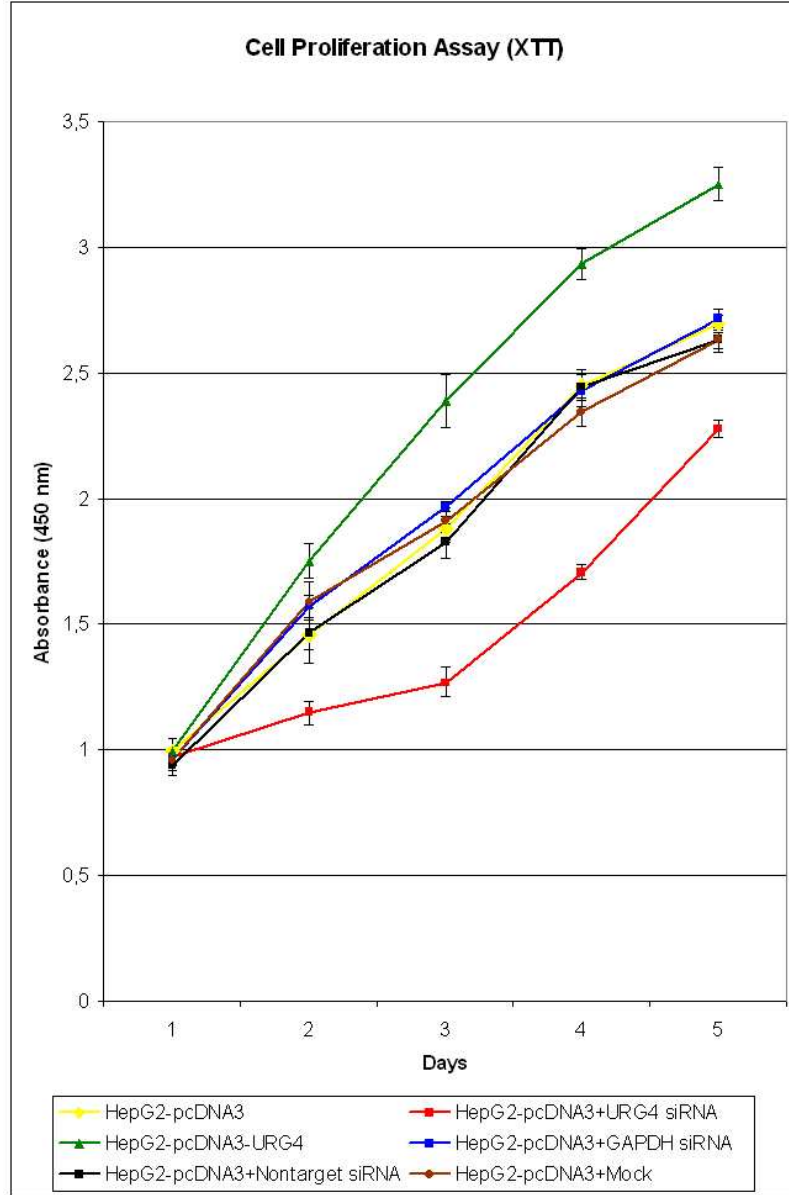
Hücre canlılığı deney sonuçları, siRNA transfeksiyonunun hücrelerde yaşamla bağdaştığı ve toksik bir etki göstermediğini göstermektedir (Şekil 5).

URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi araştırıldığında, HepG2-pcDNA3+URG4siRNA hücrelerinin proliferasyonunda HepG2-pcDNA3 hücrelerine göre belirgin şekilde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 9).

Optimizasyon amacıyla değiştirilen parametreler, örneğin: Dharmafect I siRNA Transfeksiyon solüsyonu miktarı ve transfeksiyon sırasında besi yerinde antibiyotik bulunmaması/bulunması deney sonuçlarında bir farklılık yaratmamıştır.

Şekil 9.

URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesinin sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi



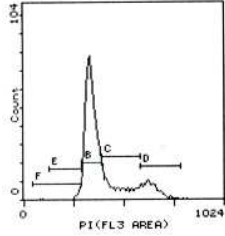
3.6 Akım Sitometrisi tekniği ile siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre içi DNA miktarının tayini:

6 kuyucuklu hücre kaplarında üretilen ve siRNA transfeksiyonu yapılan hücre dizinleri kullanılarak "Akım Sitometri" "FACS Analysis" Floresans Activated Cell Sorting" deneyleri yapılmıştır. Deney prensibi olarak ilgili her hücre dizini siRNA transfeksiyonunu takip eden 24 ve 48 saatlerinde fikse edilmiş ve sonrasında Propidium Iodide ile boyandıktan sonra ve hücre içindeki DNA miktarı-içeriği hücre döngüsündeki bölümler çerçevesinde % olarak ölçülmüştür (Şekil 10).

Şekil 10.

Akım Sitometrisi tekniği ile siRNA transfeksiyonu sonrasında hücre içi DNA miktarının tayini

10A. HepG2-pcDNA3

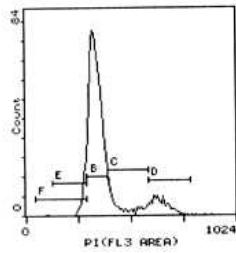


G0/G1 (B Bölgesi) = % 64.2 (# 4812)

S – (C Bölgesi) = % 19.6 (# 1471) *

G2/M – (D Bölgesi) = % 13.0 (# 977)

10B. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA



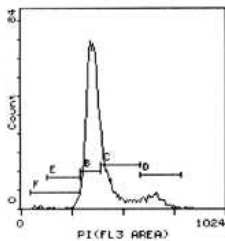
G0/G1 (B Bölgesi) = % 70.04 (# 5283)

S – (C Bölgesi) = % 12.0 (# 901) *

G2/M – (D Bölgesi) = % 10.5 (# 789)

Akım Sitometri deneylerinde HepG2-pcDNA3 kontrol grubunda S Bölgesi = % 19.6 (# 1471) tespit edilmişken, HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA hücrelerinde S Bölgesi = % 12.0 (# 901) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar URG4'ün baskılandığı hücre dizinlerinde S fazına geçişte bir yavaşlama-duraksama olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yapmış olduğumuz projede, URG4 varlığında hücrelerin S fazına geçişinde hızlanma-kolaylaşma olduğu tespit edilmiştir. Her iki deney sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, URG4 siRNA deneylerinin fonksiyonel olarak da çalıştığını gösteren önemli bir bulgu elde edilmiştir.

10C. HepG2-pcDNA3-URG4

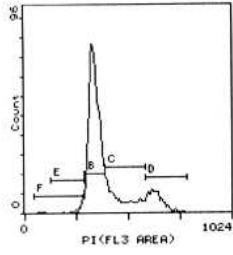


G0/G1 (B Bölgesi) = % 62.9 (# 4714)

S – (C Bölgesi) = % 23.8 (# 1783) **

G2/M – (D Bölgesi) = % 9.79 (# 734)

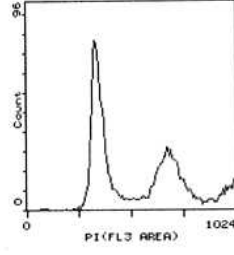
10D. HepG2-pcDNA3-URG4+ URG4 siRNA



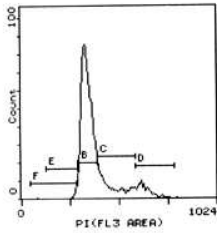
G0/G1 (B Bölgesi) = % 64.4 (# 4833)

S – (C Bölgesi) = % 19.5 (# 1460) **

G2/M – (D Bölgesi) = % 12.9 (# 969)



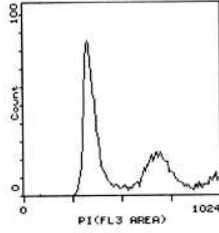
10E. HepG2-pcDNA3+GAPDH Kontrol siRNA



G0/G1 (B Bölgesi) = % 69.9 (# 5241)

S – (C Bölgesi) = % 19.2 (# 1437)

G2/M – (D Bölgesi) = % 8.71 (# 653)



Akım Sitometri deneylerinde, HepG2-pcDNA3-URG4 grubunda S Bölgesi = % 23.8 (# 1783) tespit edilmişken, HepG2-pcDNA3-URG4+ URG4 siRNA hücrelerinde S Bölgesi = % 19.5 (# 1460) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar URG4'ün daha az bir miktar baskılandığı- azaldığı hücre dizinlerinde S fazına geçişte daha az belirgin bir yavaşlama-duraksama olduğunu düşündürmektedir.

3.7 Mikroarray deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan URG4 geninin sessizleştirilmiş olduğu HepG2 hücre gruplarında, RNA interferans deneyinin kontrolünün hücre içi bazı fonksiyonel analizlerle yapılması:

Önceki projelerimizde, in vitro hücre kültür ortamında yapılan deneylerde URG4'ün HepG2 hücre dizinine transfekte edilip over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu gerçekleştirdiği ve immun sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. Ayrıca hepatoselüler karsinom olgularında URG4 ve HBV X protein ekspresyonunun aynı hücrelerde ko-lokale oldukları immunohistokimya deneyleri ile tespit edilmiştir. Bu aşamaya kadar elde edilen araştırma sonuçlarının tümü URG4'ün in vivo ortamda HB X proteininin doğal bir efektörü olabileceği hipotezini güçlendirmiştir [SATIROGLU-TUFAN, 2002].

HB X proteini, sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT, Siklin D1). Negatif büyüme regülatörlerinden p53 ve p55 ile fonksiyon baskılayıcı ilişkiye geçmesi, ve

ayrıca siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21WAF1/CIP1/SD11 ve translasyon başlatıcı faktör olan sui1'in hücre içi ekspresyonlarının HB X varlığında azalması, hücre çoğalmasının kontrolünde çeşitli bozukluklara yol açmaktadır [BENN, 1994; LUCITO, 1992; NATOLI, 1994; LEE, 1998; FEITELSON, 1993].

Laboratuvarımızda yürütmekte olduğumuz URG4 ile ilgili başka bir proje kapsamında elde ettiğimiz sonuçlarda; URG4'ün fazla ekspresyonunun sağlandığı HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinlerinde; hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişte çok önemli bir rolü olan Siklin D1 mRNA düzeyindeki ifadesinde ciddi bir artış tespit edilmiştir. Literatür bilgilerine göre Siklin D1 ifadesinde meydana gelen bozukluklar kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan kontrolsüz çoğalmaya neden olabilmektedir. Hatta pek çok kanser türünde ve özellikle lenfomaların bazı alt türlerinde (örn. Mantle Hücreli Lenfoma) Siklin D1'in sürekli sentez edildiği tespit edilmiştir. URG4'ü fazla eksprese eden HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinlerindeki hücre proliferasyonunun artışı Siklin D1 mRNA düzeyindeki artış ile ilgili olup olmayacağı araştırılması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle, Mikroarray deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan URG4 geninin sessizleştirilmiş olduğu HepG2 hücre gruplarında RNA interferans deneyinin kontrolünün hücre içi bazı fonksiyonel analizlerle yapılması amacıyla ilgili hücre gruplarında Silin D1 mRNA düzeyindeki ifadesindeki olası değişiklik tek aşamalı semikantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Siklin D1 Primeri (F: 220-244) (R:675-699)

Amplikon: 480 bç

CyclinD1_F: 5'-AGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAAAC-3'

CyclinD1_R: 5'-AGTGTTCAATGAAATCGTGCGGGGT-3'

GAPDH primeri:

Amplikon: 98 bç

GAPDH F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3'

GAPDH R: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'

Siklin D1 ve GAPDH Tek aşamalı semikantitatif RT-PCR reaksiyonu sıcaklık profili:

Reverse Transkripsiyon: 50°C → 30 dak

PCR Aktivasyonu : 95°C → 15 dak

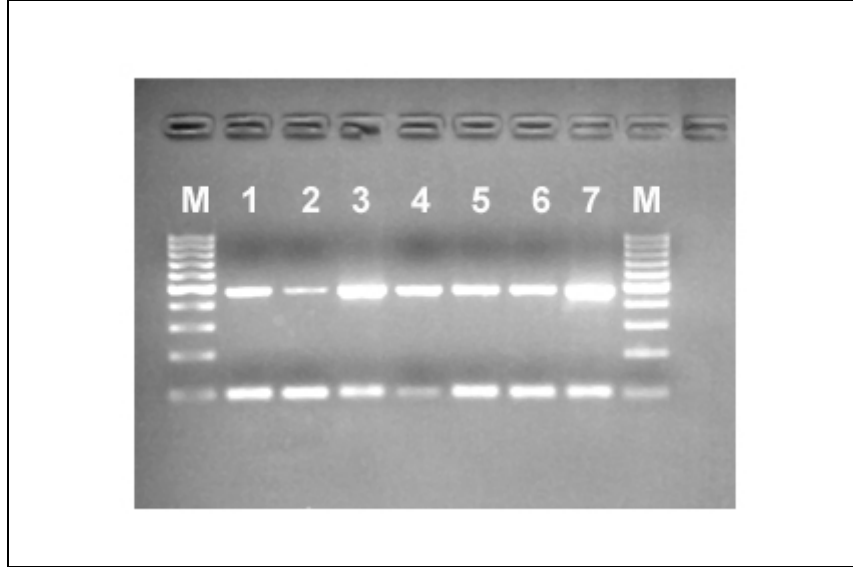
94°C → 1 dak
60°C → 1 dak
72°C → 1 dak

} 35 Döngü

72°C → 10 dak

Şekil 11.

URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında Siklin D1 ekspresyonuna etkisi



Kuyucuklar:

1. HepG2-pcDNA3
2. HepG2-pcDNA3+ URG4 siRNA
3. HepG2-pcDNA3-URG4
4. HepG2-pcDNA3+GAPDH Kontrol siRNA
5. HepG2-pcDNA3+Non-targeting siRNA
6. HepG2-pcDNA3+Mock
(siRNA yokluğunda transfeksiyon)
7. HepG2-pcDNA3-HB X

- HepG2-pcDNA3 hücre dizininde bazal-kontrol düzeyinde Siklin D1 ve GAPDH mRNA ifadesi tespit edilmiştir.
- HepG2-pcDNA3 hücre dizininde URG4 siRNA transfeksiyonu sonrasında Siklin D1 mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır ve GAPDH mRNA'sında değişiklik olmamıştır.
- HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizininde Siklin D1 ifade artışı (over-ekspresyonu) tespit edilmiştir.
- HepG2-pcDNA3 hücre dizininde GAPDH Kontrol siRNA transfeksiyonu sonrasında GAPDH mRNA'sı belirgin şekilde azalmıştır ve Siklin D1 mRNA'sında değişiklik olmamıştır.
- HepG2-pcDNA3 hücre dizininde Non-targeting siRNA transfeksiyonu sonrasında Siklin D1 ve GAPDH mRNA'sında değişiklik olmamıştır.

- HepG2-pcDNA3+Mock (siRNA yokluğunda transfeksiyon) hücrelerinde, HepG2-pcDNA3 hücre dizinindeki benzer bazal – kontrol düzeyinde Siklin D1 ve GAPDH mRNA ifadesi tespit edilmiştir.
- HepG2-pcDNA3-HB X hücre dizininde Siklin D1 ifade artışı (over-ekspresyonu) tespit edilmiştir.

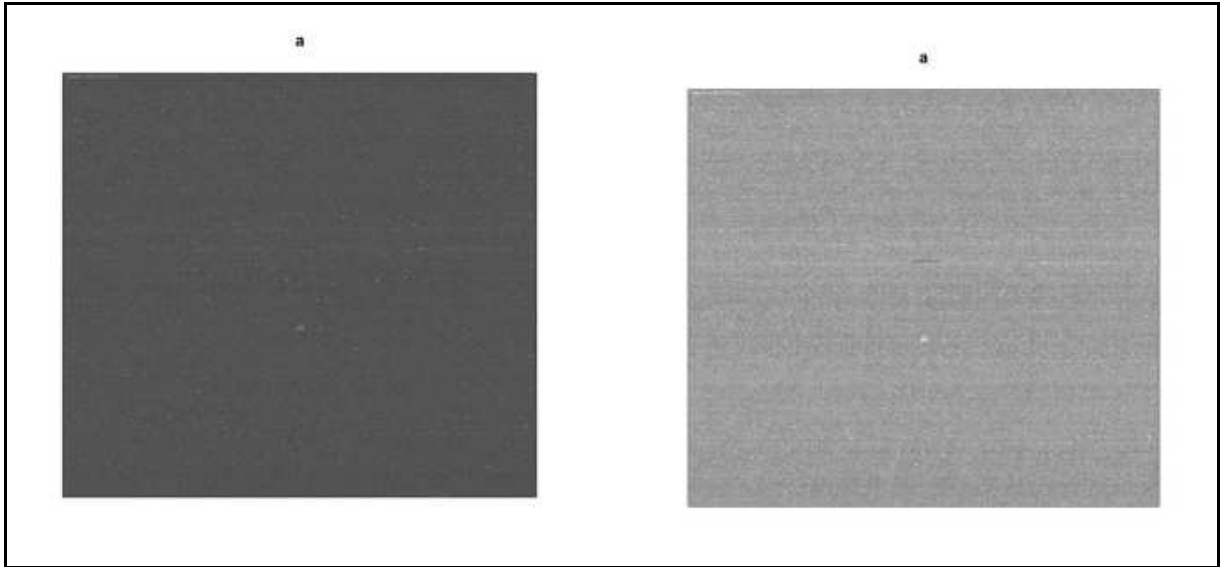
3.8 URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmiş olduğu hücreler kullanılarak mikroarray deneylerinin yapılması

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+URG4siRNA, HepG2-pcDNA3-URG4 hücre grupları kullanılarak Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne Affymetrix Human Genome U133 2.0 Plus chip platformu kullanılarak mikroarray deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.1 Mikroarray kalite kontrol analizi:

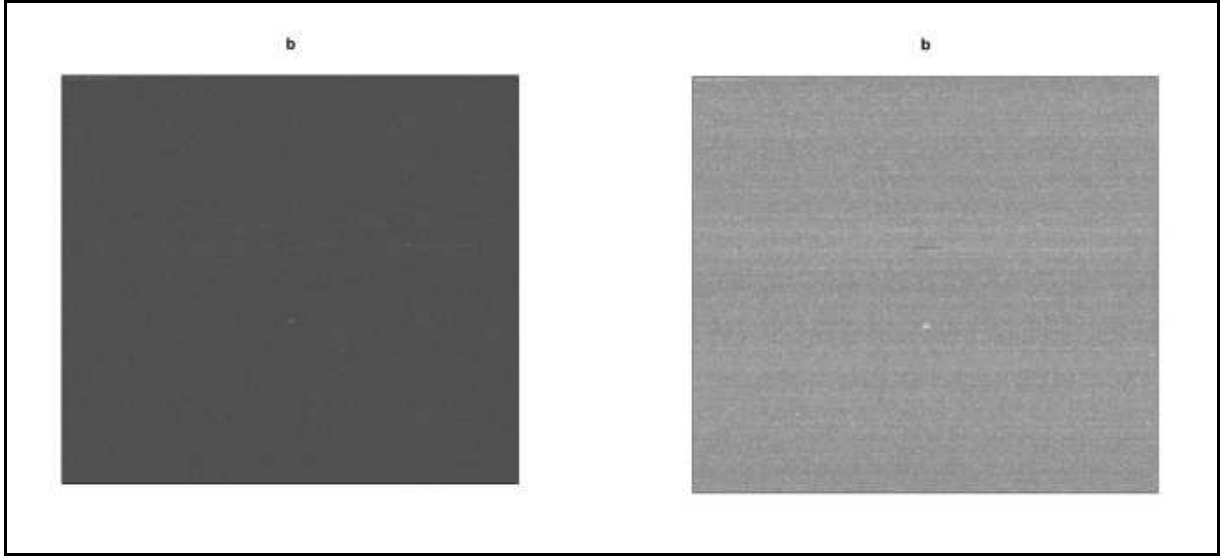
Şekil 12'den açıkça görüldüğü üzere kullanılan mikroarray chiplerinde anormal bir durum ve/veya bir hasar bulunmamaktadır.

Şekil 12. Mikroarray kalite kontrol analizi



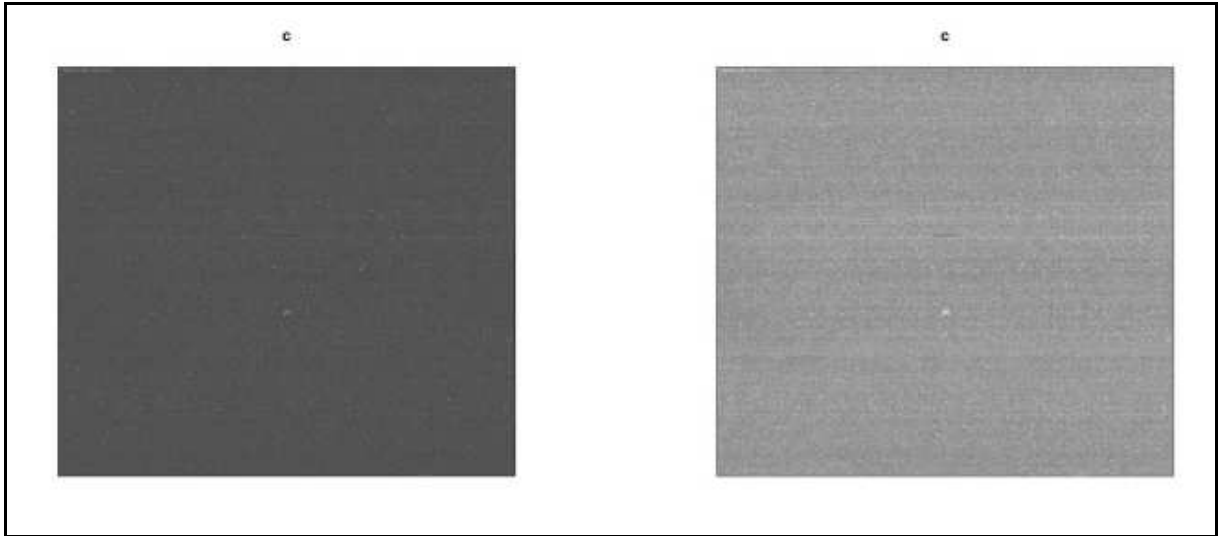
Şekil 12.1
2010-05-25_A3 ham mikroarray görüntüsü

Şekil 12.2
2010-05-25_A3 log2 görüntüsü



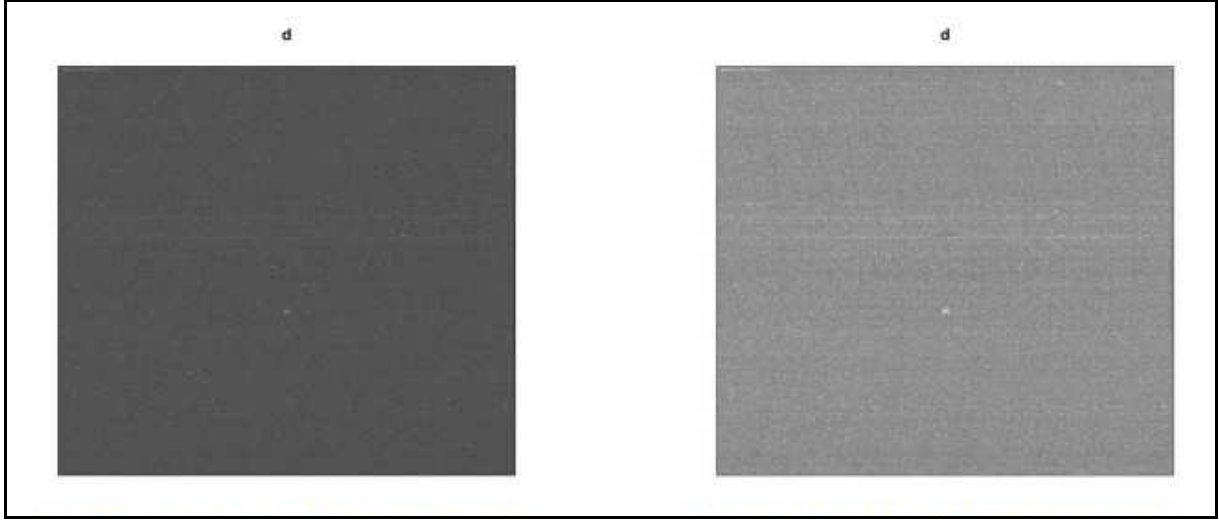
Şekil 12.3
2010-05-25_B2 ham mikroarray görüntüsü

Şekil 12.4
2010-05-25_B2 log2 görüntüsü



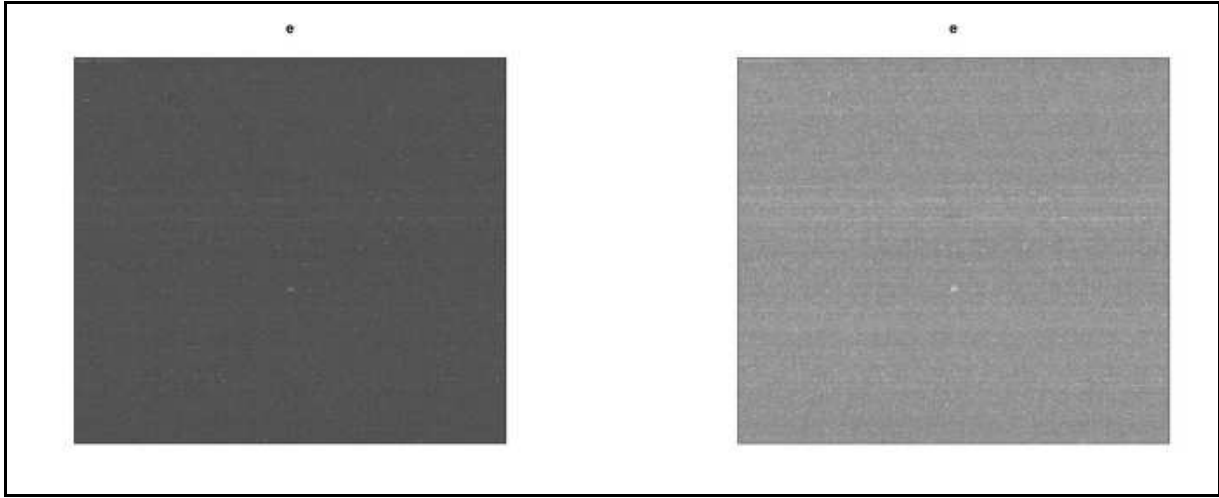
Şekil 12.5
2010-05-25_B3 ham mikroarray görüntüsü

