



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



AKCİĞER KANSERİ RADYOTERAPİSİNDE EKSOZOM KAYNAKLI circRNA EKSPRESYON PATERNLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Saina RAHİMİ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**AKCİĞER KANSERİ RADYOTERAPİSİNDE
EKSOZOM KAYNAKLI circRNA EKSPRESYON
PATERNLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Saina RAHİMİ

Danışman
Doç. Dr. Ayşe CANER

Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi

İzmir
2022

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Ayşe CANER

(Danışman)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Besra ÖZMEN YELKEN.....

Üye : Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 11.10.2022

Önsöz

Akciğer kanserinin insidansının sürekli ve hızla artması, ayrıca kansere bağlı ölümlerin en önde gelen nedeni olması nedeniyle, günümüzde insan hayatını tehdit eden önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Son yıllarda tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine rağmen akciğer kanseri hastalarının tanısı ileri evrelerde konulmakta ve sağ kalım oranı hâlâ çok düşük seviyededir. Bu nedenle hastaların erken tanı ve tedavi rejimlerinin etkinliğini belirlemek için yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip biyobelirteçlere gerek duyulmaktadır. Aynı zamanda bu biyobelirteçlere klinikte hastanın prognoz takibi ve uygun tedavi stratejilerinin belirlenmesinde de ihtiyaç bulunmaktadır. Bu durum hastaların sağ kalım oranını iyileştirmeyi ve maliyetli tedavilerden kaçınmayı mümkün kılabilir. Akciğer kanserinin erken teşhisinde ve tedavi rejimlerinin takibinde eksozomal circRNA'ların biyobelirteç potansiyellerinin belirlenmesi konusunda yaptığım bu çalışmanın daha ileri moleküler çalışmalar ve klinik araştırmalar için temel bilgiler sunması açısından faydalı olmasını umuyorum.

“Bugünün bilimi yarının teknolojisidir” (Edward Teller) cümlesine dayanarak bilim yolunda olduğum için çok mutlu ve gururluyum. Bu yolda azimle ilerleyip gelecekte kendimden bir iz bırakmak dileğiyle...

İzmir, 1.11.2022

Saina RAHİMİ

Özet

Akciğer Kanseri Radyoterapisinde Eksozom Kaynaklı circRNA Ekspresyon Paternlerinin Değerlendirilmesi

Amaç: Akciğer kanseri, dünyada en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerin en önde gelen nedenleri arasındadır. Günümüzde bu kanserin erken tanısında ve tedavisinde hala zorluklar bulunmaktadır. Radyoterapi akciğer kanseri tedavisinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Ancak radyoterapinin klinik belirtilerini erken bir aşamada değerlendirmek çok zordur ve ilgili kriterler çok sınırlıdır. Son yıllarda circRNA'ların spesifik yapıları nedeniyle kanserin tanı, tedavi ve progresyonunda önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca circRNA'ların eksozomlarda daha fazla miktarda bulunduğu ve daha stabil bir yapı içerdikleri belirtilmiştir. Bu nedenle köken aldığı hücrenin özelliklerini taşıyan ve çeşitli vücut sıvılarında bulunan eksozomal circRNA'ların, kanserin tanısı ve tedavi değerlendirmesi için uygun bir biyobelirteç olma kapasitesine sahip oldukları düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında eksozomal circRNA'ların küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ve radyoterapi ile ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri değerlendirerek biyobelirteç olma potansiyellerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada akciğer kanseri epitel (A549) ve sağlıklı akciğer fibroblast (WI38) hücre hatları kullanıldı. Ayrıca radyoterapinin etkisini değerlendirmek için öncelikle her iki hücre hattına radyasyon uygulandı ve koloni testi yapıldı. Analiz sonrasında her iki hücre hattı 4Gy ile ışınladı ve ultrasantrifüj yöntemiyle eksozomlar izole edildi. Eksozomlar, flow sitometri ve dinamik ışık saçılma parçacık boyut analizi ile karakterize edildi. Daha sonra eksozomlardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak 40 eksozomal circRNA'nın ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile incelendi. Ayrıca deney gruplarında eksprese olan eksozomal circRNA'ların etkileşimde bulunduğu olası miRNA'lar biyoinformatik yöntemler ile tespit edildi. Daha sonra, eksprese edilen eksozomal circRNA'ların parental genleri ve radyoterapi ile ilişkileri, TCGA veri bankasından küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olan hastalara ait veriler ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Bulgular: Analizler sonucunda ışınlanmış kanser hücrelerinden salınan eksozomların, kanser hücrelerinden salınanlardan daha yüksek yoğunlukta ve büyüklükte olduğu tespit edildi. Eksozomal circRNA'dan, 4 circRNA'nın, A549, WI38, ışınlanmış A549

ve ışınlanmış WI38 hücre gruplarından en az birinde eksprese edildiği bulundu. Özellikle tüm deney gruplarda eksprese olan hsa_circ_0001900 geninin kanser hücre hatlarında sağlıklı hücrelere göre daha fazla eksprese olduğu tespit edildi. Işınlamadan sonra hsa_circ_0001900 gen ekspresyonunun kanser hücrelerinde anlamlı seviyede arttığı gözlenirken sağlıklı hücrelerde önemli oranda düştüğü saptandı. Hsa_circ_0014235 geninin de kanser hücre hatlarında sağlıklı hücre hattına göre daha fazla eksprese olduğu fakat ışınlamadan sonra hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde eksprese olmadığı saptandı. Bunun yanında, hsa_circ_0000190 geni sadece kanser hücrelerinde eksprese olurken, hsa_circ_0000003 geninin her iki hücrenin ışınlamasından sonra eksprese olduğu ve bu ekspresyonun sağlıklı hücrede anlamlı seviyede daha yüksek olduğu tespit edildi. Daha sonra bu circRNA'lar ile etkileşimde olan miRNA'lar tanımlandı ve bu miRNA'ların çoğunun akciğer kanseri veya diğer kanser ile ilişkili olduğu saptandı. Ayrıca, bu circRNA'ların köken aldığı parental genlerin ekspresyon seviyeleri küçük hücreli olmayan akciğer kanser hastalarında ve radyoterapi uygulanması sonrasında değerlendirildi. Bu parental genlerden hsa_circ_0014235 geninin köken aldığı S100A2 gen ekspresyonunun tümörlü dokuda anlamlı seviyede yüksek seviyede olduğu tespit edildi. Radyoterapi uygulanan ve uygulanmayan hastalarda ise bu parental genlerin ekspresyon değerlerinde ise herhangi anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Sonuçlar: Vücut doku ve sıvılarında bulunan eksozomal kaynaklı circRNA'lar, stabil ve dirençli yapıları nedeniyle kanser tanısında ve tedavi takibinde potansiyel biyobelirteç adayları olabilir. Eksozomal circRNA'ların akciğer kanserinin tanısında ve önemli bir tedavi yöntemi olan radyoterapinin izlenmesinde biyobelirteçler olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler; Eksozom; CircRNA'lar; Akciğer Kanseri; Radyoterapi; Biyobelirteçler

Abstract

Evaluation of Exosome Derived circRNA Expression Patterns in Lung Cancer Radiotherapy

Background: Lung cancer is one of the most common and leading causes of cancer-related deaths in the world. Today, there are still difficulties in the early diagnosis and treatment of this cancer. Radiotherapy is an effective method used in the treatment of lung cancer. However, it is very difficult to assess the clinical manifestations of radiotherapy at an early stage and the relevant criteria are very limited. In recent years, it has been shown that circRNAs play an important role in the diagnosis, treatment and progression of cancer due to their specific structures. It was also stated that circRNAs are more abundant in exosomes and contain a more stable structure. For this reason, it is thought that exosomal circRNAs, which have the characteristics of the cell of origin and are found in various body fluids, have the capacity to be a suitable biomarker for the diagnosis and treatment evaluation of cancer. In this thesis, we investigated the potential of exosomal circRNAs as biomarkers by evaluating the changes in expression levels in non-small cell lung cancer and radiotherapy.

Material and Method: In this study, lung cancer epithelial (A549) and healthy lung fibroblast (WI38) cell lines were used. In addition, to evaluate the effect of radiotherapy, radiation was applied to both cell lines and colony test was performed. After analysis, both cell lines were irradiated with 4Gy and exosomes were isolated by ultracentrifugation method. Exosomes was characterized by flow cytometry and dynamic light scattering particle size analysis. Then, total RNA isolation from exosomes and cDNA synthesis were performed and expression levels of 40 exosomal circRNAs were examined by RT-qPCR. In addition, possible miRNAs interacting with exosomal circRNAs expressed in the experimental groups were determined by bioinformatics methods. Parental genes of expressed exosomal circRNAs and their association with radiotherapy were then evaluated by comparing them with data from patients with non-small cell lung cancer from the TCGA database.

Results: As a result of the analysis, it was determined that the exosomes released from irradiated cancer cells were higher in density and size than those released from cancer cells. Of the exosomal circRNA investigated, 4 exo-circRNAs were found to be expressed in at least one of the groups, including A549, WI38, irradiated A549 and irradiated WI38 cell lines. In particular, hsa_circ_0001900, which was found to be expressed in all groups, was more upregulated in cancer cell lines than healthy cell line. After irradiation, hsa_circ_0001900 expression level increased significantly in cancer cells while significantly decreased in healthy cells. Similarly, hsa_circ_0014235 was also more upregulated in cancer cell line than healthy cell line. However, it was found not to be expressed in both cell lines after irradiation.

In addition, it was determined that the hsa_circ_0000190 gene was expressed only in cancer cells, while the hsa_circ_0000003 gene was expressed after irradiation of both cells and this expression was significantly higher in irradiated healthy cells. Later, miRNAs that interact with these circRNAs were identified and most of these miRNAs were found to be associated with lung cancer or other cancers.

In addition, the expression levels of parental genes, which are the source of these circRNAs, were evaluated in NSCLC patients and after radiotherapy. Of these parental genes, S100A2 gene expression, which is originate of hsa_circ_0014235 gene, was found to be significantly high in tumor tissue. No difference was found in the expression values of these parental genes with the tissues of patients under radiotherapy.

Conclusions: The stable and resistant structures of exosomal-derived circRNAs found in body tissues and fluids can be potential biomarker candidates in cancer diagnosis and treatment follow-up. It suggests that exosomal circRNAs may be biomarkers in the diagnosis of lung cancer and in monitoring radiotherapy, which is an important treatment method.

Keywords; Exosome; CircRNAs; Lung Cancer; Radiotherapy; Biomarkers

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Grafikler Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XII
Giriş	1
Genel Bilgiler	4
2.1 Akciğer Kanseri.....	4
2.2 Akciğer Kanserinde Radyoterapi	5
2.3 Eksozomlar	6
2.3.1. Eksozomların Biyogenezi	7
2.3.2. Tümör ile İlişkili Eksozomlar	8
2.4 Halkasal RNA'lar (CircRNAs)	9
2.5 Eksozomal circRNA'lar ve Kanserdeki Rolü	10
Gereç ve Yöntem	12
3.1 Gereçler.....	12
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler	12
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	13
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Yazılım Programları.....	14
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	14
3.2 Yöntem	14
3.2.1 Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması	14
3.2.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültür Edilmesi.....	15
3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması	15
3.2.4 Koloni Oluşturma Testi ile Hücrelerin Işınlama Dozunun Belirlenmesi... 16	
3.2.5 Eksozom İçeren Üst Sıvının Hazırlanması (Ön İzolasyon Aşaması).....	17
3.2.6 Eksozom İzolasyonu.....	18
3.2.7 Eksozom Karakterizasyonu	18
3.2.7.1 Eksozom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi	19

3.2.7.2 Eksozom Yüzey Proteinlerinin İncelenmesi	20
3.2.8 Total RNA İzolasyonu	20
3.2.9 cDNA Sentezi	21
3.2.10 CircRNA'ların Belirlenmesi ve Primerlerinin Dizaynı	22
3.2.11 Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR.....	23
3.2.12 İstatistiksel Analizler	24
3.2.13 Biyoinformatik Analizler.....	24
Bulgular.....	26
4.1 Işınlama Dozunun Belirlenmesi.....	26
4.2 Eksozom karakterizasyonu	27
4.2.1 Eksozom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi	27
4.2.2 Eksozom Yüzey Proteinlerinin İncelenmesi	30
4.3 Total RNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Kontrolü	31
4.4 Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR Sonuçları	31
4.5 Eksozomal CircRNA'ların Potansiyel Fonksiyonları	35
Tartışma	39
Sonuç ve Öneriler	48
Kaynaklar	49
Teşekkür	64
Özgeçmiş	65

Tablolar Dizini

Tablo 1. Kullanılan Malzemeler.....	12
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar	13
Tablo 3. Kullanılan Yazılım Programları.....	14
Tablo 4. cDNA Sentez Protokolü 1. Aşama.....	21
Tablo 5. cDNA Sentez Protokolü 2. Aşama.....	21
Tablo 6. CircRNA'ların Primer Sekansları	22
Tablo 7. Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR Bileşenleri	23
Tablo 8. Revers-Transkriptaz PCR Reaksiyon Aşamaları	24
Tablo 9. Total RNA'ların Konsantrasyonları ve Saflık Değerleri	31
Tablo 10. Deney Gruplarında Eksprese Olan Eksozomal CircRNA'lara Ait Bilgiler	34
Tablo 11. CircRNA-miRNA Etkileşim Ağı	36

Şekiller Dizini

Şekil 1. Ekzosom İzolasyonunda Kullanılan Hücre Hatları	17
Şekil 2. Ekzosom İzolasyonu Aşamaları	19
Şekil 3. A549 ve WI38 Hücre Hattının Işınlama Sonrası Koloni Görüntüleri	26
Şekil 4. A549 Hücrelerinin Ekzosom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi ...	28
Şekil 5. Işınlama Uygulanan A549 Hücrelerinin Ekzosom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi	29
Şekil 6. Flow Sitometri Sonuçları	30
Şekil 7. β -Aktin Genine Ait PCR Sonuçları	32



Grafikler Dizini

Grafik 1. Hücre Hattına Ait Klonojenik Sağ Kalım Eğrileri	27
Grafik 2. Deney Gruplarında Eksozomal hsa_circ_0001900'ün Ekspresyon Seviyesi	33
Grafik 3. Deney Gruplarında Eksozomal hsa_circ_0014235'in Ekspresyon Seviyesi	33
Grafik 4. Eksprese Olan Eksozomal circRNA Genlerine Ait Grafikler	34
Grafik 5. KHDAK Olan Hastalarında Exosomal circRNA'ların Parental Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri.....	37
Grafik 6. Radyoterapi Alan KHDAK Olan Hastalarında Exosomal circRNA'ların Parental Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri.....	38

Kısaltma Listesi

A549	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı
AK	: Akciğer kanseri
BAL	: Balgam/bronko alveolar lavaj
BIRC5	: Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 5
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CDK4	: Cyclin-dependent kinase 4
ceRNA	: Rakip endojen RNA
CircRNA	: Halkasal RNA
ciRNA	: İntronik circRNA
CRC	: Kolorektal kanser
CT	: Cyclethreshold
CTGF	: Bağ dokusu büyüme faktörü
DSB	: DNA çift sarmal kırıkları
DSHK	: Dil skuamöz hücreli karsinom
ecircRNA	: Eksonik circRNA
EIciRNA	: Ekson-intron circRNA
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçişi
ESCRT	: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü

