AKCİĞER KANSERİNDE circGPRC5A ARACILI GPRC5A GEN İFADESİNİN REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

DAOUDE AG HAMMA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNDE circGPRC5A ARACILI GPRC5A GEN İFADESİNİN REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Daoude Ag HAMMA
0009-0000-9094-5080

Dr.Öğr.Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKCİĞER KANSERİNDE CİRCGPRC5A ARACILI GPRC5A GEN İFADESİNİN REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Daoude Ag HAMMA

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

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Elif UZ YILDIRM

İnsan genom projesinin ardından bilimsel çalışmalar kodlamayan RNA'lar üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu kodlanmayan RNA'lar gen ifadesini düzenlediklerinden dolayı çeşitli fizyolojik süreçlerde hayati öneme sahiplerdir. Bu kodlanmayan RNA ailesinin bir üyesi olan circRNA'lar son zamanlarda çok ilgi duyulan araştırma alanı haline gelişmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda circRNA'ların çeşitli kanserlerde özellikle akciğer kanserinde rol aldıkları gösterilmiştir. circRNA'lar gen ifadesini circRNA-miRNA-mRNA ekseni üzerinden düzenleyebilmektedirler. Akciğer dokusunda tümör baskılayıcı görevi olan *GPRC5A*'nın anormal ekspresyonu literatürde gösterilmiştir, fakat bu anormal ekspresyona neden olan mekanizma ile çalışmalar çok sınırlıdır. Bu bakımdan bu tez çalışmasında circGPRC5A'nın ekspresyon profili incelenip *GPRC5A* geninin ekspresyonunu düzenlemesindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda tez çalışmasını gerçekleştirmek için *in vitro* olarak akciğer kanseri hücre hattı olan A549 & H1299 ile sağlıklı akciğer dokusunun hücre hattı olan Beas-2B kullanılmıştır. Gen ifadesini analizi için hücrelerden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi yapılmış ve ardından genlerin ifade seviyelerini belirlemek için gerçek zamanlı PCR (qPCR) reaksiyonu kurulmuştur. Elden edilen sonuçlar *GAPDH* ile normalize edildiğinde circGPRC5A hem A549 hem de H1299 hücre hattında düşüş göstermektedir. circHIPK3 ile normalize edildiğinde ise A549 hücre hattında ifade değişikliği yokken H1299 hücre hattında circGPRC5A düşüş göstermektedir. *GPRC5A* ise mRNA düzeyinde A 549 hücre hattında 1,7 kat artış gösterirken H1299 hücre hattında düşüş göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda akciğer kanserindeki rolünü aydınlatmak için circGPRC5A'yı circRNA-miRNA-mRNA ekseninde incelemek suretiyle ilerdeki bir çalışmanın konusu olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *GPRC5A* geni, circGPRC5A, miRNA, Akciğer kanseri, post-transkripsiyonel gen regülasyonu
2024, XIV + 53 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE REGULATION OF GPRC5A GENE EXPRESSION MEDIATED BY CIRC-GPRC5A IN LUNG CANCER

Daoude Ag HAMMA

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

Supervisor: Assist.Prof. Elif UZ YILDIRIM

Following the Human Genome Project, scientific studies have begun to focus on non-coding RNAs. These non-coding RNAs play a vital role in various physiological processes as they regulate gene expression. CircRNAs, a member of this non-coding RNA family, have recently become a highly interesting area of research. Recent studies have shown that circRNAs play a role in various cancers, especially lung cancer. CircRNAs can regulate gene expression through the circRNA-miRNA-mRNA axis. Abnormal expression of GPRC5A, a tumor suppressor in lung tissue, has been shown in the literature, but studies on the mechanism causing this abnormal expression are very limited. Therefore, the aim of this thesis study was to investigate the expression profile of circGPRC5A and its effect on the regulation of GPRC5A gene expression. To this end, A549 & H1299, lung cancer cell lines, and Beas-2B, a healthy lung tissue cell line, were used in vitro for the thesis study. After RNA isolation from the cells for gene expression analysis, cDNA synthesis was performed, and then real-time PCR (qPCR) reactions were set up to determine the expression levels of the genes. When the results obtained were normalized with GAPDH, circGPRC5A decreased in both A549 and H1299 cell lines. When normalized with circHIPK3, circGPRC5A decreased in the H1299 cell line, while there was no change in expression in the A549 cell line. On the other hand, GPRC5A showed a 1.7-fold increase at the mRNA level in the A549 cell line, while it decreased in the H1299 cell line. In light of these results, it may be the subject of a future study to investigate circGPRC5A in the circRNA-miRNA-mRNA axis to elucidate its role in lung cancer.

Key words: *GPRC5A* gene, circGPRC5A, miRNA, Lung cancer, post-transcriptional gene regulation
2024, XIV + 53 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana ilham kaynağı olan, engin bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşarak akademik gelişimime katkıda bulunan kıymetli danışmanım Doktor Öğretim Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince laboratuvarını kullanmama olanak tanıyan ve her konuda destek olan Doç.Dr Figen ERSOY hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde kullandığım hücre hatları sağladıkları için Prof.Dr Ferda ARI ve tüm ekibine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü çalışması için labotuvar imkânı sağladığı için Prof. Dr. SERAP ÇELİKLER KASIMOĞULLARI en içten teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmam boyunca deneylerin kurgulanmasında her adımda bana rehberlik eden ve destek olan doktora öğrencisi Merve DEMİRBAĞ KARAALİ ve Arş.Gör.Dr. Mehmet KARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince sağladıkları burs desteği ile akademik hedeflerime ulaşmamda ve eğitimime odaklanmamda büyük bir rol olan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu ve uzun soluklu eğitim hayatım boyunca her daim yanımda olan, bana maddi ve manevi yönden sınırsız destek veren aileme sonsuz minnettarım. Küçüklüğümden beri eğitimime verdikleri önem ve inandıkları potansiyel sayesinde bu aşamaya kadar gelmeyi başardım. Zor zamanlarda bana ilham kaynağı olan ve her zaman yanımda duran anneme ve babama, bana her konuda yardımcı olan ve beni motive eden kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Daoude Ag HAMMA
29/07/2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET viii
ABSTRACT ix
TEŞEKKÜR x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Kanser 4
2.2 Kanser Hücrelerin Temel Özellikleri 5
2.3 Kanser Çeşitleri 6
2.4 Kanser Gelişiminde Etkili Faktörler 8
2.5 Akciğer Kanseri 9
2.6 GPRC5A ve Kanserdeki Fonksiyonel Rolü 10
2.7 . Kodlamayan RNA'lar 13
2.7.1 circRNA'ların Biyosentezi ve Fonksiyonları 14
2.7.1.1 Back-splicing ve CircRNA'ların Biyosentezi 15
2.7.1.2 circRNA'ların Biyolojik Fonksiyonları 16
2.7.2 circRNA'lar ve Kanserdeki Rolleri 18
3. MATERYAL ve YÖNTEM 21
3.1 Materyal 21
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 21
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler 21
3.1.3. Kullanılan cihazlar 21
3.2 Yöntem 21
3.2.1. Hücre kültürü çalışması 22
3.2.2. Hücre kültürü çalışması için besiyerinin hazırlanması 22
3.2.3. Hücre hatlarının kültüre alınması 22
3.2.4 Hücrelerin pasajlanması 22
3.2.5 Hücrelerden Total RNA izolasyonu 23
3.2.6 RNA örneklerinin konsantrasyonunun ölçülmesi 24
3.2.7 RNA örneklerinden cDNA sentezi 24
3.2.8 Gen ifadesinin Gerçek-Zamanlı PCR (RT-qPCR) ile ölçülmesi 25
3.2.9. Aday miRNA arayışı için *in silico* tarama 27
4. BULGULAR 28
4.1. A549 ve Beas-2B hücre hatlarının mikroskopik inceleme sonuçları 28
4.2 RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri (Nanodrop sonuçları) 30
4.3 RT-qPCR sonuçları 30
4.4Aday miRNA arayışı için *in silico* tarama 34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 36
KAYNAKLAR 40
EKLER 48
ÖZGEÇMİŞ 53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	yüzde
°C	santigrat derece
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
Bp	baz çifti
Dk	dakika
M	molar
Mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
ng	nanogram
pmol	pikomol
sn	saniye
U	ünite
Δ	delta

Kısaltmalar	Açıklama
3’ UTR	3’ çevrilmeyen bölge (untranslated region)
5' UTR	5’ çevrilmeyen bölge (untranslated region)
cDNA	Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
circRNA	Dairesel RNA (Circular RNA)
CLL	Kronik lenfositik lösemi (Chronic lymphocytic leukemia)
CO2	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPCR	G protein-coupled receptors
GPRC5A	G protein-coupled receptor class C group 5 member A
HCC	Hepatoselüler karsinom (Hepatocellular carcinoma)
IRES	Internal ribosome entry sites
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Haberci RNA
ncRNA	Kodlamayan RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pre-miRNA	Öncü mikro RNA
RBP	RNA bağlayıcı protein (RNA-binding protein)
RISC	RNA-indüklenmiş susturma kompleksi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSG	Tümör baskılayıcı genler (tumor suppressor genes)

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanserin Belirgin Özellikleri	5
Şekil 2.2.	Kanserin ayırt edici ve tetikleyici özellikleri	6
Şekil 2.3.	Kanser Çeşitleri	6
Şekil 2.4.	Kanserin oluşumunda etkili olan moleküler mekanizmalar	8
Şekil 2.5.	GPRC5A'nın farklı dokulardaki ekspresyon profili	11
Şekil 2.6.	ncRNA'ların genomdaki bolluğu ve kapsadığı yer	13
Şekil 2.7.	circRNA'ların keşfi ile ilgili tarihsel bir bakış	14
Şekil 2.8.	Back-splicing yoluyla circRNA'lar biyosentezi	15
Şekil 2.9.	Lariat ile circRNA'ların oluşumu	16
Şekil 2.10.	circRNA'ların hücresel ana fonksiyonları	18
Şekil 2.11.	circRNA'ların ve kanser özelliklerin doğrudan ilişkisi	19
Şekil 3.1.	Çalışma kapsamında uygulanacak yöntemlerin özeti	21
Şekil 4.1.	Akciğer kanseri hücrelerinin (A549 hattı) mikroskopik görüntüsü	28
Şekil 4. 2.	Akciğer kanseri hücrelerinin (H1299 hattı) mikroskopik görüntüsü	29
Şekil 4.3.	Normal akciğer epitel hücreleri (Beas-2B) mikroskop altındaki görüntüsü	29
Şekil 4.4.	Akciğer kanseri hücre hatlarında circGPRC5A'nın relatif ekspresiyonu	32
Şekil 4.5	Akciğer hücre hatlarında circGPRC5A ve GPRC5A'nın relatif ekspresyonu	33
Şekil 4.6	circGPRC5A ve GPRC5A'nın ortak miRNA'ların sayısı	34
Şekil 4.7	circGPRC5A ve GPRC5A'nın ortak miRNA'ların listesi	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	3.1.	cDNA sentez bileşenleri	24
Çizelge	3.2.	cDNA sentez koşullar	25
Çizelge	3.3.	qPCR reaksiyonu mix bileşenleri	26
Çizelge	3.4.	qPCR'in çalışma koşulları	26
Çizelge	3.5.	qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları	26
Çizelge	4.1.	RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri	30
Çizelge	4.2.	qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri	31

1. GİRİŞ

Dünya çapında her yıl tahmini 2,20 milyon yeni vaka ve 1,79 milyon ölümle akciğer kanseri, en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebidir. Son yıllarda hastalığın biyolojisi hakkındaki bilgilerimizde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler, öngörücü biyobelirteçlerin kullanımı ve tedavideki yenilikler ile birlikte birçok hasta için kayda değer ilerleme ve daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır (Thai et al., 2021a).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, akciğer kanserinin oluşumunda etkili olan moleküler mekanizmaları aydınlatmaya çalışmaktadır. Bu moleküllerden biri, GPRC5A (G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member A) gen ürünüdür. GPRC5A'nın geniş fizyolojik işlevleri nedeniyle, anormal GPCR aktivasyonu sıklıkla hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir (X. Jiang vd., 2018a; Song vd., 2019a). GPRC5A'nın ifadesinin akciğer kanserinde azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (E. Jin vd., 2019; Lin vd., 2024a). Ancak bu ifadenin azalma nedeni ile çalışmaların sayısı çok sınırlıdır. Çeşitli hastalıklarda GPRC5A'yı ncRNA'lar (kodlamayan RNA) tarafından hedef alındığını çalışmalar ışığında gösterilmektedir (Tabet vd., 2020; J. Wang vd., 2019). Bu ncRNA'ların bir üyesi olan miRNA'lar gen ifadesinin düzenleyicilerinin ana unsurudur.

mRNA'ların posttranskripsiyonel modifikasyonları içinde circRNA-miRNA-mRNA ekseni kodlanmayan RNA'lar ve mRNA ilişkilerini açıklamak üzere son yıllarda yoğun olarak çalışılan epigenetik mekanizmalardan en önemlileri olmaya başlamıştır. Tez çalışmamızın merkezinde bulunan *GPRC5A* geninin ifadesini kontrol edebilecek potansiyeli olan circRNA arayışına girildiğinde ilk adayımız circGPRC5A olmuştur. circGPRC5A'yı seçmemizin iki sebebi bulunmaktadır: (1) circGPRC5A (hsa_circ_0025506), aynı ismi aldığı ve 12. Kromozom üzerinde bulunan *GPRC5A* geninin (chr12:13,061,176–13,062,105) 2. exonunun geri-splays (back-splicing) mekanizması ile sentezlendiği gösterilmiştir (Z. Chen vd., 2023). Hedef geni ile aynı lokasyondan sentezlenen dairesel RNA'ların aynı isimli genin ifadesini modüle ettiği ile ilgili deneysel çalışmalar bulunduğundan (Ou vd., 2020; Y. Wang vd., 2021; Yao vd.,

2017; J. Zhou vd., 2019)GPRC5A'nın ifadesini etkileme potansiyeline sahip dairesel RNA'lar içinde ilk adayımız circGPRC5A olmuştur. (2) Literatürde *GPRC5A*'nın ifadesini etkilediği deneysel olarak gösterilen dairesel RNA'lar incelendiğinde toplam dört aday circRNA karşımıza çıkmaktadır:

1. hsa_circ_006100: Bu circRNA'nın ifadesi gastrik kanserde incelenmiş ve miR-195 üzerinden *GPRC5A*'nın ifadesinin tümörlerde arttığı gösterilmiş (Liang vd., 2019).
2. hsa_circ_0000144: Gastrik kanserde circ_0000144 ifadesinin artmasıyla miR-623'ü süngerleyerek (baskılayarak) *GPRC5A* ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Mi vd., 2020).
3. circ_EZH2_005: Bağırsak iskemi-reperfüzyon hasarı (intestinal ischemia/reperfusion injury) hastalarının plazmasından elde edilen exosomal circ_EZH2_005 ifadesinin kontrollere göre yükseldiği rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki hastalık modeli kanser değildir, ayrıca plazmadan exosomal circRNA izole edilerek tasarlanmış olup kanser çalışmalarında model olarak kullanmak için daha zayıf bir aday dairesel RNA durumundadır (W. Zhang vd., 2023).
4. hsa_circ_0025506 (circGPRC5A): Her ne kadar insanda bu dairesel RNA ve ilgili geni olan GPRC5A ile ilgili çalışma olmasa da aynı isimli genden sentezlenmiş olan dairesel RNA'ların genin mRNA ifadesini etkilediği örnekler çok olduğu ve literatürde bu konuda boşluk olduğu için bizim bu çalışmadaki ilk hedefimiz circGPRC5A olmuştur.

Bütün bunların yanı sıra farelerde yapılan bir çalışmada circGPRC5A'nın (has_circ_0025506) tümörlerde ifade edildiği bildirilmiştir. Bir çalışma, circGPRC5A-peptid-GPRC5A'nın mesane kanseri ve mesane kanseri kök hücrelerini hedeflemek için kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Gu vd., 2018)

Bütün bu çalışmalar circRNA'ların kanser oluşumundaki rolünün her geçen gün arttığı ile ilgili ipuçlarını göstermektedir. Literatür taramamız sonucu *GPRC5A* gen ifadesini etkilediği düşünülen circGPRC5A etkisi ile ilgili akciğer kanserinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bütün bu ön tarama sonuçlarını birleştirdiğimizde bu Tez çalışmamızın kapsamında ilk aşamada circGPRC5A'nın ifadesi akciğer kanseri ve normal hücre hatlarında kıyaslanacaktır. Bu kıyaslama sonucu farklılık gözlendiği takdirde bu farklılığın circRNA-miRNA -GPRC5A-mRNA hattı boyunca ilerdeki bir çalışmanın konusu olabilecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser dünya çapında yaygın bir hastalıktır, moleküler patolojisi, kontrolünü zorlaştıran geniş bir biyolojik agresiflik spektrumu ile karakterize edilir, bu nedenle yaşamı tehdit eden bir hastalıktır (Diori Karidio & Sanlier, 2021). Kanser genetik bir hastalıktır ve temel olarak onko-genlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin arızalanması veya dış faktörlere bağlı mutajenez gibi bir dizi nedenden dolayı ortaya çıkmaktadır (Imran vd., 2017).

