



**MEME KANSERİNDE GPRC5A GEN
EKSPRESYONUNUN circGPRC5A ARACILI
DÜZENLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esthefany Yarluz SOUQUETT RUIZ



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİNDE GPRC5A GEN EKSPRESYONUNUN circGPRC5A
ARACILI DÜZENLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esthefany Yarluz SOUQUETT RUIZ
0009-0005-0812-634X

Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEME KANSERİNDE GPRC5A GEN EKSPRESYONUNUN circGPRC5A ARACILI DÜZENLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Esthefany Yarluz SOUQUETT RUIZ

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM

Meme kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bu hastalığın patolojisi yalnızca genetik mutasyonlarla değil, aynı zamanda birçok genin ekspresyonundaki düzensizlikle de ilişkilendirilmiştir. Bu genlerden biri olan *GPRC5A* (G proteinine bağlı reseptör kodlayan gen), çeşitli kanser türlerinde rol oynamakta olup, meme dokusunda tümör baskılayıcı bir işlev gördüğü düşünülmektedir. Kovalent olarak kapalı halkasal yapıya sahip kodlamayan RNA'lar sınıfına ait olan halkasal RNA'lar (circRNA'lar), *GPRC5A* ekspresyonundaki düzensizliğe katılan yeni düzenleyici moleküller olarak tanımlanmıştır. Özellikle, circ*GPRC5A*'nın, *GPRC5A* mRNA'sını hedef alan belirli mikroRNA'lara sünger gibi bağlanarak, circRNA-miRNA-mRNA eksenini aracılığıyla bu rolü çeşitli kanser türlerinde oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizma diğer bazı kanser türlerinde önerilmiş olsa da, meme kanserindeki rolü hâlâ belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, meme kanseri hücrelerinde circ*GPRC5A*'nın ekspresyonunu değerlendirmek ve *GPRC5A* üzerindeki olası düzenleyici rolünü araştırmaktır. Bu amaçla, MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitelyal hücre hattı olan MCF10A kullanılmıştır. Bu hücrelerden toplam RNA izole edilmiş, cDNA'ya dönüştürülmüş ve circ*GPRC5A* ile *GPRC5A*'nın ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, circ*GPRC5A* ve *GPRC5A*'nın her ikisinin de kanser hücre hatlarında sağlıklı MCF10A hücrelerine kıyasla ifade azaldığını ve MDA-MB-231 hücrelerinde MCF7'ye göre daha düşük ifade düzeyleri sergilendiğini ortaya koymuştur. circ*GPRC5A* ve *GPRC5A* arasındaki paralel ekspresyon modeli potansiyel bir düzenleyici ilişkiye işaret etmektedir. Devamında yapılan *in silico* analizde, meme kanserinde circ*GPRC5A* ve *GPRC5A* ile etkileşime girebilecek en güçlü aday olarak miR-214-3p belirlenmiştir. Ancak, miR-214-3p'nin gözlemlenen ekspresyon düzeyi beklenenden farklı olmuştur. Bu korelasyonun altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, meme kanserinde tümör baskılayıcı genlerin post-transkripsiyonel düzeydeki düzenlenmesine dair önemli bilgiler sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: *GPRC5A*, circRNA, miRNA, meme kanseri, post-transkripsiyonel gen regülasyonu

2025, ix + 86 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATING circGPRC5A-MEDIATED REGULATION OF GPRC5A GENE
EXPRESSION IN BREAST CANCER

Esthefany Yarluz SOUQUETT RUIZ

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

Supervisor: Assist. Prof. Elif UZ YILDIRIM

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer globally and a major cause of cancer-related mortality. Its pathology has been associated not only genetic mutations with but also with the dysregulation of numerous genes. One gene of interest is *GPRC5A* (G protein-coupled receptor-encoding), which has been implicated in various types of cancer and is considered to function as a tumor suppressor in breast tissue. Circular RNAs (circRNAs), a class of covalently closed non-coding RNAs, have been identified as novel regulatory molecules involved in the dysregulation of *GPRC5A*. Specifically, circ*GPRC5A* has been elucidated to play this role in various types of cancer through the circRNA–miRNA–mRNA axis by sponging specific microRNAs that target *GPRC5A* mRNA, thereby influencing its expression. Although this mechanism has been proposed in other types of cancer, its implication in breast cancer remains undetermined. Therefore, this study aimed to evaluate the expression of circ*GPRC5A* and investigate its potential regulatory role over *GPRC5A* expression in breast cancer cells. For this purpose, breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231, as well as the breast epithelial cell line MCF10A, were used. Total RNA was extracted from these cells, converted into cDNA, and the expression levels of circ*GPRC5A* and *GPRC5A* mRNA were quantified using qRT-PCR. The results revealed that both circ*GPRC5A* and *GPRC5A* were downregulated in cancer cell lines compared to MCF10A, with lower expression levels observed in MDA-MB-231 cells than in MCF7. The parallel expression patterns between circ*GPRC5A* and *GPRC5A* suggested a potential regulatory link. Subsequently, an *in silico* analysis identified miR-214-3p as the most promising candidate involved in a circ*GPRC5A*–miRNA–*GPRC5A* regulatory axis in breast cancer. However, the observed expression level of miR-214-3p was opposite to what was expected. Further investigation is required to elucidate the molecular mechanisms underlying this correlation, as it may provide valuable insights into the post-transcriptional regulation of tumor suppressor genes in breast cancer.

Key words: *GPRC5A*, circular RNA, miRNA, breast cancer, post-transcriptional gene regulation

2025, ix + 86 pages

TEŞEKKÜR

Elif Uz Yıldırım danışmanıma, beni öğrencisi olarak kabul ettiği ve dilin sınırlamalarının faaliyetlerimizi yürütmemize engel olmaması için her zaman anlayışlı davrandığı için teşekkürlerimi sunarım.

Doç. Dr. Figen Ersoy'a, Bitki Moleküler Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nı kullanmamıza izin vererek deneylerimizi gerçekleştirmemize olanak sağladığı için teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Ferda Arı'ya ve Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı öğrencilerine, bu projede kullanılan hücrelerin kültürünü yapmamıza yardımcı oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Daoude Ag Hamma, Sibel Karaman, Madina Aliveya ve Sımpel Pantır Retzep'e, laboratuvar içinde ve dışında bana destek oldukları, ritmime uyum sağlayarak her zaman takım çalışması yapabilmemizi sağladıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Merve Demirbağ Karaali Hoca'ya ve Mehmet Kara Hoca'ya, projemi gerçekleştirirken her zaman sorularımı yanıtlayarak bana rehberlik ettiği için teşekkürlerimi sunarım.

Greusury, Elvis, Oumayma, Azra, Rima, Amir, Mücahit, Ramin, Zakaria ve Isra'ya, ne zaman ihtiyacım olsa bana destek olup ışıklarını benimle paylaştıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Fundayacucho'ya, Venezuela'dan öğrenci hayatımı daha huzurlu bir şekilde sürdürebilmem için teşekkürlerimi sunarım.

Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na, bana sağladıkları maddi destekle bu araştırma çalışmasını gerçekleştirmeme olanak tanıdıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Esthefany Yarluz SOUQUETT RUIZ

18/06/2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser Alt Tipleri	3
2.3. Meme Kanseri	4
2.4. Memenin Anatomisi ve Onkogenezdaki Önemi	4
2.5. Meme Kanserinin Sınıflandırması	6
2.5.1. Evreleme (Staging)	6
2.5.2. Histolojik Alt Tipler	7
2.5.3. Derecelendirme (Grading)	7
2.5.4. İmmünofenotipik Profil	8
2.5.5. Moleküler/İçsel Alt Tipler	8
2.6. Risk Faktörleri ve Duyarlılık	9
2.6.1. Meme Kanserinde Kalıtsal Duyarlılık	10
2.6.2. Meme Kanserinde Somatik Genetik Değişiklikler	10
2.7. GPRC5A Geni ve Kanserdeki Rolü	11
2.8. GPRC5A Ekspresyonunun Regülasyonu	14
2.9. GPRC5A'nın Transkripsiyonel Düzenlemesi	14
2.10. GPRC5A'nın Transkripsiyon Sonrası Düzenlemesi	15
2.10.1. GPRC5A'nın RNA bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenmesi	15
2.10.2. Kodlamayan RNA'lar ve GPRC5A'nın düzenleyicileri olarak rolleri	15
2.11. MikroRNA'lar	17
2.11.1. MikroRNA biyogenezinin mekanizmaları	17
2.11.2. MiRNA'ların hedef etkileşimi ve düzenleyici fonksiyonu	18
2.11.3. MiRNA'lar ile GPRC5A'nın düzenlenmesi ve kanserle ilişkisi	19
2.12. Dairesel RNA'lar	21
2.12.1. Dairesel RNA'ların tarihsel gelişimi	21
2.12.2. Sınıflandırma ve hücrel lokalizasyon	23
2.12.3. Dairesel RNA'ların biyogenezi	23
2.12.4. Dairesel RNA biyogenezinin mekanizmaları	25
2.12.5. Dairesel RNA'ların (circRNA'lar) biyolojik fonksiyonları	26
2.12.6. CircRNA'ların Uygulamaları	28
2.12.7. Kanserde GPRC5A'nın Düzenleyicileri Olarak CircRNA'lar	30

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Meme Hücre Hatları	33
3.2. Meme Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu	34
3.3. RNA Örneklerinin Konsantrasyon Ölçümü ve Bütünlüğünün Belirlenmesi	35
3.4. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	36
3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR)	37
3.6. Veri Analizi	40
3.7. Aday miRNA Taraması için <i>in silico</i> Analiz	40
3.8. miRNA Ekspresyonunun Belirlenmesiyle İlgili Konular	42
3.8.1. Meme hücre hatlarından RNA ekstraksiyonu ve konsantrasyon ölçümü	42
3.8.2. RNA örneklerinin Stem-loop RT-qPCR analiz	43
4. BULGULAR	46
4.1. Hücre Hatlarının Morfolojisi	46
4.2. Hücre Hatlarından İzole Edilen RNA'nın Konsantrasyonu ve Kalitesi	46
4.3. GPRC5A Geninin İnsan Meme Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Düzeyi	47
4.4. İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde circGPRC5A Ekspresyon Düzeyi	49
4.5. Aday miRNA'ların Belirlenmesi	50
4.6. miRNA Ekspresyonu ile İlgili Konular	58
4.6.1. Hücre hatlarından izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu	58
4.6.2. Meme kanseri hücrelerinde miR-214-3p ekspresyon düzeyi	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
KAYNAKLAR	66
EKLER	78
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µg (ug)	Mikrogram
µL (uL)	Mikrolitre
µM (uM)	Mikromolar
°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbon dioksit
Ct	Döngü eşiği
E	Etkileşim enerjisi
F	İleri primer (<i>Forward primer</i>)
Gr	Gram
IU	Uluslararası Birim
Kb	Kilobaz
Kcal	Kilokalori
Mg	Miligram
mL	Mililitre
Ng	Nanogram
Nm	Nanometre
Nts	Nükleotitler
R	Ters primer (<i>Reverse primer</i>)
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Tm	Eritme sıcaklığı (<i>melting temperature</i>)
V	Volt
Δ	Delta (<i>Değişim</i>)

Kısaltmalar	Açıklama
A230	230 nm'de absorpsiyon
A260	260 nm'de absorpsiyon
A280	280 nm'de absorpsiyon
BLAST	Temel Yerel Hizalama Aracı (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSJ	Back-splice birleşim noktası
BUFFER RPE	Nükleik asit saflaştırmada kullanılan etanol bazlı yıkama tamponu
BUFFER RWT	RNA izolasyonunda kullanılan guanidin tiosiyanat bazlı yıkama tampon
cDNA	Komplemanter DNA
CDS	Kodlayan dizi
circGPC5A	GPC5A geninden türetilmiş dairesel RNA
circHIPK3	HIPK3 geninden türetilmiş dairesel RNA
circRNA	Dairesel RNA (<i>circular RNA</i>)
DMEM/F-12	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı / F-12 karışımı)
DNA	Deoksiribonükleik asit

FBS	Fetal sığır serumu
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GPRC5A	G proteini ile ilişkili reseptör 5A genini kodlayan gen
MCF10A	Tümör oluşturmeyen insan meme epitel hücre hattı
MCF7	İnsan meme kanseri hücre hattı (luminal A tipi)
MDA-MB-231	Üçlü negatif, invaziv meme kanseri hücre hattı
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PBS	Fosfat tamponlu salin çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
ROX	qPCR’de kullanılan pasif referans boya
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	Ribozomal RNA
SD	Standart sapma
TAE	Tris-Asetat-EDTA tampon
UTR	Çevrilmeyen bölge (<i>Untranslated Region</i>)
UV	Ultraviyole ışık
UVDI	Ultraviyole ışıkla dezenfeksiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Memenin Bileşenleri	5
Şekil 2.2.	RNA moleküllerinin moleküler boyut, şekil, fonksiyon ve lokalizasyona göre sınıflandırılması	16
Şekil 2.3.	MiRNA biyogenez yolunun şematik gösterimi	18
Şekil 2.4.	MiRNA: Hedef tanıma	20
Şekil 2.5.	circRNA'ların keşfi, araştırılması ve gelişimine dair zaman çizelgesi	22
Şekil 2.6.	Kanonik splicing işlemi	24
Şekil 2.7.	circRNA'nın biyogenezine yol açan mekanizmalar	26
Şekil 2.8.	Süngerleme miRNA'nın gen ifadesi üzerindeki circRNA etkisinin şematik gösterimi	27
Şekil 2.9.	CircRNA'ların bazı işlevleri.	29
Şekil 3.1.	GPRC5A geninin ekzon 2'sinden türetilmiş circGPRC5A'nın yapısı ve ileri/geri (F/R) primerlerin yönlerini gösteren şematik çizim	39
Şekil 3.2.	miRNA seçim sürecinin akış şeması.	42
Şekil 3.3.	Stem-loop RT-qPCR şeması	44
Şekil 4.1.	Meme hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüsü.	46
Şekil 4.2.	MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal meme epitelyal hücre hattı MCF10A'da GPRC5A mRNA'sının göreceli ifade seviyesi.	48
Şekil 4.3.	MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında GPRC5A mRNA'sı ifadesinin kat değişimi	48
Şekil 4.4.	MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal meme epitelyal hücre hattı MCF10A'da circGPRC5A'nın göreceli ifade seviyesi	49
Şekil 4.5.	MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında circGPRC5A'nın ifadesinin kat değişimi	50
Şekil 4.6.	circGPRC5A ve GPRC5A ile potansiyel olarak etkileşimde bulunabilecek ortak ve özgül miRNA'ların sayısını gösteren Venn diyagramı	51
Şekil 4.7.	hsa-miR-214-3p ve circGPRC5A arasındaki etkileşim bölgelerini gösteren görsel hizalama	57
Şekil 4.8.	hsa-miR-214-3p ve GPRC5A mRNA arasındaki etkileşim bölgelerini gösteren görsel hizalama	57
Şekil 4.9.	MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında miR214-3p'nin göreceli ifade seviyesi.	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	İnsan kanserlerinde GPRC5A'nın düzensizliği	12
Çizelge 3.1.	Ladder ve RNA örnekleri için yükleme karışımı	35
Çizelge 3.2.	cDNA sentez reaksiyonu için bileşenler	36
Çizelge 3.3.	cDNA sentez reaksiyonu için inkübasyon koşulları	37
Çizelge 3.4.	qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri	37
Çizelge 3.5.	Uygulanan qPCR koşulları	38
Çizelge 3.6.	qPCR için primer dizileri	39
Çizelge 3.7.	Stem-loop RT-qPCR için parametreler ve koşullar	44
Çizelge 3.8.	Stem-loop qRT-PCR için kullanılan primerlerin dizileri	45
Çizelge 4.1.	Ekstrakte edilen RNA'nın konsantrasyonları ve kalitesi	47
Çizelge 4.2.	Meme kanserinde, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında deregüle olmuş miRNA'lar	50
Çizelge 4.3.	circGPRC5A ve aday miRNA'lar arasındaki öngörülen etkileşimler	55
Çizelge 4.4.	GPRC5A mRNA ve aday miRNA'lar arasındaki öngörülen etkileşimler	56
Çizelge 4.5.	hsa-miR-214-3p ile ilişkili bilgiler	57
Çizelge 4.6.	circGPRC5A ve hsa-miR-214-3p arasındaki öngörülen etkileşimler	58
Çizelge 4.7.	Ekstrakte edilen RNA'nın konsantrasyonları ve kalitesi	58

1. GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen kötü huylu kanser çeşitlerinden biri olup, yıllardır kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir. Erken tanı, sınıflandırma ve tedavi yöntemlerinde kaydedilen önemli ilerlemelere rağmen, biyolojik heterojenliği ve konvansiyonel tedavilere karşı sık gelişen direnç nedeniyle meme kanseri küresel sağlık için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu zorluklar, tanı, prognoz ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerini geliştirebilecek yeni moleküler biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin belirlenmesi gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır.

Son yıllarda, kodlamayan RNA'lar, özellikle mikroRNA'lar (microRNA, miRNA) ve dairesel RNA'lar (circular RNA, circRNA), gen ekspresyonunun çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde düzenlenmesinde önemli roller oynadıkları gösterildiğinden dolayı yoğun araştırmaların odağında yer almaktadır. Bu RNA'lar arasında, dairesel RNA'lar belirli özellikleri sayesinde kanser araştırmalarında umut verici biyomoleküller olarak dikkat çekmektedir.

Dairesel RNA'lar, "back-splicing" adı verilen bir mekanizma yoluyla oluşan kovalent olarak kapalı halka yapısıyla tanımlanır ve bu yapı, onları yüksek derecede stabil ve ekzonükleaz aracılı yıkıma karşı dirençli hale getirir. Ayrıca, bu moleküller dokuya özgü ekspresyon profilleri sergiler ve transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeylerde gen düzenlemesinde rol aldıkları giderek daha fazla kabul görmektedir. İşlevsel olarak, dairesel RNA'lar çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etkide bulunabilir: miRNA süngerleri olarak görev yapmak, RNA-bağlayıcı proteinlerle etkileşmek, gen transkripsiyonunu modüle etmek ve bazı durumlarda peptid kodlamak. Kanser araştırmalarında en fazla çalışılan mekanizmalardan biri, dairesel RNA'ların belirli miRNA'ları bağlayarak hedef genlerle etkileşim kurmalarını engellemesi ve bu yolla "rekabetçi endojen RNA" olarak görev yaparak gen ekspresyonunu düzenleme yetenekleridir.

circGPRC5A (hsa_circ_0025506), çeşitli kanser türlerinde kilit düzenleyici bir molekül olarak tanımlanmış bir dairesel RNA'dır. G-protein ile ilişkili reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesini kodlayan GPRC5A geninin ekspresyonunu dolaylı olarak etkilediği rapor edilmiştir. GPRC5A, hücre çoğalması, apoptoz ve farklılaşma

dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. İlginç bir şekilde, bu genin ekspresyonu farklı kanser türlerinde bağlama bağlı olarak tümör baskılayıcı veya onkogen olarak işlev görebilmektedir. Özellikle meme kanserinde GPRC5A'nın ekspresyonunda değişiklikler gözlemlenmiş olsa da, bu genin düzenlenmesi ve işlevi hâlâ tam olarak anlaşılmamıştır.

circGPRC5A'nın düzensizliği, mesane ve kolorektal kanserlerde hücre proliferasyonu, göçü ve diğer onkojenik süreçleri teşvik ederek hastalığın ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir; özellikle mesane kanserinde GPRC5A üzerindeki düzenleyici işlevi aracılığıyla. Ancak, circGPRC5A'nın meme kanserindeki spesifik rolü büyük ölçüde araştırılmamıştır ve bu durum mevcut bilimsel literatürde önemli bir boşluğu temsil etmektedir.

Meme kanserinin artan insidansı ve karmaşık moleküler yapısı göz önünde bulundurulduğunda, bu hastalıkta circGPRC5A'nın rolünün araştırılması büyük önem taşımaktadır. Özellikle, dairesel RNA'ların stabil moleküler biyobelirteçler olarak taşıdığı potansiyel dikkate alındığında, bu çalışma, meme kanserinde circGPRC5A ekspresyonunun değerlendirilmesini ve circGPRC5A-miRNA-GPRC5A etkileşimlerini içeren olası düzenleyici ağın araştırılmasını amaçlamaktadır. Bu amaçla, çeşitli meme kanseri hücre hatlarında ve tümöral olmayan hücre hatlarında circGPRC5A ve GPRC5A'nın ekspresyon seviyelerini belirlemek için deneysel analizler gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, circGPRC5A ile etkileşebilecek aday miRNA'ları öngörmek için biyoinformatik analizler yapılmış olup, bu adaylar GPRC5A düzenlenmesinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik gelecekteki çalışmalar için temel oluşturabilir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, genomda biriken zararlı varyasyonlar sonucunda ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesiyle (neoplazi) karakterize edilen kötü huylu bir tümörü ifade eder; bu hücreler çevre dokulara yayılma (invazyon) ile birlikte vücudun uzak organlarına metastaz yapma yeteneğine sahiptir (Taniç, 2012).

Kanser, çok aşamalı bir süreç olan onkogenz aracılığıyla genler ile organizmanın çevresi arasındaki etkileşimleri içeren moleküler olaylar sonucunda meydana gelir. Bu süreçte, kritik genlerdeki ardışık mutasyonlar ve/veya epimutasyonlar, hayati düzenleyici yolları değiştirerek hücre metabolizması ve davranışında değişikliklere yol açar (Diori Karidio ve ark., 2021).

Bir hücrenin kötü huylu transformasyonu için farklı genlerde en az 6 ila 7 mutasyonun birikmesi gerektiği, çünkü tek bir mutasyonun kanser oluşumunu tetiklemek için yetersiz olduğu bilinmektedir. Bu süreç tek bir hücrede başlar; hücre çoğalmaya başlar, fonksiyonlarında ilerleyici değişiklikler gösterir ve komşu hücrelere göre hayatta kalma avantajı sağlayan yeni değişiklikler kazanır. Bozulmuş çoğalma kontrolüne ek olarak, bu değişiklikler hücreye sonsuz bir yaşam süresi, komşu hücrelerle değişmiş iletişim yeteneği ve sonunda bağışıklık sisteminden kaçma kabiliyeti kazandırır (Diori Karidio ve ark., 2021).

2.2. Kanser Alt Tipleri

Kanserler, hücrel kökenlerine göre çeşitli alt tiplere ayrılır. İnsan tümörlerinin en yaygın olanları epitel hücrelerinden kaynaklanır ve “karsinom” olarak adlandırılır. Epitel dışı dokulardan kaynaklanan kötü huylu tümörler ise çeşitli farklı türleri içerir. Sarkomlar, kemik, kas, yağ, kan damarları ve kıkırdak gibi bağ dokularından türeyen tümörlerdir (Weinberg, 2007).

Kan oluşturan (hematopoietik) dokulardan, özellikle bağışıklık sistemine ait olanlardan kaynaklanan tümörler arasında; kanda ve kemik iliğinde dolaşan

olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinden (lökositler) gelişen lösemiler, B ve T lenfositlerden köken alıp genellikle lenf düğümlerinde katı kitleler halinde bulunan lenfomalar ve antikor salgılayan plazma hücrelerinden kaynaklanıp esas olarak kemik iliğinde biriken miyelomlar yer alır (Weinberg, 2007).

Ayrıca, merkezi ve periferik sinir sisteminin çeşitli bileşenlerinden köken alan nöroektodermal tümörler adı verilen bir tümör grubu da bulunmaktadır. Bu kategori, gliomlar ve nöroblastomlar gibi tümörleri içerir (Weinberg, 2007).

Kanser türleri, ayrıca köken aldıkları organa göre de sınıflandırılır. Dünya genelinde en sık görülen dört kanser türü meme, prostat akciğer, ve kolorektal kanserleridir (National Cancer Institute, 2025).

2.3. Meme Kanseri

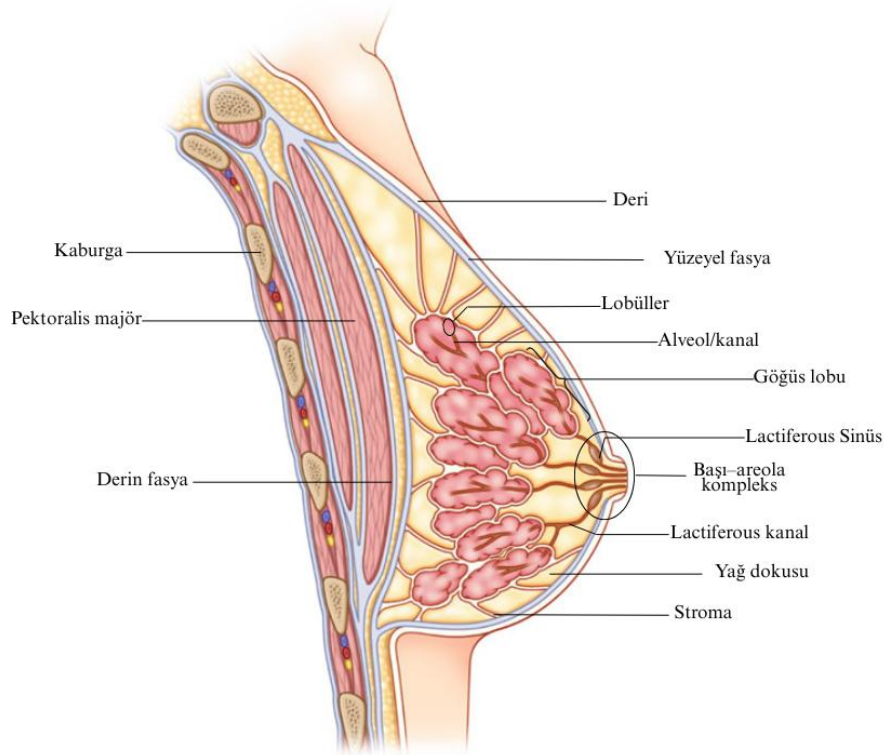
Meme kanseri, karsinogenez sürecinin meme hücrelerinde başladığı kötü huylu bir hastalıktır (Akram ve ark., 2017). Bu hastalık hem erkekleri hem de kadınları etkilese de, kadınlarda görülme sıklığı çok daha yüksektir ve bu grup içinde vakaların yaklaşık %99'unu oluşturmaktadır (Akram ve ark., 2017; National Cancer Institute, 2025).

2.4. Memenin Anatomisi ve Onkogenezdeki Önemi

Meme, deriye ait yüksek derecede özelleşmiş yardımcı bezler olup, toraksın ön bölümünde ikinci ve altıncı kaburgalar arasında, pektoralis kaslarının üzerinde yer alır (Gupta ve Goyal, 2022). Memenin en dış tabakası, meme başı–areola kompleksini de içeren deridir. Derinin hemen altında, yüzeysel fasya bulunur; bu bağ dokusu tabakası, pektoralis majör kasını örten derin fasyayla birlikte meme bezini çevreleyerek memenin tabanını oluşturur (McGuire, 2016).

Memenin iç kısmında, glandüler epitel doku, fibröz stroma ve yağ dokusundan oluşan meme parankimi bulunur (McGuire, 2016). Glandüler epitel bileşeni, toplam meme hacminin yaklaşık %10–15'ini oluşturan 15 ila 20 lobdan meydana gelir. Her bir lob, asini adı verilen, meme bezinin en küçük fonksiyonel birimlerinden oluşan lobüllere

ayrılır. Bu asiniler, laktasyon sırasında süt üretiminden sorumlu sekretuar epitel hücreleri tarafından oluşturulur. Asinilerde üretilen süt, terminal kanallara boşalır; bu kanallar birleşerek daha büyük süt kanallarını ve nihayetinde laktiferöz kanalları oluşturur. Her bir laktiferöz kanal, ait olduğu lobdan çıkar ve meme ucunda sonlanır (Gupta ve Goyal, 2022) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Memenin Bileşenleri (McGuire, 2016'dan alınmıştır)

Terminal bir kanal ile ona bağlı lobülden oluşan yapıya terminal kanal-lobüül birimi (Terminal Duct Lobular Unit, İngilizce kısaltmasıyla TDLU) adı verilir ve bu yapı, çoğu meme karsinomunun başlangıç noktasıdır (Gupta ve Goyal, 2022). Kanallar, epitel hücreleriyle döşelidir; bu hücreler, sütü ileriye iterek kanallar aracılığıyla taşınmasını sağlayan miyoepitelyal hücreler tarafından çevrelenmiştir. Tüm yapı, sürekli bir bazal membran ile sarılmıştır. In situ karsinom, kanallar içinde sınırlıdır ve bu bazal membranı geçmez; membran ihlal edildiğinde lezyon, invaziv karsinom olarak sınıflandırılır (McGuire, 2016).

