TİROİD KANSERİ HÜCRE HATLARINDA circPTPN22'nin EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

MADINA ALIYEVA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROİD KANSERİ HÜCRE HATLARINDA circPTPN22'nin EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Madina ALIYEVA
0000-0003-0819-2484

Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(Danışman)

Prof. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU
(Eş Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİROİD KANSERİ HÜCRE HATLARINDA circPTPN22'nin EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Madina ALIYEVA

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Elif UZ YILDIRIM

Eş Danışman: Prof.Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

Tiroid kanseri, endokrin sistemin en yaygın malign tümörlerinden biri olup, tüm kanser vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Son yıllarda circRNA'lar kanser biyolojisi araştırmalarının odağı haline gelmiştir. Halkasal yapıları nedeniyle daha stabil olan, kanda ve dokulardaki ifadesinden ötürü circRNA'lar potansiyel tanısal biyobelirteçler arasında yer almaktadır. circPTPN22, T hücre reseptör sinyalleşmesinin negatif düzenleyicisi olan PTPN22 geninden türeyen bir dairesel RNA'dır. PTPN22 geni, otoimmün hastalıklar ve bazı kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, circPTPN22 molekülünün tiroid kanseri erken tanısında kullanılabilecek yeni bir biyobelirteç olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla ön çalışma yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada tiroid kanseri hücre hatları olan TPC-1 ve FTC-133 ile normal tiroid hücre hattı olan Nthy-ori 3-1 kullanılmıştır. Elde edilen hücrelerden toplam RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Ardından, circPTPN22 ve PTPN22 mRNA seviyesi qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kat $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, TPC-1 ve FTC-133 hücre hatlarının her ikisinde de Nthy-ori 3-1 hücre hattına kıyasla circPTPN22 ifadesinde artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca, lineer transkript olan PTPN22'nin ifade düzeyi de her iki kanser hücre hattında normal hücre hattına göre artış göstermiştir. Bu bulgular, circPTPN22'nin tiroid kanseri için potansiyel bir moleküler biyobelirteç adayı olabileceğine dair ön veriler sunmaktadır. circRNA'ların miRNA'ları süngerleyerek hedef mRNA'ların ekspresyonunu dolaylı yoldan düzenlediği göz önünde bulundurarak, literatür taraması ve biyoinformatik analizler sonucu PTC'de artmış ekspresyonu bildirilen hsa-miR-31-5p, çalışmamızda da TPC-1 hücre hattında yukarı regülasyon göstermiştir. Ancak FTC-133 hattında belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Literatürde circPTPN22'nin miR-31-5p ile etkileşimine dair deneysel kanıt bulunmamakla birlikte, circRNA-miRNA-mRNA ekseninde görev alabilecek ara molekül miRNA'ların belirlenmesi, gelecekteki çalışmaların odak noktasını oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tiroid kanseri, PTPN22 geni, circPTPN22, hücre hattı, miRNA
2025, viii + 72 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of the Expression of circPTPN22 in Thyroid Cancer Cell Lines

Madina ALIYEVA

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist.Prof. Elif UZ YILDIRIM

Co- Supervisor: Prof. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

Thyroid cancer is the most common malignant tumor of the endocrine system, accounting for approximately 1% of all cancer cases. Recently, circRNAs have emerged as important molecules in cancer biology research. Their covalently closed loop structure renders them more stable than linear RNAs, and their presence in blood and tissues positions them as promising diagnostic biomarkers. circPTPN22 is a circRNA derived from the PTPN22 gene, which encodes a negative regulator of T cell receptor signaling. The PTPN22 gene has been linked to autoimmune diseases and various cancer types. This study aimed to perform a preliminary evaluation of circPTPN22 as a potential biomarker for early thyroid cancer detection. Thyroid cancer cell lines TPC-1 and FTC-133, as well as the normal thyroid cell line Nthy-ori 3-1, were used. Total RNA was isolated from these cells, followed by cDNA synthesis. The expression levels of circPTPN22 and PTPN22 mRNA were quantified using qRT-PCR, and the data were analyzed via the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The results indicated increased expression of circPTPN22 and PTPN22 in both cancer cell lines compared to the normal cell line. These findings provide preliminary evidence that circPTPN22 may serve as a molecular biomarker candidate for thyroid cancer. Since circRNAs modulate mRNA expression by sponging miRNAs, we also investigated hsa-miR-31-5p, known to be upregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC). Consistently, miR-31-5p expression was elevated in TPC-1 cells, but no significant change was detected in FTC-133 cells. Further studies are needed to explore circPTPN22's role in the circRNA–miRNA–mRNA regulatory network.

Key words: Thyroid cancer, PTPN22 gene, circPTPN22, cell line, miRNA
2025, viii + 72 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi, tecrübesi ve yönlendirmeleriyle bana rehberlik eden; genetik bilimine olan ilgimin artmasında büyük rol oynayan, bilimsel ve kişisel gelişimime katkı sunan, her daim desteğini esirgemeyen ve bu zorlu süreci daha anlamlı kılan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince laboratuvar ortamının geliştirilmesine sağladığı maddi ve manevi katkılar, ekipman temini ve fiziki koşulların iyileştirilmesindeki özverili desteği için Sayın Erkan YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren ve akademik süreçte destekleyici yaklaşımından ötürü Sayın Doç. Dr. Figen ERSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım hücre hatlarının temininde verdikleri destek için Sayın Prof. Dr. Ferda ARI ve başta Yüksek Lisans öğrencisi Ayşen SAĞNAK olmakla tüm ekibine gönülden teşekkür ederim.

Tez kapsamında sağladığı labotuvar imkânları için Prof. Dr. SERAP ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eş danışmanım Prof. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na ve BGD Laboratuvarı araştırma ekibine değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerin planlanması ve uygulanması sürecinde bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her aşamada yapıcı katkılarıyla destek olan Dr. Merve DEMİRBAĞ KARAALİ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında aynı çalışma ortamını paylaştığım, desteğini ve yardımını esirgemeyen Sibel KARAMAN ve Esthefany Yarluz SOUQUETT RUİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezime mali destek sağlayan BAP Koordinatörlüğü'ne (Proje No: FHIZ-2024-1909) teşekkür ederim.

Proje başvuru sürecinde birlikte çalıştığımız ve beni araştırmacı olarak dâhil eden Sayın Doç. Dr. Mehmet SARIMAHMUT'a ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı burs desteğiyle akademik gelişimime katkıda bulunan ve bu süreçte hedeflerime odaklanmamı kolaylaştıran Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu yoğun ve emek gerektiren süreçte, her daim yanımda olan sevgili eşime ve yaşamım boyunca maddi-manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Madina ALIYEVA
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....i
ABSTRACT....ii
TEŞEKKÜR....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....vi
1. GİRİŞ…… 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser (Genel Bakış) 3
2.2. Tiroid Kanseri 4
2.2.1. Tiroid kanseri çeşitleri....5
2.2.2. Tiroid kanseri epidemiyolojisi 6
2.2.3. Tiroid kanserinin nedenleri 7
2.3. PTPN22 Geni ve Kanserdeki Fonksiyonel Rolü....9
2.3.1. Tirod kanserinde PTPN22 geninin rolü 13
2.4. Kodlanmayan RNA'lar 15
2.5. MiRNA'ların Tanımı, Biyogenezi ve Fonksiyonları 16
2.5.1. MiRNA'ların kanserdeki rolleri....17
2.6. CircRNA'ların Tanımı, Biyogenezi ve Fonksiyonları....18
2.6.1. CircRNA'ların kanserdeki rolleri....22
3. MATERYAL ve YÖNTEM....26
3.1. Materyal 26
3.1.1. Deney çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler....26
3.1.2. Deney çalışmalarında kullanılan sarf malzemeler 26
3.1.3. Deney çalışmalarında kullanılan cihazlar 26
3.2. Yöntem.....26
3.2.1. Hücre kültürü çalışması....27
3.2.2. Hücre kültürü için besiyerinin hazırlanması 27
3.2.3. Hücre hatlarının kültür sürecine alınması 27
3.2.4. Hücrelerin pasajlama işlemi....28
3.2.5. Hücrelerden total RNA izolasyonu 28
3.2.6. RNA örneklerinin konsantrasyon tayini....29
3.2.7. CircRNA primer tasarımı....30
3.2.8. CircRNA'lar ve mRNA'lar için cDNA sentezleme işlemi....31
3.2.9. CircRNA'lar ve mRNA'lar için gerçek-zamanlı PCR (qRT-PCR) ile gen ifadesi ölçümü…….....32
3.2.10. Aday miRNA'ların *in silico* analizi 34
3.2.11. MiRNA primer tasarımı 35
3.2.12. MiRNA'lar için cDNA sentezleme işlemi 37
3.2.13. MiRNA'lar için gerçek-zamanlı PCR (qRT-PCR) ile gen ifadesi ölçümü....38
4. BULGULAR....39
4.1. TPC-1, FTC-133 ve Nthy-Ori 3-1 Hücre Hatlarının Mikroskopik Analiz Sonuçları….. 39
4.2. RNA Örneklerinin Nanodrop Analiz Sonuçları....40
4.3. CircRNA'ların ve mRNA'ların Gerçek-Zamanlı PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları…… 40
4.4. Aday MiRNA'ların *in silico* Analiz Sonuçları....45
4.5. MiRNA'ların Gerçek-Zamanlı PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları 46

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 48
KAYNAKLAR 52
EKLER……..... 66
ÖZGEÇMİŞ 72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ml	Mililitre
ng	Nanogram
U	Ünite
β	Beta
Δ	Delta
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
3’ UTR	3’ çevrilmeyen bölge (untranslated region)
5' UTR	5’ çevrilmeyen bölge (untranslated region)
ATC	Anaplastic Thyroid Cancer
BKZ.	Bakınız
BRAF	B-type Raf kinase
cDNA	Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
circRNA	Dairesel RNA (Circular RNA)
CPI	Checkpoint İnhibitors
DNA	Deoksiribonükleik asit
FTC	Follicular Thyroid Carcinoma
FTC-133	Follicular Thyroid Carcinoma-133
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA (long non-coding RNA)
LYP	Lymphoid-Specific Phosphatase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Haberci RNA (messenger RNA)
MTC	Medullary Thyroid Cancer
ncRNA	Non-coding RNA
Nthy-ori 3-1	Normal Thyroid-origin 3-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTC	Papillary Thyroid Carcinoma
PTP	Protein-tyrosine phosphatases
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22
qRT-PCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RBP	RNA Binding Protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse Transcription
TCR	T-cell receptor
TPC-1	Thyroid Papillary Carcinoma-1
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanser belirtileri (Hallmarks of Cancer)	3
Şekil 2.2.	Tiroid bezinin yapısı ve konumu	4
Şekil 2.3.	Tiroid kanser türleri	5
Şekil 2.4.	Tiroid kanseri insidansı	6
Şekil 2.5.	PTPN22 mRNA'sının çeşitli kanserlerde ifade değişimi	9
Şekil 2.6.	PTPN22 gen lokasyonu	10
Şekil 2.7.	PTPN ailesi üyelerinin çeşitli kanserlerdeki rolleri	11
Şekil 2.8.	PTPN22 eksikliğinin CD8+ T hücre yanıtına etkisi	13
Şekil 2.9.	Papiller tiroid karsinomunda Hashimoto tiroiditi ile ilişkili genlerin ekspresyonu	14
Şekil 2.10.	miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması	17
Şekil 2.11.	CircRNA'ların biyogenezisi	20
Şekil 2.12.	Genomik yapıya göre circRNA çeşitleri	21
Şekil 2.13.	CircRNA fonksiyonlarının kanserde oranı	23
Şekil 2.14.	Kanserlerde circRNA fonksiyonlarının genel gösterimi	23
Şekil 2.15.	Tiroid kanserinde circRNA'nın moleküler mekanizma ağı	24
Şekil 3.1.	Çalışma kapsamında yapılacak olan uygulama ve yöntemlerin özet şeması	26
Şekil 3.2.	CircRNA'ların oluşumu ve primer tasarımı	30
Şekil 3.3.	CircPrimer 2.0 programı kullanılarak circPTPN22 primerinin kontrolü	31
Şekil 3.4.	miRNA Taramasında (USLP) Yöntemi Şeması	35
Şekil 3.5.	RT-miR-31-5p stem-loop primerinin ikincil yapısı	36
Şekil 4.1.	Tiroid kanseri hücrelerinin (TPC-1 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)	39
Şekil 4.2.	Tiroid kanseri hücrelerinin (FTC-133 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)	39
Şekil 4.3.	Normal tiroid epitel hücrelerinin (Nthy-ori 3-1 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)	40
Şekil 4.4.	Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) circPTPN22'nin ifade değişim grafiği	42
Şekil 4.5.	Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) lineer PTPN22'nin ifade değişim grafiği	43
Şekil 4.6.	circPTPN22'nin (kırmızı) ve internal kontrol olarak kullanılan circHIPK3'ün (sarı) melting-curve grafiği	43
Şekil 4.7.	PTPN22'nin (sarı) ve referans gen olarak kullanılan GAPDH'in (yeşil) melting-curve grafiği	44
Şekil 4.8.	circPTPN22 ve PTPN22 mRNA artışlarının kıyaslanması	44
Şekil 4.9.	circPTPN22 ve PTPN22 molekülleri ile potansiyel olarak etkileşime girebilen miRNA'ların dağılımını gösteren Venn diyagramı	45
Şekil 4.10.	Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) hsa-miR-31-5p'nin ifade değişim grafiği	47
Şekil 5.1.	PTPN22 ekspresyonunun tiroid karsinomunda (THCA) örnek tiplerine göre dağılımı	49
Şekil 5.2.	Dairesel RNA'ları incelemek için yaklaşımlar ve araçlar	51
Şekil 5.3.	Çeşitli circRNA profilleme yöntemlerinin şematik gösterimi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	2.1	Tiroid kanserinde mutasyon profili	7
Çizelge	2.2.	Tiroid kanseri'nde circRNA'lar	25
Çizelge	3.1.	cDNA sentez bileşenleri	32
Çizelge	3.2.	cDNA sentez koşulları	32
Çizelge	3.3.	qPCR reaksiyonu bileşenleri	33
Çizelge	3.4.	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde kullanılan formüller	33
Çizelge	3.5.	qPCR'ın çalışma koşulları	34
Çizelge	3.6.	qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları	34
Çizelge	3.7.	RT-miR-31-5p ve RT-U6 Stem-loop primerlerin sekansları	37
Çizelge	3.8.	Stem-loop RT cDNA sentezi için kullanılan inkübasyon adımları, sentez koşulları ve bileşenler	37
Çizelge	3.9.	miRNA için qPCR reaksiyonu bileşenleri	38
Çizelge	3.10.	miRNA için qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları	38
Çizelge	3.11.	miRNA için qPCR'ın çalışma koşulları	38
Çizelge	4.1.	RNA örneklerinin nanodrop analiz sonuçları	40
Çizelge	4.2.	qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri	41
Çizelge	4.3.	miRNA'ların qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri	46
Çizelge	5.1.	circPTPN22'nin çeşitli kanserlerdeki ekspresyon düzeyi	48
Çizelge	5.2.	miR-31'in çeşitli kanserlerdeki ekspresyon düzeyi	50

1. GİRİŞ

Tiroid kanseri, endokrin sistemin en sık görülen malign neoplazmlarından biridir ve tüm kanser vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Son epidemiyolojik çalışmalar, tiroid kanseri insidansında küresel bir artış olduğunu göstermekte olup, bu artışın çevresel, genetik ve epigenetik faktörlerden bağlı olduğu düşünülmektedir. Tiroid kanserleri histopatolojik olarak papiller, foliküler, medüller ve anaplastik tiroid kanserleri şeklinde farklı alt tiplere ayrılmaktadır.

Protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 22 (PTPN22, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22), özellikle T hücre reseptör (T-cell receptor, TCR) sinyalizasyonunu düzenleyerek immün toleransın sürdürülmesinde kritik bir rol oynayan bir gen ürünüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalar, PTPN22'nin sadece otoimmüniteyi değil, aynı zamanda tümör immünitesi ve kanser progresyonunu da etkileyebileceğini ortaya koymuştur.

Dairesel RNA'lar (cicrcular RNA, circRNA), lineer RNA'lardan (mRNA) farklı olarak 3' ve 5' uçlarının kovalent bağlanmasıyla oluşan kapalı döngü yapısına sahip kodlanmayan RNA (non-coding RNA, ncRNA) molekülleridir. Bu yapı, onları ekzonükleazlara karşı dirençli kılarak diğer RNA formlarına kıyasla belirgin şekilde daha yüksek stabilite sağlamaktadır. Bu moleküllerin dolaşımda ve dokularda gösterdikleri yüksek stabilite, onları potansiyel tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak öne çıkarmaktadır. CircRNA'lar, mikroRNA (miRNA) süngerleme, RNA bağlayıcı proteinlerle etkileşim ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çoklu mekanizmalarla hücresel süreçlerde kritik roller üstlenmektedir. Özellikle miRNA'ları bağlayarak (miRNA sponging) hedef mRNA'ların ekspresyonunu modüle etme kapasiteleri, onları kanser araştırmalarında önemli bir odak noktası haline getirmiştir.

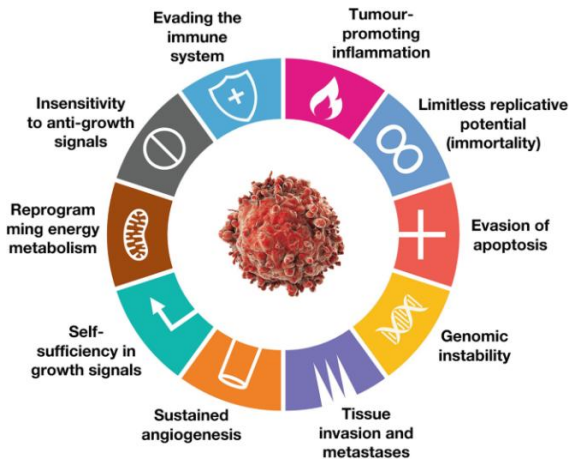
Bu tez kapsamında, PTPN22 geninin dairesel RNA formu olan circPTPN22'nin tiroid kanserindeki ekspresyon seviyesi ve olası biyobelirteç potansiyelinin araştırılması için ön çalışma yapılması amaçlanmıştır. Literatür taraması sonucunda, circPTPN22'nin tiroid kanserindeki rolüne dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu kapsamda, tiroid kanseri hücre hatları (FTC-133 ve TPC-1) ile normal tiroid epitel hücre hattı (Nthy-ori 3-1) üzerinde gerçekleştirilen qRT-PCR analizleriyle PTPN22 mRNA ve circPTPN22 ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, circPTPN22'nin tiroid kanseri için potansiyel bir moleküler biyobelirteç adayı olabileceğine dair ön veriler sunmaktdır. İleri klinik çalışmalarla doğrulanması halinde, bu molekülün erken teşhis, tanısal ve prognostik bir belirteç olarak kullanılabilme ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser (Genel Bakış)

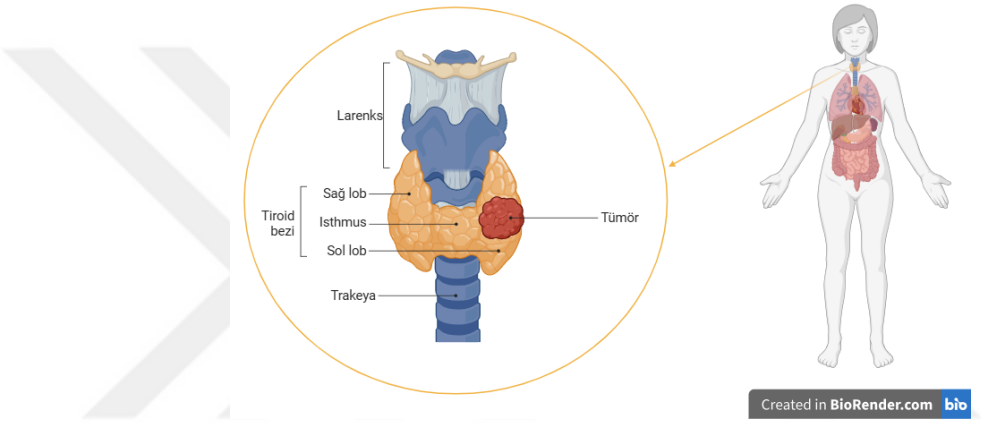
Kanser, hastanın vücudunda çok aşamalı ve heterojen bir süreç olarak gelişen kompleks bir patolojidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kanseri, normal homeostazın bozulması sonucu ortaya çıkan ve vücutta kontrolsüz yayılım gösteren anormal hücre proliferasyonu olarak tanımlamaktadır. 2000 yılında Hanahan ve Weinberg kanser biyolojisinin karmaşık mekanizmalarını altı temel özellik altında sınıflandıran bir çalışma yayınlamıştır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bu temel 6 ayırt edici özellikler şunlardır: (1) büyüme sinyallerinde öz yeterlilik (self-sufficiency in growth signals), (2) büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık (insensitivity to anti-growth signals), (3) apoptozdan kaçınma (evading apoptosis), (4) sınırsız replikatif potansiyel (limitless replicative potential), (5) sürekli anjiyogenez (sustained angiogenesis) ve (6) doku istilası ve metastaz (tissue invasion and metastasis). On yıl sonra yayınlanan güncellenmiş çalışmada (Hanahan ve Weinberg, 2011) bu listeye iki yeni özellik daha eklenmiştir: (1) enerji metabolizmasını yeniden programlama (reprogramming energy metabolism) ve (2) bağışıklık tepkisinden kaçınma (evading immune response). Ayrıca iki kolaylaştırıcı özellik (emerging hallmarks) de tanımlanmıştır: (1) Genom instabilitesi ve mutasyon (genome instability and mutation) ve tümörü destekleyen inflamasyon (tumor-promoting inflammation) (Şekil 2.1) (Fouad ve Aanei, 2017).



Şekil 2.1 Kanser belirtileri (Hallmarks of Cancer) (Hanahan, 2022)

2.2. Tiroid Kanseri

Tiroid veya glandula thyroidea memelilerin boyun bölgesinde, larenksin altında ve trakeya önünde bulunan, vücudun metabolizmasını düzenlemek için önemli hormonları salgılayan bir endokrin bezdir (Al-Suhaimi ve Khan, 2022; Grimm, 2022). İnsanlarda kelebek şeklinde bir yapıya sahiptir. İki lobdan oluşur ve bu loblar, dar bir köprü olan isthmus ile birbirine bağlıdır. Tiroid karsinomu veya tiroid kanseri ise tiroid bezinin malign (kötü huylu) tümörüdür (Grimm, 2022) (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Tiroid bezinin yapısı ve konumu

Tiroid kanseri, tiroid hücrelerinin anormal proliferasyonundan (çoğalmasından) kaynaklanmakta olup, baş ve boyun bölgesindeki tüm malign tümörlerin neredeyse üçte birini oluşturmaktadır. (Sloan, 1954; Ma ve ark., 2024).

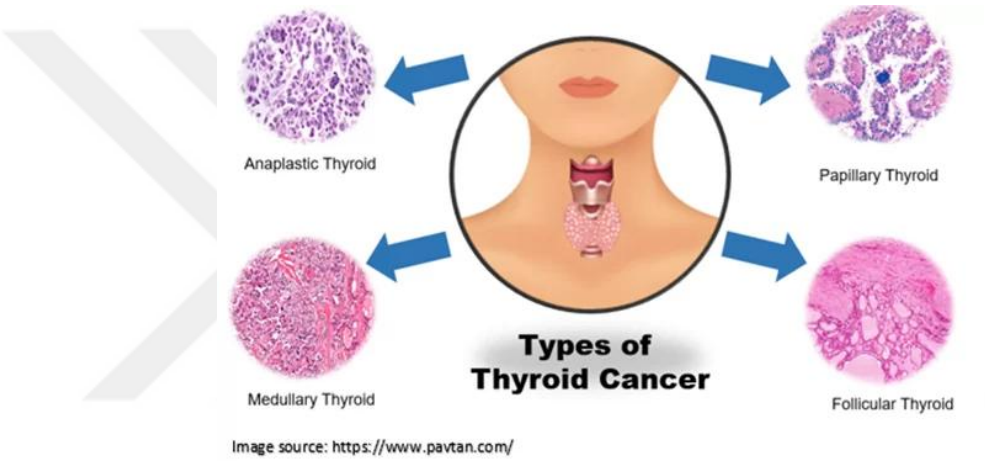
Tiroid bezi iki endokrin hücre tipinden oluşur: (1) tiroksin (thyroxine, T4) ve triiyodotironin (triiodothyronine, T3) hormonlarını sentezleyen folliküler hücreler ve (2) kalsitonin üreten parafolliküler C hücreleri. Bu iki temel hücre tipinin embriyonik kökenleri farklı olsa da farklılaşma süreçleri tam olarak aydınlanmamıştır. Bununla birlikte bu hücrelerden kaynaklanan tümörler, tedavi yanıtları ve prognoz açısından belirgin farklılıklar gösterir (Cote ve ark., 2015).

Tiroid bezi; kalp atış hızını, kan basıncını, üreme sistemini, vücut sıcaklığını ve kiloyu düzenleyen hormonlar üretir (Bhattacharya ve ark., 2023). Tiroid kanseri, bu hormonal

dengeyi bozarak metabolik süreçlerin aksamına ve dolayısıyla vücuttaki çeşitli fizyolojik işlevlerin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır.