GLS	: Glutaminaz
H1299	: insan akciğer adenokarsinom hücresi
IGFBP2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 2
IR	: İyonlaştırıcı radyasyon
KHDAK	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
ASHK	: Akciğer skuamöz hücreli karsinom
Melting curve	: Erime eğrisi
MVB	: Multivezikül cisimler
ncRNA	: Kodlamayan RNA
NPC	: Nazofarenks karsinom
PD-L1	: Programlanmış ölüm-ligand 1
PE	: Kaplama verimliliği
Pre-mRNA	: Öncü mRNA
RNA-seq	: RNA dizileme
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT	: Radyoterapi tedavisi
RT-qPCR	: Revers-transkriptaz kantitatif PCR
SF	: Sağ kalım fraksiyonu

TCGA	: Kanser Genom Atlası
TEX	: Tümör kaynaklı eksozom
TME	: Tümör mikro çevresi
TNM	: İleri tümör/nodul/metastaz
TSAP6	: Transmembran protein tümör baskılayıcı-aktif edilmiş yol 6
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WI38	: Sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı



Giriş

Akciğer kanseri (AK), insidansı sürekli ve hızla artan yaygın bir malign tümördür ve dünya çapında kadın ve erkeklerde kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK), AK'nin en yaygın tipidir ve tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Erken tanı ve multimodalite tedavilerinin gelişmesine rağmen, AK hastalarının çoğunun tanı anında lokal olarak ilerlemiş olduğu için veya metastaz olduğu için mortalite oranının çok yüksek olduğu ve öngörülen 5 yıllık sağkalım oranının %15'in altında olduğu gösterilmiştir. Geç tanı ve mevcut tedavi rejimlerinin düşük etkileri, düşük sağkalım oranlarının ve maliyetli tedavilerin en önemli sorunlarıdır. AK'nin mortalite oranını azaltmak şu anda sağlık araştırmalarında önemli bir konudur. Bu nedenle hastanın erken tanısı ve farklı tedavi rejimlerine yanıtını belirlemek için hızlı ve doğru belirteçlerin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

Akciğer kanseri tedavisi, evresine bağlı olarak, genellikle cerrahi, radyoterapi, sistemik tedaviler (kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik ajanlar), girişimsel radyoloji ve palyatif bakım dahil olmak üzere çoklu tedavi yöntemlerini içeren karmaşık bir süreçtir. Bunlar arasında AK tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve hastalığın tüm evrelerinde endikasyonları bulunan radyoterapi (RT), doğrudan DNA'yı etkileyerek veya dolaylı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikaller üreterek DNA'da tek veya çift zincir kırıkları oluşturup hücrenin apoptoza gitmesini sağlayarak tümör hücrelerinin büyümesini engellemektedir. Fakat RT'nin AK'de kanser kök hücre fenotipini, onkojenik metabolizmayı, kanser hücrelerinin metastazını ve invazyonunu desteklediği de gösterilmiştir. Bu nedenle RT'nin AK'nin önemli ve yaygın terapötik yöntemi olarak hastalar üzerindeki etkisi ve bunu takiben tedaviye yanıtta etkinliğini belirlemek için RT kaynaklı mekanizmalar ve faktörlerin daha iyi araştırılması ve anlaşılması gerekmektedir. Eksozomlar hücre arası iletişimde çeşitli biyolojik ve kanser gibi patolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve birçok hücre tarafından salgılanan nano ölçekli (30-150 nm) hücre dışı veziküllerdir. Birçok kanser araştırması eksozomların, kanser ve tümör mikroçevresi üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Eksozomların işlevleri veya hedef hücrelerin üzerinde olan etkileri içerdikleri biyoaktif kargoya (lipidler, metabolitler, proteinler ve nükleik asitler) bağlıdır. Bu nedenle de eksozomların onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip oldukları gözlemlenmektedir. Eksozom biyoaktif

kargolarının içeriğinden biri ve kanser araştırmalarında son dönemlerin önemli bir konusu olan circRNA'lar, kodlamayan RNA (ncRNA) sınıfından, 5 'başlık ve 3' poli A kuyruğunu içermeyen kovalent olarak kapalı halkasal yapılardır. CircRNA'lar, transkripsiyonun düzenlenmesi, mikroRNA (miRNA)'lar için sünger olmaları, mRNA öncesi rekabetleri ve proteinler ile etkileşimleri yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Böylece tümör oluşumu, çoğalma, migrasyon, invazyon, metastaz, apoptoz, kemoterapi/radyasyon direnci ve kanser prognozu gibi kanserin çeşitli yönlerinde önemli düzenleyici işlevlere sahiptirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, circRNA'ların eksozomlarda daha zenginleştirilmiş ve stabil olduğunu göstermiştir. Bu da circRNA'ların hem kendine özgü yapıları hem de eksozomların içerisinde olması nedeniyle eksonükleaza karşı dirençli olduklarından kaynaklanmaktadır. Eksozomal circRNA'ların bu stabilite ve yüksek özgüllükleri, onları vücut sıvılarında da kolaylıkla tespit ederek kanserin tanısı, prognoz takibi, uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi veya tümördeki minimal invazif ilerlemeleri izlemek için potansiyel biyobelirteçler olma kapasitesi içermektedir.

Bu tez araştırmasının sorusu ise bu eksozomal circRNA'ların, AK tanısı ve RT takibi için potansiyel biyobelirteç olma kapasiteleri ve RT'nin bu moleküller üzerinde olan etkisinin belirlenmesi olarak tanımlanmıştır. Tez çalışması AK'nin tanısında ve RT takibinde eksozomal circRNA moleküllerin potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilir hipotezi ile planlanmıştır.

Çalışmamızda KHDAK hücre hattı ve sağlıklı akciğer hücre hattı kullanılarak hücre kültürü gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattı için ışınlama uygulandıktan sonra ve uygulanmadan önce eksozom izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen eksozomlardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak, kanserle ilişkili 40 adet circRNA geninin ekspresyon seviyeleri, RT-qPCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, anlamlı seviyede farklı eksprese olan eksozomal circRNA'ların biyoinformatik analizleri yapılmış ve bu eksozomal circRNA'lar tanı ve/veya tedavide kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç adayları olarak tanımlanmıştır. Bu genlerin kanser ve sağlıklı deney grupları arasında farklı seviyede ekspresyonlarının olması, onların AK tanısı için potansiyel biyobelirteç adayı olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda ışınlama uygulanan ve uygulanmayan kanser deney gurubu arasındaki anlamlı seviyede farklı ekspresyonu tespit edilen genlerin ise, RT üzerlerinde nasıl bir etki yaratacağını ve tedavi için potansiyel belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma kapsamında potansiyel biyobelirteç adayları olarak saptanan eksozomal circRNA moleküllerinin, AK erken tanı ve tedavi takibinde kullanılabilmeleri için bu eksozomal circRNA'ların hasta örnekleri ve daha ileri mekanizma çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Eksozomal circRNA moleküllerinin, gen ekspresyonu düzeyinde yapılan bu in vitro çalışma ile elde edilen ön veriler ile ileride vücut sıvıları (kan, plazma, tükürük, idrar vb.) veya doku örnekleri kullanılarak klinikte de AK'nin erken tanısı ve tedavisinde biyobelirteçlerin tanımlanması amaçlanmaktadır.



Genel Bilgiler

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, son on yıl içinde dünyada en sık görülen maligniteler arasında yer almakta, kadın ve erkeklerde kanser ölümlerinin en yaygın nedeni olarak bildirilmektedir. Genel olarak 2020 yılı itibarı ile dünyada 2,2 milyon yeni vaka ve 1,8 milyon ölüm oranı rapor edilmiştir (Sung ve ark., 2021). Tütün tüketimi, radon maruziyeti, hava kirliliği, genetik mutasyonlar ve dengesiz beslenme gibi sebepler AK'ne yakalanma olasılığını artırabilecek farklı risk faktörleri olup AK insidansının artmasından sorumlu tutulmaktadır (Siegel ve ark., 2017; Mao ve ark., 2016). AK temel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, yaklaşık %15) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK, yaklaşık %85) olarak ikiye ayrılmaktadır. KHDAK'lar adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve daha az sıklıkla görülen büyük hücreli karsinom olarak üç histolojik tipte sınıflandırılır (Mao ve ark., 2016). Adenokarsinom tüm AK'nin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Akciğer adenokarsinomu, erkek ve kadınlarda yaş ve sigaradan bağımsız olarak en sık görülen akciğer kanser türüdür. Sonuçta, KHDAK'nin insidansının yıldan yıla arttığı ve nihayetinde en yaygın alt tipi haline geldiği gözlemlenmektedir (Noguchi ve ark., 1995; Mao ve ark., 2016; Couraud ve ark., 2012).

AK'nin tanısı, göğüs röntgeni, bilgisayarlı tomografi (BT), balgam/bronko alveolar lavaj (BAL) sitolojisi ve akciğer biyopsisi gibi çeşitli yöntemleri içermektedir (Hoffman ve Sanchez, 2017; Latimer, 2018). Düşük doz BT, akciğer lezyonlarını saptamada duyarlılığa sahiptir ama aynı zamanda da radyasyona maruz kalma riskini içermektedir. Bu yöntem AK erken tanısı için taramalarda kullanılmakta fakat zararlı etkileri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmemektedir (Detterbeck ve Bach, 2013). Balgam sitolojisi, basit, hızlı, ekonomik ve yüksek özgüllük gibi avantajlara sahiptir fakat duyarlılığı düşüktür (Kemp ve ark., 2007; Schreiber ve McCrory, 2003). AK şüphesi olan hastaların teşhisinde birincil yöntem bronkoskopi ve/veya akciğer biyopsisi olmakla birlikte bazı komplikasyonlar da içermektedir (Gharsalli ve ark., 2018). Ayrıca, akciğer biyopsi dokusunun içindeki heterojenlik, tanının doğruluğunu önemli ölçüde etkileyebilir (de Margerie-Mellon ve ark., 2016; Tomic ve ark., 2015). Bu yöntemlere rağmen AK'nin erken tanı oranı yaklaşık %15'tir ve hastaların %75'i tanı anında lokal olarak ilerlemiş veya metastatik aşamada bulunmaktadır (Jacobsen

ve ark., 2017). Bu yüzden, AK'nin erken tanısında yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip tanı araçlarını bulmak son derece önemli ve gereklidir.

AK tedavisi, evresine bağlı olarak, genellikle cerrahi, radyoterapi, sistemik tedaviler (kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik ajanlar), girişimsel radyoloji ve palyatif bakım dahil olmak üzere çoklu tedavi yöntemlerini içeren karmaşık bir süreçtir (Zappa ve Mousa, 2016). Genellikle erken evre tümörler için tercih edilen tedavi cerrahi rezeksiyondur. İleri akciğer kanserli hastalarda kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapi-immünoterapi tedavi yöntemleri ile devam edilmektedir (Postmus ve ark., 2017; Hirsch ve ark., 2017). Çeşitli AK tedavilerinin olmasına rağmen, ilerlemiş akciğer kanserli hastaların prognozu hâlâ çok kötüdür ve yeni immünoterapötik ilaçlara rağmen, öngörülen 5 yıllık sağkalım oranı hâlâ %15'in altındadır (Chen ve ark., 2014). Bu muhtemelen geç tanı ve mevcut tedavi rejimlerinin yetersiz etkilerinden kaynaklanmaktadır (Lee ve ark., 2017; Schuette ve ark., 2018). Bu nedenle hastaların erken tanısı ve farklı tedavi rejimlerine karşı klinik yanıtı belirlemek için hızlı ve doğru belirteçlerin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

2.2 Akciğer Kanseri Radyoterapi

Radyoterapi, AK tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve hastalığın tüm evrelerinde endikasyonları bulunan önemli bir tedavi yöntemidir. Modelleme çalışmaları, tüm AK hastalarının %77'sinin kanser sürecinin bir noktasında RT için kanıta dayalı bir endikasyona sahip olduğunu göstermektedir (Delaney ve Barton, 2015; Vinod ve Hau, 2020). Genellikle RT'nin optimal kullanımı 5 yıllık lokal kontrolde %8.3 ve sağkalımda %4'lük bir kazanç ile sonuçlanabilmektedir (Shafiq ve ark., 2016). RT'deki son gelişmeler ile AK tedavisinde daha iyi sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır (Vinod ve Hau, 2020). RT, doğrudan iyonizasyon yoluyla veya dolaylı olarak ROS üretimi yoluyla DNA hasarına neden olup kanser hücrelerini yok etmektedir. Bununla birlikte, iyonlaştırıcı radyasyon (IR), kök hücre fenotipini, onkojenik metabolizmayı ve epitelyal-mezenkimal geçişini (EMT) indükleyerek kanser hücrelerinin metastazını ve invazyonunu paradoksal olarak desteklemektedir. IR ayrıca tümör mikro çevresinde (TME) invazyon ve metastazı etkileyebilecek çeşitli değişiklikleri de ortaya çıkarabilmektedir. Metastaz, başarılı kanser tedavisinin önündeki en büyük engeldir ve birçok kanserin mortalite oranlarında artışa neden olmaktadır. Ayrıca EMT, kanser kök hücresi (KKH) ve onkojenik metabolizma radyorezistansa neden olmaktadır. Bunları hedeflemek, RT'nin etkinliğini artırabilir,

tümör nüksü ve metastazı önleyebilir (Lee ve ark., 2017). Bunun yanında IR ile ilgili çalışmalar, çoğunlukla protein kodlayan genlerin neden olduğu mekanizmalara ve bunları etkileyen faktörlerin düzenlenmesine odaklanmıştır. Son yıllarda ncRNA'ların da radyosensitivitenin belirlenmesinde önemli rollere sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, ncRNA'ların normal hücrelerde radyasyona bağlı yan etkileri modüle edebildikleri bildirilmiştir (Ebahimzadeh ve ark., 2021; Mu ve ark., 2018). Bu nedenle, ncRNA'lar RT'de prognostik bir biyobelirteç olarak ümit vadet eden moleküller olarak değerlendirilmektedir.

2.3 Eksozomlar

Eksozomlar, çift lipid katmanlı bir zarla çevrili ve çoğu ökaryotik hücre tarafından salgılanan, endositik kökenli nano-ölçekli hücre dışı veziküllerdir. Bu veziküller kan, idrar, tükürük, anne sütü, eklem sıvısı, amniyotik sıvısı, bronkoalveolar lavaj sıvısı, malign asit ve meni sıvısı gibi çeşitli vücut sıvılarında dolaşmaktadır (Ruivo ve ark., 2017; Boriachek ve ark., 2018; Boukouris ve Mathivanan, 2015; Salido-Guadarrama ve ark., 2014).

Eksozomlar 1980'lerin sonlarına doğru tanımlanmış olup (Johnstone ve ark., 1987), başlangıçta hücrelerin “çöp kutuları” olarak düşünülmüştür (Wolf, 1967; Pan ve Johnstone, 1983). Son yıllarda, araştırmacıların bu veziküllerin işlevlerine olan yoğun ilgileri ve araştırma tekniklerinin gelişmesiyle, günümüzde eksozomların yeni bir hücreler arası iletişim aracı olduğu ve kanser gibi birçok hastalıkta çok çeşitli biyolojik süreçlere katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Fanale ve ark., 2018; Kalluri ve LeBleu, 2020). Eksozomlar, biyolojik işlevlerini içerdikleri biyoaktif kargoları (lipidler, metabolitler, proteinler ve nükleik asitler) hedef hücrelere taşıyarak gerçekleştirmektedir (Skotland ve ark., 2017; Puhka ve ark., 2017; Schey ve ark., 2015; van den Boorn ve ark., 2013). Giderek artan sayıda çalışma, eksozomların hücreler arası iletişimi, tümör mikro-çevresi, bağışıklık sistemi, hücre gelişme ve farklılaşması, hücre sinyali ve viral replikasyondaki işlevlerini araştırmaya odaklanmıştır (Yu ve ark., 2018; Zhang ve Wang, 2015; Gao ve ark., 2018; Alenquer ve Amorim, 2015). Ayrıca, tümör kaynaklı eksozomların, tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz, mikro çevrenin modülasyonu, metastatik niş oluşumu, immünomodülasyon ve ilaç direncinde yer aldıkları için pleiotropik rolleri oldukları rapor edilmiştir (Ruivo ve ark., 2017; Bernadette ve ark., 2017). Bunun yanında

eksozomların onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olabileceği de bildirilmiştir (Pucci ve ark., 2018).