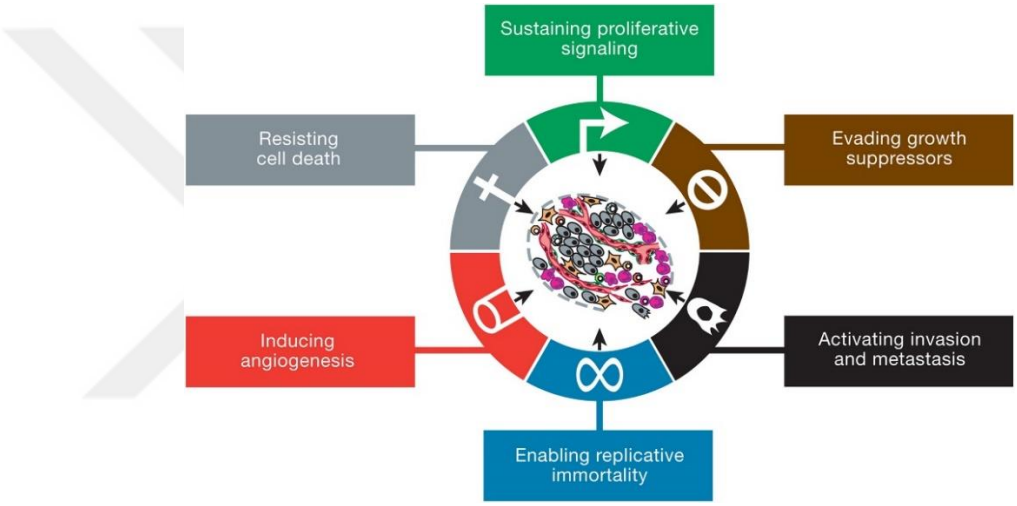
Kanser, vücudun herhangi bir bölümüne yayılabilen hücresel büyümede anormallik içeren bir hastalık grubudur. Bilimsel olarak, kanser, normal bir hücrenin hücresel kontrol mekanizmalarından kaçarak kontrolsüz bir şekilde bölünmesi,büyümesi ve bir bölgeden diğerine yayılma potansiyeli kazanması durumunda tanımlanabilir (Azees vd., 2022).

Kanser, normal benzerlerine göre zamansal olarak sınırsız büyüme tercihi gösteren (popülasyondaki hücre sayısının sürekli artması) anormal hücrelerin bir popülasyonudur. Bu tür anormal hücreler, çevre dokulara yayılır, en az bir bazal membran bölgesini geçer, birincil yerde mezenkime büyür ve uzak yerlere metastaz yapabilirler. Bir lezyonun kanser olarak adlandırılıp adlandırılmamasını belirleyen, tek bir özellik değil, tüm özelliklerin toplamıdır (Clark, 1991).

Kanser, bir organizmanın genleri ile çevresi arasındaki etkileşimleri içeren çok adımlı ve çok faktörlü moleküler olaylar sonucunda ortaya çıkar. Bu süreç, karsinojenez olarak da bilinen tümör oluşumu veya onkojenez adı verilen bir süreç aracılığıyla gerçekleşir. Söz konusu süreç, ardışık mutasyon(lar) ve/veya epimutasyon(lar) içeren çok adımlı bir süreçtir ve kontrolsüz hücre çoğalması ile hedonik homeostatik düzensizliğe yol açar. Kansere sebep olan değişiklikler, hücre metabolizmasını ve davranışını aşamalı olarak düzenlemektedir (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

2.2 Kanser Hücrelerin Temel Özellikleri

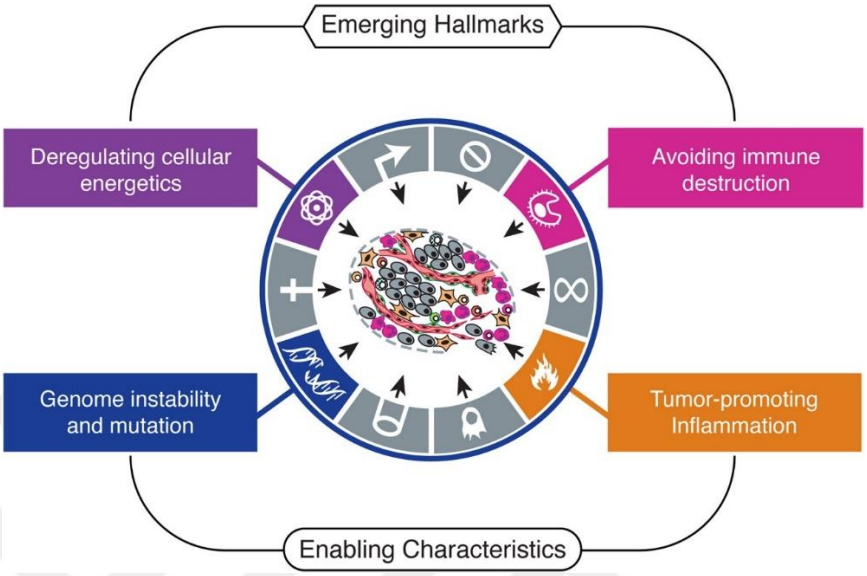
Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden faklı kılacak ve kendilerine has ayrıt edici bazı özelliklere sahiptir. Bu özellikler "Hallmarks of Cancer" yani kanser işaretleri olarak bilinmektedir. Bu kavram ilk olarak 2000 yılında Douglas Hanahan ve arkadaşı tarafından ortaya konulmuştur. Buna göre kanserli hücreler altı (6) temel özellik kazanmaktadır: Büyüme sinyallerine bağımsızlık, büyümeyi engelleyici (antibüyüme) sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma, sınırsız replikatif potansiyel, sürekli anjiyogenez ve doku invazyonu ile metastaz (Hanahan & Weinberg, 2000).



Şekil 2.1. Kanserin Belirgin Özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2000)

Hanahan ve Weinberg, kanserin belirleyici özelliklerini, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve yayılmasına izin veren edinilmiş işlevsel yetenekler olarak tanımladılar; bu fonksiyonlar, çok adımlı tümör oluşumunun seyri esnasında farklı tümör tiplerinde farklı mekanizmalar ve çeşitli zamanlarda kazanılır. Bu yeteneklerin kazanılmasını sağlayan iki etkin karakteristik bulunmaktadır. En belirgin olanı, kanser hücrelerinde genomik istikrarsızlığın gelişimidir; bu, kromozomal yeniden düzenlemeler de dahil olmak üzere rastgele mutasyonları oluşturur. Bunlar arasında belirleyici yetenekleri düzenleyebilen nadir genetik değişiklikler bulunmaktadır. İkinci etkin karakteristik ise, premalign ve açıkça malign lezyonların inflamatuar durumudur; bu durum, bağışıklık sistemi hücrelerinin etkisiyle tetiklenir ve bazıları tümör ilerlemesini çeşitli yollarla teşvik eder. Kanser hücrelerinin diğer farklı özelliklerinin, kanserin

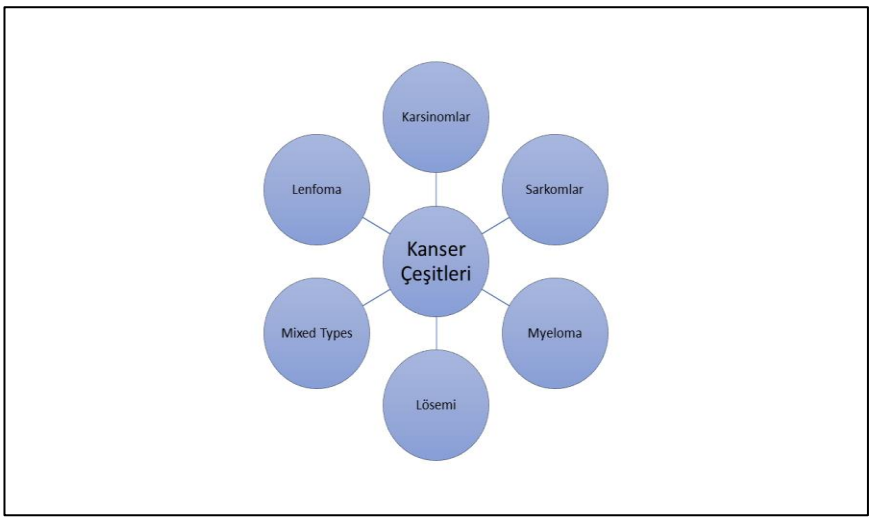
gelişimi için işlevsel olarak önemli olabileceği öne sürülmüş ve dolayısıyla bu özellikler, çekirdek (ana=core halkmarks) belirleyiciler listesine eklenebilir (Hanahan & Weinberg, 2011).



Şekil 2.2. Kanserin ayırt edici ve tetikleyici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.3 Kanser Çeşitleri

Kanser histolojik türü veya primer bölgesine bağlı olarak sınıflandırılabilir. Histolojik özelliklerini göz önünde bulundurursak kanserin beş (5) ana sınıfta incelenebilmektedir: karsinom; sarkom; miyelom; lösemi; ve lenfoma. .



Şekil 2.3. Kanser Çeşitleri

Karsinom :

Karsinom, vücudun iç veya dış tabakasında köken alan malign epitelyal neoplazma veya kanser anlamına gelir. Epitelyal dokunun malignite durumu olan karsinomlar, tüm kanser vakalarının %80 ila %90'ını teşkil etmektedir. Karsinomlar, iki ana alt türe ayrılır: Bir organ veya bezde gelişen adenokarsinom ve skuamöz epitelde köken alan skuamöz hücreli karsinom (U. S. National Institutes of Health, n.d.).

Sarkom :

Sarkom, vücudumuzdaki kemikler, tendonlar, kıkırdak, kaslar ve yağ gibi destekleyici ve bağ dokularında kök salan nadir bir kanser türüdür. Genç yetişkinlerde daha sık görülme eğiliminde olsa da her yaştan insanı etkileyebilir. En yaygın belirtisi, genellikle kemikte oluşan ve ağrıya neden olan bir kitledir. Sarkom tümörleri, büyüdükleri dokuya yapısal olarak benzeyerek tanınmasını zorlaştırabilir (U. S. National Institutes of Health, t.y.).

Myeloma :

Myeloma, kemik iliğinin plazma hücrelerinde köken alan bir kanserdir. Plazma hücreleri, kanda bulunan bazı proteinleri üretirler (U. S. National Institutes of Health, t.y.).

Lösemi

Lösemi, çocuklarda ve yetişkinlerde sık görülen bir kanser türüdür. Bu kanser, normal hücre düzenleyici süreçlerindeki değişiklikler nedeniyle kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkar (Davis vd., 2014). Hastalık genellikle olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimiyle ilişkilidir. Bu olgunlaşmamış beyaz kan hücreleri beklenen performansı göstermezler, bu nedenle hasta genellikle enfeksiyonlara yatkındır. Ayrıca lösemi kırmızı kan hücrelerini de etkiler ve anemiye bağlı olarak kötü kan pıhtılaşması ve yorgunluk yaşatabilir (U. S. National Institutes of Health, t.y.).

Lenfoma:

Lenfomalar, vücut sıvılarını arıtıp enfeksiyonla savaşan beyaz kan hücreleri veya lenfositleri üreten (özellikle dalak, bademcikler ve timüs) damarlar, nodüller ve organlardan oluşan lenfatik sistemdeki bezlerde veya nodüllerde gelişir. "Sıvı kanserler"

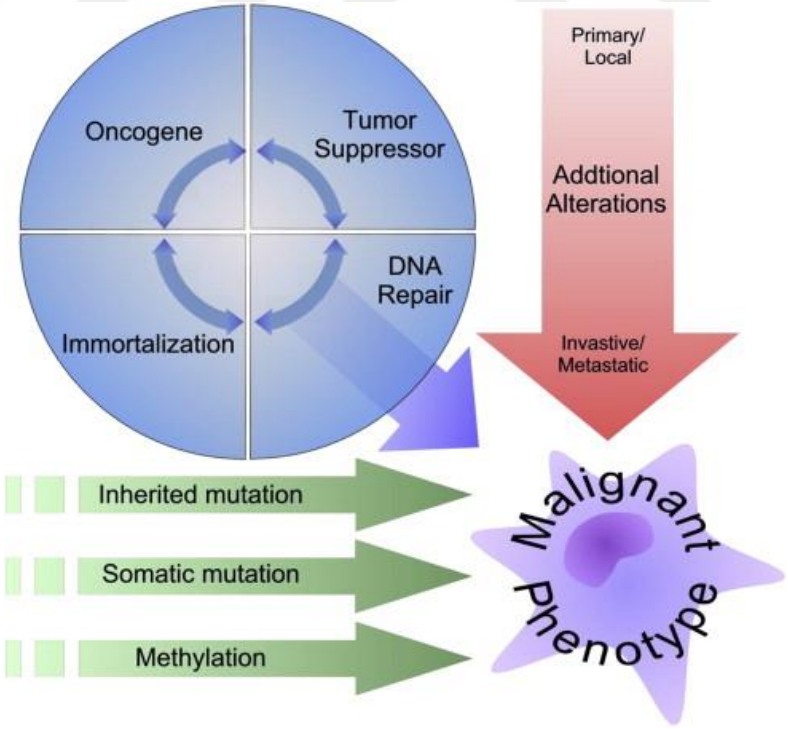
olarak adlandırılan lösemilerin aksine, lenfomalar "katı kanserlerdir." (U. S. National Institutes of Health, t.y.)

2.4 Kanser Gelişiminde Etkili Faktörler

Kanser, iki tür gen olan tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) ve proto-onkogenlerde biriken genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu bir hastalıktır (L. H. Wang vd., 2019).

Kanser, uzun bir süre boyunca birden fazla moleküler değişikliğin birikmesi sonuncunda meydana gelmektedir (Massion & Carbone, 2003).

Normal bir hücreden metastatik bir kanser hücresine evrim, birden fazla genetik ve epigenetik değişiklik gerektirir. Genel olarak, bu değişikliklerin bir hücrenin kötü huylu dönüşüm geçiren soyuna aktarılmasını sağlayan en az üç mekanizma vardır: kalıtsal bir mutasyon, somatik bir mutasyon ve hücrenin DNA'sının metilasyonu (Riley & Desai, 2009).



Şekil 2.4. Kanserin oluşumunda etkili olan moleküler mekanizmalar **(Riley & Desai, 2009)**

Normal hücrede, biyolojik süreçlerin ana düzenleyici faktörleri olan proto-onkogenler bulunmaktadır. Proto-onkogenler, büyüme faktörleri olarak, hücresel sinyal iletenler olarak ve nükleer transkripsiyon faktörleri olarak işlev görebilirler. Memeli ve kuş genomları, normal hücre farklılaşması ve çoğalmasını kontrol eden bir dizi proto-onkogen içerir. Bu genlerdeki değişiklikler hem davranışlarının kontrolünü etkileyen hem de kodladıkları proteinlerin yapısını değiştirecek şekilde kanser hücrelerinde aktif hale gelmiş onkogenler olarak ortaya çıkabilirler (Kontomanolis vd., 2020). Örnek olarak *ras* proto-onkogeninde meydana gelen nokta mutasyonu bir amino asidin değişmesiyle sonuçlanarak hücrenin fenotipinde bir değişiklik meydana getirmektedir. Benzer durumda *c-myc* normal hücreye göre aşırı ifade edilmiş olarak tanımlanan ile onkogendir. Kromozomal translokasyonlar da proto-onkogenlerin ifadesinde değişiklik meydana getirerek onları onkogen haline getirir (Weber & Mcclure, 1987).

TSG'ler, DNA hasar onarımında, hücre bölünmesinin engellenmesinde, apoptozun indüksiyonunda ve metastazın bastırılmasında rol oynayan başka bir tür önemli genler olarak kabul edilirler. Dolayısıyla, TSG'lerin işlevinin kaybı kanserin başlangıcı ve ilerlemesiyle sonuçlanır (L. H. Wang vd., 2019).

2.5 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, her yıl dünya çapında 2,2 milyondan fazla yeni vakaya ve 1,79 milyondan fazla ölüme neden olarak, kanser türleri arasında en ölümcül ve en sık tanısı konulanlardan biridir (Bray vd., 2024). Bu ürkütücü istatistikler, akciğer kanserinin küresel halk sağlığı üzerinde yarattığı yıkıcı etkiyi açıkça ortaya koymaktadır. Hastalıkların moleküler mekanizmalarına dair kazanılan derinlemesine bilgi, biyobelirteçlerin klinik uygulamalara entegre edilmesi ve tedavi protokollerindeki yenilikler, son yirmi yıllık dönemde önemli tıbbi gelişmelere öncülük ederek pek çok hastanın prognozunu olumlu yönde etkilemiştir (Thai vd., 2021b).

Histolojik olarak akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İkincisi yani KHDAK akciğer kanseri vakalarının %80'inden fazlasını teşkil eder ve adenokarsinom, skuamöz

hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (K. L. Wu vd., 2019). Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi akciğer kanseri tedavisinde en sık kullanılan geleneksel tedavilerdir (Fariha vd., 2022).

