



Uzun Kodlamayan RNA NORAD'ın Mitomisin C İlişkili Kemorezistansta Olası Rolü

The Possible Role of the Long Non-coding RNA NORAD in Mitomycin C-Related Chemoresistance

İbrahim BOZGEYİK

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

ÖZ

Amaç: Non-coding RNA activated by DNA damage (NORAD), deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarı cevabı sırasında aktive olan bir uzun kodlamayan ribonükleik asittir (RNA). Çalışmalar, NORAD'ın insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiğini ve ilaca bağlı kemorezistans ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, mitomisin C ile ilişkili kemorezistans ve mitomisin C ile indüklenen DNA hasar yanıtı sırasında spesifik olarak aktive edilen bir uzun kodlamayan RNA NORAD'ın olası rolünü araştırmayı amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Hücre kültürü deneylerinde MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanıldı. Mitomisin C'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT hücre canlılığı testi kullanıldı ve uygulama dozu buna göre belirlendi. NORAD gen ekspresyon düzeylerinin analizi için kantitatif qPCR yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Mitomisin C'nin meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığını doza bağlı olarak baskıladığı ve yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonunun 1,12 µg/mL olduğu belirlendi ($p<0,0001$). Özellikle, mitomisin C ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde NORAD'ın önemli bir farklı aktivasyonu belirlendi ($p<0,0001$).

Sonuç: Burada elde edilen bulgular, mitomisin C ile ilişkili kemorezistans ve mitomisin C ile indüklenen DNA hasar yanıtında NORAD'ın olası rolünün olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasarı, meme kanseri, mitomisin C, lncRNA, NORAD

ABSTRACT

Aim: Non-coding ribonucleic acid (RNA) activated by deoxyribonucleic acid (DNA) damage (NORAD) is a long non-coding RNA activated during DNA damage response. Accumulating evidence suggest that NORAD is overexpressed in human cancers and associated with the drug-induced chemoresistance. The present study aims to explore the possible role of long non-coding RNA NORAD during mitomycin C-related chemoresistance and mitomycin C-induced DNA damage response.

Materials and Methods: In cell culture experiments, MDA-MB-231 breast cancer cells were used. MTT cell viability assay was used to determine the effects of mitomycin C on breast cancer cells and application dose was determined accordingly. For analysis of NORAD gene expression levels, quantitative real-time polymerase chain reaction method was used.

Results: Mitomycin C was found to suppress cell viability of breast cancer cells in a dose-dependent manner and half-maximal inhibitory concentration was determined as 1.12 µg/mL ($p<0.0001$). Notably, significant differential activation of NORAD was determined in breast cancer cells treated with the mitomycin C ($p<0.0001$).

Conclusion: Findings obtained here strongly suggest that NORAD is possibly involved in mitomycin C-related chemoresistance and mitomycin C-induced DNA damage response.

Keywords: DNA damage, breast cancer, mitomycin C, lncRNA, NORAD

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. İbrahim BOZGEYİK, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

Tel.: +90 530 342 15 01 **E-posta:** ibozgeyik@adiyaman.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-1483-2580