2.3.1. Eksozomların Biyogenezi

Hücreler tarafından salınan "hücre dışı veziküller", biyogenez ve yapısal olarak farklılık gösteren, eksozomlar, mikro veziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere üç farklı vezikül grubundan oluşmaktadır (Théry, 2014). Mikroveziküller, plazma zarının doğrudan dışa doğru kabarması ile oluşan yaklaşık 50-1000 nm çapındaki veziküllerdir. Apoptotik cisimler 500-2000 nm çapında, ölen hücrelerin parçalanması sırasında oluşan ve nükleer moleküller içeren hücre altı zara bağlı hücre dışı veziküller grubudur. Eksozomlar ise, çapı 30-150 nm olan, hücreden salgılanan endositik kökenli nanoveziküllerdir (Ruivo ve ark., 2017; El Andaloussi ve ark., 2013).

Eksozom oluşumundaki ilk mekanizma, hücre zarının içeri doğru girinti oluşturarak endozomları oluşturmaktır. Bu erken endozomların membranlarından birçok intraluminal veziküller oluşmakta ve bunlar multivezikül cisimler (MVB) olarak adlandırılmaktadır (Morvan ve ark., 2012). Bazı MVB'ler lizozomlarla birleşip yapıları bozulurken, bazıları ise eksozomları oluşturmakta ve Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT)/Rab27 moleküllerinin yardımıyla hücre zarı ile kaynaşp hücre dışı ortama salınmaktadır (Colombo ve ark., 2013; Hannafon ve Ding, 2013; Mittelbrunn ve Sánchez-Madrid, 2012). Eksozomlar ayrıca lipidlerin, seramidlerin, tetraspanin ailesinin veya ısı şoku proteinlerinin yardımı ile ESCRT'den bağımsız bir mekanizma ile de salgılanmaktadır (Kosaka ve ark., 2010). Eksozomlar, hücre dışı ortama salındıktan sonra, ana hücrelerden uzaktaki veya yakındaki hedef hücreler tarafından alınmaktadır.

Eksozomların hücre içine alınmasına çeşitli mekanizmalar aracılık etmektedir; i) eksozom üzerinde bulunan ligandlar ile hedef hücre üzerinde bulunan reseptörlerin bağlanması, ii) hedef hücrelerin plazma membranı ile eksozom üzerinde bulunan adezyon moleküllerin etkileşimi ile füzyonu oluşumu, iii) Fagositoz yoluyla eksozomun alınması ve iv) reseptör-ligand etkileşim yoluyla endositoz ile hücre içine alınması (Li ve ark., 2017).

Eksozomlar, köken aldıkları hücreye özgü proteinler, lipidler, RNA ve DNA molekülleri dahil olmak üzere biyoaktif yükler taşırlar ve bunlar köken aldıkları hücrelerin ve dokuların özelliklerini yansıtmaktadır (Hessvik ve Llorente, 2018). Fakat

eksozomlar içerdikleri seçici kargolar sayesinde köken aldıkları hücrelerden farklı bir kompozisyon da sergileyebilmektedir (Fanale ve ark., 2018). Bu nedenle, eksozomların içeriğini etkileyebilecek faktörlerin ve mekanizmaların anlaşılması, bu moleküllerin hücre arası iletişimde işlevlerinin ve hedef hücreler üzerindeki etkilerinin daha iyi açıklanmasını sağlayabilir.

ExoCarta veritabanı (www.exocarta.org), yayınlanmış 286 çalışmadan elde edilen veriler ışığında eksozomlarda 9769 protein, 3408 mRNA ve 2838 miRNA listelemiştir (Keerthikumar ve ark., 2016). Ayrıca, yüksek verimli RNA sekansı ile mRNA, circRNA, miRNA, tRNA, rRNA, lncRNA, snRNA, snoRNA ve piRNA gibi RNA popülasyonların varlığı eksozomlarda saptanmıştır (Nolte-'t Hoen ve ark., 2012; Kim ve ark., 2017). Bu RNA'lar, hedef genleri modüle edebilir veya ana hücrelerdeki protein sentezi şablonunu hedef hücrelere aktarabilir (Fanale ve ark., 2018). Eksozomlar taşıdıkları içerikler ve çeşitli fonksiyonları nedeniyle tanı ve tedavi amacıyla kullanılma potansiyeli de taşımaktadır. Nitekim, eksozomlar, progenitör hücreleri tarafından yüklenen spesifik kargoları nedeniyle değerli bir biyobelirteç kaynağı olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Wang ve ark., 2019).

2.3.2. Tümör ile İlişkili Eksozomlar

Tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomlara tümör kaynaklı eksozomlar (TEX'ler) denmektedir. Kanser ve diğer hücreler arasındaki bilgi paylaşımı esas olarak TEX'ler tarafından sağlanmaktadır (Ludwig ve ark., 2019). Kanser hücrelerinin, tümör progresyonuna aracılık etmek için normal hücrelere kıyasla yaklaşık 10 kat daha fazla eksozom saldığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2017). TEX'lerin, AK'nin proliferasyonunda, anjiyogenezinde, invazyonu ve metastazında önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (Xu ve ark., 2021).

Çeşitli çalışmalar ile eksozomların AK'indeki rolleri araştırılmıştır. Nitekim, H1299 hücrelerinde (insan akciğer adenokarsinom hücresi) MiR-96 içeren eksozomların LMO7'yi hedefleyerek ve inhibe ederek hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2017). Rahman ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada AK hastalarının serumunda ve metastatik insan AK hücre hatlarında eksozomların, EMT'ye neden olduklarını, bunun da önemli ölçüde AK'nin proliferasyonunu ve invazyonunu indüklediğini bildirmişlerdir (Rahman ve ark., 2016). Ayrıca TEX'ler, TGF- β , caveolin-1, HIF1 α ve β -katenin gibi proteinleri taşıyarak, AK invazyonunu,

hedef hücrelerin göç etme yeteneğini, matrisin yeniden şekillenmesini ve niş oluşumunu desteklemektedir (Syn ve ark., 2016). Ek olarak eksozomlar IL-6, IL-8, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi proteinler aracılığıyla anjiyogenezi önemli ölçüde teşvik edebilmektedir (Kholia ve ark., 2016; Liu ve ark., 2019).

TEX'ler, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde yer alan çeşitli faktörler de içermektedir ve böylece alıcı hücrelerin yeniden programlanmasına neden olup, kanser hücrelerinin mikroçevrelerini kontrol edebilmektedir (Muller ve ark., 2016). Çeşitli çalışmalarda, TEX'in hem T hücrelerinin anti-tümör immün yanıtını hem de NK hücrelerin sitotoksikite yanıtını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Li ve Nabat, 2019; Gangoda ve ark., 2015; Riches ve ark., 2014). Bununla birlikte TEX'ler, NK hücrelerde KLRK1 veya NKG2D reseptörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek anti-tümör immün tepkilerini indükleyebilir (Lanier, 2015). Ayrıca tümör antijenlerini taşıyan TEX'ler bağışıklık sistemini uyarabilmekte ve CD4/CD8+ T hücrelerinin hücre öldürme fonksiyonunu arttırabilmektedirler (Guo ve ark., 2008; Hao ve ark., 2006; Taieb ve ark., 2006).

2.4 Halkasal RNA'lar (CircRNAs)

Halkasal RNA'lar (circRNAs), 5' başlık ve 3' poliA kuyruğu içermeyen kovalent olarak kapalı halkasal yapıları ile yakın zamanda tüm ökaryotik hücrelerde keşfedilen ve öncü mRNA'ların (pre-mRNA'lar) belirli bir alternatif birleştirme mekanizmasından kaynaklanan endojen ncRNA'ların yeni bir ailesini temsil etmektedir (Huang ve ark., 2017; Zhong ve ark., 2016; Chen ve ark., 2015; Barrett ve Julia, 2016; Gao ve ark., 2016). Bununla birlikte, bazı circRNA'ların proteinlere çevrilme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir (Wang ve Wang, 2015; Chen ve Sarnow, 1995). CircRNA'lar, eksonik, intronik veya intergenik bölgelerden oluşabilmekte ve dahil edilen yapılarla bağlı olarak dört kategoriye ayrılmaktadır: eksonik circRNA'lar (ecircRNA'lar), intronik circRNA'lar (ciRNA'lar), ekson-intron circRNA'lar (EIciRNA'lar) ve intergenik circRNA'lar (Huang ve ark., 2017; Wang ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2017). Bunun yanında lineer RNA'ların aksine, circRNA'lar özel yapıları nedeniyle belirli özelliklere sahipler (Holdt ve ark., 2018; Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2012). CircRNA'lar stabil olduğu ve poliA kuyruğuna sahip olmadığı için eksonükleazlara (RNase R dahil) dirençli moleküllerdir ve ortalama yarı ömürleri,

lineer RNA'lerden 2,5 kat daha uzundur (Jeck ve Sharpless, 2014; Eneka ve ark., 2016). Ayrıca, circRNA'ların miktarı aynı kökenli lineer RNA'lar ile korele değildir (Salzman ve ark., 2013), bu da circRNA'ların farklı düzenleyici mekanizmalarının ve hücre fonksiyonlarının olduğunu göstermektedir (Seimiya ve ark., 2020).

Günümüzde, RNA dizileme (RNA-seq) teknolojilerinin ve biyoinformatik yaklaşımların gelişimiyle, insan transkriptomunda 180.000'den fazla circRNA tanımlanmıştır (Dong ve ark., 2018). CircRNA'ların ekspresyon paterni hücre tipleri ve gelişim aşamalarına göre değişiklik göstermektedir (Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2013). CircRNA'lar, transkripsiyonun düzenlenmesi (Li ve ark., 2017; Li ve ark., 2015), mikroRNA süngerleri olmaları (Wang ve ark., 2018; Granados-Riveron ve Aquino-Jarquín, 2016; Qian ve ark., 2018), mRNA öncesi ekleme ile rekabetleri (Ashwal-Fluss ve ark., 2014) ve proteinler ile etkileşimleri (Du ve ark., 2017) yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Özellikle, circRNA'lar miRNA'ların süngerleri olarak onlara bağlanıp aktivitelerini kontrol eder ve dolaylı olarak hedef mRNA stabilitesini düzenlemektedir (Kulcheski ve ark., 2016). Ayrıca, circRNA'ların kanser mekanizmasında tümörögenez (Guarnerio ve ark., 2019), proliferasyon, migrasyon, invazyon (Zhang ve ark., 2019), metastaz (Dong ve ark., 2019), apoptoz, kemoterapi/radyasyon direnci (Huang ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2019) ve prognozda (Liang ve ark., 2019) çok önemli işlevleri olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuçta, her türlü doku ve sıvılarda yüksek miktarda varlıkları, stabilite özellikleri ve evrimsel olarak korunmaları, circRNA'ların birçok hastalık, özellikle de kanserler için potansiyel biyobelirteçler olabilme kapasitelerinin bulunduğunu göstermektedir (Han ve ark., 2017; Rybak-Wolf ve ark., 2015).

2.5 Eksozomal circRNA'lar ve Kanserdeki Rolü

CircRNA'ların eksozomlar tarafından taşınması, bu moleküllerin hücre dışı ortamda bozulmasına ve dilüe olmasına karşı koruma sağlamaktadır. Ayrıca eksozomlar bu moleküllerin kan dolaşımı veya interstisyel sıvı yoluyla daha uzun mesafelere transportuna imkân vermektedir (Morton ve ark., 2018). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, circRNA'ların TEX'de daha zenginleştirilmiş ve stabil yapılar olduğunu göstermiştir. Eksozomal circRNA'ların biyolojik işlevi tam olarak açıklanamasa da çalışmalar büyük bir ivme ile eksozomal circRNA'lara odaklanmıştır. Yeni dönemlerdeki çalışmalar TEX'den kaynaklanan circRNA'ların, biyolojik bilgiyi

spesifik hücelere aktarma yoluyla tümördeki fenotipik değışikliklerin etkin bir şekilde iletildiğini göstermektedir (Shi ve ark., 2020).

Bununla birlikte, eksozomal circRNA'ların hücre proliferasyonu, invazyon, EMT ve metastaz dahil olmak üzere kanser ilerlemesinde rol oynadığına dair artan kanıtlar bulunmaktadır (Kalluri, 2016; Maia ve ark., 2018; Wortzel ve ark., 2019). Birçok eksozomal circRNA'nın hücre proliferasyonunu desteklediği bildirilmiştir. CircRNA_100284, insan hepatik epitel hüceleri tarafından salgılanır ve eksozomlar aracılığıyla çevrede olan normal hücelere aktarılmakta ve bir miR-271 süngeri olarak EZH2'nin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek hücre çoğalmasını desteklemektedir (Dai ve ark., 2018). HCC hücelerinde, yukarı regüle edilmiş CDR1-AS, miR-1270 için bir sünger olarak görev yapıp hücre çoğalmasını ve göçünü hızlandırmakta ve alfa-fetoprotein ekspresyonunu desteklemektedir (Su ve ark., 2019). Son çalışmalar, eksozomlardaki circRNA'ların tümör invazyonuna ve metastaza katkıda bulunduğunu daha da güçlendirmektedir. CircPTGR1'nin yüksek metastatik HCC hücelerinde düşük metastatik hücelere kıyasla daha fazla salındığı ve miR-449a/MET yoluyla migrasyon ve invazyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, HCC hastalarının serum eksozomlarındaki circPTGR1 ekspresyon seviyesi, ileri klinik evre ve daha kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark, 2019).

Son zamanlarda, eksozomal circRNA'lar, stabiliteleri ve yüksek özgüllükleri nedeniyle kanserin tanısı, prognoz takibi, uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi veya tümördeki minimal invazif ilerlemeleri izlemek için potansiyel biyobelirteçler olarak önerilmiştir (Fanale ve ark., 2018).