Kanallar, meme başı–areola kompleksinin altında genişleyerek laktiferöz sinüsleri oluşturur ve ardından meme ucundan 10 ila 15 açıklık aracılığıyla dışarı açılır. Meme kanseri tipik olarak meme başı–areola kompleksinden kaynaklanmamakla birlikte, hastalığın ileri evrelerinde bu bölgede meme başı çekilmesi gibi klinik belirtiler ortaya çıkabilir (Gupta ve Goyal, 2022; McGuire, 2016).

Memenin fibröz stroması, loblara yapısal destek sağlayan bağ dokusu bantları olan Cooper bağlarını içerir. Kanser bu bağlara infiltre olduğunda, üzerindeki deride çöküntü ya da çekilme gibi görsel değişikliklere yol açabilir (Gupta ve Goyal, 2022). Memenin geri kalan kısmı yağ dokusundan oluşur; bu doku, primer kanser gelişim yeri olmamakla birlikte, ileri evre tümörler tarafından ikincil olarak istila edilebilir.

Memenin lenfatik sistemi, kanserin yayılımında kritik bir rol oynar. Tümör hücreleri, terminal kanal-lobül birimlerinden kaynaklanan lenfatik damarlar aracılığıyla aksiller lenf nodlarına ve sternuma yakın internal meme lenf nodlarına ulaşarak yayılabilir. Bu lenfatik yayılım, hem prognozun belirlenmesinde hem de tedavi stratejilerinin planlanmasında önemli bir faktördür (Gupta ve Goyal, 2022).

Son olarak, memenin üst dış kadranı, en yoğun epitel dokuya sahip olup, bu nedenle hem iyi huylu hem de kötü huylu tümörlerin en sık görüldüğü bölgedir (McGuire, 2016).

2.5. Meme Kanserinin Sınıflandırması

Günümüzde, meme kanseri vakalarının daha hedefe yönelik tedavilerle yönetilmesi ve hastalık prognozunun iyileştirilmesi amacıyla çeşitli klinik, patolojik ve moleküler sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır.

2.5.1. Evreleme (Staging)

Evreleme, kanserin vücut içindeki yayılımını TNM sistemi ile tanımlar. Bu sistemde T, primer tümörün boyutunu; N, bölgesel lenf nodu tutulumunu; M ise uzak metastaz varlığını ifade eder (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

2.5.2. Histolojik Alt Tipler

Histolojik sınıflandırma, tümör hücrelerinin büyüme paternine dayanmaktadır. İyi huylu epitelyal proliferasyonlar ve bunların öncülleri, papillifer tümörler ile *in situ* ve invaziv formlar da dahil olmak üzere 20'den fazla farklı histolojik tip tanımlanmıştır (Tsang ve Tse, 2019; Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

Noninvaziv lezyonlar arasında, duktal karsinoma *in situ* (Ductal Carcinoma *in situ*, DCIS), çevre stromaya invazyon göstermeyen neoplastik meme epiteli hücrelerinin proliferasyonu, ve TDLU'de sınırlı kalan neoplastik hücrelerin invaziv olmayan proliferasyonu ile karakterize lobüler karsinoma *in situ* (Lobular Carcinoma *in situ*, LCIS) yer almaktadır. LCIS artık kötü huylu bir lezyon olarak sınıflandırılmamakla birlikte, önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

Öte yandan, invaziv meme karsinomları arasında en yaygın olanı, tüm invaziv meme kanserlerinin %70–80'ini oluşturan, özel bir morfolojik özellik göstermeyen invaziv duktal karsinomdur (Invasive Ductal Carcinoma- No Special Type, IDC-NST). Bu tümörler belirli histolojik alt tiplerle uyumlu özgün morfolojik özelliklere sahip değildir, bu nedenle karışık paternler içeren vakalar da bu kategoriye dahil edilir (Chaturvedi ve Sirohi, 2022). Bunu, yaklaşık %10 oranında görülen invaziv lobüler karsinom (Invasive Lobular Carcinoma, ILC) takip eder. Daha nadir görülen diğer alt tipler arasında müsinöz, papillifer, medüller ve tübüler karsinomlar bulunmaktadır (Tsang ve Tse, 2019).

2.5.3. Derecelendirme (Grading)

Tümör derecesi, kanser hücrelerinin normal meme hücrelerine ne ölçüde benzediğini ve büyüme hızlarını tanımlar. Bu, Nottingham derecelendirme sistemi ile değerlendirilir. Bu sistem; tübül oluşumu, nükleer pleomorfizm (çekirdek boyutu ve şekli varyasyonu) ve mitotik indeks gibi üç kriter üzerinden tümörlere puan verilmesini içerir. Buna göre tümörler: 1. derece veya düşük dereceli (iyi diferansiye), 2. derece veya orta dereceli (orta diferansiye) ve 3. derece veya yüksek dereceli (kötü diferansiye) olarak sınıflandırılır (Tsang ve Tse, 2019; Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

2.5.4. İmmüfenotipik Profil

Tüm meme kanseri vakalarında, östrojen reseptörleri (estrogen receptor, ER), progesteron reseptörleri (progesterone receptor, PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2) ekspresyonları değerlendirilir (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

ER ve PR, hem normal hem de neoplastik meme epitelinin büyümesini teşvik eden nükleer steroid reseptörleridir. İlgili hormonlarla bağlandıklarında aktive olarak çekirdekte DNA ile etkileşir ve hücre çoğalması ile hayatta kalma gibi süreçleri düzenleyen genlerin ekspresyonunu kontrol ederler (Lale Dogan, 2016). ER ve PR pozitifliği, bu reseptörlere bağlanan spesifik antikorlarla yapılan immünohistokimya ile belirlenir (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

HER2 ise, hücre dışı ligandlarla aktive olduğunda PI3K/Akt ve Ras/Raf/MEK/MAPK gibi hücre büyümesi, hayatta kalma ve proliferasyonla ilgili sinyal yollarını başlatır. Bu reseptörlerdeki yapısal bozukluklar, konstitutif aktivasyona ve böylece onkojenik sinyalleme yol açar (Lale Dogan, 2016). HER2 durumu, immünohistokimya ve Floresan Yerde Hibridizasyon (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) teknikleri ile belirlenir (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

ER, PR ve HER2, hem prognostik belirteçler hem de hormonal ve anti-HER2 tedavilerine yönelik öngörücü faktörlerdir. ER ve/veya PR pozitif tümörler (yaklaşık %75), genellikle daha az agresif olup hormon tedavisine iyi yanıt verir. Meme kanserlerinin yaklaşık %15'i HER2 aşırı ifadesine sahiptir; bu tümörler daha agresif olsalar da hedefe yönelik tedavilere iyi yanıt verebilir. Üç belirteci de ekspresyon göstermeyen tümörler ise üçlü negatif meme kanseri (triple-negative breast cancer, TNBC) olarak sınıflandırılır; bu alt tip, kötü prognoz ile ilişkili olup henüz etkili hedefe yönelik tedaviler bulunmamaktadır (Tsang ve Tse, 2019).

2.5.5. Moleküler/İçsel Alt Tipler

Moleküler sınıflandırma, tümörleri genetik ve gen ekspresyon profillerine göre kategorize etmeye yönelik modern bir yaklaşımdır. Klinik uygulamada bu

sınıflandırma, ER, PR, HER2 ve Ki67 (hücre proliferasyonunun biyobelirteci olan nükleer protein) gibi belirteçler aracılığıyla yaklaşık olarak yapılır (Chaturvedi ve Sirohi, 2022). Başlıca alt tipler şunlardır:

Luminal A: ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatif ve düşük Ki67 ekspresyonuna sahip tümörlerdir. Yavaş büyür, hormon tedavisine yüksek yanıt verir ve prognozu olumludur (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

Luminal B: ER pozitif, PR negatif veya pozitif, HER2 pozitif ya da negatif olabilir ve yüksek Ki67 ekspresyonuna sahiptir. Luminal A'ya göre daha agresiftir; hormon tedavisinin yanı sıra kemoterapiden de fayda görür (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

HER2-zengin: ER ve PR negatif, HER2 pozitif tümörlerdir. Yüksek proliferasyon oranına sahiptir ve prognozu agresiftir; ancak anti-HER2 tedavilere iyi yanıt verirler (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

Bazal-benzeri: Meme bezlerindeki bazal hücrelerin gen ekspresyon profiline benzerlik gösterir. ER, PR ve HER2 negatiftir; yani üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak sınıflandırılır. Genellikle yüksek derecelidir, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin olmaması nedeniyle prognozu kötüdür. Genç kadınlarda ve *BRCA1* mutasyonu taşıyan bireylerde daha sık görülür (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

Normal-benzeri: Normal meme dokusunun gen ekspresyon profiline benzerlik gösterir. Klinik önemi tam olarak anlaşılmamıştır (Chaturvedi ve Sirohi, 2022).

2.6. Risk Faktörleri ve Duyarlılık

Meme kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. İleri yaş, erken menarş, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, geç yaşta gebelik ve menopoz gibi çeşitli risk faktörleri, karsinogenez sürecini tetikleyebilir. Ayrıca, genetik temeli karmaşıktır ve duyarlılık kalıtsal ve sporadik olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu da, ailede meme kanseri öyküsünün ve genetik değişikliklerin birikiminin, meme kanserine yakalanma olasılığını önemli ölçüde artırdığı anlamına gelir (Bayraktar ve Arun., 2019).

2.6.1. Meme Kanserinde Kalıtsal Duyarlılık

Germ hattı mutasyonları, tüm meme kanseri vakalarının %10'unu oluşturur ve meme kanseri duyarlılığıyla ilişkili birçok gen tanımlanmıştır (Bayraktar ve Arun., 2019). Kalıtsal mutasyonlar, mutasyon riski ve sıklığına göre üç kategoriye ayrılır. Birinci kategori, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* ve *TP53* genlerinde görülen yüksek penetranslı ve düşük frekanslı mutasyonları içerir (Hirshfield, Rebbeck, & Levine, 2010). İkinci kategori, orta derecede penetransa ve düşük frekansa sahip olan *CHEK2*, *ATM* ve *PALB2* gibi genleri içerir. Üçüncü kategori ise, *FGFR2*, *MAP3K1* ve *TGFBI* gibi genlerdeki düşük penetranslı ve yüksek frekanslı mutasyonları içerir (Hirshfield, Rebbeck, & Levine, 2010).

BRCA1 ve *BRCA2* genleri, kalıtsal meme kanseri duyarlılığında en belirgin olanlardır ve tüm kalıtsal vakaların yaklaşık yarısından sorumludur (Bayraktar ve Arun., 2019). Bu genlerdeki mutasyonlar, DNA onarımı da dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevleri etkileyerek ek mutasyonların birikmesini ve kanser gelişimini kolaylaştırır. *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyonu taşıyan kadınların meme kanseri geliştirme riski önemli ölçüde yüksektir (Bayraktar ve Arun., 2019).

2.6.2. Meme Kanserinde Somatik Genetik Değişiklikler

Kalıtsal mutasyonlara ek olarak, somatik genetik değişiklikler bireyin yaşamı boyunca hücrelerinde edinilen değişikliklerdir. Bu değişiklikler arasında nokta mutasyonları, delesyonlar, amplifikasyonlar, yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar ve duplikasyonlar yer alır (Lale Dogan, 2016). Bu bağlamda, meme kanserinin ilerlemesinde önemli rol oynayan çeşitli genetik anormallikler tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar arasında *HER2*, *Cyclin D1* ve *WIP1* genlerinin amplifikasyonları ile *PTEN* ve *TP53* genlerinin delesyonları yer alır (Lale Dogan, 2016). Son yıllarda, *GPRC5A* geni meme kanseri patolojisinde önemli bir oyuncu olarak öne çıkmaktadır.

2.7. GPRC5A Geni ve Kanserdeki Rolü

G-protein-bağlantılı reseptör ailesi C, üyesi 5, grup A (GPRC5A) ilk olarak 1998 yılında Cheng ve arkadaşları tarafından bir insan karsinom hücre hattında tanımlanmıştır. Retinoik asite yanıt veren bir gen olarak karakterize edilmiş, bazı baş ve boyun yassı hücreli karsinomu (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) hücre hatlarında artmış ekspresyon göstermiştir. Bu nedenle retinoik asit ile indüklenen gen 1 (Retinoic Acid-induced Gene 1, RAIG1) olarak adlandırılmıştır (Cheng ve ark., 1998). Aynı zamanda retinoik asit-indüklenebilir 3 (Retinoic Acid-inducible 3, RAI3) olarak da bilinir.

GPRC5A, 12p13.1 lokasyonunda yer alır ve 357 amino asitten oluştuğu öngörülen bir guanin nükleotid-bağlayıcı protein (G protein)-bağlantılı reseptörü kodlar. Hesaplanan moleküler ağırlığı 40.256 Da'dır. Protein, GPCR reseptörlerinin ayırt edici özelliği olan yedi alfa-sarmal transmembran bölgesi içerir (Cheng ve ark., 1998). Amino asit dizilimine göre bu gen ürünü, aile C GPCR'lerin RAIG1 alt ailesine ait olan *GPRC5A*, *GPRC5B*, *GPRC5C* ve *GPRC5D* reseptörleri ile gruplandırılmıştır. *GPRC5A*, ligandı veya işlevi bilinmediğinden yetim GPCR reseptörü olarak sınıflandırılmıştır (Nagahata ve ark., 2005).

Çeşitli çalışmalar, *GPRC5A*'nın akciğer, karaciğer, mide, meme ve kolon tümörleri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin gelişiminde rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmalardan bazıları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

İnsan akciğer tümörlerinde bu genin ekspresyon seviyesi düşüktür ve tümör baskılayıcı bir rol sergiler (Tao ve ark., 2007; Kadara ve ark., 2010). Akciğer kanserinin aksine, mide kanseri (Cheng ve ark., 2012), hepatoselüler karsinom (Zheng ve ark., 2014) ve kolorektal kanserde (Zhang ve ark., 2017) *GPRC5A*'nın aşırı ifadesi bildirilmiş ve bu durumlarda onkojenik bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Meme kanseri açısından ise manzara çeşitlidir. Bazı çalışmalar *GPRC5A*'nın kanser hücre hatlarında ve tümörlerde düzensiz şekilde ifade edildiğini gözlemlemiş, bu da genin kanser progresyonuna katılımını düşündürmektedir.

Çizelge 2.1. İnsan kanserlerinde GPRC5A'nın düzensizliği (Jiang ve ark., 2018'den alınmıştır)

BC: Meme kanseri; LC: Akciğer kanseri; GC: Mide kanseri; NBE: Normal bronş epiteli; COPD: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı; NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri; OSCC: Oral skuamöz hücreli karsinom; ICC: İntrahepatik kolanjiyokarsinom; CC: Kolon kanseri; CRC: Kolorektal kanser; HCC: Hepatosellüler karsinom; PDAC: Pankreatik duktal adenokarsinom; HNSCC: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom; qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı PCR; CPA: Kanser profillemeye dizisi; IHC: İmmünohistokimya; LC-MS/MS: Tandem kütle spektrometrisi ile sıvı kromatografisi; WB: Western blot; DFS: Hastalıksız sağkalım; OS: Genel sağkalım

Çalışma	Yıl	Tümör tipi	Analiz edilen örnek türü/sayısı	Yöntemler	Ekspresyon Durumu
Nagahata, T.	2005	BC	Analiz edilen örneklerin türü/sayısı	qRT-PCR	yüksek
Tao, Q.	2007	LC	25 birincil BC dokusu	qRT-PCR; Microarray	düşük
Dairkee, S. H.	2009	BC	18 çift insan LC dokusu ve bitişik normal dokular; 186 LC dokusu ve 17 normal akciğer dokusu ile mikroarray	CPA; IHC	yüksek
Cheng, L.	2012	GC	Eşleşmiş BC ve normal meme dokularından 50 çift cDNA; 147 invaziv BC ve 44 normal meme dokusu	Microarray; qRT-PCR	düşük
Fujimoto, J.	2012	NSCLC	25 eşleştirilmiş GC dokusu ve bitişik tümör olmayan dokular	Microarray; qRT-PCR	düşük
Liu, S. L.	2013	OSCC	31 NBE, 24 KOAH, kanserli 26 KOAH ve 474 NSCLC dokusu; 6 NSCLC ve eşleşmiş normal akciğer dokusu	IHC	düşük
Subrungruang, I.	2013	ICC	60 birincil OSCC ve bitişik normal örnek çifti	Microarray; qRT-PCR	yüksek
Zougman, A.	2013	CC	18 ICC ve eşleşmiş normal doku çifti	Microarray	yüksek
Kume, H.	2014	CRC	347 CC örneği	LC-MS/MS	yüksek
Lin, X.	2014	NSCLC	33 birincil CRC ve 16 kolon polipi	IHC	düşük
Sokolenko, A. P.	2014	BC	129 NSCLC ve bitişik normal doku çifti	qRT-PCR	BRCA1 mutasyonu örneklerinde düşük
Zheng, J.	2014	HCC	17 BRCA1 mutasyonlu ve 94 BRCA1 mutasyonsuz BC dokusu	qRT-PCR; WB; IHC	yüksek
Liu, H.	2016	GC	106 HCC	qRT-PCR; WB; IHC	yüksek
Zhou, H.	2016	Pancreatic cancer	30 GC ve bitişik normal doku çifti; 106 GC örneği	Microarray; IHC	yüksek
Jahny, E.	2017	PDAC	46 normal pankreas dokusu, 145 birincil pankreas tümörü ve 61 metastatik tümör; 203 pankreas tümör örneği	Microarray	yüksek
Liu, S.	2017	HNSCC	435 PDAC ve 209 kansersiz pankreas dokusu	IHC	düşük
Zhang, L.	2017	CRC	86 HNSCC ve bitişik normal doku çifti	qRT-PCR	yüksek

Nagahata ve ark. (2005), GPRC5A'nın meme tümörlerinde sıklıkla regülasyonunun arttığını ve özellikle cerrahi sonrası 5 yıl içinde hayatını kaybetmiş hastalarda ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, RNAi yöntemi ile endojen GPRC5A bastırıldığında bu genin hücre proliferasyonunda hayati bir rol oynadığı belirlenmiştir.

Buna karşılık, daha sonraki çalışmalar GPRC5A'nın meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı rol oynadığını ileri sürmüştür. Yang ve ark. (2016), MDA-MB-231 hücrelerinde GPRC5A'nın, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşmasını düzenleyen epidermal büyüme faktörü reseptörünü (epidermal growth factor receptor, EGFR) baskıladığını gözlemlemiştir. GPRC5A susturulduğunda, EGF (epidermal growth factor) ile uyarılmış EGFR aktivasyonu ve aşağı yönlü sinyal yolları artmış; bu durum koloni oluşumu, hücre büyümesi, göç ve invazyon yeteneğini artırmıştır.

Bu çalışmayı destekleyen başka bir çalışmada, Yang ve ark. (2021), GPRC5A ekspresyonunun kültürlenmiş meme kanseri hücrelerinde epitel hücrelere kıyasla azaldığını ve GPRC5A'nın aşırı ekspresyonunun, hücre içi yolları aktive ederek hücre apoptozunu indüklemek suretiyle tümör büyümesini baskıladığını göstermiştir. Bu da GPRC5A'nın koruyucu bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Rus nüfusu üzerinde yapılan bir çalışmada *GPRC5A* geninde c.183delG olarak adlandırılan bir germ hattı mutasyonunun tekrarlayan varlığı tespit edilmiştir. Bu alel, *BRCA1* 5382insC mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında, *BRCA1*'i yabancıl tip olanlara göre on kat daha fazla görülmüştür. Bu mutant alelin tek başına meme kanserine yatkınlık oluşturmadığı, ancak *BRCA1* mutasyonu taşıyan bireylerde hastalık duyarlılığını değiştirebileceği öne sürülmüştür; çünkü *BRCA1* ve *GPRC5A* ekspresyonları mRNA düzeyinde korelasyon göstermekte ve bu genlerin transkripsiyonel düzeyde etkileşim içinde olduğu ortaya konmuştur (Sokolenko ve ark., 2014).

2.8. GPRC5A Ekspresyonunun Regülasyonu

GPCR'ler birçok sinyal iletim yolunu aktive eder ve bu nedenle hücre büyümesi ve farklılaşması gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesinde temel rol oynar. Bu nedenle, düzenleyici mekanizmaları çeşitlidir ve ligand mevcudiyeti, diğer düzenleyici proteinlerle etkileşim ve gen ekspresyonunun modülasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır (Jiang ve ark., 2018).

2.9. GPRC5A'nın Transkripsiyonel Düzenlemesi

GPRC5A için çeşitli düzenleyici mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunlardan en çok çalışılanı, genin *RAIGI* olarak adlandırılmasına neden olan retinoik aside yanıtıdır (Jiang ve ark., 2018). A vitamini türevi olan retinoik asit, gen ekspresyonunu doğrudan indükler. Bu mekanizma, retinoik asit reseptörü (RAR) ve retinoid X reseptörü (RXR) adı verilen nükleer reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörler, genin promotör bölgesinde bulunan DR5III yanıt elementine bağlanır. Retinoik asit yokken RAR/RXR heterodimeri transkripsiyon baskılayıcısı gibi davranırken, retinoik asit bağlandığında kompleks dağılır ve transkripsiyon başlar (Ye ve ark., 2009).

GPRC5A, aynı zamanda siklik adenozin monofosfat (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) sinyalleme ile de transkripsiyonel olarak indüklenir. Çünkü genin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın bir cAMP-yanıt element (cAMP-responsive element, CRE) motifi bulunur. *GPRC5A*'nın, cAMP seviyelerindeki artışa bağlı olarak regülasyonunun artması, insan aort düz kas hücrelerinde retinoik asitle sinerjik bir şekilde dahi gözlemlenmiştir (Hirano ve ark., 2006).

Ek olarak, Wu ve ark. (2005), *GPRC5A*'nın tümör baskılayıcı işlevi olan bir transkripsiyon faktörü olan p53'ün transkripsiyonel hedefi olduğunu belirlemiştir. Çalışmalarında, *GPRC5A* ekspresyonunun, p53'ün geninin 5' bölgesine spesifik olarak bağlanmasıyla düzenlendiği ve bu bölgede dört farklı p53 bağlanma dizisi tespit edildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, p53 *GPRC5A*'yı baskılayan bir faktör gibi davranmakta ve ekspresyonunu sınırlamaktadır. Ancak, östrojen reseptörü-negatif ve sıklıkla mutant p53

içeren meme kanseri hücrelerinde GPRC5A aşırı ifade edilirken; yabancı tip p53 içeren östrojen reseptörü-pozitif hücrelerde ekspresyon seviyesi düşüktür.

2.10. GPRC5A'nın Transkripsiyon Sonrası Düzenlemesi

Transkripsiyon sonrası düzenleme açısından, mevcut bilgi sınırlıdır. Ancak, moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemelerle birlikte çeşitli mekanizmalar aydınlatılmıştır (Jiang ve ark., 2018).

2.10.1. GPRC5A'nın RNA bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenmesi

Zhou ve ark. (2016), pankreas kanseri hücrelerinde yaptıkları deneylerle, GPRC5A'nın ELAV-benzeri protein 1 (aynı zamanda insan antijeni R veya HuR olarak da bilinir) adlı RNA bağlayıcı protein tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Gemcitabin (bir kemoterapi ilacı) düşük konsantrasyonlarında, HuR'un GPRC5A mRNA'sının 3'-UTR bölgesine bağlanarak mRNA'nın stabilitesini artırdığı ve böylece protein seviyelerini yükselttiği gözlemlenmiştir. GPRC5A veya HuR'un inhibisyonu, pankreas kanseri hücrelerini gemcitabine karşı daha duyarlı hale getirmiştir; bu da bu moleküllerin kemoterapi direncini artırmadaki rollerini vurgulamaktadır.

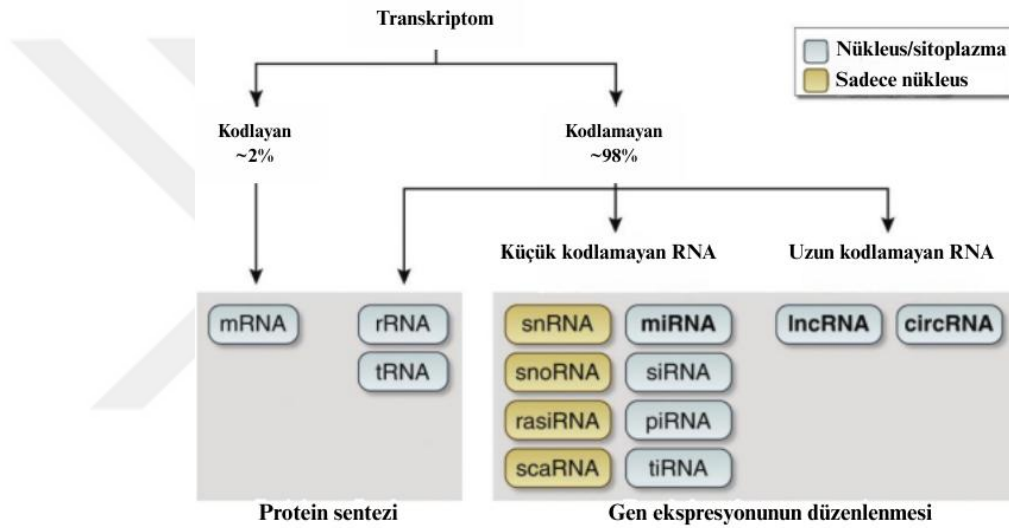
Bunun ötesinde, moleküler biyolojideki son gelişmeler, GPRC5A ekspresyonunun yalnızca proteinler tarafından değil, aynı zamanda kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) tarafından da büyük ölçüde düzenlendiğini ortaya koymuştur.

2.10.2. Kodlamayan RNA'lar ve GPRC5A'nın düzenleyicileri olarak rolleri

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), proteinlere çevrilmeyen transkripsiyonel ürünlerdir ve çeşitli biyogenez, boyut, şekil ve fonksiyon spektrumuna sahiptirler (Chen & Kim, 2024). İnsan genomunun yaklaşık %75'i RNA'ya transkribe edilirken, sadece yaklaşık %2'si protein kodlayan mRNA'ya transkribe edilir; bu nedenle, geri kalan kısmı kodlamayan RNA'lardan oluşur (Yan & Bu, 2021).

Kodlamayan RNA'lar, çeviri sürecine dahil olan transfer RNA'lar (tRNA'lar) ve ribozomal RNA'lar (rRNA'lar) gibi uzun süredir bilinen RNA sınıflarını, ekleme

olaylarında görev alan küçük nükleer RNA'ları (snRNA'lar) ve diğer küçük RNA'ların modifikasyonunda yer alan küçük nükleolar RNA'ları (snoRNA'lar) içerir (Hombach & Kretz, 2016). Ayrıca, birkaç kısa ve uzun düzenleyici kodlamayan RNA sınıfı keşfedilmiştir. Bunlar arasında piwi ile etkileşen RNA'lar (piRNA'lar), küçük Cajal cisimciği-spesifik RNA'lar (scaRNA'lar), tekrar ile ilişkili küçük girişimci RNA'lar (rasiRNA'lar), transfer RNA-türevli stresle indüklenen küçük RNA'lar (tiRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük girişimci RNA'lar (siRNA'lar), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve dairesel RNA'lar (circRNA'lar) bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Hombach & Kretz, 2016; Brandenburger ve ark., 2018).



Şekil 2.2. RNA moleküllerinin moleküler boyut, şekil, fonksiyon ve lokalizasyona göre sınıflandırılması (Brandenburger ve ark., 2018'den alınmıştır).

Kodlamayan RNA'lar, RNA olgunlaşması, transkripsiyonun düzenlenmesi, kromatin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyon sonrası RNA modifikasyonları gibi çeşitli süreçlerde rol oynarlar (Panni ve ark., 2020). Özellikle, birçok kodlamayan RNA'nın anormal ekspresyonu, agresif patolojilerle ilişkilendirilmiştir (Panni ve ark., 2020).