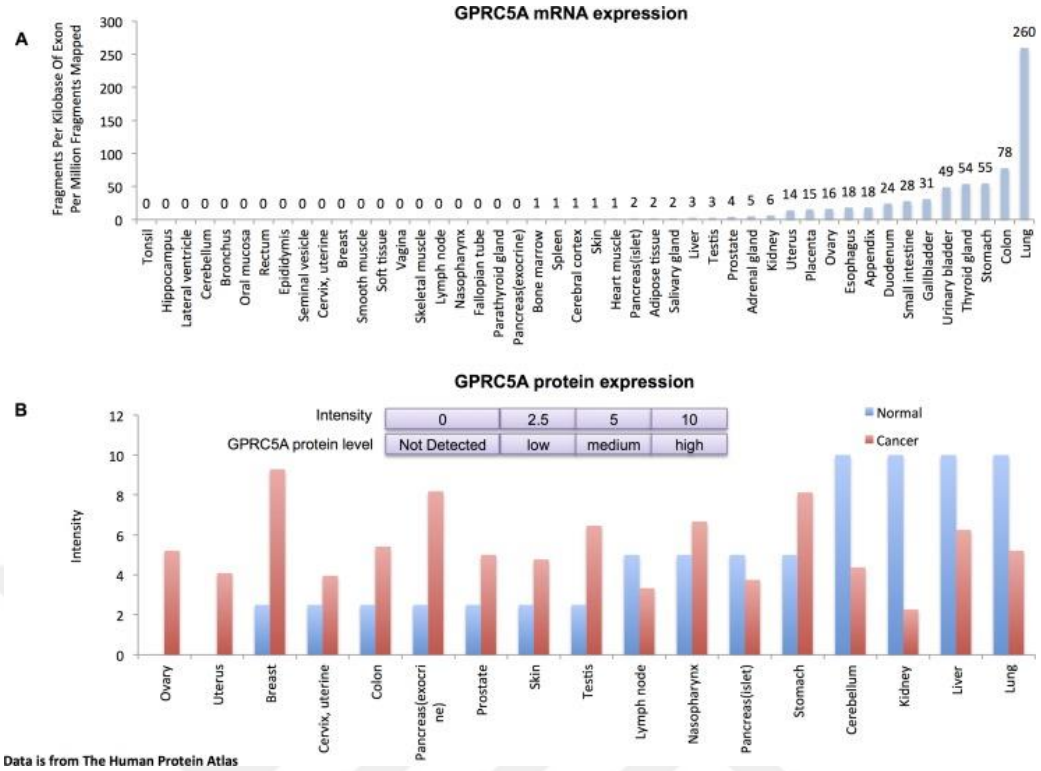
2.6 GPRC5A ve Kanserdeki Fonksiyonel Rolü

G-protein bağlı reseptörler (GPCR'ler), yedi α-helikal transmembran yapıyı paylaşan proteinler olup hem omurgalı hem de omurgasız canlılarda bir dizi fizyolojik süreci yönetirler. GPCR'lerin ana işlevi hücre dışı sinyalleri iletmek ve heterotrimerik G-proteinlerine ve bunları sinyal yolağında takip eden diğer efektör proteinlere bağlanarak hücre içi ikinci habercileri düzenlemektir (Liu vd., 2021).

GPRC5A ilk kez 1998 yılında keşfedildi ve ilk başlarda retinoik asit ile indüklenmiş gen 3 (RAI3) veya retinoik asit ile indüklenmiş gen 1 (RAIG1) olarak isimlendirildi (Cheng & Lotan, 1998).

Bu genden sentezlenen GPRC5A proteini, G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) ailesine ait olup, reseptörlerin en büyük ve en çeşitli üst ailelerinden biridir ve birçok fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Geniş fizyolojik fonksiyonlarından dolayı, düzensiz GPCR aktivasyonu sıklıkla hastalığın başlaması ve ilerlemesi ile ilişkilidir.

Bir dizi çalışma, GPCR'lerin tümör proliferasyonu, invazivlik, anjiyogenez, metastaz ve ilaç direncindeki kritik rolünü göstermiştir. GPRC5A da bu ailenin üyelerinden biri olup çeşitli kanserlerdeki etkisi hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Son zamanlarda, GPRC5A ifadesinin?? birçok insan kanserinde düzensiz olduğu bulunmuştur. Tümör ilerlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. GPRC5A ekspresyonun regülasyonu, transkrisyon, post-transkripsyon ve post-tanslasyonel düzeyde yapılmaktadır. Fakat en fazla çalışma, GPRC5A'nın post-transkripsyonel düzeyinde regülasyon üzerine yoğunlaşmaktadır (X. Jiang vd., 2018b).



Şekil 2.5. GPRC5A'nın farklı dokulardaki ekspresyon profili **(H. Zhou & Rigoutsos, 2014)**

Yapılan bir çalışmada, *GPRC5A*'nın insan akciğer tümörlerinde daha düşük ekspresyonu ve hücre hatlarında koloni oluşumunu azaltma kabiliyeti ile kanıtlandığı üzere, akciğer tümörü gelişimini baskılamada rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu da GPRC5A'nın akciğer kanserinde terapötik müdahale için potansiyel bir hedef olabileceği anlamına gelmektedir (Tao vd., 2007).

Pankreas kanserinde GPRC5A'nın ekspresyonunun arttığı ve GPRC5A ekspresyonunun bozulmasının tümör büyümesini canlı ortamda (in vivo) engellediği gözlemlenmiştir. Mekanistik olarak, GPRC5A, cAMP-CREB sinyal yoluyla YAP1 transkripsiyonunu pozitif bir şekilde regüle etmektedir (Fang vd., 2023).

GPRC5A geni delesyonu sonucunda, akciğerlerde ani tümör gelişimi gözlemlenmiştir. Bu etkinin, düzensiz MDM2 ve EGFR sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Song ve arkadaşları yaptığı çalışmada GPRC5A eksikliğinin aktive olmuş EGFR sinyal yoluyla MDM2'nin düzensizleşmesini artırarak akciğer tümörü

gelişimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Bu düzensizlik hem fare modellerinde hem de klinik insan akciğer kanseri dokularında gözlenmiştir ve akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini işaret etmektedir (Song vd., 2019b).

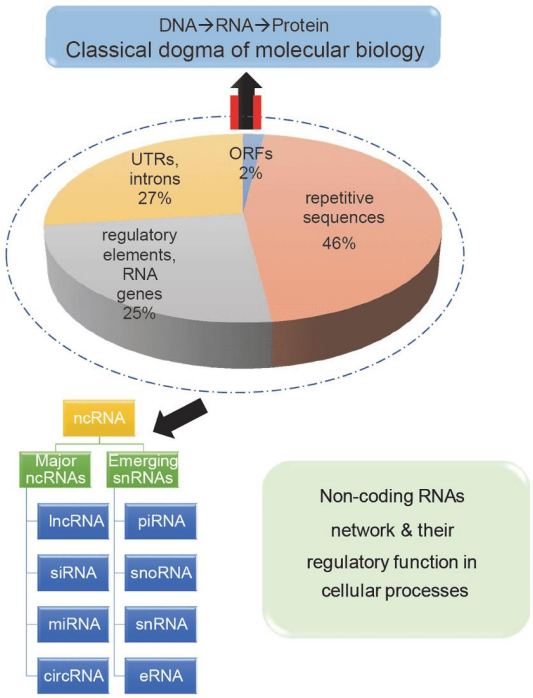
GPRC5A akciğer kanserinin hem kendiliğinden hem de çevresel faktörlere bağlı gelişimini önleyen bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir; ancak bu mekanizmanın tam olarak nasıl çalıştığı henüz açıklığa kavuşmamıştır. J.Wang ve arkadaşları yaptığı çalışmada, endoplazmik retikulum (ER) zarında yer alan GPRC5A'nın salgılanan veya membrana bağlı proteinlerin, özellikle de en önemli onkogen olan EGFR'nin sentezini baskıladığını öne sürmüştür. ER'de yer alan GPRC5A, mRNA başlığında eIF4F aracılı çeviri başlama kompleksinin oluşumunu, iki orta ekstrasellüler döngüsü ile doğrudan eIF4F kompleksine bağlanarak bozmaktadır. Özellikle GPRC5A tarafından EGFR baskılanması, iyonlaştırıcı radyasyona (IR) bağlı akciğer tümör oluşumunu önlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, GPRC5A delesyonu, IR ile uyarılmış EGFR ekspresyonunu çeviri oranını artırarak yükseltir ve böylece Gprc5a(-/-) farelerde akciğer tümör insidansını önemli ölçüde artırır. Bu bulgular, akciğer tümör gelişimi sırasında düşük ifade edilen GPRC5A'nın aktif bir çeviri durumu aracılığıyla herhangi bir transkripsiyonel stimülasyonu arttırdığını ve bu durumun onkogen ekspresyonunu ve potansiyel olarak ilişkili hastalığı kontrol etmek için kullanılabileceğini göstermektedir (J. Wang vd., 2016).

Yapılan araştırmalar, GPRC5A proteininin adenokarsinom doku yapısıyla önemli bir bağlantısı olduğunu ve GPRC5A düzeyinin nükleer faktör kappa B (NF-κB) düzeyiyle ters orantılı olduğunu göstermektedir (Fujimoto vd., 2012). Düşük GPRC5A ifadesinin, akciğer kanseri (KHDAK) türünde bağışıklık hücrelerinin artmış infiltrasyonu, daha yüksek immüno profilleri (IPS) ve PD-L1 pozitif tümör hücrelerinin mekansal dağılımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, GPRC5A'nın, PD-L1 (Programmed death-ligand 1) ve TMB (Tumour mutational burden) gibi bilinen belirteçlere ek olarak NSCLC'de potansiyel bir öngörücü belirteç veya tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir (Lin vd., 2024a).

2.7 . Kodlamayan RNA'lar

Biyolojik "Santral dogma"nın öne sürülmesinden önce, uzun bir süre boyunca ncRNA'ların hiçbir işlevi olmayan, yalnızca ara ürünler olduğu düşünülmüştür (Saw vd., 2021). Fakat ncRNA'ların işlevlerini ve proteinlerin genomun sadece %3 tarafından kodlandığını keşfedilmesiyle birlikte transkripsiyonun düzenlenmesine yalnızca protein yapısındaki faktörlerinin aracılık ettiği yönündeki paradigmatik görüş değişmiştir (Birney vd., 2007).

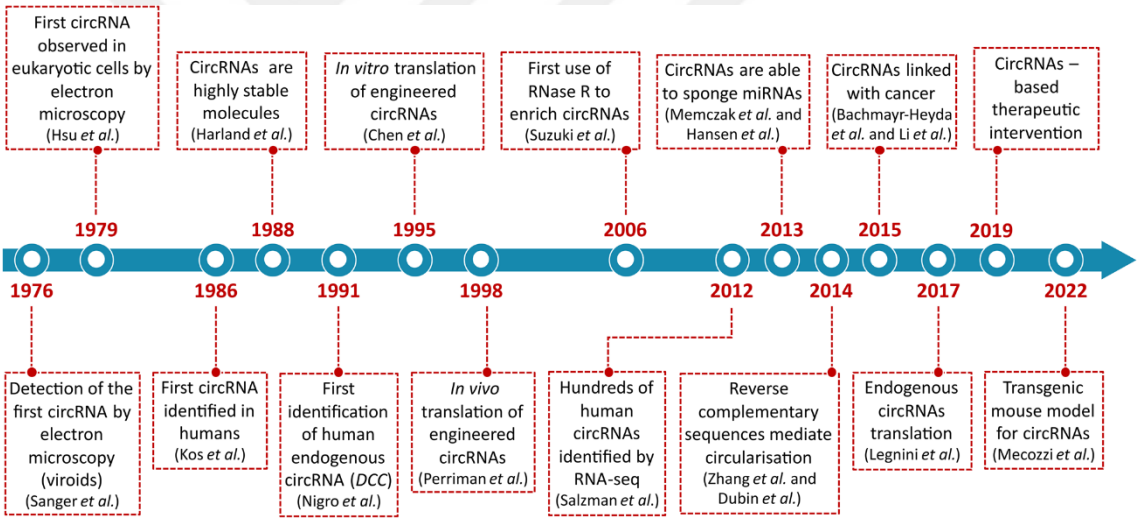
Kodlamayan RNA'lar (ncRNA) işlevsel moleküller olarak tanımlanmaktatır fakat protein kodlama yetenekleri yoktur. Dizi uzunluğu dikkate alınırsa ncRNA iki gruba ayrılır: kısa ncRNA ve uzun ncRNA (lncRNA) (J. Chen & Xue, 2016). Başlıca küçük ncRNA(sncRNA) sınıfları arasında mikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA), küçük nükleer RNA'lar (snRNA), piwi-etkileşen RNA (piwi-interacting RNA (piRNA)) ve tRNA türevi RNA Parçası (tRNA-derived RNA Fragment (tRF'ler)) bulunur (K. Zhang vd., 2023).



Şekil 2.6. ncRNA'ların genomdaki bolluğu ve kapsadığı yer (Saw et al., 2021)

2.7.1 circRNA'ların Biyosentezi ve Fonksiyonları

Dairesel RNA'lar (circRNA'lar) ilk olarak 1976'da Sanger ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. circRNA'lar ile ilgili ilk yapılan bu çalışmada, Sanger ve arkadaşları "tek sarmallı ve kovalent olarak kapalı dairesel RNA molekülleri" içeren viroidleri tanımladığını öne sürmüştür (Sanger vd., 1976). 1979 yılında ise Hsu ve arkadaşları tarafından yapılan ikinci bir çalışmada serbest uç içermeyen RNA'lar tanımlanmıştır (Hsu & Coca-Prados, 1979). Bu ilk temel çalışmadan sonra, 1991 yılında Nigro ve arkadaşları tesadüfi bir şekilde kanonik olmayan splicing ile üretilen transkripleri keşfetmiştir (Nigro vd., 1991). Cocquerelle ve arkadaşları, bir yıl sonra insan EST-1 geninde benzer bulgulara ulaştıklarını ve bu izoformların oluşumunun büyük yan intronların varlığıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Cocquerelle vd., 1992).

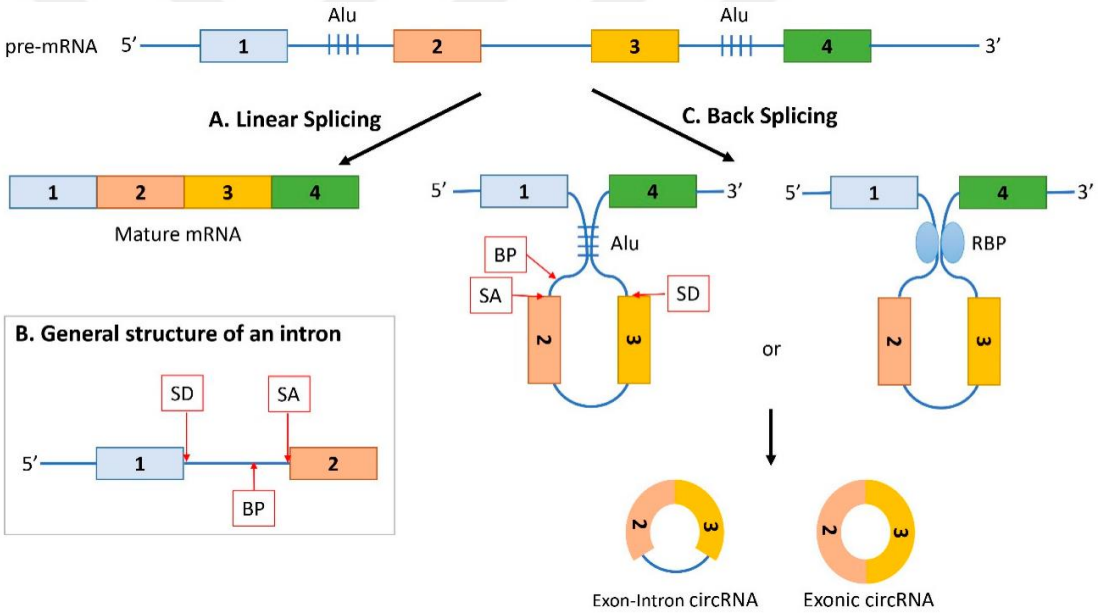


Şekil 2.7. circRNA'ların keşfi ile ilgili tarihsel bir bakış(Pisignano et al., 2023)**.**

1990'ların sonları ve 2000'lerin başlarında, yapılan çalışmalarda circRNA'ları üreten genlerin sineklerden insanlar dahil memelilere kadar tüm ökaryotik hücrelerde yaygın olduğunu göstermiştir (Burd vd., 2010; Houseley vd., 2006; Surono vd., 1999; Zaphiropoulos, 1996). Keşiflerinden itibaren, dairesel RNA'ların (circRNA'lar) çok sayıda organizmada var olduğu ve ekspresyonlarının gelişim evreleri, fizyolojik durumlar ve kanser dahil birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.7.1.1 Back-splicing ve CircRNA'ların Biyosentezi

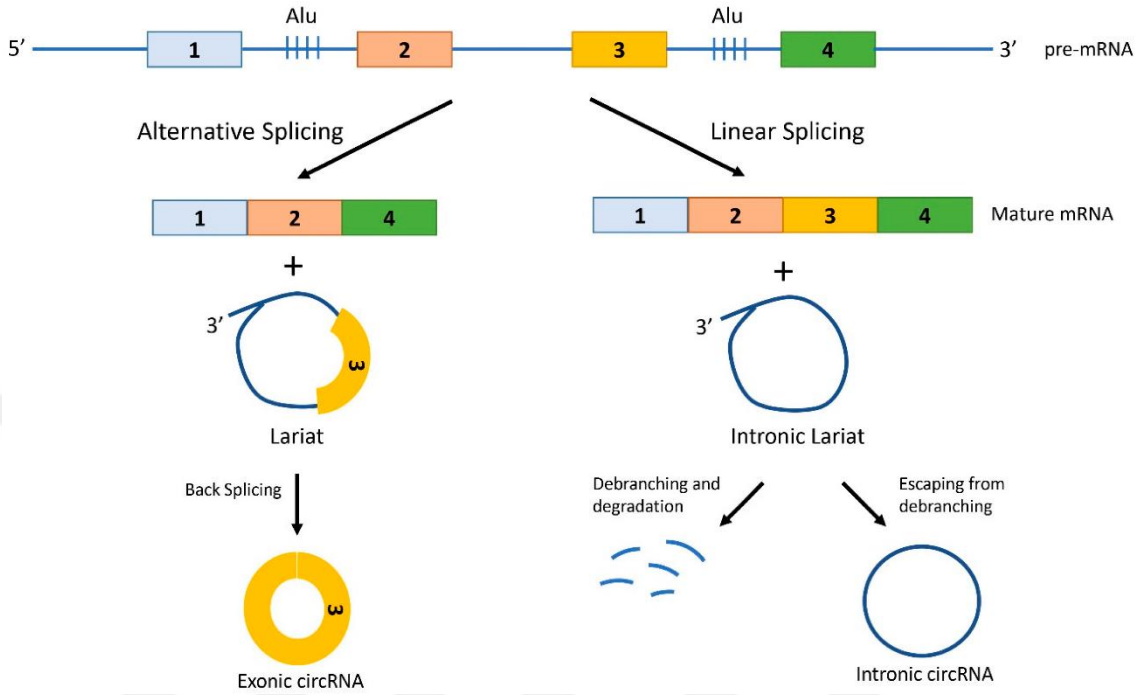
CircRNA oluşturan back-splicing, normal lineer pre-mRNA splicing işlemine benzer şekilde, aynı splicing mekanizmasını, güçlendirici (enhancer) ve zayıflatıcı (silencers) unsurların çoğunu kullanır (Starke vd., 2015; Y. Wang & Wang, 2015a). Fakat back-splicing mekanizması normal splicing mekanizmasına benzemekle birlikte, back-splicing olayının meydana gelip gelmeyeceği ve ne sıklıkta gerçekleşeceği spesifik cis-elemanları ve trans-aktif faktörler tarafından kontrol edilmektedir (Ashwal-Fluss vd., 2014). Farklı türdeki tamamlayıcı diziler, SINE'ler (short interspersed nuclear elements), özellikle insanlarda Alu elementleri, circRNA oluşumunda en büyük rolü oynar (X. O. Zhang vd., 2014).