2.2.1. Tiroid kanseri çeşitleri

Başlıca tiroid kanser türleri arasında papiller (PTC – Papillary Thyroid Carcinoma), foliküler (FTC – Follicular Thyroid Carcinoma), medüller (MTC – Medullary Thyroid Cancer) ve anaplastik (ATC – Anaplastic Thyroid Cancer) tiroid karsinomları sayılabilir (Şekil 2.3) (Patel and Shaha, 2014; Ancker et al., 2019; Kevin and Ashish, 2021).



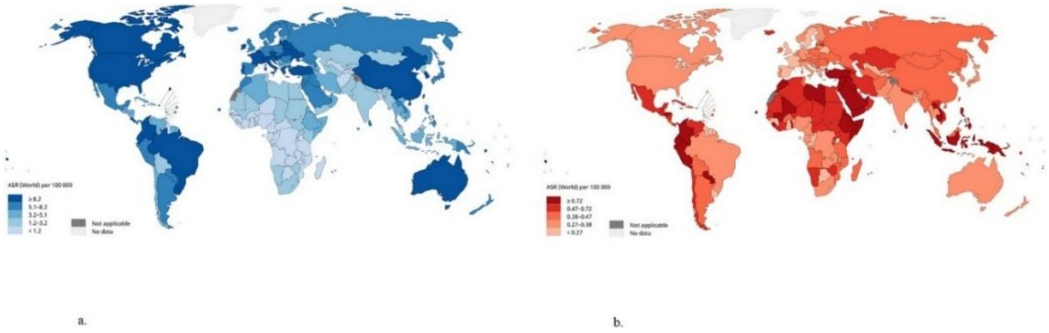
Şekil 2. 3. Tiroid kanser türleri

En sık görülen tiroid kanseri türü, tüm vakaların yaklaşık %80'ini oluşturan papiller tiroid karsinomudur (PTC). İkinci en yaygın tip ise tüm olguların %10-20'sini kapsayan foliküler tiroid karsinomudur (FTC). Medüller tiroid kanseri (MTC) tüm tiroid kanseri vakalarının %6-8'ini oluşturmaktadır. Anaplastik tiroid kanseri (ATC) ise tüm tiroid kanseri vakalarının %2'sinden daha azını oluşturan, nadir fakat en agresif ve hızlı ilerleyen tiroid kanser türüdür (Silva, 2021; Bhattacharya ve ark., 2023). Tiroid bezinden kaynaklanan tümörler, tiroid bezinde bulunan farklı hücre tiplerinden türeyen heterojen bir neoplastik grup oluşturmaktadır (Silva, 2021). PTC, FTC ve ATC, tiroidin folliküler epitel hücrelerinden köken alırken; MTC, parafolliküler C hücrelerinden gelişmektedir (Gimm, 2001).

2.2.2. Tiroid kanseri epidemiyolojisi

Tiroid kanseri, dünya genelinde 586.000 vaka ile 2020 yılında insidans (yeni vaka sayısı) açısından 9. sırada yer alan (Sung ve ark., 2021) özellikle kadınlarda artış gösteren yaygın bir endokrin malignitedir (Siegel ve ark., 2016; Kitahara ve Sosa, 2016; Greco ve ark., 2017). Genel olarak en yüksek insidans, Güney Kore, Kanada, İtalya, Fransa, İsrail, Hırvatistan, Avusturya, Amerika Birleşik Devletleri, Türkiye, Brezilya, Kosta Rika ve Çin gibi ülkelerde gözlemlenmektedir (Ferlay ve ark., 2020; Franceschi ve ark., 2018). Bunun yanı sıra, Kıbrıs, Cape Verde, Fransız Polinezyası, Yeni Kaledonya ve Porto Riko gibi bazı ada ülkeleri ve bölgelerinde de insidans oranları yüksektir (Ferlay ve ark., 2020) (Şekil 2.4 a) (Kitahara ve Schneider, 2022).

Tiroid kanserinin küresel prevalansı (tüm mevcut vakaların oranı) genç yetişkinler ve ergenler arasında belirgin bir artış göstermektedir. Yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları kadınlarda erkeklere kıyasla yaklaşık üç kat daha yüksek düzeyde seyretmektedir (Sung ve ark., 2021; Ma ve ark., 2024). Hastalığa bağlı mortalite (ölüm) oranları kadınlarda 100.000 kişide 0,5, erkeklerde ise 100.000 kişide 0,3 ile oldukça düşük olmasına ve coğrafi farklılıklar açısından çok daha az değişkenlik göstermesine (Şekil 2.4 b) rağmen (Sung ve ark., 2021), hastalığın tekrarlama veya kalıcılık gösterme oranı yüksek olup, bu durum tedaviye direnç gelişimiyle birlikte hasta morbidite (hastalık sıklığı) ve mortalite risklerinde artışa neden olabilmektedir (Xing, 2013).



Şekil 2. 4. Tiroid kanseri insidansı (Ferlay ve ark., 2020)
(a) ve tiroid kanserine bağlı mortaliteye (b) ilişkin tahmini yaşa standartlanmış oranlar (ASR, Age-Standardized Rate), dünya geneli için gösterilmektedir. Veri kaynağı ve grafik düzenlemesi: GLOBOCAN 2020

Tiroid kanserinde en yaygın risk faktörü iyonize radyasyondur ancak aşırı vücut ağırlığı, aşırı büyük boy, hormonal maruziyetler ve belirli çevresel kirleticilerin de rol oynayabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Kitahara ve ark., 2018).

2.2.3. Tiroid kanserinin nedenleri

Tiroid hücrelerinin malignleşmesini tetikleyen çeşitli genetik değişiklikler bilinmektedir (Çizelge 2.1.) (Nikiforova ve Nikiforov, 2008).

Çizelge 2.1. Tiroid kanserinde mutasyon profili (REBAÏ, M., & REBAÏ, A., 2016. Değiştirilerek alınmıştır) (a: Nikiforov ve Nikiforova, 2011; b: Muzza ve ark., 2015)

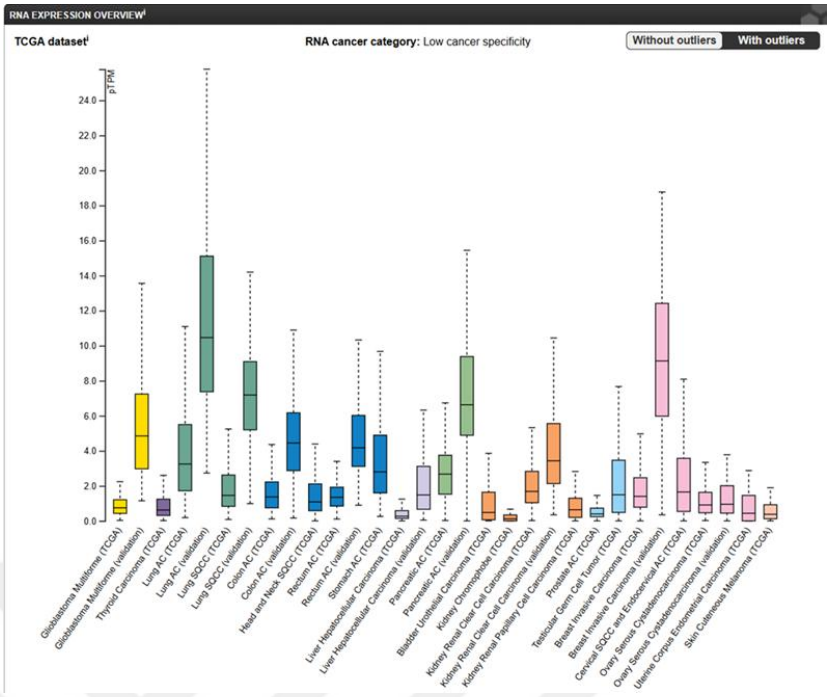
Tiroid kanserinde yaygın mutasyonların yüzdesi (%)			
Papiller Tiroid Karsinomu (PTC)	**Foliküler Tiroid Karsinomu (FTC)**	**Medüller Tiroid Karsinomu (MTC)**	**Anaplastik Tiroid Karsinomu (ATC)**
BRAF: 40-50 (a)	RAS: 40-50 (a)	RET/PTC: 40-50 (a)	TP53: 50-80 (a)
RET/PTC: 10-20 (a)	PAX8/PPARγ: 30-35 (a)	RAS: 25 (a)	TERT: 33-50 (b)
RAS: 10-20 (a)	TERT: 14-36 (b)		BRAF: 20-40 (a)
			RAS: 20-40 (a)

Bunlar arasında en önemlisi, BRAF (B-type Raf kinase, B tipi Raf kinazı) geninde meydana gelen spesifik bir nokta mutasyonudur. Bu mutasyon, genin 15. ekzonunda yer alan 1799. nükleotid pozisyonunda timinin adenine dönüşmesi (T1799A) sonucunda, 600. pozisyondaki valin (V) amino asidinin glutamik asit (E) ile yer değiştirmesine neden olur. Ortaya çıkan bu mutasyon BRAFV600E olarak adlandırılır (Xing, 2005). BRAF proteini, hücre proliferasyonu, farklılaşması, büyümesi ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan MAPK (mitogen-activated protein kinase, mitojenle aktive olan protein kinazlar) sinyal yolunun kritik bir ara bileşenidir ve bu yol üzerinden çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenler (Zuidervaart ve ark., 2005). BRAFV600E mutasyonu, sporadik papiller tiroid karsinomlarının (PTC) yaklaşık %45'inde görülmekte olup, özellikle daha agresif tümör alt tiplerinde daha yüksek sıklıkta rapor edilmektedir (Kim ve ark., 2018).

Tiroid kanserlerinde bir diğer önemli yaygın mutasyon, RAS mutasyonudur. RAS proteinleri, ilk olarak 1960'lı yıllarda Jennifer Harvey ve Werner Kirsten tarafından fare sarkom virüslerinde tanımlanan dönüşüm sağlayıcı onkogenler olup (Harvey, 1964;

Kirsten ve ark., 1970), günümüzde birçok insan malignitesinde sıkça mutasyona uğrayan proto-onkogenler olarak bilinmektedir. Bu proteinler üç gen tarafından kodlanmaktadırlar: HRAS (Harvey-Ras), KRAS (Kirsten-Ras) ve NRAS (Neuroblastoma-Ras) (Santarpia ve ark., 2012); bu moleküller, proliferasyon ve hücre hayatta kalma yollarından sorumlu GTP'azlardır (guanosine triphosphate, guanozin-5'-trifosfat). RAS'ın 12, 13 veya 61. kodonlarındaki nokta mutasyonları, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve tümör oluşumu ile ilişkilidir (Quinlan ve Settleman, 2009; Khatami ve ark., 2019).

Tiroid tümör gelişiminde rol oynayan mutasyona uğramış diğer çeşitli genler de tanımlanmıştır. Bu genler arasında; katenin (catenin), Tümör Proteini P53 (TP53, Tumor Protein P53), izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1, isocitrate dehydrogenase 1), anaplastik lenfoma kinaz (ALK, anaplastic lymphoma kinase), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, epidermal growth factor receptor), çinko ve halka parmak proteini 3 (ZNRF3, Zinc and ring finger 3) yer almaktadır (Xing, 2013). Bu genlerin yanı sıra bazı çalışmalar, otoimmün hastalıklarla da ilişkili olan protein tirozin fosfataz nonreseptör tip 22 molekülünün (PTPN22, protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22) çeşitli kanser türlerinde ifade düzeyinin değiştiğini ortaya koymuş (Şekil 2.5) ve tümörlerdeki etki mekanizması kanser immünoterapisi için bir hedef olarak olduğunu göstermektedir (Ho ve ark., 2021).



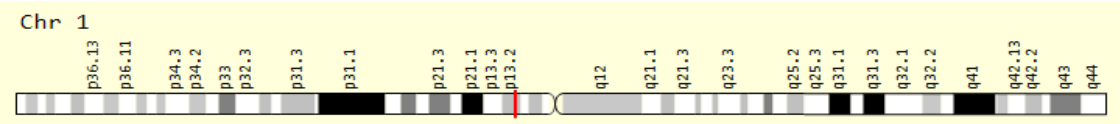
Şekil 2. 5. PTPN22 mRNA'sının çeşitli kanserlerde ifade değişimi (The Human Protein Atlas'tan alınmıştır, 2025)

Genetik nedenlerinin yanı sıra, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu (Khatami, 2019), mikroRNA'lar (miRNA) (Stuchi ve ark., 2020) ve uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) ekspresyonundaki değişiklikler (Davis ve ark., 2020) gibi bazı epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonunun modülasyonu yoluyla onkojenik sinyal yollarının anormal aktivasyonunu ve tiroid-spesifik genlerin aşağı regülasyonunu tetikleyebilir. Bu durum, tiroid kanserinin gelişimine ve ilerlemesine sebep olabilir (Iacobas, 2020; Silva, 2021).

2.3. PTPN22 Geni ve Kanserdeki Fonksiyonel Rolü

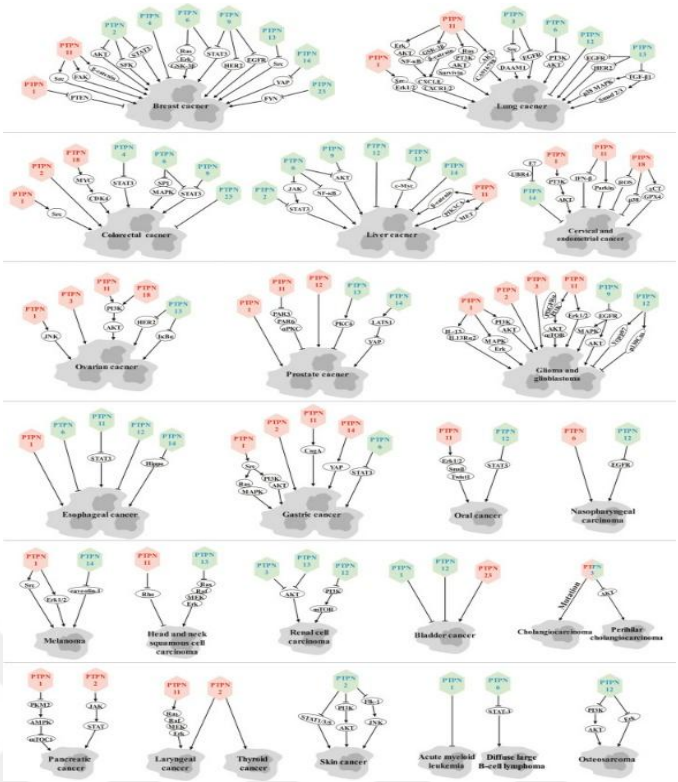
Protein-tirozin fosfatazlar (PTP, Protein-tyrosine phosphatases) ailesine ait olan protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 22 (PTPN22, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22), insan genomunda 1. kromozomun kısa kolu üzerinde (1p13.1-13.3 bölgesinde) konumlanmıştır (Şekil 2.6). Yaklaşık 57.900 baz çiftinden oluşan bu gen, insanlarda 807 amino asitlik lenfoid özgül tirozin fosfataz (LYP, Lymphoid-Specific Phosphatase) proteinini kodlamaktadır. Farelerde ise PTPN22 geninin ortoloğu olan

PTPN8 geni tarafından kodlanan PEP proteini, PEST (Prolin, glutamik asit, serin, treonin) bakımından zengin bir bölge içermektedir (Cohen ve ark., 1999).



Şekil 2. 6. PTPN22 gen lokasyonu (genecards veritabanından alındı)

PTPN22 ağırlıklı olarak immün hücrelerde eksprese edilir ve biyolojik rolü en iyi şekilde T hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu protein, T-hücre reseptörü (TCR, T-cell receptor) sinyal iletimini negatif yönde düzenler (Cloutier ve Veillette, 1999; Wu ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2020; Bottini ve Peterson, 2014). PTP'ler büyüme, farklılaşma, apoptoz ve metabolizma gibi hücresel süreçlerde önemli bir rol oynar (Hunter, 2009; Tonks, 2006; Tonks, 2013). Anormal PTP aktivitesi, kanser, diyabet ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir (Zhang, 2001; Tautz ve ark., 2006; Julien ve ark., 2011; Zhang, 2016; de Munter, 2013). PTP'lerin terapötik hedefler olarak büyük potansiyeline rağmen, PTP ilaç keşfindeki doğal zorluklar (yüksek derecede korunmuş ve pozitif yüklü aktif bölgeler) ve PTP biyolojisine dair sınırlı anlayış nedeniyle bu proteinler henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Zhang, 2016; de Munter, 2013). PTP ailesine ait protein tirozin fosfatazlar, çeşitli kanserlerde hem onkojenik (tumor promoters) hem de tümör baskılayıcı (tumor suppressors) işlevler gösterebilmektedir (Şekil 2.7) (Tang ve ark., 2022).

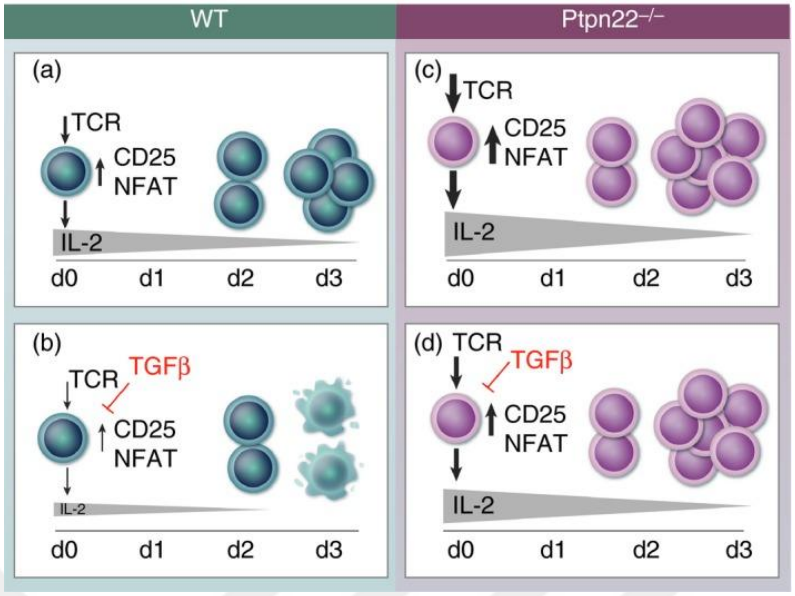


Şekil 2. 7. PTPN ailesi üyelerinin çeşitli kanserlerdeki rolleri (Tang ve ark., 2022)
Kırmızı yazı tipi tümör destekleyicilerini (tumor promoters), mavi yazı tipi ise tümör baskılayıcıları (tumor suppressors) temsil etmektedir.

Yapılan çalışmalar, PTPN22'nin silinmesinin anti-tümör immünitesini güçlendirmek için bir strateji olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. İnsan hastalıklarında bu yaklaşımın potansiyel faydasını değerlendirmek için, insan T hücrelerinde PTPN22'yi hedefleyen ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Brownlie ve ark., 2018). PTPN22 geni tümör bağlamında bağışıklık yanıtlarını düzenleyici işlevi hem insan hem de hayvan modellerinden bazı çalışmalarda elde edilen bulgularla desteklenmektedir (Schlicher ve ark., 2023). İnsan çalışmalarında, PTPN22'nin R620W varyantı, çeşitli otoimmün hastalıklarla olan güçlü ilişkisine ek olarak, bazı kanser türlerine karşı koruyucu bir etki göstermekte ve immün kontrol noktası inhibitörleri (CPI, checkpoint inhibitors) tedavisine karşı daha yüksek yanıt oranlarıyla anlamlı şekilde ilişkilendirilmektedir (Cubas ve ark., 2020; Ho ve ark., 2021). Bu varyantın fare homologu olan R619W knock-in transgenini taşıyan farelerde de benzer şekilde, Hepa1-6.x1 tümörlerinin büyümesi yabanıl tipe kıyasla daha etkili şekilde baskılanmaktadır. Ancak bu etki, PTPN22 eksikliği gösteren farelerde gözlemlenen tümör büyümesi üzerindeki kontrol kadar güçlü

değildir (Cubas ve ark., 2020; Orozco ve ark., 2021). Bu veriler, PTPN22'nin bağışıklık sisteminin tümörlere karşı geliştirdiği yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir role sahip olduğunu ve inhibitörlerinin terapötik potansiyel taşıyabileceğini göstermektedir (Schlicher ve ark., 2023).

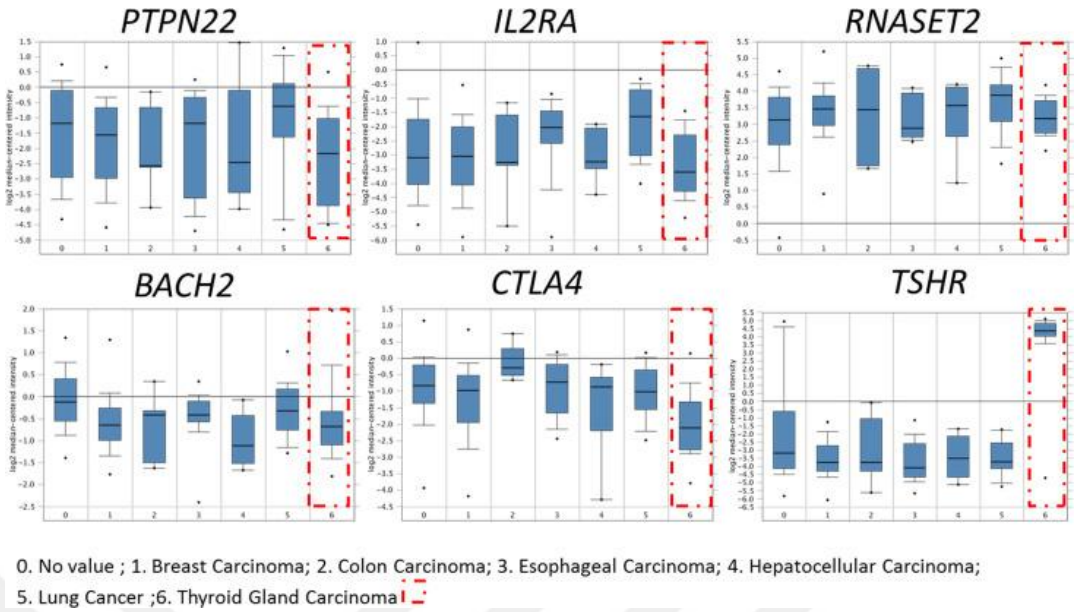
Brownlie ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar, PTPN22 eksikliğinin CD8+ T hücrelerinde transforme edici büyüme faktörü beta tarafından (TGFβ, transforming growth factor beta) baskılanan T hücre reseptörü (TCR) sinyalizasyonunu güçlendirdiğini ortaya koymuştur. Şekil 2.8 (a)'da gösterildiği gibi kontrol hücrelerinde TCR uyarımı, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırır, CD25 gibi aktivasyon belirteçlerini yukarı regülasyonuna yol açar ve 24 saat içinde NFAT'ın (nuclear factor of activated T-cells) çekirdeğe translokasyonunu sağlamaktadır. Ardından hücreler IL-2 (interleukin-2) salgılamaya ve çoğalmaya başlar. Şekil 2.8 (b)'de gösterildiği gibi, kontrol hücrelerine TGFβ eklenmesi durumunda TCR kaynaklı transkripsiyon faktörleri, aktivasyon belirteçlerinin artışını ve NFAT translokasyonunu baskılar. Bu durum, daha düşük IL-2 üretimine, dolayısıyla daha az hücre çoğalmasına ve 3. günde hücre ölümüne yol açar. Bunun aksine Şekil 2.8 (c)'de gösterilen PTPN22 eksik (PTPN22-/-) CD8+ T hücrelerinde TCR sinyalizasyonu belirgin şekilde güçlenmekte, bu da kontrol hücrelerine göre daha fazla IL-2 salınımı ve daha fazla hücre proliferasyonuyla sonuçlanır. Şekil 2.8 (d)'de gösterildiği gibi PTPN22 eksik (PTPN22-/-) CD8+ T hücrelerinde TGFβ'nin varlığına rağmen TCR sinyal yolaklarının etkin aktivasyonu devam etmekte ve bunun sonucunda yeterli düzeyde IL-2 üretimi sağlanmaktadır. Sonuç olarak hücreler 3. güne kadar proliferasyon kapasitelerini koruyabilmekte ve hayatta kalabilmektedir. (Brownlie ve ark., 2017; Brownlie ve ark., 2018).



Şekil 2. 8. PTPN22 eksikliğinin CD8+ T hücre yanıtına etkisi (Brownlie ve ark., 2018)

2.3.1. Tirod kanserinde PTPN22 geninin rolü

Son yıllarda ortaya çıkan çok sayıda kanıt, Hashimoto tiroiditinin (HT) papiller tiroid karsinomu (PTC) riskini artırabileceğini düşündürmektedir (Lun ve ark., 2013; Kim ve ark., 2011; Dvorkin ve ark., 2013). Zhang ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, Oncomine veri tabanının biyoenformatik yöntemi kullanılarak HT ile ilişkili genlerin (TSHR (thyrotropin receptor), BACH2 (BTB Domain And CNC Homolog 2), RNASET2 (ribonuclease 2A), CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), IL2RA (interleukin-2 receptor α chain) ve PTPN22) farklı tiroid kanseri türlerinde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, papiller tiroid karsinomunda TSHR geninin yüksek ekspresyon gösterdiği, BACH2, CTLA4, PTPN22 ve IL2RA gibi immün ilişkili genlerin ise azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. Papiller tiroid karsinomunda (PTC) Hashimoto tiroiditi (HT) ile ilişkili genlerin ekspresyonu (Zhang ve ark., 2021).