Kodlamayan RNA'ların çeşitli patolojilerin gelişimindeki düzensizliğinin iyi bilinen rolü göz önüne alındığında, kanser alanında kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. GPRC5A, kodlamayan RNA'ların düzenleyici mekanizmalarının çeşitli kanser türlerinde incelendiği genlerden biridir. Bunlar arasında, miRNA'lar ve circRNA'lar, en kapsamlı şekilde incelenen moleküller olarak öne çıkmıştır.

2.11. MikroRNA'lar

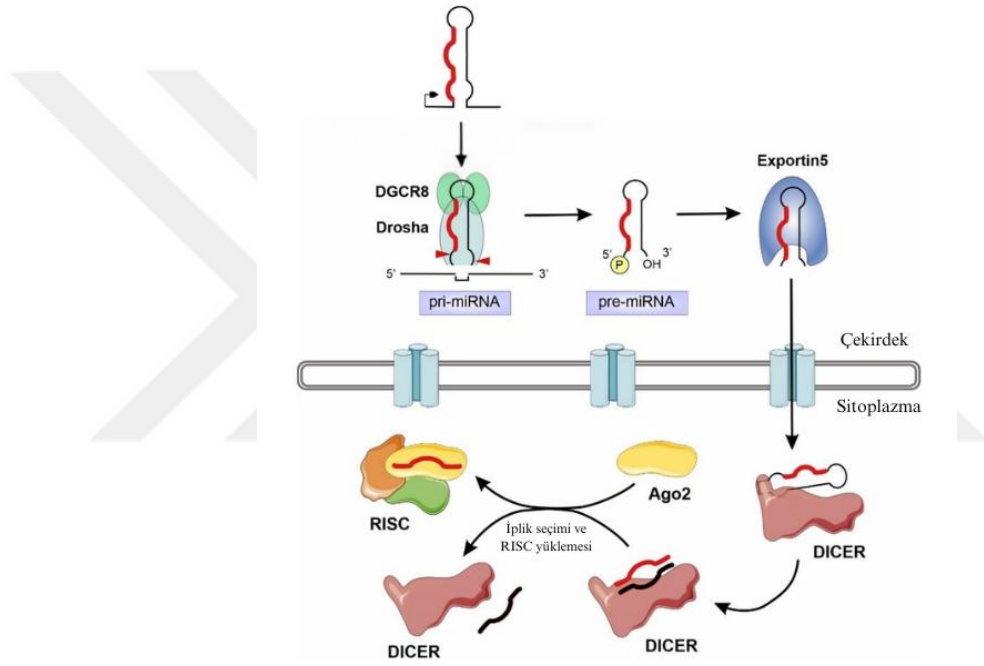
MikroRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan küçük, kodlamayan RNA'lardır ve protein kodlayan genlerin mRNA'ları ile eşleşerek gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesine katılırlar (Felekis ve ark., 2010). Baz eşleşmesine dayanan bu düzenleyici mekanizma, miRNA'nın 5' tohum dizisi olarak bilinen bölgesini kullanır ve bu bölge, çeşitli hedef mRNA'ları tanıyarak onların baskılanmasını sağlar (Komatsu ve ark., 2023).

LncRNA'lar biyosentezinden farklı olarak, ki bu süreç transkripsiyon ve RNA olgunlaşması için ortak hücrel mekanizmalara bağlıdır, miRNA biyogenezi, tanımlı transkripsiyon birimlerinden küçük düzenleyici RNA'ları oluşturan özgül nükleazlardan oluşan bir grup tarafından gerçekleştirilir (Leitão ve ark., 2022).

2.11.1. MikroRNA biyogenezinin mekanizmaları

MikroRNA'lar, miRNA üretim bilgilerini içeren özgül DNA bölgelerinin çekirdekte transkripsiyonu ile başlayan bir dizi işlemle işlenirler. Bu bölgeler, kodlayan ve kodlamayan genlerin yanı sıra intergenik alanları da içerebilir (Leitão ve ark., 2022). Transkripsiyon birimleri RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir ve ortaya çıkan transkriptler, primer miRNA (pri-miRNA) olarak bilinen karakteristik saç tokası (hairpin) yapılar oluşturacak şekilde kendi üzerine katlanır (Bartel, 2009; Leitão ve ark., 2022). Pri-miRNA içindeki saç tokası yapısı, endonükleaz DROSHA ve yardımcı proteini DGCR8'ten oluşan Mikroişlemci (Microprocessor) kompleksi tarafından tanınır ve kesilir (Gregory ve ark., 2004). Bu kesim işlemi, saç tokası şeklindeki öncül miRNA'yı (pre-miRNA) oluşturur ve bu yapı daha sonra taşıyıcı protein Exportin-5 (XPO5) aracılığıyla nükleer porlardan sitoplazmaya taşınır (Komatsu ve ark., 2023). Sitoplazmada, pre-miRNA'lar endonükleaz DICER ve yardımcı proteini TRBP tarafından daha fazla işlenerek çift sarmallı RNA duplesi oluşturur (Bofill-De Ros ve ark., 2024). Bu miRNA duplesi daha sonra Argonaute (AGO) proteinlerine yüklenir. Yüklendikten sonra, yalnızca bir iplik (rehber iplik olarak adlandırılır) komplekste tutulurken, diğer iplik (yolcu iplik olarak adlandırılır) kompleks dışına bırakılır ve yıkıma uğrar (Medley ve ark., 2021).

Rehber ipliğin tutulması, 5' ucundaki nükleotid ile AGO proteinlerinin bir domeni arasındaki etkileşimle sağlanır ve bu ipliğin seçimi, 5' nükleotidinin doğası ile miRNA dupleksinin iki ucundaki göreceli termodinamik stabiliteye bağlıdır. Genellikle 5'-uridin veya 5'-adenin ile başlayan ve 5' ucu daha az stabil olan iplikler tercih edilir (Komatsu ve ark., 2023). Duplekslerden ya 5' ucuna yakın olan ya da 3' ucuna yakın olan ipliğin seçilmesiyle sırasıyla 5p ve 3p miRNA'lar oluşur. Bu süreç, olgun bir miRNA'nın ve AGO-miRNA kompleksinin, yani miRNA kaynaklı susturma kompleksinin (miRISC) oluşumuyla sonuçlanır (Şekil 2.3) (Bofill-De Ros ve ark., 2024).



Şekil 2.3. MiRNA biyogenez yolunun şematik gösterimi (Leitão ve ark., 2021'den alınmıştır)

2.11.2. MiRNA'ların hedef etkileşimi ve düzenleyici fonksiyonu

Olgun miRNA, RISC kompleksinin içinde, "tohum (seed) dizisi" aracılığıyla miRNA yanıt elemanları (MRE'ler) içeren hedef mRNA'lara bağlanır; bu tohum dizisi, olgun miRNA'nın 2-8 nükleotidlerini içerir (Şekil 2.4). Hedef tanıma için böyle kısa tohum dizilerine dayanıldığından, bir miRNA birden fazla geni düzenleyebilir ve tam tersi olarak, bir gen birden fazla miRNA tarafından hedef alınabilir. Özellikle, mRNA'ların

3'-transle olmayan bölgeleri (3'-UTR'ler) genellikle birden fazla miRNA bağlanma bölgesi içerir ve çoğu etkileşim bu bölgede meydana gelir; ancak miRNA-hedef etkileşimleri, transkriptin tamamı üzerinde de tespit edilebilir (Komatsu ve ark., 2023).

Ayrıca, RNA topolojisi miRNA aracılı düzenlemenin etkinliğini etkileyebilir, çünkü bireysel miRNA bağlanma bölgeleri, içsel RNA yapıları veya RNA bağlayıcı proteinler tarafından maskelenebilir. Sonuç olarak, miRISC kompleksi, miRNA-hedef baz çiftleşme etkileşiminin yapısal yeniden düzenlemeleri tarafından yönlendirilen yapısal değişiklikler geçirebilir (Bofill-De Ros ve ark., 2024).

Bundan sonra, trinükleotid tekrar içeren gen 6 protein ailesi (Trinucleotide Repeat-Containing 6, TNRC6), AGO'nun bir domenine bağlanarak, poly(A)-nükleaz (PAN) ve CCR4–NOT kompleksini çekerek mRNA'nın poly(A) kuyruğunun kısalmasını teşvik eder. Bu durum mRNA'nın kararsızlaşmasına ve 5' uçtan degradasyonuna yol açar. TNRC6 ayrıca, translayon başlatma faktörü eIF4E ile etkileşerek translayon başlatmasını engelleyen DDX6 gibi diğer proteinlerin alımına da katkıda bulunur, böylece hedef baskılamayı daha da artırır (Bofill-De Ros ve ark., 2024).

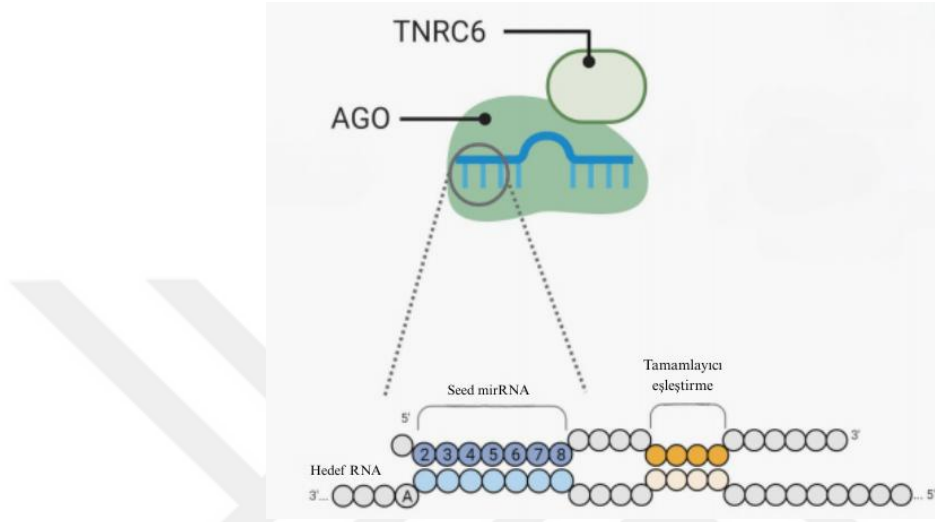
Bu şekilde, miRNA'lar mRNA'yı parçalayarak veya translayonu baskılayarak kanser dahil çeşitli patolojileri düzenler (Yan & Bu, 2021).

2.11.3. MiRNA'lar ile GPRC5A'nın düzenlenmesi ve kanserle ilişkisi

Son yıllarda, birkaç miRNA'nın GPRC5A geninin önemli post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak tanımlandığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin, GPRC5A'nın tümör baskılayıcı veya onkogenik fonksiyonunu farklı dokularda etkileyerek kanserli patolojilerin gelişimi ve ilerlemesine katkı sağladığı belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2018).

Pankreas kanseri hücre hatlarında, miR-103a-3p, GPRC5A mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini düşürerek bu miRNA tarafından yapılan post-transkripsiyonel düzenlemeye dair ilk ipuçlarını sunmuştur (Zhou ve Rigoutsos, 2014). Diğer bir çalışmada, miR-204'ün mide kanserinde düşük ifade gösterdiği ve aşırı ekspresyonunun

mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve GPRC5A ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur. Bu, miR-204'ün potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü öne sürmektedir (Shrestha ve ark., 2018).



Şekil 2.4. MiRNA: Hedef tanıma (Bofill-De Ros ve ark., 2024'ten alınmıştır)

Ayrıca, Liang ve ark. (2019), mide kanserinde miR-195'in düşük ekspresyonunu tespit etmiş ve düşük ekspresyonun kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu belirtmiştir; özellikle ileri TNM aşamalarındaki hastalar, kötü hücre farklılaşması ve lenf nodu metastazları göstermiştir. Bu bulgular, miR-195'in mide kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gösterebileceğini belirtmektedir.

Bu miRNA'lar tarafından *GPRC5A*'nın doğrudan düzenlenmesinin ötesinde, bahsedilen son araştırma, miRNA aktivitesinin ana düzenleyicileri olan circRNA'ları içeren ek bir epigenetik düzenleme katmanını dahil etmiştir ve bu durum, dolayısıyla *GPRC5A*'nın post-transkripsiyonel kontrolünü etkilemektedir (Liang ve ark., 2019).

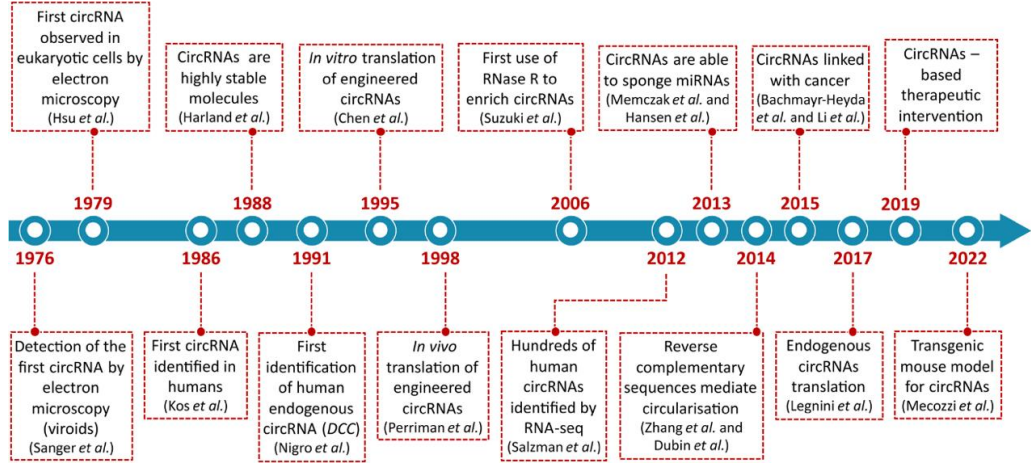
2.12. Dairesel RNA'lar

Dairesel RNA'lar (circRNA), serbest 3' veya 5' uçları ve poliadenile kuyrukları bulunmayan, kovalent olarak kapalı sürekli bir halkadan oluşan, uzun, kodlama yapmayan, tek sarmallı RNA molekülleridir. 3' ve 5' uçlarının birleştirilmesi sonucu 5'–3' polaritesi ortadan kalkar (Eger ve ark., 2018). Bu kovalent olarak kapalı yapıları sayesinde, circRNA'lar sitoplazmada son derece kararlıdır. 5' CAP ve 3' poli-A kuyruklarının olmaması, onları 3'–5' ekzonükleaz aktivitesine sahip ve neredeyse tüm lineer RNA türlerini etkili bir şekilde parçalayan RNase R enzimine karşı dirençli hale getirir (Meng ve ark., 2017). Ayrıca, lineer RNA'lara kıyasla 48 saatten fazla yarı ömre sahip olup, dokuya özgü ekspresyon paternleri sergilemektedirler (Xia ve ark., 2017; Mehta ve ark., 2020).

2.12.1. Dairesel RNA'ların tarihsel gelişimi

Dairesel RNA'ların önemli biyolojik roller üstlenen ve çeşitli fenotiplerle ilişkili moleküller olarak keşfi ve tanımlanması yaklaşık 50 yıllık bir süreci kapsamaktadır (Şekil 2.5). Tek sarmallı RNA moleküllerinin daireselleşmesi ilk kez 1976 yılında, Sanger ve çalışma arkadaşlarının bitkilerde kovalent olarak kapalı yapılar halinde bulunan viroidlerin varlığını bildirmesiyle tanımlanmıştır; bu durum dairesel RNA'ların bilinen ilk örneğini oluşturur (Sanger ve ark., 1976). Birkaç yıl sonra, elektron mikroskobu ile HeLa ökaryotik hücrelerinde benzer yapılar gözlemlenmiş, ancak kökenleri ve işlevleri henüz tanımlanamamıştır (Hsu ve ark., 1979). Ayrıca hepatit delta virüsünün (HDV) dairesel tek sarmallı RNA genomu gibi farklı türlerde başka dairesel RNA tipleri de tanımlanmıştır (Kos ve ark., 1986). Ancak uzun yıllar boyunca, circRNA'ların esas olarak hatalı kesilme (splicing) olaylarının, transkripsiyonel gürültülerin veya gen yeniden düzenlenmelerinin yan ürünleri olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle işlevsel olmayan “gereksiz” RNA olarak kabul edilmişlerdir (Kristensen ve ark., 2019).

1991 yılında, insanlarda DCC genine ait transkriptlerin kanonik lineer dizilerle karşılaştırıldığında karışık diziler içermesi, bu fenomenin dairesel RNA oluşumuyla ilişkilendirilmesine yol açmıştır (Kristensen ve ark., 2019).



Şekil 2.5. circRNA'ların keşfi, araştırılması ve gelişimine dair zaman çizelgesi (Pisignano ve ark., 2023'ten alınmıştır).

Bu anormal kesilme olayına dair önerilen mekanizma, öncül mRNA'nın kıvrılarak bir halka yapısı oluşturmasını ve böylece ardışık olmayan ekzonların birleşmesini içermektedir. Bazı durumlarda, bu birleşme sonucu dairesel bir RNA molekülü oluşabilir (Nigro ve ark., 1991). Ayrıca, Sry geni tarafından kodlanan bir dairesel RNA'nın, fare embriyogenezinde cinsiyet belirlemesinden sorumlu molekül olarak tanımlanması, dairesel RNA'ların organizmalarda işlevsel roller üstlenebileceği fikrini daha da güçlendirmiştir. Bu da doğrusal olmayan kesilmenin sadece izole bir hata değil, düzenlenmiş bir hücrel mekanizmanın parçası olduğunu göstermektedir (Nigro ve ark., 1991; Capel ve ark., 1993).

Son yıllarda transkriptomik teknolojilerinin, özellikle circRNA'lara özgü biyoinformatik araçlarla birlikte yüksek verimli RNA dizileme (RNA-seq) tekniklerinin, gelişmesiyle birlikte, dairesel RNA'ların daha iyi tanımlanması mümkün olmuştur (Kristensen ve ark., 2019). Günümüzde, circRNA'ların mantarlar, protistler, bitkiler, solucanlar, balıklar, böcekler ve memeliler dâhil olmak üzere çeşitli canlı türlerinde yaygın olarak bulunduğu ve birçok potansiyel işlev üstlendikleri gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2022).

2.12.2. Sınıflandırma ve hücrel lokalizasyon

Buna ek olarak, circRNA'lar kökenlerine göre üç ana gruba ayrılabilir: yalnızca ekzonlardan türeyenler (ecircRNA'lar), yalnızca intronlardan türeyenler (ciRNA'lar) ve ekzon-intron kombinasyonlarından türeyenler (EIciRNA'lar) (Zhao ve ark., 2022; Kristensen ve ark., 2019; Pandey ve ark., 2020).

Çoğu dairesel RNA, ekzon kökenlidir ve yüksek oranda korunmuştur (Mehta ve ark., 2020). Tek bir dairesel RNA'nın içerebileceği ekzon sayısı bir ile beş arasında değişebilir; en yaygın olanları iki veya üç ekzon içerenlerdir. Bazı durumlarda, bu ekzonlar arasında bulunan intron bölgeleri dairesel yapının içinde kısmen veya tamamen yer alabilir (Eger ve ark., 2018).

Ayrıca, yalnızca ekzon kökenli dairesel RNA'lar (EcircRNA'lar) büyük ölçüde sitoplazmada bulunurken, intron kökenli ve ekzon-intron dairesel RNA'lar (ciRNA'lar) esas olarak çekirdekte tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2022).

2.12.3. Dairesel RNA'ların biyogenezi

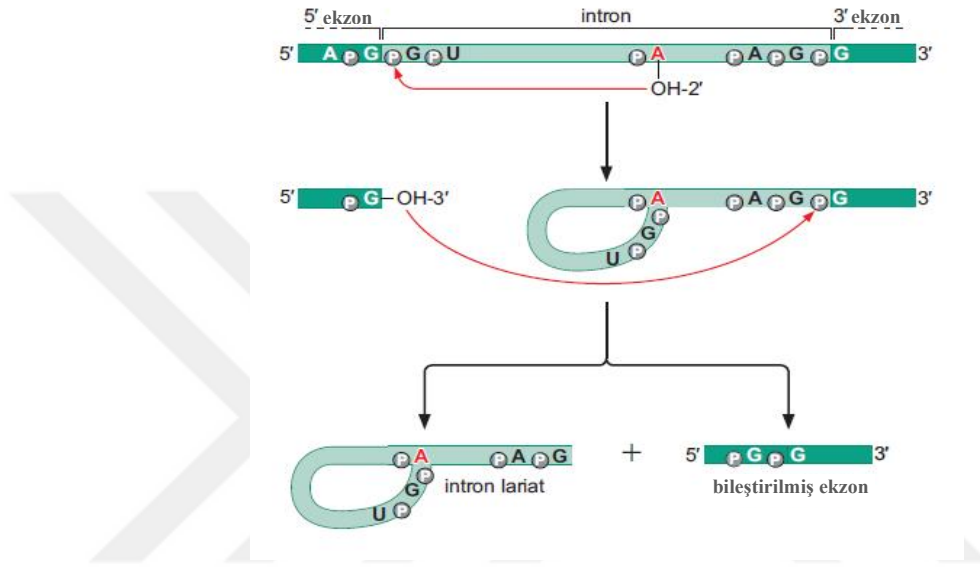
Normal fizyolojik koşullar altında, bir protein kodlayan gen transkribe edildiğinde oluşan öncül mRNA (pre-mRNA), intronların çıkarıldığı ve bitişik ekzonların birleştirilerek olgun bir mRNA oluşturduğu kanonik bir ekleme işlemine (splicing) uğrar (Mehta ve ark., 2020). Buna karşılık, dairesel RNA'lar, transkriptin yeniden düzenlenmesini içeren ve kovalent olarak kapalı dairesel bir molekül oluşturan, geleneksel lineer splicing işleminden farklı bir mekanizma ile üretilir (Mehta ve ark., 2020).

Kanonik RNA splicing

Pre-mRNA'larda ekzon-intron sınırları, intronun 5' ucunda bulunan 5' splicing bölgesi (verici) ve 3' ucunda bulunan 3' splicing bölgesi (alıcı) ile tanımlanır. İtronun 3' ucuna yakın bir yerde dallanma noktası (branch point) ve onu izleyen bir polipirimidin dizisi bulunur (Watson ve ark., 2008).

İtronun çıkarılması, ardışık iki transesterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleşir. İlk

reaksiyon, dallanma noktasındaki korunan bir adenin nükleotidinin 2'-OH grubu tarafından başlatılır; bu grup nükleofilik olarak 5' splicing bölgesindeki GU dizisine saldırır. Bu, ekzon ile intron arasındaki fosfodiester bağı kırar. Serbest kalan intronun 5' ucu daha sonra dallanma noktasındaki adenine bağlanarak yeni bir fosfodiester bağıyla üçlü bir yapı oluşturur. İkinci reaksiyonda 5' ve 3' ekzonlar birleşir ve intron lariat yapısında dışarı atılır (Şekil 2.6) (Watson ve ark., 2008).



Şekil 2.6. Kanonik splicing işlemi (Watson ve ark., 2008'den alınmıştır)

Kanonik olmayan splicing: Backsplicing ve dairesel RNA oluşumu

Dairesel RNA'lar, aynı transkript içinde yer alan bir aşağı yönlü 3' ek-donor bölgesinin yukarı yönlü bir 5' ek-kabul bölgesiyle kovalent olarak bağlandığı, backsplicing olarak bilinen kanonik olmayan bir alternatif ekleme (splicing) biçimi aracılığıyla üretilir (Eger ve ark., 2018; Kristensen ve ark., 2019). Bu süreç, genetik dizilimle karşılaştırıldığında ekzonların ters ya da karışık bir sırayla düzenlenmesiyle sonuçlanır (Eger ve ark., 2018). Backsplicing, bir alternatif ekleme türü olarak kabul edilse de, doğrusal alternatif eklemeden farklı bir moleküler mekanizma ile işler (Kristensen ve ark., 2019).

2.12.4. Dairesel RNA biyogenezinin mekanizmaları

Bugüne kadar geri-splicing'i başlatan üç ana mekanizma tanımlanmıştır: lariat-yönelimli daireselleşme (ekzon atlama), intron eşleşmesine dayalı daireselleşme ve RNA bağlayıcı protein (RBP) aracılı daireselleşme (Pisignano ve ark., 2023).

Lariat-yönelimli daireselleşme (ekzon atlama)

Pre-mRNA'lar klasik GU/AG alternatif splicing'e uğradığında ve ekzon atlaması gerçekleştiğinde, atlanan ekzonları ve intronları içeren ara bir lariat yapısı ile eksik ekzonlara sahip bir mRNA oluşur (Pisignano ve ark., 2023). Bu lariatın oluşumu geri-splicing'e yol açabilir; intronlar çıkarıldıktan sonra sadece ekzon içeren bir dairesel RNA (ecircRNA) ya da ekzon ve intron içeren bir EIciRNA oluşabilir (Kristensen ve ark., 2019; Mehta ve ark., 2020).

Bu süreç ayrıca intronik dairesel RNA'ların (ciRNA'lar) oluşmasına da yol açabilir. Lariat yapıları normalde debranching enzimi tarafından doğrusal hale getirilip parçalanır; ancak, bazıları 5' splicing bölgesinde korunan bir GU-zengin motif ve 3' uçta C-zengin bir motif içerdiğinde, bu yapı parçalanmadan kalarak dairesel bir forma geçebilir (Pisignano ve ark., 2023) (Şekil 2.7a).

İntron eşleşmesine dayalı daireselleşme

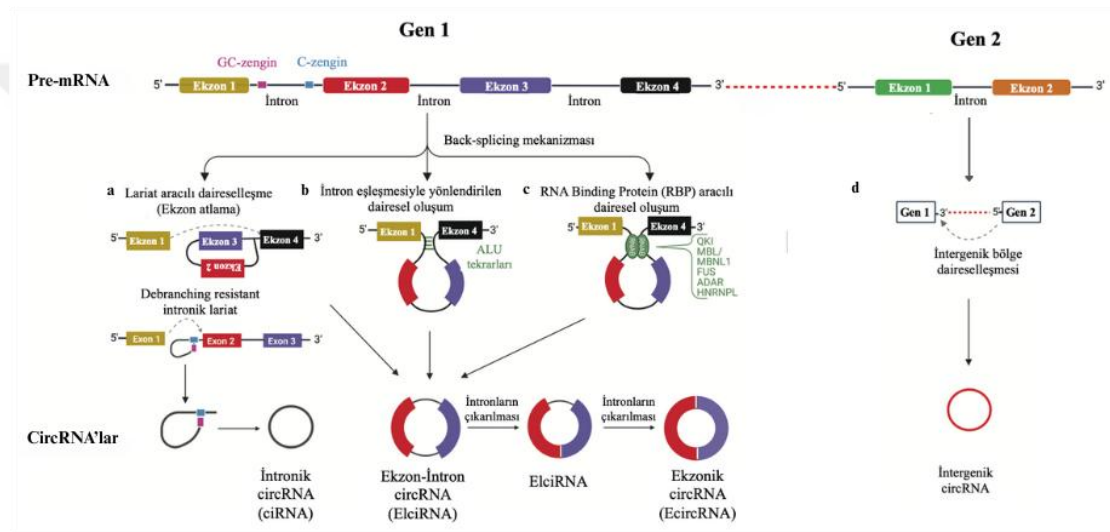
Bu mekanizma, daireselleşecek ekzonların etrafındaki intronlarda bulunan tamamlayıcı dizilerin, transkripte saç tokası benzeri RNA yapıları oluşturmasını sağlar (Zhao ve ark., 2022). Bu yapı, 5' verici ve 3' alıcı bölgelerini birbirine yaklaştırarak geri-splicing'i kolaylaştırır ve bir ecircRNA oluşur. Bu mekanizmaya dahil olan dizilere ters tamamlayıcı eşleşmeler (RCM'ler) denir ve Alu elementleri gibi diziler içerir (Pisignano ve ark., 2023). Bu mekanizma özellikle ecircRNA oluşumunda yaygındır (Zhao ve ark., 2022) (Şekil 2.7b).

RNA bağlayıcı protein (RBP) aracılı daireselleşme

Bazı koşullarda RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), daireselleşme sürecini düzenleyebilir. RBP'ler, intronik dizilerdeki tanıdıkları motiflere bağlanarak splicing

bölgelerini yakınlştırır ve dairesel RNA oluşumunu teşvik eder (Zhao ve ark., 2022). Önemli örnekler arasında Quaking (QKI) ve muscleblind (MBL/MBNL1) proteinleri yer alır (Pisignano ve ark., 2023). Bu mekanizma, hem ecircRNA hem de EiciRNA üretiminde etkilidir (Pandey ve ark., 2020) (Şekil 2.7c).