Şekil 2.8. Back-splicing yoluyla circRNA'lar biyosentezi (Brozzi & Regazzi, 2021).

Şekil 2.9'de görüldüğü gibi circRNA'ların oluşumunda sadece Alu elementler değil aynı zamanda RNA bağlayıcı proteinler (RNA-binding proteins (RBPs)) de görev alabilmektedir. Bu RBP'ler dimer oluşturarak ve ekzonları çevreleyen intronlardaki spesifik motiflere bağlanarak circRNA'ların oluşumunu teşvik etmektedir (Conn vd., 2015).

Back-splincing mekanizmasının yanı sıra circRNA'lar lariat dizilerin işlenmesi sonucunda oluşabilir.



Şekil 2.9. Lariat ile circRNA'ların oluşumu (Brozzi & Regazzi, 2021).

2.7.1.2 circRNA'ların Biyolojik Fonksiyonları

circRNA'lar çeşitli yollar ile işlev göstermektedir. Genel olarak circRNA'ların sekans bilgisi, kararlılığı, transkripsiyon sonrası modifikasyonları, ikincil yapıları ve hücresel lokalizasyonları işlevlerini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır (Kristensen et al., 2022). circRNA'lar, farklı düzenleme modları aracılığıyla gen ekspresyonu düzenleyicileri olarak işlev görebilir. Bu circRNA'lar: miRNA sponge (süngeri), protein translasiyonu, RNA bağlayıcı proteinler ile etkileşimi ve protein iskeleti gibi işlev yaparak fonksiyon göstermektedirler (Han et al., 2018).

- ✓ miRNA süngeri olarak circRNA'lar:

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesinin önemli post-transkripsiyonel düzenleyicileridir ve hedef mRNA'ların 3' UTR veya 5' UTR gibi kodlanmayan hedef bölgelerle doğrudan baz çifti oluşturarak işlev görürler. Son zamanlarda, miRNA aktivitesinin, miRNA sünger transkriptleri olarak bilinen bir grup RNA molekülünün

varlığıyla etkilendiği gösterilmiştir. Bu sünger transkriptleri, miRNA'lara bağlanarak onları hedef mRNA'lardan uzaklaştırabilir ve bu da miRNA'ların gen ekspresyonu üzerindeki etkisini azaltmaktadır. Bu vesileyle circRNA'lar ceRNA (competing endogenous RNA) olarak rol oynamaktadır (Cesana et al., 2011; Franco-Zorrilla et al., 2007; Karreth et al., 2011). Bu sünger (sponge) transkriplerinin en önemli sınıfı circRNA'lardır. İlk miRNA süngeri olarak tanımlanan circRNA'lar ciRS-7 ve circSRY; bunlar sırasıyla miR-7 ve miR-138 transkriplerin aktivitesini düzenlemektedir (Hansen et al., 2013). Daha sonra çeşitli fizyolojik koşullarda circRNA-miRNA-mRNA ekseni üzerinden yapılan çalışmalar gittikçe ön plana çıkmıştır (J. Chen et al., 2019; Morovat et al., 2023; Peng et al., 2020; X. Zhang et al., 2019).

- ✓ circRNA'ların RNA bağlayıcı protein olarak işlevi:

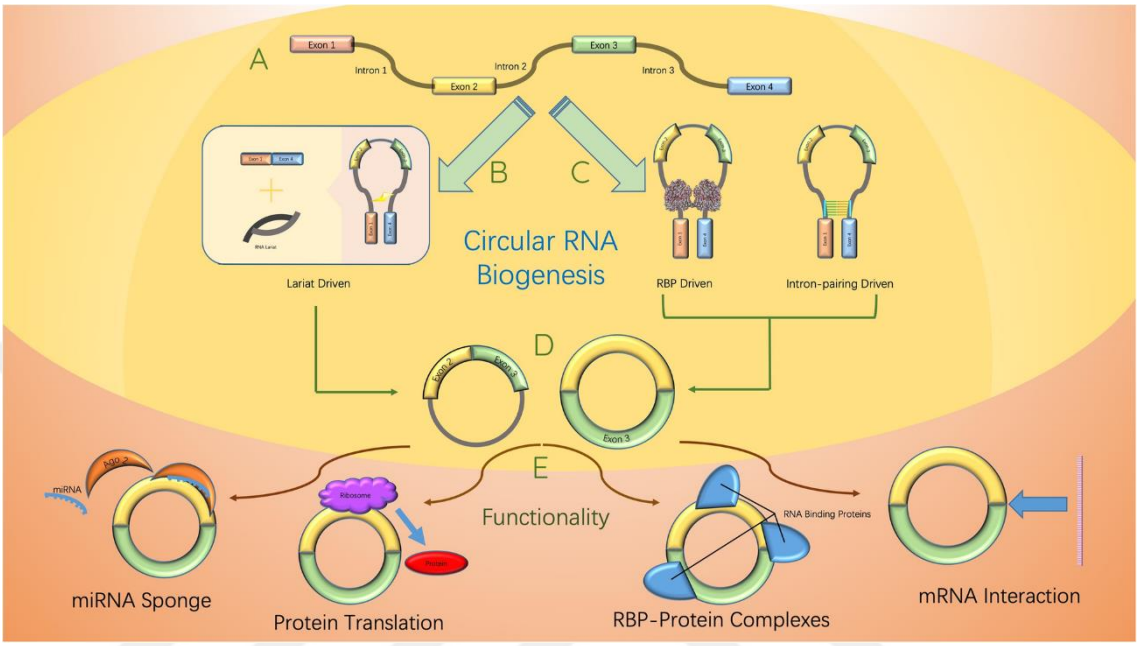
CircRNA'lar, sadece sünger görevi görmenin ötesinde, proteinlerin hücresel konumlarını düzenlemede de rol oynayan özel bir RNA türüdür. Bu işlevi, RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler) ile doğrudan etkileşime girerek gerçekleştirirler.

CircRNA'ların RBP'lere bağlanması, proteinlerin hücre içindeki normal konumlarından farklı bölgelere taşınmasına (translokasyon) yol açabilir. Bu translokasyon, proteinlerin hedef moleküllerle etkileşimlerini ve dolayısıyla hücresel işlevlerini önemli ölçüde etkileyebilir (Q. Yang et al., 2017; Z. G. Yang et al., 2017). Aynı zamanda circRNA'lar iskelet işlevi görevi görerek protein kompleksinin oluşmasına zemin hazırlayabilmektedir (Du et al., 2016).

- ✓ circRNA'ların protein veya peptit sentezlemesi:

Son yıllarda kovalent olarak kapalı circRNA moleküllerinin, translasyon uğrayarak belirli peptitler veya proteinleri sentezleyebilme potansiyellerini olduğunu bildirilmiştir. Bu circRNA'ların, translasyonun başlaması için gerekli olan 5' şapka (cap) yapısından yoksun oldukları için, IRES (internal ribosomal entry sites) veya N6-Methyladenosine (m6A) RNA modifikasyonu gibi 5' şapkadan bağımsız (cap-independent) bir translasyon mekanizmasına sahip oldukları anlaşılmıştır (J. Wu et al., 2021; Y. Yang & Wang, 2019).

CircRNA’ların peptit veya proteine dönüşebileceği Yeşil floresan protein (GFP) içeren circRNA mini gen raporlayıcı sistemi kullanarak doğrulanmıştır (Meganck et al., 2021; Y. Wang & Wang, 2015b).



Şekil 2.10 circRNA’ların hücresel ana fonksiyonları (Lu, 2020)**.**

2.7.2 circRNA’lar ve Kanserdeki Rolleri

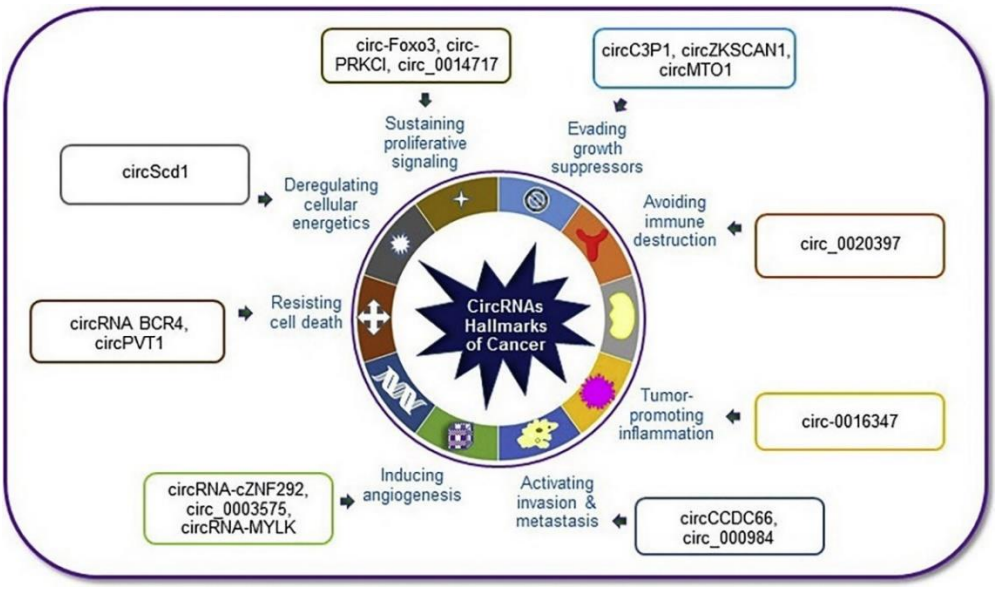
Çok yönlü moleküller olarak karşımıza çıkan circRNA'lar, gen ekspresyonunu hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel düzeyde düzenleme yetisine sahiptir. Farklı doku tiplerinde ve gelişim aşamalarında özgün ifade profilleri gösteren bu RNA’lar, normal fizyolojik süreçlerin yanı sıra, kanser gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde de rol oynamaktadır (Pisignano et al., 2023). circRNA’ların kanserin ayrıt edici temel özellikleri ile ilişkili olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Du et al., 2016, 2017; W. Yang et al., 2016).

CircRNA'lar, kanser gelişiminin ve devam eden proliferatif sinyallemenin önemli düzenleyicileri olarak hizmet edebilmektedir. Bunun en iyi deneysel örneklerinden biri, tümörlerde ekspresyonu azalan ve FOXO3, p53 ve PUMA'nın ekspresyonunu etkileyebilen circ-FOXO3'tür. Endojen circ-FOXO3'ün susturulması ters etkiye sahip

olsa da, ektopik circ-FOXO3, tümör gelişimini inhibe ederek farelerin ömrünü uzatmaktadır (Du et al., 2017).

circRNA'lar tümör baskılayıcı genleri hedef alan miRNA'ların aktivitesini regüle ederek kanser hücrelerinin büyümesini kontrol etmede yardım etmektedirler. Yapılan bir çalışmada, circC3P1'in aşırı ekspresyonu, hepatoselüler karsinomun (HK) çoğalmasını, göçünü ve istilasını önemli ölçüde inhibe ettiğini ve circC3P1 HCC hücrelerinde miR-4641'i süngerleyerek PCK1 ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (L. Zhong et al., 2018).

Kanser hücrelerinin en temel özelliklerinden biri bağışıklık sisteminden kaçmak olduğu bilinmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). circRNA'ların circRNA-miRNA-mRNA ekseni üzerinden antitümör bağışıklığını etkilediği düşünülmektedir (Xu et al., 2018). Bunula birlikte yapılan çalışmalarda circRNA'ların kanserin diğer temel özellikleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dong et al., 2017; Hsiao et al., 2017; H. Jin et al., 2017; B. Li et al., 2017; C. Y. Li et al., 2017).



Şekil 2.11. circRNA'ların ve kanser özelliklerin doğrudan ilişkisi (Bach et al., 2019).

Bilimsel çalışmalar ışığında, tümör büyümesi, apoptoz ve invazyon gibi anormal biyolojik süreçlerde çeşitli sinyal yollarının etkin rol oynadığı bilinmektedir. Artan sayıda

araştırma, dairesel RNA'ların (circRNA'lar) kanserle ilişkili sinyal yolları ile yakın etkileşim içinde olduğunu ve bu etkileşim aracılığıyla akciğer kanserinin oluşumunu, büyümesini, metastazını ve invazyonunu doğrudan etkileyebilecek hedef genleri veya mikroRNA'ları (miRNA'lar) düzenleyebileceğini göstermiştir.

Jiang ve ekibinin yürüttüğü çalışma, circRNA'lar küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. CircRNA mikro dizileri (microarray) kullanılarak yapılan bu araştırma, KHDAK dokularında sağlıklı dokulara kıyasla çok sayıda farklı şekilde ifade edilen circRNA'ların varlığını göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre toplam 957 ifade değişikliği sergileyen circRNA'lar belirlenmiştir (M. M. Jiang et al., 2018). Jiang ve ekibi erken evre akciğer adenokarsinomu hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmanın sonucunda, circ_104640 proliferasyonu teşvik ettiğini ve apoptozu baskıladığını göstermişlerdir (W. Jiang et al., 2021). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hsa_circ_0050386, FN1 (Fibronectin 1) proteininin ekspresyonunu azaltarak KHDAK hücrelerinin kötü huylu biyolojik davranışlarını bastırdığını göstermişlerdir (J. Chen et al., 2024).

Tez konumuz olan circGPRC5A (has_circ_0025506) ile iligili yapılan bir çalışmada *In vitro* ve *in vivo* deneyler, circGPRC5A geninin kolorektal kanserinde (CRC) onkogenik bir rol oynadığını desteklemektedir. circGPRC5A'nın yüksek ekspresyonu, tümörün klinik patolojik özellikleri ile pozitif korelasyon göstermektedir. Mekanistik olarak, circGPRC5A, UBA1-PPP1CA etkileşimini inhibe ederek PPP1CA (Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Alpha) proteinini stabilize etmekte ve YAP (Yes1 Associated Transcriptional Regulator) proteininin fosforilasyon seviyesini düşürerek hücre proliferasyonu, migrasyon ve invazyonu desteklemektedir (Z. Chen et al., 2023).

circGPRC5A, mesane tümörlerinde ve kanser kök hücrelerinde aşırı miktarda ifade edilmektedir. Bu ekspresiyon seviyesi azaltıldığında, mesane kanserinin kök hücrelerinin kendini yenileme ve metastaz yapma kapasitesini engellemektedir. Ancak, circGPRC5A'nın ekspresiyonu artırıldığında ise tam tersi bir durum ortaya çıkmaktadır (Gu et al., 2018).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler EKLER kısımında verilmektedir.

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm sarf malzemeler EKLER bölümünde verilmektedir.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve hangi amaçla kullanıldıkları EKLER bölümünde verilmektedir.