Geliş tarihi/Received: 01.02.2022 **Kabul tarihi/Accepted:** 31.03.2022

GİRİŞ

İnsan genomu yüzlerce uzun kodlamayan ribonükleik asidi (RNA) (lncRNA'lar) barındırır da, farklı biyolojik aktivitelere ve biyokimyasal özelliklere sahip olan sadece yaklaşık bir düzine tanımlanmıştır. DNA hasarına yanıt olarak uyarılan belirli bir lncRNA transkripti olan, DNA hasarıyla aktive edilen kodlamayan RNA'nın (NORAD, eski adıyla LINC00657) genom bütünlüğünün korunması için gerekli olduğu bildirilmiştir¹. NORAD'ın silinmesi kromozomal instabiliteye ve anöploidiye yol açar². NORAD, çeşitli insan hücre dizilerinde ve dokularında bol miktarda eksprese edilir. Memelilerdeki diğer lncRNA'larla karşılaştırıldığında, NORAD yüksek oranda korunmuştur^{2,3}. NORAD'ın DNA replikasyonu ve onarım mekanizmalarını düzenleyen ve DNA hasarı veya replikasyon stresi ile uyarıldığında çekirdeğe yer değiştiren proteinlerle etkileşime girdiği keşfedilmiştir^{2,3}. NORAD, bir DNA hasarı tepki bileşeni olan RBMX ile etkileşime girer ve RBMX'in NORAD ile aktive olan ribonükleoprotein kompleks 1'de birleşmesini önler. Deplete edilmiş NORAD veya RBMX hücreler, daha yüksek kromozomal segregasyon anormallikleri, daha yavaş replikasyon çatal hızı ve hücre döngüsü progresyonu deregülasyonu insidansı sergilemişlerdir². Ayrıca, çalışmalar NORAD'ın meme, yumurtalık, servikal, gastric, kolorektal, mesane, pankreas, hepatoselüler, özofagus, prostat, akciğer, tiroid, retinoblastom ve nöroblastom kanserlerinde deregüle olduğunu göstermektedir⁴. Spesifik olarak, NORAD'ın aşırı ekspresyonu, kanserli hücrelerin proliferasyonunu, invazyonu ve metastazını uyarır ve apoptozu önler⁴. Ek olarak, birkaç kanıt dizisi, NORAD'ın doksorubisin, gemsitabin ve 5-florourasil gibi şu anda mevcut kemoterapötik ajanlara karşı kemorezistans ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Nöroblastomda, NORAD ekspresyonunun artmasının proliferasyon, metastaz ve doksorubisin direncini arttırdığı ve miR-144-3p sponging yoluyla HDAC8 ekspresyonunu indükleyerek nöroblastom hücrelerinin apoptotik ölümüne müdahale ettiği gösterilmiştir⁵. Ayrıca, NORAD'ın, miR-155-5p sponging yoluyla WEE1 ekspresyonunu düzenleyerek mesane kanserinde gemsitabin kemorezistansına aracılık etmek için rakip bir endojen RNA (ceRNA) olarak hareket ettiği bildirilmiştir⁶. Ayrıca, NORAD'ın diferansiyel aktivasyonunun, kolorektal kanserde miR-495-3p/HIF-1 α ekspresyonunu sponging yoluyla ceRNA gibi davranarak hipoksi sırasında 5-florourasil kemorezistans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷.

Mitomycin C, Streptomyces Caespitosus ve diğer Streptomyces türlerinden elde edilen, doğal olarak oluşan bir antikanser antibiyotik maddesidir. Mitomisin C, 1950'lerde Japon mikrobiyologlar tarafından keşfedildi. Mitomisin C, DNA ile reaksiyona girdiği bilinen birkaç antibiyotikten biridir⁸. Tek işlevli ve çift işlevli DNA çapraz bağlarını tanıtarak DNA hasarına neden olur. Bir ön ilaç olarak, mitomisin C'nin kendisi inaktif halde kalır ve DNA ile reaksiyona girmez ve biyoaktivasyon

gerektirir⁹. Mitomisin C'yi oldukça reaktif, kararsız bir alkilleyici türe dönüştüren kinon halkasının redaksiyonu, DNA çapraz bağlama ve alkilleme aktiviteleri için gereklidir¹⁰. Mitomisin C, DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini baskılama yeteneğinden dolayı birçok insan malignitesinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Göğüs kanseri, rahim ağzı kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri, prostat kanseri ve mesane kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde etkili bir antitümör ajanı olduğu gösterilmiştir. Mitomisin C, hipoksik koşullar altında yüksek biyo-indirgeyici alkilasyonu ile karakterizedir. Katı tümörlerin içinde oksijenden yoksun hücreler mitomisin C'nin oldukça aktif olduğu bir ortam oluşturur¹¹.