Gereç ve Yöntem

Tez çalışması, in vitro koşullarda adenokarsinomik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı (WI38) kullanılarak, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, Ege Üniversitesi Solunum Araştırmaları Merkezi'nde (EGESAM), Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) ve Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1 Gereçler

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Tablo 1. Kullanılan malzemeler

Malzemeler	Marka, Ülke	Katalog Numarası
15 ml Falkon tüpleri	Sarstedt, Almanya	62.554.502
50 ml Falkon tüpleri	Sarstedt, Almanya	62.547.254
Mikrosantrifüj tüpleri	Axygen, Meksika	PMI110-06(570009)
İnce duvarlı PCR tüpleri	Axygen, Meksika	PMI110-16-9/16
5 ml Serolojik pipet	Sarstedt, Almanya	86.1253.001
10 ml Serolojik pipet	Sarstedt, Almanya	86.1254.001
25 ml Serolojik pipet	Sarstedt, Almanya	86.1685.020
T-flask 25 cm ²	Sarstedt, Almanya	83.391
T-flask 75 cm ²	Sarstedt, Almanya	83.3911.002
96 Kuyucuklu plak	Roche, Germany	4729692001
6 Kuyucuklu Plak	TPP	92006
Nichipet EX-Plus II pipet 0.1-2	Nichiryo, Japonya	K18Y06121
Nichipet EX-Plus II pipet 2-20	Nichiryo, Japonya	J18404351
Nichipet EX-Plus II pipet 20-200	Nichiryo, Japonya	K20624881
Nichipet EX-Plus II pipet 100-1000	Nichiryo, Japonya	K20702521
Tek kullanımlık pipet uçları	Kirgen / Golden Gate	KG5333/GTRC200F
Parafilm	Sarstedt, Almanya	86 1254 001
Kriyotüpler	Thermo Fisher, ABD	11391645
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, ABD	9.140.362.501
Steril su	Deva, Türkiye	A078096

Fosfat tampon tuz çözeltisi	Serox, Almanya	SRX0515-500
RPMI 1640+Glutamin	Sigma Aldrich	RNBK5748
Fetal Bovine Serum	Gibco, ABD	12103C
Penisilin-Streptomisin	Gibco, ABD	P4333
Trypsin-EDTA	Gibco, ABD	25200056
Trypan Blue boyası	Gibco, ABD	15250061
Hematositometre	Fisherscientific, ABD	02-671-10
Kristal Viyole boyası	Merck, Almanya	109218
Trizol	MRC	888-841-0900
ProtoScript®First Strand cDNA Sentez Kiti	New England Biolabs, Japonya	10121601???
FastStart Essential DNA Green Master	Roche, Almanya	6402712001
Primerler	Macrogen Europe	
CD63 antikoru	Biolegend, ABD	353003

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
-80°C Derin dondurucu	Sanyo, Japonya
-20°C Buzdolabı	Vestel, Türkiye
4°C Buzdolabı	Şenocak, Türkiye
Su banyosu	Faithful, Çin
Vortex	Boeco, Almanya
Şarjlı pipetör	Eppendorf
CO ₂ İnkübatör	Thermo Fisher, ABD
Sınıf-2 biyogüvenlik kabini	Thermo Fisher, ABD
Soğutmalı santrifüj	ThermoFisher, ABD
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Optima L-100XP Ultra Santrifüj	Beckman Coulter, ABD
Ultra Santrifüj Polyalomer Tüpleri (Ti40)	Beckman Coulter, ABD
İnverted mikroskop	CKX53 Olympus, Almanya
LightCycler 480	Roche, İsviçre
PCR ThermoCycler	BioRad, ABD

Nanofotometre N60	Implen, Almanya
Işınlama cihazı	Elehta
Zetasizer Nano ZS90	Malvern, İngiltere
BD Accuri C5 flow sitometri	BD Biosciences, ABD

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Yazılım Programları

Tablo 3. Kullanılan yazılım programları

Program Adı	Versiyon	Kullanım amacı
ImageJ	1.53	Hücrelerin Koloni Sayımı
Microsoft Excel	16.55	RT-qPCR Sonuçlarının Hesaplanması
GraphPad	9.2.0	İstatistiksel Analizler ve Grafikler

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışması kapsamında, A549 (CCL185, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri epitel hücre) ve WI38 (CCL75, insan sağlıklı akciğer fibroblast hücre) hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy'dan temin edilmiştir. Hücreler kullanılmadan önce mikoplazma tespit kiti ile kontaminasyon varlıkları incelenmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması

Bu çalışmada 2 hücre hattı, insan akciğer adenokarsinomik alveolar bazal epitel hücre hattı A549 ve insan sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı WI38 kültüre edilmiştir. Hücrelerin çözdürülmesinde, dondurulmasında, devamlılığında ve pasajlamasında kullanılacak besi ortamı hazırlanmıştır. Bunun için +4°C'de steril olarak muhafaza edilen L-Glutamin'li RPMI 1640 besiyeri, fetal sıgır serumu (FBS) ve penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı kullanılmıştır. Etüv (37°C) içerisinde çözdürülen solüsyonlar, daha sonra steril kabin içerisinde RPMI 1640 besi ortamına, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin bileşenleri eklenerek istenen hacimde hücre kültürü besiyeri oluşturulmuştur.

3.2.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültür Edilmesi

İlk önce steril kabin içerisinde, santrifüj tüpüne 5-6 ml besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra 1 ml içerisinde dondurulmuş hücre bulunan kriyotüpler -80°C 'den alınarak 37°C 'lik su banyosu içerisinde yaklaşık %75'i çözünecek şekilde çözdürülmüş ve kabindeki santrifüj tüpüne eklenerek hücre süspansiyonu oluşturulmuştur. Bir sonraki aşamada hücre süspansiyonu $400\times g$ 'de 5 dk santrifüjlenip, oluşan hücre pelletinin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerine 5 ml besiyeri eklenerek pipet yardımıyla homojenize edilmiş ve 25 cm^2 'lik (T-25) hücre kültür flaskına ekilmiştir. Flask 37°C , %5 CO_2 ve %95 relatif nem içeren etüvde inkübe edilmiştir.

3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücre hatlarının kültürü yapıldıktan sonra, flasklar bakteri kontaminasyon riski açısından her gün inverted mikroskop ile incelenmiştir. Hücre kültürü çalışması süresince hücre besiyerleri, hücrenin büyüme hızına göre haftada 2-3 defa yenilenip 85-90% konfluent hale geldiği zaman hücrelerin yeni flasklara pasajlanması yapılmıştır.

Pasajlama sırasında öncelikle hücrelerin üzerindeki eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Besiyeri içindeki serumu ortamdan tamamen uzaklaştırılmak için hücreler yaklaşık 5ml PBS (1x) ile 2 kere yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine 2ml tripsin/EDTA solüsyonu eklenip yaklaşık 5dk, 37°C 'de etüvde inkübe edilmiştir. Hücrelerin tamamının flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop ile gözlemlendikten sonra flaska tripsin miktarının en az 3 katı besiyeri eklenmiştir. Daha sonra bu hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve $400\times g$ hızıyla 5dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda oluşan hücre pelletinin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin büyüklüğüne göre uygun miktarda besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir.

Hücre süspansiyonunda bulunan canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesi için hemositometre ve tripan mavisi kullanılmıştır. Hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 oranında dilüe edilerek hemositometre lamı ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Sayım sırasında hemositometre lamında bulunan dört büyük karedeki canlı hücreler sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak süspansiyonun 1 ml'sinde bulunan toplam canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, hücrelerin yaklaşık 1:5'i yeni kültür flaskına alınarak pasajlama

işlemi tamamlanmış ve hücreler 37°C, %5 CO₂, %95 relatif nem içeren etüvde büyüme bırakılmıştır.

Çalışma sırasında oluşabilecek problemlerden dolayı, pasaj sayısı artmadan hücrelerin dondurulması ve stoklanması sağlanmıştır. Bunun için hücre pasajlaması ve sayılması ile süspanse hale gelen hücreler 1 ml olacak şekilde %10 DMSO çözeltisi içerisinde kriyotüpler içine koyularak -80°C derin dondurucuya kaldırılıp stoklanmıştır.

3.2.4 Koloni Oluşturma Testi ile Hücrelerin Işınlama Dozunun Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında A549 ve WI38 hücrelerinin üzerinde ışınlamanın etkisi ile eksozomal circRNA'ların gen ekspresyon farklılıklarının araştırılması için öncelikle uygun ışınlama dozu, koloni oluşturma testi yapılarak belirlenmiştir (Müftüoğlu, 2022). Hücrelerin sağ kalım fraksiyonlarının belirlenmesi amacıyla A549 ve WI38 hücreleri ayrı ayrı 5 filtresiz kapaklı T-25 flask içerisinde hazırlanmıştır.

Işınlama için öncelikle flasklar içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, PBS ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde tamamen doldurulmuştur. Doğru dozda ışınlama yapabilmek için flask, doku eş değeri materyal olarak kullanılan bolus içerisine yerleştirilmiş ve ışınlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Işınlamada Precise Treatment System cihazı kullanılmış, deneyden önce ayarları ve doz hesaplamaları gerçekleştirilmiştir (1 Gy = 108 MU).

Daha sonra flasklar 0 (Kontrol), 2, 4, 6 ve 8 Gy dozda ışınlamaya maruz bırakılmıştır. Işınlama sonrasında flasklar içerisinde PBS uzaklaştırılmış ve tripsinizasyon işlemi sonrasında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.2.3). Hücre sayımı sonrasında, 6 kuyucuklu plakalara 500 hücre ekimi üç tekrarlı olarak yapılmış ve kuyucuklara 2ml besiyeri eklenip 37°C etüve kaldırılmıştır. Işınlama sonrası ölen hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için her 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Işınlamadan sonraki 9. günde koloniler boyanmış ve sayma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kolonilerin boyanması için öncelikle kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin fikse olması için kuyucuklara 1ml metanol eklenmiş ve plakalar 10dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra metanol ortamdan uzaklaştırılmış ve kolonilerin boyanması için kuyucuklara 2 ml %0,2 kristal viyole boyası eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra boya ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra plakalar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plakaların fotoğrafları mikroskop

altında çekilerek koloni sayımları ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolonilerin kaplama verimlilikleri (platin efficiencies; PE) ve sağ kalım fraksiyonları (surviving fraction; SF) sırasıyla aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

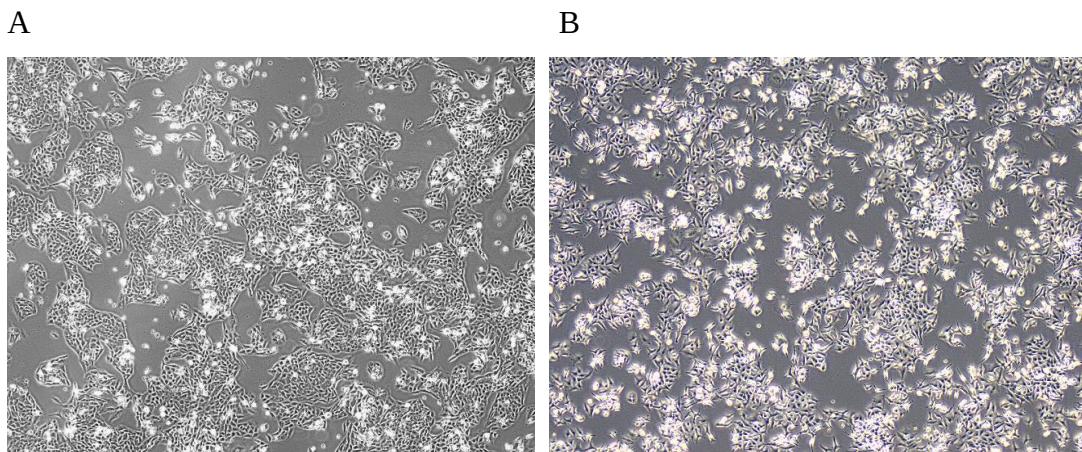
$$PE = \text{Oluşan Koloni Sayısı} / \text{Ekilen Hücre Sayısı}$$

$$SF = \text{Işınlamadan Sonra Oluşan Koloni Sayısı} / (\text{Ekilen Hücre Sayısı} \times \text{Kaplama Verimliliği})$$

3.2.5 Eksozom İçeren Üst Sıvının Hazırlanması (Ön İzolasyon Aşaması)

Hücre hatlarından eksozomların izolasyonu için öncelikle eksozom içeren supernatantın hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Hücreler, T-25 flasklar içerisinde %75 konfluent hale gelene kadar büyütülmüştür (Şekil 1). Bu işlem her hücre hattı başına 3 adet T-25 flask içerisinde uygulanmıştır.

Işınlama uygulanan hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra (Bölüm 3.2.4) ve ışınlama uygulanmayan hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp steril PBS ile üç kez yıkanmıştır. Her flaska yaklaşık 30 ml serumsuz taze kültür ortamı eklenmiştir (Serumda bulunan matriks metalloproteazların eksozom yüzeyinde olan molekülleri ayırma kapasitesine sahip olması nedeniyle). Hücreler 37°C, %5 CO₂, %95 relatif nem içeren etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra eksozom içeren supernatantlar flasktan toplanıp 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Supernatant toplandıktan sonra, hemen eksozom izolasyonu aşamasına geçilmiştir.



Şekil 1. Eksozom izolasyonunda kullanılan hücre hatları. A. WI38; B. A549 %75 konfluent olan hücre hatları

3.2.6 Eksozom İzolasyonu

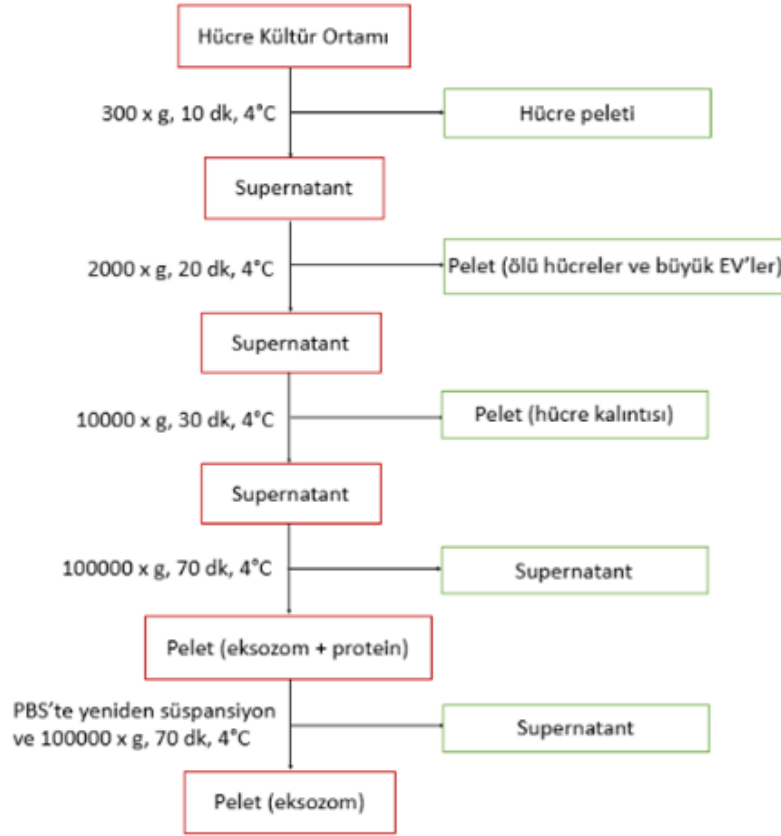
Eksozomların izolasyon ultrasantrifüjleme yöntemiyle ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem şekil 2’de gösterildiği gibi santrifüjleme ve ultrasantrifüjleme basamaklarına göre yapılmış, bütün basamaklar 4⁰C’de gerçekleştirilmiştir (Purushothaman, 2019).

Her hücre hattından elde edilen 90 ml supernatant 2 adet 50 ml’lik falkon tüpüne aktarıldıktan sonra, 300xg hızında 10 dk santrifüj edilmiş ve canlı hücreler çöktürülmüştür. Supernatant 2 adet yeni 50 ml’lik falkon tüpüne aktarılıp 20 dk 2000xg’de santrifüjlenmiş ve ölü hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen supernatant dikkatlice pelet ile karışmadan ultrasantrifüj rotoruna uygun olan poliallomer tüplere aktarılmıştır. Bu tüplerin maksimum kapasitesi 14 ml olup, ultrasantrifüj sırasında tüplere 12 ml supernatant konulmuştur. 10.000xg’de 30 dk boyunca santrifüjlenerek hücre kalıntılarından uzaklaştırılmış ve süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır. Daha sonra süpernatant 70 dk 100.000xg’de santrifüjlenmiştir (santrifüj hızının 100.000xg’a ulaşması yaklaşık 10 dk sürmektedir). Oluşan pelet, eksozomları ve proteinleri içermektedir.