3.2 Yöntem



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

3.2.1. Hücre kültürü çalışması

Bu tez çalışmasında kullanılan A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatları BURSA Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde görev yapan Prof.Dr. Ferda ARI'nın laboratuvarından temin edildi. Hücreler Kriyoprotektan içerisinde -80 °C dolaplarda saklanmıştır. Kanserli hücre modeli olarak A549 (İnsan Adenokarsinomik Alveolar Bazal Epitel Hücreleri), H1299 (p53' süz küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) hücre hatları kullanılırken, sağlıklı dokuyu temsil etmek için Beas-2B (İnsan Bronşiyal Normal Epitel Hücreleri) hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Hücre kültürü çalışması için besiyerinin hazırlanması

A549 ve H1299 hücre hatları için RPMI (1640, Gibco) besiyeri %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu ve %1 L-Glutamin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kontrol hücre hattı olan Beas-2B için ise %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, %1 Nonessential Amino Asit ve %1 L-Glutamin içeren RPMI besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.3. Hücre hatlarının kültüre alınması

Dondurulmuş hücre hatları -80°C'den çıkarılarak su banyosunda 37 °C'de hızlı bir şekilde çözülmüştür. Çözünen hücrelere 5 mL olacak şekilde yaklaşık 1 ml RPMI besiyeri ekleyip süspense hale getirildikten sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatan atılmıştır. Kalan hücre pelleti üzerine 5 ml taze besiyeri eklenip pipetle süspanse hale getirilmiş ve her hücre hattı 25 cm²'lik flasklara ekilerek 37°C ve %5 CO2 ayarlarında bir inkübatörde inkübasyona alınmıştır. Daha hızlı çoğalma eğiliminde olan invaziv tümör hücreleri (A549 ve H1299) 4 gün inkübe edilirken, normal doku hücreleri olan Beas-2B hücre hattı bir hafta boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur.

3.2.4 Hücrelerin pasajlanması

25 cm²'lik flakonların tüm yüzeyini kaplayan hücrelerin besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, fazlalık besin ortamı yaklaşık 2 mL PBS ile yıkama yoluyla arındırılmıştır. Ardından, hücreleri tamamen kaplayacak kadar tripsin eklenip 2 dakika inkübatörde

bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olmak için mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hemen sonra tripsini inaktive etmek için hücrelere eşit miktarda besin ortamı eklenmiş ve santrifüj için falkona aktarılmıştır. 1000 RPM'de 5dk boyunca santrifüjleme yapıldıktan sonra süpernatan uzaklaştırılmış ve hücre peleti 15 mL taze besin ortamı ile yeniden süspense hale getirilmiştir. Etiketlenmiş 75 cm²'lik flasklara ekilen hücreler, 37°C ve %5 CO2 ayarlarında bir inkübatörde tekrar inkübe edilmiştir.

3.2.5 Hücrelerden Total RNA izolasyonu

Tez kapsamında kullanılan hücre hatlarından total RNA izolasyonu için TRIzol™ Plus RNA Purification Kit kullanılmıştır. Bunun için hücre pelletine 600 uL Trizol ekleyerek resüspanse edilmişiyice karıştırmak için 10 sn vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından tüpe 200 µl kloroform eklendikten sonra 2-3 dakika oda ısında inkübe edilmiştir. Ardından 12.000 x RPM'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatandan? 400 uL alınıp temiz bir tüpe aktarılmış, üzerine eşit hacimde %70 etanol eklenmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Numuneden 700 uL alınıp saflaştırma kolonuna aktardıktan sonra 12000 × g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Tüpün dibine biriken sıvı atılmış ve saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirilmiş, tüm sulu faz kolona aktarılana ve santrifüjlenene kadar bu adım tekrarlanmıştır. Saflaştırma kolonu yeni bir 1,5 mL toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 700 µL ıkama Tamponu 1 eklenmiş ve 12000 × g'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmışı ve saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir. Daha sonra 500 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve 12000 × g'de 15 sn santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve saflaştırma kolonu toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir. Bir sonraki adımda saflaştırma kolonuna 250 µL Yıkama Tamponu 2 eklenmiş ve 12000 × g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Kolon steril ve yeni 1,5 mL RNase free tüpüne aktarılmış,ortasına 50 uL ddH2O eklenmiş ve RNA'yı elüe etmek için 12000 × g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırma kolonu atılmıştır. Saflaştırılmış RNA sonraki uygulamalar için kullanılmış veya RNA kullanılana kadar -20°C veya -80°C'de saklanmıştır.

3.2.6 RNA örneklerinin konsantrasyonunun ölçülmesi

RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı ölçümünden önce, nanodrop cihazının bilgisayarındaki program açılarak RNA elüsyon işleminde kullanılan ddH_2O kör olarak okutulmuş ve ardından RNA örneklerine ait bilgisayar programına girilmiştir. Son olarak her RNA örneğinden 1 µl kullanılarak ölçüm yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3.2.7 RNA örneklerinden cDNA sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi ticari olarak satın alınan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti, Thermo Fisher (4368814) kullanılarak yapılmıştır. Deneye başlamadan önce RNA örnekleri -80'den çıkarılıp buzun üzerine konulmuştur. cDNA sentez kitinin bileşenleri oda sıcaklığında çözdürüp buzun üzerine konulmuştur. cDNA sentezi yapılacağı nükleaz içermeyen 0,2'lik PCR tüplerine etiket yazdıktan sonra cDNA sentez kitinin talimatları dikkate alınarak ve Nanodrop'ta ölçülen RNA konsantrasyonlara bağlı olarak Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi reaksiyon kurulmuştur.

Çizelge 3. 1. cDNA sentez bileşenleri

Örnek	Total RNA miktarı 1 ug	10X RT Buffer	25X dNTP Mix	10X RT Random Primers	MultiScribe™ ters Transkriptaz	Saf ddH2O	Total hacim
A549	2,94 µL	2.0 µL	0.8 µL	2.0 µL	1.0 µL	11,26 µL	20.0 µL
H1299	1,83 µL	2.0 µL	0.8 µL	2.0 µL	1.0 µL	12,37 µL	20.0 µL
Beas-2B	1,67 µL	2.0 µL	0.8 µL	2.0 µL	1.0 µL	12,53 µL	20.0 µL

Reaksiyon kurulduktan sonra, kısa süre santrifüj yapılarak PCR tüpleri sentez kitinin talimatlarına göre Thermo cycler cihazına yerleştirilmiştir. Cihaz çizelge 3.2'de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3. 2. cDNA sentez koşulları

Ayarlama	Döngü 1	Döngü 2	Döngü 3	Döngü 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri bir sonraki işlemler yapılana kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.8 Gen ifadesinin Gerçek-Zamanlı PCR (RT-qPCR) ile ölçülmesi

Daha önce elde edilen cDNA kullanılarak gen ifade miktarını belirlemek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemi uygulanmıştır. Bunun için BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kiti ve Bio-Rad CFX Connect cihazı kullanılmıştır.
Deneyin ilk aşamasında, qPCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım, cDNA şablonu haricindeki tüm bileşenleri (primerler, master mix ve ddH2O) içermektedir.
Her bir gen için farklı bir primer çifti kullanıldığına dikkat edilerek, hücre hattı sayısına uygun miktarda reaksiyon karışımı (mix) hazırlanmıştır (bkz. Çizelge 3.4). Her bir cDNA örneği için üçer teknik tekrar (triplet) olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımından her bir kuyucuğa 19 mikrolitre (µl) olacak şekilde dağıtılmıştır. Son olarak, her kuyucuğa 1 µl cDNA örneği eklenmiştir. Plate, kısa süre santrifüj edilerek (spin down) tüm sıvılar kuyucuğun dibine toplandıktan sonra qPCR cihazına yerleştirilmiş ve Çizelge 3. 3'de gösterildiği gibi cihaz ayarlaması yapılmıştır. RT-qPCR deneyi sonucunda elde edilen verilerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemini kullanılmıştır (Pfaffl, 2001). Referans gen olarak *GAPDH* ve circHIPK3 referans genleri (housekeeping genes) kullanılarak sonuçların normalizasyonu yapılmıştır.

ΔΔCt yönteminde kullanılan formüller aşağıda açıklanmaktadır:
ΔΔCt = ΔCt (deney grubu) - ΔCt (kontrol)
ΔCt = Ct (Hedef gen) – Ct (housekeeping gene)

Çizelge 3.3. qPCR reaksiyonu mix bileşenleri

Bileşenler	Hacim 20 uL (1Rxn)	Hacim 10 Rxn
BlasTaq™ 2X qPCR MM	10 µL	100 µl
İleri Primer (10 µM)	0.5 µl	5 µl
Geri Primer (10 µM)	0.5 µl	5 µl
Kalıp DNA	1 µl	-
Nükleaz içermeyen H2 O	8 µl	80 µl
Total hacim	20 µl	190 µl

*Tablodaki hesaplama her primer çifti için yapıldı.

Çizelge 3. 4. qPCR'in çalışma koşulları

Step	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Enzim Aktivasyon	95oC	3 dk	1
Denatürasyon	95oC	15Sn	40
Annealing/Uzuma	60oC	1 dk	
Melting Curve			

Çizelge 3. 5. qPCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin sekansları

Primer	Sekansı (5'→3')
circGPRC5A	F. TCCTGTTGAGGATGCTTTCT
	R: ACTTGGATTTCAGGCCATTG
GPRC5A	F: CTCACTCTCCCGATCCTCGT
	R: CAGTCCGATGATGAAGGCGAA
circHIPK3	F: GTGAACAAGTCCAAGAGGACC
	R: ACAGATGCTCTTCAAGGATGC
GAPDH	F: CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC
	R: GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT

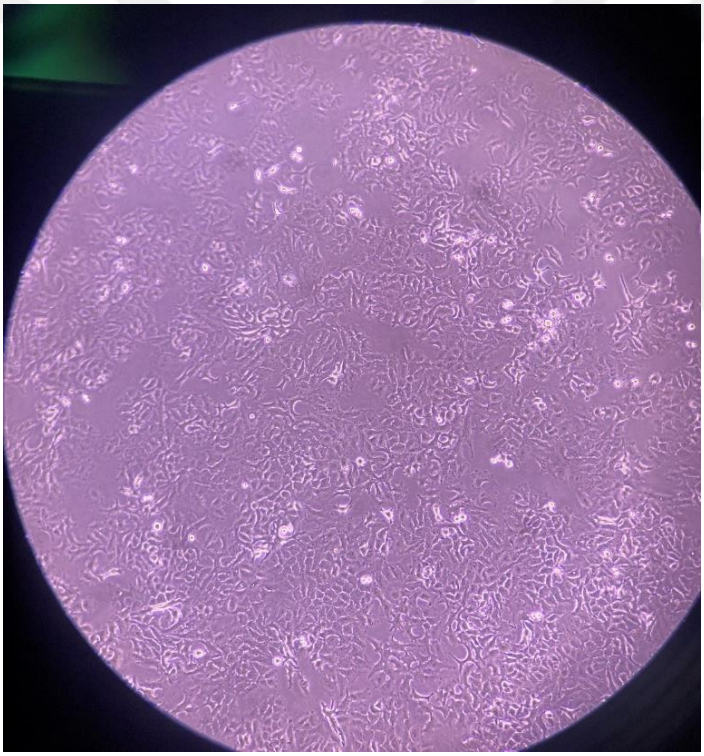
3.2.9. Aday miRNA arayışı için *in silico* tarama

Çalışmamızda, circGPRC5A'nın kanser ve normal hücre hatlarındaki ifadesini incelemek amacıyla, circGPRC5A ile miRNA'lar arasındaki potansiyel etkileşimleri belirlemek için bir *in silico* tahmin çalışması yapılmıştır. miRDB (https://mirdb.org/), miRBase (https://www.mirbase.org/), TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) ve CircInteractome (https://circinteractome.nia.nih.gov/) veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilen bu analizde, circGPRC5A ve GPRC5A mRNA'sı ile potansiyel olarak etkileşimde bulunabilecek miRNA'lar için bir aday listesi oluşturulmuştur. Hem circGPRC5A hem GPRC5A için ortak miRNA'ları bulup sayısal olarak Venn diagramı ile gösterildi. Aynı zamanda ortak miRNA'ların listesi oluşturulmuştur.

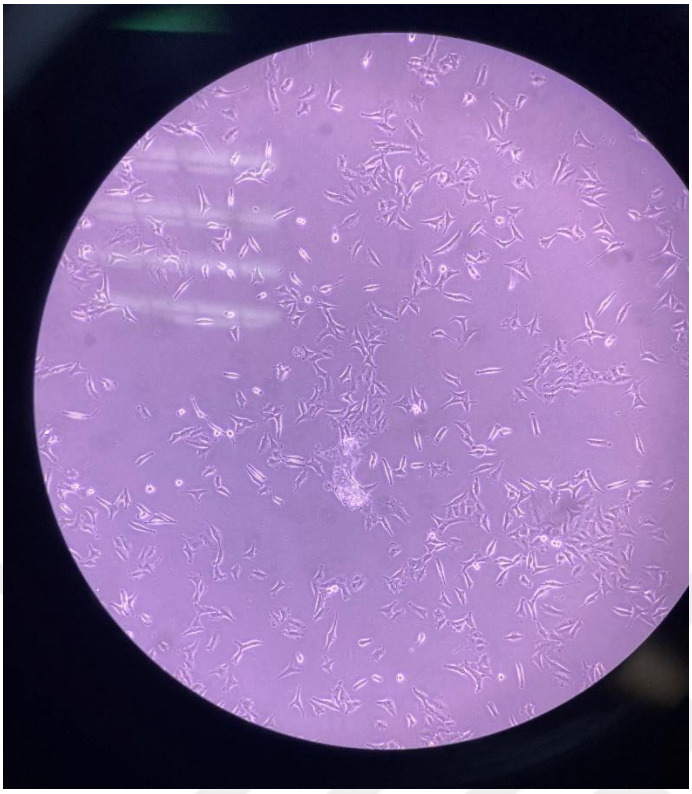
4. BULGULAR

4.1. A549 ve Beas-2B hücre hatlarının mikroskopik inceleme sonuçları

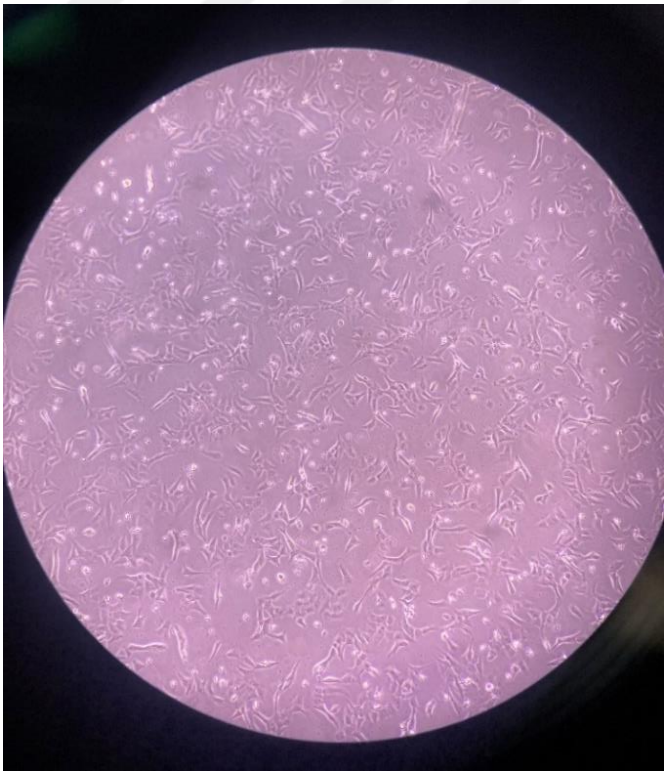
Bu çalışmada, akciğer kanseri (A549) ve sağlıklı akciğer (Beas-2B) hücreleri ters mikroskopla incelenerek görüntülenmiştir. Şekil 4.1, A549 hücre hattı akciğer kanseri hücrelerinin mikroskobik görüntüsünü göstermektedir. Şekil 4.2'de ise H1299 hücre hattının morfolojik özelliklerini gösterilmektedir. Beas-2B hücre hattının normal akciğer dokusuna ait morfolojik özellikleri, Şekil 4.3'deki mikroskobik görüntülerde sunulmaktadır.



Şekil 4. 1. Akciğer kanseri hücrelerinin (A549 hattı) mikroskopik görüntüsü



Şekil 4. 2. Akciğer kanseri hücrelerinin (H1299 hattı) mikroskopik görüntüsü



Şekil 4. 3. Normal akciğer epitel hücreleri (Beas-2B) mikroskop altındaki görüntüsü

4.2 RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri (Nanodrop sonuçları)

Akciğer kanseri ve normal akciğer dokusu hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri, ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 cihazı ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. RNA örnekleri, izolasyon işleminde kullanılan elüsyon tamponu ile kalibre edilen ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 cihazında, 1 µl hacimde spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 4. 1'de sunulmaktadır.