Şekil 12.6
2010-05-25_B3 log2 görüntüsü



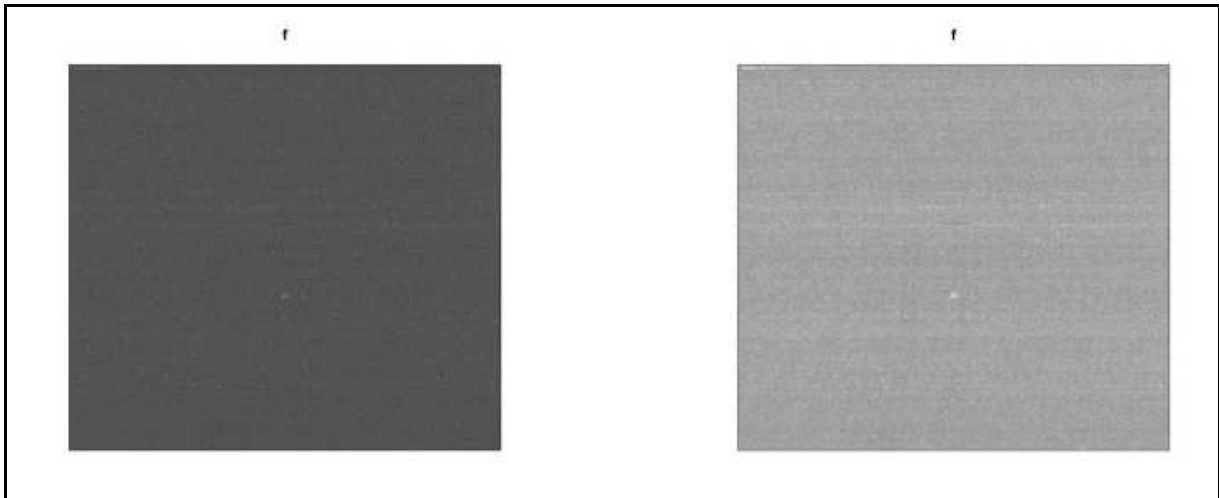
Şekil 12.7
2010-05-26_A2 ham mikroarray görüntüsü

Şekil 12.8
2010-05-26_A2 log2 görüntüsü



Şekil 12.9
2010-05-26_C2 ham mikroarray görüntüsü

Şekil 12.10
2010-05-26_C2 log2 görüntüsü

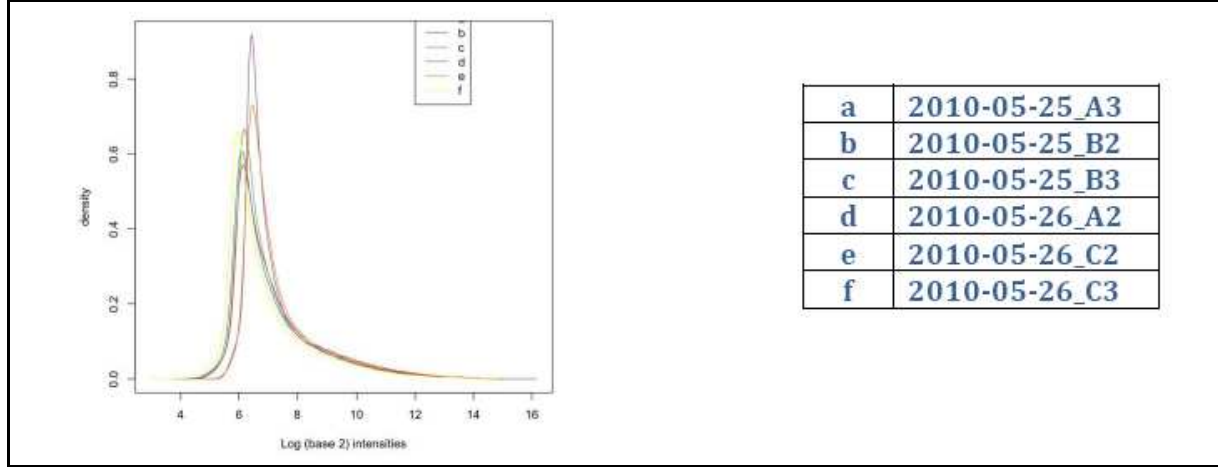


Şekil 12.11
2010-05-26_C3 ham mikroarray görüntüsü

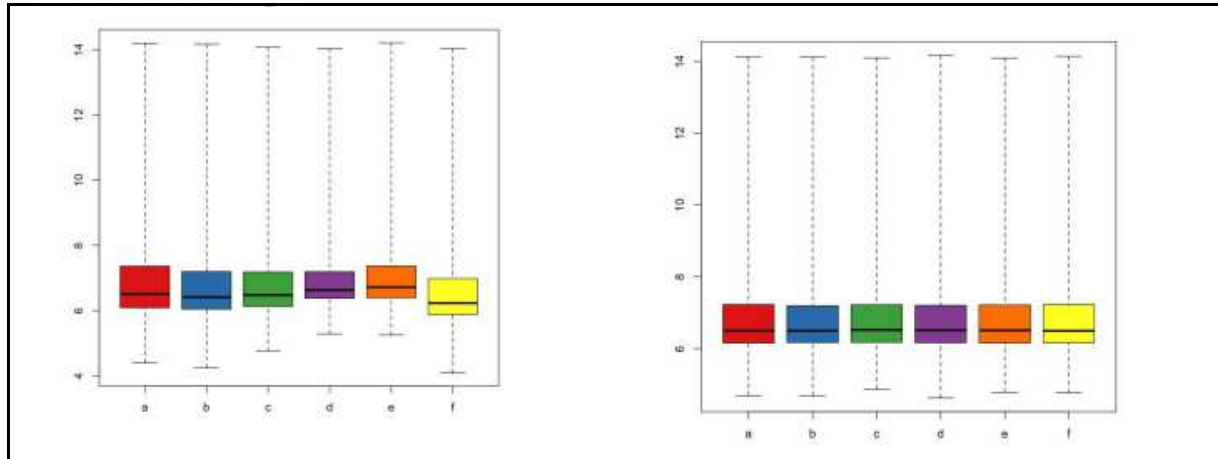
Şekil 12.12
2010-05-26_C3 log2 görüntüsü

Şekil 13. Görüntülerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

13A. Histogram



13B. Kutu grafiği

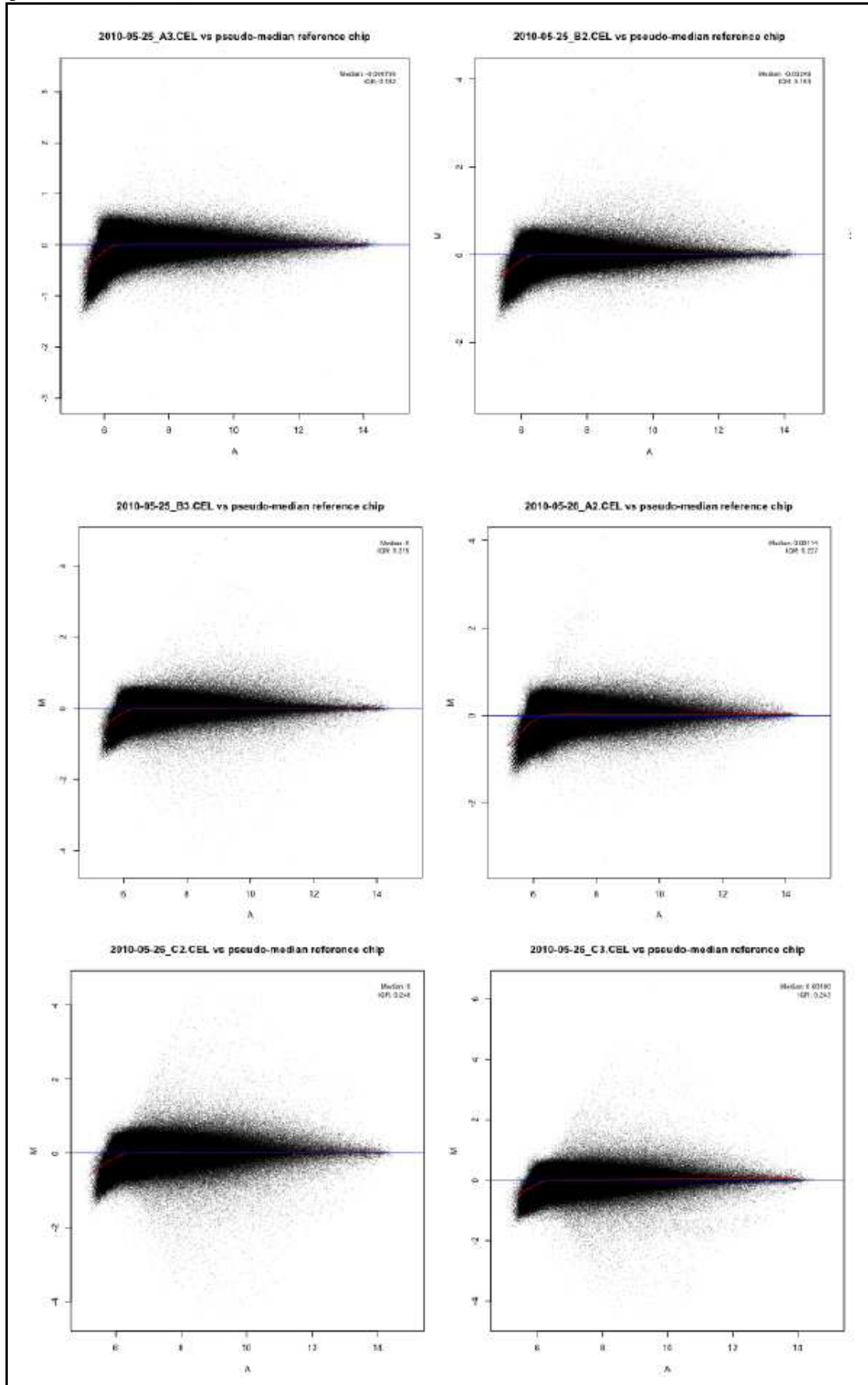


13B.a Tüm çiplere ait normalizasyon öncesi log2 ışıma değerleri

13B.b Tüm çiplere ait normalizasyon sonrası log2 ışıma değerleri

A-B, A-C ve B-C grupları arasında, ikişer tekrarlı çiplerden elde edilen veri, limma yöntemi ile analiz edilerek karşılaştırma yapılmıştır [SMYTH GK, 2004] İstatistiksel olarak anlamlı ilk yirmi beş gen seçilerek, analiz bu genler üzerinden sürdürülmüştür. p değerleri üzerinde çoklu karşılaştırmalar için “False Discovery Rate” düzeltmesi yapılmış [BENJAMINI Y, 2001] olup, Limma analizi sonucu elde edilen genler üzerinde kümeleme analizi yürütülmüştür. Kümeleme Analizi, unsupervised olarak “k-means” algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir [SAEED AI, 2006] (Şekil 12-18 ve Tablo 10-13).

Şekil 14. MA Grafikleri



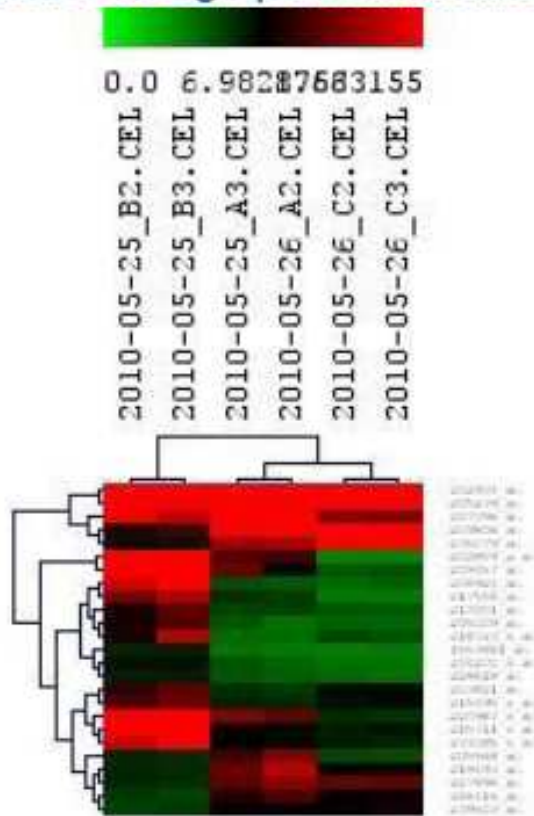
Tablo 10.

A ve B grupları “limma” analiz sonuçları: İstatistiksel olarak anlamlı ilk yirmi beş gene ait bilgiler.