Bu genler tiroid kanserinde tiroid bezinin fonksiyonel düzenlenmesi, immün homeostazın sağlanması ve tümör ilerlemesi süreçlerinde kritik roller üstlenmektedir. PTPN22 geni, T hücre sinyal iletimini ve T hücre reseptörü (TCR) aracılı sinyal yolaklarını düzenleyerek immün yanıtın kontrolünde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu genin fonksiyonundaki değişiklikler, T hücre aktivasyonunu etkileyerek otoimmüniteye veya immün toleransın bozulmasına yol açabilmektedir. PTPN22'nin düzenleyici etkisi, CD25+ düzenleyici T hücrelerinde (Treg) IL2RA gen ekspresyonunu artırarak T hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskılamakta böylece immün sistemin aşırı tepkisini önlemektedir. Ayrıca, PTPN22'nin modüle ettiği immün mekanizmalar, HLA sınıf I moleküllerinin antijen sunum sürecini etkileyerek endojen tümör antijenlerinin CD8+ sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Böylece, PTPN22'nin T hücre fonksiyonları üzerindeki düzenleyici etkisi hem otoimmün yanıtların hem de antijen-spesifik immün tepkilerin kontrolünde merkezi bir rol üstlenmektedir (Zhang ve ark., 2021).

2.4. Kodlanmayan RNA’lar

Francis Crick tarafından öne sürülen merkezi dogma prensibi, genetik bilgi akışının DNA → RNA → protein ekseninde gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Crick, 1958; Crick, 1970). Uzun yıllar boyunca proteinler, genetik bilginin temel fonksiyonel son ürünleri olarak kabul edilmiştir (Anastasiadou, 2017); oysa insan genomunun yaklaşık %75'i RNA olarak transkribe edilirken, bunun yalnızca %3'lük kısmı protein kodlayan mRNA'lardan oluşmaktadır (Kimura, 2020).

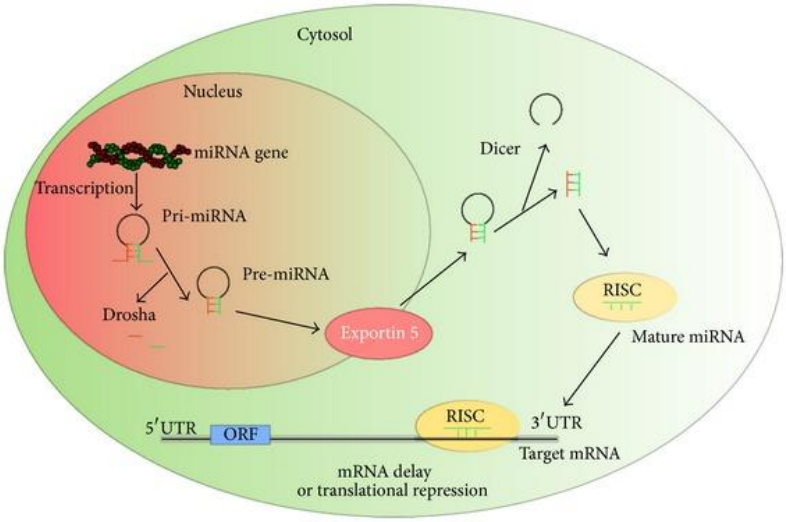
Kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA, ncRNA), gen ekspresyonunu ve protein fonksiyonlarını düzenleyen transkriptler olup genomun protein kodlamayan bölgelerinden üretilmektedir (Nappi, 2024). Kodlanmayan RNA'lar uzunluk, şekil ve hücresel lokalizasyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (Yan ve Bu, 2021). Uzunluklarına göre ncRNA'lar iki ana kategoriye ayrılmaktadır: 200 ribonükleotitten kısa olanlar mikro RNA’lar (micro RNA, miRNA) ve 200 ribonükleotitten uzun olanlar uzun kodlanmayan RNA’lar (long non-coding RNA, lncRNA) (Anfossi ve ark., 2018; Chen ve Huang, 2018). Her iki transkript tipinin düzensizleşmesinin, bugüne kadar incelenen tüm kanser türleriyle ilişkili olduğu ve kanserin temel özelliklerini (hallmark) etkilediği gösterilmiştir (Nappi, 2024). Bunlara ek olarak, mRNA dizilerinin "geri ekleme" (back-splicing) işlemiyle 3′ ve 5′ uçlarının kovalent bağlanması sonucu oluşan dairesel RNA’lar (circular RNA, circRNA), lncRNA'ların yeni bir alt sınıfını temsil etmektedir (Anfossi ve ark., 2018; Chen ve Huang, 2018).

Yapılan çok sayıda çalışma, ncRNA'ların insan malignitelerinde önemli roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu moleküller, kanserin başlangıç ve ilerleme süreçlerini düzenlemede onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilmektedir. ncRNA'lar farklı kanser türlerinin progresyon süreçlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bazı ncRNA'lar kanser hastalarının serum veya idrarında yüksek miktarlarda bulunmakta ve bu özellikleriyle tanısal biyobelirteçler olarak işlev görebilmektedir. Son dönemde, ncRNA'ları hedef alan çok sayıda klinik çalışma yürütülmüş olup, bu çalışmalar umut vaat eden terapötik etkiler sergilemiştir (Yan ve Bu, 2021).

2.5. MiRNA’ların Tanımı, Biyogenezi ve Fonksiyonları

1990'ların başında Victor Ambros ve ekibinin yanı sıra Gary Ruvkun ve ekibinin yürüttüğü çığır açıcı çalışmalar, ilk miRNA'nın keşfiyle sonuçlanmıştır (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). MiRNA'lar ilk olarak Caenorhabditis elegans model organizmasında keşfedilmiş (Lee ve ark., 1993) ancak bu alandaki araştırmaların ivme kazanması sekiz yıl sürmüş ve bu süreçte üç farklı model sistemde (C. elegans, Drosophila ve insan) onlarca küçük RNA'nın varlığı kesin olarak doğrulanmıştır (Lagos ve ark., 2001; Lee ve Ambros, 2001; Lau ve ark., 2001; Lee ve Dutta, 2009). Sonrasında hayvanlar, bitkiler ve hatta virüsler dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda binlerce miRNA tanımlanmıştır (Li ve ark., 2010). MiRNA'lar, 18-25 nükleotit uzunluğunda endojen küçük ncRNA'lar olup, kısmen tamamlayıcı hedef mRNA'lara bağlanarak protein translasyonunu baskılamaktadır (Lee ve ark., 1993).

Evrimsel olarak korunmuş olan miRNA genleri, protein kodlayan genlerin intron bölgelerinde veya genler arası alanlarda bulunur (Rodriguez ve ark., 2004) ve 1000 nükleotit uzunluğa varan primer miRNA'lar (primary miRNA, pri-miRNA) şeklinde transkribe edilir. Bu uzun transkriptler, RNaz III (Rnasen) ve DGCR8 proteininden oluşan mikroişlemci kompleksi (Microprocessor complex) tarafından 44-180 nükleotit uzunluğunda "pre-miRNA" adı verilen saplı-halka yapılarına (stem-loop structures) işlenir (Denli ve ark., 2004; Han ve ark., 2004; Lee ve ark., 2004). Pre-miRNA'lar, eksportin 5 (Ran GTP-bağımlı çift iplikli RNA bağlayıcı protein) ile sitoplazmaya taşınır ve burada Dicer adlı ikinci bir RNaz III enzimi tarafından olgun miRNA'lar haline getirilir. Oluşan 18-25 nükleotitlik olgun miRNA, sonunda RNA kaynaklı susturma kompleksine (RNA-induced silencing complex, RISC) entegre olur. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-translasyona uğramayan bölgelerindeki (3′-untranslated region, 3'-UTR) tam veya kısmi tamamlayıcı dizilere bağlanarak, gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde baskılar (Esquela ve Slack., 2006; Winter ve ark., 2009). Her bir miRNA'nın yüzlerce mRNA hedefi olabilir (Jeffries ve ark., 2011; Selbach ve ark., 2008; Guz ve ark., 2014) (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10. miRNA biyogenezisi ve etki mekanizması (Guz ve ark., 2014)

Bu bağlamda miRNA'lar apoptoz, gelişim, proliferasyon ve farklılaşma dahil geniş bir biyolojik süreç yelpazesini düzenler (Calin ve Croce, 2006). Gelişimdeki bu temel rollerinden dolayı, miRNA'ların tümör oluşumunda da rol oynadığının keşfi şaşırtıcı olmamıştır (Farazi ve ark., 2011). Tümör gelişimindeki rolleri o kadar belirgindir ki, ekspresyon profilleri insan tümörlerinin sınıflandırılmasında ve klinik durumla ilişkili moleküler imzaların tanımlanmasında kullanılabilmektedir (Lu ve ark., 2005; Volinia ve ark., 2006; Guz ve ark., 2014).

2.5.1. MiRNA'ların kanserdeki rolleri

MikroRNA'ların kanserdeki rolüne dair yapılan çalışmalar, üç temel bulguya işaret etmektedir (Sassen ve ark., 2007): (1) mikroRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz süreçlerinde rol oynaması (Brennecke ve ark., 2003; Lee ve ark., 1993), (2) miRNA genlerinin sıklıkla kırılgan bölgelerde (fragile sites) ve kanserle ilişkili genomik bölgelerde (cancer-associated genomic regions, CAGRs) yer alması (Calin ve ark., 2004), (3) malign tümörlerde ve tümör hücre hatlarında, normal dokulara kıyasla miRNA ekspresyon düzeylerinde belirgin düzensizliğin (deregulated) görülmesi (Calin ve Croce, 2006; Gaur ve ark., 2007; Lu ve ark., 2005).

MikroRNA'ların insan kanserindeki rolüne dair ilk kanıtlar, kronik lenfositik lösemi üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Calin ve ark., 2002). Sonraki çalışmalar, kanserde miRNA moleküllerinin delesyona veya amplifikasyona uğrayan genomik bölgelerde kümelendiğini göstermiştir (Calin ve ark., 2004). MiRNA ekspresyon değişiklikleri kanserde yaygın olarak gözlenen bir durumdur. Bilinen bir tümör baskılayıcı genin transkriptini negatif olarak düzenleyen miRNA'ları içeren kromozomal bölgeler, kanser gelişimi sırasında amplifiye olabilmektedir. Bu amplifikasyon, ilgili miRNA'nın aşırı ekspresyonuna ve sonuçta tümör baskılayıcı genin susturulmasına yol açmaktadır. Buna karşılık, onkogenleri baskılayan miRNA'lar ise genellikle kırılgan lokuslarda bulunmakta olup, bu bölgelerde meydana gelen delesyonlar veya mutasyonlar miRNA ekspresyonunun azalmasına ve hedef onkogenin aşırı ifadesine neden olabilmektedir (Iorio ve Croce, 2012).

Dolayısıyla, miRNA ekspresyonundaki değişiklikler insan kanserlerinde yaygın bir olgu olup kanser patogenezine katkıda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, vücut sıvılarında, özellikle kan, plazma, serum ve tükürükte stabil bir şekilde yer alması, bu moleküllerin kanser tanısı ve izlenmesinde potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmelerini sağlamaktadır (Qu ve ark., 20011; Ashby ve ark., 2014).

2.6. CircRNA'ların Tanımı, Biyogenezi ve Fonksiyonları

Dairesel RNA'lar (circular RNA, circRNA), geri ekleme (back-splicing) sonucu oluşan, 5′ uç kapakları veya 3′ poli(A) kuyrukları bulunmayan, kovalent olarak kapalı, tek sarmallı ncRNA çeşididir (Adelman ve Egan, 2017). CircRNA terimi ilk kez 1976'da Sanger ve meslektaşları tarafından viroidlerin yapısını karakterize ederken kullanılmıştır (Sanger ve ark., 1976). Ancak bu moleküller daha sonraki çalışmalarda araştırmacılar tarafından fazla ilgi görmedi çünkü circRNA'ların splicing hatalarının yan ürünleri olduğu ve önemli bir biyolojik etkiye sahip olmadığı düşünülmüştür (Huang ve ark., 2020). Son zamanlarda, RNA dizileme teknolojilerindeki ve biyoinformatik yaklaşımlardaki gelişmelerle birlikte (Salzman ve ark., 2012), bilim insanları ökaryotlarda (mantarlar, protistler, bitkiler, solucanlar, balıklar, böcekler ve memeliler dahil) binlerce circRNA tespit etmiş ve bu RNA'ların dokuya özgü, hücreye özgü ve gelişim aşamasına özgü ifade

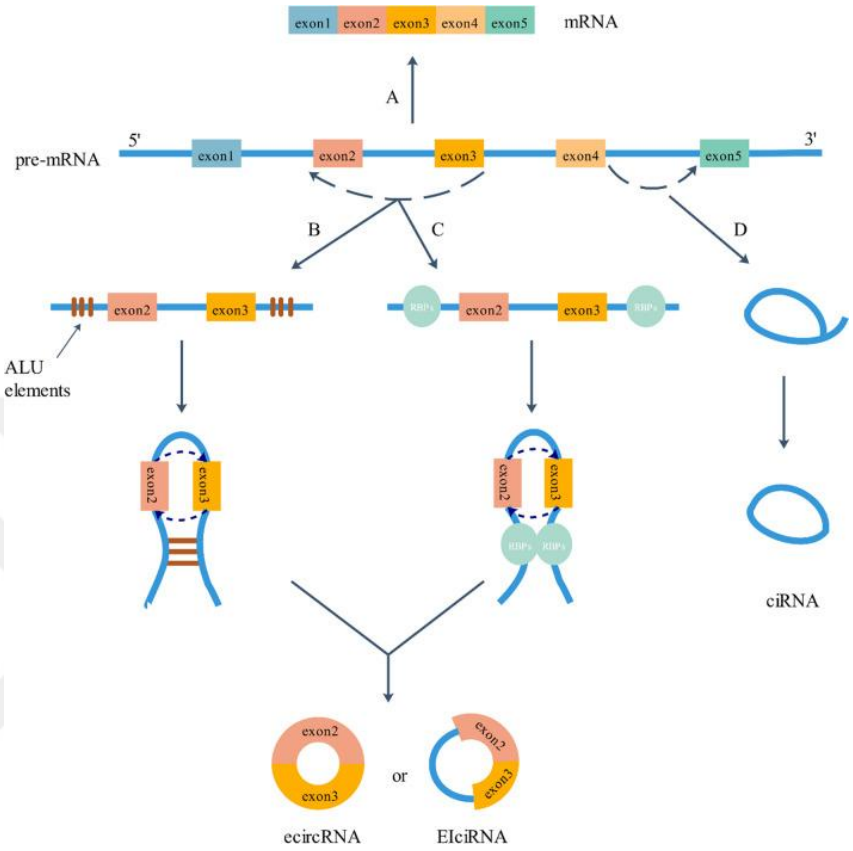
kalıplarına sahip olduğunu (Patop ve ark., 2019) ve türler arasında korunduğunu bulmuşlardır (Haddad ve Lorenzen, 2019). Çoğu circRNA sitoplazmada bulunmakla birlikte, bazıları ekzozomlar ve mitokondri gibi hücre altı bölmelerde de tespit edilebilir. Günümüzde circRNA'ların çekirdekte üretildiği düşünülmekle birlikte, sitoplazmaya nasıl taşındıkları halen netlik kazanmamıştır (Huang ve ark., 2020). CircRNA'lar, serbest 3' veya 5' uçları bulunmaması nedeniyle RNaz R ve diğer ekzonükleazlara karşı son derece stabil ve dirençli bir yapı sergiler (Suzuki ve ark., 2006). Bu nedenle, circRNA'ların yarı ömürleri, lineer RNA'larınkine (mRNA) kıyasla daha uzundur. Hücrelerdeki circRNA'ların ortalama yarı ömrü 48 saati aşarken, mRNA'lar ise ortalama yalnızca 10 saat dayanmaktadır (Li M. ve ark., 2019). Bu özellik, dairesel RNA'ları kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanıma son derece uygun hale getirmektedir (Huang ve ark., 2020).

CircRNA'ların biyogenez mekanizmalarının aydınlatılması, bu moleküllerin sınıflandırılması ve fonksiyonel rollerinin anlaşılması açısından temel bir öneme sahiptir. Klasik (kanonik) ekleme (canonical splicing) mekanizmasına göre, spliceozom kompleksinin aktivasyonuyla öncü mRNA'lardaki (precursor mRNA, pre-mRNA) intronlar uzaklaştırılır ve ekzonlar lineer mRNA oluşturacak şekilde ardışık olarak birleştirilir (Chen ve Yang, 2015) (Şekil 2.11 a). Ancak circRNA'lar, spliceozom aracılığıyla gerçekleşen pre-mRNA'ların ardışık olmayan geri ekleme (back-splicing) işlemi sonucu oluşur (Wang Y., ve Wang Z., 2015). Back-splicing sürecinde, yukarı akımdaki 5' splice donor bölgesi (genellikle "GT" başlangıç dizisi içeren), aşağı akımdaki 3' splice acceptor bölgesi ("AG" bitiş dizisi içeren) ile ters yönde eşleşerek kovalent olarak kapalı bir yapı meydana getirir (Wang Y., ve Wang Z., 2015; Zhang ve ark., 2016).

Back-splicingin verimliliği başlıca iki faktör tarafından düzenlenir: (1) İntronlar arası baz eşleşmeleri (ALU elementleri (Chen ve Carmichael, 2014) veya tamamlayıcı diziler (Zhang ve ark., 2014) aracılığıyla ekzonların yakınlaşması). (2) RNA bağlayıcı proteinlerin (RNA binding proteins, RBPs) rolü.

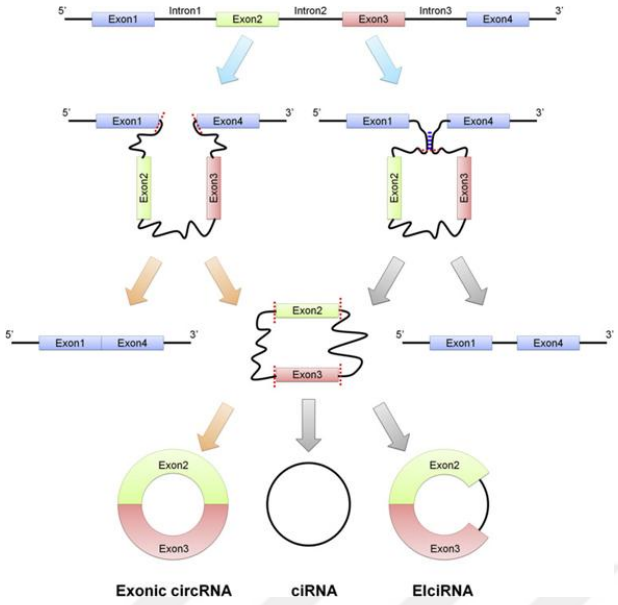
Örneğin, circHIPK3 oluşumu, tamamlayıcı ALU tekrarları içeren uzun intronik bölgeler gerektirir (Zheng ve ark., 2016). MBL (MBNL1), QKI ve FUS gibi RBP'ler ise

intronlardaki korunmuş dizilere bağlanarak circRNA'ların oluşumunu kolaylaştırmak için ekzon daireselleşmesini teşvik eder (Ashwal-Fluss ve ark., 2014) (Şekil 2.11 b, c).



Şekil 2. 11. CircRNA'ların biyogenezisi (Cheng ve ark., 2021)
A: Canonical splicing. Pre-mRNA'lardaki intronların uzaklaştırılıp ekzonların birleştirilerek lineer mRNA oluşturulduğu süreç. **B,C: Back-splicing.** İntron eşleşmesi ve RBP'ler, back-splicing yoluyla daireselleşmeyi teşvik ederek ekzonik circRNA'ları (ecircRNAs) veya ekzon-intronik circRNA'ları (EIciRNAs) oluşturabilir. **D: Intron splicing.**

CircRNA'lar aynı zamanda hücre altı lokalizasyon açısından da özgüllük gösterir. Ekzonik circRNA'lar ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunurken, dairesel intronik RNA'lar (ciRNA'lar) ve ekzon-intron circRNA'lar (EIciRNA'lar) (Şekil 2.12) gibi diğer circRNA tipleri özellikle çekirdekte zenginleşmiştir (Qu ve ark., 2018).



Şekil 2. 12. Genomik yapıya göre circRNA çeşitleri (He ve ark., 2017)

CircRNA'lar çeşitli mekanizmalarla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli roller üstlenirler:

1) **miRNA süngeri (sponge):** CircRNA'ların en önemli işlevsel mekanizmalarından biri miRNA sünger aktivitesi göstermeleridir (Khan ve ark., 2016; Du ve ark., 2017). miRNA'lar hedef genlerin mRNA'larına bağlanarak transkripsiyon ve translasyon sürecini negatif olarak düzenlemektedir (Yang ve ark., 2017). CircRNA'lar ise miRNA'lara bağlanmak için rekabet eden birden fazla miRNA bağlanma bölgesine sahiptir. Bunun sayesinde circRNA'lar miRNA'ya bağlanarak sponge eder ve miRNA'nın hedef mRNA'lar üzerindeki baskılayıcı etkisini nötralize etmektedir (Han ve ark., 2017; Liang ve ark., 2017).

2) **Protein Translasyonu:** Kodlamayan RNA kabul edilmelerine rağmen, bazı circRNA'ların iç ribozom giriş bölgeleri (internal ribosome entry site, IRES) aracılığıyla protein üretebildiği gösterilmiştir. CircRNA'ların protein kodlama işlevi hastalıklardaki rolü hakkında yeni bir bakış açısı sağlamaktadır (Yang ve ark., 2017).

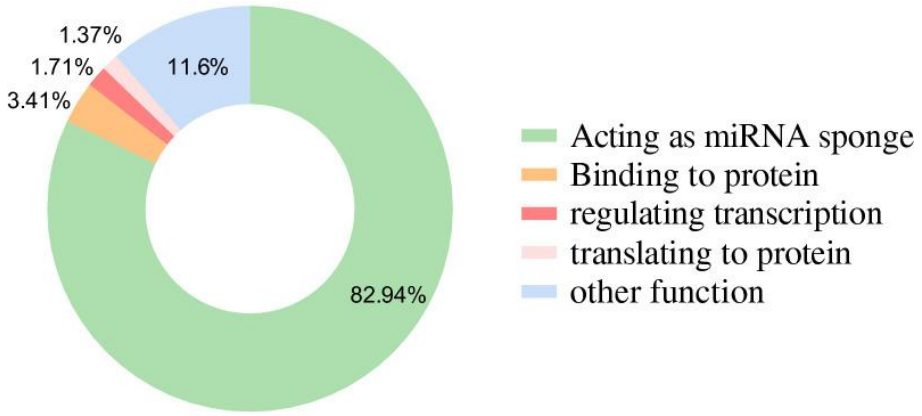
3) **Transkripsiyonel Düzenleme:** Çekirdekte baskın olarak yer alan ve nispeten düşük sayıda miRNA hedef bölgesi içeren, EIciRNA'lar ve ciRNA'lar transkripsiyon düzenlemesinde yer aldığı bilinmektedir (Qian ve ark., 2018; Li ve ark., 2018). Bazı çalışmalar, bu circRNA'ların parental genlerinin ifadesini düzenlediğini öne sürmüştür (Lei ve ark., 2018)

4) **RNA bağlayıcı proteinler ile etkileşim:** RBP'ler RNA metabolizmasının kritik düzenleyicileri olup çeşitli RNA süreçlerinde önemli roller üstlenmektedir (Pan ve ark., 2017). Son çalışmalar, circRNA'ların RBP'ler ile etkileşime girerek gen ifadesini birlikte düzenleyebildiğini ortaya koymuştur (Thomas ve Sætrom, 2014; Chen ve ark., 2021; Chen ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020).

5) **Alternatif Splicing Regülasyonu:** Dairesel RNA (circRNA) oluşumu ile klasik splicing süreçleri arasında dinamik bir rekabet bulunmaktadır (Ashwal-Fluss ve ark., 2014). Aynı ekzonun hem circRNA hem de lineer mRNA üretiminde kullanılması durumunda, bu iki süreç birbirini engeller: Ekzonların circRNA'ya dahil olma oranı arttıkça mRNA'daki aynı ekzonların miktarı azalır (Qian ve ark., 2018; Khan ve ark., 2016). Bu rekabet mekanizması, pre-mRNA'ların alternatif splicing dinamiklerini doğrudan etkileyerek gen ekspresyon profilinin değişmesine yol açar.

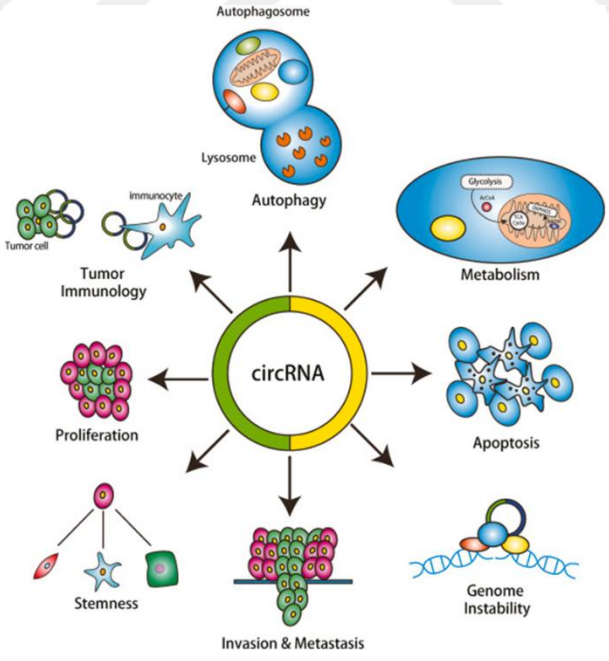
2.6.1. CircRNA'ların kanserdeki rolleri

CircRNA'ların insan vücut sıvılarında (serum, plazma, tükürük ve eksozomlar) yüksek stabilite ile bulunması ve önemli ölçüde artmış miktarlarda tespit edilebilmesi, bu molekülleri kanser için ideal biyobelirteç adayları haline getirmektedir (Li ve ark., 2015; Mumtaz ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, circRNA'ların kanser patogenezindeki en önemli ve yaygın işlevinin miRNA'ları bağlayarak (sponge etkisi) onkogenik veya tümör baskılayıcı sinyal yollarını düzenlemek olduğunu göstermektedir. circRNA'ların diğer fonksiyonel mekanizmaları ise kanserle ilişkili süreçlerde daha az katkı sağlamaktadır (Şekil 2.13) (Cheng ve ark., 2021).