Çizelge 4. 1. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri

Hücre hattı	Konsantrasyon (ng/ µl)	A260/280	A260/230
A549	340.3	2,06	2,23
H1299	2185,3	2,09	2,23
Beas-2B	600,3	2,06	2,25

4.3 RT-qPCR sonuçları

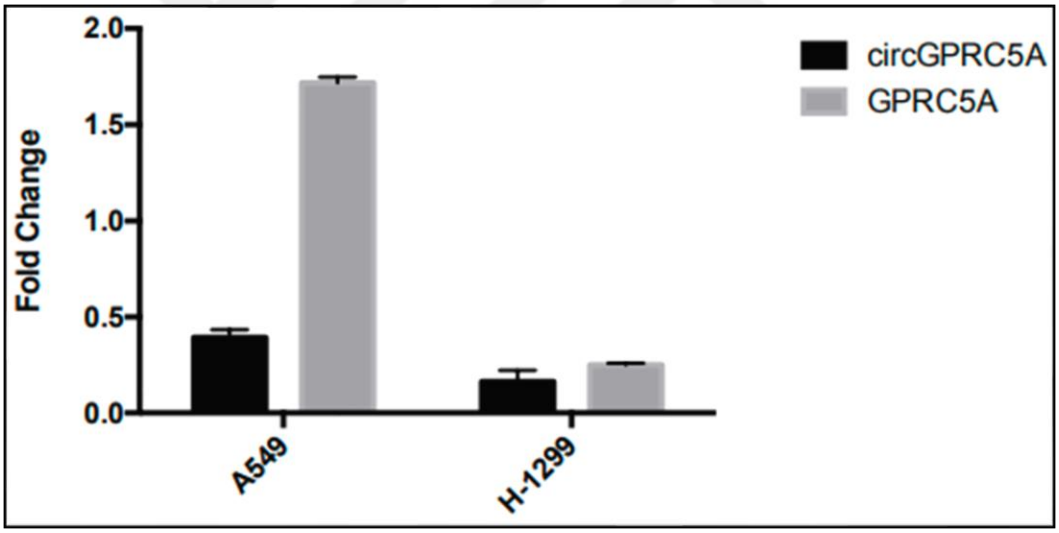
circGPRC5A'nın normal akciğer hücre hattı (Beas-2B) ve akciğer kanseri hücre hatlarındaki (A549;H-1299) ifade değişikliğini incelemek için RT-qPCR yöntemi ve BlasTaq 2X masterMix kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA kalıp olarak kullanılmış ve ilgili genlerinin (circGPRC5A, GPRC5A, circHİPK3, GAPDH) primerleri kullanılarak RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda elde edilen sonuçları normalize etmek için housekeeping gen olarak *GAPDH* ve circHİPK3 kullanılmıştır. Şekil 4.4.'te sunulan veriler *GAPDH* normalizasyonu ile elde edilmiştir. Şekil 4.5'teki veriler ise circGPRC5A circHIPK3 ile normalize edilmiş, lineer GPRC5A ise *GAPDH*'e göre normalize edilmiştir. qPCR reaksyion sonucunda elde edilen Ct değerleri ile ΔΔCt yöntemi kullanılarak gen ifade değişikliği belirlenmiş ve sonuçlar grafiğe dönüştürülmüştür.

Normalizasyonu *GAPDH*'e göre yapılan Şekil 4.4'ü göz önünde bulundurduğumuz zaman circGPRC5A'nın akciğer kanser hücre hatları olan A549 ve H1299 ile akciğer normal dokusunun hücre hattı olan Beas-2B arasında bir ekspresyon farkı olduğu gözlemlenmiştir. A549 hücre hattında circGPRC5A'nın relatif ekspresyon değeri 0.39 iken, H1299 hücre hattındaki relatif ekspresyon değeri ise 0,20'dır. circRNA'ların normalizasyonu circHIPK3'e göre yapıldığı durumda, A549 hücre hattında circGPRC5A'nın ekspresyonunda herhangi bir değişiklik yokken H1299 hücre hattında circGPRC5A'nın ralatif ekspresyon değeri 0,32 olarak hesaplanmıştır. Lineer GPRC5A'nın relatif ekspresyon değeri A549 hücre hattında 1,7 iken, H1299 hücre hattında ise relatif ekspresyon değeri 0,25 olarak hesaplanmıştır.

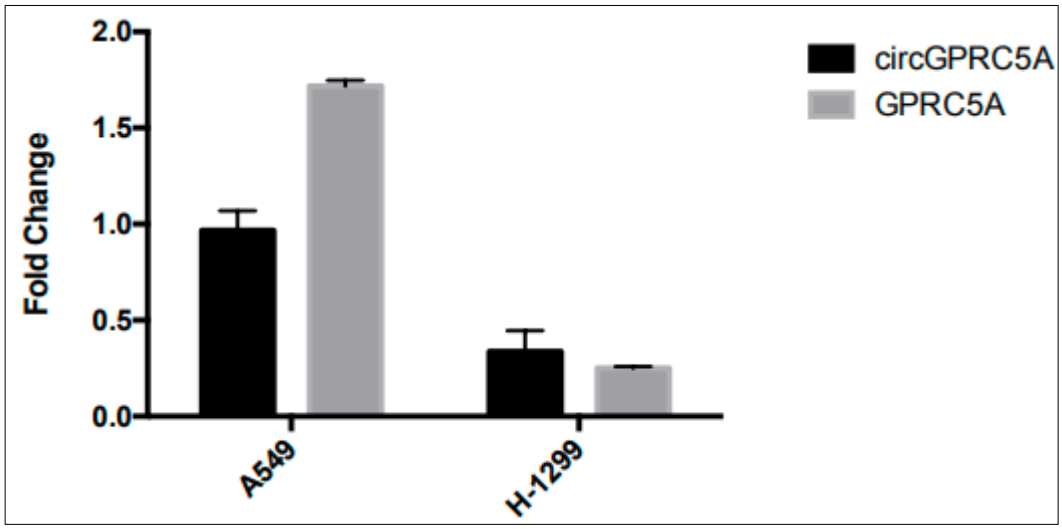
Çizelge 4.2. qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen Ct değerleri

Hücre hattı	Genler	Tüp	Ct değeri	Ortalama Ct değeri
A549	circGPRC5A	1	31,5919	31,4558
		2	31,2836	
		3	31,4917	
	GPRC5A	1	20,8154	20,81
		2	20,8325	
		3	20,7821	
	circHİPK3	1	24,4323	24,3787
		2	24,3957	
		3	24,3082	
	GAPDH	1	15,471	15,2299
		2	15,1906	
		3	15,0282	
H1299	circGPRC5A	1	33,2271	32,8591
		2	32,3519	
		3	32,9984	
	GPRC5A	1	23,6237	23,6836
		2	23,7246	
		3	23,7025	
	circHİPK3	1	24,2067	24,2175
		2	24,1651	
		3	24,2806	
	GAPDH	1	15,3671	15,3326

		2	15,2905	
		3	15,3403	
Beas-2B	circGPRC5A	1	31,8707	31,3062
		2	31,0233	
		3	31,0247	
	GPRC5A	1	22,9143	22,79
		2	22,7934	
		3	22,6623	
	circHİPK3	1	24,3554	24,285
		2	24,2281	
		3	24,2715	
	GAPDH	1	16,3503	16,4258
		2	16,5193	
		3	16,4077	



Şekil 4. 4. Akciğer kanseri hücre hatlarında circGPRC5A'nın relatif ekspresiyonu. Bütün genler *GAPDH* ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir.



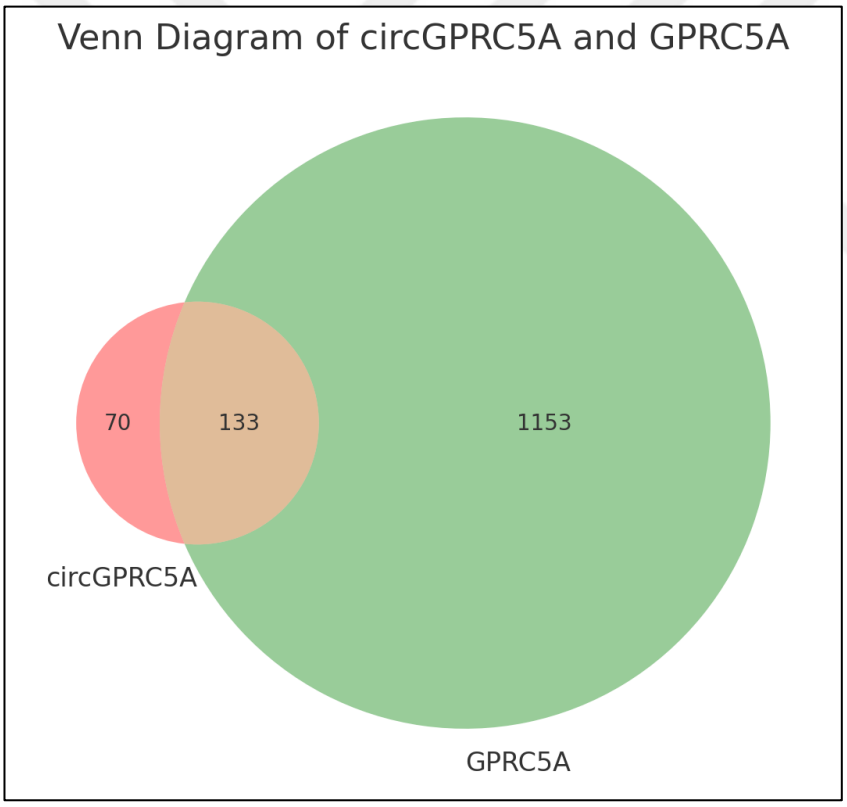
Şekil 4.5. Akciğer hücre hatlarında circGPRC5A ve GPRC5A'nın relatif ekspresyonu. GPRC5A'nın ekspresyonu *GAPDH* ile, circGPRC5A'nın ekspresyonu ise circHIPK3 kullanılarak normalize edilmiştir.

Çizelge 4.2'deki Ct değerlerine ve şekil 4.4'teki grafiği dikkate alındığı zaman normalizasyon işlemi GAPDH'e göre yapıldığı durumda akciğer kanseri hücre hatlarında (A549 ve H1299), sağlıklı hücre hattına göre circGPRC5A'nın ifadesi farklılık göstermektedir. Yani sağlıklı hücre hattına (Beas-2B) göre circGPRC5A'nın ifadesi hem A549 hücre hattında hem de H1299 hücre hattında düşüş göstermektedir. Buna karşılık referans gen olarak kullandığımız GAPDH'ın ifadesi normal seviyelerdedir. Lineer GPRC5A'nın ifadesi A549 hücre hattında artış gösterirken H1299 hücre hattında belirgin bir şekilde düşüş göstermektedir.

Dairesel RNA'lar için normalizasyon circHIPK3'e göre yapıldığı durumda (bkz. Şekil 4.5), A549 hücre hattında circGPRC5A'nın ifadesinde herhangi bir belirgin değişiklik görülmemektedir. Buna karşılık H1299 hücre hattında circGPRC5A'nın ifadesi belirgin bir şekilde düşüş göstermektedir. Referans olarak kullandığımız circHIPK3'ün ifadesi normal seviyelerdedir.

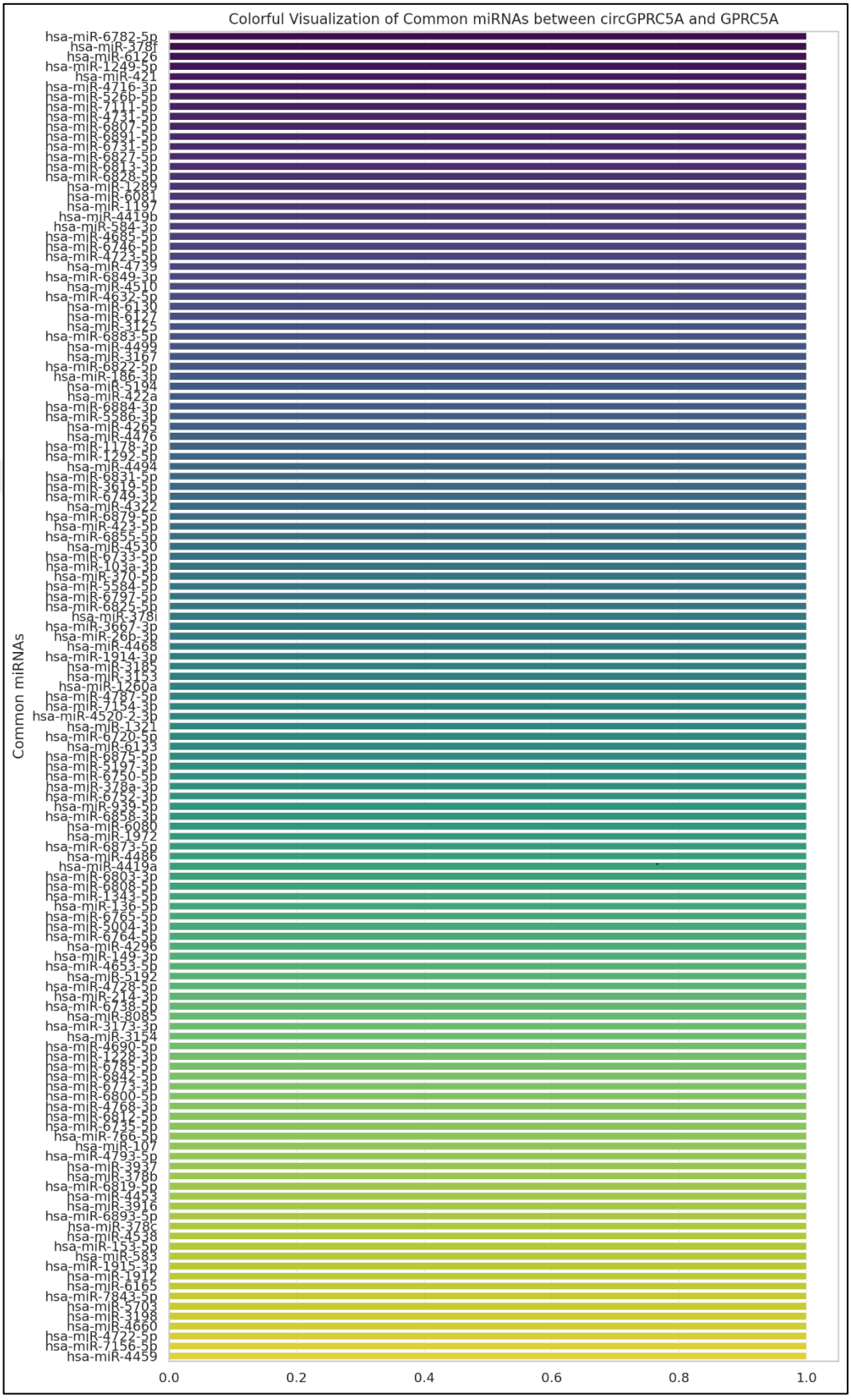
4.4 Aday miRNA arayışı için *in silico* tarama

Yapılan kapsamlı biyoinformatik analizler sonucunda, circGPRC5A ve GPRC5A mRNA dizileri ile yüksek oranda benzerlik gösteren toplam 133 adet mikroRNA (miRNA) adayı tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.6.). Bu miRNA'ların, cicGPRC5A'nın miRNA bağlayıcı bölgesi ve GPRC5A'nın 3' UTR ve 5' UTR bölgelerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleme potansiyeli oldukça yüksektir. Elde edilen bulgular, circGPRC5A ve GPRC5A genlerinin miRNA aracılı düzenleme ağlarına dahil olduğunu ve bu sayede çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.6 circGPRC5A ve GPRC5A'nın ortak miRNA'ların sayısı

Hem circGPRC5A hem de GPRC5A ile eşleşme gösteren, potansiyel olarak ortak düzenleyici görevi olabilecek 133 adet miRNA'nın listesi Şekil 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. circGPRC5A ve GPRC5A'nın ortak miRNA'ların listesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, çok hücreli organizmalarda normalde sıkı düzenlemeye tabi tutulan gen ifadesinin kontrolden çıkması sonucu oluşan bir hastalıktır. Bu durum, vücudun dengesini sağlayan karmaşık ağların işlevsiz hale gelmesine ve hücrelerin kendi başına çoğalarak tümör oluşturmasına yol açmaktadır (Baylin & Jones, 2016).

Kanserin temel özellikleri, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalmasına yol açan biyolojik süreçlerdir. Bu özellikler, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farklı davranmasını sağlar. On farklı temel özellik tanımlanmıştır: sürekli büyüme sinyalleri üretme, büyüme baskılayıcılarından kaçma, hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez, doku invazyonu ve metastaz, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık sisteminden kaçış, genom dengesizliği ve mutasyonlar ve tümör mikroçevresinin oluşturulması. Bu özellikler, kanserin gelişimini ve tedaviye direnç mekanizmalarını anlamada kilit rol oynamaktadır (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Bu nedenle, kanser tedavilerinin geliştirilmesinde bu özelliklerin her biri hedeflenmektedir. Üzerine çalıştığımız ve tezimize konu olan akciğer kanseri en fazla ölüme neden olan kanser türüdür (Thandra et al., 2021).

GPRC5A, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) gelişiminde tümör baskılayıcı olarak görev yapmakla birlikte KHDAK dokusu ile akciğer kanseri hücre hatlarında düşük bir ekspresyona sahiptir (E. Jin et al., 2017; Tao et al., 2007).

ΔΔCt yöntemi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) verilerini analiz ederek, bir hedef genin farklı deneysel koşullar veya örnekler arasındaki relatif ekspresyon seviyesini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, hedef genin Ct (eşik döngü) değeri, bir referans genin Ct değeri ile karşılaştırılarak normalizasyon sağlanır. Elde edilen ΔΔCt değeri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle işlenerek hedef genin ekspresyonundaki kat değişikliği hesaplanır. 2^(-ΔΔCt) değeri 1'den büyükse, hedef genin ekspresyon seviyesi karşılaştırılan örnek veya koşulda artmış anlamına gelir. Bu durum, deneysel müdahalenin veya farklı biyolojik durumların gen ekspresyonunu yukarı regüle ettiğini gösterir. Eğer bu değer 1'e eşitse, hedef genin

ekspresyon seviyesi incelenen koşullar arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Ancak, 2^(-ΔΔCt) değeri 1'den küçükse, hedef genin ekspresyon seviyesi karşılaştırılan örnek veya koşulda azalmıştır. Bu durum ise gen ekspresyonunun aşağı regüle olduğunu ifade eder (Pfaffl, 2001; Rao vd., 2013).