Mitomisin C'nin biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin altında yatan moleküler mekanizma iyi tanımlanmış olmasına rağmen, DNA hasar yanıtı sırasında aktive olan kodlamayan RNA'lar üzerindeki etkisi henüz tanımlanmamıştır. Buna göre, bu çalışmada, mitomisin C ile ilişkili kemorezistans ve mitomisin C ile indüklenen DNA hasar yanıtı sırasında DNA hasar yanıtında spesifik olarak aktive olan bir lncRNA olan NORAD'ın olası rolünü araştırmaya çalıştık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Hatları, Kültür Koşulları ve Kimyasallar

Çalışma için, ATCC'den HTB-26 (MDA-MB-231) üçlü negatif meme adenokarsinom hücreleri elde edildi ve %1 penisilin/streptomisin ve %10 fetal buzağı serumu solüsyonu (Cat. No.: A4766801, Sigma-Aldrich) ile tamamlanan DMEM mediyumu (Cat. No.: D6429, Sigma-Aldrich) kullanılarak çoğaltıldı. Hücre kültürleri, 37 °C'de nemlendirilmiş karbon dioksit inkübatöründe tutuldu. Streptomyces Caespitosus'tan izole edilen mitomisin C, ticari olarak Sigma-Aldrich'ten elde edildi (Cat. No.: M4287). 200 ug/mL'lik bir stok solüsyonu elde etmek için 2 mg mitomisin C 10 mL ddH₂O içinde süspanse edildi.

MTT Analizi

Hücreler, 96 oyuklu plakalarda 3x10⁴ hücre/mL konsantrasyonunda tohumlandı ve hücre canlılığını belirlemek için gece boyunca inkübe edildi. Gece boyunca inkübasyonun ardından hücreler, 0,125 ila 2 µg/mL arasında değişen çeşitli mitomisin C konsantrasyonları ile işleme tabi tutuldu ve 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra süpernatantlar ekarte edildi ve hücreler birkaç kez 1 X PBS çözeltisi ile yıkandı ve ardından 1 mg/mL MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolyum bromür) çözeltisi ile 37 °C'de 40-60 dakika inkübe edildi.

Gen Ekspresyon Analizi

Mitomisin C'nin NORAD ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmak için hücreler 12 kuyulu kültür kaplarına yerleştirildi ve bağlanmaya izin vermek için gece boyunca

inkübe edildi. Daha sonra hücreler mitomisin C ile muamele edildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler ardından Trypsin-EDTA çözeltisi kullanılarak toplandı ve üretici tavsiyelerine göre GeneJET RNA Purifikasyon Kiti (Cat. No.: K0702, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak RNA purifikasyonu yapıldı. Thermo Scientific Multiskan GO cihazı yardımıyla RNA kalitesi ve konsantrasyonları belirlendi. RNA örneklerinin cDNA örneklerine ters transkripsiyonu için RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Cat. No.: FERK1622, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanıldı. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve NORAD'a özgü gen ekspresyonu PCR primerleri, NCBI primer blast yardımıyla tasarlandı. GAPDH için primer çiftleri Forward: 5'-AGACCACAGTCCATGCCATCAC-3', Reverse: 5'-GGTCCACCACCCTGTTGCTGT-3' ve NORAD için primer çiftleri Forward: 5'-CAGAGGAGGTATGCAGGGAG-3', Reverse: 5'-CCACCATCCGTGACTAAG-3' idi. Son olarak, NORAD ve GAPDH genlerinin gen ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için RealQ Plus 2x Master Mix Green (Cat. No.: A323402, Ampliqon) kullanıldı ve reaksiyonları gerçekleştirmek için Rotor-Gene Q real-time PCR cihazı kullanıldı. Kısaca, 12,5 µl RealQ Plus 2x Ana Karışım, her bir primerden (10 µM) 0,5 µl, 2 µl cDNA ve 9,5 µl PCR-grade H₂O karıştırıldı ve aşağıdaki termal koşullara tabi tutuldu; 95 °C'de 15 dakika, 94 °C'de 15 saniyelik 40 döngü, 60 °C'de 30 saniye ve 70 °C'de 30 saniye. Her reaksiyon sonunda 72 °C ile 95 °C arasında bir erime eğrisi analizi yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Göreceli gen ekspresyon seviyelerinin hesaplanması için 2^{-ΔCT} formülü kullanıldı. GAPDH, hesaplamalar için referans gen olarak kullanıldı. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel incelemesi GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak yapıldı ve 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak

kabul edildi. İki bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalar için Student's t-testi, ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar için varyans analizi kullanıldı.

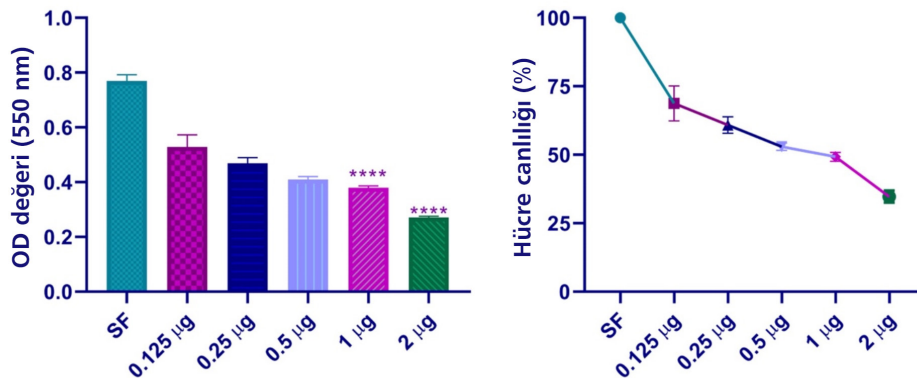
BULGULAR

Mitomisin C Tedavilerinde Hücrelerin Canlılığı

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), şu anda etkili bir tedavisi olmayan agresif bir meme kanseri alt tipidir. Meme kanserinde mitomisin C ile ilişkili kemorezistansı araştırmak için MDA-MB-231 TNBC kullanıldı. Buna göre, mitomisin C'nin meme kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için MTT tahlili kullanıldı ve hücreler, değişen konsantrasyonlarda mitomisin C ile tedavi edildi. Dikkat çekici bir şekilde, meme kanseri hücrelerinin canlılığının doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı bulundu (Şekil 1). Mitomisin C'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine karşı yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) 1,12 µg/mL olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,125 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL ve 2 µg/mL mitomisin C ile 24 saat boyunca tedavi sonucunda sırasıyla %68,72, %60,86, %53,20, %49,27, ve %35,20 hücre canlılığı gözlemlendi (Şekil 1). Mitomisin C'nin 1 µg/mL (p<0,0001) ve 2 µg/mL (p<0,0001) dozlarında, tedavi edilmeyen grupla karşılaştırıldığında, hücre canlılığının anlamlı inhibisyonu gözlemlendi.

Mitomisin C Tedavilerinde NORAD'ın Diferansiyel Aktivasyonu

Mitomisin C'nin NORAD lncRNA'nın ekspresyonu üzerindeki etkisini daha fazla test etmek için meme kanseri hücrelerinde mitomisin C tedavileri üzerine gen ekspresyonu analizi yaptık. Özellikle, 1 µg/mL ve 2 µg/mL mitomisin C ile tedavi edilen hücrelerde NORAD ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde



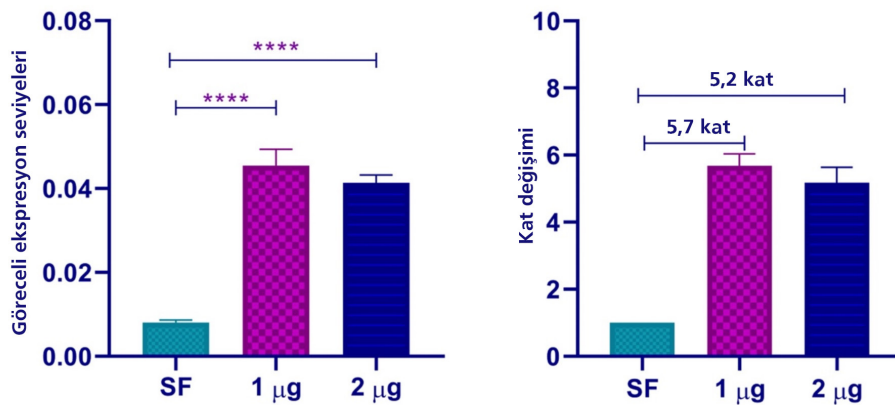
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda mitomisin C ile muamele edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığının doza bağlı inhibisyonu

arttığı belirlendi ($p<0,0001$). Kat değişimi analizi, 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 2 $\mu\text{g/mL}$ mitomisin C ile tedavi edilen hücrelerde NORAD ekspresyonunun sırasıyla 5,7 kat ve 5,2 kat arttığını ortaya koydu (Şekil 2), bu da mitomisin C ile tedavinin NORAD lncRNA'yı içeren DNA hasar tepkisini indüklediği göstermektedir.

TARTIŞMA

Kanser tedavisinin temel amacı, tümör hücrelerinin cerrahi olarak çıkarılması veya radyasyon veya kemoterapi ile yok edilmesidir. Bu nedenle, ilaca bağlı genetik değişiklikleri ve kemorezistansı anlamak, kanser kemoterapisinde hasta sonuçlarını iyileştirmek için büyük önem taşımaktadır. Kanser kemoterapisinin zayıf başarısı genellikle yan etkilerden ve kemoterapötik ajanlara dirençten kaynaklanmaktadır¹². Malign transformasyonu önlemek için mutasyonların ve DNA lezyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla optimal bir DNA onarımı seviyesinin gerekli olduğuna dair artan kanıtlar vardır¹². Böylece DNA onarım fonksiyonu kanser tedavisinde iki ucu keskin bir kılıç olarak karşımıza çıkmaktadır. Düşük düzeyde DNA onarım aktivitesi, kanser hücrelerini kemo-aracılı ölüme duyarlı hale getirirken, aynı zamanda ikinci bir birincil tümörün gelişmesine de izin vermektedir¹². Buna karşılık, DNA onarım işlevlerinin aşırı aktivitesi, kanserin ilerlemesini destekler. DNA hasar yanıtı ve onarım mekanizmaları ile genom bütünlüğünün korunması, genomik stabiliteyi sağlar ve kromozom sayısını sabit tutar. Ayrıca, lncRNA NORAD, DNA hasarına yanıt olarak tetiklenen, kodlamayan spesifik bir RNA molekülüdür. Daha yakın zamanlarda, NORAD'ın, DNA replikasyonu ve onarım mekanizmasının proteinleri ile etkileşime girdiği ve stres koşulları durumunda çekirdeğe göç ettiği gösterilmiştir. NORAD'ın ayrıca, genom stabilitesinin korunması için kritik