Şekil 2. 13. CircRNA fonksiyonlarının kanserde oranı (Cheng ve ark., 2021)

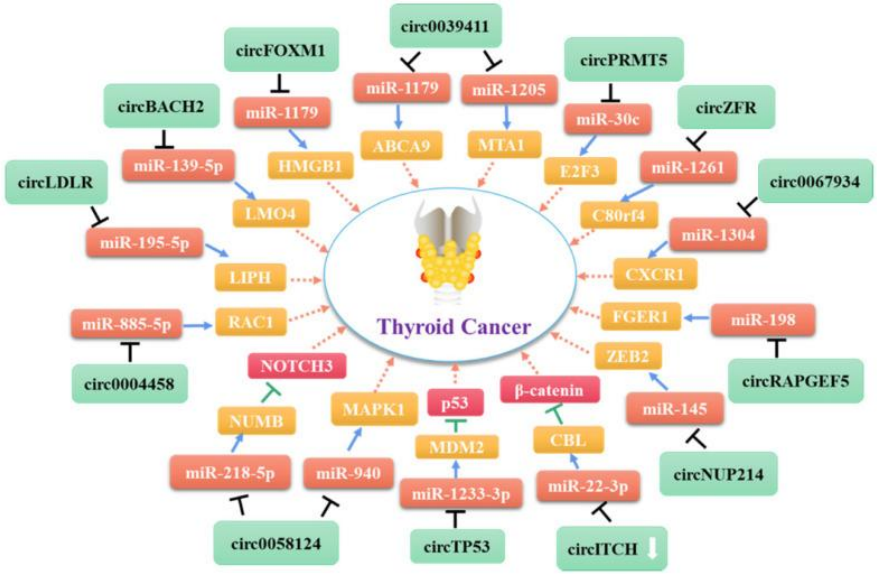
Yapılan çalışmalar, circRNA'ların insan kanserlerinin başlangıcı ve gelişiminde kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur (Shang ve ark., 2019) (Şekil 2.14). Örneğin, ZNF609 mRNA'sına homolog circ-ZNF609'in, çoklu kanser tipinin progresyonunda tümör destekleyici etkiler sergilediği belirlenmiştir (Wu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Shi ve ark., 2022).



Şekil 2. 14. Kanserlerde circRNA fonksiyonlarının genel gösterimi (Chen ve ark., 2021)

CircRNA'ların tiroid kanserindeki işlevsel rollerini aydınlatmaya yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Güncel veriler, circRNA'ların başlıca miRNA sünger mekanizmasıyla

tümör baskılayıcı veya tümör destekleyici roller üstlendiğini göstermektedir (Xia ve ark., 2021). Tiroid kanseriyle ilişkili circRNA mekanizmaları genellikle circRNA-miRNA-mRNA ekseni üzerinden incelenmektedir (Ruan ve ark., 2020). Örneğin, circBACH2'nin PTC'de onkojenik bir RNA olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. circBACH2 bir miRNA süngeri olarak PTC hücrelerinde miR-139-5p'i baskılayarak hedef gen LMO4 ekspresyonunu pozitif yönde düzenlemektedir (Cai ve ark., 2019). Yapılan başka bir çalışmada, circ-BACH2'nin papiller tiroid karsinomu (PTC) patogenezindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır. Deneysel bulgular, circ-BACH2'nin miR-139-5p-LMO4 eksenini düzenleyerek onkojenik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, circ-BACH2'nin PTC için potansiyel bir tanı belirteci ve terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (Cai ve ark., 2019). Genel olarak, tiroid kanseri progresyonu ile ilişkili circRNA'ların büyük çoğunluğu tümör hücrelerinde up-regule (yukarı düzenlenir) olmakta ve başlıca miRNA süngerleri olarak işlev görmektedir (Wei ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Xia ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021) (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15. Tiroid kanserinde circRNA'nın moleküler mekanizma ağı (CircRNA'lar miRNA süngerleri olarak görev yapar) (Zhang ve ark., 2021)

Son yıllarda yapılan araştırmalar sayesinde artan deneysel kanıtlar, circRNA'ların farklı mekanizmalar yoluyla tiroid kanserinin oluşumunu destekleyebileceğini veya engelleyebileceğini ileri sürmektedir. Çizelge 2.2 tiroid kanserinde circRNA'ların

patogenezdeki rolünü ve moleküler mekanizmalarını gösteren güncel çalışmaları sistematize etmektedir (Zhu ve ark., 2021).

Çizelge 2.2. Tiroid kanseri'nde circRNA'lar (Zhu ve ark., 2021, değiştirilerek alınmıştır)

Rolü	circRNA	İfade düzeyi	Mekanizma	Referans
İnvazivliği düzenleme (Regulating invasiveness)	circ_FAT1	PTC hücre hatlarında ve dokularda up regüledir	ZEB1'i düzenlemek için sünger miR-873	Liu ve ark., 2020
	circ_102171	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	β-catenin/TCF3/TCF4/LEF1 kompleksiyle etkileşimini engellemek için CTNNBIP1 ile etkileşime girer	Bi ve ark., 2018
	circ_BACH2	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	miR-139-5p süngerler ve hedef LMO4'ün baskılanmasını hafifletir	Cai ve ark., 2019
	circ_RASSF2	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	miR-1178 süngerler; TLR4 ekspresyonunu aşağı düzenler	Wu ve ark., 2020
	circ_0008274	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	AMPK/mTOR sinyal yolunu düzenler	Zhou ve ark., 2018
	circ_0103552	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-127	Zheng ve ark., 2020
	circ_FOXM1	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-1179; HMGB1 ekspresyonunu yukarı düzenler	Ye ve ark., 2020
	hsa_circ_0058124	TC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-940; MAPK1 protein seviyelerini aşağı düzenler	Yao ve ark., 2019; Shi ve ark., 2020
	circ_FNDC3B	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-1178; TLR4 ekspresyonunu aşağı düzenler	Wu ve ark., 2020
	circ_EIF3I	PTC dokularında up regüledir	Süngerler miR-149; KIF2A ekspresyonunu artırır	Wang ve ark., 2020
İnvazivliği düzenleme (Regulating invasiveness) (devamı)	circ_RAPGEF5	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-198; FGFR1'i yukarı düzenler	Shi ve ark., 2020
	hsa_circ_0124055	TC dokularında up regüledir	-	Sun ve ark., 2020
	hsa_circ_0101622	TC dokularında up regüledir	-	Sun ve ark., 2020
	circ_ABCB10	TC dokularında up regüledir	KLF6'yı aşağı düzenler	Han ve ark., 2020
Hücre döngüsünün düzenlenmesi (Regulation of the cell cycle)	circDOCK1	TC dokularında up regüledir	Süngerler miR-124; JAK/STAT/AMPK sinyal iletimini azaltır	Cui ve Xue., 2020
	has_circ_0008274	PTC dokularında up regüledir	AMPK/mTOR sinyal yolunun aktivasyonunu engeller	Zhou ve ark., 2018
	hsa_circ_0004458	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-885-5p; RAC1 aktive eder	Jin ve ark., 2018
	circ_0001666	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-330-5p/miR-193a-5p/miR-326	Qi ve ark., 2021
	circ_PSD3	PTC dokularında up regüledir	Süngerler miR-637'yi; HEMGN'yi düzenler ve PI3K/Akt sinyal yolunu etkiler	Li ve ark., 2021
Epitel-mezenkimal geçişin düzenlenmesi (Regulation of epithelial-mesenchymal transition)	circ_102002	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	HAS2'yi düzenlemek için miR-488-3p süngerler	Zhang ve ark., 2020
	circ_0067934	TC hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-1304; CXCR1 ifadesini up regüle eder	Wang ve ark., 2019
	circ_LDLR	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-195-5p'yi LIPH ekspresyonunu düzenler	Gui ve ark., 2020
	CIRS-7	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	EGFR'yi düzenlemek için miR-7 süngerler	Guo ve ark., 2020
Glikoz metabolizmasının düzenlenmesi (Regulation of glucose metabolism)	circCCDC66	TC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-211-5p'yi ve PDK4'ü up regüle eder	Salzman ve ark., 2013
	hsa_circ_0011290	PTC dokularında up regüledir	Süngerler miR-1252; FSTL1 ekspresyonunu pozitif olarak düzenler	Hu ve ark., 2020
	circPUM1	PTC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	Süngerler miR-21-5p; MAPK1'i down regüle eder	Li ve ark., 2021
Sisplatin direncinin artırılması (Enhancement of cisplatin resistance)	circEIF6	ATC dokularında ve hücrelerinde up regüledir	üngerler miR-144-3p; TGF-α ekspresyonunu artırır	Liu ve ark., 2018
Diğer (Other)	hsa_circ_0137287	PTC dokularında down regüledir	-	Lan ve ark., 2018
	hsa_circRNA_007148	PTC dokularında up regüledir	-	Ren ve ark., 2018
	hsa_circRNA_047771	PTC dokularında down regüledir	-	Ren ve ark., 2018

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler

Deney çalışmalarında kullanılan tüm kimyasal maddeler EKLER (EK1) kısmında verilmektedir.

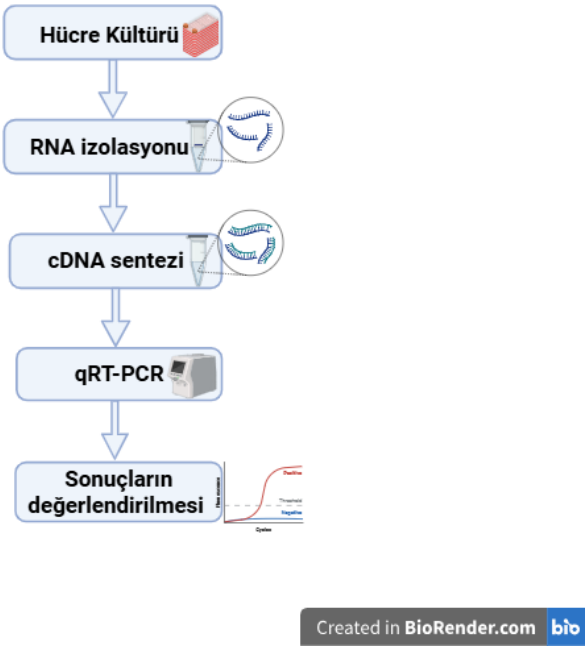
3.1.2. Deney çalışmalarında kullanılan sarf malzemeler

Deney çalışmalarında kullanılan tüm sarf malzemeler EKLER (EK2) kısmında verilmektedir.

3.1.3. Deney çalışmalarında kullanılan cihazlar

Deney çalışmalarında kullanılan tüm cihazlar EKLER (EK3) kısmında verilmektedir.

3.2. Yöntem



Şekil 3. 1. Çalışma kapsamında yapılacak olan uygulama ve yöntemlerin özet şeması

3.2.1. Hücre kültürü çalışması

Bu tez kapsamında kullanılan TPC-1, FTC-133 ve Nthy-ori 3-1 hücre hatları, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde görev yapan Prof. Dr. Ferda ARI'nın laboratuvarından temin edilmiştir. Hücreler, kriyoprotektan içerisinde -80°C'de saklanmıştır. Kanserli hücre modelleri olarak TPC-1 (İnsan Papiller Tiroid Karsinoma Hücreleri) ve FTC-133 (İnsan Foliküler Tiroid Karsinomu Hücreleri) kullanılırken, sağlıklı doku örneği olarak Nthy-ori 3-1 (İnsan Normal Tiroid Epitel Hücreleri) kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Hücre kültürü için besiyerinin hazırlanması

Kanser hücre hatları olan TPC-1 ve FTC-133 için DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) besiyeri "%1 penisilin-streptomisin, %10 FBS ve %1 L-glutamin" içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol hücre hattı olan Nthy-ori 3-1 için ise RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) besiyeri "%1 penisilin-streptomisin, %10 FBS ve %1 L-glutamin" içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.2.3. Hücre hatlarının kültür sürecine alınması

Dondurulmuş hücre hatları, -80°C'den çıkarılarak su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmüştür. Çözülen hücrelere, toplam hacmi 5 mL olacak şekilde yaklaşık 1 mL RPMI besiyeri eklenmiş ve karıştırılarak süspanse hale getirilmiştir. Bu işlem sonrasında, hücreler 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine 5 mL taze besiyeri eklenmiş ve pipet yardımıyla homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Her bir hücre hattı, 25 cm^2'lik flasklara ekilerek %5 CO_2 atmosferinde 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde kültürlenmiştir. Hızlı çoğalma potansiyeline sahip kanser hücre hatları olan TPC-1 iki gün; FTC-133 ise üç gün inkübasyona tabi tutulmuştur. Normal doku hücreleri olan Nthy-ori 3-1 hücre hattı ise bir hafta boyunca inkübasyon sürecine alınmıştır.

3.2.4. Hücrelerin pasajlama işlemi

25 cm²'lik flaskların tüm yüzeyine yayılan hücrelerin besin ortamı uzaklaştırılmış ve fazla besin ortamı PBS ile yıkanarak temizlenmiştir. Ardından, hücrelerin yüzeyine tamamen ulaşacak şekilde tripsin eklenip 2 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olmak için mikroskop altında kontrol yapılmış ve hemen ardından, tripsini inaktive etmek amacıyla hücrelere eşit miktarda besin ortamı eklenip santrifüjleme için flaska aktarılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatan uzaklaştırılmış ve hücre peleti 15 mL taze besin ortamında yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Hücreler, etiketlenmiş 75 cm²'lik flasklara aktarılmış ve hücrelerin homojen dağılımını sağlamak için flasklar yavaşça çalkalanmıştır. Ardından, hücreler 37°C ve %5 CO2 ortamında yeniden inkübe edilmiştir.

3.2.5. Hücrelerden total RNA izolasyonu

Bu tez kapsamında TPC-1, FTC-133 ve Nthy-ori 3-1 hücre hatlarından total RNA izolasyonu işlemini gerçekleştirmek amacıyla miRNeasy® Mini Kit (Cat.No: 217004) kullanılmıştır. Bu kit, hücre içerisindeki miRNA'lar dahil olmak üzere tüm RNA türlerinin izolasyonunu sağlamaktadır.

Deneye başlamadan önce santrifüj cihazı +4°C'ye ayarlanmıştır. Kültür aşaması tamamlandıktan sonra, hücreler izolasyon işlemi için üç ayrı 2 ml'lik eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Her bir tüpe 1000 µl PBS eklenmiş ve ardından +4°C'de 1000 rpm hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra supernatant atılarak üzerlerine 700 µl Qıazol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır; bu süreçte pelletin tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Ardından tüpler, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona alınmıştır. Daha sonra, her bir tüpe 140 µl kloroform ilave edilmiştir. Tüpler hızlı bir şekilde alt üst çalkalanmış ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından +4 °C'de 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra tüpler alınmış ve santrifüj cihazı +25°C'ye ayarlanmıştır. Her tüpte üç fazın oluştuğu gözlemlenmiş ve bu fazlardan, ikinci faza dokunulmadan dikkatlice üst faz alınarak, her örnek için yeni bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerlerine her bir örnek için

1,5 katı kadar (yaklaşık 400 µl) %100'lük etanolden eklenmiştir. İyice pipetaj yapılarak homojen bir karışım elde edilmiş ve bu karışımdan 700 µl alınıp filtreli tüplere (RNAaz mini kolon) aktarılmıştır. 10.000 rpm hızında 15 saniye satrifüj edilmiştir. Filtreli tüplerin altındaki toplama tüpü atılmış ve yerine yeni bir toplama tüpü takılmıştır. Üzerine 700 µl RWT buffer eklenmiş ve 15 saniye 10.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Ardından, altındaki toplama tüpü tekrar atılmış ve RNAaz mini kolona yeni bir toplama tüpü takılmıştır. Bu işlem sonrasında, kolonun üzerine 500 µl RPE buffer ilave edilerek 15 saniye 10.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü yeniden değiştirilmiş ve tekrar 500 µl RPE buffer eklenerek 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında, toplama tüpü değiştirilip, 10.000 rpm'de 1 dakika süreyle opsiyonel olarak boş santrifüj yapılmıştır. Toplama kabı atıldıktan sonra, RNAaz mini kolonlar 1,5 mL'lik eppendorf tüplere yerleştirilmiş ve filtrelerin tam ortasına denk gelecek şekilde 30 µl RNAaz-free su eklenmiştir. Ardından, 12.000 rpm'de +24°C'de 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası RNAaz mini kolonlar atılmış ve 1,5 ml'lik eppendorf tüplerde izole edilmiş RNA pelletinin elde edildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen RNA'lar, saklanmak üzere -80°C'deki buzdolabına kaldırılmıştır.

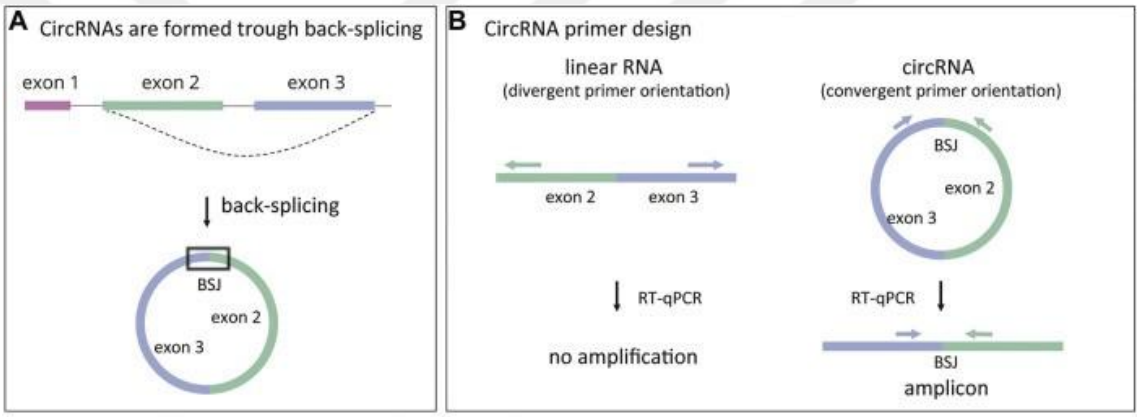
3.2.6. RNA örneklerinin konsantrasyon tayini

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığını tayin etmek için Nanodrop cihazı kullanılmıştır. Prosedür, öncelikle bilgisayarın açılmasıyla başlanmış ve ardından Nanodrop cihazına bağlı yazılım başlatılmıltır. Yazılım açıldıktan sonra, kör (BLANK) tanıma işlemi gerçekleştirilmiş; bu işlem, RNA elüsyonu sırasında kullanılan malzeme ile yapılmış ve bu çalışmada RNAaz-free ddH_2O kullanılmıştır.

Nanodrop cihazının kapağı açılarak, 2 µl RNAaz-free ddH_2O dikkatlice eklenmiştir. Yazılım arayüzünde "measure" tuşuna basarak BLANK ölçümü tamamlanmıştır. Cihazın üst ve alt yüzeyleri, kuru ve tüy bırakmayacak şekilde silinerek temizlenmiştir. Ardından, her bir RNA örneği sırayla 2 µl miktarında cihaza eklenmiştir. Her örnek eklendikçe, cihazın yüzeyleri tekrar silinerek kontaminasyon riski en aza indirilmiştir. Ölçümler, 230 nm, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, her bir örnek için kaydedilmiştir.

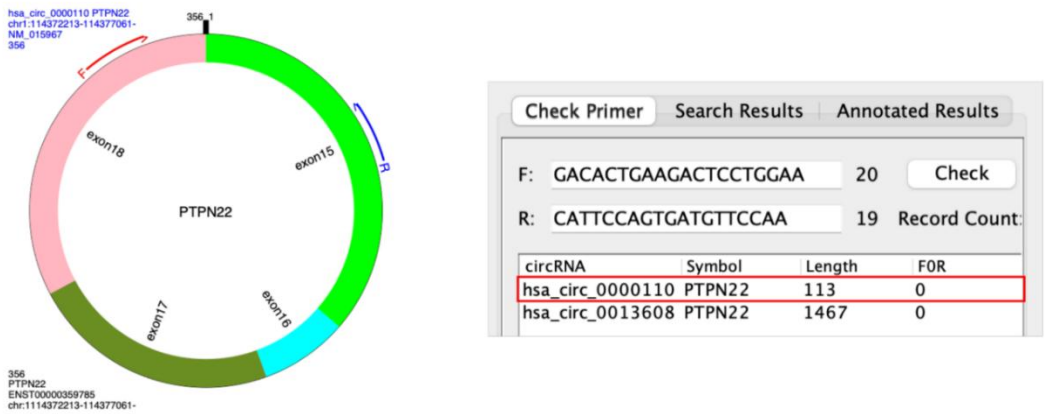
3.2.7. CircRNA primer tasarımı

CircRNA'lar, back-splicing (ters bağlanma) olarak adlandırılan bir süreç sonucu oluşur ve back-splice junction (BSJ) olarak tanımlanan kovalent kapalı bir döngü yapısı sergiler (Şekil 3.2 a). Bu karakteristik BSJ bölgesi, circRNA'ların lineer izoformlardan ayırt edilmesini sağlayan temel yapısal özelliği oluşturur. CircRNA'ya özgü primerler, BSJ bölgesini çevreleyen dizilere bağlanarak (convergent orientation) spesifik amplifikasyon gerçekleştirir. Aynı primerler lineer RNA üzerinde divergent oryantasyon sergilediğinden amplifikasyon yapamaz (Şekil 3.2 b). Bu mekanizma, circRNA tespitinde yüksek özgüllük sağlar (Vromman ve ark., 2022).



Şekil 3. 2. CircRNA'ların oluşumu ve primer tasarımı (Vromman ve ark., 2022, değiştirilerek alınmıştır)

CircRNA'ların tespiti için gerekli primerlerin tasarımında CircInteractome platformundan yararlanılmıştır. Söz konusu platform, Primer3 ve NCBI Primer Design Tool yazılımlarını entegre ederek, BSJ bölgelerini çevreleyen dizileri temel alarak primer dizaynı yapmaktadır (Dudekula ve ark., 2016). Primerlerin spesifikliğinin doğrulanması amacıyla circPrimer 2.0 programı kullanılmıştır (Şekil 3.3). Bu yazılım, aynı BSJ bölgesini paylaşan tüm circRNA varyantlarını tarayarak, primerlerin hedef dışı bağlanma potansiyelini analiz etmekte ve böylece yüksek özgüllük sağlamaktadır (Zhong ve Feng, 2022).



Şekil 3. 3. CircPrimer 2.0 programı kullanılarak circPTPN22 primerinin kontrolü

3.2.8. CircRNA'lar ve mRNA'lar için cDNA sentezleme işlemi

RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari olarak temin edilen Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot Number: 2575015) kullanılarak yapılmıştır. Deneye başlamadan önce RNA örnekleri -80 °C'den çıkarılıp buzun üzerine yerleştirilmiştir. cDNA sentez kitinin bileşenleri oda sıcaklığında çözdürülerek buzda bekletilmiştir. cDNA sentezi için nükleaz içermeyen 0,2 mL PCR tüplerine etiketler yazıldıktan sonra, cDNA sentez kitinin talimatları ve Nanodrop ile ölçülen RNA konsantrasyonları dikkate alınarak, Çizelge 3.1'de belirtilen protokole göre soğuk blok üzerinde reaksiyon kurulmuştur. cDNA miksinden 19 µL'lik 0,2 mL PCR tüplerine eşit olarak dağıtılmıştır. Üzerine, ortalama 1000 ng konsantrasyonundaki RNA örneklerinden 1'er µL eklenmiştir (tüplerde toplam hacim 20 µL olacaktır). Kısa bir vorteks ve santrifüj işlemi yapıldıktan sonra tüpler, PCR cihazına (Thermo Cycler) yerleştirilerek Çizelge 3.2'deki PCR protokolüne uygun olarak cDNA sentezi başlatılmıştır.

Çizelge 3.1. cDNA sentez bileşenleri

Örnek	5X Reaction Buffer	RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL)	10mM dNTP Mix	RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/µL)	Random Hexamer Primer	Nuclease-free H2O	Total Hacim
TPC-1	4 µL	1 µL	2 µL	1 µL	1 µL	10 µL	19 µL (+**1 µL RNA**) = 20 µL
FTC-133	4 µL	1 µL	2 µL	1 µL	1 µL	10 µL	19 µL (+**1 µL RNA**) = 20 µL
Nthy-ori 3-1	4 µL	1 µL	2 µL	1 µL	1 µL	10 µL	19 µL (+**1 µL RNA**) = 20 µL

*Aynı protokol kullanılarak her bir örnek için kontrol tüpleri hazırlanmıştır. (TPC-1(-Reverse T.), FTC-133(-Reverse T.) ve Nthy-ori 3-1(-Reverse T.) olacak şekilde toplam üç tane cDNA sentez bileşenleri içeren 0,2 mL PCR tüpü).