Ayrıca yakın zamanda intergenik dairesel RNA'ların varlığı ortaya konmuştur. Bu RNA'lar, GT-AG ya da CT-AC splicing sinyalleriyle çevrelenmiş intronik fragmanların birleşmesiyle oluşur. Ancak işlevleri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur (Pisignano ve ark., 2023) (Şekil 2.7d).



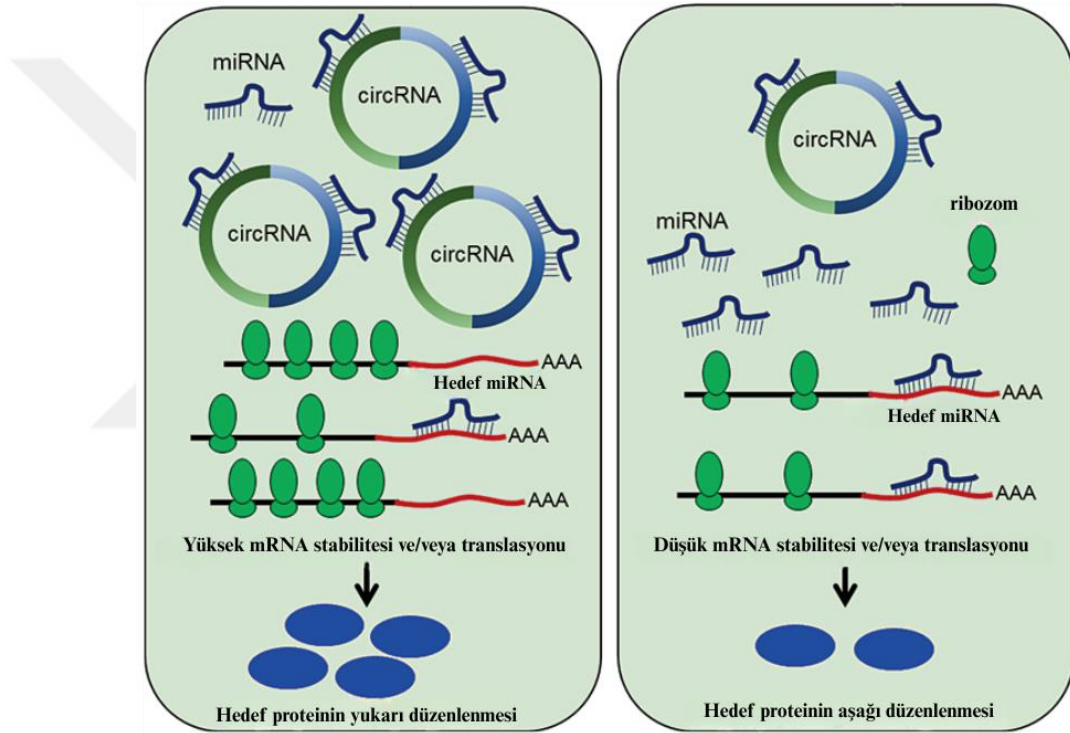
Şekil 2.7. circRNA'nın biyogenezine yol açan mekanizmalar (Pisignano ve ark., 2023'ten alınmıştır).

2.12.5. Dairesel RNA'ların (circRNA'lar) biyolojik fonksiyonları

Birçok dairesel RNA'nın biyolojik rolü henüz net olmasa da, çeşitli biyolojik fonksiyonlar aydınlatılmış ve bunlar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar katılımcılar olarak tanınmıştır (Zhao ve ark., 2022). Yüksek verimli dizileme teknolojilerinin gelişmesi sayesinde, circRNA'ların mikroRNA (miRNA) süngerleri, transkripsiyonel düzenleyiciler, protein taşıma ve aktivite modülatörleri, protein-protein etkileşimlerinin kolaylaştırıcıları ve hatta protein kodlayan öğeler olarak işlev gördüğü keşfedilmiştir.

Dairesel RNA'lar miRNA süngerleri olarak

circRNA'ların en iyi belgelenmiş fonksiyonlarından biri, mikroRNA'ları süngere çekerek endojen RNA'lar (ceRNA'lar) olarak rekabet etme yetenekleridir. CircRNA'lar, miRNA'lar için birden fazla bağlanma sitesine sahip olup, bu molekülleri hapsederek hedef mRNA'larıyla bağlanmalarını engeller ve böylece transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu modüle eder (Zhao ve ark., 2022; Pandey ve ark., 2020) (Şekil 2.8). MiRNA'ları süngere çekerek, birkaç circRNA'nın hücre büyümesi, çoğalması ve diferansiyasyonu üzerinde modülatör etkiler yaptığı bulunmuştur (Hansen ve ark., 2013).



Şekil 2.8. Süngerleme miRNA'nın gen ifadesi üzerindeki circRNA etkisinin şematik gösterimi (Panda, 2018'den alınmıştır)

Transkripsiyonel düzenleme

Nükleusta bulunan belirli circRNA'lar, özellikle EICiRNA'lar, doğrudan transkripsiyonel düzenlemeye katılabilir (Zhao ve ark., 2022; Pandey ve ark., 2020). Bu circRNA'ların, RNA polimeraz II (Pol II) gibi transkripsiyonel makinelerle etkileşime girerek, enzimleri promoter bölgelerde hipometilasyon indüklemek ve böylece gen

ekspresyonunu aktive etmek için işe koyuldukları, RNA-DNA hibrid yapıları (R-dönüşleri) oluşturarak erken transkripsiyon sonlandırılması ve fonksiyonel olmayan kısmi izoformların oluşması gibi mekanizmalarla belirlenmiştir (Pisignano ve ark., 2023).

Çevirme potansiyeli

Bazı circRNA'ların, Internal Ribosome Entry Sites (IRES) bulunması nedeniyle kısmi olarak proteinler veya peptitler halinde çevrilebileceğine dair artan kanıtlar vardır (Pandey ve ark., 2020; Yang ve ark., 2017) (Şekil 2.9a). Bu, AUG başlangıç kodonunun varlığıyla birlikte, ribozomların circRNA'nın segmentlerini, lineer RNA çevirisi için gereken 5'-CAP'dan bağımsız olarak çevirmesine olanak tanır (Pandey ve ark., 2020). Ayrıca, IRES'i taklit eden N6-metiladenosin (m6A) gibi modifikasyonlar, birden fazla proteinle birlikte çeviriyi başlatabilir (Yang ve ark., 2017).

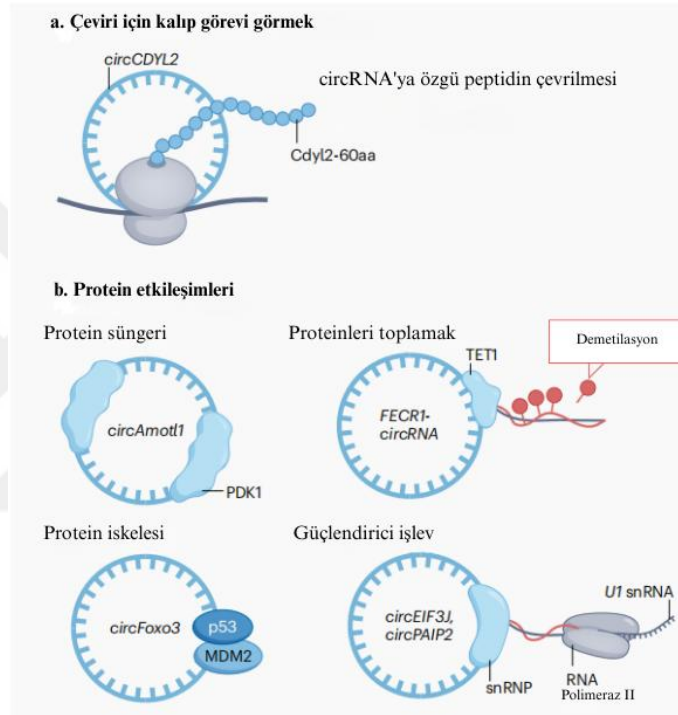
Protein etkileşimleri

CircRNA'lar, proteinlerle etkileşimleri yoluyla çeşitli süreçler gerçekleştirdiği bildirilmiştir, özellikle RNA bağlayıcı proteinlere (RBP) bağlanabilen motifler taşıdıklarında (Zhao ve ark., 2022). Bu şekilde, protein süngeri olarak hareket edebilirler ve dolayısıyla proteinlerin aktivitesini düzenleyebilir, protein fonksiyonunu çekirdek ve sitoplazma arasında translokasyon yaparak etkileyebilir, protein-protein etkileşimlerini protein iskeletleri olarak işlev görebilerek kolaylaştırabilirler (Nemeth ve ark., 2024). CircRNA'lar ile proteinler arasındaki bazı etkileşimler Şekil 2.9b'de örneklendirilmiştir.

2.12.6. CircRNA'ların Uygulamaları

Antijenleri kodlayan mRNA dizilerinden oluşan aşılarda, özellikle SARS-CoV-2 pandemisinin başlamasından bu yana öne çıkan bir yaklaşımdır. Bu aşılarda hızlı üretim ve viral mutasyonlara uyum sağlama gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Ancak, mRNA aşılmasının saklama ve taşıma koşulları daha zordur ve potansiyel immünojenik yan etkiler oluşturabilirler. Bu bağlamda, dairesel RNA'lar (circRNA'lar) aşı geliştirme

için umut vaat eden adaylar olarak dikkat çekmektedir. Lineer mRNA'lara kıyasla circRNA'lar daha stabildir ve etkili protein sentezi için daha düşük miktarlarda kullanılır, bu da toksisitelerini azaltır. Yakın zamanda, SARS-CoV-2'nin reseptör bağlanma bölgesini (RBD) kodlayan bir circRNA bazlı aşı rapor edilmiştir. Bu aşı, virüsü nötralize edebilen güçlü ve uzun süreli bir bağışıklık yanıtı indüklemiş ve oda sıcaklığında iki hafta saklandıktan sonra bile yüksek termal stabilite ve ekspresyon kapasitesi göstermiştir (Zhao ve ark., 2022).



Şekil 2.9. CircRNA'ların bazı işlevleri. Bunlar çeviri için bir şablon olarak kullanılabilir ve farklı süreçleri modüle etmek için proteinlerle etkileşime girebilir (Nemeth ve ark., 2024'ten alınmıştır)

Ayrıca, circRNA'ların insan hastalıklarında önemli rol oynayan birçok sinyal yolunda yer almaları nedeniyle, terapötik moleküller olarak potansiyelleri araştırılmakta ve klinik denemelerde yer almaktadırlar (Verduci ve ark., 2021). CircRNA tasarımı ve optimizasyonu için önemli çalışmalar yapılmıştır. Vektör bazlı ekspresyon sistemleri (hem viral hem plazmit) hücrelerde circRNA üretimini indüklemek için kullanılmış olup, genellikle güçlü promotörler veya dairesel eklenmeyi teşvik eden intronlar eklenmiştir (Zhao ve ark., 2022; Meganck ve ark., 2018). Buna karşılık, Litke ve ark.

(2019) vektör kullanmayan, enzimler ve endojen hücrel mekanizmaları kullanarak RNA seviyesinde doğrudan daireselleşmeyi sağlayan bir strateji geliştirmiştir. Bu çalışmalar uygun circRNA ekspresyonunu başarmış olsa da, çözülmesi gereken teknik zorluklar devam etmektedir (Verduci ve ark., 2021).

Bu aşırı ifade temelli yaklaşımlar, kanserde onkojenik miRNA'ları hedef alarak gen ekspresyon düzeylerini azaltmakta ve böylece kanser gelişiminin engellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, bazı circRNA'ların aşırı ifadesi kanser gelişimine katkıda bulunabileceği için, bunların siRNA ile susturulması kanserde umut vaat eden terapötik hedefler olarak öne çıkmaktadır (Zhao ve ark., 2022; Verduci ve ark., 2021).

Son olarak, circRNA'ların stabilitesi ve doku özgüllüğü, bunları klinik uygulamalar için ideal biyobelirteçler haline getirmektedir; ayrıca, gerçek zamanlı PCR gibi görece basit teknolojilerle kolayca tespit edilebilirler. Çok sayıda çalışma bu potansiyeli desteklemekte olup, circRNA'lar prostat kanseri, mesane kanseri ve diğer hastalıklarda kandaki yüksek bollukları ve idrar örneklerinde bulunmaları nedeniyle umut vaat eden biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, belirli circRNA'ların ifade seviyeleri ile tümör derecesi, büyüklüğü, metastaz ve lenf nodu tutulumu gibi klinik parametreler arasında ilişkiler bildirilmiş, bu da farklı insan hastalıklarının ilerlemesinin izlenmesinde biyobelirteç olarak potansiyellerini göstermektedir (Verduci ve ark., 2021).

2.12.7. Kanserde GPRC5A'nın Düzenleyicileri Olarak CircRNA'lar

GPRC5A'nın dairesel RNA'lar tarafından düzenlenmesi daha önce mide kanseri, kolorektal kanser ve mesane kanserinde incelenmiştir.

Mide kanserinde circ_0000144 yükselmiş olup, miR-623 (azalmış) ve GPRC5A (artmış) ile hedefli ilişkisi dual-luciferase raporlayıcı ve RNA immunopresipitasyon testleriyle doğrulanmıştır. Ayrıca, circ_0000144'ün susturulması miR-623'yı artırarak GPRC5A ekspresyonunu azaltmış ve mide kanseri progresyonunu engellemiştir. Bu bulgular, circRNA düzensizliğinin mide kanserinde nedensel bir faktör olduğunu ve

circ_0000144'ün hedeflenmesinin yeni bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermektedir (Mi ve ark., 2020).

Kolorektal kanserde circ_0007351'in miR-5195-3p/GPRC5A kaskadı aracılığıyla kanser hücre proliferasyonu, hareketliliği ve invazivitesini etkilediği gösterilmiştir. Bu circRNA'nın ifade seviyesi kanser dokularında anlamlı şekilde artmış ve azalışı GPRC5A düzeylerini düşürmüştür. Buna karşın miR-5195-3p inhibisyonu, circ_0007351 susturulmasının fenotipik etkilerini tersine çevirmiştir. Bu da circ_0007351'in kolorektal kanserde potansiyel terapötik değerini vurgulamaktadır (He ve ark., 2024).

GPRC5A gen bölgesinden türeyen ve günümüzde ilgi gören circRNA'lardan biri circGPRC5A'dır. Gu ve ark. (2018) ile Chen ve ark. (2023) tarafından mesane kanseri ve kolorektal kanserde circGPRC5A'nın regülasyonunun arttığı bildirilmiştir. Ancak, sadece Gu ve ark. GPRC5A ile işlevsel ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu çalışmada circGPRC5A'nın GPRC5A proteinine bağlanan bir peptit ürettiği gösterilmiştir. GPRC5A eksik hücrelerde circGPRC5A aşırı ekspresyonu mesane kanseri kök hücre (cancer stem cell, CSCs) oranlarında değişiklik yaratmamış, bu da circGPRC5A işlevinde GPRC5A'nın vazgeçilmez olduğunu göstermiştir. Böylece, circGPRC5A peptit bağımlı yolla mesane kanseri kök hücrelerinin kendini yenilemesinde kritik bir rol oynamaktadır (Gu ve ark., 2018).

Meme kanserinde, circRNF20, circZEB1 ve circASS1 gibi çeşitli dairesel RNA'ların (circRNA) düzensizliği bildirilmiştir (Hou et al., 2019; Cao et al., 2020; Pei et al., 2020). Ancak, şimdiye kadar özellikle circGPRC5A'nın meme kanserinde GPRC5A'yı düzenleyici rolleri üzerine spesifik çalışmalar yapılmamıştır.

Ayrıca, circRNA'ların farklı kanser türlerinde farklı ekspresyon modelleri gösterdiği ve kan, idrar, tükürük gibi kolay erişilebilir biyolojik sıvılarda tutarlı olarak bulunmaları nedeniyle, circGPRC5A klinik uygulamalar için değerli bir potansiyele sahiptir.

Bu nedenle, bu çalışma meme kanseri hücrelerinde circGPRC5A ve GPRC5A ekspresyon seviyelerinin belirlenmesini ve bunların meme kanseri tanısı veya prognozunda yeni biyobelirteçler olarak potansiyellerinin değerlendirilmesini, ayrıca hastalığın post-transkripsiyonel düzenleyici mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmayı amaçlamaktadır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Meme Hücre Hatları

Kullanılan insan meme hücre hatları, Bursa Uludağ Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı'ndan (Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye) Prof. Dr. Ferda Arı tarafından temin edilmiştir. Meme kanseri modelleri olarak MDA-MB-231 ve MCF7 hücreleri seçilmiştir.

MDA-MB-231, östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonuna sahip olmaması nedeniyle yüksek derecede agresif, invaziv ve düşük derecede farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Bu hücre hattı aynı zamanda E-kaderin negatiftir, mutasyona uğramış p53 proteini eksprese eder ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonu göstermektedir. Genellikle ileri evre meme kanserini modellemek amacıyla kullanılmaktadır (Chavez ve ark., 2011; Welsh, 2013).

MCF7, östrojen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerinin ekspresyonu ile karakterize edilen luminal A moleküler alt tipe ait bir hücre hattıdır. Ayrıca orta düzeyde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu göstermektedir; E-kaderin pozitifdir. MCF7 ksenogreftleri yabancı tip p53 proteini ifade eder. Bu hücre hattı düşük agresifliğe ve invaziv olmayan özelliklere sahip olup, genellikle düşük metastatik potansiyele sahip olarak kabul edilmektedir. Erken evre hastalık modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Welsh, 2013; Comşa ve ark., 2015).

MDA-MB-231 hücreleri, %10 FBS (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) ve %1 penisilin içeren RPMI 1640 besiyerinde (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), %5 CO₂ nemlendirilmiş, %95 hava içeren inkübatörde 37 °C'de muhafaza edilmiştir. Aynı inkübasyon koşullarında MCF7 hücreleri %5 FBS ve %1 penisilin içeren RPMI 1640 ortamında kültürlenmiştir.

GPRC5A ve circGPRC5A'nın ekspresyon düzeyini değerlendirmek için kontrol hücre hattı olarak meme epitel hücre hattı MCF10A kullanılmıştır. Bu hücreler, %5 FBS, %1 penisilin, 20 ng/mL epidermal büyüme faktörü, 50 ng/mL klorotoksin ve 100 IU/mL insülin ile desteklenmiş DMEM/F-12 besiyerinde (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) kültürlenmiştir. Hücreler 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

3.2. Meme Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu

Her bir hücre hattı örneğinden toplam RNA, üreticinin önerdiği protokole göre miRNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak izole edilmiştir. Bu işlemde ilk olarak hücre peleti fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış ve 3 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelete 700 µL QIAzol Lysis Reagent eklenmiş ve pipetleme ile süspansiyon edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 140 µL kloroform eklenmiş, tüp çalkalanarak karıştırılmış ve örnek oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, 15 dakika boyunca 4 °C'de 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 400 µL alınarak bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 1,5 hacim (600 µL) %100 etanol eklenmiştir. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, 700 µL örnek saflaştırma kolonuna aktarılmış ve kolonu içeren toplama tüpü 25 °C'de 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alttaki faz atılmış ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kalan örnek için bu adım tekrarlanmıştır. Daha sonra kolona 700 µL Buffer RWT eklenmiş ve 25 °C'de 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alt faz tekrar atılmış ve kolona 500 µL Buffer RPE pipetle eklenmiştir. 25 °C'de 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra alt faz atılmış ve bu adım bu kez 2 dakika santrifüj edilerek tekrar edilmiştir. Kolon zarının tamamen kurutulması için 25 °C'de 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulanmıştır. Saflaştırma kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve membranın üzerine doğrudan 30 µL RNaz içermeyen su eklenmiştir. RNA'yı elüe etmek için kolon 25 °C'de 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon atılmış ve elde edilen RNA -20 °C veya -80 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.3. RNA Örneklerinin Konsantrasyon Ölçümü ve Bütünlüğünün Belirlenmesi

Örneklerden izole edilen RNA'nın konsantrasyonu, 260 nm dalga boyunda absorbanans ölçümü yapılarak Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) cihazı kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. Cihaz için RNaz içermeyen su blank olarak kullanılmış, ardından okumalar için 2 µL örnek alınmıştır. RNA saflığı, A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirilerek kaydedilmiştir.

RNA bütünlüğü, %1 agaroz jel elektroforezi yapılarak gözlemlenmiştir. Bunun için, terazide 0,5 gr agaroz tartıldı, bir şişeye döküldü ve üzerine 50 mL 1X Tris-Asetat (TAE) tamponu eklendi (TAE tamponu hazırlığı için Ek 1'e bakınız). Agaroz ve tampon içeren şişe mikrodalgaya konularak çözülmüştür. Birkaç dakika soğuması beklendikten sonra, agaroz çözeltisine 1 µL etidyum bromür (10 mg/mL) eklenmiş ve şişe hafifçe çalkalanarak karıştırılmıştır. Daha sonra agaroz, sızdırmaz döküm kalıbına (tarak ile birlikte) dökülmüş ve elektroforez sisteminin tampon haznesine yerleştirilmiştir. Jel dökümünden sonra tarak çıkarılmış ve örnekler mikropipet kullanılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Çizelge 3.1, yükleme karışımlarındaki bileşenlerin dağılımını göstermektedir. Moleküler marker olarak 1 kb DNA ladder (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) kullanılmıştır. Öte yandan, yaklaşık 1 µg RNA içerecek örnek hacmi, daha önce elde edilen konsantrasyon değerleri kullanılarak hesaplanmış (Çizelge 4.1) ve hacim 10 µL'ye tamamlanmıştır. Ladder ve örnekler 120 V'da 1 saat boyunca çalıştırılmıştır. Elektroforez sonunda jel, UV ışığı (360 nm) altında UVDI jel görüntüleme sistemi (Major Science, Saratoga, CA, USA) içerisine yerleştirilerek görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. Ladder ve RNA örnekleri için yükleme karışımı.

DNA Yükleme Boyası (6X), Applied Biological Materials Inc. (Richmond, BC, Kanada) firmasından satın alınmıştır.

	1 kb DNA Ladder 500 µg/mL	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
Distile su	3 µL	7 µL	9 µL	8 µL
DNA yükleme boyası (6X)	1 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Ladder/RNA örneği	2 µL	3 µL	1 µL	2 µL
Toplam hacim	6 µL	12 µL	12 µL	12 µL

3.4. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

Birinci zincir cDNA sentezi için 1 µg toplam RNA, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) kullanılarak kullanılmıştır. Hücre hatlarından izole edilen RNA örnekleri ve kit bileşenleri, ters transkripsiyon reaksiyonu için buz üzerinde çözdürülmüştür. Her örnek için reaksiyon karışımı, üretici firmanın protokolüne göre Çizelge 3.2'de belirtildiği şekilde 0,2 mL'lik PCR tüplerinde hazırlanmıştır. 1 µg toplam RNA ile reaksiyonun gerçekleştirilmesi için gerekli örnek hacmi, Nanodrop ile belirlenen konsantrasyon değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (4. Bölümdeki çizelge 4.1).

Her örnek için reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra, tüpler hızlıca santrifüj edilmiş ve RNA'dan cDNA sentez reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için MJ Research PTC-100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) cihazına yerleştirilmiştir. Dönüştürme işleminin gerçekleştirilmesi için inkübasyon koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, cDNA örnekleri bir sonraki deneyler gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. cDNA sentez reaksiyonu için bileşenler

	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
RNA Örneği	2,8 µL	0,9 µL	1,9 µL
5X Reaksiyon Tamponu	4 µL	4 µL	4 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL	2 µL	2 µL
Random Hexamer Primer, 100 µM	1 µL	1 µL	1 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
RiboLock RNaz Inhibitörü (20 U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Nücleaz içermeyen su	8,2 µL	10,1 µL	9,1 µL
Toplam hacim (reaksiyon başına)	20 µL	20 µL	20 µL

Çizelge 3.3. cDNA sentez reaksiyonu için inkübasyon koşulları

Ayarlama	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25 °C	42 °C	70 °C	4 °C
Süre	5 dakika	60 dakika	5 dakika	Bekletme

3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR)

İlgili genlerin ekspresyon seviyeleri, daha önce elde edilen cDNA'nın şablon olarak kullanıldığı kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile belirlenmiştir. qPCR, üretici firmanın talimatlarına göre BlasTaq™ 2X qPCR Master Mix (Applied Biological Materials (abm) Inc, Richmond, Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir gen için karşılık gelen primer çifti için, üretici talimatlarına uygun şekilde qPCR reaksiyon karışımı (Çizelge 3.4) hazırlanarak, gerekli reaksiyon sayısına göre her bileşenin toplam hacmi eklenmiştir. DNA şablonu hariç tüm reaksiyon bileşenleri buz üzerinde çözüldükten sonra 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine alınmıştır. Kısa süreli vortex yapıldıktan sonra karışım 96 kuyucuklu PCR plakasına her kuyucuğa 18 µL pipetlenecek şekilde dağıtılmıştır. Ardından her kuyucuğa 10 kat seyreltilmiş 2 µL cDNA örneği eklenmiş ve toplam 20 µL'lik reaksiyon hacmi tamamlanmıştır. Her bir cDNA örneği için üçlü tekrarlar halinde deneyler yapılmış olup, her qPCR serisinde, örnek yerine su eklenerek üçlü negatif kontrol reaksiyonları da hazırlanmıştır. Son olarak, plaka optik yapışkan film ile kapatılarak kısa süreli santrifüj edilmiştir.

Çizelge 3.4. qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri

ROX referans boyası, BlasTaq 2X qPCR Master Mix'e 11 µL / 1,25 mL oranında eklendi

Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyon
BlasTaq 2X qPCR Master Mix ^(a)	10 µL	1X
İleri Primer (10 µM)	0,5 µL	0,25 µM
Geri Primer (10 µM)	0,5 µL	0,25 µM
cDNA template	2 µL	
Nükleaz içermeyen su	7 µL	
Toplam hacim (reaksiyon başına)	20 µL	

Reaksiyonlar, StepOne Plus Gerçek Zamanlı PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD) kullanılarak, aşağıda belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5):

Çizelge 3.5. Uygulanan qPCR koşulları

Adım	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim aktivasyonu	1	95 °C	3 dakika
Denatürasyon	40	95 °C	15 saniye
Eşleşme (Annealing) ve uzama		60 °C	1 dakika

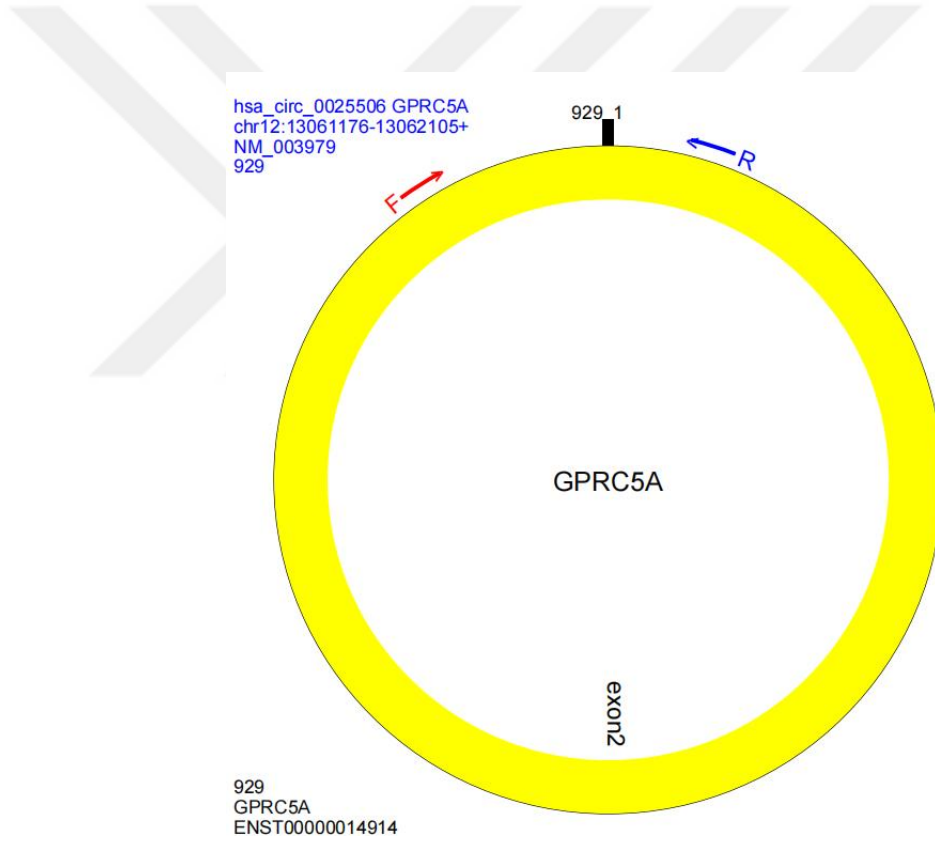
qPCR analizi için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.6'da verilmiştir. circRNA'ların qPCR analizinde divergent (ayrışan) primerlerin kullanıldığı özellikle vurgulanmalıdır, çünkü bu primerler lineer RNA'yı amplifiye etmez. Bu yaklaşım, circRNA'yı zenginleştirmek için RNase R muamelesine olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır (Dudekula ve ark., 2016).