Bu tez çalışmasında, circGPRC5A'nın akciğer kanser hücre hatları A549 ve H11299 ile normal akciğer dokusu hücre hattı Beas-2B'de ekspresyon seviyelerini karşılaştırdık. circRNA'ların sonuçları hem *GAPDH* hem de circHIPK3'e göre normalize edildi. Bunun sebebi ise circRNA'ların *GAPDH*'e ek olarak circHIPK3 ile de normalize edilebiliyor olmasıdır (S. Zhong et al., 2019). Bu genler, genellikle circRNA çalışmalarında referans olarak kullanılan "housekeeping" genlerdir. Bu genlerin ifade seviyeleri, deney koşullarındaki değişikliklerden çok az etkilenmektedir. Bu nedenle, incelenen genin (circGPRC5A) ifade seviyelerini bu referans genlere göre kıyaslamak, deneydeki göreceli ifade değişimleri daha iyi anlamayı sağlamaktadır.

Çizelge 4.2'de yer alan Ct değerleri ve Şekil 4.4'teki grafik incelendiğinde, GAPDH geni referans alınarak yapılan normalizasyon işlemi sonucunda, akciğer kanseri hücre hatları olan A549 ve H1299'da, sağlıklı hücre hattı (Beas-2B) ile karşılaştırıldığında circGPRC5A gen ifadesinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Sağlıklı hücre hattına kıyasla, circGPRC5A'nın ifadesi hem A549 hücre hattında hem de H1299 hücre hattında düşüş göstermiştir. Bu durum, circGPRC5A'nın akciğer kanseri hücrelerinde baskılandığını, yani düşük ifade edildiğini göstermektedir. Buna karşılık, referans gen olarak kullanılan GAPDH'ın ifadesi her iki kanser hücre hattında da normal seviyelerde kalmıştır. Lineer GPRC5A'nın ifadesine bakıldığında ise, A549 hücre hattında artış gözlemlenirken, H1299 hücre hattında belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Öte yandan, dairesel RNA'lar için yapılan normalizasyon circHIPK3 geni referans alınarak yapıldığında (bkz. Şekil 4.5), A549 hücre hattında circGPRC5A ifadesinde belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak, H1299 hücre hattında circGPRC5A'nın ifadesi belirgin bir şekilde azalmıştır. Bu bulgular, circGPRC5A'nın akciğer kanseri hücre hatlarında, özellikle H1299'da, baskılanmış olduğunu göstermektedir. Ayrıca, referans olarak kullanılan circHIPK3'ün ifadesi her iki hücre hattında da normal

seviyelerde kalmıştır. Bu da, yapılan normalizasyon işleminin güvenilir olduğunu ve elde edilen sonuçların doğru şekilde yorumlanabileceğini göstermektedir.

Lineer GPRC5A'nın ekspresyon profili Lin ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlarla uymludur (Lin et al., 2024b). Bu sonuçlara göre lineer GPRC5A A549 hücre hattında Beas-2B'e göre mRNA düzeyinde 1,7 kat artmaktadır. H1299 hücre hattında ise GPRC5A'nın mRNA'sı düşüş göstermektedir.

Bu bulgular, circGPRC5A'nın akciğer kanseri teşhis veya prognozunda potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanımı için sınırlı bir fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu çalışmanın bazı sınırlamaları olduğunu belirtmek önemlidir. Örneğin, sadece iki hücre hattı kullanılmıştır ve farklı kanser türleri veya evreleri içeren daha geniş bir örneklem üzerinde çalışılması gerekmektedir. Ek olarak, circGPRC5A'nın işlevsel rollerini ve akciğer kanserindeki rolünü daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, circGPRC5A'nın akciğer kanserinde biyobelirteç olarak kullanımı için potansiyeli sınırlı görünmektedir. Daha fazla araştırma, circGPRC5A'nın işlevlerini ve kanser biyolojisindeki rolünü aydınlatmaya yardımcı olabilecektir.

Dairesel RNA'ların işlevlerinden biri de miRNA'ları süngerleyerek (sponging) ifadesini düşürmektir (Su et al., 2019). Bu işlem sonucu miRNA'nın hedeflediği bir/birden fazla mRNA'nın da ifadesi artmış olacaktır. Bu sebeple tez çalışmamızda circGPRC5A'nın ifadesini kanser ve normal hücre hatlarında incelerken hem GPRC5A mRNA'sını hedefleyen hem de circGPRC5A tarafından süngerlenebilecek bir miRNA arayışı için *in silico* analizi yapıldı. Bu algoritmalar ile yaptığımız tarama sonucu hem circGPRC5A hem de GPRC5A mRNA'sı ile eşleşme gösteren toplam 133 hedef miRNA tespit edilmiştir. Literatürde de belirtildiği üzere GPRC5A mRNA ifadesi akciğer kanserinde azaldığı bilindiği için 133 aday miRNA'larımızın içinden akciğer kanserinde ifadesi artan bir miRNA seçmek için hedeflerimizi daralttığımızda bu kritere uygun miRNA'ların en önde geleni hsa-miR-939'un olduğunu fark edilmiştir. Literatür taraması yapıldığında hsa-miR-939'un çeşitli kanserlerde farklı ekspresyon profiline sahip olup düzensizliğinin

birçok insan kanseri türünün gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. miR-939 aynı zamanda meme kanserinin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Di Modica et al., 2017).

Yapılan bir çalışmada RT-qPCR analizi, miR-939'un up-regülasyonunun NSCLC hücre hatlarında ve klinik örneklerde meydana geldiğini ve böylece KHDAK'li hastalar için potansiyel bir prognostik belirteç olduğunu göstermiştir (A. Chen et al., 2018).

Bu yaptığımız *in silico* tarama sonuçlarını dikkate aldığımız zaman *GPRC5A* geninin regülasyonunun circGPRC5A-miR-939-GPRC5A ekseni üzerinden incelenmesi, ilerdeki bir çalışmanın konusu olabilecektir.

KAYNAKLAR

Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., Evantal, N., Memczak, S., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2014). CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. Molecular Cell, 56(1), 55-66. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019

Azees, P. A. A., Natarajan, S., Amaechi, B. T., Thajuddin, N., Raghavendra, V. B., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A., & Phuong, T. N. (2022). An empirical review on the risk factors, therapeutic strategies and materials at nanoscale for the treatment of oral malignancies. Içinde Process Biochemistry (C. 118, ss. 283-293). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.013

Bach, D. H., Lee, S. K., & Sood, A. K. (2019). Circular RNAs in Cancer. Içinde Molecular Therapy Nucleic Acids (C. 16, ss. 118-129). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.005

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8(9). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., … De Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. Nature, 447(7146), 799-816. https://doi.org/10.1038/nature05874

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 74(3), 229-263. https://doi.org/10.3322/caac.21834

Brozzi, F., & Regazzi, R. (2021). Circular RNAs as novel regulators of β-cell functions under physiological and pathological conditions. Içinde International Journal of Molecular Sciences (C. 22, Sayı 4, ss. 1-16). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms22041503

Burd, C. E., Jeck, W. R., Liu, Y., Sanoff, H. K., Wang, Z., & Sharpless, N. E. (2010). Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. PLoS Genetics, 6(12), 1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001233

Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., & Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. Cell, 147(2), 358-369. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028

Chen, A., Liu, S., Lu, X., Wei, L., & Chen, Y. (2018). Inhibition of microRNA-939 suppresses the development of human non-small cell lung cancer via the upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases 2. Molecular Medicine Reports, 18(6), 4831-4838. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9502

Cheng, Y., & Lotan, R. (1998). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Retinoic Acid-inducible Gene That Encodes a Putative G Protein-coupled Receptor*. http://www.jbc.org

Chen, J., Rao, B., Huang, Z., Xie, C., Yu, Y., Yang, B., Wu, D., Wang, D., Qiu, F., Zhou, Y., Deng, Y., & Lu, J. (2024). Circular RNA hsa_circ_0050386 suppresses non-

small cell lung cancer progression via regulating the SRSF3/FN1 axis. Journal of Translational Medicine, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12967-023-04812-1

Chen, J., & Xue, Y. (2016). Emerging roles of non-coding RNAs in epigenetic regulation. Içinde Science China Life Sciences (C. 59, Sayı 3, ss. 227-235). Science in China Press. https://doi.org/10.1007/s11427-016-5010-0

Chen, J., Xu, S., Chen, S., Zong, Z., Han, X., Zhao, Y., & Shang, H. (2019). CircPUM1 promotes the malignant behavior of lung adenocarcinoma by regulating miR-326. Biochemical and Biophysical Research Communications, 508(3), 844-849. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.176

Chen, Z., Li, Y., He, K., Yang, J., Deng, Q., Chen, Y., & Fu, Z. (2023). CircGPRC5A enhances colorectal cancer progress by stabilizing PPP1CA and inducing YAP dephosphorylation. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 42(1). https://doi.org/10.1186/s13046-023-02915-7

Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer*. Içinde Br. J. Cancer (C. 64).

Cocquerelle, C., Daubersies, P., Majerus, M.-A., Kerckaert, J.-P., Bailleul', B., & Brody, E. (1992). Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns 'Corresponding author Communicated by. Içinde The EMBO Journal (C. 1, Sayı 3).

Conn, S. J., Pillman, K. A., Toubia, J., Conn, V. M., Salmanidis, M., Phillips, C. A., Roslan, S., Schreiber, A. W., Gregory, P. A., & Goodall, G. J. (2015). The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. Cell, 160(6), 1125-1134. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.014

Davis, A. S., Viera, A. J., & Mead, M. D. (2014). Leukemia: An Overview for Primary Care (C. 89, Sayı 9). www.aafp.org/afp.

Di Modica, M., Regondi, V., Sandri, M., Iorio, M. V., Zanetti, A., Tagliabue, E., Casalini, P., & Triulzi, T. (2017). Breast cancer-secreted miR-939 downregulates VE-cadherin and destroys the barrier function of endothelial monolayers. Cancer Letters, 384, 94-100. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.013

Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. Içinde Journal of the Egyptian National Cancer Institute (C. 33, Sayı 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1186/s43046-021-00088-y

Dong, Y., He, D., Peng, Z., Peng, W., Shi, W., Wang, J., Li, B., Zhang, C., & Duan, C. (2017). Circular RNAs in cancer: an emerging key player. Içinde Journal of Hematology and Oncology (C. 10, Sayı 1, ss. 1-8). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13045-016-0370-2

Du, W. W., Fang, L., Yang, W., Wu, N., Awan, F. M., Yang, Z., & Yang, B. B. (2017). Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. Cell Death and Differentiation, 24(2), 357-370. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.133

Du, W. W., Yang, W., Liu, E., Yang, Z., Dhaliwal, P., & Yang, B. B. (2016). Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. Nucleic Acids Research, 44(6), 2846-2858. https://doi.org/10.1093/nar/gkw027

Fang, W., Yu, X., Deng, J., Yu, B., Xiong, J., & Ma, M. (2023). Upregulated GPRC5A disrupting the Hippo pathway promotes the proliferation and migration of pancreatic cancer cells via the cAMP-CREB axis. Discover Oncology, 14(1). https://doi.org/10.1007/s12672-023-00626-1

Fariha, A., Hami, I., Tonmoy, M. I. Q., Akter, S., Al Reza, H., Bahadur, N. M., Rahaman, M. M., & Hossain, M. S. (2022). Cell cycle associated miRNAs as target and therapeutics in lung cancer treatment. Içinde Heliyon (C. 8, Sayı 10). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11081

Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J. A., & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nature Genetics, 39(8), 1033-1037. https://doi.org/10.1038/ng2079

Fujimoto, J., Kadara, H., Garcia, M. M., Kabbout, M., Behrens, C., Liu, D. D., Lee, J. J., Solis, L. M., Kim, E. S., Kalhor, N., Moran, C., Sharafkhaneh, A., Lotan, R., & Wistuba, I. I. (2012). G-protein coupled receptor family C, group 5, member A (gprc5a) expression is decreased in the adjacent field and normal bronchial epithelia of patients with chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer. Journal of Thoracic Oncology, 7(12), 1747-1754. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31826bb1ff

Gu, C., Zhou, N., Wang, Z., Li, G., Kou, Y., Yu, S., Feng, Y., Chen, L., Yang, J., & Tian, F. (2018). circGprc5a Promoted Bladder Oncogenesis and Metastasis through Gprc5a-Targeting Peptide. Molecular Therapy Nucleic Acids, 13, 633-641. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.008

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Içinde Cell (C. 100).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. Içinde Cell (C. 144, Sayı 5, ss. 646-674). https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Han, B., Chao, J., & Yao, H. (2018). Circular RNA and its mechanisms in disease: From the bench to the clinic. Içinde Pharmacology and Therapeutics (C. 187, ss. 31-44). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.010

Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. Nature, 495(7441), 384-388. https://doi.org/10.1038/nature11993

Houseley, J. M., Garcia-Casado, Z., Pascual, M., Paricio, N., O'Dell, K. M. C., Monckton, D. G., & Artero, R. D. (2006). Noncanonical RNAs from transcripts of the Drosophila muscleblind gene. Journal of Heredity, 97(3), 253-260. https://doi.org/10.1093/jhered/esj037

Hsiao, K. Y., Lin, Y. C., Gupta, S. K., Chang, N., Yen, L., Sun, H. S., & Tsai, S. J. (2017). Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis. Cancer Research, 77(9), 2339-2350. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1883

Hsu, M., & Coca-Prados, M. (1979). Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. Nature, 280, 339-340.

Imran, A., Yasara Qamar, H., Ali, Q., Naeem, H., Riaz, M., Amin, S., Kanwal, N., Ali, F., Sabar, M. F., & Nasir, I. A. (2017). Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. Içinde Iran J Public Health (C. 46, Sayı 11). http://ijph.tums.ac.ir

Jiang, M. M., Mai, Z. T., Wan, S. Z., Chi, Y. M., Zhang, X., Sun, B. H., & Di, Q. G. (2018). Microarray profiles reveal that circular RNA hsa_circ_0007385 functions as an oncogene in non-small cell lung cancer tumorigenesis. Journal of Cancer

Research and Clinical Oncology, 144(4), 667-674. https://doi.org/10.1007/s00432-017-2576-2

Jiang, W., Zhang, C., Kang, Y., Li, G., Feng, Y., & Ma, H. (2021). The roles and mechanisms of the circular RNA circ_104640 in early-stage lung adenocarcinoma: a potential diagnostic and therapeutic target. Annals of Translational Medicine, 9(2), 138-138. https://doi.org/10.21037/atm-20-8019

Jiang, X., Xu, X., Wu, M., Guan, Z., Su, X., Chen, S., Wang, H., & Teng, L. (2018a). GPRC5A: An emerging biomarker in human cancer. Içinde BioMed Research International (C. 2018). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2018/1823726

Jiang, X., Xu, X., Wu, M., Guan, Z., Su, X., Chen, S., Wang, H., & Teng, L. (2018b). GPRC5A: An emerging biomarker in human cancer. Içinde BioMed Research International (C. 2018). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2018/1823726

Jin, E., Wang, W., Fang, M., Wang, L., Wu, K., Zhang, Y., Zhang, S., & Ma, S. (2017). Lung cancer suppressor gene GPRC5A mediates p53 activity in non-small cell lung cancer cells in vitro. Molecular Medicine Reports, 16(5), 6382-6388. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7343

Jin, E., Wang, W., Fang, M., Wang, W., Xie, R., Zhou, H., Ye, J., Xu, R., & Ma, S. (2019). Clinical significance of reduced GPRC5A expression in surgically resected non-small cell lung cancer. Oncology Letters, 17(1), 502-507. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9537

Jin, H., Jin, X., Zhang, H., & Wang, W. (2017). Circular RNA hsa-circ-0016347 promotes proliferation, invasion and metastasis of osteosarcoma cells. www.impactjournals.com/oncotarget

Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., Denicola, G., Webster, K. A., Weiss, D., Perez-Mancera, P. A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D. J., Tuveson, D. A., & Pandolfi, P. P. (2011). In vivo identification of tumor- suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. Cell, 147(2), 382-395. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.032

Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. Içinde Anticancer Research (C. 40, Sayı 11, ss. 6009-6015). International Institute of Anticancer Research. https://doi.org/10.21873/anticanres.14622

Kristensen, L. S., Jakobsen, T., Hager, H., & Kjems, J. (2022). The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology. Içinde Nature Reviews Clinical Oncology (C. 19, Sayı 3, ss. 188-206). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41571-021-00585-y

Liang, M., Huang, G., Liu, Z., Wang, Q., Yu, Z., Liu, Z., Lin, H., Li, M., Zhou, X., & Zheng, Y. (2019). Elevated levels of hsa_circ_006100 in gastric cancer promote cell growth and metastasis via miR-195/GPRC5A signalling. Cell Proliferation, 52(5). https://doi.org/10.1111/cpr.12661

Li, B., Xie, F., Zheng, F. xin, Jiang, G. song, Zeng, F. qing, & Xiao, X. yuan. (2017). Overexpression of CircRNA BCRC4 regulates cell apoptosis and MicroRNA-101/EZH2 signaling in bladder cancer. Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science, 37(6), 886-890. https://doi.org/10.1007/s11596-017-1822-9