Original row	GENE_TITL	TX_END	CHR	LOC	STRAND	TX_START	GO_TERM	GENE_SVA	REFSEQ_A	PROBE_ID	ENTREZ_ID	HUMIGENE	GENBANK	CHR	TGL_TC	logFC	AveExp	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	1552861_at-complex	1,05E+08	chr12	105+		1,06E+08	NA	TCF12L2	NM_152715	1552861_s	252294	Hs.696047	NM_152715	12	THC24755	-2,30854	4,409113	-21,4465	5,97E-08	0,002912	8,000784
2	202859_at-interleu1	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	IL8	NM_000520	202859_s	3576	Hs.624	NM_000520	NA	NA	-2,04057	6,747233	-20,0493	9,77E-08	0,002912	7,705378
3	202934_at-hexokin1	74973949	chr2	7497+		74973204	NA	HK2	NM_000120	202934_at	3099	Hs.591588	AI751561	2	THC26596	-3,94164	5,851077	-19,8542	1,05E-07	0,002912	7,661052
4	203821_at-heparin-b	1,4E+08	chr5	1396-		1,4E+08	GO:00048	HBEF	NM_001920	203821_at	1839	Hs.799	NM_001920	5	THC24617	1,691736	8,758079	16,48803	4,06E-07	0,003433	5,750745
5	204200_s_platelet-d	37971006	chr22	3797-		37969350	GO:00020	PDGFB	NM_002920	204200_s	5155	Hs.1976	NM_002920	22	THC24699	-2,40917	5,692268	-16,123	4,77E-07	0,003433	5,632749
6	205209_at-traf6l fac	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	TRAF1	NM_003220	205209_at	7031	Hs.162837	NM_003220	NA	NA	-2,022955	6,558779	15,52568	6,27E-07	0,003433	5,43003
7	205239_at-amphreg	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	AREG	U12891	205239_at	3747	Hs.645475	NM_001820	NA	NA	1,580429	7,898847	15,11305	7,51E-07	0,003433	5,282569
8	205568_at-aquapor1	56265401	chr15	562+		56217829	NA	AQP9	NM_020620	205568_at	166	Hs.104824	NM_020620	15	THC24718	-1,58037	10,37117	-15,0617	7,86E-07	0,003433	5,161759
9	206924_at-interleu1	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	IL11	NM_000620	206924_at	3589	Hs.467304	NM_000620	NA	NA	1,729653	6,435152	14,91163	8,36E-07	0,003433	5,20827
10	207096_at-seram am	18214950	chr11	182+		18209479	NA	SAA4	NM_006520	207096_at	6291	Hs.854493	NM_006520	11	THC24749	-2,17076	5,719798	-14,6244	9,65E-07	0,003433	5,09959
11	209457_at-daal spe1	1,12E+08	chr10	112+		1,12E+08	NA	DUSP5	NM_004820	209457_at	1847	Hs.2128	U16996	10	THC24672	-1,62122	8,721004	-14,5621	9,55E-07	0,003433	5,075572
12	209805_at-histone d	27212596	chr6	272+		27214052	GO:00007	HIST1H2B	NM_080520	209805_at	85236	Hs.437275	BC000893	6	THC24677	1,716727	8,721004	14,54261	1,00E-06	0,003433	5,069042
13	213301_at-angione	1,20E+08	chr9	1288-		1,20E+08	NA	ANGPTL2	NM_012920	213301_at	23452	Hs.653362	AF007150	9	THC24678	-1,65294	4,905701	-14,1541	1,22E-06	0,00354	5,914112
14	215495_s_sterile atp	54325505	chr14	542+		54291256	NA	SAMD4A	NM_025520	215495_s	23034	Hs.98159	AI117523	14	THC26952	1,622912	7,074896	13,92511	1,37E-06	0,003752	5,820856
15	215711_s_WEE1 inh	9501604	chr13	948+		9499437	GO:00020	WEE1	NM_003920	215711_s	7465	Hs.249441	AJ277548	11	THC24887	-1,73	7,624957	-13,5589	1,66E-06	0,003927	5,66541
16	217546_at-metalloth	55225398	chr16	552+		55224066	GO:00059	MTM1	NM_178820	217546_at	4499	Hs.647370	R06655	16	THC24772	-3,08541	5,251968	-13,4751	1,74E-06	0,003927	5,630203
17	218723_s_chromoso	40943007	chr13	409+		40929712	NA	C13orf15	NM_014920	218723_s	28984	Hs.507966	NM_014920	13	HP206724	-1,109	4,92731	-11,3789	1,83E-06	0,003927	5,588239
18	219493_at-SHC SH2	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	SHC9P1	NM_024720	219493_at	79821	Hs.123253	NM_024720	NA	NA	-1,85562	5,588493	-13,1029	2,12E-06	0,003927	5,465157
19	220087_s_HUAK fan	2,04E+08	chr13	2085-		2,04E+08	NA	C13orf17	NM_020620	220087_s	56672	Hs.132180	NM_020620	1	THC24699	-2,34183	10,39878	-13,0753	2,15E-06	0,003927	5,452853
20	226415_at-three pri	8926248	chr8	8897+		8897764	NA	THEX1	NM_151820	226415_at	90459	Hs.20000	AL137679	8	THC24696	1,789316	6,129242	12,79736	2,51E-06	0,004001	5,324948
21	227895_at-BRCA2 am	1,28E+08	chr10	127+		1,28E+08	NA	BRCA1	NM_005920	227895_at	56647	Hs.370292	AJ373643	10	THC24657	-3,61023	7,548921	-12,6714	2,76E-06	0,004001	5,265557
22	228618_at-platelet e	1,55E+08	chr1	1551+		1,55E+08	NA	PEAR1	NM_001020	228618_at	375033	Hs.591476	AI640178	1	THC24739	-3,61682	5,555502	-12,572	2,85E-06	0,004001	5,218304
23	233065_s_oligonucl	-1	chrNA	-1	NA	-1	NA	OBFC2A	NM_001020	233065_s	64859	Hs.591616	AV734843	NA	NA	2,051008	6,92991	12,53232	2,92E-06	0,004001	5,199276
24	235079_at-Transcri	81710668	chr8	8179+		81710181	NA	NA	NA	235079_at	NA	Hs.631567	AW285067	8	THC25466	-1,60387	7,138287	-12,1201	3,68E-06	0,004647	5,00089
25	239503_at-CDNA doi	21822612	chr10	218-		21821593	NA	NA	NA	239503_at	NA	Hs.554052	AJ809010	10	THC25042	-1,89506	7,307952	-11,7885	4,51E-06	0,005023	4,826177

Şekil 15.

A ve B grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü



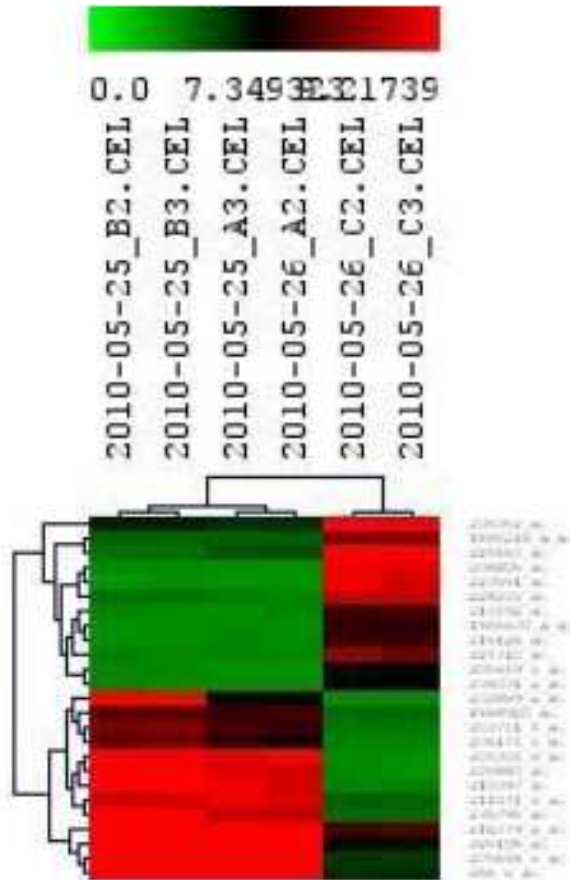
Tablo 11.

A ve C grupları “limma” analiz sonuçları: İstatistiksel olarak anlamlı ilk yirmi beş gene ait bilgiler

Original row	GENE_ID	TX_END	CHR	LOC_STRAND	TX_START	GO_TERM	GENE_SYM	REFSEQ_A	PROBE_ID	ENTREZ_ID	UNIGENE	GENBANK/CHR	TSS_TC	logFC	AveExpr	P.Value	adj.P.Val	B		
1	1555216_s_hypothet	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	LOC64572.XM.9936	1555216_s	645722	HL41099	BC009278	NA	NA	-5,8928	5,212061	-85,9455	1,49E-11	8,17E-07	15,15621	
2	1555630_s_RAB34_m	24018900	chr17:24018900	-	24005430	GO:000031	RAB34	NM_0319	1555630_s	88871	HL30185	AF127350	17	THC248107	5,882112	7,214098	59,94356	3,03E-11	5,28E-07	14,83602
3	1568920_s_CDNA_dca	24018948	chr17:24018948	-	24005956	NA	NA	NA	1568920_s	NA	HL68534	BC035494	12	THC26057	4,376275	8,941634	50,70643	1,05E-10	1,23E-06	14,19584
4	202859_s_interleuk	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	IL8	NM_0005	202859_s	3576	HL624	NM_0005	NA	NA	-4,38743	4,809255	-49,5952	1,23E-10	1,23E-06	14,10187
5	203404_s_adenylylat	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	ADCY7	NM_0011	203404_s	113	HL513576	NM_0011	NA	NA	-4,47474	5,211781	-49,2952	1,23E-10	1,23E-06	14,07506
6	204304_s_prominin	1568682	chr4:1568682	-	15578955	GO:00056	PROM1	NM_0060	204304_s	8842	HL514734	NM_0060	4	THC24669	5,422207	7,298307	46,98825	1,35E-10	1,23E-06	14,049
7	205174_s_glutamin	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	GPCT	NM_0124	205174_s	25797	HL79031	NM_0124	NA	NA	-5,24078	5,495417	-46,8054	1,89E-10	1,31E-06	13,84794
8	205352_s_serpin pe	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	SERPINI1	NM_0050	205352_s	5274	HL478151	NM_0050	NA	NA	4,502412	7,48814	46,31784	2,05E-10	1,31E-06	13,80042
9	205545_s_paired bo	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	PAX5	NM_0003	205545_s	5080	HL591991	NM_0003	NA	NA	4,136919	10,63075	45,56418	2,31E-10	1,31E-06	13,72521
10	205549_s_fibronect	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	FGA	NM_0039	205549_s	2243	HL351591	NM_0039	NA	NA	-4,39304	4,732194	-44,3952	2,80E-10	1,31E-06	13,60379
11	205590_s_protasin ki	20254533	chr14:20254533	-	2015440	NA	PRKD1	NM_0027	205590_s	5587	HL538395	NM_0027	14	THC24720	-1,361205	4,557848	-44,3254	2,83E-10	1,31E-06	13,59646
12	206825_s_sama don	83428425	chr7:83428425	-	83428425	GO:00056	SEMA5A	NM_0068	206825_s	30371	HL252851	NM_0068	7	THC24773	4,528511	7,538726	44,14723	2,92E-10	1,31E-06	13,57727
13	210397_s_defensin	6722929	chr8:6722929	-	6715511	NA	DEFB1	NM_0052	210397_s	1672	HL32949	U13945	8	THC24744	-5,90575	5,091166	-43,0257	3,53E-10	1,31E-06	13,45376
14	211071_s_myeloid/1	-1	chrNA-1	NA	-1	NA	MELT11	NM_0066	211071_s	30952	HL75821	BC005471	NA	NA	-1,83949	7,995185	-43,0121	3,54E-10	1,31E-06	13,45223
15	213492_s_collagen	46654528	chr12:46654528	-	46653043	GO:00019	COL2A1	NM_0018	213492_s	1280	HL408182	X06268	12	THC24679	3,91918	5,660701	42,65411	3,76E-10	1,31E-06	13,41267
16	215126_s_CDNA FL	78315191	chr6:78315191	-	78277314	NA	NA	NA	215126_s	NA	HL20034	AL109718	15	THC25052	5,602829	7,246102	42,56811	3,82E-10	1,31E-06	13,40185
17	216179_s_CD24 mol	1,12E+08	chr6:11162	+	1,12E+08	NA	CD24	NM_0132	216179_s	934	HL694721	AK000168	6	THC25438	-1,65134	5,810434	-41,2109	4,86E-10	1,58E-06	13,24094
18	223551_s_protein ki	1,23E+08	chr6:12303	+	1,23E+08	NA	PKIB	NM_0324	223551_s	5570	HL488354	AF225513	6	NP314049	4,142975	5,747213	40,70602	5,32E-10	1,62E-06	13,17871
19	224850_s_at_maf, T-cell	1,2E+08	chr8:12021	+	1,2E+08	NA	MAL2	NM_0528	224850_s	114589	HL301851	AL117612	8	THC24690	-4,00062	4,617407	-39,2392	6,98E-10	1,94E-06	12,98987
20	224710_s_at_RAB34_m	24018901	chr17:24018901	-	24005430	GO:000031	RAB34	NM_0319	224710_s	88871	HL30185	AF127057	17	THC24691	3,517335	5,687811	39,15116	7,10E-10	1,94E-06	12,97815
21	225305_s_at_oversexp	1,04E+08	chr12:104	+	1,04E+08	NA	OCC-1	NM_2073	225305_s	387882	HL65184	BF950197	12	THC24610	3,631024	9,426267	38,90091	7,44E-10	1,94E-06	12,94456
22	228231_s_at_FRA31 rel	14759531	chr9:14759531	-	14727214	NA	FREM1	NM_1448	228231_s	158326	HL31050	A0824037	9	THC24742	-4,86418	5,11091	-37,3081	9,01E-10	2,15E-06	12,80755
23	235795_s_at_paired bo	31789434	chr11:31789434	-	31767035	GO:000031	PAX5	NM_0003	235795_s	5080	HL391991	AW088233	11	THC24629	-4,47474	4,858958	-37,8815	9,06E-10	2,15E-06	12,80379
24	236031_s_FRA51 rel	14726945	chr9:14726945	-	14724573	NA	FREM1	NM_1448	236031_s	158326	HL31050	AL127440	9	THC23074	4,151997	8,95089	35,15008	1,18E-09	2,75E-06	12,56931
25	236_s_at_CD24 mol	13611914	chr6:13611914	-	13611914	NA	CD24	NM_0132	236_s	934	HL694721	L13930	Y	THC24657	4,001427	6,41488	35,14506	1,18E-09	2,75E-06	12,56854

Şekil 16.