**Kontrol tüpleri Reverse Transcriptase içermemektedir.

***Kontrol tüplerde toplam hacmi 20 µL tamamlayabilmek için Nuclease-free H2O'dan 11 µL eklenmiştir.

Çizelge 3.2. cDNA sentez koşulları

Ayarlama	Döngü 1	Döngü 2	Döngü 3	Döngü 4
Sıcaklık	25°C	42°C	70°C	4°C
Süre	5 dk	60 dk	5 dk	∞

İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, cDNA örnekleri sonraki işlemler gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.9. CircRNA'lar ve mRNA'lar için gerçek-zamanlı PCR (qRT-PCR) ile gen ifadesi ölçümü

RNA'lardan elde edilen cDNA örneklerinin qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için, Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit (LOT Number: 0000194566) (Madison, USA) kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce, cDNA örnekleri ddH2O ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. Deneyin ilk aşamasında, Çizelge 3.4'te yer alan protokole uygun olarak soğuk blok üzerinde qPCR bileşen karışımı (mix) hazırlanmıştır. Her bir gen için farklı primer çiftleri kullanıldığı için (bkz. Çizelge 3.6) toplamda 4 ayrı qPCR karışımı oluşturulmuştur. Her cDNA örneği için üçlü teknik tekrar (triplet) olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Hazırlanan bileşen karışımından, soğuk blok üzerinde bulunan

plakanın (plate) her kuyucuğuna 18 µl miktarında dağıtılmıştır. Son aşamada, her kuyucuğa 2 µl cDNA örneği eklenmiştir. Plaka (plate) kısa bir süre santrifüj edilerek tüm sıvıların kuyucuğun dibine toplanması sağlanmış ve ardından AB (Applied Biosystems) StepOnePlus qPCR (Real-Time PCR) cihazına yerleştirilmiş, Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi cihaz ayarları yapılmıştır.

qRT-PCR deneyinden elde edilen verilerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi uygulanmıştır (Pfaffl, 2001) (bkz. Çizelge 3.3). Sonuçların normalizasyonu, referans gen olarak GAPDH ve circHIPK3 genleri (housekeeping genes) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde kullanılan formüller

Grup	**Hedef Gen (Ct)**	**Housekeeping Gen (Ct)**	**ΔCt (Hedef gen - Housekeeping Gen)**	**ΔΔCt (ΔCt Deney – ΔCt Kontrol)**	**$2^{-\Delta\Delta CT}$ (Fold Gene Expression)**
Kontrol	X1	Y1	X1-Y1	0	1
Deney	X2	Y2	X2-Y2	(X2-Y2)-(X1-Y1)	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$

Çizelge 3.4. qPCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	**Hacim (1 Rxn)**	**Hacim (15 Rxn)**
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10 µL	150 µL
Forward Primer (20X)	1 µL	15 µL
Reverse Primer (20X)	1 µL	15 µL
Supplemental CXR Reference Dye (if required)	0,2µL	3 µL
Nuclease-Free Water	5,8 µL	87 µL
	(18 µL bileşenler + **2µL cDNA**) Toplam hacim: 20 µL (her kuyucukta)	(270 µL bileşenler:15Rxn=18µL) (18µL bileşenler + **2µL cDNA**) Toplam hacim: 20 µL (her kuyucukta)

Tablodaki hesaplama her primer çifti için yapılmıştır (circPTPN22, PTPN22, circHIPK3 ve GAPDH primerleri olacak şekilde, toplam dört adet 1,5 mL'lik qPCR reaksiyon bileşenlerini içeren eppendorf tüpü). Bileşen karışımını (mix) hazırlarken cDNA eklenmeyecektir. Her hücre hattının cDNA'sı, 96 kuyucuktan oluşan PCR plakasındaki (plate) kuyucuklara en son ilave edilecektir. RXN sayısı arttığında cDNA örnekleri

standart olarak 2 µL hacminde alınmalıdır. 96 kuyucuktan oluşan PCR plakasındaki kullanılan her kuyucuğunda toplam hacim 20µL olmalıdır.

Çizelge 3.5. qPCR'ın çalışma koşulları

Step	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Enzim Aktivasyon	95°C	2 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Annealing	60°C	1 dk	
Melting Curve			

Çizelge 3.6. qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları

Primer	**Sekansı (5'→3')**
hsa_circ_0000110 (circPTPN22)	(F) : 5′- GACACTGAAGACTCCTGGAA -3
	(R) : 5′- CATTCCAGTGATGTTCCAA -3′
PTPN22	(F) : 5′-TTGAACCAGGAGTCAGCTGT-3′
	(R) : 5′-ATGTTCCACCCCATTCCAGT-3′
circHIPK3	(F) : 5′-GTGAACAAGTCCAAGAGGACC-3′
	(R) : 5′-ACAGATGCTCTTCAAGGATGC-3′
GAPDH	(R) : 5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′
	(R) : 5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′

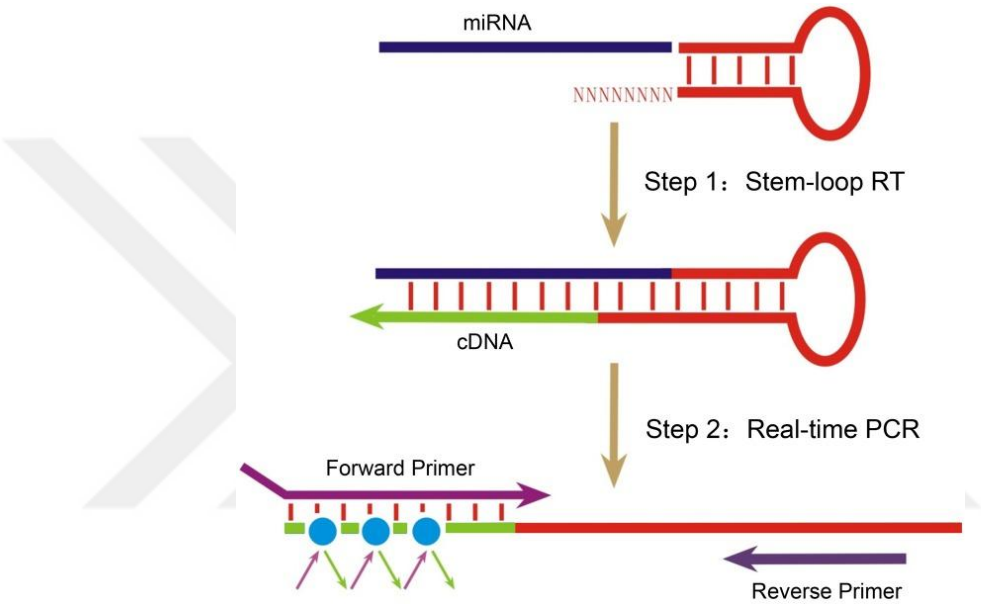
3.2.10. Aday miRNA'ların *in silico* analizi

"circPTPN22-miRNA-PTPN22 mRNA" etkileşim ağını oluşturmak amacıyla ara molekül olan miRNA'yı belirlemek için in silico analiz gerçekleştirilmiştir. PTPN22'nin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi için miRDB (Chen ve Wang, 2020) ve miRWalk (Sticht ve ark., 2018) veritabanları kullanılmıştır. CircPTPN22 tarafından düzenlenmesi muhtemel miRNA'lar ise CircInteractome (Dudekula ve ark., 2016) ve circBANK (Liu ve ark., 2019) veritabanlarından elde edilmiştir.

Daha sonra, bu iki moleküle de etkileşime giren ortak miRNA adaylarının kanserle olan bağlantılarını doğrulamak amacıyla dbDEMC (Yang ve ark., 2017) veritabanı kullanılarak tiroid kanseriyle ilişkileri incelenmiş ve PubMed'de sistematik bir literatür taraması yapılmıştır. Sonuç olarak hem PTPN22 hem de circPTPN22 ile etkileşime girebilen ve tiroid kanseri patogenezinde rol oynayabilecek hedef miRNA'lar belirlenmiştir.

3.2.11. MiRNA primer tasarımı

cDNA sentez aşamasında random primerler yerine Chen ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışma referans alınarak tasarlanan miRNA-spesifik stem-loop yapıda ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) primerleri kullanılmıştır. miRNA profil taraması ve kantifikasyonu için önerilen evrensel stem-loop qRT-PCR yöntemi Şekil 3.4'te şematize edilmiştir (Chen ve ark., 2005; Liu, 2014).



Şekil 3. 4. miRNA Taramasında Evrensel (Universal) Stem-Loop Primer (USLP) Yöntemi Şeması (Liu, 2014)

Hsa-miR-31-5p için tasarlanan stem-loop RT primerinin dizaynı aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Temel Yapı:

Tüm stem-loop primerlerde ortak olan
5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3'
kalıp dizisi kullanılmıştır.

2. Reverse complementerite sekansı:

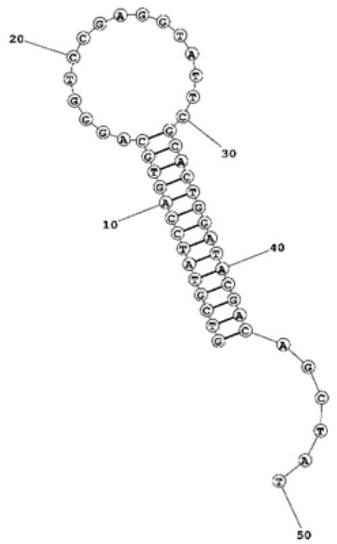
Hedef miRNA olan hsa-miR-31-5p'nin sekansı mirBase web sitesinden (http://www.mirbase.org/) alınarak (AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU) son 6 nükleotidi (AUAGCU) belirlenmiştir (Kozomara ve ark., 2019). Ters tamamlayıcı (Reverse complementerite) hesaplaması için bu altı nükleotid Reverse Complement tool (https://reverse-complement.com) kullanılarak analiz edilmiş ve AGCTAT sekansı elde edilmiştir.

3. Final stem-loop RT Primer Dizisi:

Kalıp dizinin 3' ucuna reverse complementerite sekansı eklenerek final stem-loop RT primer dizisi oluşturulmuştur:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTAT-3'

Şekil 3.5'te gösterilen RT-miR-31-5p primerin ikincil yapısı ve potansiyel katlanma şekli https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/ bioinformatik araçlarla analiz edilmiştir (Reuter ve Mathews, 2010).



Şekil 3. 5. RT-miR-31-5p stem-loop primerinin ikincil yapısı

3.2.12. MiRNA'lar için cDNA sentezleme işlemi

cDNA sentezi için ticari olarak temin edilen High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Deney, kitin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup, protokolünde yer alan random primer yerine stem-loop RT primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.7.). cDNA sentezinde her bir reaksiyon için 10 ng RNA ve 2 µM final konsantrasyonda stem-loop primer kullanılmıştır.

İlk olarak, TPC-1, FTC-133 ve Nthy-ori 3-1 hücre hatlarından elde edilen RNA örnekleri stem-loop RT primerler ile karıştırılarak toplam altı adet tüp olacak şekilde (üç tüpte RT-miR-31-5p, diğer üç tüpte ise RT-U6 primerleri) reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Ardından tüpler 65°'de 5 dakika boyunca inkübe edilerek (Çizelge 3.8. adım 1) hemen buz üzerine alınmıştır. Bu işlem sayesinde RNA moleküllerindeki ikincil yapıların çözülmesi ve primerlerin hedef dizilere daha etkin bir şekilde bağlanması amaçlanmıştır. İkinci aşamada, Çizelge 3.8. adım 2 de belirtilen protokole göre soğuk blok üzerinde nükleaz içermeyen 0,2 mL PCR tüpleri kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. Karışımın homojenizasyonu için kısa süreli vorteks uygulamasını takiben santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve tüpler PCR cihazına (Thermo Cycler) yerleştirilerek cDNA sentezi başlatılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, cDNA örnekleri sonraki işlemler gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.7. RT-miR-31-5p ve RT-U6 Stem-loop primerlerin sekansları

Primer	**Sekansı (5'→3')**
RT-miR-31-5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTAT-3'
RT-U6	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATA-3'

Çizelge 3.8. Stem-loop RT cDNA sentezi için kullanılan inkübasyon adımları, sentez koşulları ve bileşenler

İnkübasyon Adımları	**Sentez Koşulları**	**Bileşen**	**Hacim**
1	65°C-5 dk	Stem-loop RT Primer (2 µM)	1,0 µl
		RNA (10ng)	5 µl
2	25°C-10 dk 37°C-120 dk 85°C-5 dk	10X Reverse Transcriptase Buffer	2,0 µl
		25X Deoxynucleotide Triphosphates Mix	0,8 µl
		MultiScribeTM Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl
		Nuclease-free H_2O	10,2 µl

3.2.13. MiRNA'lar için gerçek-zamanlı PCR (qRT-PCR) ile gen ifadesi ölçümü

Stem-loop RT yöntemiyle sentezlenen cDNA örneklerinin qRT-PCR işleminin analizi, BlasTaqTM 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials) kit bileşenleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel işlemler 3.2.9 bölümünde belirtilen protokole uygun şekilde yürütülmüş olup, cDNA örnekleri seyreltilmemiş ve verilerin normalizasyonunda referans olarak U6 geni (housekeeping gene) kullanılmıştır. Deneysel parametreler; kullanılan reaktifler (Çizelge 3.9), primer sekansları (Çizelge 3.10) ve termal sikler koşulları (Çizelge 3.11) şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 3.9. miRNA için qPCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	**Hacim (1 Rxn)**
BlasTaqTM 2X qPCR	10 µL
Forward Primer (10 µM)	0,5 µL
Reverse Primer (10 µM) (Universal)	0,5 µL
Nuclease-Free Water	7 µL
	(18 µL bileşenler + **2µL cDNA**) Toplam hacim: 20 µL (her kuyucukta)

Çizelge 3.10. miRNA için qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları

Primer	**Sekansı (5'→3')**
hsa-miR-31-5p	(F): 5'- GCCAGGCAAGATGCTGGCATA -3'
	(Universal Reverse): 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	(F): 5'- CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	(Universal Reverse): 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Çizelge 3.11. miRNA için qPCR'ın çalışma koşulları

Step	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Enzim Aktivasyon	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Annealing	60°C	1 dk	
Melting Curve			

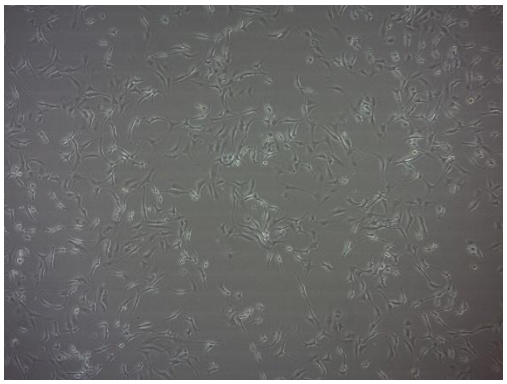
4. BULGULAR

4.1. TPC-1, FTC-133 ve Nthy-Ori 3-1 Hücre Hatlarının Mikroskopik Analiz Sonuçları

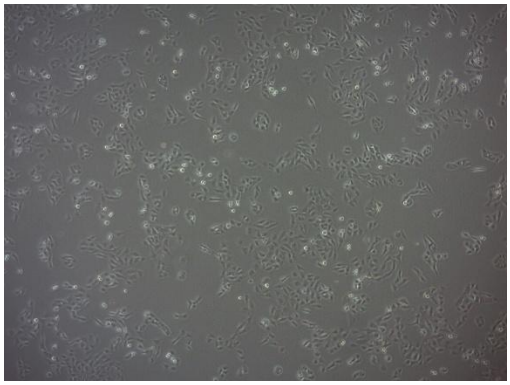
Bu çalışmada, tiroid kanseri hücre hatları olarak insan foliküler tiroid karsinom hücreleri (FTC-133) ve insan papiller tiroid karsinom hücreleri (TPC-1), sağlıklı kontrol hücre hattı olarak ise insan foliküler tiroid epitel hücreleri (Nthy-ori 3-1) mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur. Şekil 4.1'de TPC-1 hücre hattının, Şekil 4.2'de FTC-133 hücre hattının, Şekil 4.3'te ise Nthy-ori 3-1 hücre hattının morfolojik özellikleri gösterilmektedir.



Şekil 4. 1. Tiroid kanseri hücrelerinin (TPC-1 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)



Şekil 4. 2. Tiroid kanseri hücrelerinin (FTC-133 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)



Şekil 4. 3. Normal tiroid epitel hücrelerinin (Nthy-ori 3-1 hattı) mikroskop görüntüsü (4x)

4.2. RNA Örneklerinin Nanodrop Analiz Sonuçları

Sağlıklı kontrol tiroid hücre hattı ve tiroid kanseri hücre hatlarından elde edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri, ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 cihazı aracılığıyla belirlenmiştir. Ölçüm sırasında, her RNA örneğinden 2 µl alınmış ve blank olarak 2 µl RNAaz-free ddH2O kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. RNA örneklerinin nanodrop analiz sonuçları

Hücre hattı	Konsantrasyon (ng/ µl)	A260/280	A260/230
TPC-1	1428,9	2,04	2,09
FTC-133	1190,6	2,02	2,04
Nthy-ori 3-1	1239,5	2,04	2,00

4.3. CircRNA'ların ve mRNA'ların Gerçek-Zamanlı PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları

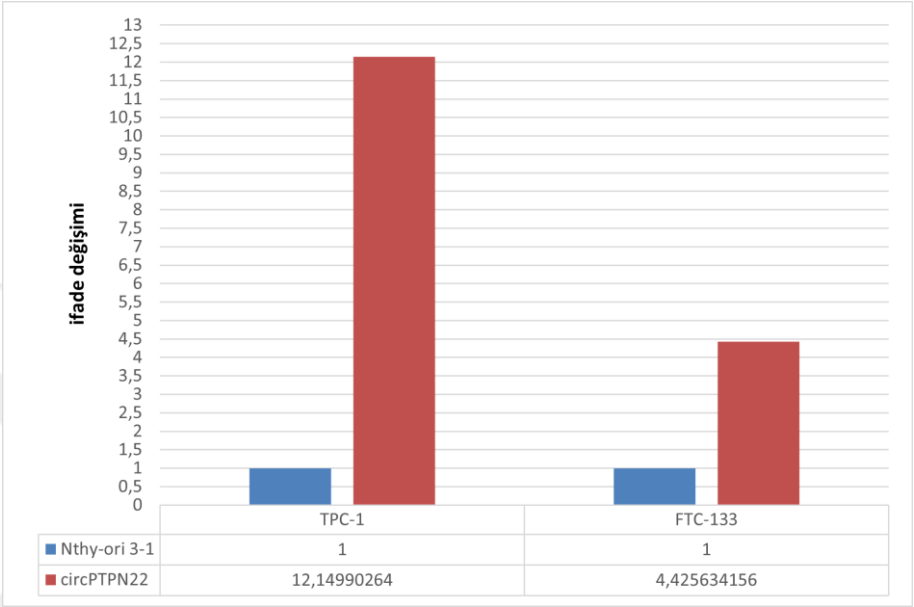
Sağlıklı kontrol tiroid hücre hattı (Nthy-ori 3-1) ile tiroid kanseri hücre hatları (TPC-1; FTC-133) arasındaki gen ifade değişiklikleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Analiz, AB StepOnePlus qPCR cihazı kullanılarak Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit (Madison, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. circPTPN22, PTPN22, circHIPK3 ve GAPDH için spesifik primerler (bkz. Çizelge 3.5) kullanılarak qRT-PCR reaksiyonları yapılmıştır.

Referans gen olarak circPTPN22 ifadelerinde circHIPK3, lineer PTPN22 ifadelerinde ise GAPDH kullanılmıştır. qPCR reaksiyon sonucunda elde edilen Ct değerleri (bkz. Çizelge 4.2) kat değişimini tespit etmek üzere $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar grafiksel olarak sunulmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Hedef gen olan circPTPN22 ve internal kontrol circHIPK3'e ait melting curve analizlerinde tek pik oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Benzer şekilde, PTPN22 mRNA'sı ve referans gen GAPDH için yapılan analizlerde de tek pik erime eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.7).

Çizelge 4.2 qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri

Hücre hattı	**Genler**	**PCR plate kuyucuğu**	**Ct değeri**	**Ortalama Ct değeri**
TPC-1	circPTPN22	1	26,61473083	26,7402737935384
		2	26,23587418	
		3	27,37021637	
	PTPN22	1	27,74826622	28,24509366666667
		2	28,43264771	
		3	28,55436707	
	circHIPK3	1	22,69884872	22,33106676737467
		2	21,86964417	
		3	22,42470741	
	GAPDH	1	23,61764336	23,55173397
		2	23,48582458	
FTC-133	circPTPN22	1	27,7157135	27,23768043518067
		2	26,91644669	
		3	27,08088112	
	PTPN22	1	30,9319725	30,96331278333333
		2	31,05243683	
		3	30,90552902	
	circHIPK3	1	20,96737289	21,37148475646973
		2	21,82439041	
		3	21,32269096	
	GAPDH	1	24,42663574	24,20937220333333
		2	24,17877007	
		3	24,0227108	
Nthy-ori 3-1	circPTPN22	1	29,23482895	29,29562123616537
		2	29,41753578	
		3	29,23449898	
	PTPN22	1	32,96466064	33,20994440666667
		2	33,17347336	
		3	33,49169922	
	circHIPK3	1	21,25862694	21,28354136149087
		2	21,18439674	
		3	21,4076004	
	GAPDH	1	24,44683838	24,61931800666667
		2	24,9912796	
		3	24,41983604	

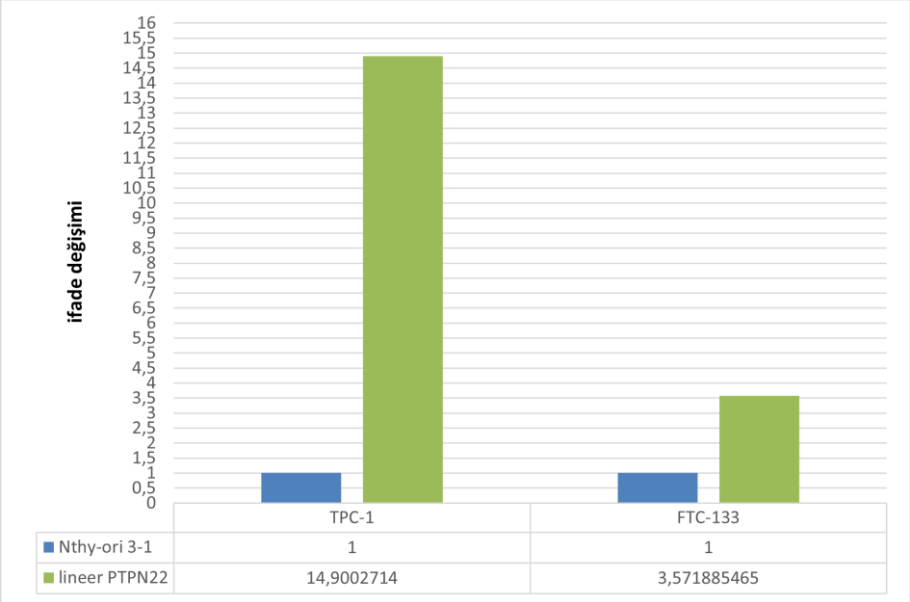
Şekil 4.4'te sunulan veriler, circPTPN22'nin circHIPK3 ile normalize edilerek, tiroid kanseri hücre hatlarının (TPC-1 ve FTC-133), sağlıklı kontrol hücre hattına (Nthy-ori 3-1) göre ifade değişim grafiğini göstermektedir. TPC-1 hücre hattında circPTPN22'nin ifade değişim değeri 12,15; FTC-133 hücre hattında ise 4,43 kat arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 4. Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) circPTPN22'nin ifade değişim grafiği

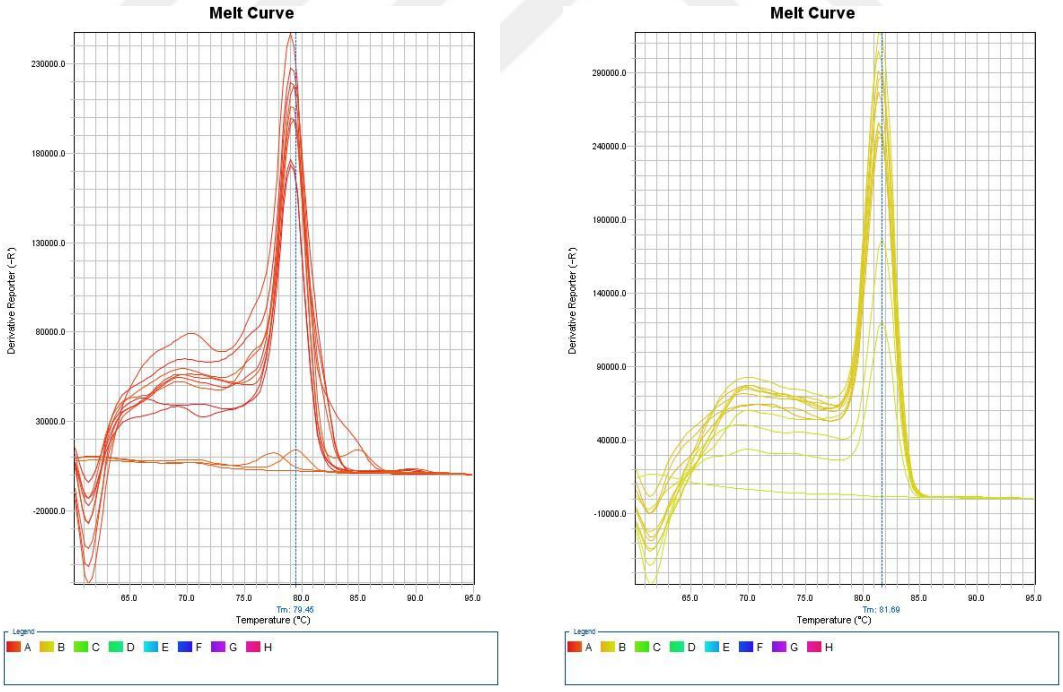
circHIPK3 ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. Sağlıklı kontrol hücre hattı (Nthy-ori 3-1) 1 olarak kabul edilmiştir.