Li, C. Y., Ma, L., & Yu, B. (2017). Circular RNA hsa_circ_0003575 regulates oxLDL induced vascular endothelial cells proliferation and angiogenesis. Biomedicine and Pharmacotherapy, 95, 1514-1519. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.064

Lin, Y., Wang, Y., Xue, Q., Zheng, Q., Chen, L., Jin, Y., Huang, Z., & Li, Y. (2024a). GPRC5A is a potential prognostic biomarker and correlates with immune cell infiltration in non-small cell lung cancer. Translational Lung Cancer Research, 13(5), 1010-1031. https://doi.org/10.21037/tlcr-23-739

Lin, Y., Wang, Y., Xue, Q., Zheng, Q., Chen, L., Jin, Y., Huang, Z., & Li, Y. (2024b). GPRC5A is a potential prognostic biomarker and correlates with immune cell infiltration in non-small cell lung cancer. Translational Lung Cancer Research, 13(5), 1010-1031. https://doi.org/10.21037/tlcr-23-739

Liu, N., Wang, Y., Li, T., & Feng, X. (2021). G-protein coupled receptors (Gpcrs): Signaling pathways, characterization, and functions in insect physiology and toxicology. International Journal of Molecular Sciences, 22(10). https://doi.org/10.3390/ijms22105260

Lu, M. (2020). Circular rna: Functions, applications and prospects. Içinde ExRNA (C. 2, Sayı January-February-March). AME Publishing Company. https://doi.org/10.1186/s41544-019-0046-5

Massion, P. P., & Carbone, D. P. (2003). The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. http://respiratory-research.com/content/4/1/12

Meganck, R. M., Liu, J., Hale, A. E., Simon, K. E., Fanous, M. M., Vincent, H. A., Wilusz, J. E., Moorman, N. J., Marzluff, W. F., & Asokan, A. (2021). Engineering highly efficient backsplicing and translation of synthetic circRNAs. Molecular Therapy Nucleic Acids, 23, 821-834. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.003

Mi, L., Lei, L., Yin, X., Li, N., Shi, J., Han, X., Duan, X., Zhao, M., Han, G., Wang, J., & Yin, F. (2020). Circ 0000144 functions as a miR-623 sponge to enhance gastric cancer progression via up-regulating GPRC5A. Bioscience Reports, 40(8). https://doi.org/10.1042/BSR20201313

Morovat, P., Morovat, S., Hosseinpour, M., Moslabeh, F. G. Z., Kamali, M. J., & Samadani, A. A. (2023). Survival-based bioinformatics analysis to identify hub long non-coding RNAs along with lncRNA-miRNA-mRNA network for potential diagnosis/prognosis of thyroid cancer. Journal of Cell Communication and Signaling, 17(3), 639-655. https://doi.org/10.1007/s12079-022-00697-9

Nigro, J. M., Cho, K. R., Fearon, E. R., Kern, S. E., Ruppert, J. M., Oliner, J. D., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1991). Scrambled Exons. Içinde Cell (C. 64).

Ou, R., Lv, J., Zhang, Q., Lin, F., Zhu, L., Huang, F., Li, X., Li, T., Zhao, L., Ren, Y., & Xu, Y. (2020). circAMOTL1 Motivates AMOTL1 Expression to Facilitate Cervical Cancer Growth. Molecular Therapy Nucleic Acids, 19, 50-60. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.09.022

Peng, Z., Xu, B., & Jin, F. (2020). Circular RNA hsa_circ_0000376 Participates in Tumorigenesis of Breast Cancer by Targeting miR-1285-3p. Technology in Cancer Research and Treatment, 19. https://doi.org/10.1177/1533033820928471

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Içinde Nucleic Acids Research (C. 29, Sayı 9).

Pisignano, G., Michael, D. C., Visal, T. H., Pirlog, R., Ladomery, M., & Calin, G. A. (2023). Going circular: history, present, and future of circRNAs in cancer. Içinde

Oncogene (C. 42, Sayı 38, ss. 2783-2800). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41388-023-02780-w

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.

Riley, L. B., & Desai, D. C. (2009). The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. Içinde Surgical Clinics of North America (C. 89, Sayı 1, ss. 1-15). https://doi.org/10.1016/j.suc.2008.09.016

Sanger, H. L., KLOTZt, G., RIESNERt, D., Gross, H. J., KLEINSCHMIDTt, A. K., Pflanzenvirologie, A., L Sanger, I. H., & Riesner, D. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures (C. 73, Sayı 11).

Saw, P. E., Xu, X., Chen, J., & Song, E. W. (2021). Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology. Içinde Science China Life Sciences (C. 64, Sayı 1, ss. 22-50). Science in China Press. https://doi.org/10.1007/s11427-020-1700-9

Song, H., Sun, B., Liao, Y., Xu, D., Guo, W., Wang, T., Jing, B., Hu, M., Li, K., Yao, F., & Deng, J. (2019a). GPRC5A deficiency leads to dysregulated MDM2 via activated EGFR signaling for lung tumor development. International Journal of Cancer, 144(4), 777-787. https://doi.org/10.1002/ijc.31726

Song, H., Sun, B., Liao, Y., Xu, D., Guo, W., Wang, T., Jing, B., Hu, M., Li, K., Yao, F., & Deng, J. (2019b). GPRC5A deficiency leads to dysregulated MDM2 via activated EGFR signaling for lung tumor development. International Journal of Cancer, 144(4), 777-787. https://doi.org/10.1002/ijc.31726

Starke, S., Jost, I., Rossbach, O., Schneider, T., Schreiner, S., Hung, L. H., & Bindereif, A. (2015). Exon circularization requires canonical splice signals. Cell Reports, 10(1), 103-111. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.002

Su, M., Xiao, Y., Ma, J., Tang, Y., Tian, B., Zhang, Y., Li, X., Wu, Z., Yang, D., Zhou, Y., Wang, H., Liao, Q., & Wang, W. (2019). Circular RNAs in Cancer: Emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers. Içinde Molecular Cancer (C. 18, Sayı 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12943-019-1002-6

Surono, A., Takeshima, Y., Wibawa, T., Ikezawa, M., Nonaka, I., & Matsuo, M. (1999). Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. Içinde Human Molecular Genetics (C. 8, Sayı 3).

Tabet, F., Lee, S., Zhu, W., Levin, M. G., Toth, C. L., Cuesta Torres, L. F., Vinh, A., Kim, H. A., Chu, H. X., Evans, M. A., Kuzmich, M. E., Drummond, G. R., Remaley, A. T., Rye, K. A., Sobey, C. G., & Vickers, K. C. (2020). microRNA-367-3p regulation of GPRC5A is suppressed in ischemic stroke. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 40(6), 1300-1315. https://doi.org/10.1177/0271678X19858637

Tao, Q., Fujimoto, J., Men, T., Ye, X., Deng, J., Lacroix, L., Clifford, J. L., Mao, L., Van Pelt, C. S., Lee, J. J., Lotan, D., & Lotan, R. (2007). Identification of the retinoic acid-inducible Gprc5a as a new lung tumor suppressor gene. Journal of the National Cancer Institute, 99(22), 1668-1682. https://doi.org/10.1093/jnci/djm208

Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021a). Lung cancer. Içinde The Lancet (C. 398, Sayı 10299, ss. 535-554). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021b). Lung cancer. Içinde The Lancet (C. 398, Sayı 10299, ss. 535-554). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. Içinde Wspolczesna Onkologia (C. 25, Sayı 1, ss. 45-52). Termedia Publishing House Ltd. https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829

U. S. National Institutes of Health, N. C. I. (t.y.). Cancer Classification . Geliş tarihi 17 Mart 2024, gönderen https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html

Wang, J., Farris, A. B., Xu, K., Wang, P., Zhang, X., Duong, D. M., Yi, H., Shu, H. K., Sun, S. Y., & Wang, Y. (2016). GPRC5A suppresses protein synthesis at the endoplasmic reticulum to prevent radiation-induced lung tumorigenesis. Nature Communications, 7. https://doi.org/10.1038/ncomms11795

Wang, J., Yang, Y., Cao, Y., & Tang, X. (2019). MiR-342 inhibits glioma cell proliferation by targeting GPRC5A. Molecular Medicine Reports, 20(1), 252-260. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10242

Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2019). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. Içinde Cellular Physiology and Biochemistry (C. 51, Sayı 6, ss. 2647-2693). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000495956

Wang, Y., & Wang, Z. (2015a). Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. RNA, 21(2), 172-179. https://doi.org/10.1261/rna.048272.114

Wang, Y., & Wang, Z. (2015b). Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. RNA, 21(2), 172-179. https://doi.org/10.1261/rna.048272.114

Wang, Y., Wang, Z., Lu, J., & Zhang, H. (2021). Circular RNA circ-PTEN elevates PTEN inhibiting the proliferation of non-small cell lung cancer cells. Human Cell, 34(4), 1174-1184. https://doi.org/10.1007/s13577-021-00526-y

Weber, J., & Mcclure, M. (1987). Regular Review: Oncogenes And Cancer. Içinde Clinical Research Edition) (C. 294, Sayı 6582). https://about.jstor.org/terms

Wu, J., Guo, X., Wen, Y., Huang, S., Yuan, X., Tang, L., & Sun, H. (2021). N6-Methyladenosine Modification Opens a New Chapter in Circular RNA Biology. Içinde Frontiers in Cell and Developmental Biology (C. 9). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.709299

Wu, K. L., Tsai, Y. M., Lien, C. T., Kuo, P. L., & Hung, J. Y. (2019). The roles of microRNA in lung cancer. Içinde International Journal of Molecular Sciences (C. 20, Sayı 7). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms20071611

Xu, Z., Li, P., Fan, L., & Wu, M. (2018). The potential role of circRNA in tumor immunity regulation and immunotherapy. Içinde Frontiers in Immunology (C. 9, Sayı JAN). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00009

Yang, Q., Du, W. W., Wu, N., Yang, W., Awan, F. M., Fang, L., Ma, J., Li, X., Zeng, Y., Yang, Z., Dong, J., Khorshidi, A., & Yang, B. B. (2017). A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. Cell Death and Differentiation, 24(9), 1609-1620. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.86

Yang, W., Du, W. W., Li, X., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2016). Foxo3 activity promoted by non-coding effects of circular RNA and Foxo3 pseudogene in the inhibition of tumor growth and angiogenesis. Oncogene, 35(30), 3919-3931. https://doi.org/10.1038/onc.2015.460

Yang, Y., & Wang, Z. (2019). IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. Içinde Journal of Molecular Cell Biology (C. 11, Sayı 10, ss. 911-919). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz091

Yang, Z. 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), 2062-2074. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.022

Yao, Z., Luo, J., Hu, K., Lin, J., Huang, H., Wang, Q., Zhang, P., Xiong, Z., He, C., Huang, Z., Liu, B., & Yang, Y. (2017). ZKSCAN1 gene and its related circular RNA (circZKSCAN1) both inhibit hepatocellular carcinoma cell growth, migration, and invasion but through different signaling pathways. Molecular Oncology, 11(4), 422-437. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12045

Zaphiropoulos, P. G. (1996). Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: Correlation with exon skipping (C. 93). https://www.pnas.org

Zhang, K., Lee, Y. S., Lee, I., & Bao, X. (2023). Editorial: Small non-coding RNAs in diseases. Içinde Frontiers in Molecular Biosciences (C. 9). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1086768

Zhang, W., Zhou, B., Yang, X., Zhao, J., Hu, J., Ding, Y., Zhan, S., Yang, Y., Chen, J., Zhang, F., Zhao, B., Deng, F., Lin, Z., Sun, Q., Zhang, F., Yao, Z., Liu, W., Li, C., & Liu, K. X. (2023). Exosomal circEZH2_005, an intestinal injury biomarker, alleviates intestinal ischemia/reperfusion injury by mediating Gprc5a signaling. Nature Communications, 14(1). https://doi.org/10.1038/s41467-023-41147-3

Zhang, X. O., Wang, H. Bin, Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L., & Yang, L. (2014). Complementary sequence-mediated exon circularization. Cell, 159(1), 134-147. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001

Zhang, X., Wang, S., Wang, H., Cao, J., Huang, X., Chen, Z., Xu, P., Sun, G., Xu, J., Lv, J., & Xu, Z. (2019). Circular RNA circNRIP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway. Molecular Cancer, 18(1). https://doi.org/10.1186/s12943-018-0935-5

Zhong, L., Wang, Y., Cheng, Y., Wang, W., Lu, B., Zhu, L., & Ma, Y. (2018). Circular RNA circC3P1 suppresses hepatocellular carcinoma growth and metastasis through miR-4641/PCK1 pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications, 499(4), 1044-1049. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.221

Zhong, S., Zhou, S., Yang, S., Yu, X., Xu, H., Wang, J., Zhang, Q., Lv, M., & Feng, J. (2019). Identification of internal control genes for circular RNAs. Biotechnology Letters, 41(10), 1111-1119. https://doi.org/10.1007/s10529-019-02723-0

Zhou, H., & Rigoutsos, I. (2014). The emerging roles of GPRC5A in diseases. Içinde Oncoscience (C. 1, Sayı 12). www.impactjournals.com/oncoscience

Zhou, J., Zhang, S., Chen, Z., He, Z., Xu, Y., & Li, Z. (2019). CircRNA-ENO1 promoted glycolysis and tumor progression in lung adenocarcinoma through upregulating its host gene ENO1. Cell Death and Disease, 10(12). https://doi.org/10.1038/s41419-019-2127-7

EKLER

EK 1 Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin listesi
EK 2 Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler
EK 3 Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

EK 1 Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddelerin listesi

- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X) (10000 U/ml penisilin,10.00 mg/ml streptomisin, 9.00 mg/ml sodyum klorid), Cegrogen-biotech
- MEM (Minimum Esasantial Medium) Nonessential Amino Asit (100X), Diagnovum
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit K1622, ThermoFisher Scientific
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- 0.05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit 1X (Tripsin-EDTA), Gibco
- Etanol (%96-100), Merck -NaOH (Sodyum Hidroksit), Fisher Scientific, UK
- Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA-Dihydrate), Bioshop
- Agaroz, Prona Basica Le -DNA yükleme boyası, abm G030
- Etidyum Bromür, Merck 25
- TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (katalog numarası A33254)
- Kloroform

EK 2 Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler

- Steril Santrifüj Tüpleri 15 ml
- Steril Santrifüj Tüpleri 50 ml
- 25cm2 ve 75cm2 ‘lik flask,
- 1,5 ml Steril Nüclease-free mikrofüj tüpleri (Ependorf) , Isolab
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject
- 10 µl pipet uçları, Biopointe scientific
- 100 µl pipet uçları, Biopointe scientific
- 200 µl pipet uçları,
- 1000 µl pipet uçları, Isolab
- 0,2 ml PCR tüpleri, ThermoFisher Scientific
- 0,1 ml RT-PCR tüpleri ve kapakları, ThermoFisher Scientific

EK Çizelge 1. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihazın adı	Kullanım amacını
Steril Kabin, Fagus	Hücre kültürü çalışmasında steril ortam sağlamak için kullanıldı.
-80 °C Dondurucu, HARRIS	Hücre hatları ve RNA örnekleri saklamak için kullanıldı.
-20 °C Dondurucu, Arçelik	cDNA ve kullanılan kitleri saklamak için kullanıldı.
-10 µl mikropipet,	Numune aktarmak için kullanıldı.
100 µl mikropipet,	Numune aktarmak için kullanıldı.
1000 µl mikropipet	Numune aktarmak için kullanıldı.
Santrifüj, NÜVE- NF-800R	Pellet oluşturma
Aspiratör, Value- VE115N	Hücrelerden besiyerini uzaklaştırmak için kullanıldı.
CO_2 inkübatörü (%5 CO2; 37 °C), Panasonic	Hücre çalışmasında hücrelere uygun ortamı sağlamak için kullanıldı.
Inverted mikroskop, Euromex- CMEX PRO 5	Tez çalışmasında kullanılan hücreleri incelemek için kullanıldı.
Mikrosantrifüj, Microfuge 16- Beckman Coulter	Pellet oluşturma
Vortex, VELP Scientifica	Numuneleri ve solüsyonları iyice karışması sağlamak adına kullanıldı.
Nanodrop, ThermoFisher Scientific NANODROP 2000	RNA örneklerin konsantrasyonu ölçmek için kullanıldı.
Hassas terazi, Radwag AS220/C/2	Agarozu tartmak için kullanıldı.
Mikrodalga, Arçelik MD564	Agarozu TAE tamponunda eritmek için kullanıldı.
Mini jel elektroforez sistemi, ThermoFisher Scientific OWL EASYCAST B1-BP	qPCR amplikonları jelde yürütmek için kullanıldı.

Ultraviyole (UV) görüntüleme cihazı, Major Science UVDI	Jeldeki DNA bantları görüntülemek için kullanıldı.
Termal döngüleyici PCR Cihazı, MJ RESEARCH ,INC. PTC-100	RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanıldı.
Ultra saf su cihazı	Deneylerde kullanılan suyu elde etmek için kullanıldı.
Buz makinası, Biobase FIM20	Deney sırasında kullanılan buzu üretmek için kullanıldı.
Gerçek-Zamanlı PCR, Bio-Rad CFX Connect cihazı	Çalışma kapsamındaki hedef genlerin ifade miktarlarını belirmek için kullanıldı.