Süpernatant aynı yöntemle uzaklaştırıldıktan sonra her tüpün içindeki pellet, 1 ml PBS ile yeniden süspanse edilmiş ve hepsi bir tüpe aktarılıp (ultrasantrifüj için tüp sayısının en aza indirilmesi, eksozomların verimini arttırmak için) üzeri PBS ile doldurulmuş ve ikinci kez 100.000xg’de 70 dk santrifüjlenmiştir. 100.000xg gibi yüksek hızda ultrasantrifüjleme için tüplerin hepsinin dörtte üçü dolu olması gerektiğinden, tüplere 10.5 ml olana kadar PBS eklenmiştir. Eksozomları elde etmek amacıyla yapılan son ultrasantrifüjleme aşamasından sonra, tüm süpernatantı uzaklaştırılmak için; önce pastor pipet ile dikkatlice peletin olduğu yere dokunmadan peletin üzerinde yaklaşık 100 µl sıvı kalacak şekilde supernatant atılmış, sonra kalan 100 µl’yi almak için bir mikropipet kullanılmıştır. Daha sonra eksozom peleti 50µL PBS ile yeniden süspanse edilip ependorfa aktarılmış ve total RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C’de saklanmıştır. Eksozomlar bir yıl -80°C’de saklanabilmektedir fakat sık sık dondurma-çözdürülme işlemlerinin eksozomların parçalanması ve kaybına neden olabileceği unutulmamalıdır.

3.2.7 Eksozom Karakterizasyonu

Bu aşamada, elde edilen peletin eksozom karakterizasyonu, saflığı ve konsantrasyonu araştırılmıştır. İzole edilen eksozomların karakterizasyonu, eksozomların boyutu ve eksprese ettikleri yüzey proteinin gösterilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Eksozom izolasyonu aşamaları

3.2.7.1 Eksozom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi

İzole edilen eksozomların büyüklüğü ve sayısının değerlendirilmesi, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Nano Zetasizer) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için 20 µl elde edilen eksozom süspansiyonu, cihazın kendine özel küveti içerisinde 200 PBS ile dilüe edilerek cihazda ölçümü yapılmıştır. Cihazın önce standart ayarları gerçekleştirilmiş ve Kırılma İndeksi = 1.331, Viskozite = 0.89, Sıcaklık = 25°C olarak ayarlanmıştır.

3.2.7.2 Eksozom Yüzey Proteinlerinin İncelenmesi

Eksozomlarda spesifik olarak eksprese olan yüzey proteinlerinin incelenmesi flow sitometri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için eksozom yüzey proteinlerinin varlığı anti-CD63 antikoru kullanılarak incelenmiştir. Deney için 3 örnek hazırlanmıştır; birincisine 190µl PBS ve 10µl elde edilen eksozom süspansiyonu, ikincisine 190µl PBS, 10µl eksozom süspansiyonu ve 1µl antikor ve üçüncüsüne 200µl PBS ve 1µl antikor eklendikten sonra 45 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra antikor içeren tüpler (ikinci ve üçüncü) 15000xrpm, 4°C ve 30 dk santrifüj edilmiştir. Bu süre içinde birinci tüp 4°C’de, 30 dk saklanmıştır. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 200 µl PBS eklenmiştir. Bütün tüplerin analizi BD Accuri C5 flow sitometri cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Total RNA İzolasyonu

Her deney grubu (A549, WI38, A549-RT, WI38-RT) için total RNA ekstraksiyonu Trizol solüsyonu (guanidyum tiyosiyanat ve fenol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.6’da elde edilen 50 µl eksozom içeren sıvı içerisine 1ml Trizol eklenmiş ve oluşan hücre süspansiyonu vorteks ile karıştırılmıştır. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra süspansiyon 12.000xrpm, 4°C ve 20 dk santrifüj edilmiştir. Kloroform ile parçalanan hücrelerden protein, RNA ve DNA olmak üzere üç fazın oluşması sağlanmıştır; 1. faz (en üst faz) renksiz ve RNA içermekte, 2. faz (ortadaki faz) beyaz ve DNA içermekte, 3. faz (aşağıdaki faz) mavi ve protein içermektedir.

En üstteki renksiz fazdan, diğer fazlara dokunmadan dikkatli bir şekilde yaklaşık 500-700 µl alınıp yeni steril tüplere aktarılmıştır. Tüp üzerine RNA miktarı kadar izopropanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Tüp 12.000xrpm, 4°C, 10 dk santrifüj edilmiş ve böylece RNA’nın pellet halinde çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 1 ml %75 etanol eklenmiştir. Tüp 7500xg, 4°C ve 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpün içinde kalan etanol uçana kadar 5-10 dk beklenilmiştir. Son olarak RNA pelleti 20-50 µL (RNA konsantrasyonuna göre) steril su (RNase free) ile çözündürülmüştür. İzolasyon sonrası RNA’ların konsantrasyon ölçümü Nanofotometre N60 cihazı ile gerçekleştirilmiş ve cDNA sentezi yapılana kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır.

3.2.9 cDNA Sentezi

Her dört deney grubundan elde edilen eksozomların total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, her bir örnek için cDNA sentezi yapılmıştır. Bu aşama ProtoScript First Strand cDNA Kiti ve Thermal Cycler cihazı ile aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri tablo 4'teki gibi hazırlandıktan sonra her örnek başına toplam volüm 8 µL olacak şekilde PCR cihazında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Ters transkriptaz enziminin aktivasyonu için 15 dk, 65°C sıcaklıkta reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu aşamanın sonunda mikrofüt tüpü derhal buz üstüne konulmuştur.

Tablo 4. cDNA sentez protokolü 1. aşama

Bileşenler	Hacim (µl)
Total RNA	1–6 µl (max 1 µg)
Random Primerler	2 µl
Distile H ₂ O	Değişken
Total Hacim	8 µl

Daha sonra M-MuLV Reaksiyon miks ve M-MuLV Enzim miks bileşenleri tablo 5'te gösterildiği hacimlerde mikrofüt tüpüne eklenmiştir. Mikrofüt tüpün içindeki total hacim 20 µl'ye tamamlandıktan sonra, PCR cihazında 3 aşamada reaksiyon gerçekleştirilmiştir: 25°C, 5 dk; 42°C, 60 dk; 80°C, 5dk. Daha sonra elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında sulandırılmış ve RT-qPCR deneyleri yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 5. cDNA sentez protokolü 2. aşama

Bileşenler	Hacim (µl)
M-MuLV Reaksiyon Miks	10 µl
M-MuLV Enzim Miks	2 µl

3.2.10 CircRNA'ların Belirlenmesi ve Primerlerinin Dizaynı

Tez çalışmasında kullanılan circRNA primerler için daha önce yayımlanan literatürler taranmıştır. Bunun sonucunda özellikle akciğer kanseriyle ilişkili 40 adet circRNA geni seçilmiştir. Bu circRNA'ların ID'leri www.circbase.org sitesinden kontrol edilmiştir. Daha sonra CircInteractome web aracı (<http://circinteractome.irp.nia.nih.gov>) ve Primer 3 programı kullanılarak circRNA primerleri dizayn edilmiş ve bir firma tarafından sentezi gerçekleştirilmiştir. Seçilmiş olan circRNA genlerine ait sağ ve sol primer sekansları tablo 6'da listelenmiştir.

Tablo 6. CircRNA'ların primer sekansları

CircRNA-ID	Sol Primer Sekans	Sağ Primer Sekans
hsa_circ_0000519	CAGACCTTCCCAAGGGACAT	GCCCTAACAGGGCTCTCC
hsa_circ_0001874	ACATACCCGTTGGCTCTCCT	GGTCAGGGTCATCCACAATC
hsa_circ_0001946	CTGGAAGACCCGAGTTGT	CATGTCTTCCAACGTCTCCA
hsa_circ_0006404	TCTTGCCAGTTCCTCATTC	GGGGAACCTTCACTGGTGCTA
hsa_circ_0005320	CCTGTGGCTGAGGCTACAC	ACAGTGGCTCGGAGTAGGG
hsa_circ_0000003	GGCTCTGAGGTCCTTGCTTA	CCATGCACAAGCTCTTTGAC
hsa_circ_0001900	TGTGCTCCTGCTCATACTGG	ACGTTCACTGCCTCGAAAGA
hsa_circ_0001346	GAGCATCCCTATGGAGAGCA	TTTGTCCAGGATAGACATAGAGC
hsa_circ_0002874	AAAGCAGCAGGAGTTTGAA	GAAAAACCTGTGGCCAAGAC
hsa_circ_0000376	GAGCCAGGAGTTCCAGACT	TTTGGATGTGGAGGGGAATA
hsa_circ_0000291	TTGCGCAGCATCATTTAGAG	GCCCAAAGACAAAGCAGAAG
hsa_circ_0002130	CAAGTCCTCAACGTTCCACA	CACCACGTGGGAGATTCTG
hsa_circ_0008305	TTTTGGCCTTGACAGAATCC	AGAAGGTGAACGGGCTTTG
hsa_circ_0001320	CAGTGTGCGAAGATTTCCAA	CTGAGGGCTCAGCACTTGT
hsa_circ_0087862	AGTTGTGGTGGTGGAGGAAG	GGGCTATGAACGAGAGCAAG
hsa_circ_0102533	GCAGGCTGCAATACTGTGAA	ATTGGCTTCCAGCTTGATA
hsa_circ_0060937	TTTTGATGGCCATGATGAAG	CTGCTGTACAGAGCTCCAG
hsa_circ_0013958	ATAGCTGGGGGTTCCACTCT	TCAACCCACAGGAGGTCTTT
hsa_circ_0086414	TTCTCCAAACCGCAGAACT	TGAAAGAGATGCACGTCTGC
hsa_circ_0014235	GAAGGTAGTGACCAGCACAGC	AAGAGGGCGACAAGTTCAAG
hsa_circ_0056616	TAACCGCTGGTTCTCCAGAT	GTGGGTTGATTTCAACCT
hsa_circ_0074027	CGGCAGAGTCTGTCTTAAAGC	CAGCGTCCCTGTGTATGTTG
hsa_circ_0008928	TGTGTCCCAAGCTGTCTTTG	ACAACTCGGCGTGTCTTC
hsa_circ_0007385	GCAGCACAAGACCCACAGTA	GTTTGAACGCATGTCTCTGC
hsa_circ_0047921	CTTTCCAGGTTCCGAAACAA	GGCTTTACCGCTGCTACTTG
hsa_circ_0056285	CTGGCCCTTACTCTTGTTGG	GGAGGAGGCCAGGAGTAAAG
hsa_circ_0007761	CGCTCCGACATTCTTTCC	TGAGGCTTCCAACTTCCTG
hsa_circ_0000190	ACCAGTGCAATGACATGAGC	GAGGGCAGCTGAAGTCACAC

hsa_circ_0001492	ACCAACCGCACAAACAAACT	TACCAGCATCCATTGCAAAC
hsa_circ_0000690	AGCACTTTGGTGGCATCTG	GCGAGCGAGTTTGTGAAAT
hsa_circ_0001439	GGGAAAGGCCTCCAATTTT	GAACATGGAAGTGACTAACCAACA
hsa_circ_0004771	TCCGGATGACATCAGAGCTA	TGTGCATCTTCTGGCTGTGT
hsa_circ_0005962	GAAGCATTGGGGATCAAGAA	TGAAGCCATTGCTGAACCTG
hsa_circ_0000735	AGGCCCTTGAGTTTCACAGA	GGCACTGCAGACCCATCTAT
hsa_circ_0016760	TGGGCTCCAGGTAGTAGGTG	CTCAGAAGCGCAAGAACCTC
hsa_circ_0003645	GGCCAAAGGAAACCATTTTT	ACCTGCATTCTGGTCAGGTG
hsa_circ_0026134	GGCAACAAGGATCTCCCACT	CACTCCTTTGTCTTGGAACTGTC
hsa_circ_0014130	AAAGTCCGAGGGTTCTGGTT	TGGTACATGACGGAGACACTG
hsa_circ_0008975	TGCTGCTTTTCGATACATGC	GGGACGGAGAGGTGTTCTTT

3.2.11 Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR

Tez kapsamında 4 deney grubu (A549, WI38, A549-RT, WI38-RT) örnekleri üzerinde incelenen 40 eksozomal circRNA genlerinin ifade düzeyleri Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi ile SYBR Green I Master qPCR Kiti kullanılarak LightCycler 480 cihazında analiz edilmiştir. SYBR Green, PCR reaksiyonu esnasında oluşan gen ürünlerine bağlanarak özgül olmayan floresans ışıma yapabilme özelliğine de sahip bir moleküldür. Bu nedenle bütün sonuçların analizleri erime eğrisi (melting curve) ile doğrulanarak ve agaroz jelde bantların varlığı gösterilerek kontrol edilmiştir. Gen ifade düzeylerinin analizlerinin yapılabilmesi için referans gen (Housekeeping) olarak β -Aktin geni kullanılmıştır. RT-qPCR sırasında circRNA gen ekspresyonları için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Revers-Transkriptaz kantitatif PCR bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim	Final Konsantrasyonu
2 X SYBR Green	5 μ l	1 X
Sol Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.5 μ M
Sağ Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.5 μ M
cDNA	1 μ l	
H ₂ O	3 μ l	
Total Hacim	10 μ l	

Reaksiyon bileşenleri 96-kuyucuklu plaklar içerisine pipetlendikten sonra RT-qPCR reaksiyonları LightCycler 480 platformunda, pre-inkübasyon basamağını takiben 45

döngü üzerinden gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların gerçekleştirildiği döngü aşamaları tablo 8’de verilmiştir.

Amplifikasyon eğrisinin eşik değerini geçtiği floresan değerine eşik döngüsü (Cyclethreshold; Ct) değişimleri ΔCT yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. CircRNA genlerinin ekspresyon analizlerinin normalizasyon hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak housekeeping β -Aktin ile yapılmıştır (Wang ve ark., 2019).

$$\Delta CT = Ct (Hedef Gen) - Ct (Referans Gen)$$

Hedef Gen: circRNA

Referans Gen: β -Aktin

Tablo 8. Revers-Transkriptaz PCR reaksiyon aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Pre-denatürasyon	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 sn	45
Yapışma	60 °C	10 sn	
Uzama	72 °C	10 sn	

3.2.12 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasından elde edilen verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism (versiyon 9.2.0 yazılım programı Software Inc., CA, USA) kullanılmıştır. Her 4 deney grubu (WI38, A549, WI38-RT ve A549-RT) için β -Aktin referans gen olarak normalizasyon için kullanılmıştır. Belirlenen circRNA genlerinin ekspresyon seviyeleri ANOVA testi kullanılarak 4 deney grubunda karşılaştırılmıştır. Anlamlı seviyedeki değişiklikler Tukey-Post testi ile değerlendirilmiştir. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (ns; P> 0,05; * P <0,05; ** P <0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001).

3.2.13 Biyoinformatik Analizler

Tez çalışmasında deney gruplarında saptanan eksozomal circRNA’lar (Bölüm 4.4) ve onların parental genlerinin ekspresyon verileri detaylı olarak incelendi. Bunun için öncelikle KHDAK ile ilgili hasta TCGA gen ekspresyon verileri GEPIA platformu kullanılarak değerlendirildi (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). Bu analizde hastalara ait kanserli ve sağlıklı dokulardaki gen ekspresyon verileri absolut log2 değeri>1 ve

$p < 0.05$ alınarak incelendi. Aynı zamanda TCGA verileri kullanılarak radyoterapi alan ve almayan KHDAK hastalarında bu genlerin ekspresyonu analiz edildi. Ayrıca bu eksozomal circRNA'ların hedeflediği tahmini miRNA'lar circBank platformu (<http://www.circbank.cn>) kullanılarak oluşturuldu.