Divergent primerler, Primer3 (Untergasser ve ark., 2012) ve NCBI Primer-BLAST gibi primer tasarım programlarını entegre eden web tabanlı bir araç olan CircInteractome (Dudekula ve ark., 2016) kullanılarak tasarlanmıştır. Bu primerler, circRNA'nın back-splice junction (BSJ) bölgesinin her iki tarafındaki dizileri içeren bir şablon kullanılarak tasarlanmıştır. Şekil 3.1, circPrimer 2.0 yazılımı (Zhong & Feng, 2022) kullanılarak oluşturulmuş olup, circGPRC5A için tasarlanan primerlerin yönelimini şematik olarak göstermektedir. Primerler lineer bir şablon üzerinde divergent (ayrışan) şekilde konumlandırılmış olsa da, dairesel bir şablonda BSJ bölgesi etrafında convergent (yakınsayan) yönde gösterilmektedir (daha fazla açıklama için Ek 2'ye bakınız). Primerlerin özgüllüğü, erime eğrisi belirlemesi ile doğrulanmış olup, ilgili grafiklere Ek 3'te yer verilmiştir.

qPCR deneyleri, Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda, Bursa Uludağ Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. qPCR için primer dizileri

Hedef RNA	Primer	Dizi (5'-3')
hsa-circ-0025506 (circGPRC5A)	İleri	TCCTGTTGAGGATGCTTTCT
	Geri	ACTTGGATTTTCAGGCCATTG
GPRC5A	İleri	CTCACTCTCCCGATCCTCGT
	Geri	CAGTCCGATGATGAAGGCGAA
GAPDH	İleri	GCAAATTCCATGGCACCGT
	Geri	TCGCCCCACTTGATTTTGG
hsa_circ_0000284 (circHIPK3)	İleri	TATGTTGGTGGATCCTGTTCGGCA
	Geri	TGGTGGGTAGACCAAGACTTGTGA



Şekil 3.1. GPRC5A geninin ekzon 2'sinden türetilmiş circGPRC5A'nın yapısı ve ileri/geri (F/R) primerlerin yönlerini gösteren şematik çizim

3.6. Veri Analizi

Veri analizleri için Excel 2010 kullanılmış ve qPCR yoluyla elde edilen örneklerin Ct değerleri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir.

Göreceli mRNA ve circRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Pfaffl, 2001). Bu yöntem, hedef genin iki durum arasındaki (deneysel koşulun kontrol koşuluna göre) ekspresyon değişimini gösteren bir değer sağlamaktadır. 1'den büyük bir değer regülasyonun artmasını (aşırı ifade), 1'den küçük bir değer ise regülasyonun azalmasını (düşük ifade) ifade etmektedir. Bu değerın hesaplanabilmesi için, her bir örnekte hedef gen ile referans gen arasındaki fark ($\Delta\Delta Ct$), Denklem 3.1 ve 3.2'ye göre hesaplanmıştır. Son olarak, göreceli ifade seviyesi belirlemek için Denklem 3.3 uygulanmıştır. GPRC5A ve circGPRC5A için sırasıyla GAPDH ve circHIPK3 referans genler olarak kullanılarak, kat değişimleri (fold change) bu genlerin ekspresyonuna göre normalize edilmiştir.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{deney grubu}) - \Delta Ct (\text{kontrol grubu}) \quad (3.1)$$

$$\Delta Ct = Ct^{(b)} (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans ya da housekeeping gen}) \quad (3.2)$$

$$\text{Kat değişimi (Fold change)} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.3)$$

Burada:

(b) Ct, genin floresansının tespit edilebilir hâle geldiği döngüyü belirten eşik döngü (cycle threshold) değeridir.

3.7. Aday miRNA Taraması için *in silico* Analiz

circGPRC5A ve GPRC5A arasında bir etkileşim ağı oluşturmak amacıyla, her iki molekülle de etkileşim kurması öngörülen aday miRNA'ları tanımlamak için bir *in silico* tarama gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Bu amaçla, GPRC5A'yı potansiyel olarak düzenleyen miRNA'ları bulmak için miRDB (Chen & Wang, 2020), TargetScan (Agarwal ve ark., 2015), miRTarBase (Huang ve ark., 2020) and miRWalk (Sticht ve ark., 2018) veri tabanları kullanılmıştır. Bu taramada GPRC5A mRNA'sının 3' UTR, 5' UTR ve CDS bölgeleriyle olası miRNA etkileşimleri dikkate alınmıştır. Ayrıca,

circGPRC5A tarafından düzenlenmesi muhtemel miRNA'lar CircInteractome (Dudekula ve ark., 2016), Starbase (Li ve ark., 2014), and CircNetVis (Nguyen ve ark., 2024) veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir. Son olarak, hem circGPRC5A hem de GPRC5A ile ortak olarak etkileşimde bulunabilecek miRNA seti tanımlanmıştır. Bu miRNA'ları temsil eden diyagramı oluşturmak için Cytoscape 3.10.3 (Shannon ve ark., 2003) yazılımı kullanılmıştır.

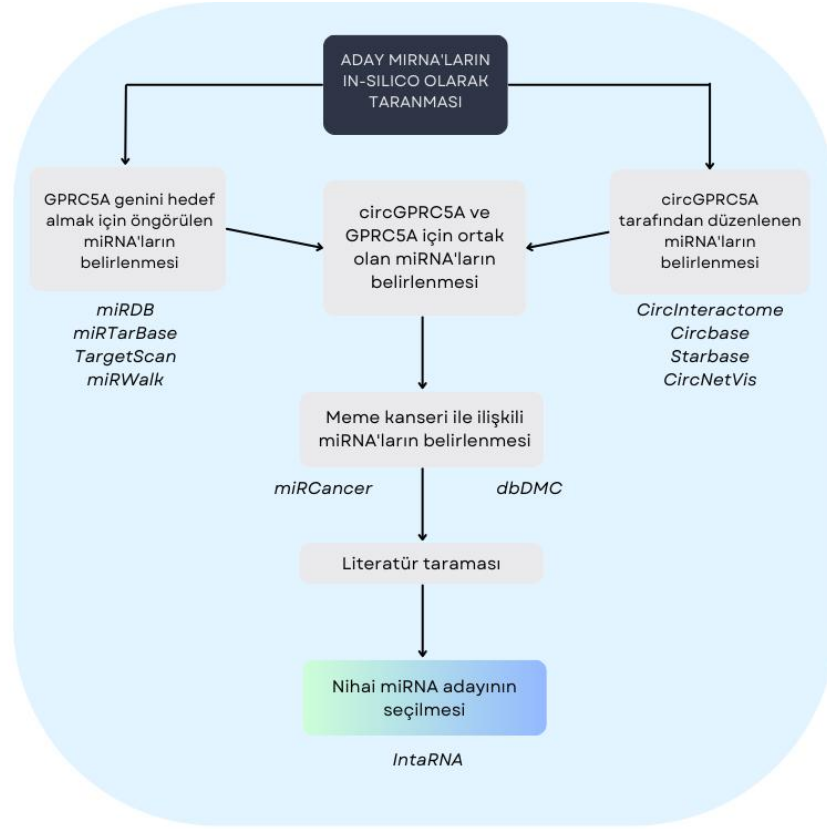
Daha sonra, bu ortak miRNA'lardan hangilerinin deneysel çalışmalarla meme kanseriyle ilişkilendirildiğini belirlemek amacıyla miRCancer (Xie ve ark., 2013) and dbDEMC (Yang ve ark., 2017) veri tabanları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür taraması ile doğrulanmış ve her bir miRNA için bildirilen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. İlgili miRNA'nın adı ile birlikte "breast cancer" veya "cancer" anahtar kelimeleri PubMed'de aratılarak circGPRC5A ve GPRC5A için elde edilen regülasyon durumunun tersi yönde düzensizlik (disregülasyon) gösteren miRNA'lar seçilmiştir.

Bundan sonra, seçilen miRNA'ların circGPRC5A ve GPRC5A mRNA molekülleri ile etkileşim gücü, yerel olarak Ubuntu 22.04.5 LTS ortamında çalıştırılan IntaRNA (v1.2.5) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. IntaRNA, RNA-RNA etkileşimlerinin özelleştirilebilir bir şekilde tahmin edilmesini sağlayan bir araçtır (Mann ve ark., 2017).

Son olarak, IntaRNA analizinin sonuçlarına dayanarak circRNA-miRNA-mRNA düzenleyici aksamız için tek bir miRNA seçilmiştir. Bu seçim aşağıdaki temel parametreler dikkate alınarak yapılmıştır:

- Etkileşim enerjisi (E): Daha negatif bir enerji, daha güçlü ve biyolojik olarak daha olası bir etkileşim anlamına gelir.
- miRNA'nın etkileşime katılan bölgesi: Etkileşim bölgesinin, miRNA'nın 2-8 nükleotidlerinden oluşan "seed" bölgesini içermesi, hedef RNA'nın fonksiyonel olarak baskılanabilmesi için kritik öneme sahiptir.

Seçilen miRNA hakkında açıklama miRBase (Kozomara ve ark., 2019) ve miRPathDB v2.0 (Kehl ve ark., 2020) veri tabanlarından elde edilmiştir.



Şekil 3.2. miRNA seçim sürecinin akış şeması. İtalik yazılmış kelimeler, kullanılan veritabanlarını ve yazılımları ifade etmektedir.

3.8. miRNA Ekspresyonunun Belirlenmesiyle İlgili Konular

In silico araçlar kullanılarak circGPCR5A–miRNA–GPCR5A etkileşim ağı oluşturma potansiyeli en yüksek olan mikroRNA (miRNA) belirlendikten sonra, daha önce GPCR5A ve circGPCR5A ekspresyonunu belirlemek için uygulanan işlemler, bu kez tahmin edilen miRNA'nın ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla tekrar gerçekleştirildi. MiRNA'ların yapısal özellikleri ve bunların tespitinde kullanılan teknikler göz önünde bulundurularak bazı adımlarda değişiklikler yapıldı.

3.8.1. Meme hücre hatlarından RNA ekstraksiyonu ve konsantrasyon ölçümü

Toplam RNA, daha önce kullanılan meme hücre hatları olan MCF10A, MCF7 ve MDA-MB-231'den yeniden elde edildi. Hücre hatları Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlandı. Uygulanan protokol Bölüm 3.2'da açıklanmıştır ve

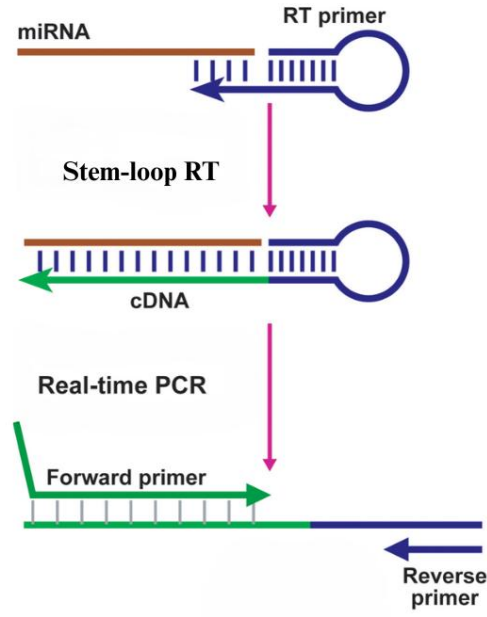
aynı şekilde miRNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kullanılmıştır. Toplam RNA konsantrasyonu Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) cihazı ile ölçülmüş ve bu ölçümlere göre ters transkripsiyon için gerekli miktarlar belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

3.8.2. RNA örneklerinin Stem-loop RT-qPCR analiz

MikroRNA'ların (miRNA'lar) doğru şekilde tespiti için, RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesini takiben stem-loop primerlerine dayalı özel bir yaklaşımla qRT-PCR uygulandı. Bu strateji, miRNA'ların kısa uzunlukları ve aynı aile üyeleri arasındaki yüksek dizi benzerliği nedeniyle miRNA analizi için özellikle uygundur (Kramer, 2011).

Stem-loop tipi primerler, yalnızca olgun miRNA'ların ters transkripsiyonunu sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Bu primerler, kendi üzerine katlanarak saç tokası (hairpin) yapısı oluşturan 44 nükleotitik bir segment ile hedef miRNA'nın 3' ucuna tamamlayıcı altı nükleotitik bir terminal bölgeye sahiptir (Şekil 3.3). Bu konformasyon, ters transkripsiyon sürecine stabilite kazandırmasının ve üretilen cDNA'nın qPCR ile tespitini kolaylaştıracak şekilde yapay olarak uzatılmasının yanı sıra, üç boyutlu yapısı sayesinde örnek içerisinde bulunan öncül yapılara (pri-miRNA veya pre-miRNA) bağlanmayı engelleyerek özgüllüğü artırır (Chen, 2005; Kramer, 2011).

Bu doğrultuda, cDNA sentezi sırasında 50 ng toplam RNA, stem-loop primerleriyle karıştırıldı ve MJ Research PTC-100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) cihazında 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Bu adım, RNA'nın ikincil yapılarının denatürasyonunu sağlayarak primer ile olgun miRNA arasındaki verimli bağlanmayı kolaylaştırdı. Ardından, karışım buz üzerinde hızla soğutularak hibridizasyon stabilize edildi. Ters transkripsiyon işlemi, üretici firmanın orijinal protokolünde yer alan rastgele primerler (random primer) yerine stem-loop primerleri kullanılarak yapılan değişikliklerle birlikte, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ile gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları Çizelge 3.7'de özetlenmiştir.



Sekil 3.3. Stem-loop RT-qPCR şeması (Chen, 2005'ten değiştirilerek alınmıştır)

Çizelge 3.7. Stem-loop RT-qPCR için parametreler ve koşullar

İnkübasyon Adımları	Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyon
65 °C - 5 dk	Stem-loop RT Primer (2 µM)	1,0 µl	0,1 µM
	RNA (10ng)	5 µl	50 ng
5°C-10 dk 37°C-120 dk 85°C-5 dK	10X Reverse Transcriptase Buffer	2,0 µl	2X
	25X Deoxynucleotide Triphosphates Mix	0,8 µl	2X
	MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl	50U
	Nuclease-free H2O	10,2 uL	

Son olarak, sentezlenen cDNA, Bölüm 3.5'te açıklandığı şekilde, BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix reaktifi (Applied Biological Materials (abm) Inc., Richmond, Kanada) ve StepOnePlus™ Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR reaksiyonları için kalıp olarak kullanıldı. snRNA U6 molekülü, miRNA'ların bağıl ekspresyonunun normalizasyonu için endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

Stem-loop qRT-PCR’de kullanılan primerlar Çizelge 3.8’de sunulmuştur. Altı çizilerek işaretlenen nükleotidler, olgun miRNA’ya özgü olan dizileri temsil etmektedir. Aynı şekilde tabloda, miRNA’ya özgü ileri primer (forward primer) dizileri ve cDNA’ya eklenen evrensel stem-loop dizisini tanıyan ve tüm reaksiyonlarda evrensel ters primer (reverse primer) olarak kullanılabilen ters primer dizisi de yer almaktadır.

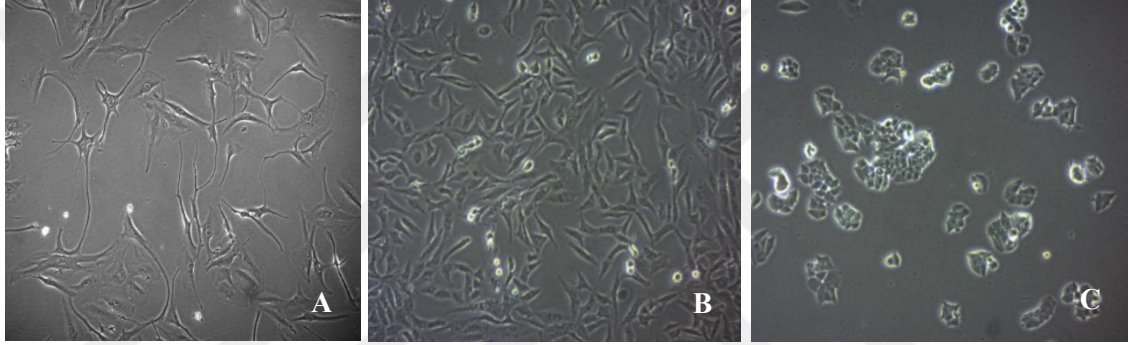
Çizelge 3.8. Stem-loop qRT-PCR için kullanılan primerlerin dizileri

Primer	Dizi (5’-3’)
RT-U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC <u>AAAATA</u>
U6 Forward	CGCTTCGGCAGCACATATAC
RT-miR-214-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC <u>ACTGCC</u>
miR-214-3p Forward	GCCACAGCAGGCACAGACAGGCA
Universal Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT

4. BULGULAR

4.1. Hücre Hatlarının Morfolojisi

Ekilen hücre hatları, ekimden 48 saat sonra ışık mikroskobu altında gözlemlenmiş ve ilgili morfolojik özellikleri sergiledikleri belirlenmiştir (Şekil 4.1). MCF10A ve MDA-MB-231 hücreleri, epitelyal benzeri bir morfolojiye sahiptir; uzun ve ince (iğsi şekilli) yapıda olup, uzantıları aracılığıyla hücre kolonları oluşturarak birbirlerine bağlanırlar. Buna karşılık, MCF7 hücreleri kültür plakta hücre yığınları (agregaları) oluşturur.



Şekil 4.1. Meme hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüsü. MCF10A (A), MDA-MB-231 (B) ve MCF7 (C) hücre hatları, ekimden 48 saat sonra 10X büyütmede fotoğraflanmıştır.

4.2. Hücre Hatlarından İzole Edilen RNA'nın Konsantrasyonu ve Kalitesi

Hücre hatlarından RNA ekstraksiyonunun verimliliğini değerlendirmek amacıyla, her ekstraktın konsantrasyon ve saflık değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen RNA konsantrasyonları ve saflık değerlerinin, sonraki deneyler için uygun olduğu gözlemlenmiştir.; en yüksek konsantrasyon kanserli MCF7 hücrelerinde, en düşük ise tümöral olmayan MCF10A hücrelerinde gözlemlendi. Tüm örneklerde 260/280 absorbans oranı yaklaşık 2.0 olarak belirlenmiştir. 260/230 oranı ise MCF10A hücrelerinde, MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha düşük çıkmıştır.

Çizelge 4.1. Ekstrakte edilen RNA'nın konsantrasyonları ve kalitesi.

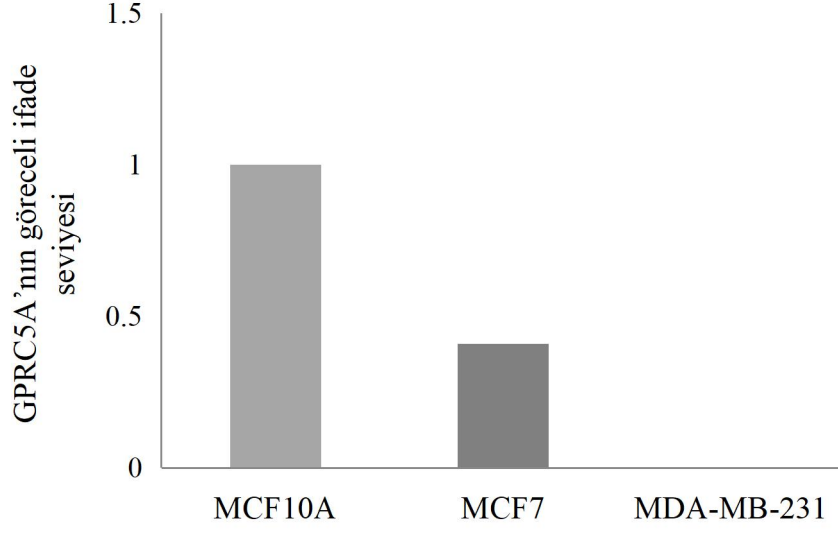
Hücre hattı örneği	RNA Konsantrasyon (ng/uL)	A260/280	A260/230
MCF10A	350,8	2,02	1,78
MCF7	1186,6	2,03	2,16
MDA-MB-231	598,8	2,02	2,12

Toplam RNA'nın agaroz jelde yürütülmüş şekli Ek 4'te gösterilmektedir. Tüm örneklerde, 28S rRNA'ya karşılık gelen çok yoğun bir üst bant ve 18S rRNA'ya karşılık gelen daha az yoğunlukta bir alt bant gözlemlenmektedir. Bu durum, RNA'nın kalitesinin iyi durumda olduğunu göstermektedir.

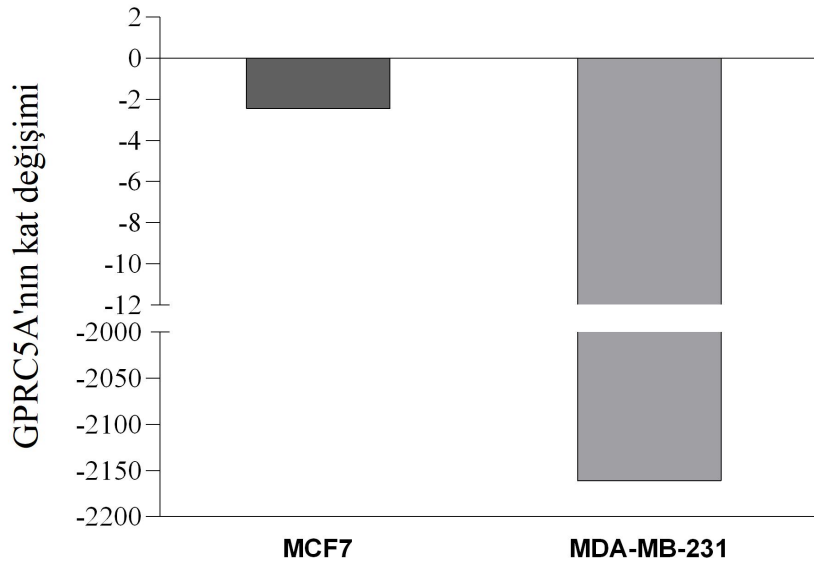
4.3. GPRC5A Geninin İnsan Meme Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Düzeyi

Meme epitelyal hücre hattı MCF10A ile meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA-MB-231'den izole edilen RNA, ters transkripsiyon ve kantitatif PCR (qPCR) analizine tabi tutulmuştur. Bu analiz, GPRC5A mRNA ekspresyon düzeylerini incelemek amacıyla yapılmıştır. qPCR sonrası elde edilen Ct değerleri Ek 5'te sunulmuştur ve Şekil 4.2, bu genin göreceli ekspresyonunu göstermektedir.

Yapılan analiz sonucunda, GPRC5A gen ekspresyonunun insan meme kanserinde baskılandığı (downregulated) gözlemlenmiştir. Özellikle, MCF7 hücrelerinde GPRC5A ekspresyon düzeyi, MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise GPRC5A'nın endojen düzeyleri, MCF10A hücrelerine kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür ve bu değerler şekilde gösterilmesi mümkün olmamıştır. Bu sebeple aynı sonuçlar kat değişimi olarak da gösterilmiştir (Şekil 4.3). MDA-MB-231 hücrelerinde yaklaşık 2161 katlık belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Buna karşılık, MCF7 hücrelerinde bu azalma daha ılımlı olup yaklaşık 2,4 kat olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal meme epitelyal hücre hattı MCF10A'da GPRC5A mRNA'sının göreceli ifade seviyesi



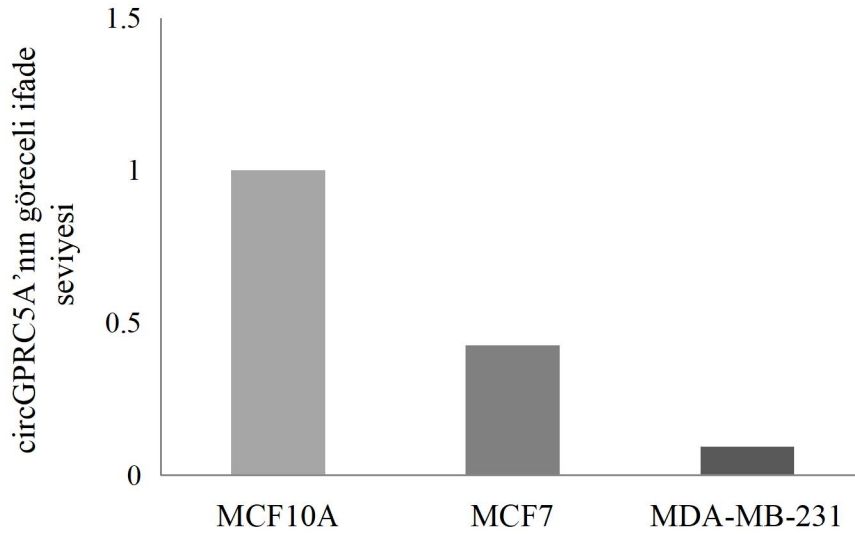
Şekil 4.3. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında GPRC5A mRNA'sı ifadesinin kat değişimi

4.4. İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde circGPC5A Ekspresyon Düzeyi

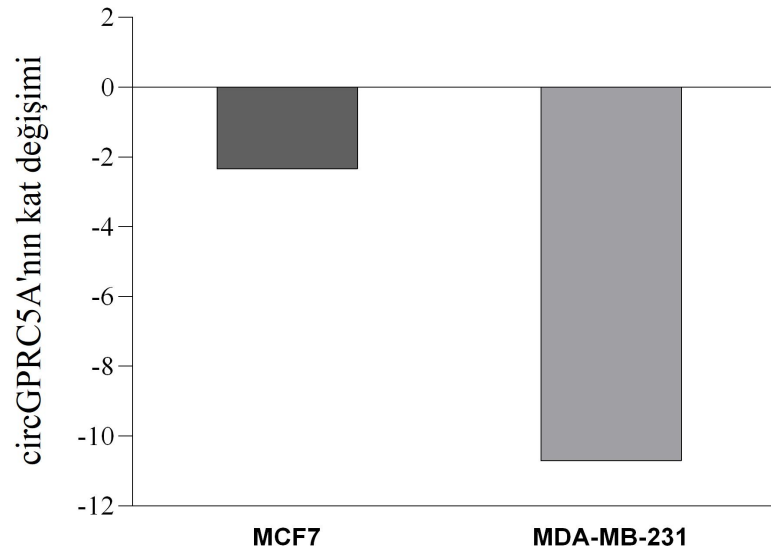
Meme kanseri hücre hatlarında circGPC5A'nın varlığını daha kesin olarak doğrulamak amacıyla qPCR analizi gerçekleştirildi (Ct değerleri için Ek 5 bakınız).

Bu analizle, circGPC5A'nın hem MCF7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ifade edildiği gösterildi. Ayrıca, GPRC5A geninde gözlemlenen ifade modeli gibi, circGPC5A'nın regülasyonunda da meme kanseri hücre hatlarında kontrol hücreleri (MCF10A) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.4 ve Sekil 4.5).

MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları arasında ise, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) ekspresyon düzeyinde daha belirgin bir azalma (10,7 kat) gözlemlenirken, MCF7 hücrelerinde bu azalma yaklaşık 2,3 kat olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile kontrol olarak kullanılan normal meme epitelyal hücre hattı MCF10A'da circGPC5A'nın göreceli ifade seviyesi



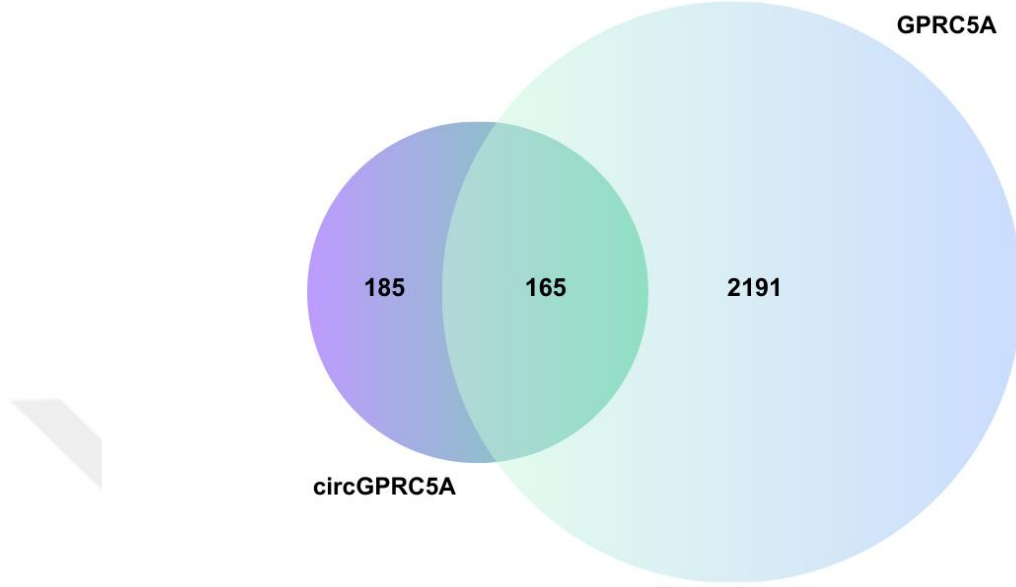
Şekil 4.5. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında circGPRC5A'nın ifadesinin kat değişimi

4.5. Aday miRNA'ların Belirlenmesi

Çeşitli veritabanlarında yapılan taramalar sonucunda, GPRC5A'nın, circGPRC5A'ya kıyasla daha fazla sayıda miRNA ile etkileşim kurmasının öngörüldüğü tespit edilmiştir. Bu durum Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Açık mavi renkteki büyük alan, GPRC5A ile etkileşime girmesi öngörülen miRNA sayısını, küçük mavi alan ise circGPRC5A ile etkileşmesi öngörülenleri temsil eder. Yeşil renkteki çakışan alan ise, her iki molekülle de etkileşim kurabilecek ortak miRNA'ların sayısını gösterir. Buna göre, iki grup arasındaki ortak miRNA sayısı (165), GPRC5A için %7.5'i ve circGPRC5A için %89'u temsil etmektedir. Ortak olarak tanımlanan miRNA'ların isimleri Ek 6'da rapor edilmiştir.

circGPRC5A ve GPRC5A arasında ortak olan miRNA'lar belirlendikten sonra, bu miRNA'ların daha önce meme kanseri ile ilişkilendirilip ilişkilendirilmediğini belirlemek amacıyla iki farklı veritabanı kullanılmış ve ayrıca literatür taraması yapılarak hangilerinin özellikle çalışıldığı ve deneysel olarak doğrulandığı tespit edilmiştir. Çizelge 4.2, bu miRNA'lardan 62 tanesini, meme kanserinde deneysel

doğrulama ile tespit edilen düzensizlik durumu (regülasyonu azalmış – downregulated veya regülasyonu artmış – upregulated) ile birlikte listelemektedir.



Şekil 4.6. circGPRC5A ve GPRC5A ile potansiyel olarak etkileşimde bulunabilecek ortak ve özgül miRNA'ların sayısını gösteren Venn diyagramı.

Bazı miRNA'lar farklı çalışmalarda tutarsız şekilde raporlanmıştır, yani hem azalmış hem de regülasyonu artmış olduklarına dair kanıtlar mevcuttur.

Bu nedenle, circRNA-miRNA-mRNA düzenleyici eksenimizi oluşturmak için aday miRNA'ların seçilmesinde, meme kanseri hücrelerinde hem circGPRC5A hem de GPRC5A'nın regülasyonunun azaldığı dikkate alınarak, yalnızca regülasyonu artmış olarak bildirilen miRNA'lar değerlendirmeye alınmıştır. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, deneysel olarak doğrulanan 62 miRNA'dan 17'si artmış (upregulated) olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 4.2. Meme kanserinde, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında deregüle olmuş miRNA'lar.

miRNA adı	Deregülasyon durumu	Referans
hsa-miR-645	yüksek	Cai ve ark., 2017
hsa-miR-665	yüksek	Zhao ve ark., 2019
hsa-miR-214-3p	yüksek	Liu ve ark., 2017
hsa-miR-761	yüksek	Huang ve ark., 2022
hsa-miR-151a-5p	yüksek	Ebrahimi ve ark., 2023
hsa-let-7d-5p	yüksek	Fiore ve ark., 2018
hsa-miR-98-5p	yüksek	Sun ve ark., 2020
hsa-miR-199a-5p	yüksek	Li ve ark., 2016
hsa-miR-1207-5p	yüksek	Yan ve ark., 2017
hsa-miR-301a-3p	yüksek	Lettlova ve ark., 2018
hsa-miR-454-3p	yüksek	Xu ve ark., 2023
hsa-miR-301b-3p	yüksek	Fan ve ark., 2021
hsa-miR-148a-3p	yüksek	Li ve ark., 2023
hsa-miR-877-5p	yüksek	Zhu ve ark., 2023
	düşük	Liu, Xang & Mei, 2022
hsa-miR-1343-3p	yüksek	Jia ve ark., 2024
	düşük	Lin ve ark., 2023
hsa-miR-140-3p	yüksek	Salem ve ark., 2016
	düşük	Zhou ve ark., 2019
hsa-miR-940	yüksek	Zhang ve ark., 2020
	düşük	Hou ve ark., 2016
hsa-miR-512-3p	yüksek	Duan ve ark., 2020
	düşük	Mohamadzade ve ark., 2021
hsa-miR-1224-3p	düşük	Wei ve ark., 2024
hsa-miR-1278	düşük	Demirdogen Sevinc ve ark., 2015
hsa-miR-146b-3p	düşük	Feng ve ark., 2021
hsa-miR-296-5p	düşük	Dinami ve ark., 2017
hsa-miR-338-5p	düşük	Chen ve ark., 2024
hsa-miR-421	düşük	Pan ve ark., 2016
hsa-miR-576-3p	düşük	Qiu ve ark., 2023
hsa-miR-583	düşük	Foruzandeh ve ark., 2023

Çizelge 4.2. Meme kanserinde, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında deregüle olmuş miRNA'lar (devam)

miRNA adı	Deregülasyon durumu	Referans
hsa-miR-640	düşük	Tang ve ark., 2021
hsa-miR-890	düşük	Wang ve ark., 2019
hsa-miR-26b-3p	düşük	Tian ve ark., 2020
hsa-miR-4731-5p	düşük	Lang ve ark., 2022
hsa-miR-4701-5p	düşük	Zhang ve ark., 2024
hsa-miR-588	düşük	Yu ve ark., 2017
hsa-miR-133a-3p	düşük	Shi ve ark., 2019
hsa-miR-133b	düşük	Hesari ve ark., 2019
hsa-miR-641	düşük	Li ve ark., 2022
hsa-miR-493-3p	düşük	Li ve ark., 2019
hsa-miR-299-3p	düşük	Tong ve ark., 2024
hsa-let-7b-5p	düşük	Li ve ark., 2023
hsa-let-7c-5p	düşük	Fu ve ark., 2017
hsa-let-7i-5p	düşük	Zhou ve ark., 2020
hsa-miR-873-5p	düşük	Zou ve ark., 2021
hsa-miR-1323	düşük	Dong ve ark., 2024
hsa-miR-485-5p	düşük	Wang ve ark., 2018
hsa-miR-542-3p	düşük	Qi ve ark., 2022
hsa-miR-378g	düşük	Luo ve ark., 2024
hsa-miR-330-5p	düşük	Wang ve ark., 2024
hsa-miR-326	düşük	Luo ve ark., 2021
hsa-miR-129-5p	düşük	Zeng ve ark., 2018
hsa-miR-199b-5p	düşük	Wu ve ark., 2018
hsa-miR-143-3p	düşük	Li ve ark., 2017
hsa-miR-130a-3p	düşük	Kong ve ark., 2018
hsa-miR-3666	düşük	Li & Li, 2017
hsa-miR-148b-3p	düşük	Mangolini ve ark., 2015
hsa-miR-186-5p	düşük	Peng & Yuan, 2023
hsa-miR-136-5p	düşük	Xiong ve ark., 2023
hsa-miR-483-3p	düşük	Menbari ve ark., 2020

Çizelge 4.2. Meme kanserinde, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında deregüle olmuş miRNA'lar (devam)

miRNA adı	Deregülasyon durumu	Referans
hsa-miR-766-5p	düşük	Zhou & Huang, 2024
hsa-miR-497-5p	düşük	Li ve ark., 2019
hsa-miR-138-5p	düşük	Yao ve ark., 2022
hsa-miR-4660	düşük	Bai ve ark., 2023
hsa-miR-646	düşük	Darvishi ve ark., 2020
hsa-miR-331-3p	düşük	Zhao ve ark., 2020

IntaRNA analizi sonrasında, bu miRNA'ların circGPRC5A ve GPRC5A mRNA ile öngörülen etkileşimleri, bu etkileşimlerin güçleriyle birlikte belirlenmiştir. Çizelgeler 4.3 ve 4.4, sırasıyla circGPRC5A ve GPRC5A ile olan etkileşimlerle ilgili elde edilen bazı verileri rapor etmektedir. Her bir miRNA için bir etkileşim bölgesi belirlenmiş ve bunlar, Enerji Skoru (E)'na göre, en güçlü etkileşimden (en negatif E değeri) en zayıf etkileşime (en az negatif E değeri) doğru sıralanmıştır.

circGPRC5A için, hsa-miR-214-3p, en negatif etkileşim enerjisine sahipken, hsa-miR-301a-3p en az negatif etkileşim enerjisine sahiptir. Ayrıca, miRNA'lar için öngörülen etkileşim bölgelerinin yalnızca “seed” bölgesindeki nükleotitlerle sınırlı olmadığı, bunun yerine bu bölgenin ötesine dağıldığı veya bazen hiç dahil olmadığı gözlemlenebilir. Öte yandan, miRNA'lar için öngörülen etkileşim bölgelerinin, circGPRC5A dizisinin tamamı boyunca dağıldığı görülmektedir.

GPRC5A ile ilgili olarak, hsa-miR-877-5p ve hsa-miR-301a-3p sırasıyla en negatif ve en az negatif etkileşim enerjisi değerlerine sahiptir. circGPRC5A ile yapılan analizde en negatif etkileşim enerjisine sahip olan hsa-miR-214-3p, GPRC5A için en negatif E değeri açısından üçüncü sırada yer almaktadır. Bir kez daha, etkileşimlerde yer alan miRNA'lar içindeki pozisyonların, “seed” bölgesinin ötesine yayılmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, GPRC5A mRNA için öngörülen etkileşim bölgeleri, 3'UTR'nin bulunduğu ekzon 4 içindeki pozisyonlara karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.3. circGPRC5A ve aday miRNA'lar arasındaki öngörülen etkileşimler

(a) start1/end1: circRNA içindeki miRNA ile etkileşime giren konum.

(b) start2/end2: Etkileşime giren miRNA'nın konumu

(c) E (enerji skoru): Etkileşim için gereken toplam serbest enerji (kcal/mol)

	Hedef adı	start1 ^(a)	end1 ^(a)	miRNA adı	start2 ^(b)	end2 ^(b)	E ^(c) (kcal/mol)
1	circGPRC5A	328	346	hsa-miR-214-3p	2	21	-18.95
2	circGPRC5A	690	699	hsa-miR-761	3	12	-14.45
3	circGPRC5A	559	576	hsa-miR-512-3p	2	20	-13.89
4	circGPRC5A	552	567	hsa-miR-877-5p	4	19	-13.79
5	circGPRC5A	197	218	hsa-let-7d-5p	1	18	-12.39
6	circGPRC5A	504	522	hsa-miR-151a-5p	2	20	-12
7	circGPRC5A	422	432	hsa-miR-1343-3p	4	14	-11.53
8	circGPRC5A	424	435	hsa-miR-665	7	18	-11.11
9	circGPRC5A	646	653	hsa-miR-98-5p	1	8	-9.98
10	circGPRC5A	429	437	hsa-miR-645	2	10	-9.74
11	circGPRC5A	635	641	hsa-miR-940	7	13	-8.69
12	circGPRC5A	563	578	hsa-miR-148a-3p	1	16	-8.38
13	circGPRC5A	604	612	hsa-miR-140-3p	13	21	-8.19
14	circGPRC5A	720	735	hsa-miR-199a-5p	5	21	-6.88
15	circGPRC5A	712	718	hsa-miR-301b-3p	16	22	-5.3
16	circGPRC5A	451	472	hsa-miR-454-3p	1	22	-4.95
17	circGPRC5A	712	718	hsa-miR-301a-3p	16	22	-4.53

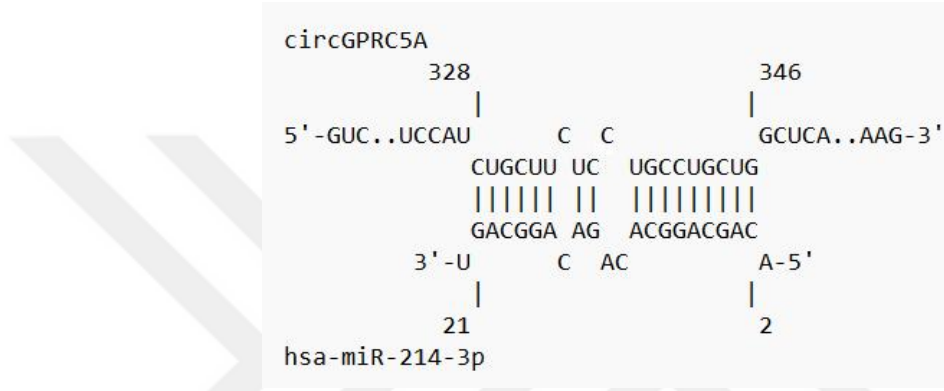
Çizelge 4.4. GPRC5A mRNA ve aday miRNA'lar arasındaki öngörülen etkileşimler.
(a) start1/end1: circRNA içindeki miRNA ile etkileşime giren konum
(b) start2/end2: Etkileşime giren miRNA'nın konumu
(c) E (enerji skoru): Etkileşim için gereken toplam serbest enerji (kcal/mol)

	Hedef adı	start1 ^(a)	end1 ^(a)	miRNA adı	start2 ^(b)	end2 ^(b)	E ^(c) (kcal/mol)
1	GPRC5A	6261	6277	hsa-miR-877-5p	3	20	-23.71
2	GPRC5A	4035	4049	hsa-miR-940	3	17	-19.3
3	GPRC5A	5847	5870	hsa-miR-214-3p	1	22	-19.29
4	GPRC5A	4234	4250	hsa-miR-151a-5p	3	20	-17.41
5	GPRC5A	1088	1100	hsa-miR-645	4	16	-16.1
6	GPRC5A	3373	3386	hsa-miR-665	3	16	-15.97
7	GPRC5A	5444	5462	hsa-miR-1343-3p	4	19	-15.69
8	GPRC5A	5579	5590	hsa-miR-761	1	12	-15.62
9	GPRC5A	1707	1724	hsa-let-7d-5p	1	20	-14.52
10	GPRC5A	1934	1955	hsa-miR-512-3p	3	22	-14.09
11	GPRC5A	3878	3896	hsa-miR-199a-5p	6	23	-11.76
12	GPRC5A	1919	1928	hsa-miR-98-5p	1	10	-11.69
13	GPRC5A	4521	4528	hsa-miR-148a-3p	1	8	-10.2
14	GPRC5A	2340	2351	hsa-miR-140-3p	6	20	-8.74
15	GPRC5A	1979	1988	hsa-miR-301b-3p	1	11	-8.6
16	GPRC5A	1971	1988	hsa-miR-454-3p	1	22	-8.31
17	GPRC5A	6222	6241	hsa-miR-301a-3p	2	22	-7.19

Etkileşimlerin analiz edilmesinin ardından, hsa-miR-214-3p, circGPRC5A ve GPRC5A ile bir circRNA-miRNA-mRNA etkileşim ağı oluşturmak için en iyi aday olarak seçilmiştir. Bu nedenle, bu miRNA hakkında genel bilgiler Çizelge 4.5'te sunulmaktadır. Diğer taraftan, Şekiller 4.7 ve 4.8, bu seçilen miRNA ile her iki hedef RNA arasındaki baz çiftleşme etkileşimlerini göstermektedir.

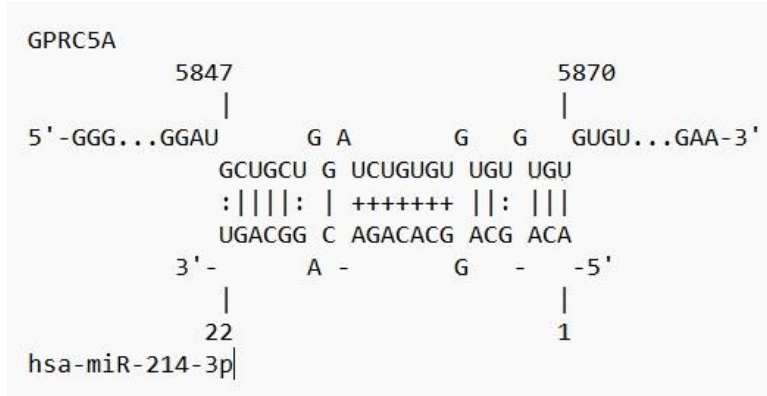
Çizelge 4.5. hsa-miR-214-3p ile ilişkili bilgiler.

Gen Ailesi	mir-214		Sekans (5' -> 3') (22 nts)
Öncü	hsa-mir-214	Olgun	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
miRBase erişim numarası	MIMAT0000271	Seed	CAGCAGG



Şekil 4.7. hsa-miR-214-3p ve circGPC5A arasındaki etkileşim bölgelerini gösteren görsel hizalama.

Dikey çizgiler (|), bazların tamamlayıcı şekilde eşleştiği kanonik eşleşmeleri temsil eder (A-U, G-C)



Şekil 4.8. hsa-miR-214-3p ve GPRC5A mRNA arasındaki etkileşim bölgelerini gösteren görsel hizalama.

Dikey çizgiler (|), bazların tamamlayıcı şekilde eşleştiği kanonik eşleşmeleri temsil eder (A-U, G-C); iki nokta üst üste işareti (:) ise bazların temas ettiği ancak geleneksel tamamlayıcılık kuralına uymadığı kanonik olmayan eşleşmeleri gösterir; artı işaretleri (+) ise eşleşmede uyumsuzlukları veya etkileşimin mükemmel olmadığı bölgeleri gösterebilir.

Ayrıca, IntaRNA yazılımı, hsa-miR-214-3p ile circGPRC5A arasında daha önce sunulandan daha az negatif E değeriyle üç başka olası etkileşim göstermektedir. Bu etkileşimler Çizelge 4.6'da rapor edilmiştir.

Çizelge 4.6. circGPRC5A ve hsa-miR-214-3p arasındaki öngörülen etkileşimler.

	Hedef adı	start1	end1	miRNA adı	start2	end2	E (kcal/mol)
1	circGPRC5A	328	346	hsa-miR-214-3p	2	21	-18.95
2	circGPRC5A	763	781	hsa-miR-214-3p	2	20	-10.95
3	circGPRC5A	391	403	hsa-miR-214-3p	2	18	-6.4
4	circGPRC5A	839	845	hsa-miR-214-3p	2	8	-5.25

4.6. miRNA Ekspresyonu ile İlgili Konular

4.6.1. Hücre hatlarından izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu

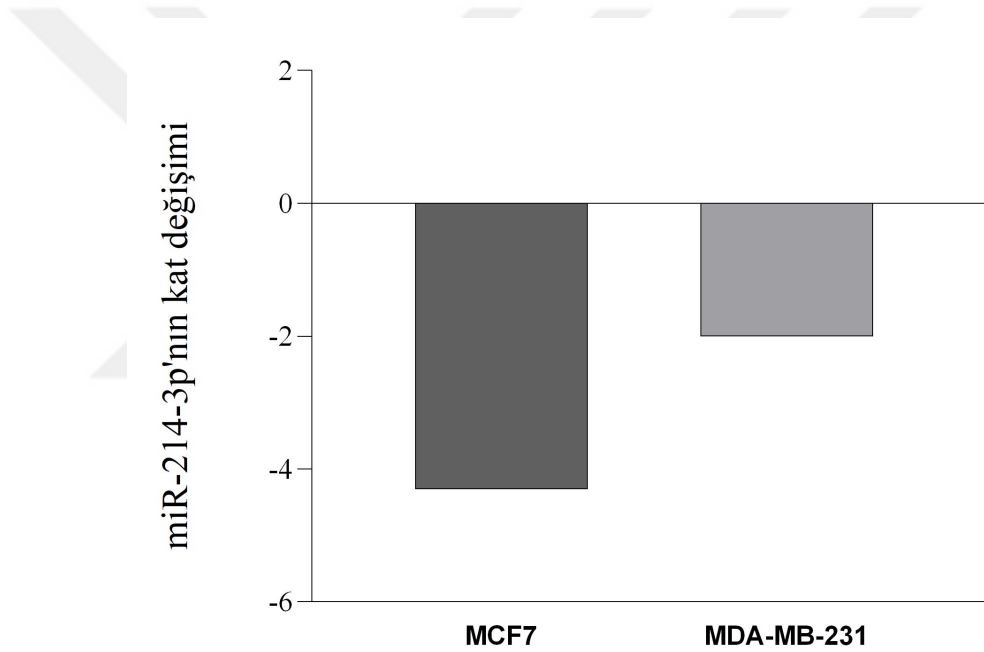
MCF10A, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarından miR-214-3p analizine yönelik olarak izole edilen toplam RNA konsantrasyonları Çizelge 4.7'de raporlanmıştır. Bu hücre hatları arasında en yüksek RNA konsantrasyonu MDA-MB-231'de gözlemlenmiş, bunu MCF7 takip etmiş ve en düşük konsantrasyon MCF10A'dan elde edilmiştir. A260/280 ve A260/230 saflık oranları, protein, tuz veya fenol gibi kirleticilerin önemli bir varlığı olmaksızın, iyi kalitede RNA elde edildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Ekstrakte edilen RNA'nın konsantrasyonları ve kalitesi.

Hücre hattı örneği	RNA Konsantrasyon (ng/uL)	A260/280	A260/230
MCF10A	449,7	2,03	2,03
MCF7	702,0	2,06	2,17
MDA-MB-231	780,8	2,05	2,19

4.6.2. Meme kanseri hücrelerinde miR-214-3p ekspresyon düzeyi

In silico analiz yoluyla seçilen miRNA'nın meme kanseri hücre hatlarında regülasyonunun artıp artmadığını belirlemek amacıyla stem-loop RT-qPCR yöntemi uygulanmıştır. Ancak, elde edilen sonuçlar tam tersini göstermiştir: miR-214-3p'nin regülasyonu, MCF10A ile karşılaştırıldığında MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde azalmıştır (Şekil 4.9). Bununla birlikte, primerlerin özgüllüğü doğrulanmadığı için (Ek Şekil 7), bu sonuçlar kesin olarak değerlendirilemez; bu durum, kantifikasyonun doğruluğunu etkilemiş olabilir.



Şekil 4.9. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında miR214-3p'nin ifadesinin kat değişimi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, diğerkanser türleri gibi, sadece fiziksel değişiklikler yoluyla değil, aynı zamanda duygusal, sosyal ve ekonomik etkileri nedeniyle bireylerin yaşam kalitesini derinden etkileyen bir hastalıktır. Biyolojik çeşitlilikle karakterize edilen karmaşık bir patolojidir ve bu durum, tanı ve tedavi stratejilerinin seçimini doğrudan etkilediğinden önemli bir zorluk teşkil etmektedir.

Günümüzde meme kanseri tedavisi, önemli heterojenliği ve çeşitli moleküler alt tipleri ile klinik davranış kalıplarını göz önünde bulundurarak, biyolojik profiline göre belirlenmektedir. Bu nedenle, birçok vakada tedavi cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve endokrinoterapilerin kombinasyonunu gerektirmektedir. Örneğin, HER2 pozitif tümörlerde trastuzumab gibi anti-HER2 monoklonal antikolarla biyolojik tedaviler uygulanmaktadır. Östrojen veya progesteron reseptörü pozitif tümörlerde endokrinoterapi olumlu sonuçlar göstermiştir. Ancak, bu molekülleri ifade etmeyen üçlü negatif meme kanserlerinde (TNBC) bu tedaviler etkisiz olup, tedavi seçenekleri sadece cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile sınırlıdır (Katsura ve ark., 2022).

Bu zorluklar, meme kanseri gelişimi ve progresyonunda rol oynayan etiyojoloji, biyoloji ve tüm etkenlerin daha iyi anlaşılması ihtiyacını ve yeni tanı ile tedavi alternatiflerinin keşfini acil kılmaktadır.

Son zamanlarda, meme kanseri de dahil olmak üzere kanser araştırmalarında kodlamayan RNA'lar, çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesindeki kritik rolleri nedeniyle önem kazanmıştır. Tanısal biyobelirteç olarak potansiyelleri gösterilmiş ve meme kanseri tedavisinde terapötik araç olarak uygulanmaları aktif şekilde araştırılmaktadır. Özellikle, yapısal avantajları nedeniyle klinik uygulamalar için umut vadeden circRNA'lar büyük ilgi çekmiştir.

Bu çalışma, kanser biyolojisinde önemli bir rolü olan GPRC5A geninden türeyen dairesel RNA circGPRC5A'ya odaklanmıştır. GPRC5A, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve homeostaz gibi çok sayıda fizyolojik süreçte sinyal kaskadlarında genel

aracilar olarak görev yapan G proteinine bağlı reseptör (GPCR) ailesinden bir proteini kodlamaktadır.

Bu proteinin hücresel süreçlerin geniş spektrumunda yer alması nedeniyle, bu proteinin anormal aktivasyonu veya gen regülasyonundaki bozukluklardan kaynaklanan ifade varyasyonları, meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine yol açabilmektedir (Gu ve ark., 2018). Ayrıca circGPCR5A'nın mesane kanserinde GPCR5A'yı düzenleyerek tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, circGPCR5A'nın meme kanseri patolojisinde de rol oynayıp oynamadığını değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla, meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA-MB-231'de circGPCR5A ve GPCR5A'nın ifade seviyeleri, kontrol olarak kullanılan epitelial hücre hattı MCF10A ile karşılaştırıldı.

Sonuçlarımız, circGPCR5A ve GPCR5A mRNA'nın meme kanserinde daha önce bildirilmemiş bir şekilde düzensiz regüle olduğunu ortaya koymuştur. MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, MCF10A'ya kıyasla her iki molekülün ifade seviyelerinin azaldığı görülmüştür.

Daha önce bahsedildiği gibi, Gu ve ark. (2018), circGPCR5A düzenlemesini çalışmış ve bizim bulgularımızın aksine, mesane tümörleri ve mesane kanseri kök hücrelerinde circGPCR5A ve GPCR5A'nın regülasyonunun arttığını rapor etmiştir.

Benzer şekilde, meme kanseri hücre hatlarında gözlemlenen GPCR5A'nın regülasyonunun azaldığını, Nagahata ve ark. (2005) ile Dairkee ve ark.'nın (2009) normal meme hücrelerine kıyasla meme kanseri hücrelerinde yüksek GPCR5A ekspresyonu rapor etmeleriyle çelişmektedir. Ancak sonraki yıllarda, Yang ve ark. (2021) çalışmalarında kullandıkları tüm meme kanseri hücre hatlarında (MCF7 ve MDA-MB-231 dahil) GPCR5A ekspresyonunun MCF10A kontrolünden daha düşük olduğunu bildirmiştir. Özellikle, MDA-MB-231'in MCF7'den daha belirgin bir regülasyon azalması gösterdiği, bu çalışmanın sonuçlarıyla tamamen uyumludur.

İncelenen her iki meme kanseri hücre hattında circGPCR5A ve GPCR5A'nın düzensiz regülasyonu, bu moleküllerin meme kanseri patogenezinde rol oynayabileceğini

düşündürmektedir. Bu durum, her iki molekülün MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla regülasyonunun azaldığı göz önüne alındığında özellikle önemlidir.