Benzer şekilde, Şekil 4.5'te sunulan veriler, lineer PTPN22'nin GAPDH'e göre normalize edilerek, tiroid kanseri hücre hatlarının (TPC-1 ve FTC-133), sağlıklı kontrol hücre hattına (Nthy-ori 3-1) göre ifade değişim grafiğini sunmaktadır. PTPN22 mRNA'sının ifade değişim değeri TPC-1 hücre hattında 14,9; FTC-133 hücre hattında ise 3,57 kat artış olarak hesaplanmıştır.

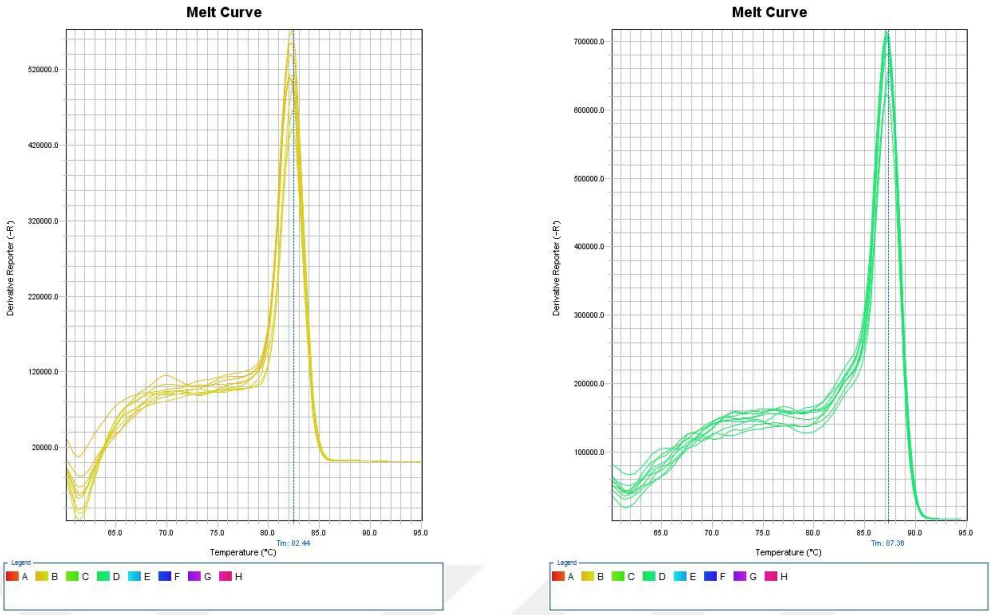


Şekil 4. 5. Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) lineer PTPN22'nin ifade değişim grafiği

GAPDH ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. Sağlıklı kontrol hücre hattı (Nthy-ori 3-1) 1 olarak kabul edilmiştir.

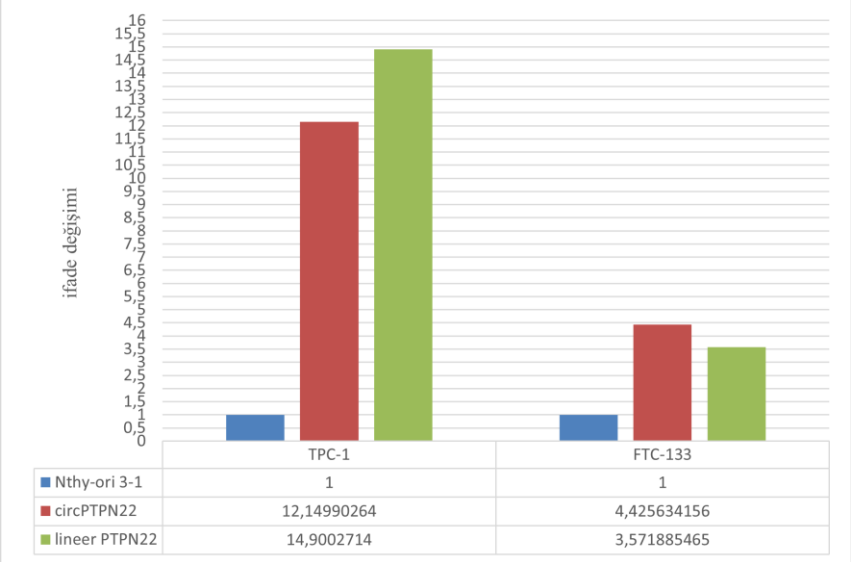


Şekil 4. 6. circPTPN22'nin (kırmızı) ve internal kontrol olarak kullanılan circHIPK3'ün (sarı) melting-curve grafiği



Şekil 4. 7. PTPN22'nin (sarı) ve referans gen olarak kullanılan GAPDH'in (yeşil) melting-curve grafiği

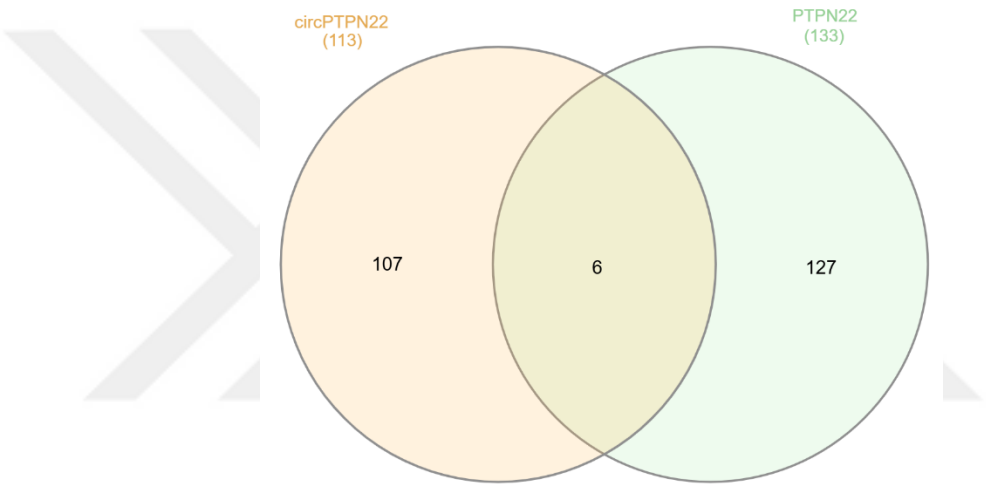
Bu bulgular, circPTPN22 ve lineer PTPN22'nin her iki tiroid kanseri hücrelerinde yüksek seviyelerde ifade edildiğini göstermekte ve circPTPN22 ile PTPN22 mRNA artışlarının birbirine paralel olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. circPTPN22 ve PTPN22 mRNA artışlarının kıyaslanması

4.4. Aday MiRNA'ların *in silico* Analiz Sonuçları

Aday miRNA taraması yapılırken *in silico* tarama sonuçlarına göre, circPTPN22'nin 113 adet ve PTPN22'nin 133 adet hedef miRNA ile etkileşim potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir. Yapılan kesişim analizinde, bu miRNA'ların 6 tanesinin her iki molekül ile de etkileşime girebileceği öngörülmüştür (Şekil 4.9). Bu ortak miRNA'lar, circPTPN22 ve PTPN22 arasındaki düzenleyici ağın oluşumunda kritik bir rol oynayabileceği ön görülmektedir.



Şekil 4. 9. circPTPN22 ve PTPN22 molekülleri ile potansiyel olarak etkileşime girebilen miRNA'ların dağılımını gösteren Venn diyagramı

Çalışmada belirlenen hedef miRNA'ların verileri EKLER bölümünde sunulmuştur. (EK 4: circPTPN22 ile etkileşim gösteren miRNA'lar, EK 5: PTPN22 genini hedef alan miRNA'lar, EK 6: Her iki molekül ile de etkileşime giren ortak miRNA'lar)

Toplam 6 ortak miRNA tanımlanmış olup (Ek 6), bunlardan dbDEMC veritabanı analizlerine göre dört miRNA'nın (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-6499-3p ve hsa-miR-6825-5p) tiroid kanseri patogeneziyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Hedef miRNA'ları daha kesin olarak belirlemek amacıyla, bu dört miRNA UALCAN (Chandrashekar ve ark., 2017, 2022) veritabanında analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda,

yalnızca hsa-miR-145-5p ve hsa-miR-31-5p'nin tiroid kanseriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında, hsa-miR-31-5p kullanılmıştır.

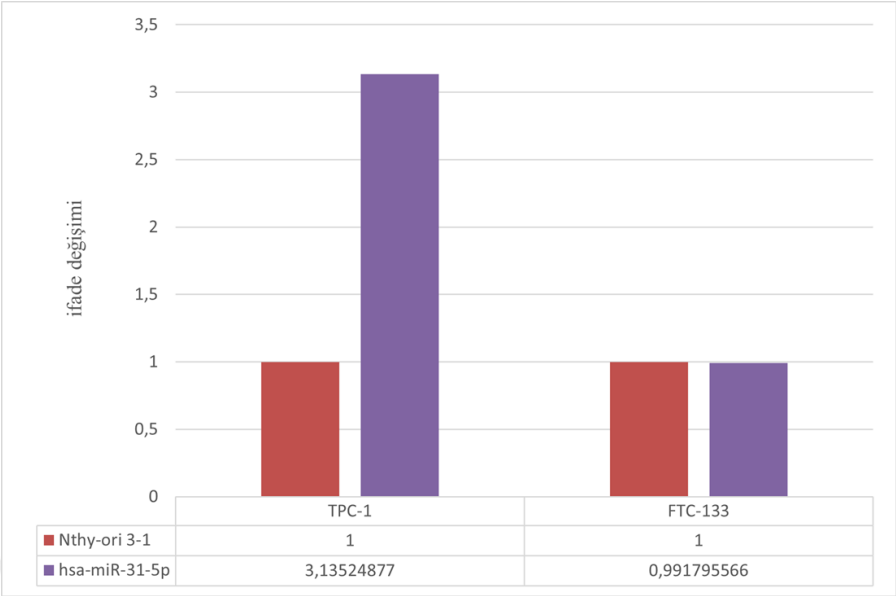
4.5. MiRNA'ların Gerçek-Zamanlı PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları

Sağlıklı kontrol tiroid hücre hattı (Nthy-ori 3-1) ile tiroid kanseri hücre hatları (TPC-1; FTC-133) arasındaki hsa-miR-31-5p ifade değişiklikleri, qRT-PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Deney sonuçlarının normalizasyonu için referans gen olarak U6 kullanılmıştır. qPCR reaksiyon sonucunda elde edilen Ct değerleri (bkz. Çizelge 4.3) kat değişimini tespit etmek üzere $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar grafiksel olarak sunulmuştur (Şekil 4.10).

Çizelge 4.3. miRNA'ların qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri

Hücre hattı	Genler	PCR plate kuyucuğu	Ct değeri	Ortalama Ct değeri
TPC-1	hsa-miR-31-5p	1	19,19651604	18,99459457
		2	18,81040573	
		3	18,97686195	
	U6	1	29,12234497	29,10084152
		2	28,98324013	
		3	29,19693947	
FTC-133	hsa-miR-31-5p	1	20,21806526	20,1902771
		2	19,97957039	
		3	20,37319565	
	U6	1	28,6138134	28,63605881
		2	28,60098267	
		3	28,69338036	
Nthy-ori 3-1	hsa-miR-31-5p	1	20,30972481	20,34703573
		2	20,04902267	
		3	20,6823597	
	U6	1	28,68608475	28,80470276
		2	28,72060776	
		3	29,00741577	

Şekil 4.10'da sunulan veriler, hsa-miR-31-5p'nin U6 ile normalize edilerek, tiroid kanseri hücre hatlarının (TPC-1 ve FTC-133), sağlıklı kontrol hücre hattına (Nthy-ori 3-1) göre ifade değişim grafiğini göstermektedir. TPC-1 hücre hattında hsa-miR-31-5p'nin ifade değişim değeri 3,13 kat arttığı; FTC-133 hücre hattında ise 0,99 fark olmadığı şeklinde belirlenmiştir.



Şekil 4. 10 Tiroid kanseri hücre hatlarında (TPC-1 ve FTC-133) hsa-miR-31-5p'nin ifade değişim grafiği

U6 ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. Sağlıklı kontrol hücre hattı (Nthy-ori 3-1) 1 olarak kabul edilmiştir.

Bu bulgular, hsa-miR-31-5p'nin TPC-1 tiroid kanseri hücre hattında sağlıklı hücre hattına göre yüksek ifade edildiğini göstermektedir. FTC-133 hücre hattında ise hsa-miR-31-5p'nin ifadesinde herhangi bir belirgin değişiklik görülmemektedir.

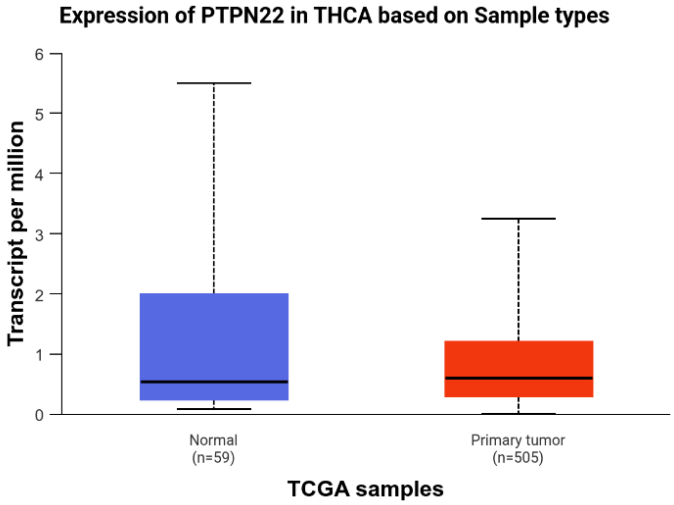
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son dönemde, kanser biyolojisi araştırmalarında dairesel RNA'lar özellikle biyobelirteç potansiyeli ile önemli bir odak noktası haline gelmiştir (Huang ve ark., 2020). Bu bağlamda, T hücre reseptör sinyalizasyonunun negatif düzenleyicisi PTPN22 geninden türeyen circPTPN22 molekülü dikkat çekicidir. PTPN22'nin hem otoimmün hastalıklarda hem de çeşitli kanser türlerinde rol oynadığı bilinmektedir (Tang ve ark., 2022). CircPTPN22'nin çeşitli kanser türlerindeki ekspresyon düzeyleri Tablo 5.1'de özetlenmiştir. Ancak, tiroid kanserinde circPTPN22'nin potansiyel tanısal değeri ve fonksiyonları hâlâ tam olarak aydınlatılamamış ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 5.1. circPTPN22'nin çeşitli kanserlerdeki ekspresyon düzeyi

Kanser	circPTPN22
Tiroid kanseri	?
Pankreas kanseri	Ekspresyonunda artış (He ve ark., 2023)
Akciğer kanseri	Ekspresyonunda artış (Tan ve ark., 2020)
Kolorektal kanser	Düşük ekspresyon (Bian ve ark., 2018)
Mide kanseri	Ekspresyonunda artış (Ma ve ark., 2021, 2024)

Literatürde PTPN22 geninin tiroid karsinomundaki rolünü inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır ve bu genin hastalık patogenezindeki kesin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Özellikle TPC-1 ve FTC-133 gibi yaygın kullanılan tiroid kanseri hücre hatlarında lineer PTPN22 ve circPTPN22 ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Zhang ve arkadaşlarının (2021) Oncomine veri tabanı üzerinde gerçekleştirdiği biyoinformatik analiz çalışmasında, papiller tiroid karsinomu dokularında lineer PTPN22 gen ekspresyonunun normal tiroid dokularına kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2.9). Bunun yanı sıra, UALCAN veri tabanı (Chandrashekar ve ark., 2017, 2022) üzerinde yaptığımız incelemelerde PTPN22 mRNA ekspresyon düzeylerinin tiroid karsinomu örneklerinde, sağlıklı kontrol dokularına kıyasla downregüle olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 5.1).



Şekil 5. 1. PTPN22 ekspresyonunun tiroid karsinomunda (THCA) örnek tiplerine göre dağılımı (UALCAN veritabanından alındı)

Mevcut tez çalışmasında, tiroid kanserinde circPTPN22'nin potansiyel biyobelirteç rolünü değerlendirmek amacıyla TPC-1 (papiller tiroid karsinomu) ve FTC-133 (folliküler tiroid karsinomu) hücre hatlarında circPTPN22 ve PTPN22 mRNA ifade düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, her iki molekülün de normal tiroid hücre hattı (Nthy-ori 3-1) ile karşılaştırıldığında up regüle olduğunu ortaya koymaktadır. qRT-PCR analiz sonuçlarına göre, circPTPN22 ekspresyonu normal tiroid hücre hattına kıyasla TPC-1 hücre hattında 12,15 kat; FTC-133 hücre hattında ise 4,43 kat artış göstermiştir (Şekil 4.4). Benzer şekilde, PTPN22 mRNA seviyeleri de TPC-1 hücre hattında 14,9 kat, FTC-133 hücre hattında 3,57 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Mevcut çalışmanın bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Örneğin, sadece iki tiroid kanseri hücre hattı (TPC-1 ve FTC-133) kullanılmış olup, farklı kanser alt tiplerini ve klinik örnekleri içeren daha geniş bir kohortla doğrulama gereklidir. Ayrıca, circPTPN22'nin moleküler mekanizmalarını ve tiroid kanserindeki fonksiyonel rolünü aydınlatmak için detaylı çalışmalar gereklidir. Bu bilgiler doğrultusunda bulgularımız, circPTPN22'nin tiroid kanseri için potansiyel bir moleküler biyobelirteç adayı olabileceğine dair ön veriler sunmakta olup ileri çalışmalar yapılarak klinik örneklerde doğrulanması elzemdir.

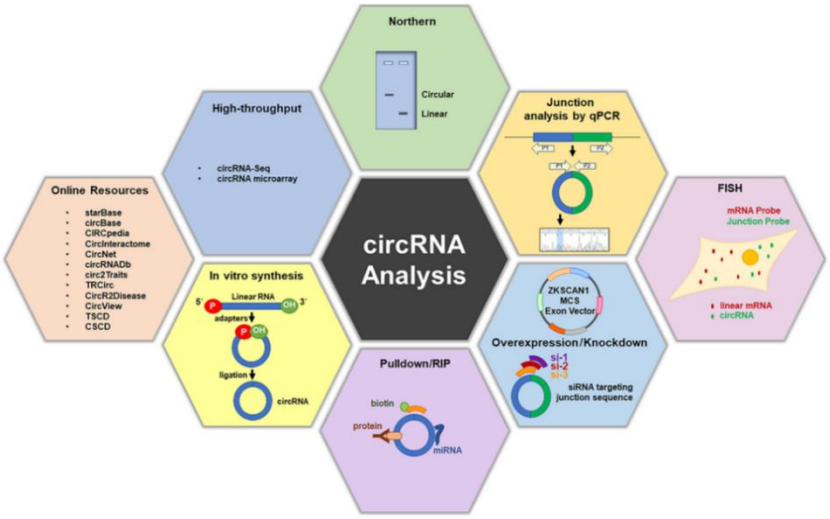
CircRNA'ların moleküler mekanizmaları incelendiğinde, çoklu miRNA bağlanma bölgeleri sayesinde miRNA süngerleme aktivitesi göstererek mRNA ekspresyonunu düzenleyebildikleri bilinmektedir (Khan ve ark., 2016; Du ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda, miR-31'in çeşitli kanser türlerinde up regüle olduğu ve onkojenik bir rol oynadığı bildirilmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. miR-31'in çeşitli kanserlerdeki ekspresyon düzeyi

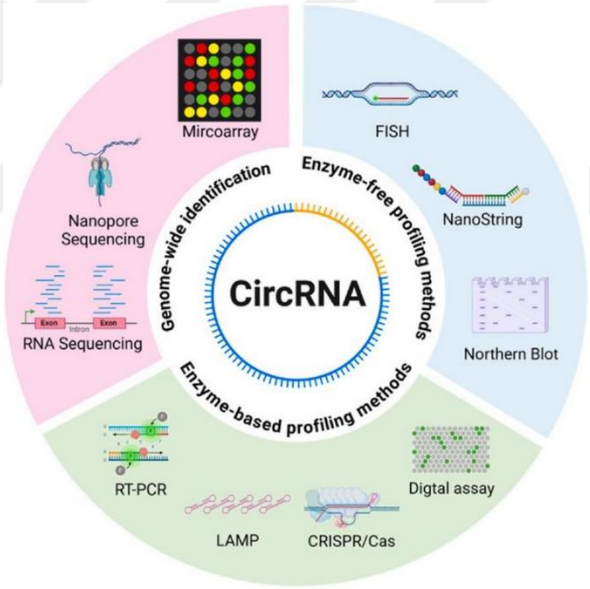
Kanser	miR-31
Tiroid kanseri	miR-31-5p PTC türünde up regüledir. Onkojenik rolü vardır (Magissano ve ark., 2021).
Kordoma (kemik tümörü)	kordoma dokusu ve kordoma hücre hattında (U-CH1) miR-31 önemli ölçüde aşağı regüledir (Bayrak O. F. ve ark., 2013).
Kemik kanseri	miR-31-5p aşırı up regüledir. Onkojenik rolü vardır (Chen ve ark., 2019).
Ağız kanseri	miR-31-5p up regüledir. Onkojenik rolü vardır (Lu ve ark., 2019).

Literatürde papiller tiroid karsinomunda (PTC) hsa-miR-31-5p yüksek eksprese olduğu gösterilmiş olup (Yi ve ark., 2021; Rogucki ve ark., 2022), foliküler tiroid karsinomuyla ilgili ise hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Tez çalışmamız kapsamında olası miRNA hedef çalışmasında hsa-miR-31-5p olarak seçilmiştir.

Bulgularımız, miR-31-5p'nin normal hücre hattına kıyasla papiller tiroid karsinomu (PTC) modeli olan TPC-1 hücrelerinde literatürdeki verilerle tutarlı bir şekilde yüksek eksprese olduğunu, folliküler tiroid karsinomu (FTC) modeli FTC-133'te ise anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. qRT-PCR analiz sonuçlarına göre, miR-31-5p'nin ekspresyonu normal tiroid hücre hattına kıyasla TPC-1 hücre hattında 3,13 kat arttığı; FTC-133 hücre hattında ise fold change değeri 0,99 olarak anlamlı bir farkın olmadığını göstermiştir (Şekil 4.10). Bu durum, miR-31-5p'nin tiroid kanseri alt tiplerinde farklı düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, miR-31-5p'nin TPC-1 hücre hattında upregüle olması, miR-31-5p'nin papiller tiroid karsinomu gelişimindeki rolünü düşündürmektedir. Dolayısıyla, literatürde circPTPN22'nin miR-31-5p ile etkileşimine dair kanıt bulunmamakla birlikte, bu potansiyel etkileşimin tiroid kanseri patogenezindeki rolünün aydınlatılması için Şekil 5.2 ve Şekil 5.3'te özetlenen ileri düzey deneysel çalışmalar gereklidir.



Şekil 5. 2. Dairesel RNA'ları incelemek için yaklaşımlar ve araçlar (Pandey ve ark., 2019)



Şekil 5. 3. Çeşitli circRNA profilleme yöntemlerinin şematik gösterimi (Zequan ve ark., 2024)

Sonuç olarak, gen ifadesinin kontrolünde circRNA-miRNA-mRNA ekseni göz önüne alınacak olursa tiroid kanserinde potansiyel biyobelirteç olan circPTPN22 molekülünün süngerlediği olası miRNA'ların kapsamlı bir şekilde belirlenmesi ve bunların hedef gen ağlarının haritalanması, gelecek çalışmalarımızın hedefi olacaktır.