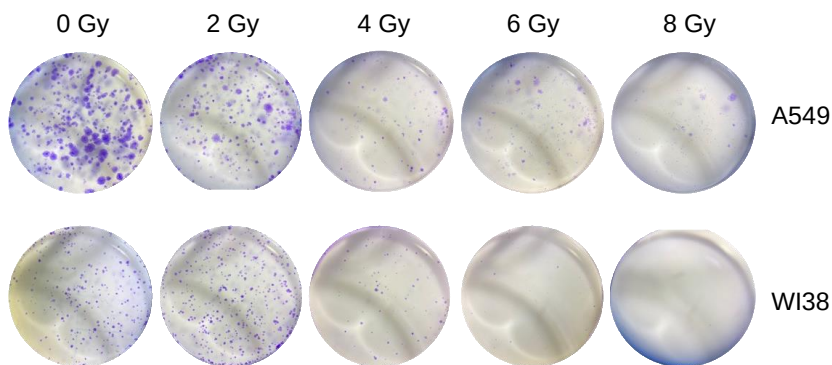


Bulgular

Tez çalışması kapsamında, in vitro koşullarda akciğer kanseri (A549), sağlıklı akciğer (WI38), ışınlanmış A549 ve ışınlanmış WI38 hücre hatlarının eksozomal circRNA ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. Hücrelerin ışınlama dozunu belirlemek için koloni oluşturma testi yapılmış ve sonuçlara göre 4 Gy ışınlama dozu çalışmanın devamı için uygun görülmüştür. Işınlama yapılan ve yapılmayan hücrelerden eksozomlar izole edilmiştir. Elde edilen eksozomların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm deney gruplarından izole edilen eksozomlardan total RNA ekstraksiyonu yapılmış ve 40 adet circRNA'nın ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. KHDAK hasta verilerine ait TCGA verilerin analizleri ile değerlendirilmiştir.

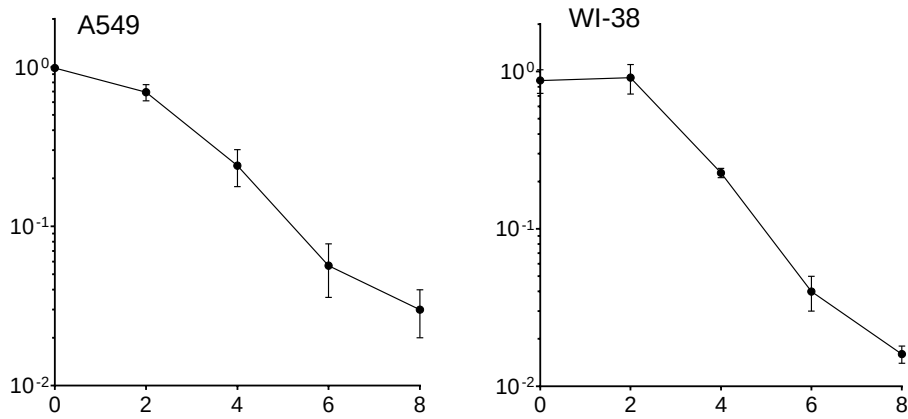
4.1 Işınlama Dozunun Belirlenmesi

Işınlama dozunun belirlenmesi için, detayları gereç ve yöntemde (Bölüm 3.2.4) anlatılmış olan koloni oluşturma testi uygulanmıştır. Bunun için A549 ve WI38 hücre hatlarını içeren T-25 filtresiz kapaklı flaskların içerisi PBS ile doldurulmuştur. Daha sonra 0, 2, 4, 6 ve 8 Gy dozlarda ışınlama gerçekleştirilmiştir. Işınlamadan sonra hücrelerin ekimi, 6 kuyucuklu plakalara üç tekrarlı olarak 500 hücre/kuyucuk olacak şekilde yapılmıştır. Hücrelerin hayatta kalma eğrileri, 9. günde oluşan kolonilerin boyanarak sayılmasıyla gerçekleştirilmiştir. A549 ve WI38 hücre hattının kontrol (0 Gy), 2, 4, 6 ve 8 Gy doz ışınlama uygulama sonrası elde edilen koloni görüntüleri şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. A549 ve WI38 hücre hattının ışınlama sonrası koloni görüntüleri

Daha sonra ImageJ programı kullanılarak farklı ışınlama dozları sonrasında oluşan koloniler sayılmıştır (koloni sayılarının ortalamaları alınmıştır). Kaplama verimliliği (PE) ve Sağ Kalım Fraksiyonu (SF) hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Klonojenik sağ kalım eğrisi sonuçları grafik 1’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre A549 ve WI38 hücrelerde 2-4 Gy arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$, $p<0.0001$, sırasıyla). Bu sonuçlara göre çalışmanın devamında eksozomal circRNA’ların ekspresyon analizi için 4 Gy ışınlama dozu uygulanmıştır.



Grafik 1. Hücre hattına ait klonojenik sağ kalım eğrileri

4.2 Eksozom karakterizasyonu

Bütün deney gruplarından izole edilen eksozomların karakterizasyonu dinamik ışık saçılımı ve flow sitometri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

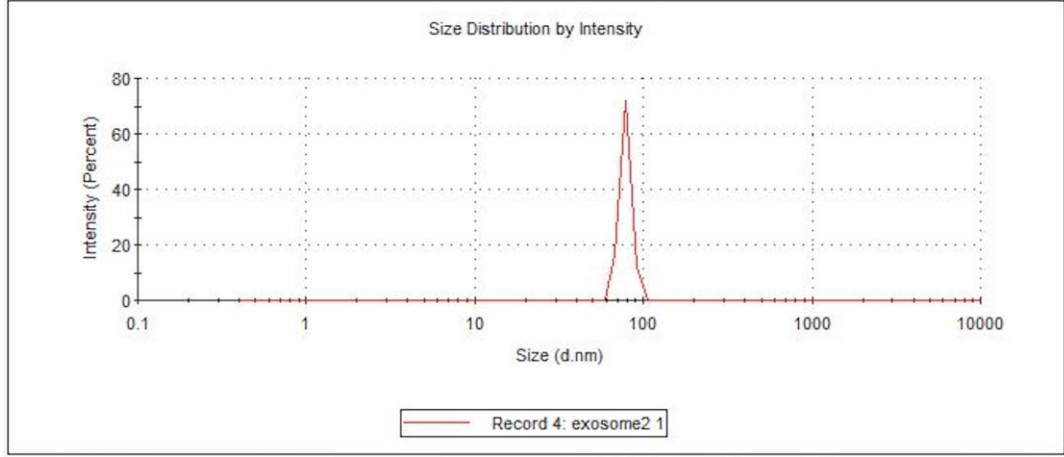
4.2.1 Eksozom Büyüklüğü ve Sayısının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada ışınlama uygulanan ve uygulanmayan hücrelerden izole edilen eksozomların büyüklüğü ve sayısının değerlendirilmesi Zetasizer Nano ZS90 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için elde edilen eksozom süspansiyonu, cihazın özel küveti içerisinde PBS ile dilüe edilip cihazda ölçüm yapılmıştır. A549-RT ve A549 deney gruplarındaki eksozomların ölçüm sonuçları şekil 4 ve 5’te gösterilmiştir.

A

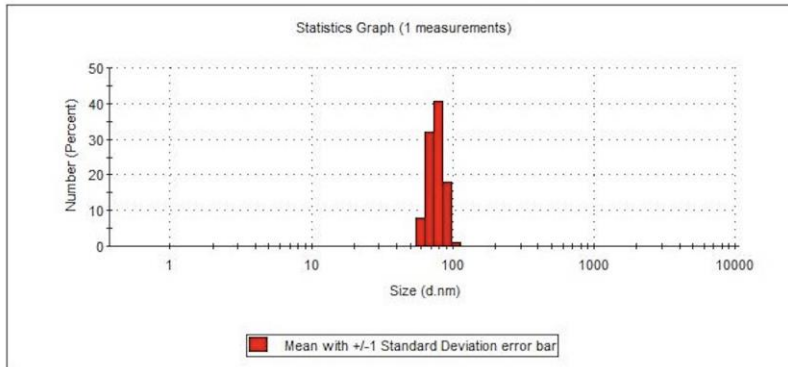
Temperature (°C): 25,0 Duration Used (s): 190
 Count Rate (kcps): 63,7 Measurement Position (mm): 4,65
 Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Z-Average (d.nm): 2978 **Peak 1:** 78,52 **% Intensity:** 100,0 **St Dev (d.nm):** 6,091
Pdl: 1,000 **Peak 2:** 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,671 **Peak 3:** 0,000 0,0 0,000
Result quality : Refer to quality report



B

Size d.nm	Mean Number Percent	Std Dev Number Percent	Size d.nm	Mean Number Percent	Std Dev Number Percent	Size d.nm	Mean Number Percent	Std Dev Number Percent	Size d.nm	Mean Number Percent	Std Dev Number Percent
0,4000	0,0		5,815	0,0		78,82	40,7		1106	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	18,1		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	1,2		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	0,0		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	0,0		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,0		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,0		2669	0,0	
1,117	0,0		15,89	0,0		220,2	0,0		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		256,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	0,0		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	0,0		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	8,1		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	31,9		955,4	0,0				



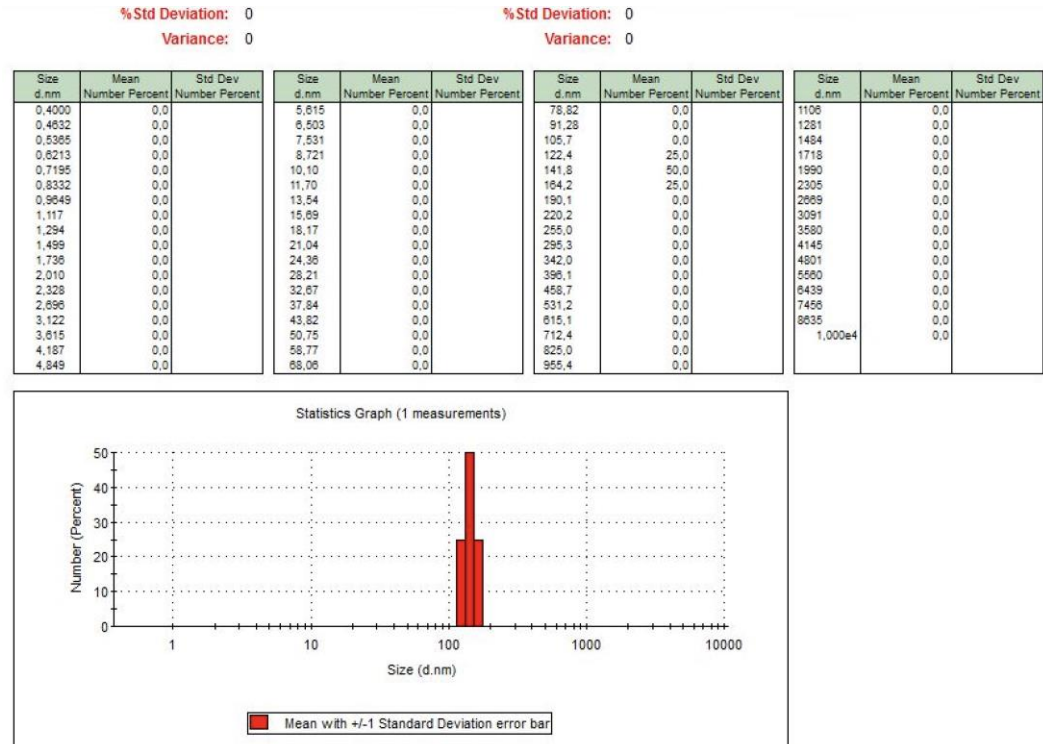
Şekil 4. A549 hücrelerinin eksozom büyüklüğü ve sayısının değerlendirilmesi.

A) yoğunluk, B) sayısına ait veriler

A



B

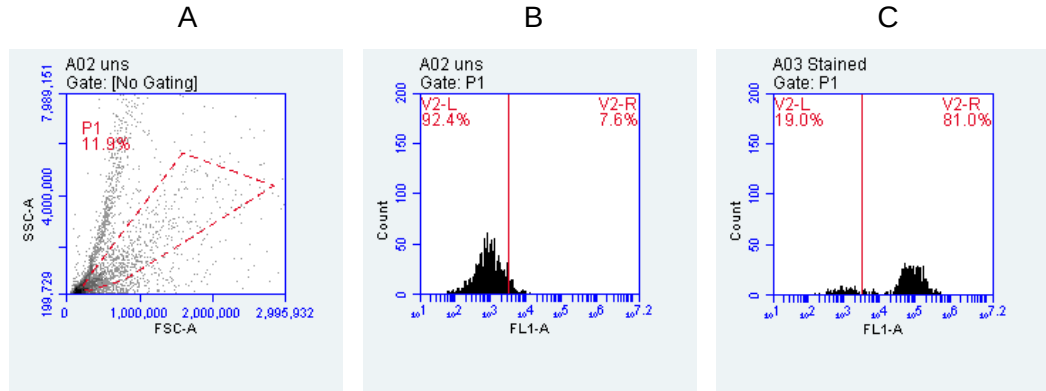


Şekil 5. Işınlama uygulanan A549 hücrelerinin eksozom büyüklüğü ve sayısının değerlendirilmesi. A) yoğunluk, B) sayısına ait veriler

İki deney grubundaki eksozom partikül boyutu bilinen eksozom boyutlarıyla tutarlı olarak tespit edilmiştir. A549 hücrelerinden elde edilen eksozom büyüklükleri 58,77 ile 105,7 nm arasında ve A549-RT hücrelerinden elde edilen eksozom büyüklükleri 122,4 ile 164,2 nm arasında bulunmuştur. Bu nedenle, bu izole veziküller eksozom olarak kabul edilmiştir. Sonuçta, A549-RT hücrelerinden alınan eksozomların büyüklüğü (ortalama boyutu; 141.8nm), A549 hücrelerinininkinden (ortalama boyutu: 78.5 nm) daha büyük olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde, ışınlanmış kanser hücrelerindeki eksozom yoğunluğu, kanser hücrelerindeki daha fazla olarak bulunmuştur.

4.2.2 Eksozom Yüzey Proteinlerinin İncelenmesi

Eksozom karakterizasyonunda eksprese olan eksozom yüzey proteinlerinin incelenmesi flow sitometri yöntemi ve BD Accuri C5 flow sitometri cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Eksozomlar üzerinde spesifik olarak eksprese olan CD63 proteinini bölüm 3.2.7.2’de bahsedildiği gibi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 6’da gösterilmiştir. İzole edilen nanoparçacıkların %81’i anti-CD63 antikoruna ile boyanmış olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. Flow sitometri sonuçları. A) Eksozom popülasyonu için alınan gate, B) Kontrol histogramı, C) Anti-CD63 antikoruna ile boyanmış eksozom süspansiyonunun histogramı

4.3 Total RNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Kontrolü

Bütün deney gruplarından elde edilen eksozomların total RNA izolasyonu, trizol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası total RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri 260/280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrometri ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar tablo 9 'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar izole edilen eksozomal RNA'ların çalışmanın devamı için ideal saflıkta olduğunu göstermiştir.