MDA-MB-231, MCF7'ye göre çok daha agresif bir alt tip olan TNBC hücre hattıdır. ER, PR ve HER2 ekspresyonunun yanı sıra mutasyona uğramış p53 taşımaktadır, oysa MCF7, normal (yabancıl tip) p53 ekspresyonuna sahiptir. Bu ayrım, p53'ün DNA'ya bağlanıp GPRC5A ekspresyonunu baskılayan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı bildirilmiş olması nedeniyle önemlidir (Wu ve ark., 2005).

TP53, yaygın olarak tümör baskılayıcı bir gen olarak bilinse de, fonksiyon kaybı mutasyonlarının kanser progresyonunu ve kötü prognozu teşvik etmesi yanında, rolü daha karmaşıktır. Mutant p53'ün, kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde birikimine bağlı olarak kazanılmış işlev (gain-of-function, GOF) mekanizmasıyla onkojenik rolü olduğu yönünde önemli kanıtlar bulunmaktadır (Liu ve ark., 2024).

Hollestelle ve ark. (2010), çeşitli meme kanseri hücre hatlarının moleküler karakterizasyonu ile, MDA-MB-231'de p53'ün missense mutasyonlu ve aşırı eksprese (overexpressed) olduğunu bildirmiştir.

Wu ve ark. (2005)'in GPRC5A üzerindeki baskılayıcı p53 fonksiyonu göz önüne alındığında, MDA-MB-231'deki p53 aşırı ekspresyonunun, circGPRC5A'nın düzenleyici etkisiyle birlikte, GPRC5A'nın belirgin azalan regülasyonuna neden olabileceği çıkarılabilir. Wu ve ark. (2005) mutant p53 taşıyan TNBC hücrelerinde GPRC5A aşırı ekspresyonu bildirmiş olsalar da, MDA-MB-231 bu çalışmaya dahil edilmemiştir.

MCF7 için ise, normal p53 ekspresyonuna sahip olması (Hollestelle ve ark., 2010; Wu ve ark., 2005) ve circGPRC5A'nın regülasyonunun azalması, MDA-MB-231'e kıyasla daha ılımlı düzeyde düşük GPRC5A ekspresyonunu açıklayabilir.

Ayrıca circGPRC5A ve GPRC5A'nın paralel ifade profili, circRNA-miRNA-mRNA etkileşim ağında, dairesel RNA'ların tipik olarak hedef mRNA ile aynı ifade paterni gösterdiği, karşılık gelen miRNA'ların ise ters yönde ifade edildiği dikkate alındığında, miRNA'lar aracılığıyla düzenleyici bir mekanizmayı akla getirmektedir.

Bu doğrultuda, MCF10A, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında miR-214-3p ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür.

miR-214-3p seçimi, hem GPRC5A hem de circGPRC5A ile yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri ve enerji skorları gösteren korunan bağlanma bölgelerinin varlığına dayanan *in silico* biyoinformatik analizlere dayanmaktadır.

Ancak önceki literatürde miR-214-3p'nin meme kanseri hastalarında osteolitik kemik metastazlarında (Liu ve ark., 2017) ve TNBC dokularında (Ren ve ark., 2024) aşırı ifadesi rapor edilmesine rağmen, çalışmamızda miR-214-3p tüm kanser hücre hatlarında regülasyonunun azaldığı bulunmuştur.

Bu bulgular, qPCR'de miRNA özgül amplifikasyonu için kullanılan primerlerde gözlemlenen özgüllük eksikliği nedeniyle dikkatle yorumlanmalıdır. Bu nedenle, miR-214-3p'nin daha doğru kantifikasyonu için ek analizler veya alternatif olarak diğer miRNA adaylarının araştırılması ve çift-lüminesans (dual-luciferase), RNA immünopresipitasyon (RIP) veya CLIP-seq gibi deneysel validasyon yöntemleriyle circGPRC5A ile seçilen miRNA ve miRNA ile GPRC5A arasındaki etkileşimin doğrulanması gerekmektedir.

Ayrıca, circGPRC5A-miRNA-GPRC5A düzenleyici ekseninin meme kanseri tümörjenezindeki rolünü açıklamak için fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunlar, circRNA'lar için plazmidler ile aşırı ifade ve siRNA veya shRNA kullanarak gen susturma yaklaşımlarını, ayrıca miRNA inhibitörleri, süngerleri, mimikleri veya ekspresyon plazmidleri kullanılarak işlevsel rollerinin değerlendirilmesini içermelidir.

Son olarak, daha fazla sayıda meme kanseri hücre hattının eklenmesi, tümör alt tiplerinin temsil gücünü artıracaktır.

Bu ön çalışmanın sonuçları birlikte ele alındığında, circGPRC5A'nın meme kanseri patogeneze potansiyel olarak dahil olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle MDA-MB-231 hücrelerinde gözlemlenen circGPRC5A ve GPRC5A ekspresyonundaki azalma göz önünde bulundurulduğunda, bu düzensizliğin altında yatan mekanizmaların, p53'ün rolü de dahil olmak üzere, daha ayrıntılı olarak araştırılmasının önemi

vurgulanmaktadır. Nitekim, GPRC5A'nın tümör progresyonunda, EGFR ile ilişkili sinyal yoluna ve onun alt kolu olan PI3K/Akt sinyal yoluna katılımı yoluyla yer aldığı daha önce gösterilmiştir. Bu yolların proliferasyon, sağkalım ve apoptoz gibi temel hücrel işlevlerle ilişkili olması, GPRC5A ekspresyonunun nasıl düzenlendiğini anlamayı daha da önemli kılmaktadır (Yang ve ark., 2016; Yang ve ark., 2021).

circRNA/miRNA/mRNA düzenleyici eksenini, meme kanserinin erken tanı ve prognozunda moleküler biyobelirteç olarak taşıdığı potansiyel nedeniyle giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu bağlamda, circGPRC5A'nın miRNA'lar aracılığıyla GPRC5A üzerindeki etkileşimini ve düzenleyici etkisini doğrulamak ve ayrıca meme kanserinde tanısallık, prognostik veya terapötik bir biyobelirteç olarak potansiyelini değerlendirmek amacıyla ek fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır; zira bu çalışmada elde edilen sonuçlar kesinlik taşımamaktadır.

Özetle, bu çalışma ilk defa, meme kanseri hücrelerinde circGPRC5A ve GPRC5A'nın ifadesinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bu da bu genlerin tümör progresyonundaki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. Ayrıca, bu sonuçlar, GPRC5A'nın biyolojik fonksiyonlarının ve düzenleyici mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir.

|



KAYNAKLAR

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *elife*, **4**, <https://doi.org/10.7554/eLife.05005.001>.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, **50**, 1-23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, **136**(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bayraktar, S., & Arun, B. K. (2019). Epidemiology, risk factors, and prevention. In A. Aydiner, A. İğci, & A. Soran, A. (Eds.). *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, (pp. 39-61). Springer International Publishing Switzerland.
- Bofill-De Ros, X., & Vang Ørom, U. A. (2024). Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biology*, **21**(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741>
- Brandenburger, T., Salgado Somoza, A., Devaux, Y., & Lorenzen, J. M. (2018). Noncoding RNAs in acute kidney injury. *Kidney international*, **94**(5), 870–881. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.06.033>
- Cai, Y., Li, W.-F., Sun, Y., & Liu, K. (2017). Downregulation of microRNA-645 suppresses breast cancer cell metastasis via targeting DCDC2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **21**, 4129-4136.
- Cao, L., Wang, M., Dong, Y., Xu, B., Chen, J., Ding, Y., Qiu, S., Li, L., Karamfilova Zaharieva, E., Zhou, X., & Xu, Y. (2020). Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1 α /HK2. *Cell Death and Disease*, **11**(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2336-0>
- Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell*, **73**(5), 1019–1030. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90279-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90279-y)
- Chaturvedi, A., & Sirohi, B. (2022). Classification of Breast Cancer. In S. Mohan Bose (Ed.). *Breast Cancer: Comprehensive Management* (pp. 71-85). Springer Nature Singapore
- Chavez, K. J., Garimella, S. v., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, **32**(1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **33**(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, L. L., & Kim, V. N. (2024). Small and long non-coding RNAs: Past, present, and future. *Cell*, **187**(23), 6451–6485. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.024>
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, **48**(D1), D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Chen, W. J., Ye, Q. Q., Wu, H. T., Wu, Z., Lan, Y. Z., Fang, Z. X., Lin, W. T., & Liu, J. (2024). MiR-338–5p, a novel metastasis-related miRNA, inhibits triple-negative breast cancer progression by targeting the ETS1/NOTCH1 axis. *Heliyon*, **10**(15). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34949>

- 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>
- Cheng, Y., & Lotan, R. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid- inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(52), 35008–35015.
- Cheng, L., Yang, S., Yang, Y., Zhang, W., Xiao, H., Gao, H., Deng, X., & Zhang, Q. (2012). Global gene expression and functional network analysis of gastric cancer identify extended pathway maps and GPRC5A as a potential biomarker. *Cancer letters*, **326**(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.031>
- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, **35**(6), 3147-3154.
- Dairkee, S. H., Sayeed, A., Luciani, G., Champion, S., Zhenhang, M., Jakkula, L. R., Feiler, H. S., Gray, J. W., & Moore, D. H. (2009). Immutable functional attributes of histologic grade revealed by context-independent gene expression in primary breast cancer cells. *Cancer Research*, **69**(19), 7826–7834. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1564>
- Darvishi, N., Rahimi, K., Mansouri, K., Fathi, F., Menbari, M. N., Mohammadi, G., & Abdi, M. (2020). MiR-646 prevents proliferation and progression of human breast cancer cell lines by suppressing HDAC2 expression. *Molecular and Cellular Probes*, **53**. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101649>
- Dexian, W., Fan, Z., Min, L., Zhimin, F., Jiulong, M., Jiahua, J., Sennan, Q., Peng, H., Wenqing, Z., Kaiqi, F., Lu, L., Wentao, Z., Xiangjun, L., & Liqun, R. (2025). CircDUSP16 mediates the effect of triple-negative breast cancer in pirarubicin via the miR-1224-3p/TFDP2 axis. *Biochemical Pharmacology*, **232**. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116719>
- Dinami, R., Buemi, V., Sestito, R., Zappone, A., Ciani, Y., Mano, M., Petti, E., Sacconi, A., Blandino, G., Giacca, M., Piazza, S., Benetti, R., & Schoeftner, S. (2017). Epigenetic silencing of miR-296 and miR-512 ensures hTERT dependent apoptosis protection and telomere maintenance in basal-type breast cancer cells. *Oncotarget*, **8** (56). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21180>
- Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer’s biology: an eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, **33**(1). <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00088-y>
- Dong, G., Wang, X., Wang, X., Jia, Y., Jia, Y., Zhao, W., & Tong, Z. (2024). Circ_0084653 promotes the tumor progression and immune escape in triple-negative breast cancer via the deubiquitination of MYC and upregulation of SOX5. *International Journal of Biological Macromolecules*, **280**. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135655>
- Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2016). Circinteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biology*, **13**(1), 34–42. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1128065>
- Ebrahimi, A., Derakhshan, S. M., Ghavi, D., Foruzandeh, Z., & Hashemi, S. (2023). The role of mir-151a-5p in tumorigenesis; A systematic review. *Pathology Research and Practice*, **249**. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154576>

- Eger, N., Schoppe, L., Schuster, S., Laufs, U., & Boeckel, J. N. (2018). Circular RNA Splicing. *Advances in experimental medicine and biology*, **1087**, 41–52. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_4
- Duan, W. J.; BI, P. D.; MA, Y.; Liu, N. Q.; Zhen, X. (2020). MiR-512-3p regulates malignant tumor behavior and multi-drug resistance in breast cancer cells via targeting Livin. *Neoplasma*, **67**(1), 102. https://doi.org/10.4149/neo_2019_190106N18
- Fan, Y., Li, Y., Zhu, Y., Dai, G., Wu, D., Gao, Z., Zhang, L., & Xu, D. (2021). MiR-301b-3p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting NR3C2. *Journal of Oncology*, **2021**(1). <https://doi.org/10.1155/2021/8810517>
- Felekis, K., Touvana, E., Stefanou, C.h, & Deltas, C. (2010). microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*, **14**(4), 236–240.
- Foruzandeh, Z., Alivand, M. R., Ghiami-Rad, M., Zaefizadeh, M., & Ghorbian, S. (2023). Identification and validation of miR-583 and mir-877-5p as biomarkers in patients with breast cancer: an integrated experimental and bioinformatics research. *BMC Research Notes*, **16**(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06343-w>
- Fu, X., Mao, X., Yuxiang, W., Ding, X., & Li, Y. (2017). Let-7c-5p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting ERCC6 in breast cancer. *Oncology Reports*, **38**(3), 1851–1856. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5839>
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**(7014), 235-240. doi: 10.1038/nature03120
- 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>
- Gupta, M., & Goyal, N. (2022). Applied anatomy of breast cancer. In S. Mohan Bose (Ed.). *Breast Cancer: Comprehensive Management* (pp. 23-35). Springer Nature Singapore.
- 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>
- He, A., Liao, F., & Lin, X. (2024). Circ_0007351 Exerts an Oncogenic Role In Colorectal Cancer Depending on the Modulation of the miR-5195-3p/GPRC5A Cascade. *Molecular Biotechnology*, **67**(2), 617-627. <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01071-3>
- Hesari, A. R., Azizian, M., Darabi, H., Nesaei, A., Hosseini, S. A., Salarinia, R., Motaghi, A. A., & Ghasemi, F. (2019). Expression of circulating miR-17, miR-25, and miR-133 in breast cancer patients. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**(5), 7109–7114. <https://doi.org/10.1002/jcb.27984>
- Hirano, M., Zang, L., Oka, T., Ito, Y., Shimada, Y., Nishimura, Y., & Tanaka, T. (2006). Novel reciprocal regulation of cAMP signaling and apoptosis by orphan G-protein-coupled receptor GPRC5A gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, **351**(1), 185-191.
- Hirshfield, K. M., Rebbeck, T. R., & Levine, A. J. (2010). Germline Mutations and Polymorphisms in the Origins of Cancers in Women. *Journal of Oncology*, **2010**, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2010/297671>
- Hollestelle, A., Nagel, J. H. A., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., Ng, S. S., French, P. J., Peeters, J. K., Rozendaal, M. J., Riaz, M., Koopman, D. G., ten Hagen, T.

- L. M., de Leeuw, B. H. C. G. M., Zwarthoff, E. C., Teunisse, A., van der Spek, P. J., Klijn, J. G. M., Dinjens, W. N. M., ... Schutte, M. (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, **121**(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8>
- Hombach, S. & Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. In O. Slaby & G. A. Calin. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Non-coding RNAs in Colorectal Cancer*. (pp. 3-17). Springer International Publishing AG Switzerland
- Hou, J. C., Xu, Z., Zhong, S. L., Zhang, H. da, Jiang, L. H., Chen, X., Zhu, L. P., Li, J., Zhou, S. Y., Yang, S. J., He, Y. J., Wang, D. D., Deng, F., Zhang, Q., Wang, J. Y., Hu, J. H., Zhang, W., Wu, Y., Ding, L., ... Tang, J. H. (2019). Circular RNA circASS1 is downregulated in breast cancer cells MDA-MB-231 and suppressed invasion and migration. *Epigenomics*, **11**(2), 199–213. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0167>
- Hou, L., Chen, M., Yang, H., Xing, T., Li, J., Li, G., Zhang, L., Deng, S., Hu, J., Zhao, X., & Jiang, J. (2016). MiR-940 inhibited cell growth and migration in triple-negative breast cancer. *Medical Science Monitor*, **22**, 3666–3672. <https://doi.org/10.12659/MSM.897731>
- Hsu, M. T., & Coca-Prados, M. (1979). Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature*, **280**(5720), 339–340. <https://doi.org/10.1038/280339a0>
- Huang, H. Y., Lin, Y. C. D., Li, J., Huang, K. Y., Shrestha, S., Hong, H. C., Tang, Y., Chen, Y. G., Jin, C. N., Yu, Y., Xu, J. T., Li, Y. M., Cai, X. X., Zhou, Z. Y., Chen, X. H., Pei, Y. Y., Hu, L., Su, J. J., Cui, S. D., ... Huang, H. da. (2020). MiRTarBase 2020: Updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Research*, **48**(D1), D148–D154. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz896>
- Huang, S., Xie, J., Lei, S., Fan, P., Zhang, C., & Huang, Z. (2023). CircDUSP1 regulates tumor growth, metastasis, and paclitaxel sensitivity in triple-negative breast cancer by targeting miR-761/DACT2 signaling axis. *Molecular Carcinogenesis*, **62**(4), 450–463. <https://doi.org/10.1002/mc.23498>
- Jia, L., Peng, J., Chen, H., Liu, Z., Gong, J., Sun, N., Zhang, Q., & Li, L. (2024). TPTEP1 impedes the reprogramming of fatty acid metabolism in triple negative breast cancer via miR-1343-3p/SIRT3 axis. *International Journal of Biological Macromolecules*, **280**. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135792>
- Jiang, X., Xu, X., Wu, M., Guan, Z., Su, X., Chen, S., Wang, H., & Teng, L. (2018). GPRC5A: An emerging biomarker in human cancer. *BioMed Research International*, **2018**(1), 1823726. <https://doi.org/10.1155/2018/1823726>
- Kadara, H., Fujimoto, J., Men, T., Ye, X., Lotan, D., Lee, J. S., & Lotan, R. (2010). A Gprc5a tumor suppressor loss of expression signature is conserved, prevalent, and associated with survival in human lung adenocarcinomas. *Neoplasia*, **12**(6), 499–505. <https://doi.org/10.1593/neo.10390>
- Katsura, C., Ogunmwonyi, I., Kankam, H. K. N., & Saha, S. (2022). Breast cancer: Presentation, investigation and management. *British Journal of Hospital Medicine*, **83**(2). <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>
- Kehl, T., Kern, F., Backes, C., Fehlmann, T., Stöckel, D., Meese, E., Lenhof, H. P., & Keller, A. (2020). MiRPathDB 2.0: A novel release of the miRNA Pathway Dictionary Database. *Nucleic Acids Research*, **48**(D1), D142–D147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1022>

- Komatsu, S., Kitai, H., & Suzuki, H. I. (2023). Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction. *Cells*, **12**(2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12020306>
- Kong, X., Zhang, J., Li, J., Shao, J., & Fang, L. (2018). MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **501**(2), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.018>
- Kos, A., Dijkema, R., Arnberg, A. C., van der Meide, P. H., & Schellekens, H. (1986). The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*, **323**(6088), 558–560. <https://doi.org/10.1038/323558a0>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, **95**(1), 15-10. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
- Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V. W., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2019). The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nature Reviews Genetics*, **20**(11), 675–691. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>
- Lale Dogan, A. (2016). Biology and genetics of breast cancer. In A. Aydiner, A. İğci, & A. Soran, A. (Eds.). *Breast Disease: Diagnosis and Pathology* (pp. 146-160). Springer International Publishing Switzerland.
- Lang, L., Tao, J., Yang, C., & Li, W. (2022). Tumor suppressive role of microRNA-4731-5p in breast cancer through reduction of PAICS-induced FAK phosphorylation. *Cell Death Discovery*, **8**(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00938-1>
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2022). A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-coding RNA*, **8** (1). <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>
- Lettlova, S., Brynychova, V., Blecha, J., Vrana, D., Vondrusova, M., Soucek, P., & Truksa, J. (2018). MiR-301a-3p Suppresses Estrogen Signaling by Directly Inhibiting ESR1 in ERα Positive Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **46**(6), 2601–2615. <https://doi.org/10.1159/000489687>
- Li, D., Hu, J., Song, H., Xu, H., Wu, C., Zhao, B., Xie, D., Wu, T., Zhao, J., & Fang, L. (2017). miR-143-3p targeting LIM domain kinase 1 suppresses the progression of triple-negative breast cancer cells. *American journal of translational research*, **9**(5), 2276.
- Li, D., & Li, L. (2017). MicroRNA-3666 inhibits breast cancer cell proliferation by targeting sirtuin 7. *Molecular Medicine Reports*, **16**(6), 8493–8500. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7603>
- Li, J. H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L. H., & Yang, J. H. (2014). StarBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, **42**(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
- Li, L., Wei, D., Zhang, J., Deng, R., Tang, J., & Su, D. (2022). MiR-641 Inhibited Cell Proliferation and Induced Apoptosis by Targeting NUCKS1/PI3K/AKT Signaling Pathway in Breast Cancer. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, **2022**(1). <https://doi.org/10.1155/2022/5203839>
- Li, L., Zhang, X., Lin, Y., Ren, X., Xie, T., Lin, J., Wu, S., & Ye, Q. (2023). Let-7b-5p inhibits breast cancer cell growth and metastasis via repression of hexokinase 2-

- mediated aerobic glycolysis. *Cell Death Discovery*, **9**(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01412-2>
- Li, W., Jin, X., Zhao, Y., Dai, J., & Cai, Y. (2020). Long noncoding RNA GAS6-AS2 sponges microRNA-493, thereby enhancing the malignant characteristics of breast cancer cells via upregulation of FUT4. *Pathology Research and Practice*, **216**(2). <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152772>
- Li, W., Wang, H., Zhang, J., Zhai, L., Chen, W., & Zhao, C. (2016). miR-199a-5p regulates β 1 integrin through Ets-1 to suppress invasion in breast cancer. *Cancer Science*, **107**(7), 916–923. <https://doi.org/10.1111/cas.12952>
- Li, X., Wang, Q., Rui, Y., Zhang, C., Wang, W., Gu, J., Tang, J., & Ding, Y. (2019). HOXC13-AS promotes breast cancer cell growth through regulating miR-497-5p/PTEN axis. *Journal of Cellular Physiology*, **234**(12), 22343–22351. <https://doi.org/10.1002/jcp.28800>
- 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), e12661. <https://doi.org/10.1111/cpr.12661>
- Lin, W., Mo, C. Q., Kong, L. J., Chen, L., Wu, K. L., & Wu, X. (2023). FTO-mediated epigenetic upregulation of LINC01559 confers cell resistance to docetaxel in breast carcinoma by suppressing miR-1343-3p. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, **39**(9), 873–882. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12728>
- Litke, J. L., & Jaffrey, S. R. (2019). Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nature Biotechnology*, **37**(6), 667–675. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0090-6>
- Liu, H., Xiang, L., & Mei, Y. (2022). MiR-877-5p Inhibits Epithelial Mesenchymal Transformation of Breast Cancer Cells by Targeting FGB. *Disease Markers*, **2022**(1). <https://doi.org/10.1155/2022/4882375>
- Liu, J., Li, D., Dang, L., Liang, C., Guo, B., Lu, C., He, X., Cheung, H. Y. S., He, B., Liu, B., Li, F., Lu, J., Wang, L., Shaikh, A. B., Jiang, F., Lu, C., Peng, S., Zhang, Z., Zhang, B. T., ... Zhang, G. (2017). Osteoclastic miR-214 targets TRAF3 to contribute to osteolytic bone metastasis of breast cancer. *Scientific Reports*, **7**. <https://doi.org/10.1038/srep40487>
- Liu, Y., Su, Z., Tavana, O., & Gu, W. (2024). Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell*, **42**(6), 946–967. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.04.009>
- Luo, N., Liu, S., Li, X., Hu, Y., & Zhang, K. (2021). Circular RNA circHIPK3 promotes breast cancer progression via sponging MiR-326. *Cell Cycle*, **20**(13), 1320–1333. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1939476>
- Luo, W., Zhou, Y., Wang, J., Wang, K., Lin, Q., Li, Y., Xie, Y., Li, M., Wang, J., & Xiong, L. (2024). YTHDF1's Regulatory Involvement in Breast Cancer Prognosis, Immunity, and the ceRNA Network. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**(3). <https://doi.org/10.3390/ijms25031879>
- Mangolini, A., Ferracin, M., Zanzi, M. V., Saccenti, E., Ebnaof, S. O., Poma, V. V., Sanz, J. M., Passaro, A., Pedriali, M., Frassoldati, A., Querzoli, P., Sabbioni, S., Carcoforo, P., Hollingsworth, A., & Negrini, M. (2015). Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomarker Research*, **3**(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-015-0037-0>

- Mann, M., Wright, P. R., & Backofen, R. (2017). IntaRNA 2.0: Enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, **45**(W1), W435–W439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx279>
- McGuire, K. P. (2016). Breast anatomy and physiology. In A. Aydiner, A. İğci, & A. Soran, A. (Eds.). *Breast Disease: Diagnosis and Pathology* (pp. 1-19). Springer International Publishing Switzerland.
- Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **12**(3), e1627.
- Meganck, R. M., Borchardt, E. K., Castellanos Rivera, R. M., Scalabrino, M. L., Wilusz, J. E., Marzluff, W. F., & Asokan, A. (2018). Tissue-Dependent Expression and Translation of Circular RNAs with Recombinant AAV Vectors In Vivo. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **13**, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.08.008>
- Mehta, S. L., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2020). Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases. *Progress in Neurobiology*, **186**. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101746>
- Menbari, M. N., Rahimi, K., Ahmadi, A., Mohammadi-Yeganeh, S., Elyasi, A., Darvishi, N., Hosseini, V., & Abdi, M. (2020). miR-483-3p suppresses the proliferation and progression of human triple negative breast cancer cells by targeting the HDAC8 oncogene. *Journal of Cellular Physiology*, **235**(3), 2631–2642. <https://doi.org/10.1002/jcp.29167>
- Meng, X., Li, X., Zhang, P., Wang, J., Zhou, Y., & Chen, M. (2017). Circular RNA: An emerging key player in RNA world. *Briefings in Bioinformatics*, **18**(4), 547–557. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw045>
- 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>
- Mohamadzade, Z., Mahjoubi, F., & Soltani, B. M. (2021). Introduction of hsa-miR-512-3p as a new regulator of HER2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **185**(1), 95–106. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05937-3>
- Nagahata, T., Sato, T., Tomura, A., Onda, M., Nishikawa, K., & Emi, M. (2005). Identification of RAI3 as a therapeutic target for breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **12**(1), 65–73. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00890>
- National Cancer Institute. (2025, May 6). *Common cancer types*. National Institutes of Health. <https://www.cancer.gov/types/common-cancers>
- Nemeth, K., Bayraktar, R., Ferracin, M., & Calin, G. A. (2024). Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, **25**(3), 211-232.
- Nguyen, T. H., Nguyen, H. N., & Vu, T. N. (2024). CircNetVis: an interactive web application for visualizing interaction networks of circular RNAs. *BMC Bioinformatics*, **25**(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-024-05646-4>
- 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. *Cell*, **64**, 607-613.
- Pan, Y., Jiao, G., Wang, C., Yang, J., & Yang, W. (2016). MicroRNA-421 inhibits breast cancer metastasis by targeting metastasis associated 1. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **83**, 1398–1406. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.058>

- Panda, A. C. (2018). Circular RNAs Act as miRNASponges. In J. Xiao (Ed.). *Circular RNAs, Advances in Experimental Medicine and Biology*. (pp. 67-79). Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_6
- Pandey, P. R., Munk, R., Kundu, G., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2020). Methods for analysis of circular RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **11**(1). <https://doi.org/10.1002/wrna.1566>
- Panni, S., Lovering, R. C., Porras, P., & Orchard, S. (2020). Non-coding RNA regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, **1863**(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>
- Pei, X., Zhang, Y., Wang, X., Xue, B., Sun, M., & Li, H. (2020). Circular RNA circ-ZEB1 acts as an oncogene in triple negative breast cancer via sponging miR-448. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **126**. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105798>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**(9).
- Pisignano, G., Michael, D. C., Visal, T. H., Pirlog, R., Lodomery, M., & Calin, G. A. (2023). Going circular: history, present, and future of circRNAs in cancer. *Oncogene*, **42**(38), 2783–2800. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02780-w>
- Qi, L., Sun, B., Yang, B., & Lu, S. (2022). circRNA RPPH1 Facilitates the Aggravation of Breast Cancer Development by Regulating miR-542-3p/ARHGAP1. *Pathway. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **37**(8), 708–719. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.4381>
- Qiu, X., Zhang, Q., Deng, Q., & Li, Q. (2023). Circular RNA hsa_circ_0012673 Promotes Breast Cancer Progression via miR-576-3p/SOX4 Axis. *Molecular Biotechnology*, **65**(1), 61–71. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00524-x>
- Ren, J., Chen, W., Zhou, Y., Sun, J., & Jiang, G. (2024). The novel circRNA circ_0045881 inhibits cell proliferation and invasion by targeting mir-214-3p in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, **24**(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-024-12007-0>
- Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., & Kleinschmidt, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**(11), 3852–3856. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3852>
- Salem, O., Erdem, N., Jung, J., Münstermann, E., Wörner, A., Wilhelm, H., Wiemann, S., & Körner, C. (2016). The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC Genomics*, **17**(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2869-x>
- Sevinc, E. D., Egeli, U., Cecener, G., Tezcan, G., Tunca, B., Gokgoz, S., Tasdelen, I., Tolunay, S., & Evrensel, T. (2015). Association of miR-1266 with recurrence/metastasis potential in estrogen receptor positive breast cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **16**(1), 291–297. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.1.291>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, **13**(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shi, W., Tang, T., Li, X., Deng, S., Li, R., Wang, Y., Wang, Y., Xia, T., Zhang, Y., Zen, K., Jin, L., & Pan, Y. (2019). Methylation-mediated silencing of miR-133a-3p promotes