olan NARC1 adı verilen bir topoizomerez kompleksinin oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir. NORAD'ın ayrıca genom bütünlüğünü korumak için PUMILIO proteinlerini ayrı tuttuğu da gösterilmiştir^{1,13,14}. NORAD, genomik stabilite için önemli olmasına rağmen, insan kanserlerinde çok önemli bir onkojenik sürücü olarak bildirilmiştir. NORAD'ın yüksek aktivitesi, artan hücre proliferasyonu ve insan kanserlerinin agresifliği ile ilişkilendirilmiştir. NORAD'ın, komşu sağlıklı dokuya kıyasla mide kanseri dokusunda belirgin şekilde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir. NORAD ekspresyonunun inhibisyonu, hücre canlılığını ve göçünü azalttığı ve E-cadherin Bax ve PTEN ekspresyonunu indükleyerek ve Bcl-2 proteinlerini aşağı regüle ederek mide kanseri hücrelerinin apoptotik ölümünü desteklediği bulunmuştur¹⁵. NORAD'ın ayrıca oral skuamöz hücreli karsinom dokularında ve hücre dizilerinde aşırı eksprese edildiği belirlenmiş ve miR-577 sponging yoluyla oral skuamöz hücreli karsinomun ilerlemesini arttırmak için bir tümör promotörü olarak işlev gördüğü ifade edilmiştir¹⁶. Benzer şekilde, tiroid karsinomu hastalarının kanserli dokularında NORAD'ın daha yüksek ekspresyonu bulunmuş ve NORAD'ın ektopik aşırı ekspresyonu artan hücre proliferasyonu, invazyonu ve göçünde artış ile ilişkilendirilmiş ve miR-202-5p'yi inhibe ederek epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) aktive etmiştir¹⁷. NORAD'ın yıkılmasının, miR-26a-5p'yi düzenleyerek baş ve boyun kanseri kök hücrelerinin EMT'sinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu da keşfedilmiştir¹⁸. NORAD'ın önemli aşırı ekspresyonu osteosarkom tümörlerinde de bulundu ve hastaların tümör boyutu, derecesi ve metastazı gibi klinik ve patolojik bulguları ile ilişkilendirildi¹⁹. Sınırlı olmasına rağmen, NORAD ile belirli kemoterapötik ajan tiplerine direnç arasında bir ilişki de gösterilmiştir. Özellikle NORAD, miR-155-5p aktivitesini



Şekil 2. Mitomisin C muamelesinin NORAD ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. NORAD'ın mitomisin C tedavilerine yanıt olarak farklı şekilde aktive olduğu belirlendi

NORAD: Non-coding RNA activated by DNA damage

inhibe eden rekabetçi bir endojen RNA olarak hareket ederek mesane kanserinde gempitabin direncine bağlanmıştır. NORAD'ın gempitabine dirençli mesane kanseri hücrelerinde susturulması, proliferasyonu ve hücre döngüsü progresyonunu bozmakta ve miR-155-5p/WEE1 ekseninin regülasyonu yoluyla apoptozu indüklemektedir⁶. Ek olarak, NORAD'ın kolorektal kanserde hipoksi ile indüklenen 5-florourasil kemorezistans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷. Tüm bu gözlemlerle tutarlı olarak, bu çalışmada meme kanseri hücrelerinde mitomisin C tedavisine yanıt olarak NORAD'ın önemli ölçüde aktive olduğu gösterilmiştir, bu da NORAD'ın organizma düzeyinde mitomisin C direnci ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. Mitomisin C kemoterapisi ile kombinasyon halinde olarak NORAD inhibitör tedavisi, TNBC için iyi bir tedavi yöntemi olabilir. Genel olarak, güçlü tümör teşvik edici işlev ve belirli ilaçlara karşı kemorezistans ile olan ilişki, NORAD'ın aynı zamanda mitomisin C'ye karşı kemorezistanstaki rolünü desteklemektedir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışma, NORAD'ın mitomisin C ile ilişkili kemorezistans ve mitomisin C ile indüklenen DNA hasar yanıtındaki rolünü başarıyla değerlendirirken, bazı sınırlamalar vardı. Yapılacak olan çalışmalarda, mitomisin tedavileri ile birlikte NORAD'ın fonksiyon kazanımı ve fonksiyon kaybı deneyleri, NORAD'ın DNA hasar yanıtı ve onarımındaki rolünü daha iyi anlamak için ilgi gerektirir.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada lncRNA NORAD'ın TNBC hücrelerinde mitomisin C tedavilerine yanıt olarak aktive edildiğini, bunun da NORAD'ın mitomisin C ile bağlantılı kemorezistans ile ilişkili olabileceğini kuvvetle gösterdiğini açıklıyoruz. Ancak, bu bulguların başka kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma kanser hücre dizilerinde yapılmıştır; bu nedenle etik onay gerekmemiştir.