Tablo 9. Total RNA'ların konsantrasyonları ve saflık değerleri

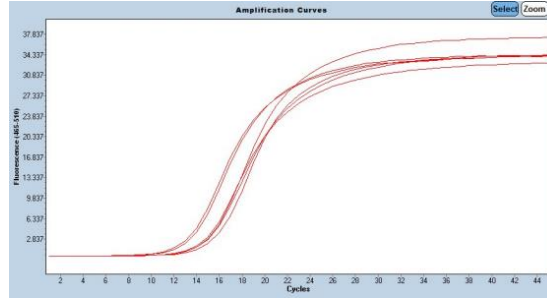
Deney grubu	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A260/280
A549	1490.3	1.782
WI38	1422.7	1.775
A549-RT	1319.7	1.876
WI38-RT	1376.3	1.857

4.4 Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR Sonuçları

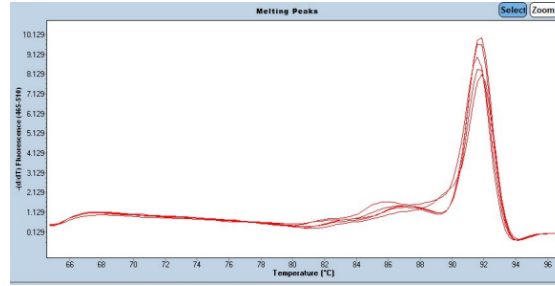
İyonlaştırıcı radyasyonun circRNA'lar üzerindeki etkisini değerlendirmek için, RT-PCR kullanarak ışınlamadan önce ve sonra eksozomlarda 40 circRNA genini araştırdık. Revers-Transkriptaz Kantitatif PCR (RT-qPCR) reaksiyonlarının sonuçları, her bir eksozomal circRNA geni için erime eğrileri ve amplifikasyon eğrileri değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR sonuçlarına göre normalizasyon (ΔCT) işlemi β -Aktin referans geni ile gerçekleştirilmiştir. β -Aktin genine ait örnek amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi pikleri şekil 7'de gösterildiği gibidir.

Tez çalışması kapsamında incelenen 40 adet eksozomal circRNA genine ait sonuçlar göz önüne alındığında; 4 adet eksozomal circRNA geninin deney gruplarının en az birinde eksprese olduğu, 36 adet eksozomal circRNA geninin ise hiçbir deney grubunda ifade edilmediği tespit edilmiştir.

A



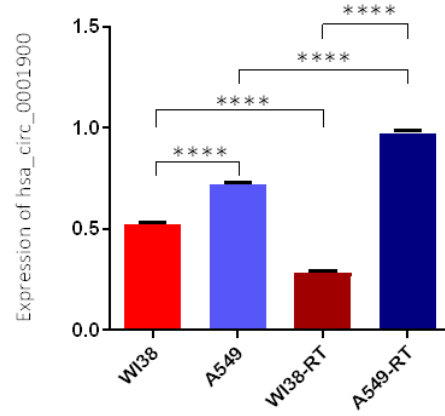
B



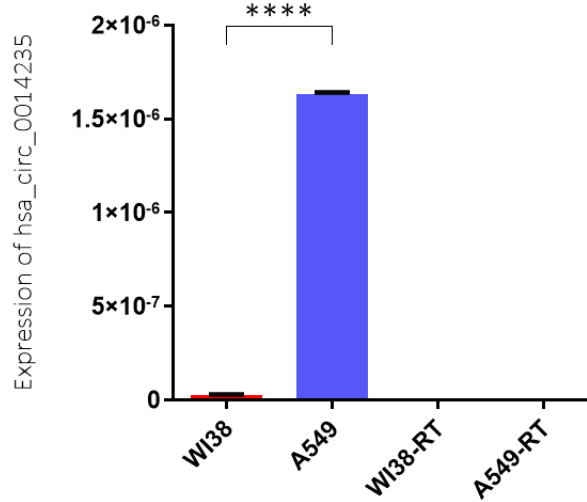
Şekil 7. β -Aktin genine ait PCR sonuçları. A) amplifikasyon eğrisi, B) erime pikleri.

Bunlar arasında, hsa_circ_0001900 geninin bütün deney gruplarında eksprese edildiği tespit edilmiştir. Hsa-circ_0001900'ün ekspresyon seviyesinin kanser hücre hattında, sağlıklı hücre hattına kıyasla anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.0001$). Işınlamadan sonra ise hsa-circ_0001900'ün ekspresyon seviyesinin sağlıklı hücre hattında ışınlanmamış hücrelere göre anlamlı seviyede aşağı doğru regüle olduğu; ışınlanmış kanser hücre hattında ise yukarı doğru regüle olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p < 0,0001$ $p < 0,0001$) (Grafik 2).

Benzer şekilde hsa_circ_0014235 ekspresyonunun, sağlıklı hücre hattına kıyasla kanser hücresinde belirgin şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.0001$). Bununla birlikte, bu circRNA'nın ekspresyon seviyesinin ışınlanmış kanser ve sağlıklı hücre hattında eksprese olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 3).

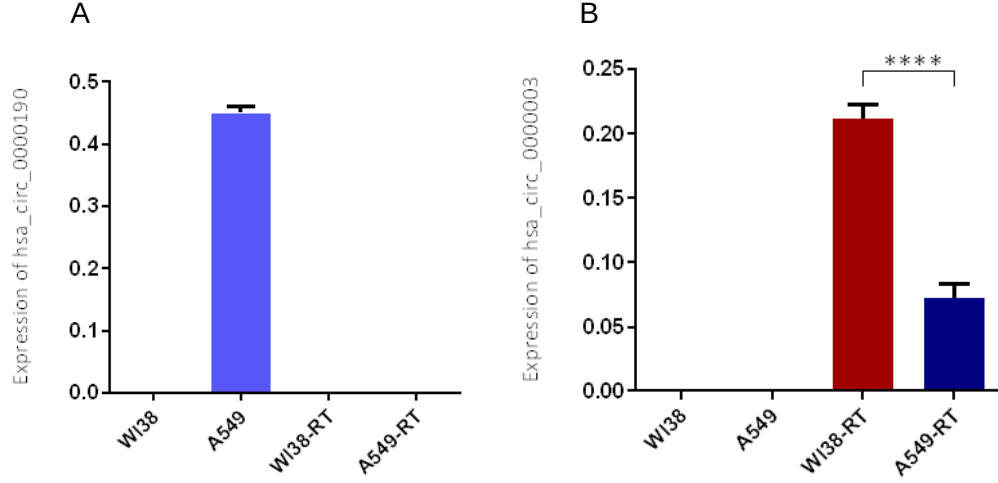


Grafik 2. Deney gruplarında eksozomal hsa_circ_0001900'ün ekspresyon seviyesi



Grafik 3. Deney gruplarında eksozomal hsa_circ_0014235'in ekspresyon seviyesi

Hsa_circ_0000190 geninin ise sadece A549 kanser deney grubunda ekspresyonu tespit edilirken ışınlamadan sonra eksprese olmadığı saptanmıştır (Grafik 4A). Hsa_circ_0000003 geni A549 kanser ve WI38 sağlıklı hücre hatlarında eksprese olmaz iken ışınlama uygulamasından sonra her iki hücre hattında bu genin eksprese olduğu tespit edilmiştir (Grafik 4B).



Grafik 4. Eksprese olan eksozomal circRNA genlerine ait grafikler. A) hsa_circ_0000190, B) hsa_circ_0000003

Tez çalışmasında ekspresyonu tespit edilen eksozomal circRNA'ların hangi kromozomda ifade edildiğini, hangi genden eksprese olduğunu ve bu genlerin genomik uzunluklarını gösteren bilgiler <https://circinteractome.irp.nia.nih.gov/index.html> internet sitesi kullanılarak elde edilmiştir (Memczak ve ark., 2013; Salzman ve ark., 2013; Rybak-Wolf ve ark., 2015). Bu genler ve özellikleri tablo 10'da listelenmiştir. Gen bilgileri <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> kullanılarak elde edilmiştir.

Tablo 10. Deney guruplarında eksprese olan eksozomal circRNA'lara ait bilgiler

circRNA ID	Gen ID	Kromozom Lokalizasyon	NCBI ID	Gen Büyüklüğü	circRNA Büyüklüğü	Gen Fonksiyon
hsa_circ_0001900	CAMSAP 1	chr9:138773478-138774924	157922	1446 bp	425 bp	Hücre morfogenez, mikrotübül polimerizasyonu
hsa_circ_0014235	S100A2	chr1:153536209-153536363	6273	154 bp	154 bp	Hücrel kalsiyum sinyali
hsa_circ_0000190	CNIH4	chr1:224553580-224559125	29097	5545 bp	254 bp	Golgi vezikül aracılı taşıma
hsa_circ_0000003	ATAD3B	chr1:1423242-1459777	83858	36535 bp	29313 bp	Kök hücrelerin mitokondriyal ağ organizasyonu

4.5 Eksozomal CircRNA'ların Potansiyel Fonksiyonları

CircRNA'ların miRNA seviyelerini düzenlemek için "miRNA sünger" olması nedeniyle (Zhang ve ark., 2019; Li ve ark., 2018), online veri tabanları ile bu circRNA'lar ve miRNA'lar arasındaki bağlanma bölgelerini kullanarak circRNA'ların fonksiyonlarını araştırdık. Böylece circRNA ve miRNA sekanslarının uyumluluğu ile circRNA-miRNA etkileşim ağı elde edilmiş ve detayları tablo 11'de belirtilmiştir.

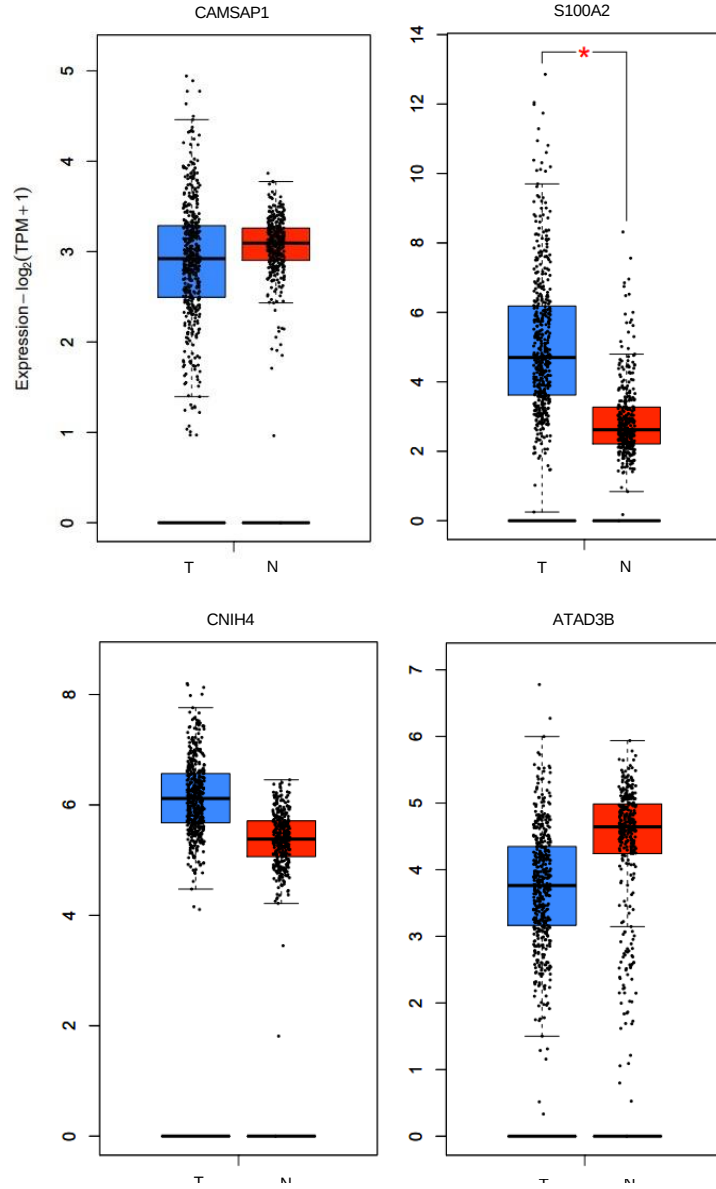


Tablo 11. CircRNA-miRNA etkileşim ağı

miRNA ID	miRanda	Targetscan	miRNA ID	miRanda	targetscan
hsa_circ_0001900			hsa-miR-320a	128	142 148
hsa-miR-3918	163	176 288 182 294	hsa-miR-320b	128	142 148
hsa-miR-431-3p	374	236 388 241 394	hsa-miR-320c	130	142 148
hsa-miR-6744-5p	155	121 168 126 175	hsa-miR-320d	131	142 148
hsa-miR-6884-3p	184	201 295 208 300	hsa-miR-3679-3p	91	106 113
hsa-miR-100-3p	65	77 83	hsa-miR-3925-5p	4	21 27
hsa-miR-1182	1	23 29	hsa-miR-4429	130	142 148
hsa-miR-1254	158	172 178	hsa-miR-4433a-3p	56	69 75
hsa-miR-1273h-3p	97	111 117	hsa-miR-4448	120	131 137
hsa-miR-148a-5p	360	377 383	hsa-miR-4660	118	134 140
hsa-miR-153-5p	245	257 264	hsa-miR-4722-5p	54	70 76
hsa-miR-193b-3p	324	338 344	hsa-miR-4738-5p	20	35 41
hsa-miR-2861	162	174 180	hsa-miR-512-5p	83	97 104
hsa-miR-3116	158	172 178	hsa-miR-520a-5p	11	24 30
hsa-miR-3158-5p	98	112 118	hsa-miR-525-5p	11	24 30
hsa-miR-3190-5p	326	337 343	hsa-miR-5589-5p	124	140 145
hsa-miR-34c-5p	87	103 108	hsa-miR-612	122	138 144
hsa-miR-3591-3p	393	406 412	hsa-miR-634	29	45 51
hsa-miR-3937	52	66 72	hsa-miR-6720-3p	14	32 38
hsa-miR-4280	288	302 308	hsa-miR-6833-5p	44	59 66
hsa-miR-4462	91	107 113	hsa-miR-6858-3p	23	37 43
hsa-miR-4497	171	183 190	hsa-miR-6860	122	138 144
hsa-miR-4529-5p	282	296 302	hsa-miR-7153-5p	5	20 26
hsa-miR-4701-5p	324	336 342	hsa_circ_0000190		
hsa-miR-4724-5p	346	362 368	hsa-miR-100-3p	198	210 216
hsa-miR-4728-3p	301	319 325	hsa-miR-103a-2-5p	183	197 203
hsa-miR-4761-3p	274	286 292	hsa-miR-1252-5p	60	73 79
hsa-miR-4776-3p	260	273 279	hsa-miR-130a-3p	44	58 64
hsa-miR-4787-5p	205	219 225	hsa-miR-130b-3p	44	58 64
hsa-miR-5704	284	298 304	hsa-miR-135a-5p	187	200 206
hsa-miR-589-3p	393	409 415	hsa-miR-135b-5p	187	200 206
hsa-miR-640	399	414 421	hsa-miR-148a-3p	43	59 65
hsa-miR-6741-5p	234	249 255	hsa-miR-148b-3p	43	59 65
hsa-miR-6757-3p	325	340 346	hsa-miR-152-3p	44	59 65
hsa-miR-6772-3p	39	52 58	hsa-miR-196a-3p	76	90 97
hsa-miR-6794-3p	196	208 214	hsa-miR-301a-3p	43	58 64
hsa-miR-6842-5p	202	218 224	hsa-miR-301b-3p	43	58 64
hsa-miR-767-3p	32	47 53	hsa-miR-4295	48	58 64
hsa-miR-7706	335	350 356	hsa-miR-4504	19	32 38
hsa_circ_0014235			hsa-miR-4716-5p	119	136 142
hsa-miR-146a-5p	6	20 26	hsa-miR-548s	1	20 26
hsa-miR-146b-5p	6	20 26	hsa-miR-6818-5p	173	187 193
hsa-miR-205-5p	98	113 120	hsa-miR-6820-3p	172	184 191
hsa-miR-3187-5p	121	138 144	hsa-miR-767-5p	106	121 127
hsa-miR-3190-3p	44	58 65	hsa-miR-8060	220	237 243