A ve C grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü



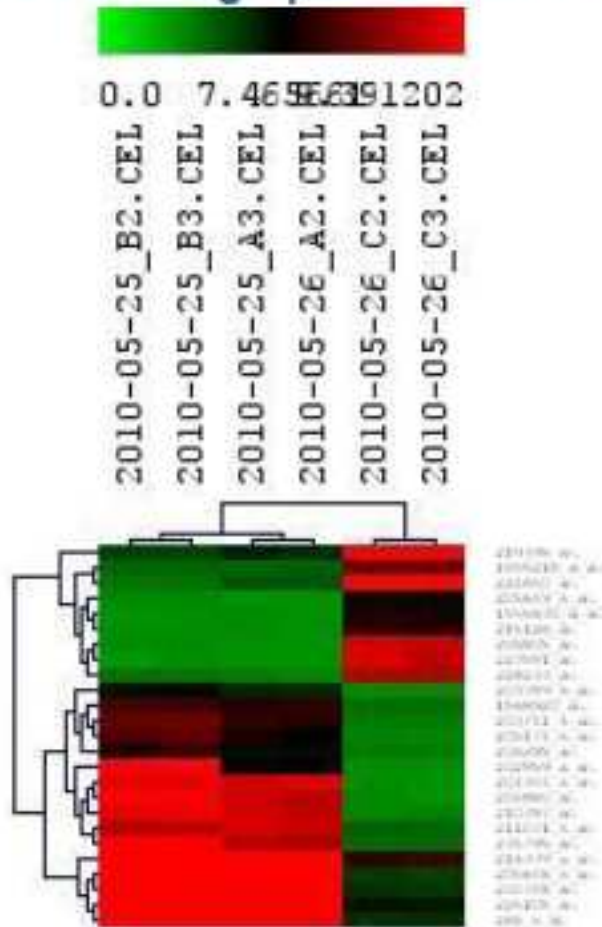
Tablo 12.

B ve C grupları “limma” analiz sonuçları: İstatistiksel olarak anlamlı ilk yirmi beş gene ait bilgiler

Original row	GENE_TITL	TX_END	CHR	LOC2	STRAND	TX_START	GO_TERM	GENE_SYM	REFSEQ_A	PROBE_ID	ENTREZ_ID	UNIGENE	GENBANK	CHR	TGI_TC	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
1	1555216_c1hypothet	-	1	chrNA:	1-NA	-	1-NA	LOC64572	XM_93304.1555216.1	64572	HL_410998	BC009278	NA	NA	-5,71317	5,212061	-63,9375	1,88E-11	4,08E-07	15,29965	
2	1555630_c1RAB34	mv	24069300	chr17:	2400	-	1-NA	RAB34	NM_003101.1555630.1	83871	HL_301853	AF327350	NA	17	ThC24810	5,183547	5,742233	90,75528	2,74E-11	4,08E-07	15,11145
3	1558920_c1CDNA	clot	24039648	chr12:	2400	-	1-NA	NA	NA	1558920	HL_685334	BC009484	NA	12	ThC26057	5,941947	7,214008	80,55333	2,81E-11	4,08E-07	15,0992
4	202859_x1	interleuk	-	1	chrNA:	1-NA	-	IL8	NM_00251202859.1	3576	HL_624	NM_00051	NA	NA	-5,45533	5,211781	-60,0989	2,97E-11	4,08E-07	15,0713	
5	203741_x1	adenylate	-	1	chrNA:	1-NA	-	ADCY7	NM_0011203741.1	113	HL_512878	NM_00111	NA	NA	5,62071	7,298307	51,22297	9,71E-11	8,49E-07	14,42437	
6	203789_x1	sema dom	-	1	chrNA:	1-NA	-	SEMA3C	NM_0063203789.1	10513	HL_299109	NM_00631	NA	NA	5,130088	7,528726	51,1129	9,75E-11	8,49E-07	14,42322	
7	204304_x1	prominin	1366852	chr4:	13571	-	1-NA	PROM1	NM_0060204304.1	8942	HL_614734	NM_00601	NA	4	ThC24669	-4,48334	4,809255	-50,4532	1,09E-10	8,49E-07	14,35724
8	205174_x1	glutamin	-	1	chrNA:	1-NA	-	QPCT	NM_0124205174.1	25797	HL_79033	NM_01241	NA	NA	4,194452	8,941634	48,59969	1,45E-10	8,80E-07	14,18795	
9	205648_x1	paired bo	-	1	chrNA:	1-NA	-	PAX5	NM_00201205648.1	5080	HL_591993	NM_00201	NA	NA	4,373475	5,660701	47,60057	1,67E-10	1,01E-06	14,09239	
10	205649_x1	fibrinogen	-	1	chrNA:	1-NA	-	FGA	NM_00061205649.1	2243	HL_351593	NM_00061	NA	NA	8,133811	7,246102	46,60235	1,95E-10	1,07E-06	13,99127	
11	205840_x1	protein ki	2926433	chr14:	291	-	1-NA	PRKD1	NM_0027205840.1	5587	HL_508999	NM_00271	NA	14	ThC24719	-4,48517	4,732194	-45,3252	2,40E-10	1,19E-06	13,8572
12	206295_x1	interleuk	-	1	chrNA:	1-NA	-	IL18	NM_00131206295.1	3606	HL_83077	NM_00131	NA	NA	4,2937	7,48814	44,17075	2,91E-10	1,22E-06	13,72972	
13	206825_x1	sema dom	83651845	chr7:	83421	-	1-NA	SEMA3A	NM_00601206825.1	10371	HL_252451	NM_00601	NA	7	ThC24773	3,934418	10,63075	43,33383	3,35E-10	1,22E-06	13,63356
14	210397_x1	defensin	6722389	chr8:	67131	-	1-NA	DEFB1	NM_0052210397.1	1672	HL_32949	U73945	NA	8	ThC24744	-5,89622	5,091186	-42,9562	3,57E-10	1,22E-06	13,58908
15	211071_x1	myoflodil	-	1	chrNA:	1-NA	-	MLLT1	NM_0068211071.1	10962	HL_75823	BC006471	NA	NA	4,920441	8,65089	42,84057	3,65E-10	1,22E-06	13,57533	
16	215126_x1	CDNA FL1	78331591	chr15:	782	-	1-NA	NA	NA	215126	HL_29304	AL100715	NA	15	ThC26952	-4,78346	5,495417	-43,722	3,72E-10	1,22E-06	13,56114
17	216379_x1	CD24	1,12E+08	chr6:	1,11E+	-	1-NA	CD24	NM_0132216379.1	994	HL_894731	AK002188	NA	6	ThC25438	-3,78055	5,810434	-42,4435	3,91E-10	1,22E-06	13,52756
18	219795_x1	solute car	1,15E+08	chr3:	1,15E+	-	1-NA	SLC6A14	NM_0072219795.1	11254	HL_522109	NM_00721	NA	6	ThC24742	5,292459	9,031253	42,28221	4,02E-10	1,22E-06	13,50794
19	223551_x1	protein ki	1,23E+08	chr6:	1,23E+	-	1-NA	PKIB	NM_0324223551.1	3570	HL_496354	AF225513	NA	6	HP134049	3,706996	6,887811	41,26125	4,81E-10	1,31E-06	13,38062
20	224650_x1	mal, T-cal	1,2E+08	chr8:	1,20E+	-	1-NA	MAL2	NM_05281224650.1	114569	HL_201083	AL117612	NA	8	ThC24690	4,562723	6,41468	41,21528	4,85E-10	1,31E-06	13,37476
21	225105_x1	overexpre	1,04E+08	chr12:	1,04E+	-	1-NA	OCC-1	NM_2073225105.1	387882	HL_651848	BF983997	NA	12	ThC24610	-3,60895	4,557848	-40,9965	5,05E-10	1,31E-06	13,3467
22	228233_x1	FRAS1	rel1	14789531	chr9:	1472	-	FRS1	NM_14491228233.1	158326	HL_50850	AJ824037	NA	9	ThC24742	3,775268	9,425257	40,44627	5,58E-10	1,39E-06	13,27409
23	230748_x1	solute car	6377465	chr11:	637	-	1-NA	SLC16A8	NM_00461230748.1	9120	HL_42645	AJ873273	NA	17	ThC28500	3,960487	5,217628	39,68531	6,42E-10	1,53E-06	13,17901
24	235795_x1	paired bo	31789434	chr11:	317	-	1-NA	PAX6	NM_00201235795.1	5080	HL_591993	AW08823	NA	11	ThC24629	-5,77257	7,708978	-39,1301	7,13E-10	1,61E-06	13,09549
25	266_x1	CD24	19614050	chr1:	1961	-	1-NA	CD24	NM_01322166_x1	994	HL_894731	L33930	Y	ThC24657	3,748933	5,614654	38,91831	7,42E-10	1,61E-06	13,06853	

Şekil 17.

B ve C grupları kümeleme analiz sonuçlarının HeatMap görüntüsü



Tablo 13.
Tüm gruplara ait “İlimma” analiz sonuçları:

Original row	GENE_TITLE_END	CHR	LOCAT3	TX_START	GO_TERM	GENE_SYM	REFSEQ	ACPROBE_ID	ENTREZ_ID	UNIGENE	GENBANK_CHR	TGI_TC	logFC	Avrlogp	t	P.Value	adj.P.Val	B	
1	1553861_15-complex1	1	1064048	chr12:1012+	1,05E+00	NA	TCPI12	NM_152773553861.1	255394	Hs.696047	NM_15277	12	THC247593	-2,20054	6,433313	-21,4603	5,97E-08	0,020112	6,000784
2	202057_1	Interleukin1	-1	NA	1,8E+00	IL1B	NM_00031202859.1	3876	Hs.424	NM_20058NA	NA	NA	-2,20057	6,477233	-20,0403	6,77E-08	0,020112	7,303378	
3	202094_1	hoxa9b	1	74873204	NA	HGX	NM_00018202834.1	3099	Hs.501538	A70161	1	THC255968	-3,94104	5,851077	-19,8542	1,02E-07	0,020112	7,661252	
4	202821_1	hpa2n1b	1	1,4E+08	GO:000407	HMGF	NM_00184203821.1	1838	Hs.759	NM_50194	5	THC240172	1,691736	6,791079	16,48023	6,02E-07	0,020433	6,767545	
5	204202_1	plakale-dw	3	37871005	chr22:5794-	NA	PLK1	NM_00102042020.1	5155	Hs.1076	NM_20060	22	THC246592	-2,40917	5,692260	-16,123	4,77E-07	0,020433	6,432749
6	206005_1	trkai1	1	NA	1,1E+00	TRK1	NM_00322206206.1	7031	Hs.162807	NM_20022NA	NA	NA	2,022955	6,598779	15,12568	6,77E-07	0,020433	6,430203	
7	206232_1	arrp3	-1	NA	1,2E+00	ARR3	NM_00105206232.1	3747	Hs.65475	NM_20065NA	NA	NA	1,930429	7,998847	15,11303	7,61E-07	0,020433	6,282958	
8	206582_1	mapkapin1	1	56217829	NA	ACF9	NM_20081206582.1	306	Hs.204624	NM_20099	15	THC247182	-1,83037	10,71717	-15,9617	7,82E-07	0,020433	6,263759	
9	206924_1	interleukin1	-1	NA	1,1E+00	IL11	NM_00064206924.1	3538	Hs.407304	NM_20064NA	NA	NA	1,721655	6,631512	14,51163	8,33E-07	0,020433	6,103827	
10	207098_1	scram amy1	1	18218010	chr11:1820-	NA	SAA4	NM_00051207098.1	6291	Hs.654983	NM_200651	11	THC247408	-2,17076	5,719789	-14,6244	5,93E-07	0,020433	6,09959
11	209457_1	dual specific	1	1,12E+08	chr10:1122+	NA	DUSP5	NM_00441209457.1	1047	Hs.2123	U18958	10	THC248721	-1,62122	6,710294	-14,5621	5,92E-07	0,020433	6,055572
12	209820_1	histone h2a	1	27224252	GO:000781	HIST1H2BE	NM_00039209820.1	85238	Hs.437275	BC000893	6	THC248771	1,716727	8,721442	14,54201	1,02E-06	0,020433	6,060042	
13	211005_1	angpt1	1	2,39E+08	chr9:1388-	NA	ANGPT1	NM_01009211005.1	23562	Hs.653262	AF007130	9	THC248741	-1,65294	6,808701	-14,1541	1,02E-06	0,020554	5,914412
14	211495_1	gata1	1	54261256	NA	SAMD4	NM_01551211495.1	21034	Hs.38259	AL127523	14	THC248524	1,822912	7,978888	13,25511	1,37E-06	0,020752	5,820856	
15	211711_1	WEE1	1	8501614	chr11:9440+	NA	WEE1	NM_00130211711.1	7465	Hs.249441	A277546	11	THC248670	-1,73	7,624557	-13,5588	1,66E-06	0,020827	5,66641
16	211745_1	rasal6	1	55224566	GO:000550	MTM1	NM_17687211745.1	4499	Hs.647370	RD6655	16	THC247727	-2,08641	5,252568	-13,4751	1,74E-06	0,020827	5,662023	
17	211783_1	chromatin	1	40629712	NA	CBX15	NM_01405211783.1	28984	Hs.507866	NM_51405	11	NP209724	-2,109	4,92733	-13,3788	1,83E-06	0,020827	5,582328	
18	211983_1	SHC3	-1	NA	1,2E+00	SHC3	NM_02474211983.1	8549	Hs.122253	NM_22474NA	NA	NA	-1,85562	6,588043	-13,1023	2,12E-06	0,020827	5,463357	
19	220987_1	NUAK	1	2,04E+08	chr1:2033-	NA	NUAK1	NM_02064220987.1	56572	Hs.131180	NM_20095	1	THC248595	-2,14183	10,28878	-13,0753	2,15E-06	0,020827	5,452893
20	221641_1	ctnnb1	1	8897164	NA	TNFR1	NM_15133221641.1	30489	Hs.20000	AL137678	8	THC248368	1,783315	6,121242	12,79726	2,51E-06	0,020401	5,204948	
21	221786_1	IKKCB	-1	1,28E+08	chr10:1275+	NA	IKKCB	NM_01865221786.1	36647	Hs.370282	A373643	10	THC248579	-3,41923	5,548021	-12,6754	2,70E-06	0,020401	5,265657
22	222018_1	plakale-nd	1	1,55E+08	chr1:15514+	NA	PLK1	NM_00108220181.1	37033	Hs.591470	AL040178	1	THC247992	-3,61682	5,556502	-12,572	2,81E-06	0,020401	5,218204
23	223085_1	otus1	-1	NA	1,1E+00	OT1A	NM_0010323085.1	64859	Hs.381610	AV734843	NA	NA	2,010388	6,92591	12,52322	2,92E-06	0,020401	5,199276	
24	223079_1	Transcribed	1	81710181	chr8:8170-	NA	NA	229079	NA	Hs.633567	AW245005	8	THC248445	-1,60387	7,118287	-12,1291	3,64E-06	0,020467	5,00083
25	223952_1	CDNA	1	21821550	chr16:2182-	NA	NA	239522	NA	Hs.554052	AB030310	10	THC250423	-1,89556	7,307162	-11,7896	5,41E-06	0,020523	4,868177
26	225321_1	hsp90aa1	-1	NA	1,1E+00	HSP90AA1	NM_00045225321.1	445722	Hs.410968	BC009378	NA	NA	-3,19026	5,212261	-49,9405	1,48E-11	8,17E-07	15,19221	
27	2255630_1	RAB34	1	24069300	chr17:2406-	NA	RAB34	NM_01818255630.1	81871	Hs.301853	AF127350	17	THC248109	5,881112	7,214088	10,94356	3,03E-11	8,20E-07	14,93020
28	2256820_1	CDNA	1	24030948	chr12:2403-	NA	NA	1568020	NA	Hs.685334	BC065484	12	THC260571	4,376726	8,041634	10,70641	1,02E-10	1,23E-06	14,1354
29	220741_1	adenylinat	-1	NA	1,1E+00	ADCY7	NM_0011120741.1	113	Hs.132578	NM_00111NA	NA	NA	-4,18743	6,809255	-49,5952	1,23E-10	1,23E-06	14,10187	
30	220420_1	prosm1	1	15578955	GO:000561	PRDM1	NM_0061220420.1	8842	Hs.614734	NM_200601	4	THC248695	-4,47474	6,211781	-49,2962	1,23E-10	1,23E-06	14,07958	
31	220517_1	glutathionyl	-1	NA	1,1E+00	GPTC	NM_0124120517.1	25797	Hs.73033	NM_01241NA	NA	NA	5,423207	7,298307	46,98283	1,31E-10	1,23E-06	14,0449	
32	220532_1	scn5a	-1	NA	1,1E+00	SCN5A	NM_0002120532.1	1274	Hs.471133	NM_20062NA	NA	NA	-2,14078	6,498147	-46,3994	1,83E-10	1,31E-06	13,94784	
33	220640_1	patcd1	-1	NA	1,1E+00	PATC1	NM_0002820640.1	5030	Hs.501983	NM_20028NA	NA	NA	4,320412	7,48814	46,31794	2,05E-10	1,31E-06	13,80042	
34	220647_1	fibroglyc	-1	NA	1,1E+00	FGA	NM_0005020647.1	2247	Hs.351593	NM_20050NA	NA	NA	4,136919	10,43106	45,66428	2,31E-10	1,31E-06	13,75221	
35	220680_1	protein kin	1	29115440	chr14:2911-	NA	PRKDI	NM_0027420680.1	5583	Hs.506893	NM_00274	14	THC247192	-4,39304	4,732154	-40,5964	1,31E-10	1,31E-06	13,60379
36	220682_1	scn5a	1	83428426	GO:000561	SEMA2A	NM_0068220682.1	10371	Hs.252451	NM_200608	7	THC247713	-3,10209	4,557840	-44,3294	2,83E-10	1,31E-06	13,59646	
37	221097_1	defensin b1	-1	8715511	NA	DEFB1	NM_0052121097.1	3672	Hs.32949	U73845	8	THC247444	4,508511	7,538726	46,14723	2,83E-10	1,31E-06	13,57727	
38	221107_1	myo4	-1	NA	1,1E+00	MYO4	NM_0068121107.1	12062	Hs.7823	BC006473	NA	NA	-4,50576	5,906166	-40,0257	3,53E-10	1,31E-06	13,53376	
39	2211492_1	collage	1	46653043	GO:00150	COL1A1	NM_00184211492.1	1392	Hs.408182	X62643	12	THC248795	-3,89949	7,995185	-43,0121	3,54E-10	1,31E-06	13,45223	
40	221216_1	CDNA	1	78277314	NA	NA	215126	NA	Hs.20034	AL109716	15	THC260527	5,91918	6,660701	42,66413	3,79E-10	1,31E-06	13,41267	
41	221672_1	CDNA	1	1,12E+08	chr6:11209+	NA	CD24	NM_0123221672.1	934	Hs.644721	AK000168	6	THC254385	5,602823	7,246102	42,66413	3,82E-10	1,31E-06	13,40165
42	222051_1	protein kin	1	1,23E+08	chr6:12308+	NA	PRK	NM_0224722051.1	5570	Hs.486354	AF225513	6	NP314049	-3,45134	5,810434	-41,2109	4,98E-10	1,56E-06	13,29284
43	2228952_1	miel	1	1,2E+00	NA	NA	NM_52281228952.1	114669	Hs.201033	AL117612	9	THC248907	-4,00052	6,617407	-39,2392	6,38E-10	1,94E-06	12,89987	
44	224712_1	RAB34	1	24069300	chr17:2406-	NA	RAB34	NM_0181824712.1	81871	Hs.301853	AF122067	17	THC248514	5,517336	6,607811	39,15116	7,12E-10	1,94E-06	12,87815
45	225105_1	ovexonep	1	1,04E+08	chr12:1042+	NA	OVX1	NM_2073725105.1	38782	Hs.655184	BF080397	12	THC248102	1,631024	6,426267	38,90901	7,49E-10	1,94E-06	12,84566
46	228231_1	FRS1	1	14727214	NA	FRS1	NM_14496228231.1	158326	Hs.30850	AB24037	9	THC247425	-4,86418	5,11025	-37,9001	9,01E-10	2,15E-06	12,80735	
47	228793_1	patcd1	-1	31789434	chr11:3178-	NA	PATC1	NM_00028228793.1	5030	Hs.501993	AW080232	11	THC248296	-4,47042	4,858958	-37,8015	9,01E-10	2,15E-06	12,80379
48	230031_1	FRS1	1	14724673	NA	FRS1	NM_14496230031.1	158326	Hs.30850	AI27440	9	THC207043	4,151997	6,95069	16,15098	1,24E-09	2,79E-06	12,54811	
49	246_1	CDNA	1	38611914	NA	CD24	NM_01232246.1	934	Hs.644721	U13910	6	THC248572	4,021427	6,41468	36,14506	1,84E-09	2,79E-06	12,54954	
50	202788_1	scn5a	1	8715511	NA	SCN5A	NM_0002120788.1	1274	Hs.471133	NM_20062NA	NA	NA	5,297409	8,011253	42,88221	6,02E-10	1,23E-06	13,50794	
51	206281_1	interleukin1	-1	NA	1,1E+00	IL13	NM_00156206281.1	3605	Hs.43077	NM_00156NA									

Mikroarray deney sonuçlarımız, URG4'ün hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptozda rol alan bazı önemli gen ifadeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Geniş kapsamlı ve çoklu kontroller içeren biyoinformatik analiz sonucunda elde edilen verilerde; URG4 varlığında Siklin D1, member RAS oncogene family (RAB34), platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog) (PDGFB), heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) ifadelerinde artış saptanırken, protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB) RNA ifadelerinde azalma saptanmıştır.

3.9 URG4 geninin HepG2 hücrelerinde sessizleştirilmiş olduğu hücreler kullanılarak proteomiks “Kinex Antibody Microarray” deneylerinin yapılması:

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3+URG4 siRNA, HepG2-pcDNA3-URG4 hücre grupları KİNEXUS firması tarafından “Kinex Antibody Microarray” tekniği ile yaklaşık 800 adet proteinin (300 phospho-specific + 500 pan-specific antikor) ifadesine ve fosforilasyon durumunda oluşan olası farklılıkları değerlendirmek üzere analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 14 ve Şekil 19-22’de özetlenmiştir.

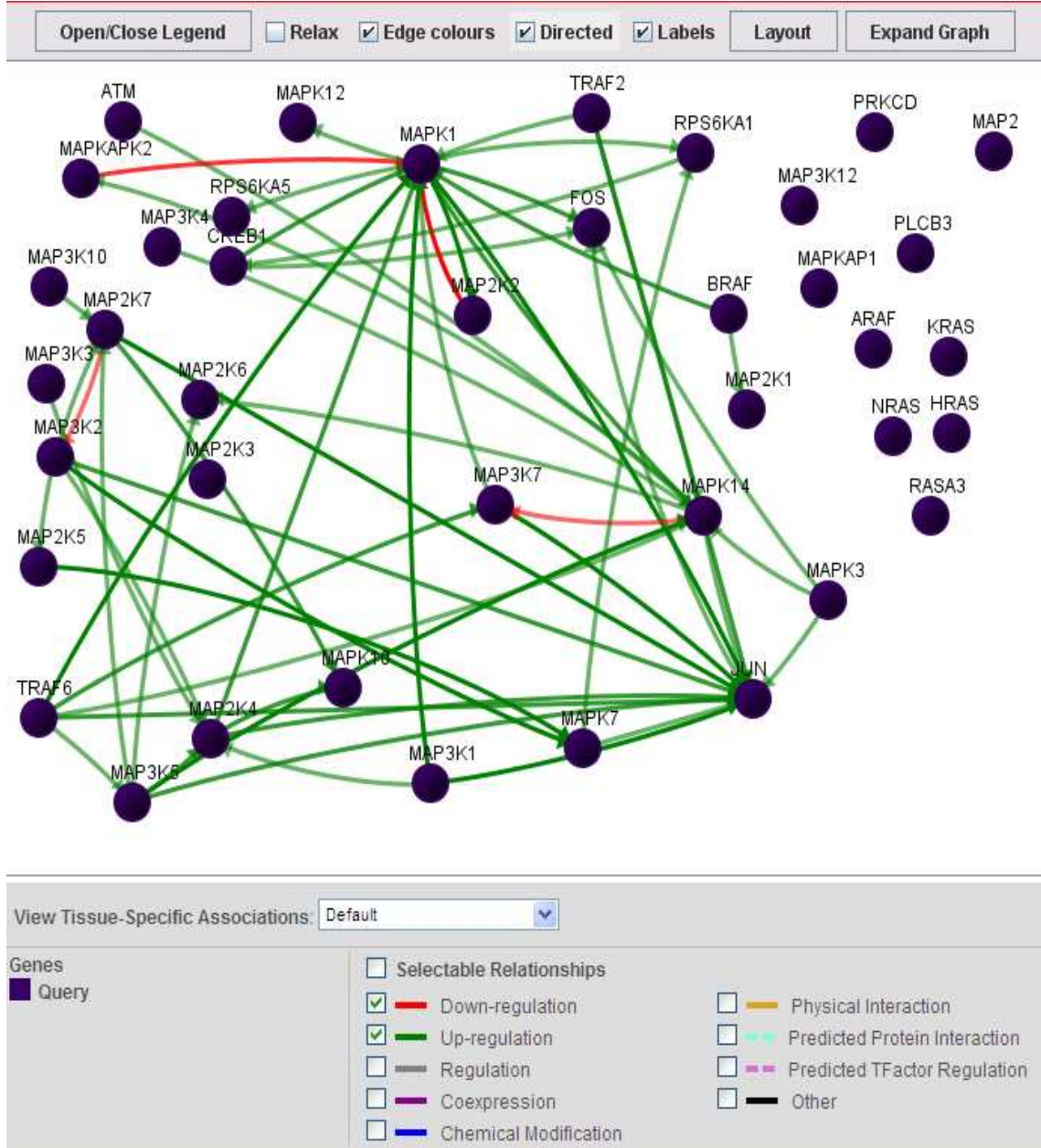
Tablo 14.