Hasta Onamı: Hasta onamı gerekmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışmanın herhangi bir finansal destek almadığını beyan etmiştir.

KAYNAKLAR

1. Lee S, Kopp F, Chang TC, Sataluri A, Chen B, Sivakumar S, et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell*. 2016;164:69-80.
2. Munschauer M, Nguyen CT, Sirokman K, Hartigan CR, Hogstrom L, Engreitz JM, et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature*. 2018;561:132-6.
3. Yang Z, Zhao Y, Lin G, Zhou X, Jiang X, Zhao H. Noncoding RNA activated by DNA damage (NORAD): Biologic function and mechanisms in human cancers. *Clin Chim Acta*. 2019;489:5-9.
4. Soghli N, Yousefi T, Abolghasemi M, Quej D. NORAD, a critical long non-coding RNA in human cancers. *Life Sci*. 2021;264:118665.
5. Wang B, Xu L, Zhang J, Cheng X, Xu Q, Wang J, et al. lncRNA NORAD accelerates the progression and doxorubicin resistance of neuroblastoma through up-regulating HDAC8 via sponging miR-144-3p. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110268.
6. Yang Y, Zhang G, Li J, Gong R, Wang Y, Qin Y, et al. Long noncoding RNA NORAD acts as a ceRNA mediates gempitabine resistance in bladder cancer by sponging miR-155-5p to regulate WEE1 expression. *Pathol Res Pract*. 2021;228:153676.
7. Zhang L, Wu H, Zhang Y, Xiao X, Chu F, Zhang L. Induction of lncRNA NORAD accounts for hypoxia-induced chemoresistance and vasculogenic mimicry in colorectal cancer by sponging the miR-495-3p/ hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α). *Bioengineered*. 2022;13:950-62.
8. Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*. 1987;235:1204-8.
9. Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol*. 1995;2:575-9.
10. Seow HA, Penketh PG, Baumann RP, Sartorelli AC. Bioactivation and resistance to mitomycin C. *Methods Enzymol*. 2004;382:221-33.
11. Gad SE. Mitomycin C. In: Wexler P, ed. *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). Oxford: Academic Press. 2014:354-6.
12. Kiwerska K, Szyfter K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J Appl Genet*. 2019;60:329-34.
13. Elguindy MM, Kopp F, Goodarzi M, Rehfeld F, Thomas A, Chang TC, et al. PUMILIO, but not RBMX, binding is required for regulation of genomic stability by noncoding RNA NORAD. *Elife*. 2019;8:e48625.
14. Tichon A, Gil N, Lubelsky Y, Havkin Solomon T, Lemze D, Itzkovitz S, et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. *Nat Commun*. 2016;7:12209.
15. Raei N, Safaralizadeh R, Hosseinpourfeizi M, Latifi-Navid S, Yazdanbod A. Suppression of lncRNA NORAD may affect cell migration and apoptosis in gastric cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2022;49:3289-96.
16. Qi C, Liu J, Guo P, Xu Y, Hu J, Han X. lncRNA NORAD facilitates oral squamous cell carcinoma progression by sponging miR-577 to enhance TPM4. *Biol Direct*. 2022;17:1.
17. He H, Yang H, Liu D, Pei R. lncRNA NORAD promotes thyroid carcinoma progression through targeting miR-202-5p. *Am J Transl Res*. 2019;11:290-9.
18. Hu W, Zhao Y, Su L, Wu Z, Jiang W, Jiang X, et al. Silencing the lncRNA NORAD inhibits EMT of head and neck squamous cell carcinoma stem cells via miR 26a 5p. *Mol Med Rep*. 2021;24:743.
19. Wang Y, Zhou B, Yan L, Wu J, Xing Z, Zhang S, et al. lncRNA NORAD promotes the progression of osteosarcoma via targeting of miR-155-5p. *Exp Ther Med*. 2021;21:645.