KAYNAKLAR

Adelman, K., & Egan, E. (2017). More uses for genomic junk. Nature, 543(7644), 183-185. https://doi.org/10.1038/543183a

Al-Suhaimi EA, Khan FA. (2022). Thyroid glands: physiology and structure. Emerging concepts in Endocrine structure and functions. Springer, pp.133–60. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9016-7_5

Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2017). Non-coding RNA networks in cancer. Nature Reviews. Cancer, 18(1), 5. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99

Ancker O.V., Kruger M., Wehland M., Infanger M., Grimm D. (2019). Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. Int. J. Mol. Sci., 21:10. https://doi.org/10.3390/ijms21010010

Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., & Calin, G. A. (2018). Clinical utility of circulating non-coding RNAs — An update. Nature Reviews Clinical Oncology, 15(9), 541-563. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x

Ashby J, Flack K, Jimenez LA. et al. (2014). Distribution profiling of circulating microRNAs in serum. Anal Chem., 86:9343–9349. https://doi.org/10.1021/ac5028929

Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. (2014). circRNA biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. Mol Cell, 56(1):55–66. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019

Bayrak O. F., Gulluoglu S., Aydemir E., Ture U., Acar H., Atalay B., Demir Z., Sevli S., Creighton C.J., Ittmann M., Sahin F., Ozen, M. (2013). MicroRNA expression profiling reveals the potential function of microRNA-31 in chordomas. Journal of Neuro-Oncology, 115(2), 143–151. https://doi.org/10.1007/s11060-013-1211-6

Bhattacharya, S., Mahato, R. K., Singh, S., Bhatti, G. K., Mastana, S. S., & Bhatti, J. S. (2023). Advances and challenges in thyroid cancer: The interplay of genetic modulators, targeted therapies, and AI-driven approaches. Life Sciences, 332, 122110. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122110

Bi, W., Huang, J., Nie, C., Liu, B., He, G., Han, J., Pang, R., Ding, Z., Xu, J., & Zhang, J. (2018). CircRNA circRNA_102171 promotes papillary thyroid cancer progression through modulating CTNNBIP1-dependent activation of β-catenin pathway. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR, 37, 275. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0936-7

Bian, L., Zhi, X., Ma, L., Zhang, J., Chen, P., Sun, S., Li, J., Sun, Y., & Qin, J. (2018). Hsa_circRNA_103809 regulated the cell proliferation and migration in colorectal cancer via miR-532–3p / FOXO4 axis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 505(2), 346-352. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.073

Bottini, N., & Peterson, E. J. (2013). Tyrosine phosphatase PTPN22: Multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. Annual Review of Immunology, 32, 83. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120249

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. Cell, 113(1):25–36. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00231-9

Brownlie, R. J., Garcia, C., Ravasz, M., Zehn, D., Salmond, R. J., & Zamoyska, R. (2017). Resistance to TGFβ suppression and improved anti-tumor responses in CD8+

T cells lacking PTPN22. Nature Communications, 8, 1343. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01427-1

Brownlie, R. J., Zamoyska, R., & Salmond, R. J. (2018). Regulation of autoimmune and anti-tumour T-cell responses by PTPN22. Immunology, 154(3), 377. https://doi.org/10.1111/imm.12919

Cai, X., Zhao, Z., Dong, J., Lv, Q., Yun, B., Liu, J., Shen, Y., Kang, J., & Li, J. (2019). Circular RNA circBACH2 plays a role in papillary thyroid carcinoma by sponging miR-139-5p and regulating LMO4 expression. Cell Death & Disease, 10(3), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1439-y

Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. Nature Reviews Cancer, 6(11), 857-866. https://doi.org/10.1038/nrc1997

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(24), 15524. https://doi.org/10.1073/pnas.242606799

Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(9), 2999. https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101

Chen L, Carmichael GG. (2014). Gene regulation by SINES and inosines: biological consequences of A-to-I editing of Alu element inverted repeats. Cell Cycle, 7(21):3294–3301. https://doi.org/10.4161/cc.7.21.6927

Chen, B., & Huang, S. (2018). Circular RNA: An emerging non-coding RNA as a regulator and biomarker in cancer. Cancer Letters, 418, 41-50. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.011

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Research, 33(20), e179. https://doi.org/10.1093/nar/gni178

Chen, J., Sun, Y., Ou, Z., Yeh, S., Huang, P., You, B., Tsai, C., Zu, X., & Chang, C. (2020). Androgen receptor-regulated circFNTA activates KRAS signaling to promote bladder cancer invasion. EMBO Reports, 21(4), e48467. https://doi.org/10.15252/embr.201948467

Chen, L., & Shan, G. (2021). CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential. Cancer Letters, 505, 49-57. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.02.004

Chen, L., & Yang, L. (2015). Regulation of circRNA biogenesis. RNA Biology, 12(4), 381. https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020271

Chen, S., Thorne, R. F., Zhang, X. D., Wu, M., & Liu, L. (2021). Non-coding RNAs, guardians of the p53 galaxy. Seminars in Cancer Biology, 75, 72-83. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.09.002

Chen, Y., & Wang, X. (2020). MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. Nucleic Acids Research, 48(D1), D127–D131.

Cheng, D., Wang, J., Dong, Z., & Li, X. (2021). Cancer-related circular RNA: Diverse biological functions. Cancer Cell International, 21, 11. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01703-z

Cloutier, J.F., Veillette, A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. (1999). J Exp Med., 189 (1), pp. 111-121. https://doi.org/10.1084/jem.189.1.111

Cohen, S., Dadi, H., Shaoul, E., Sharfe, N., & Roifman, H. M. (1999). Cloning and Characterization of a Lymphoid-Specific, Inducible Human Protein Tyrosine Phosphatase, Lyp. Blood, 93(6), 2013-2024. https://doi.org/10.1182/blood.V93.6.2013.406k25_2013_2024

Cote, G. J., Grubbs, E. G., & Hofmann, C. (2015). Thyroid C-Cell Biology and Oncogenic Transformation. Recent Results in Cancer Research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres Dans les Recherches sur le Cancer, 204, 1. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22542-5_1

Crick FH. (1958). On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol 12, 138–163.

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. Nature, 227(5258), 561-563. https://doi.org/10.1038/227561a0

Cubas, R., Khan, Z., Gong, Q., Moskalenko, M., Xiong, H., Ou, Q., Pai, C., Rodriguez, R., Cheung, J., & Chan, A. C. (2020). Autoimmunity linked protein phosphatase PTPN22 as a target for cancer immunotherapy. Journal for Immunotherapy of Cancer, 8(2), e001439. https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001439

Cui W. and Xue J. (2020). Circular RNA DOCK1 downregulates microRNA-124 to induce the growth of human thyroid cancer cell lines. Biofactors, 46:591–599. https://doi.org/10.1002/biof.1662

Davis, P. J., Lin, Y., Hercbergs, A., & Mousa, S. A. (2020). Actions of L-thyroxine (T4) and Tetraiodothyroacetic Acid (Tetrac) on Gene Expression in Thyroid Cancer Cells. Genes, 11(7), 755. https://doi.org/10.3390/genes11070755

de Munter, S., Köhn, M., Bollen, M. Challenges and Opportunities in the Development of Protein Phosphatase-Directed Therapeutics. (2013). ACS Chem Biol., 8(1):36–45. https://doi.org/10.1021/cb300597g

Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature, 432(7014), 231-235. https://doi.org/10.1038/nature03049

Du WW, Yang W, Chen Y, et al. (2017). Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. Eur Heart J., 38(18):w1. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw001

Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K. ve Gorospe, M. (2016). CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their

Dvorkin S, Robenshtok E, Hirsch D, Strenov Y, Shimon I, Benbassat CA. (2013). Differentiated Thyroid Cancer Is Associated With Less Aggressive Disease and Better Outcome in Patients With Coexisting Hashimotos Thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab, 98:2409–14. https://doi.org/10.1210/jc.2013-1309

Farazi, T. A., Spitzer, J. I., Morozov, P., & Tuschl, T. (2010). MiRNAs in human cancer. The Journal of Pathology, 223(2), 102. https://doi.org/10.1002/path.2806

Ferlay J, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, Dec [cited 2021 Nov 24].

Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. American Journal of Cancer Research, 7(5), 1016. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5446472/

Franceschi, S., Maso, L. D., & Vaccarella, S. (2018). Thyroid cancer "epidemic" also occurs in low- and middle-income countries. International Journal of Cancer, 144(9), 2082. https://doi.org/10.1002/ijc.31884

Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. Cancer Res., 67(6):2456–2468. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2698

Gimm, O. (2001). Thyroid cancer. Cancer Letters, 163(2), 143-156. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00697-2

Greco, A., Auletta, L., Orlandella, F. M., Chiara Iervolino, P. L., Klain, M., Salvatore, G., & Mancini, M. (2017). Preclinical Imaging for the Study of Mouse Models of Thyroid Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 18(12), 2731. https://doi.org/10.3390/ijms18122731

Grimm, D. (2022). Recent Advances in Thyroid Cancer Research. International Journal of Molecular Sciences, 23(9), 4631. https://doi.org/10.3390/ijms23094631

Gui, X., Li, Y., Zhang, X., Su, K., & Cao, W. (2020). Circ_LDLR promoted the development of papillary thyroid carcinoma via regulating miR-195-5p/LIPH axis. Cancer Cell International, 20, 241. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01327-3

Guo, S., Wei, N., Xue, R., Li, W., Dong, G., Li, J., Tian, X., Chen, C., Qiu, S., Wang, T., Xiao, Q., Liu, C., & Xu, J. (2020). CiRS-7 Promotes the Proliferation and Migration of Papillary Thyroid Cancer by Negatively Regulating the miR-7/Epidermal Growth Factor Receptor Axis. BioMed Research International, 2020, 9875636. https://doi.org/10.1155/2020/9875636

Guz, M., Rivero-Müller, A., Okoń, E., Stenzel-Bembenek, A., Polberg, K., Słomka, M., & Stepulak, A. (2014). MicroRNAs-Role in Lung Cancer. Disease Markers, 2014, 218169. https://doi.org/10.1155/2014/218169

Haddad, G., & Lorenzen, J. M. (2019). Biogenesis and Function of Circular RNAs in Health and in Disease. Frontiers in Pharmacology, 10, 428. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00428

Han D, Li J, Wang H, et al. (2017). Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. Hepatology, 66(4):1151–1164. https://doi.org/10.1002/hep.29270

Han X.T., Jiang J.Q., Li M.Z., Cong Q.M. (2020). Circular RNA circ-ABCB10 promotes the proliferation and invasion of thyroid cancer by targeting KLF6. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 24:9774. https://doi.org/10.26355/eurrev_202010_23170

Han, J., Lee, Y., Yeom, H., Kim, K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes & Development, 18(24), 3016. https://doi.org/10.1101/gad.1262504

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. Cell, 100:57–70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144:646–674 https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov., Jan;12(1):31-46. https://10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204

Harvey JJ. (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. Nature, 204:1104–5. doi: 10.1038/2041104b0.

He, J., Xie, Q., Xu, H., Li, J., & Li, Y. (2017). Circular RNAs and cancer. Cancer Letters, 396, 138-144. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.027

He, Y., Han, P., Chen, C., Xie, S., Zhang, H., Song, Y., Hu, H., Zhao, Q., & Lian, C. (2023). CircPTPN22 attenuates immune microenvironment of pancreatic cancer via STAT3 acetylation. Cancer Gene Therapy, 30(4), 559-566. https://doi.org/10.1038/s41417-021-00382-w

Ho, W. J., Croessmann, S., Lin, J., Phyo, Z. H., Charmsaz, S., Danilova, L., Mohan, A. A., Gross, N. E., Chen, F., Dong, J., Aggarwal, D., Bai, Y., Wang, J., He, J., Leatherman, J. M., Yarchoan, M., Armstrong, T. D., Zaidi, N., Fertig, E. J., . . . Jaffee, E. M. (2021). Systemic inhibition of PTPN22 augments anticancer immunity. The Journal of Clinical Investigation, 131(17), e146950. https://doi.org/10.1172/JCI146950
https://doi.org/10.1093/nar/gkz757

Hu Z, Zhao P, Zhang K, Zang L, Liao H, Ma W. (2020). Hsa_ circ_0011290 regulates proliferation, apoptosis and glycolytic phenotype in papillary thyroid cancer via miR-1252/FSTL1 signal pathway. Arch Biochem Biophys., 685:108353. https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108353

Huang, A., Zheng, H., Wu, Z., Chen, M., & Huang, Y. (2020). Circular RNA-protein interactions: Functions, mechanisms, and identification. Theranostics, 10(8), 3503. https://doi.org/10.7150/thno.42174

Hunter, T. (2009). Tyrosine phosphorylation: Thirty years and counting. Current Opinion in Cell Biology, 21(2), 140. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.028

Iacobas, D. A. (2020). Biomarkers, Master Regulators and Genomic Fabric Remodeling in a Case of Papillary Thyroid Carcinoma. Genes, 11(9), 1030. https://doi.org/10.3390/genes11091030

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. EMBO Molecular Medicine, 4(3), 143. https://doi.org/10.1002/emmm.201100209
interacting proteins and microRNAs. RNA Biology, 13(1), 34-42.

Jeffries, C. D., Fried, H. M., & Perkins, D. O. (2011). Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. RNA, 17(4), 675. https://doi.org/10.1261/rna.2006511

Jin, X., Wang, Z., Pang, W., Zhou, J., Liang, Y., Yang, J., Yang, L., & Zhang, Q. (2018). Upregulated hsa_circ_0004458 Contributes to Progression of Papillary Thyroid Carcinoma by Inhibition of miR-885-5p and Activation of RAC1. Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 24, 5488. https://doi.org/10.12659/MSM.911095

Julien, S. G., Dubé, N., Hardy, S., & Tremblay, M. L. (2010). Inside the human cancer tyrosine phosphatome. Nature Reviews Cancer, 11(1), 35-49. https://doi.org/10.1038/nrc2980

Kevin C. Miller; Ashish V. Chintakuntlawar. (2021). Molecular-Driven Therapy in Advanced Thyroid Cancer. Current Treatment Options in Oncology, 22: 24. https://doi.org/10.1007/s11864-021-00822-7

Khan MAF, Reckman YJ, Aufiero S, et al. (2016). RBM20 regulates circular RNA production from the titin gene. Circ Res., 119(9):996–1003. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309568

Khatami, F., Larijani, B., Nikfar, S., Hasanzad, M., Fendereski, K., & Tavangar, S. M. (2019). Personalized treatment options for thyroid cancer: Current perspectives. Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 12, 235. https://doi.org/10.2147/PGPM.S181520

Kim K.W., Park Y.J., Kim E.H., Park S.Y., Park D.J., Ahn S.H., et al. (2011). Elevated Risk of Papillary Thyroid Cancer in Korean Patients With Hashimoto's Thyroiditis. Head Neck, 33:691–5. https://doi.org/10.1002/hed.21518

Kim, W. W., Ha, T. K., & Bae, S. K. (2018). Clinical implications of the BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis. *Journal of Otolaryngology- Head & Neck Surgery*, *47*, 4. https://doi.org/10.1186/s40463-017-0247-6

Kimura T. (2020). Non-coding natural antisense RNA: mechanisms of action in the regulation of target gene expression and its clinical implications. Yakugaku Zasshi 140, 687–700. https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00002

Kirsten WH, Schauf V, McCoy J. (1970). Properties of a murine sarcoma virus. Bibl Haematol, (36):246–9. doi: 10.1159/000391714.

Kitahara C.M., Schneider A.B., Brenner A.V. (2018). Thyroid cancer. In: M Thun, MS Linet, JR Cerhan, CA Haiman, D Schottenfeld, eds. Cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed., Oxford University Press, 839-860.

Kitahara, C. M., & Schneider, A. B. (2022). Cancer Progress and Priorities: Epidemiology of Thyroid Cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 31(7), 1284. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1440

Kitahara, C. M., & Sosa, J. A. (2016). The changing incidence of thyroid cancer. Nature Reviews. Endocrinology, 12(11), 646. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.110

Kozomara, A., Birgaoanu, M. ve Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Research, 47(D1), D155-D162. https://doi.org/10.1093/nar/gky1141

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Science, 294:853–8. https://doi.org/10.1126/science.1064921

Lan, X., Cao, J., Xu, J., Chen, C., Zheng, C., Wang, J., Zhu, X., Zhu, X., & Ge, M. (2018). Decreased expression of hsa_circ_0137287 predicts aggressive clinicopathologic characteristics in papillary thyroid carcinoma. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 32(8), e22573. https://doi.org/10.1002/jcla.22573

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001). Science, 294:858–62. https://doi.org/10.1126/science.1065062

Lee R.C., Ambros V. (2001). Science, 294:862–4. https://doi.org/10.1126/science.1065329

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell., 75(5):843–854. https://10.1016/0092-8674(93)90529-y.

Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. Annual Review of Pathology, 4, 199. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. The EMBO Journal, 23(20), 4051. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385

Lei, K., Bai, H., Wei, Z., Xie, C., Wang, J., Li, J., & Chen, Q. (2018). The mechanism and function of circular RNAs in human diseases. Experimental Cell Research, 368(2), 147-158. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.05.002

Li X, Yang L, Chen L. (2018). The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. Mol Cell, 71(3):428–442. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.034

Li Y, Qin J, He Z, Cui G, Zhang K, Wu B. (2021). Knockdown of circPUM1 impedes cell growth, metastasis and glycolysis of papillary thyroid cancer via enhancing MAPK1 expression by serving as the sponge of miR-21-5p. Genes Genomics, 43:141–150. https://doi.org/10.1007/s13258-020-01023-6

Li Z., Huang X., Liu A., Xu J., Lai J., Guan H., Ma J. (2021). Circ_PSD3 promotes the progression of papillary thyroid carcinoma via the miR-637/HEMGN axis. Life Sci. 2021;264:118622. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118622

Li, F., Zhang, L., Li, W., Deng, J., Zheng, J., An, M., Lu, J., & Zhou, Y. (2015). Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/β-catenin pathway. Oncotarget, 6(8), 6001. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3469

Li, M., Li, J., Ding, X., He, M., & Cheng, Y. (2010). MicroRNA and Cancer. The AAPS Journal, 12(3), 309. https://doi.org/10.1208/s12248-010-9194-0

Li, M., Ma, L., & Li, G. (2019). Intriguing circles: Conflicts and controversies in circular RNA research. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 10(5), e1538. https://doi.org/10.1002/wrna.1538

Liang G, Liu Z, Tan L, et al. (2017). HIF1α-associated circDENND4C promotes proliferation of breast cancer cells in hypoxic environment. Anticancer Res., 37(8):4337–4343. https://doi.org/10.21873/anticanres.11827

Liu, B. (2014). Universal Stem-Loop Primer Method for Screening and Quantification of MicroRNA. PLoS ONE, 9(12), e115293. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115293

Liu, F., Zhang, J., Qin, L., Yang, Z., Xiong, J., Zhang, Y., Li, R., Li, S., Wang, H., Yu, B., Zhao, W., Wang, W., Li, Z., & Liu, J. (2018). Circular RNA EIF6 (Hsa_circ_0060060) sponges miR-144-3p to promote the cisplatin-resistance of human thyroid carcinoma cells by autophagy regulation. Aging (Albany NY), 10(12), 3806. https://doi.org/10.18632/aging.101674

Liu, J., Li, H., Wei, C., Ding, J., Lu, J., Pan, G., & Mao, A. (2020). CircFAT1(e2) Promotes Papillary Thyroid Cancer Proliferation, Migration, and Invasion via the miRNA-873/ZEB1 Axis. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2020, 1459368. https://doi.org/10.1155/2020/1459368

Liu, M., Wang, Q., Shen, J., Yang, B. B., & Ding, X. (2019). Circbank: A comprehensive database for circRNA with standard nomenclature. RNA Biology, 16(7), 899. https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1600395

Lu C, Tej S.S., Luo S., Haudenschild C.D., Meyers B.C., Green P.J. (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. Science, 309(5740):1567–1569. https://doi.org/10.1126/science.1114112

Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Lamb, J., Peck, D., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature, 435(7043), 834-838. https://doi.org/10.1038/nature03702

Lun Y., Wu X., Xia Q., Han Y., Zhang X., Liu Z., et al. (2013). Hashimoto's Thyroiditis as a Risk Factor of Papillary Thyroid Cancer May Improve Cancer Prognosis. Otolaryngol Head Neck Surg,148:396–402. https://doi.org/10.1177/0194599812472426

Ma, J., Xu, J., Zhang, X., & Quan, J. (2024). The emerging role and clinical significance of circRNAs in papillary thyroid cancer. Frontiers in Endocrinology, 15, 1351776. https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1351776

Ma, S., Kong, S., Gu, X., Xu, Y., Tao, M., Shen, L., Shen, X., & Ju, S. (2021). As a biomarker for gastric cancer, circPTPN22 regulates the progression of gastric cancer through the EMT pathway. Cancer Cell International, 21, 44. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01701-1

Mara, J., Morillo-Bernal, J., Garca-Marn, R., Carmelo, J., & Martn-Lacave, I. (2012). Paracrine Regulation of Thyroid-Hormone Synthesis by C Cells. Thyroid Hormone. https://doi.org/10.5772/46178

Mumtaz, P. T., Taban, Q., Dar, M. A., Mir, S., Zargar, S. M., Shah, R. A., & Ahmad, S. M. (2020). Deep Insights in Circular RNAs: From biogenesis to therapeutics. Biological Procedures Online, 22, 10. https://doi.org/10.1186/s12575-020-00122-8

Muzza, M., Colombo, C., Rossi, S., Tosi, D., Cirello, V., Perrino, M., De Leo, S., Magnani, E., Pignatti, E., Vigo, B., Simoni, M., Bulfamante, G., Vicentini, L., & Fugazzola, L. (2015). Telomerase in differentiated thyroid cancer: Promoter mutations, expression and localization. Molecular and Cellular Endocrinology, 399, 288-295. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.10.019

Nappi, F. (2024). Non-Coding RNA-Targeted Therapy: A State-of-the-Art Review. International Journal of Molecular Sciences, 25(7), 3630. https://doi.org/10.3390/ijms25073630

Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nature Reviews Endocrinology, 7(10), 569-580. https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142

Nikiforova, M. N., & Nikiforov, Y. E. (2008). Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. Expert Review of Molecular Diagnostics, 8(1), 83–95. doi:10.1586/14737159.8.1.83

Orozco, R. C., Marquardt, K., Mowen, K., & Sherman, L. A. (2021). Proautoimmune Allele of Tyrosine Phosphatase, PTPN22, Enhances Tumor Immunity. The Journal of Immunology Author Choice, 207(6), 1662. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100304

Pan, H., Li, T., Jiang, Y., Pan, C., Ding, Y., Huang, Z., Yu, H., & Kong, D. (2017). Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. Journal of Cellular Biochemistry, 119(1), 440-446. https://doi.org/10.1002/jcb.26201

Pandey, P. R., Munk, R., Kundu, G., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2019). Methods for analysis of circular RNAs. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 11(1), e1566. https://doi.org/10.1002/wrna.1566

Patel K.N., Shaha A.R. (2014). Poorly differentiated thyroid cancer. Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck. Surg., 22:121–126. https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000037

Patop, I. L., Wüst, S., & Kadener, S. (2019). Past, present, and future of circRNAs. The EMBO Journal, 38(16), e100836. https://doi.org/10.15252/embj.2018100836

Qi, Y., He, J., Zhang, Y., Wang, L., Yu, Y., Yao, B., & Tian, Z. (2021). Circular RNA hsa_circ_0001666 sponges miR-330-5p, miR-193a-5p and miR-326, and promotes papillary thyroid carcinoma progression via upregulation of ETV4. Oncology Reports, 45(4), 50. https://doi.org/10.3892/or.2021.8001

Qian, L., Yu, S., Chen, Z., Meng, Z., Huang, S., & Wang, P. (2018). The emerging role of circRNAs and their clinical significance in human cancers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1870(2), 247-260. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.06.002

Qu H, Xu W, Huang Y, Yang S. (2011). Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. Asian Pac J Cancer Prev., 12:1117–1125

Qu, S., Liu, Z., Yang, X., Zhou, J., Yu, H., Zhang, R., & Li, H. (2018). The emerging functions and roles of circular RNAs in cancer. Cancer Letters, 414, 301-309. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.022

Quinlan MP, Settleman J. (2009). Isoform-specific ras functions in development and cancer. Future Oncol, 5(1):105–116. doi: 10.2217/14796694.5.1.105

REBAÏ, M., & REBAÏ, A. (2016). Molecular genetics of thyroid cancer. Genetics Research, 98, e7. https://doi.org/10.1017/S0016672316000057

Ren, H., Liu, Z., Liu, S., Zhou, X., Wang, H., Xu, J., Wang, D., & Yuan, G. (2018). Profile and clinical implication of circular RNAs in human papillary thyroid carcinoma. PeerJ, 6, e5363. https://doi.org/10.7717/peerj.5363

Reuter, J. S. ve Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics, 11(1), 129.

Ruan Y., Li Z., Shen Y., Li T., Zhang H., Guo J. (2020). Functions of circular RNAs and their potential applications in gastric cancer. Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol., 14 85–92. https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1715211

Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L., & Brown, P. O. (2013). Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. PLoS Genetics, 9(9), e1003777. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003777

Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O. (2012). Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types. PLoS ONE, 7(2), e30733. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030733

Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., & Kleinschmidt, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73(11), 3852. https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3852

Santarpia, L., Lippman, S. L., & El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 16(1), 103. https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805

Sassen, S., Miska, E. A., & Caldas, C. (2007). MicroRNA—Implications for cancer. Virchows Archiv, 452(1), 1. https://doi.org/10.1007/s00428-007-0532-2

Schlicher, L., Green, L. G., Romagnani, A., & Renner, F. (2023). Small molecule inhibitors for cancer immunotherapy and associated biomarkers – the current status. Frontiers in Immunology, 14, 1297175. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1297175

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. Nature, 455(7209), 58-63. https://doi.org/10.1038/nature07228

Shang, Q., Yang, Z., Jia, R., & Ge, S. (2019). The novel roles of circRNAs in human cancer. Molecular Cancer, 18, 6. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0934-6

Shi, E., Ye, J., Zhang, R., Ye, S., Zhang, S., Wang, Y., Cao, Y., & Dai, W. (2020). A Combination of circRNAs as a Diagnostic Tool for Discrimination of Papillary Thyroid Cancer. OncoTargets and Therapy, 13, 4365. https://doi.org/10.2147/OTT.S247796

Shi, P., Liu, Y., Yang, D., Wu, Y., Zhang, L., Jing, S., Shi, H., & Geng, C. (2022). CircRNA ZNF609 promotes the growth and metastasis of thyroid cancer in vivo and in vitro by downregulating miR-514a-5p. Bioengineered, 13(2), 4372. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2033015

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2017. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67(1), 7-30. https://doi.org/10.3322/caac.21387

Silva, S. N. (2021). Special Issue: Genetic Perspectives in Thyroid Cancer. Genes, 12(2). https://doi.org/10.3390/genes12020126

Slack, F. J. (2006). Oncomirs — MicroRNAs with a role in cancer. Nature Reviews Cancer, 6(4), 259-269. https://doi.org/10.1038/nrc1840

Sloan LW. (1954). Of the origin, characteristics and behavior of thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metabolism, 14(11):1309–35. https://doi.org/10.1210/jcem-14-11-1309

Sticht, C., de La Torre, C., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). Mirwalk: An online resource for prediction of microrna binding sites. PLOS ONE, 13(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239

Stuchi, L. P., U Castanhole-Nunes, M. M., Maniezzo-Stuchi, N., Biselli-Chicote, P. M., Henrique, T., Padovani Neto, J. A., Neto, S., Girol, A. P., Pavarino, E. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2020). VEGFA and NFE2L2 Gene Expression and Regulation by MicroRNAs in Thyroid Papillary Cancer and Colloid Goiter. Genes, 11(9), 954. https://doi.org/10.3390/genes11090954

Sun J.W., Qiu S., Yang J.Y., Chen X., Li H.X. (2020). Hsa_circ_0124055 and hsa_circ_0101622 regulate proliferation and apoptosis in thyroid cancer and serve as prognostic and diagnostic indicators. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 24:4348–4360. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_21016

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Suzuki, H., Zuo, Y., Wang, J., Zhang, M. Q., Malhotra, A., & Mayeda, A. (2006). Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. Nucleic Acids Research, 34(8), e63. https://doi.org/10.1093/nar/gkl151

Tan, Z., Cao, F., Jia, B., & Xia, L. (2020). Circ_0072088 promotes the development of non-small cell lung cancer via the miR-377-5p/NOVA2 axis. Thoracic Cancer, 11(8), 2224. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13529

Tang, X., Qi, C., Zhou, H., & Liu, Y. (2022). Critical roles of PTPN family members regulated by non-coding RNAs in tumorigenesis and immunotherapy. Frontiers in Oncology, 12, 972906. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.972906

Tautz, L., Pellecchia, M., Mustelin, T. Targeting the PTPome in human disease. (2006). Expert Opin Ther Targets, 10(1):157–177.