Antibody Microarray sonuçları: Raf/MAP kinaz yolağında rol alan önemli proteinlerden URG4 varlığında ekspresyonlarında ve/veya fosforilasyon durumlarında anlamlı artış tespit edilenler:

Gen Sembolü	Gen adı
A-RAF	Serine/threonine-protein kinase A-Raf
B-RAF	Serine/threonine-protein kinase B-Raf
Rab-5A	Ras-related protein Rab-5A
MAK	Serine/threonine-protein kinase MAK
MAPKAPK-1b	MAP kinase-activated protein kinase 1b
MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP2K4	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4
MAP2K6	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6
MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
MAPK7	Mitogen-activated protein kinase 7
MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7

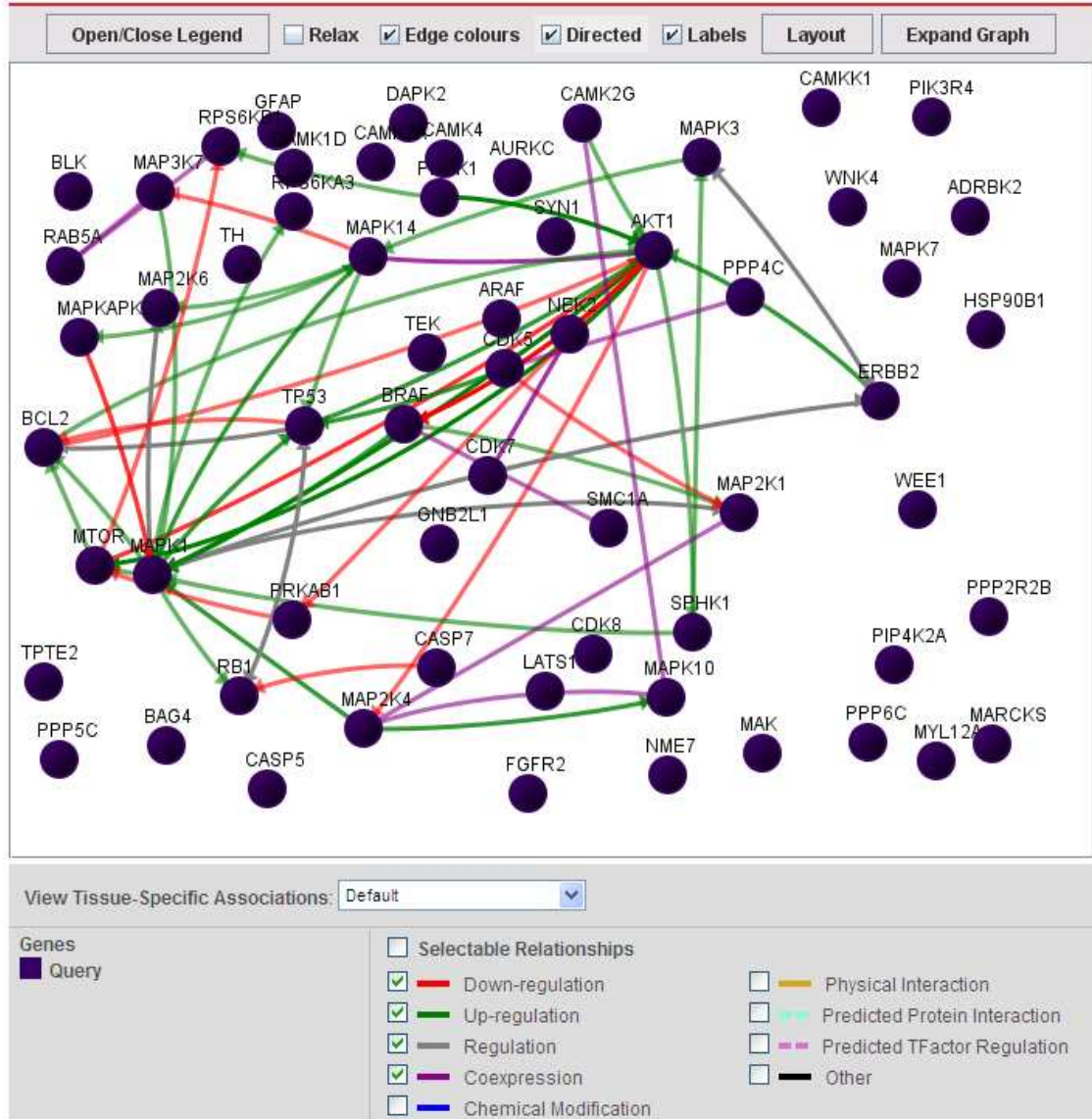
Şekil 19.

“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde artış veya azalış gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri:



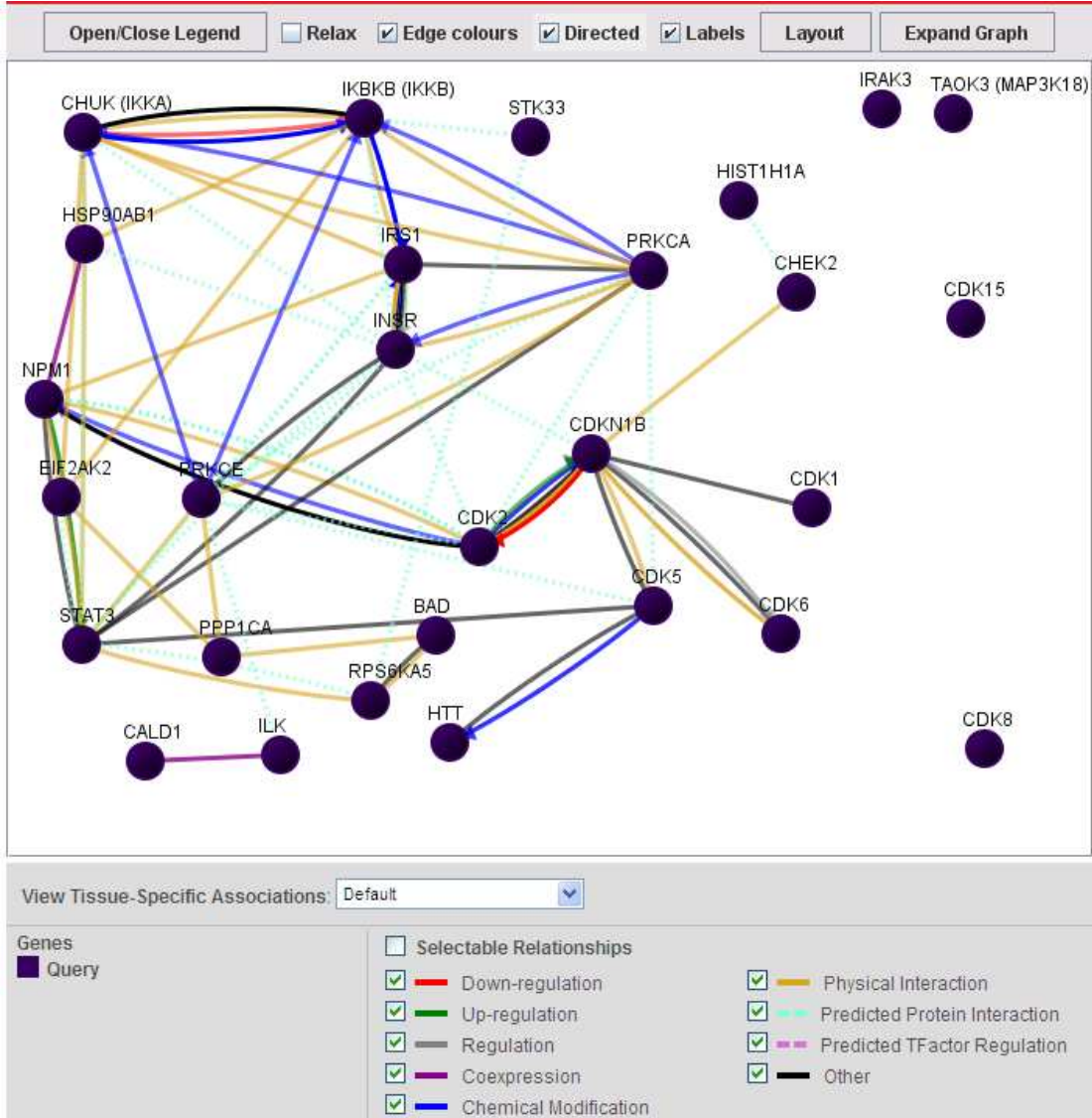
Şekil 20.

“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde artış gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri



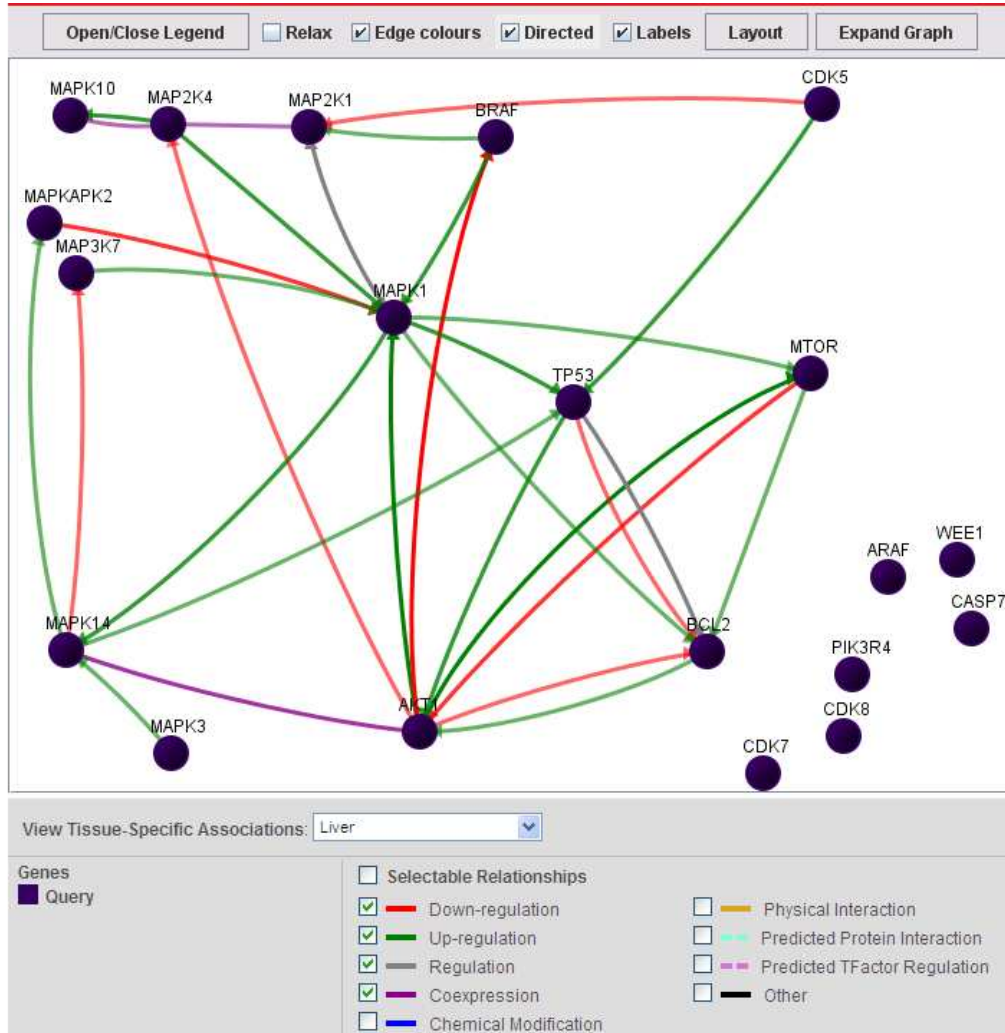
Şekil 21.

“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde azalma gözlemlenen proteinlerin etkileşimleri



Şekil 22.

“Kinex Antibody Microarray” deney sonuçlarında ifadesinde farklılık gözlemlenen MAPK yolağında rol alan proteinlerin etkileşimleri



Protein Antibody array deney sonuçlarımızda, URG4 varlığında Raf/MAP kinaz yolağında rol alan önemli proteinlerin ekspresyonlarında ve fosforilasyon durumlarında anlamlı artış tespit edilmiştir. Örneğin, A-RAF, B-RAF, Rab-5A, MAK, MAPKAPK-1b, MAP2K1, MAP2K4, MAP2K6, MAPKAPK2, MAPK1, MAPK3, MAPK7, MAPK10, MAPK14, MAP3K7. Raf/MAP kinaz yolağındaki bu proteinler; HCC gelişimindeki hücre proliferasyonu, apoptozun inhibisyonu, invazyon ve metastazın moleküler mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (Tablo 14, Şekil 19-22).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tamamlamış olduğumuz bu projemizde, HepG2 ve RNA interferans metodu kullanılarak URG4'ün onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizmasının araştırılması gerçekleştirilmiştir.

RNA interferans tekniği ile URG4'ün sessizleştirmesini sağladığımız HepG2-pcDNA3-siURG4 hücre dizinlerinde, HepG2-pcDNA3 kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda belirgin azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 9 ve 10).

Elde ettiğimiz bu sonuçlar, URG4'ün temel karakterizasyonunun yapıldığı proje sonuçlarımızı desteklemekte ve URG4'ün hücre döngüsünün ilerlemesinde etkili olabileceğini önemle göstermektedir.

Ayrıca, URG4'ü over-eksprese eden HepG2-pcDNA3-URG4 hücre dizinlerinde, hücre döngüsü G1'den S aşamasında geçişinde çok önemli fonksiyonu olan Siklin D1'in mRNA düzeyinde, HepG2-pcDNA3 kontrol grubuna göre belirgin artış olduğu saptanmıştır. RNA interferans tekniği ile URG4'ün sessizleştirmesini sağladığımız HepG2-pcDNA3-siURG4 hücre dizinlerinde bu artış gözlenmemektedir (Şekil 11).

Bu sonucumuz Song ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir [SONG J, 2006], ilgili araştırma makalesinde, URG4'ün fazla ekspresyonunun sağladıkları GES-1 mide kanseri hücrelerinde de Siklin D1 ifade artışı tespit etmişlerdir. Yazarlar elde ettikleri verilerle, URG4'ün mide kanseri gelişiminde Siklin D1 ifadesinin regülasyonunda etkili olabilecek potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini ifade etmektedirler. Bu veriler ışığında, URG4 varlığında ortaya çıkan Siklin D1 miktarındaki artış ile, hücre döngüsünün kontrol kaybı ve beraberinde gelişebilecek olan apoptoz dirençliliğinin, HCC gelişiminde etkili olabilecek önemli adımlardan olabileceğini düşünmekteyiz.

Mikroarray deney sonuçlarımız, URG4'ün hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptozda rol alan bazı önemli gen ifadeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Geniş kapsamlı ve çoklu kontroller içeren biyoinformatik analiz sonucunda elde edilen verilerde; URG4 varlığında Siklin D1, member RAS oncogene family (RAB34), platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog) (PDGFB), heparin-

binding EGF-like growth factor (HBEGF) ifadelerinde artış saptanırken, protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB) RNA ifadelerinde azalma saptanmıştır.