- breast cancer cell migration and stemness via miR-133a-3p/MAML1/DNMT3A positive feedback loop. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1400-z>
- Shrestha, S., Yang, C. D., Hong, H. C., Chou, C. H., Tai, C. S., Chiew, M. Y., Chen, W. L., Weng, S. L., Chen, C. C., Chang, Y. A., Lee, M. L., Huang, W. Y., Hsu, S. da, Chen, Y. C., & Huang, H. da. (2018). Integrated microRNA–mRNA analysis reveals miR-204 inhibits cell proliferation in gastric cancer by targeting CKS1B, CXCL1 and GPRC5A. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010087>
- Sokolenko, A. P., Bulanova, D. R., Iyevleva, A. G., Aleksakhina, S. N., Preobrazhenskaya, E. v., Ivantsov, A. O., Kuligina, E. S., Mitiushkina, N. v., Suspitsin, E. N., Yanus, G. A., Zaitseva, O. A., Yatsuk, O. S., Togo, A. v., Kota, P., Dixon, J. M., Larionov, A. A., Kuznetsov, S. G., & Imyanitov, E. N. (2014). High prevalence of GPRC5A germline mutations in BRCA1-mutant breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, 134(10), 2352–2358. <https://doi.org/10.1002/ijc.28569>
- Sticht, C., de La Torre, C., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). Mirwalk: An online resource for prediction of microrna binding sites. *PLOS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
- Sun, D., Luo, X., Ma, L., Wang, Y., & Zhang, F. (2020). Identifying of miR-98-5p/IGF1 axis contributes breast cancer progression using comprehensive bioinformatic analyses methods and experiments validation. *Life Sciences*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118435>
- Tang, C., Wang, X., Ji, C., Zheng, W., Yu, Y., Deng, X., Zhou, X., & Fang, L. (2021). The Role of miR-640: A Potential Suppressor in Breast Cancer via Wnt7b/β-catenin Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.645682>
- Tanić, M. (2012). MicroRNA expression profiles in hereditary breast cancer. (Master’s thesis) Universidad Autónoma De Madrid.
- 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>
- Tong, S., Zhu, Y., Leng, Y., Wu, Y., Xiao, X., Zhao, W., & Tan, S. (2024). Restoration of miR-299-3p promotes macrophage phagocytosis and suppresses malignant phenotypes in breast cancer carcinogenesis via dual-targeting CD47 and ABCE1. *International Immunopharmacology*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111708>
- Tsang, J. Y., & Gary, M. T. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Verduci, L., Tarcitano, E., Strano, S., Yarden, Y., & Blandino, G. (2021). CircRNAs: role in human diseases and potential use as biomarkers. In *Cell Death and Disease*, 12(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03743-3>
- Wang, C., Xu, C., Niu, R., Hu, G., Gu, Z., & Zhuang, Z. (2019). MiR-890 inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells by targeting CD147. *BMC Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5796-9>

- Wang, M., Cai, W. R., Meng, R., Chi, J. R., Li, Y. R., Chen, A. X., Yu, Y., & Cao, X. C. (2018). miR-485-5p suppresses breast cancer progression and chemosensitivity by targeting survivin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **501**(1), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.129>
- Wang, M. H., Liu, Z. H., Zhang, H. X., Liu, H. C., & Ma, L. H. (2024). Hsa_circRNA_000166 accelerates breast cancer progression via the regulation of the miR-326/ELK1 and miR-330-5p/ELK1 axes. *Annals of Medicine*, **56**(1), 2424515. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2424515>
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene* (6th ed.). Pearson/Benjamin Cummings.
- Weinberg, R. A., & Weinberg, R. A. (2006). *The biology of cancer*. WW Norton & Company
- Welsh, J. E. (2013). Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. In M. Conn (Ed.). *Animal Models for the Study of Human Disease* (pp. 997–1018). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3>
- Wu, A., Chen, Y., Liu, Y., Lai, Y., & Liu, D. (2018). miR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1. *Oncology Letters*, **16**(4), 4889–4896. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9255>
- Wu, Q., Ding, W., Mirza, A., van Arsdale, T., Wei, I., Bishop, W. R., Basso, A., McClanahan, T., Luo, L., Kirschmeier, P., Gustafson, E., Hernandez, M., & Liu, S. (2005). Integrative genomics revealed RAI3 is a cell growth-promoting gene and a novel P53 transcriptional target. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(13), 12935–12943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409901200>
- Xia, S., Feng, J., Lei, L., Hu, J., Xia, L., Wang, J., Xiang, Y., Liu, L., Zhong, S., Han, L., & He, C. (2017). Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Briefings in Bioinformatics*, **18**(6), 984–992. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw081>
- Xie, B., Ding, Q., Han, H., & Wu, D. (2013). MiRCancer: A microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics*, **29**(5), 638–644. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt014>
- Xiong, Y., Li, L., Wang, N., Wang, F., Chen, Z., Han, L., Jiang, S., & Gu, Y. (2023). Circ_0001387 regulates SKA2 to accelerate breast cancer progression through miR-136-5p. *Thoracic Cancer*, **14**(18), 1707–1718. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14916>
- Xu, J., Hu, M., Gao, Y., Wang, Y., Yuan, X., Yang, Y., Song, W., Yin, W., Gong, P., Wei, L., & Zhang, J. (2023). LncRNA MIR17HG Suppresses Breast Cancer Proliferation and Migration as ceRNA to Target FAM135A by Sponging miR-454-3p. *Molecular Biotechnology*, **65**(12), 2071–2085. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00706-1>
- Xu, J., Lin, L., Chen, Q., & Li, L. (2023). Hsa-miR-148a-3p promotes malignant behavior of breast cancer cells by downregulating DUSP1. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao Journal of Southern Medical University*, **43**(9), 1515–1524. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2023.09.09>
- Yan, C., Chen, Y., Kong, W., Fu, L., Liu, Y., Yao, Q., & Yuan, Y. (2017). PVT1-derived miR-1207-5p promotes breast cancer cell growth by targeting STAT6. *Cancer Science*, **108**(5), 868–876. <https://doi.org/10.1111/cas.13212>
- Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in Biochemistry*, **65**(4), 625–639. <https://doi.org/10.1042/EBC20200032>

- Yang, L., Ma, T., & Zhang, J. (2016). GPRC5A exerts its tumor-suppressive effects in breast cancer cells by inhibiting EGFR and its downstream pathway. *Oncology Reports*, **36**(5), 2983–2990. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5062>
- Yang, L., Zhao, S., Zhu, T., & Zhang, J. (2021). GPRC5A Is a Negative Regulator of the Pro-Survival PI3K/Akt Signaling Pathway in Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.624493>
- Yang, Y., Fan, X., Mao, M., Song, X., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Y., Yang, Y., Chen, L. L., Wang, Y., Wong, C. C., Xiao, X., & Wang, Z. (2017). Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell research*, **27**(5), 626–641. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.31>
- Yang, Z., Wu, L., Wang, A., Tang, W., Zhao, Y., Zhao, H., & Teschendorff, A. E. (2017). DbDEMC 2.0: Updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *Nucleic Acids Research*, **45**(D1), D812–D818. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1079>
- Yao, L., Chen, L., Zhou, H., Duan, F., Wang, L., & Zhang, Y. (2022). Long Noncoding RNA NEAT1 Promotes the Progression of Breast Cancer by Regulating miR-138-5p/ZFX Axis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **37**(8), 636–649. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3515>
- Ye, X., Tao, Q., Wang, Y., Cheng, Y., & Lotan, R. (2009). Mechanisms underlying the induction of the putative human tumor suppressor GPRC5A by retinoic acid. *Cancer Biology and Therapy*, **8**(10), 951–962. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.10.8244>
- Yu, M., Zhang, X., Li, H., Zhang, P., & Dong, W. (2017). MicroRNA-588 is downregulated and may have prognostic and functional roles in human breast cancer. *Medical Science Monitor*, **23**, 5690–5696. <https://doi.org/10.12659/MSM.905126>
- Zeng, H., Wang, L., Wang, J., Chen, T., Li, H., Zhang, K., Chen, J., Zhen, S., Tuluhong, D., Li, J., & Wang, S. (2018). microRNA-129-5p suppresses Adriamycin resistance in breast cancer by targeting SOX2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **651**, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.05.018>
- Zhang, H., Peng, J., Lai, J., Liu, H., Zhang, Z., Li, X., Liang, B., Chen, X., Zou, B., Lin, S., & Zhang, L. (2020). MiR-940 promotes malignant progression of breast cancer by regulating FOXO3. *Bioscience Reports*, **40**(9). <https://doi.org/10.1042/BSR20201337>
- Zhang, L., Li, L., Gao, G., Wei, G., Zheng, Y., Wang, C., Gao, N., Zhao, Y., Deng, J., Chen, H., Sun, J., Li, D., Zhang, X., & Liu, M. (2017). Elevation of GPRC5A expression in colorectal cancer promotes tumor progression through VNN-1 induced oxidative stress. *International Journal of Cancer*, **140**(12), 2734–2747. <https://doi.org/10.1002/ijc.30698>
- Zhang, M.-Y., Huang, Y.-M., Lv, X., Yang, X., Shen, S.-J., Wang, J.-G., & Zhu, J.-Y. (2024). Expression profile analysis and the role of miRNA in breast adenocarcinoma. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4147896/v1>
- Zhao, M., Zhang, M., Tao, Z., Cao, J., Wang, L., & Hu, X. (2020). miR-331-3p Suppresses Cell Proliferation in TNBC Cells by Downregulating NRP2. *Technology in Cancer Research and Treatment*, **19**. <https://doi.org/10.1177/1533033820905824>
- Zhao, X. G., Hu, J. Y., Tang, J., Yi, W., Zhang, M. Y., Deng, R., Mai, S. J., Weng, N. Q., Wang, R. Q., Liu, J., Zhang, H. Z., He, J. H., & Wang, H. Y. (2019). miR-665 expression predicts poor survival and promotes tumor metastasis by targeting NR4A3 in breast cancer. *Cell Death and Disease*, **10**(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1705-z>

- Zhao, X., Zhong, Y., Wang, X., Shen, J., & An, W. (2022). Advances in Circular RNA and Its Applications. *International Journal of Medical Sciences*, **19**(6), 975–985. <https://doi.org/10.7150/ijms.71840>
- Zheng, J., Guo, X., Gao, X., Liu, H., Tu, Y., & Zhang, Y. (2014). Overexpression of retinoic acid-induced protein 3 predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, **16**(1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s12094-013-1040-2>
- Zhong, S., & Feng, J. (2022). CircPrimer 2.0: a software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. *BMC Bioinformatics*, **23**(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04705-y>
- Zhou, H., & Rigoutsos, I. (2014). MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA*, **20**(9), 1431–1439. <https://doi.org/10.1261/rna.045757.114>
- Zhou, H., Telonis, A. G., Jing, Y., Xia, N. L., Biederman, L., Jimbo, M., Blanco, F., Londin, E., Brody, J. R., & Rigoutsos, I. (2016). GPRC5A is a potential oncogene in pancreatic ductal adenocarcinoma cells that is upregulated by gemcitabine with help from HuR. *Cell Death and Disease*, **7**(7). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.169>
- Zhou, T., Lin, K., Nie, J., Pan, B., He, B., Pan, Y., Sun, H., Xu, T., & Wang, S. (2021). LncRNA SPINT1-AS1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by sponging let-7 a/b/i-5p. *Pathology Research and Practice*, **217**. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153268>
- Zhou, Y. H., & Huang, J. Y. (2024). Expression and Significance of LINC02418 in Breast Cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, **16**, 233–243. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S454054>
- Zhou, Y., Wang, B., Wang, Y., Chen, G., Lian, Q., & Wang, H. (2019). miR-140-3p inhibits breast cancer proliferation and migration by directly regulating the expression of tripartite motif 28. *Oncology Letters*, **17**(4), 3835–3841. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10038>
- Zhu, J., Dai, H., Li, X., Guo, L., Sun, X., Zheng, Z., & Xu, C. (2023). LncRNA TRG-AS1 inhibits bone metastasis of breast cancer by the miR-877–5p/WISP2 axis. *Pathology Research and Practice*, **243**. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154360>
- Zou, Y., Zhong, C., Hu, Z., & Duan, S. (2021). MiR-873-5p: A Potential Molecular Marker for Cancer Diagnosis and Prognosis. *Frontiers in Oncology*, **11**. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743701>

EKLER

- EK 1 TRIS-ASETAT (TAE) TAMPONUNUN HAZIRLANMASI (PH 8.0)**
- EK 2 DIVERGENT PRIMER TASARIM**
- EK 3 HEDEF MOLEKÜLLERİN ERİME EĞRİLERİ**
- EK 4 RNA ÖRNEKLERİNİN %1 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ**
- EK 5 HEDEF GENLERİN CT DEĞERLERİ**
- EK 6 CIRCGPC5A VE GPC5A İLE İLİŞKİLİ ÖZGÜL MIRNA'LAR**
- EK 7 MIRNA TAYİNİNDE ERİME EĞRİLERİ**



EK 1. TRIS-ASETAT (TAE) TAMPONUNUN HAZIRLANMASI (PH 8.0)

İlk olarak, aşağıdaki bileşenler bir şişeye eklenerek 50X TAE özeltisi (500 mL hacminde) hazırlandı:

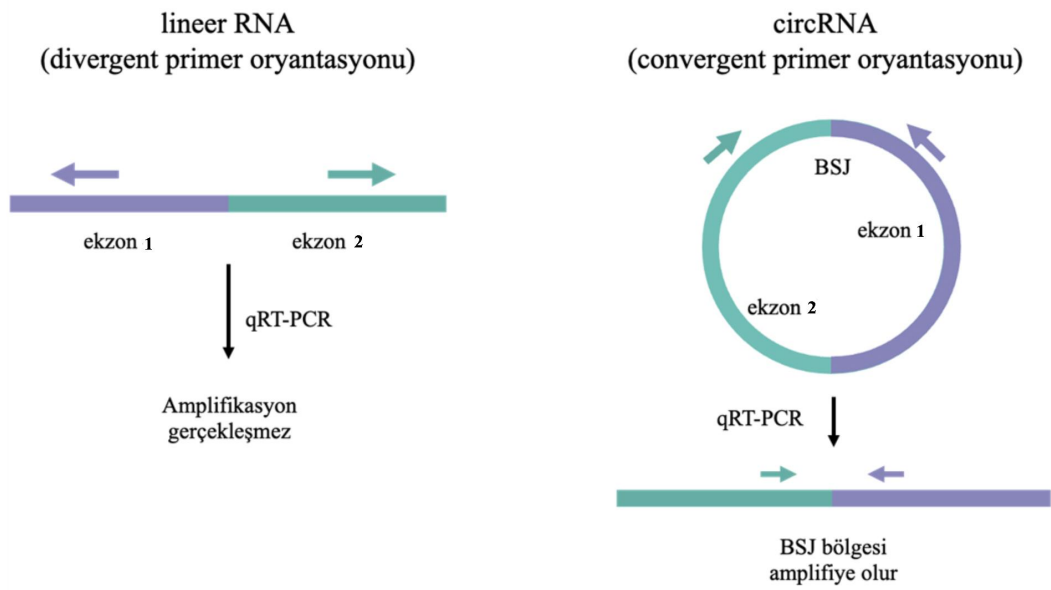
- 121 g Tris + 350 mL su
- 28,55 mL glasiyal asetik asit
- 50 mL 0,5 M EDTA

Toplam hacim 500 mL'ye saf su ile tamamlandı ve pH 8.0 olacak şekilde ayarlandı. Son olarak, 50X TAE özeltisi 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

0,5 M EDTA'nın (50 mL hacminde) hazırlanması için, 9,31 g EDTA tartıldı ve 50 mL su içinde çözülerek pH 8.0'a ayarlandı.

EK 2. DIVERGENT PRIMER TASARIMI

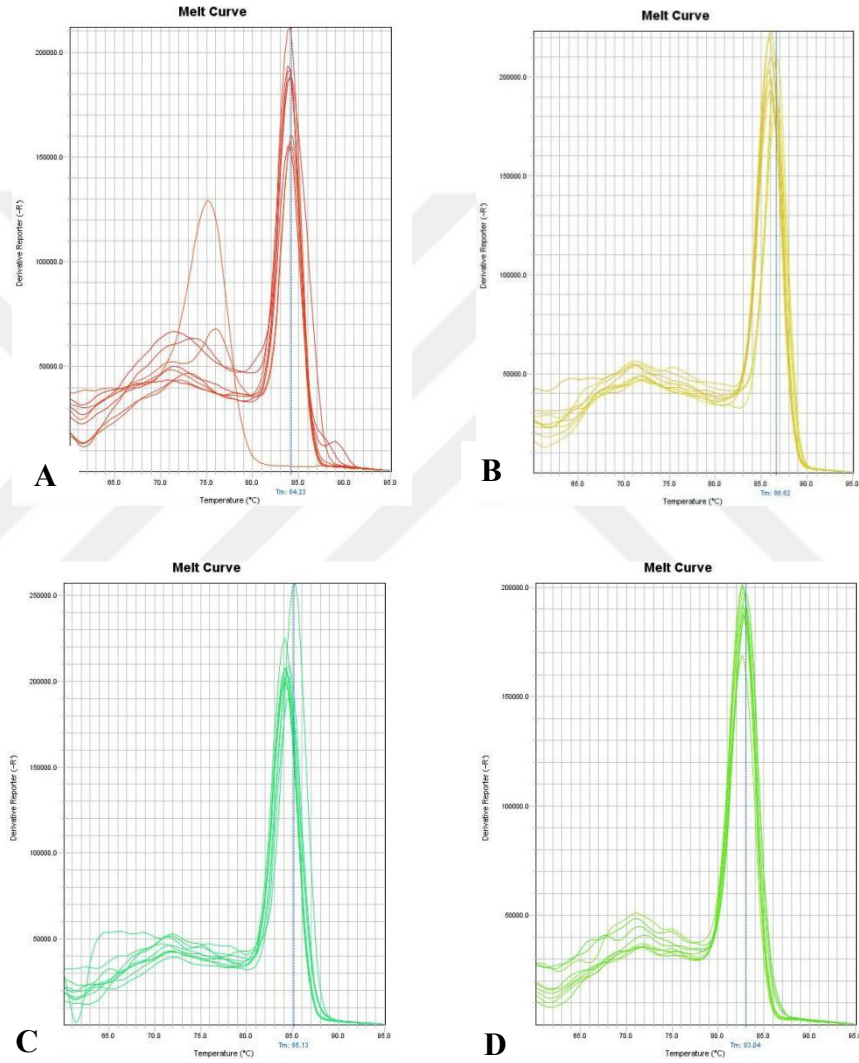
Dairesel RNA'ların tespitine yönelik zenginleştirme stratejisi, PCR sırasında spesifik primerlerin kullanımıyla gerçekleştirilmektedir ve bu süreç, dairesel RNA'nın olduğu doğrusal mRNA şablonunda birbirinden uzaklaşacak şekilde tasarlanmış divergent (ayrılan) primerlerin tasarımını içermektedir. Daireselleşme sırasında, tamamlayıcılık esasına göre primer tasarımı için kullanılan diziler, dairesel şablon üzerinde birbirine yakın, yani konverjan olacak şekilde konumlanmaktadır. Bu primerler, çalışılması hedeflenen dairesel RNA'nın BSJ bölgesini çevrelemekte ve bu bölgeyle örtüşmektedir; böylece yalnızca bu moleküllerin spesifik amplifikasyonu sağlanmaktadır. Buna karşılık, doğrusal mRNA şablonları üzerindeki divergent yönelimleri nedeniyle bu primerler doğrusal transkriptlerde amplifikasyona yol açmamaktadır.



Ek Şekil 1. Dairesel RNA'ların spesifik tespiti için primer tasarımı stratejisi (Vromman ve ark., 2022'den alınmıştır)

EK 3. HEDEF MOLEKÜLLERİN ERİME EĞRİLERİ

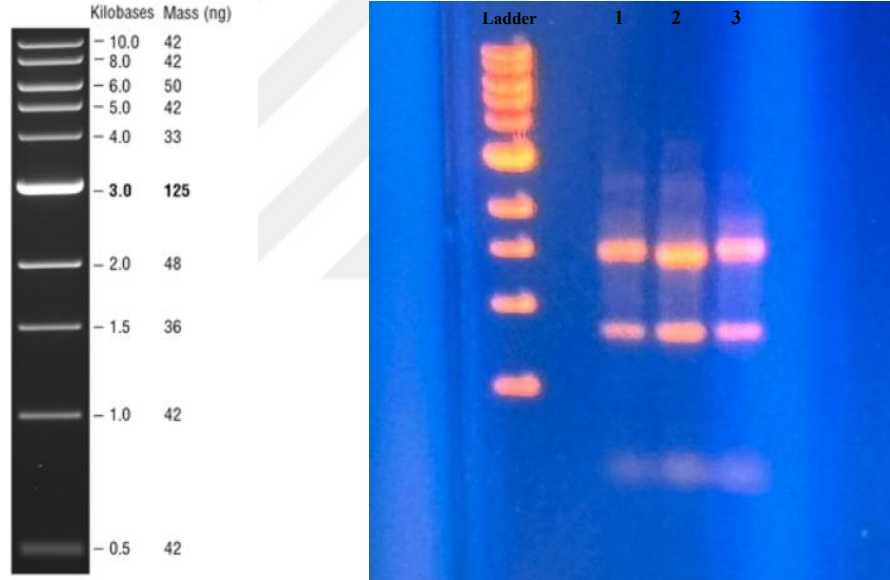
Tasarımı yapılan primerlerin özgüllüğü, erime eğrilerinde tek bir pik gözlemlenerek doğrulanmıştır (Ek Şekil 2). Bütün primerler için tek pik gözlenmiştir.



Ek Şekil 2. Amplifiye edilen circRNA ve mRNA moleküllerine ait erime eğrisi grafikleri. (A) GPRC5A ve (B) circGPRC5A hedef genler olarak, (C) GAPDH ve (D) circHIPK3 ise iç kontrol olarak kullanılmıştır.

EK 4. RNA ÖRNEKLERİNİN %1 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

MCF10A, MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatlarından izole edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi, RNA'nın bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir; zira 28S rRNA'ya karşılık gelen (üstte, daha yoğun ve kalın bant) ve 18S rRNA'ya karşılık gelen (altta, daha ince bant) iki belirgin bant açıkça gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 28S ve 18S bantları için beklenen büyüklükler sırasıyla 5 kb ve 1.9 kb'dir. Ancak, kullanılan marker ile karşılaştırıldığında bu büyüklükler beklenen şekilde gözlemlenmemiştir. Ancak, 28S ve 18S rRNA bantlarının belirgin varlığı, total RNA'nın bütünlüğünün güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir; smear olmaması RNA'nın bütünlüğünün korunduğuna işaret etmektedir.



Ek Şekil 3. MCF10A (1), MDA-MB-231(2) ve MCF7 (3) hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin %1 agaroz jel elektroforezi. 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır

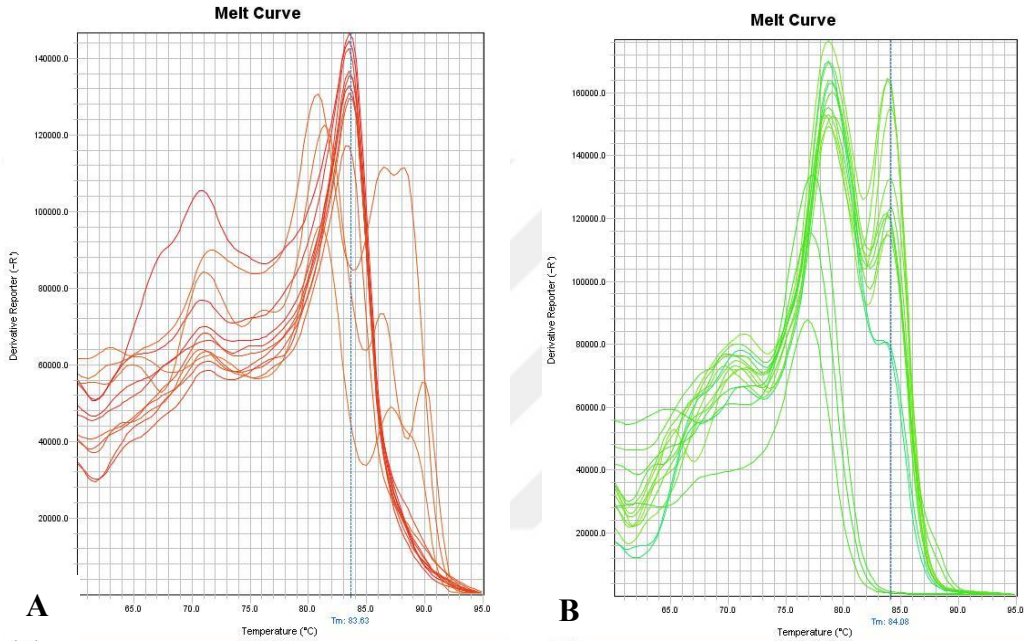
EK 5. HEDEF GENLERİN CT DEĞERLERİ

Ek Çizelge 1. MCF10A, MDA-MB-231 ve MCF7 RNA örneklerindeki hedef genler için qRT-PCR ile elde edilen Ct değerleri

Hücre hattı	Hedef Gen	Ct Değeri	Ortalama Ct değeri
MCF10A	CircGPRC5A	32,542762756	32,19553439
	CircGPRC5A	32,085491180	
	CircGPRC5A	31,958349228	
MCF7	CircGPRC5A	33,622028351	33,6296018
	CircGPRC5A	34,106296539	
	CircGPRC5A	33,160480499	
MDA-MB-231	CircGPRC5A	36,85611725	36,62419383
	CircGPRC5A	36,13557053	
	CircGPRC5A	36,88089371	
MCF10A	GPRC5A	18,92679977	18,49773216
	GPRC5A	18,45492935	
	GPRC5A	18,11146736	
MCF7	GPRC5A	20,4231205	20,30711746
	GPRC5A		
	GPRC5A	20,19111443	
MDA-MB-231	GPRC5A	29,93464279	29,93408966
	GPRC5A	29,91744995	
	GPRC5A	29,95017624	
MCF10A	CircHPK3	26,29693794	26,18458684
	CircHPK3	26,0915966	
	CircHPK3	26,16522598	
MCF7	CircHPK3	26,56373787	26,38759486
	CircHPK3	26,28597832	
	CircHPK3	26,31306839	
MDA-MB-231	CircHPK3	27,39274597	27,19274839
	CircHPK3	27,51790237	
	CircHPK3	26,66759682	
MCF10A	GAPDH	17,73676872	17,8087279
	GAPDH	17,85481644	
	GAPDH	17,83459854	
MCF7	GAPDH	18,22611237	18,33002281
	GAPDH	18,29942703	
	GAPDH	18,46452904	
MDA-MB-231	GAPDH	18,42965508	18,16738065
	GAPDH	18,49790382	
	GAPDH	17,57458305	

EK 7. MIRNA TAYININDE ERIME EĞRİLERİ

MiRNA-214-3p ve U6 için tasarlanan primerlerin özgüllüğü, erime eğrisi analiziyle gözlemlenmiştir (Ek Şekil 5). GPRC5A ve circGPRC5A için elde edilen erime eğrilerinden farklı olarak, bu durumda erime sıcaklığında yalnızca bir pik yerine birden fazla pik tespit edilmiştir; bu durum, primerlerin özgül olmadığını veya çok sayıda primer dimeri oluştuğunu göstermektedir.



Ek Şekil 5. (A) miR-214-3p molekülüne ve (B) internal kontrol olarak kullanılan U6 molekülüne ait erime eğrisi grafikler