Thomas, L. F., & Sætrom, P. (2014). Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites. Bioinformatics, 30(16), 2243. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu257

Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7(11), 833-846. https://doi.org/10.1038/nrm2039

Tonks, N. K. (2013). Protein Tyrosine Phosphatases: From Housekeeping Enzymes to Master-Regulators of Signal Transduction. The FEBS Journal, 280(2), 346. https://doi.org/10.1111/febs.12077

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., & Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(7), 2257. https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103

Vromman, M., Anckaert, J., Vandesompele, J., & Volders, J. (2022). CIRCprimerXL: Convenient and High-Throughput PCR Primer Design for Circular RNA Quantification. Frontiers in Bioinformatics, 2, 834655. https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.834655

Wang, F., Li, Y., Tang, F., Jia, M., Liu, Z., & Li, Q. (2020). Circular RNA circEIF3I promotes papillary thyroid carcinoma progression through competitively binding to miR-149 and upregulating KIF2A expression. American Journal of Cancer Research, 10(4), 1130. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7191093/

Wang, H., Yan, X., Zhang, H., & Zhan, X. (2019). CircRNA circ_0067934 Overexpression Correlates with Poor Prognosis and Promotes Thyroid Carcinoma Progression. Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 25, 1342. https://doi.org/10.12659/MSM.913463

Wang, M., Chen, B., Ru, Z., & Cong, L. (2018). CircRNA circ-ITCH suppresses papillary thyroid cancer progression through miR-22-3p/CBL/β-catenin pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications, 504(1), 283-288. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.175

Wang, S., Xue, X., Wang, R., Li, X., Li, Q., Wang, Y., Xie, P., Kang, Y., Meng, R., & Feng, X. (2018). CircZNF609 promotes breast cancer cell growth, migration, and invasion by elevating p70S6K1 via sponging miR-145-5p. Cancer Management and Research, 10, 3881. https://doi.org/10.2147/CMAR.S174778

Wang, Y., & Wang, Z. (2015). Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. RNA, 21(2), 172. https://doi.org/10.1261/rna.048272.114

Wei, H., Pan, L., Tao, D., & Li, R. (2018). Circular RNA circZFR contributes to papillary thyroid cancer cell proliferation and invasion by sponging miR-1261 and facilitating C8orf4 expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 503(1), 56-61. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.174

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Cell, 75:855–62. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology, 11(3), 228-234. https://doi.org/10.1038/ncb0309-228

Wu L, Xia J, Yang J, et al. (2018). Circ-ZNF609 promotes migration of colorectal cancer by inhibiting Gli1 expression via microRNA-150. J. of BUON: Off. J. of the Balkan Union of Oncol., 23: 1343–1349

Wu, G., Zhou, W., Pan, X., Sun, Z., Sun, Y., Xu, H., Shi, P., Li, J., Gao, L., & Tian, X. (2020). Circular RNA Profiling Reveals Exosomal circ_0006156 as a Novel Biomarker in Papillary Thyroid Cancer. Molecular Therapy. Nucleic Acids, 19, 1134. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.025

Wu, J., Katrekar, A., Honigberg, L. A., Smith, A. M., Conn, M. T., Tang, J., Jeffery, D., Mortara, K., Sampang, H., Williams, S. R., Buggy, J., & Clark, J. M. (2006). Identification of Substrates of Human Protein-tyrosine Phosphatase PTPN22. Journal of Biological Chemistry, 281(16), 11002-11010. https://doi.org/10.1074/jbc.M600498200

Xia, F., Chen, Y., Jiang, B., Bai, N., & Li, X. (2020). Hsa_circ_0011385 accelerates the progression of thyroid cancer by targeting miR-361-3p. Cancer Cell International, 20, 49. https://doi.org/10.1186/s12935-020-1120-7

Xia, F., Zhang, Z., & Li, X. (2021). Emerging Roles of Circular RNAs in Thyroid Cancer. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 636838. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.636838

Xing M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer, 12(2):245–262. doi: 10.1677/erc.1.0978

Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. Nature Reviews. Cancer, 13(3), 184. https://doi.org/10.1038/nrc3431

Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. Essays in Biochemistry, 65(4), 625. https://doi.org/10.1042/EBC20200032

Yang, G., Awan, F. M., Du, W. W., Zeng, Y., Lyu, J., Wu, D., Gupta, S., Yang, W., & Yang, B. B. (2017). The Circular RNA Interacts with STAT3, Increasing Its Nuclear Translocation and Wound Repair by Modulating Dnmt3a and miR-17 Function. Molecular Therapy, 25(9), 2062. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.022

Yang, Y., Gao, X., Zhang, M., Yan, S., Sun, C., Xiao, F., Huang, N., Yang, X., Zhao, K., Zhou, H., Huang, S., Xie, B., & Zhang, N. (2017). Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 110(3), 304. https://doi.org/10.1093/jnci/djx166

Yang, Z., Wu, L., Wang, A., Tang, W., Zhao, Y., Zhao, H., & Teschendorff, A. E. (2017). DbDEMC 2.0: Updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. Nucleic Acids Research, 45(D1), D812–D818. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1079

Yao, Y., Chen, X., Yang, H., Chen, W., Qian, Y., Yan, Z., Liao, T., Yao, W., Wu, W., Yu, T., Chen, Y., & Zhang, Y. (2019). Hsa_circ_0058124 promotes papillary thyroid cancer tumorigenesis and invasiveness through the NOTCH3/GATAD2A axis. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR, 38, 318. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1321-x

Ye, M., Hou, H., Shen, M., Dong, S., & Zhang, T. (2019). Circular RNA circFOXM1 Plays a Role in Papillary Thyroid Carcinoma by Sponging miR-1179 and Regulating HMGB1 Expression. Molecular Therapy. Nucleic Acids, 19, 741. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.014

Ye, Z., Wang, K., Zhou, J., & Wang, J. (2024). Advances in the molecular diagnostic methods for circular RNA. Biomedical Analysis, 1(4), 271-279. https://doi.org/10.1016/j.bioana.2024.11.002

Zhang X, Wang H, Zhang Y, et al. (2014). Complementary sequence-mediated exon circularization. Cell, 159(1):134–147. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001

Zhang, L., Zhou, L., Feng, Q., Li, Q., & Ge, M. (2021). Mutation of Hashimoto's Thyroiditis and Papillary Thyroid Carcinoma Related Genes and the Screening of Candidate Genes. Frontiers in Oncology, 11, 813802. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.813802

Zhang, O., Dong, R., Zhang, Y., Zhang, L., Luo, Z., Zhang, J., Chen, L., & Yang, L. (2016). Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. Genome Research, 26(9), 1277. https://doi.org/10.1101/gr.202895.115

Zhang, Q., Wang, W., Zhou, Q., Chen, C., Yuan, W., Liu, J., Li, X., & Sun, Z. (2020). Roles of circRNAs in the tumour microenvironment. Molecular Cancer, 19, 14. https://doi.org/10.1186/s12943-019-1125-9

Zhang, W., Liu, T., Li, T., & Zhao, X. (2020). Hsa_circRNA_102002 facilitates metastasis of papillary thyroid cancer through regulating miR-488-3p/HAS2 axis. Cancer Gene Therapy, 28(3), 279. https://doi.org/10.1038/s41417-020-00218-z

Zhang, X., Yu, Y., Bai, B., Wang, T., Zhao, J., Zhang, N., Zhao, Y., Wang, X., & Wang, B. (2020). PTPN22 interacts with EB1 to regulate T-cell receptor signaling. The FASEB Journal, 34(7), 8959-8974. https://doi.org/10.1096/fj.201902811RR

Zhang, Y. (2016). Drugging the Undruggable: Therapeutic Potential of Targeting Protein Tyrosine Phosphatases. Accounts of Chemical Research, 50(1), 122. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00537

Zhang, Y., Jia, D., Zhang, F., Cheng, D., Zhu, X., Li, F., & Zhang, F. (2021). The emerging function and clinical significance of circRNAs in Thyroid Cancer and Autoimmune Thyroid Diseases. International Journal of Biological Sciences, 17(7), 1731. https://doi.org/10.7150/ijbs.55381

Zhang, Z. (2001). Protein tyrosine phosphatases: Prospects for therapeutics. Current Opinion in Chemical Biology, 5(4), 416-423. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00223-4

Zheng F.B., Chen D., Ding Y.Y., Wang S.R., Shi D.D., Zhu Z.P. (2020). Circular RNA circ_0103552 promotes the invasion and migration of thyroid carcinoma cells by sponging miR-127. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 24:2572–2578. https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20526

Zheng, Q., Bao, C., Guo, W., Li, S., Chen, J., Chen, B., Luo, Y., Lyu, D., Li, Y., Shi, G., Liang, L., Gu, J., He, X., & Huang, S. (2016). Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. Nature Communications, 7, 11215. https://doi.org/10.1038/ncomms11215

Zhong, S. ve Feng, J. (2022). CircPrimer 2.0: a software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. BMC Bioinformatics, 23(1), 215. https://doi.org/10.1186/s12859-022-04705-y

Zhou G.K., Zhang G.Y., Yuan Z.N., Pei R., Liu D.M. (2018). Has_ circ_0008274 promotes cell proliferation and invasion involving AMPK/mTOR signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 22:8772–8780. https://doi.org/10.26355/eurrev_201812_16644.

Zhou, W., Wu, G., Li, J., Lin, X., Sun, Y., Xu, H., Shi, P., Gao, L., & Tian, X. (2020). CircRASSF2 Acts as ceRNA and Promotes Papillary Thyroid Carcinoma Progression through miR-1178/TLR4 Signaling Pathway. Molecular Therapy. Nucleic Acids, 19, 1153. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.037

Zhu, G., Chang, X., Kang, Y., Zhao, X., Tang, X., Ma, C., & Fu, S. (2021). CircRNA: A novel potential strategy to treat thyroid cancer (Review). International Journal of Molecular Medicine, 48(5), 201. https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5034

Zuidervaart, W., Stark, M., Dijkman, R., Packer, L., Borgstein, M., Pavey, S., Out, C., Jager, M. J., Hayward, N. K., & Gruis, N. A. (2005). Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. British Journal of Cancer, 92(11), 2032. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602598

EKLER

EK 1: Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Malzeme	Kullanım Amacı
DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12), Gibco	Hücre kültüründe, özellikle epitel hücrelerinin büyümesini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır.
RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), Gibco	Lenfoid hücre hatları ve çeşitli kanser hücrelerinin kültüründe kullanılmaktadır.
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu 10,000 U/ml, Hyclone	Hücre kültürlerinde bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla antibiyotik olarak kullanılmaktadır.
Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA	Hücre kültür ortamına büyüme faktörleri ve besin desteği sağlamak için kullanılmaktadır.
L-Glutamine, 200mM Solution 29,2 mg/ml L-Glutamine, Hyclone	Hücre metabolizması için gerekli olan temel bir amino asit olup, kültür ortamına enerji ve azot kaynağı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.
Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco	Hücre yıkama, süspansiyon hazırlama ve pH dengesi sağlama amacıyla kullanılmaktadır.
Qıazol	Hücrelerden total RNA izolasyonunda kullanılmaktadır.
Kloroform, Sigma-Aldrich® (Germany)	QIAzol ile birlikte faz ayrımı sağlanarak RNA izolasyonunda kullanılmaktadır.
miRNeasy® Mini Kit (Cat.No: 217004), Germany	Hücrelerden yüksek saflıkta mikroRNA ve total RNA izolasyonu için kullanılan kit.
Etanol (%96-100), Fisher Scientific, UK	RNA saflaştırma ve yıkama adımlarında çöktürme ve saflaştırma amacıyla kullanılmaktadır.
Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot Number: 2575015)	İzole edilen RNA'dan geri transkripsiyon yoluyla birinci zincir cDNA sentezi yapılmasında kullanılmaktadır.
Promega GoTaq® qPCR Master Mix Kit (LOT Number: 0000194566) (Madison, USA)	Gerçek zamanlı PCR (qPCR) analizlerinde, hedef genlerin kantitatif olarak ölçümünde kullanılmaktadır.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)	İzole edilen RNA'dan miRNA için cDNA sentezi yapılmasında kullanılmaktadır.
BlasTaqTM 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials)	miRNA için qRT-PCR analizlerinde kullanılmaktadır.

EK 2: Deney Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme	Kullanım Amacı
25cm^2 ve 75cm2'lik flasklar	Hücrelerin uygun koşullarda kültüre edilmesi ve çoğaltılması amacıyla kullanılan, farklı yüzey alanlarına sahip iki ayrı boyutta kültür kabı olarak kullanılmaktadır.
2 ml ve 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpleri	Numune saklama, santrifüjleme ve reaktif karışımlarının hazırlanmasında kullanılmaktadır.
10 µL, 100 µL, 200 µL ve 1000 µL DNase/RNase Free filtreli pipet uçları	Kontaminasyonu önlemek ve farklı hacimlerde hassas sıvı transferi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.
0,2 ml RT-PCR tüpleri, ThermoFisher	cDNA sentezi
0.1mL 96-Well qRT-PCR Plate,Clear	qRT-PCR
Parafilm	Reaktif şişelerinin, kültür kaplarının ve tüplerin hava geçirmez şekilde kapatılması için kullanılmaktadır.
Pudrasız nitril eldiven (S)	Deney sırasında risklere karşı korumak ve numunelerde kontaminasyonu önlemek amacıyla kullanılmaktadır.

EK 3: Deney Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Cihazın adı	Kullanım Amacı
10 µl mikropipet	Numune transfer işlemlerinde hassas ölçüm sağlamak için kullanılmaktadır.
100 µl mikropipet	Numunelerin aktarımında standart bir hacim sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.
1000 µl mikropipet	Daha büyük hacimli numune transferi için tercih edilmektedir.
Steril Kabin, Fagus	Hücre kültürü çalışmaları için aseptik bir ortam sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.
Aspiratör, Value- VE115N	Hücre kültürlerinden besiyerinin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır.
CO_2 inkübatörü (%5 CO_2; 37 °C), Panasonic	Hücre kültürlerinin optimal büyüme koşullarını sağlamak için kullanılmaktadır.
Inverted mikroskop, Euromex- CMEX PRO 5	Hücrelerin morfolojik incelemeleri için kullanılmaktadır.
-80 °C Dondurucu, HARRIS	Hücre hatları ve RNA örneklerinin uzun süreli depolanması için tercih edilmektedir.
-20 °C Dondurucu, Arçelik	cDNA ve ilgili kitlerin güvenli bir şekilde saklanması amacıyla kullanılmaktadır.
Santrifüj, NÜVE- NF-800R	Pellet elde etme süreçlerinde kullanılmaktadır.
Mikrosantrifüj, Microfuge 16- Beckman Coulter	Pellet elde etme süreçlerinde kullanılmaktadır.
Vortex, VELP Scientifica	Numune ve çözeltilerin homojen bir şekilde karıştırılması için kullanılmaktadır.
Nanodrop, ThermoFisher Scientific NANODROP 2000	RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümü için kullanılmaktadır.
Termal döngüleyici PCR Cihazı, MJ RESEARCH ,INC. PTC-100	RNA örneklerinden cDNA sentezleme süreçlerinde kullanılmaktadır.
Buz makinası, Biobase FIM20	Deney esnasında gerekli olan buzun üretimi için kullanılmaktadır.
AB (Applied Biosystems) StepOnePlus qPCR (Real-Time PCR)	Araştırma kapsamındaki hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır.

EK 4: circPTPN22 ile etkileşim gösteren miRNA'lar

circBANK (https://www.circbank.cn/#/home)				**circİnteractome (https://circinteractome.nia.nih.gov/)**
hsa-miR-19a-5p	hsa-miR-635	hsa-miR-4516	hsa-miR-6788-5p	hsa-miR-1292
hsa-miR-19b-1-5p	hsa-miR-659-3p	hsa-miR-4651	hsa-miR-6795-5p	hsa-miR-145
hsa-miR-19b-2-5p	hsa-miR-765	hsa-miR-4665-5p	hsa-miR-6796-5p	hsa-miR-1825
hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-190b-5p	hsa-miR-4666a-3p	hsa-miR-6802-5p	hsa-miR-31
hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-877-5p	hsa-miR-4700-5p	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-411
hsa-miR-92a-1-5p	hsa-miR-665	hsa-miR-4723-5p	hsa-miR-6825-5p	hsa-miR-513a-3p
hsa-miR-92a-2-5p	hsa-miR-924	hsa-miR-4724-3p	hsa-miR-6830-5p	hsa-miR-513a-5p
hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-1253	hsa-miR-4728-5p	hsa-miR-6851-5p	hsa-miR-580
hsa-miR-135a-3p	hsa-miR-1258	hsa-miR-5000-5p	hsa-miR-6870-5p	hsa-miR-587
hsa-miR-9-5p	hsa-miR-1261	hsa-miR-5004-3p	hsa-miR-6873-5p	hsa-miR-625
hsa-miR-30c-1-3p	hsa-miR-1275	hsa-miR-5698	hsa-miR-6876-5p	hsa-miR-651
hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-2861	hsa-miR-5703	hsa-miR-6894-5p	hsa-miR-653
hsa-miR-450a-1-3p	hsa-miR-3175	hsa-miR-6134	hsa-miR-7106-5p	hsa-miR-659
hsa-miR-519c-5p	hsa-miR-3192-5p	hsa-miR-6499-3p	hsa-miR-7110-5p	
hsa-miR-519b-5p	hsa-miR-3193	hsa-miR-6503-5p	hsa-miR-7111-5p	
hsa-miR-523-5p	hsa-miR-4294	hsa-miR-6766-5p	hsa-miR-7160-5p	
hsa-miR-518f-5p	hsa-miR-4298	hsa-miR-6731-5p	hsa-miR-7703	
hsa-miR-526a-5p	hsa-miR-3679-5p	hsa-miR-6733-3p	hsa-miR-7855-5p	
hsa-miR-520c-5p	hsa-miR-3916	hsa-miR-6746-5p	hsa-miR-8068	
hsa-miR-518e-5p	hsa-miR-4433a-3p	hsa-miR-6748-5p	hsa-miR-8085	
hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-4447	hsa-miR-6750-5p	hsa-miR-8089	
hsa-miR-522-5p	hsa-miR-4453	hsa-miR-6756-5p	hsa-miR-10399-5p	
hsa-miR-519a-5p	hsa-miR-4472	hsa-miR-6760-5p	hsa-miR-12119	
hsa-miR-450a-2-3p	hsa-miR-4476	hsa-miR-4753-3p	hsa-miR-6809-3p	
hsa-miR-601	hsa-miR-3689d	hsa-miR-10393-5p	hsa-miR-550b-3p	

Not: her iki veritabanında da ortak olarak bulunan miRNA'lardan sadece bir miRNA eklenmiştir (EK 4 ve EK 5 için geçerlidir).

EK 5: PTPN22 genini hedef alan miRNA'lar

miRDB (https://mirdb.org/)		miRWalk (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)			
hsa-miR-3668	hsa-miR-4320	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-4692	hsa-miR-3154	hsa-miR-182-5p
hsa-miR-548at-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-602	hsa-miR-219a-1-3p	hsa-miR-3162-5p	hsa-let-7i-5p
hsa-miR-3128	hsa-miR-4795-3p	hsa-miR-630	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-548x-5p	hsa-miR-8074
hsa-miR-6844	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-3650	hsa-miR-361-3p
hsa-miR-4699-3p	hsa-miR-6083	hsa-miR-636	hsa-miR-105-3p	hsa-miR-3691-5p	hsa-miR-431-5p
hsa-miR-3671	hsa-miR-627-3p	hsa-miR-873-5p	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-3713	hsa-miR-486-5p
hsa-miR-3662	hsa-miR-586	hsa-miR-1305	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-4436a	hsa-miR-500a-3p
hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-219a-1-3p	hsa-miR-2278	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-548aj-5p	hsa-miR-597-3p
hsa-miR-4262	hsa-miR-3692-3p	hsa-miR-2682-5p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-4671-5p	hsa-miR-630
hsa-miR-561-3p	hsa-miR-4662a-3p	hsa-miR-3150a-3p	hsa-miR-431-5p	hsa-miR-4727-3p	hsa-miR-33b-3p
hsa-miR-7844-5p	hsa-miR-4722-3p	hsa-miR-3154	hsa-miR-4748	hsa-miR-4748	hsa-miR-1305
hsa-miR-12123	hsa-miR-6727-3p	hsa-miR-3162-5p	hsa-miR-4796-3p	hsa-miR-4766-5p	hsa-miR-2278
hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-509-3p	hsa-miR-3622a-5p	hsa-miR-6129	hsa-miR-5586-3p	hsa-miR-2682-5p
hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-1244	hsa-miR-3650	hsa-miR-6499-3p	hsa-miR-6129	hsa-miR-3129-5p
hsa-miR-4524a-3p	hsa-miR-5582-3p	hsa-miR-3713	hsa-miR-6734-5p	hsa-miR-6500-3p	hsa-miR-4269
hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-548az-5p	hsa-miR-4483	hsa-miR-6777-5p	hsa-miR-6511a-5p	hsa-miR-4436a
hsa-miR-335-5p	hsa-miR-16-1-3p	hsa-miR-4508	hsa-miR-6825-5p	hsa-miR-6731-5p	hsa-miR-4437
hsa-miR-3646	hsa-miR-1305	hsa-miR-4671-5p	hsa-miR-6882-5p	hsa-miR-6734-5p	hsa-miR-4661-3p
hsa-miR-5003-3p	hsa-miR-548t-5p	hsa-miR-4717-3p	hsa-miR-8074	hsa-miR-6777-5p	hsa-miR-4671-5p
hsa-miR-5589-3p	hsa-miR-4423-3p	hsa-miR-4727-3p	hsa-miR-10526-3p	hsa-miR-6799-5p	hsa-miR-4727-3p
hsa-miR-1250-3p	hsa-miR-6824-5p	hsa-miR-4727-3p	hsa-miR-9851-5p	hsa-miR-6800-5p	hsa-miR-4748
hsa-miR-3157-3p	hsa-miR-4452	hsa-miR-4725-3p	hsa-miR-12131	hsa-miR-6824-5p	hsa-miR-4766-5p
hsa-miR-325	hsa-miR-4778-5p	hsa-miR-4727-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-6825-5p	hsa-miR-6129
hsa-miR-576-5p	hsa-miR-630	hsa-miR-5681b	hsa-miR-105-3p	hsa-miR-6882-5p	hsa-miR-9851-5p
hsa-miR-6516-5p	hsa-miR-6790-5p	hsa-miR-4727-3p	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-9851-5p	hsa-miR-6734-5p
hsa-miR-577	hsa-miR-4658	hsa-miR-548g-5p	hsa-miR-6882-5p	hsa-miR-12131	hsa-miR-6777-5p
hsa-miR-126-5p	hsa-miR-7156-3p	hsa-miR-548x-5p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-6800-5p
hsa-miR-624-3p	hsa-miR-664a-3p	hsa-miR-548aj-5p	hsa-miR-630	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-6824-5p
hsa-miR-548n	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-11181-3p	hsa-miR-548g-5p	hsa-miR-105-3p	hsa-miR-6825-5p
hsa-miR-6885-3p	hsa-miR-6783-5p	hsa-miR-219a-1-3p	hsa-miR-2682-5p	hsa-miR-139-3p	
hsa-miR-4766-5p	hsa-miR-4271				
hsa-miR-617	hsa-miR-4519				
hsa-miR-4666a-3p	hsa-miR-2278				
hsa-miR-5700	hsa-miR-4274				
hsa-miR-429	hsa-miR-5009-5p				
hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-876-5p				

EK 6: Her iki molekül ile de etkileşime giren ortak miRNA'lar

hsa-miR-4666a-3p
hsa-miR-6499-3p
hsa-miR-6731-5p
hsa-miR-6825-5p
hsa-miR-31 (PTPN22'de hsa-miR-31-5p bulunmaktadır. İkisi de farklı iplikçikten türeyen fakat aynı miRNA)
hsa-miR-145 (PTPN22'de hsa-miR-145-5p bulunmaktadır. İkisi de farklı iplikçikten türeyen fakat aynı miRNA)