Protein Antibody array deney sonuçlarımızda, URG4 varlığında Raf/MAP kinaz yolağında rol alan önemli proteinlerin ekspresyonlarında ve fosforilasyon durumlarında anlamlı artış tespit edilmiştir. Örneğin, A-RAF, B-RAF, Rab-5A, MAK, MAPKAPK-1b, MAP2K1, MAP2K4, MAP2K6, MAPKAPK2, MAPK1, MAPK3, MAPK7, MAPK10, MAPK14, MAP3K7. (Basım aşamasında veri). Raf/MAP kinaz yolağındaki bu proteinler; HCC gelişimindeki hücre proliferasyonu, apoptozun inhibisyonu, invazyon ve metastazın moleküler mekanizmasında önemli rol oynamaktadır.

Bu deneyler sonucunda elde edilen yeni bilgiler, öncelikle insanlarda Hepatit B virüsü (HBV) X proteininin varlığında hepatoselüler kanser gelişimi ile sonuçlanan olayın bugüne kadar bilinmeyen kontrol mekanizmalarının açıklanmasına büyük katkı sağlama potansiyelindedir.

Disiplinler arası çalışmaların geniş kitlelere tanıtılması çerçevesinde birbiriyle ilişkili olan çok sayıda alanda bu çalışmanın etkisi görülebilecektir. Bu alanlar arasında moleküler genetik, moleküler patoloji, moleküler hücre biyolojisi ve mikrobiyoloji gibi bilim alanlarının yanı sıra onkoloji, enfeksiyon hastalıkları, diğer dahili bilimler ve genel cerrahi gibi klinik branşlar ile biyomedikal ve doku mühendisliği gibi biyolojik gelişmeleri teknolojik yenilikler haline getirmeye yarayan ve insanlığın yararına sunan bilim dalları da yer almaktadır.

Bu araştırma projesi ile ulaşılmaması planlanan son nokta öncelikle Hepatit B virüsü (HBV) X proteininin varlığında hepatoselüler kanser gelişimi sürecinde rol oynayan URG4 proteinine bağlı mekanizmaların keşfi ve bu mekanizmalardan yola çıkılarak hepatoselüler kanserde yeni tanı ve prognostik kriterlerin, tedavide yeni gelişmelerin ve olası genetik protokollerin önünün açılmasıdır. Unutulmamalıdır ki, URG4 gibi yeni onkogenlerin keşfi ve etki mekanizmalarının aydınlatılması sadece hepatoselüler kanserde değil diğer kanserler türlerinde de tanı, tedavi ve prognoz değerlendirilmesinde önemli rol oynayacak potansiyele sahiptir.

6. REFERANSLAR

ARBUTHNOT P., Kew M., Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma, *Int J Exp Pathol*, 82, 77-100, (2001).

BEASLEY R.P., Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 61, 1942-1956, (1988).

BEASLEY R.P., Hwang L.Y., Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. GN Vyas, JL Dienstag, and JH Hoofnagle, Eds. Grune & Stratton, Inc., New York. (1984). pp. 209-224.

BENJAMINI Y., Yekutieli, Daniel "The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency". *Annals of Statistics* 29 (4): 1165–1188, (2001).

BENN J., Schneider R.J., HBV X protein activates ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10350-10354, (1994).

BENN J., Schneider R.J., Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11215-11219, (1995).

CASELMANN W.H., Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis, *J Hepatol*, 22, 34-37, (1995).

CHEN C.J., Yu M.W., Liaw Y.F., Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma, *J Gastroenterol Hepatol*, 12, 294-308, (1997).

CHEONG J.H., Yi M., Lin Y., Murakami S., Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation, *EMBO J*, 14, 142-150, (1995).

COGONI C., Macino G., Post-transcriptional gene silencing across kingdoms, *Genes Dev*, 10, 638-643, (2000).

DIAMANTIS I.D., McGandy C.E., Chen T.J., Liaw Y.F., Gudat F., Bianchi L., Hepatitis B X gene expression in hepatocellular carcinoma, *J Hepatol*, 15, 400-403, (1992).

ELBASHIR S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411, 494-498, (2001).

ELMORE L.W., Hancock A.R., Chang S.F., Wang X.W., Chang S., Callahan C.P., Geller D.A., Will H., Harris C.C. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 14707-14712, (1997).

FEITELSON M.A., Duan L.X., Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma, *Am J Pathol*, 150, 1141-1157, (1997).

FEITELSON M.A., Lega L., Duan L.X., Clayton M., Characteristics of woodchuck hepatitis X antigen in the livers and sera from chronically infected animals, *J Hepatol*, 17, S24-S34, (1993).

FEITELSON M.A., Zhu M., Duan L.X., London W.T., Hepatitis B x antigen and p53 are associated *in vitro* and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma, *Oncogene*, 8, 1109-1117, (1993).

FEITELSON, M.A., Reis, H., Pan, J., Lian, Z., Fang, J., Liu, J., Zhu, X., Zhu, M., Sun, B., Abrogation of negative growth regulatory pathways by hepatitis B virus encoded X antigen in the development of hepatocellular carcinoma, In *Normal and Malignant Liver Cell Growth: FALK Workshop*. WE Fleig, Ed. Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK, (1999), pp.156-170.

GOTTLOB K., Fulco M., Levrero M., Graessmann A., The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity, *J Biol Chem*, 273, 33347-33353, (1998).

GURU T., A silence that speaks volumes, *Nature*, 404, 804-808, (2000).

HAMMOND S.M., Caudy A.A., Hannon G.J., Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA, *Nature Rev Gen*, 2, 110-119, (2001).

HAVIV I., Vaizel D., Shaul Y., pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner, *EMBO J*, 15, 3413-3420, (1996).

HAVIV I., Vaizel D., Shaul Y., The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains, *Mol Cell Biol*, 15, 1079-1085, (1995).

HENKLER F., Koshy R., Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis, *J Viral Hepat*, 3, 109-121, (1996).

HOHNE M., Schaefer S., Seifer M., Feitelson M.A., Paul D., Gerlich W.H., Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA, *EMBO J*, 9, 1137-1145, (1990).

HUANG J, Zhu B, Lu L, Lian Z, Wang Y, Yang X, Satiroglu-Tufan NL, Liu J, Luo Z. The expression of novel gene URG4 in osteosarcoma: correlation with patients' prognosis. *Pathology*, 41(2):149-54, (2009).

KATAYAMA K., Hayashi N., Sasaki Y., Kasahara A., Ueda K., Fusamoto H., Sato N., Chisaka O., Matsubara K., Kamada T., Detection of hepatitis B virus X gene protein and antibody in type B chronic liver disease, *Gastroenterology*, 97, 990-998, (1989).

KIM H., Lee H., Yun Y., X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells, *J Biol Chem*, 273, 381-385, (1998).

KOIKE K., Moriya K., Iino S., Yotsuyanagi H., Endo Y., Miyamura T., Kurokawa K., High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice, *Hepatology*, 19, 810-819, (1994).

LEE T.H., Elledge S.J., Butel J.S., Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein, *J Virol*, 69, 1107-1114, (1995).

LEE Y.H., Yun Y., HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling, *J Biol Chem*, 273, 25510-25515, (1998).

LIAN Z., Pan J., Liu J., Zhu M., Arbuthnot P., Kew M.C., Feitelson M.A., The translation initiation factor, SUI1, may be a target of hepatitis B x antigen in hepatocarcinogenesis, *Oncogene*, 18, 1677-1687, (1999).

LUBER B., Arnold N., Sturzl M., Hohne M., Schirmacher P., Lauer U., Wienberg J., Hofschneider P.H., Kekule A.S., Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation *in vitro*, *Oncogene*, 12, 1597-1608, (1996).

LUCITO R., Schneider R.J., Hepatitis B virus protein activates transcription factor NF- κ B without a requirement for protein kinase C, *J Virol*, 66, 983-991, (1992).

MAGUIRE H.F., Hoeffler J.P., Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions, *Science*, 252, 842-844, (1991).

MATSUBARA K., Tokino T., Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis, *Mol Biol Med*, 7, 243-260, (1990).

NATOLI G., Avantiaggiati M.L., Chirillo P., Costanzo A., Artini M., Balsano C., Levrero M., Induction of the DNA binding activity of c-Jun/c-Fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX, *Mol Cell Biol*, 14, 989-998, (1994).

PADDISON P.J., Caudy A., Hannon G.J., Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1443-1448, (2002).

PATERLINI P., Poussin K., Kew M., Franco D., Brechot C., Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 21, 313-321, (1995).

QADRI K., Maguire H.F., Siddiqui A., Hepatitis B virus *trans*-activator protein X interacts with the TATA-binding protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 1003-1007, (1995).

ROSSNER M.T., Hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator, *J Med Virol*, 36, 101-117, (1992).

SAEED AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. TM4 microarray software suite. . *Methods in Enzymology*. 411:134-93 (2006).

SATIROGLU-TUFAN N.L., et al., Hepatitis B x Antigen Stimulates Expression of a Novel Cellular Gene, URG4, that Promotes Hepatocellular Growth and Survival, *Neoplasia*, 4(4):355-68, (2002).

SATIROGLU-TUFAN N.L., Y. Dodurga, D. Gok, A. Cetinkaya, M.A. Feitelson. RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. *Genetics and Molecular Research*, 9(3):1557-67, (2010).

SIRMA, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsforf, D., Brechot, C., Genetic and functional analysis of the effects of hepatitis B viral transactivator HBx on cell growth and apoptosis: implications for viral replication and hepatocarcinogenesis, In *Normal and Malignant Liver Cell Growth: FALK Workshop*. WE Fleig, Ed. Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK, pp. 171-186, (1999).

SMYTH GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, No. 1:3, (2004).

SONG J, Xie H, Lian Z, Yang G, Du R, Du Y, Zou X, Jin H, Gao J, Liu J, Fan D. Enhanced cell survival of gastric cancer cells by a novel gene URG4. *Neoplasia*. 8(12):995-1002, (2006).

SUN B.S., Zhu X., Clayton M.M., Pan J., Feitelson M.A., Identification and preliminary characterization of a protein involved in cellular senescence which binds to hepatitis B virus X antigen, *Hepatology*, 27, 228-239, (1998).

UEDA H., Ullrich S.J., Gangemi J.D., Kappel C.A., Ngo L., Feitelson M.A., Jay G., Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer, *Nat Genet*, 9, 41-47, (1995).

VITVITSKI, L., Meyers, M.L., Sninsky, J.J., Berthillon, P., Chevalier, P., Sells, M.A., Acs, G., Trepo, C., Expression of the X gene product of hepatitis B virus and WHV in infected livers and transfected 3T3 cells: Evidence for cross-reactivity and correlation with core/e gene expression. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. AJ Zuckerman, Ed. Alan R. Liss, Inc., New York, (1988), pp. 341-344.

WANG W., London W.T., Feitelson M.A., Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer, *Cancer Res*, 51, 4971-4977, (1991).

WANG W., London W.T., Lega L., Feitelson M.A., Hepatitis B x antigen in liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis, *Hepatology*, 14, 29-37, (1991a).

WANG X.W., Forrester K., Yeh H., Feitelson M.A., Gu J., Harris C.C., Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity and association with ERCC3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2230-2234, (1994).

YANG S., Tutton S., Pierce E., Yoon K., Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells, *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7807-7816, (2001).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 104S259
Proje Başlığı: Hepatit B Virüsü X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen ve özgün-yeni bir gen olan "Up-Regulated-Gene-4" (URG4)'ün RNA interferans yöntemi kullanılarak gen sessizleştirilmesi sonrasında, onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizmasının mikroarray ve protein western array yöntemleri ile araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. N. Lale Şatıroğlu-Tufan Dr.Yavuz Dodurga Prof. Dr. Mark A. Feitelson
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Denizli
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, SBAG, Tunus Cad. No: 80, Kavaklıdere-ANKARA.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.11.2005 - 1.03.2011
Öz Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen "URG4" tanımlanmıştır. URG4'ün HepG2 hücre dizinine over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu ve hayatiyeti arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu uyardığı ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Yeni tamamladığımız bu projemizde, HepG2 ve RNA interferans metodu kullanılarak URG4'ün onkogenik fonksiyonunun ve moleküler etki mekanizması araştırılmıştır. Mikroarray ve protein array deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlar, URG4'ün hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptozda, invazyon ve metastazda rol alan yollardaki bazı önemli gen ifadeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.
Anahtar Kelimeler: URG4, Hepatoselüler kanser
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: <u>Ulusal Toplantılarda Yayınlanmış Bildiriler</u> <ul style="list-style-type: none">N. Lale Şatıroğlu-Tufan. Özgün-yeni bir gen olan URG4'ün RNA interferans yöntemi ile sessizleştirilmesi sonrasında HepG2 hücre proliferasyonuna etkisi. II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 24-27 Şubat 2008, Bursa-Uludağ. (Poster 3.'lük ödülü kazanılmıştır) <u>Science Citation Index Kapsamındaki Bilimsel Dergilerde Yayınlanmış Makaleler</u> <ul style="list-style-type: none">SATIROGLU-TUFAN N.L., Y. Dodurga, D. Gok, A. Cetinkaya, M.A. Feitelson. RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. Genetics and Molecular Research, 9(3):1557-67, (2010). <u>Uluslararası Toplantılarda Yayınlanmış Bildiriler</u> <ul style="list-style-type: none">N.Lale Satiroglu-Tufan, Yavuz Dodurga. Microarray Analyses of Differential Gene Expression in RNA Interference-Mediated URG4 Gene Silenced HepG2 Cells. 15th Human Genome Meeting- HUGO 14-17 Mart 2011 Dubai-Birleşik Arap Emirlikleri. (Human Genome Organization (HUGO) Young Investigator Award kazanılmıştır).