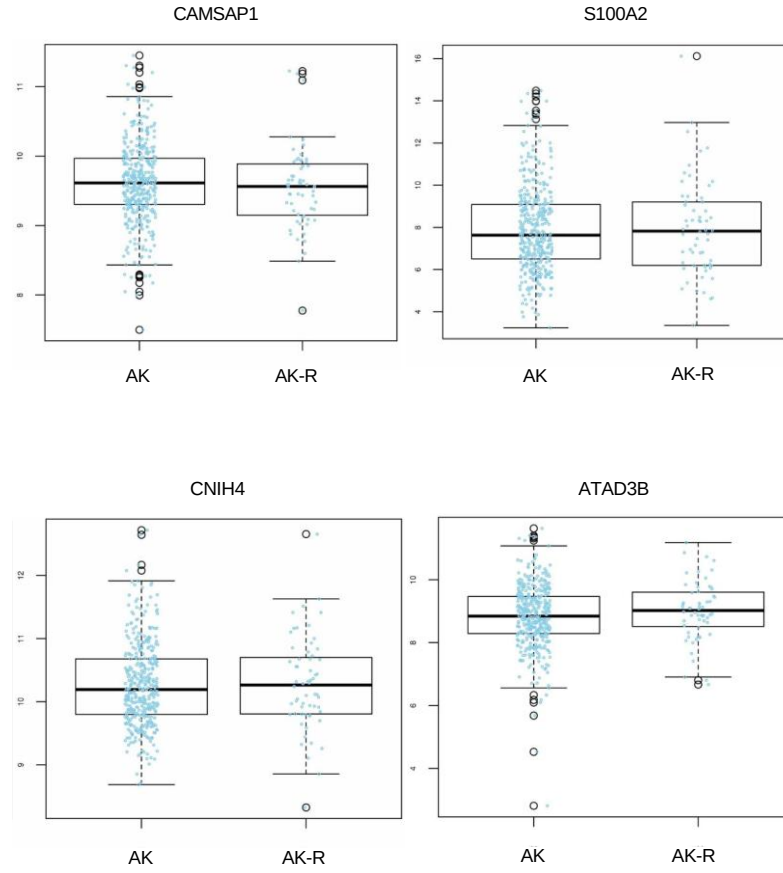
Eksprese edilen eksozomal circRNA'ların parental genleri değerlendirmek için, TCGA'den KHDAK olan hastalara ait veriler ile gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hsa_circ_0014235'in parental geni olan S100A2'nin AK hastalarının

tümör dokusunda anlamlı seviyede yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Grafik 5).



Grafik 5. KHDAK olan hastalarında eksozomal circRNA'ların parental genlerinin ekspresyon seviyeleri. T: Tümörlü doku (n=483), N; Sağlıklı doku (n=347)

Daha sonra radyoterapi alan KHDAK hastalarındaki bu parental genlerin ekspresyon seviyelerini araştırdık. Radyoterapiden sonra dört parental genin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. (Grafik 6)



Grafik 6. Radyoterapi alan KHDAK olan hastalarında exosomal circRNA'ların parental genlerinin ekspresyon seviyeleri. AK-RT: Radyoterapi alan KHDAK hastalar (n=61), AK; Radyoterapi almayan KHDAK hastalar (n=408)

Tartışma

AK, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en önde gelen nedenleri arasındadır. Erken tanı ve multimodalite tedavilerinin gelişmesine rağmen, AK hastalarının çoğunun tanı anında lokal olarak ilerlemiş olduğu veya metastaz olduğu için mortalite oranının çok yüksek olduğu ve öngörülen 5 yıllık sağkalım oranı %15'in altında olduğu gösterilmiştir (Zappa ve Mousa, 2016). Geç tanı ve mevcut tedavi rejimlerinin düşük etkileri, düşük sağkalım oranlarını iyileştirmenin ve maliyetli tedavilerden kaçınmanın önündeki başlıca engeller olarak belirlenmiştir (Lin ve ark., 2020; Lee ve ark., 2017; Schuette ve ark., 2018). Günümüzde AK'nin mortalitesini azaltmak sağlık araştırmalarında önemli bir konudur. Bu nedenle hastalığın erken tanısı ve farklı tedavi rejimlerine yanıtını belirlemek için hızlı ve doğru belirteçlerin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

RT, AK tedavisinde kullanılan etkili ve yaygın bir terapötik araçtır. RT'nin optimal kullanımı ile 5 yıllık lokal kontrolde %8.3 ve sağkalımda %4'lük bir kazanç gösterilmiştir (Shafiq ve ark., 2016). RT'nin terapötik etkileri, geleneksel olarak, tümör hücrelerine verilen en ölümcül hasar şekli olan, DNA çift sarmal kopmaları (DSB'ler) ile ilişkilidir. Pek çok kanıt, p53'ün RT kaynaklı DNA hasarına yanıt olarak aktive olduğunu göstermiştir (Santivasi ve Xia, 2014; Surova ve Zhivotovsky, 2013; Gudkov ve Komarova, 2003; Fei ve El-Deiry, 2003). P53, çok işlevli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsü durmasını (p21, 14-3-3σ), apoptozu (PUMA, NOXA, BAX), otofajiyi (fosfataz ve tensin homoloğu [PTEN], TSC1, DRAM) veya hücre yaşlanmasını (p21) indüklemek için birkaç genin ekspresyonunu arttırmakta ve esas olarak bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Bununla birlikte, iyonlaştırıcı radyasyon, metastaz, KKH fenotipi ve kanser hücrelerindeki onkojenik metabolizmayı indüklemektedir (Lee ve ark., 2017). Bu nedenle, RT kaynaklı EMT, kanser kök hücre fenotipi ve onkojenik metabolizma ile ilgili mekanizmalar ve faktörlerin daha iyi anlaşılması, RT'nin etkinliğini artırmaya yardımcı olabilir.

Eksozomlar, lipidler, büyüme faktörleri ve reseptörlerini, proteazlar, sinyal molekülleri, mRNA ve kodlamayan RNA'lar dahil olmak üzere biyoaktif kargoları bir hücreden (kökenden) alıcı hücrelere iletebilen nano ölçekli hücre dışı veziküllerdir (Momen-Heravi ve ark., 2013; Ruivo ve ark., 2017). Böylece lokal ve sistemik olarak hücreler arası iletişimde, çeşitli biyolojik ve kanser gibi patolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Kanser kaynaklı eksozomların, (a) tümör

hücrelerinin bağışıklık kontrolünden kaçmasını sağlayarak ve inflamatuvar yanıtı arttırarak, (b) fibroblastların ve mezenkimal hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını etkileyerek, (c) anjiyogenez sürecini tetikleyerek, (d) tümörün metastatik evrimini, EMT teşvik ederek ve yeni anatomik konumda tümör nişini hazırlayarak, kanser ve tümör mikroçevresinin oluşumunda önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir (Jelonek ve ark., 2016). Bunun yanında eksozomların onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olabileceği de bildirilmiştir (Pucci ve ark., 2018). Bu nedenle, tümör ve mikroçevreleri arasındaki eksozom aracılı sinyalleşmeyi anlamak ve bu iletişimi etkileyen faktörleri belirlemek, insan malignitelerinin daha iyi teşhisi ve tedavisi için önemli bir konudur.

Eksozomların spesifik içeriği ve mikroçevre üzerindeki etkileri öncelikle salgılandıkları hücrenin tipine bağlıdır. Çalışmalar alıcı hücrelerin maruz kaldığı çevresel stresin önemini vurgulamaktadır. Hedef hücrenin DNA'sına ve diğer yapılarına zarar veren IR, maruz kalan hücrelerin davranışını etkileyen stres koşullarından biridir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, ışınlanmış hücrelerden salınan eksozomların salgılanmasında ve bileşiminde radyasyonun neden olduğu değişiklikleri ve bunların hücreler arasındaki radyasyonla ilişkili iletişimde yer aldığını kanıtlamıştır (Jelonek ve ark., 2016). Radyasyonun eksozom aracılı sinyalleşme üzerindeki etkileri çok az sayıda in vitro modelde incelenmiştir. Ne yazık ki, IR'un eksozom salgılanmasının ve bileşiminin modüle edici bir faktörü olarak rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez çalışmasında, AK tedavisinde yaygın olarak kullanılan RT'nin, KHDAK hücre hattı üzerinde tedavi etkilerinin bu hücrelerden salgılanan eksozomlar ve eksozomal circRNA'larda oluşturduğu değişiklikler ve tedavinin takibi için yeni biyobelirteç aday olabilecek moleküllerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, in vitro koşullarda A549 kanser ve WI38 sağlıklı akciğer hücre hatlarından ışınlama öncesi ve sonrası eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksozomlar Zetasizer Nano ZS90 cihazı ile karakterize edilmiştir. Deney grubundaki eksozom partikül boyutu bilinen eksozom boyutlarıyla tutarlı olarak tespit edilmiştir. A549 hücrelerden elde edilen eksozomların ortalama boyutu 141.8nm ve A549-RT hücrelerden elde edilen eksozomların ortalama boyutu 78.5 nm arasında bulunmuştur.

İşinlanmaya maruz kalan A549 hücrelerinden salgılanan eksozom sayısının ve yoğunluğunun işinlanmayan A549 kontrol grubuna kıyasla daha fazla tespit edilmiştir.

Çalışmalar, IR'a bağlı artan eksozom salınımının hem doza hem de zamana bağlı olarak arttığını desteklemektedir. Çeşitli mekanizmalar, bu IR'un eksozom salınımında rol oynamaktadır. Bu mekanizmalardan biri, DNA hasarıyla aktive olan p53 transkripsiyon faktörü tarafından uyarılan TSAP6'nın (transmembran protein tümör baskılayıcı-aktive edilmiş yol 6) ekspresyonunun artması ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizma ilk olarak IR'a maruz kalan insan epitelyal akciğer H460 hücre hattında gösterilmiştir (Yu ve ark., 2006). P53-yetkili hücrelerin ışınlanmasını takiben eksozom salgılama artışıdaki hız, anöploid keratinosit HaCaT (Kumar Jella ve ark., 2014), insan meme adenokarsinomu MCF7 (Al-Mayah ve ark., 2015) ve insan prostat kanseri hücre hatlarında (Lehmann ve ark., 2008) doğrulanmıştır. Ayrıca bu etkinin yaşlanma ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Bu veriler, kanser hücreleri için tipik olan p53 aşırı ekspresyonu, anormal derecede yüksek radyasyon kaynaklı eksozom salınımı ile sonuçlandığından, eksozom modelleri olarak kullanılan hücrelerde p53 durumunun önemini vurgulamaktadır. Bu ilişki insan glioblastoma hücre hatlarında (Arscott ve ark., 2013) gösterilmiştir. Burada vahşi tip p53'e sahip U87 hücre hattına kıyasla p53 mutasyonlu/aşırı eksprese edilmiş hücre hatlarında (LN18 ve U251) ışınlamanın ardından eksozom salınımında daha yüksek nispi bir artış gözlemlenmiştir (Jelonek ve ark., 2016).

Eksozomların alıcı hücreler veya mikroçevre üzerindeki etkileri taşıdıkları spesifik içeriğine de bağlıdır. Eksozomların biyoaktif kargolarının içeriğinden biri ve kanser araştırmalarında son dönemlerin önemli bir konusu olan circRNA'lardır. Bu moleküller poliA kuyruğu olmayan ve kovalent bağlı tek sarmallı halkasal yapılarıyla ncRNA sınıfının bir üyesidir (Fanale ve ark., 2018). CircRNA'lar, çekirdekdeki transkripsiyonun düzenlenmesi (Li ve ark., 2017; Li ve ark., 2015), mikroRNA'lar için sünger fonksiyonu göstermesi (Wang ve ark., 2018; Granados-Riveron ve Aquino-Jarquín, 2016; Qian ve ark., 2018) ve proteinler ile etkileşimleri gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda rol oynamaktadır (Du ve ark., 2017). Günümüzde bazı circRNA'ların tümörlerin oluşması, proliferasyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Hansen ve ark., 2013; Guarnerio ve ark., 2016; Yu ve ark., 2018). CircRNA'lar sitoplazmaya transfer edildikten sonra, işlevlerini yerine getirmek için sadece miRNA'lara veya proteinlere bağlanmakla kalmaz, aynı zamanda nükleik asit, lipid ve proteinler ile birlikte multiveziküller endozomların kargo içeriği olabilir (Bao ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, circRNA'ların eksozomlarda daha

zenginleştirilmiş ve stabil olduğunu göstermiştir. Eksozomal circRNA'lar, stabiliteleri ve yüksek özgüllükleri nedeniyle kanserin tanısı, prognoz takibi, uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi veya tümörün tedaviye yanıtını izlemek için potansiyel biyobelirteçler olarak önerilmiştir (Fanale ve ark., 2018).

Bir eksozomun içeriği hücrenin maruz kaldığı stres koşullarından da etkilenebilir. Hücresel strese neden olan en önemli çevresel faktörlerden biri iyonlaştırıcı radyasyondur (Jelonek ve ark., 2016). Eksozom bileşiminde radyasyonun neden olduğu değişikliklerle ilgili literatür verileri çok sınırlıdır. Prostat kanserinin tanısız belirteci olarak tanımlanan yüksek B7-H3 (CD276) seviyelerinin, in vitro ışınlanmış prostat kanseri hücrelerinden salınan eksozomlardan gelmekte olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda radyasyonun eksozom bileşiminde ve salıverilmesinde değişikliklere neden olduğu ve bu hücrelerde yaşlanmanın uyarılmasının eşlik ettiğine dikkat çekmektedir (Lehmann ve ark., 2008). Bir başka çalışmada, prostat kanseri hasta serumlarında RT'ye bağlı olarak hücreleri genellikle hücresel stresten koruyan Hsp72'nin seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Hurwitz ve ark., 2010). RT maruz kalan glioblastoma hücrelerinden salınan eksozomlarda, kanser hücrelerinin göçünden ve istilasından sorumlu olan bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) mRNA ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 2 (IGFBP2)'nin anormal derecede yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir. RT'den sonra eksozomlarda pek çok mRNA seviyelerinde belirgin değişiklik olurken sadece birkaç miRNA'nın seviyelerinde değişiklik saptanmıştır (Arscott ve ark., 2013). Baş ve boyun kanseri hücre modeli üzerine yakın zamanda yapılan bir çalışma, ışınlanmış hücrelerden alınan eksozomların, transkripsiyon, translasyon, hücre bölünmesi ve hücre sinyallemede rol oynayan protein seviyelerinin önemli ölçüde arttığını ve ayrıca düşük apolipoprotein ve immünoglobulin seviyelerine sahip olduğunu ortaya koymuştur (Jelonek ve ark., 2015).

Tez çalışmasında, eksozomal circRNA genlerinin ekspresyon seviyeleri 4 deney grubunda (A549, WI38, A549-RT ve WI38-RT) RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Bu 40 circRNA adayının ekspresyon seviyelerinin analizi sonucunda 4 genin istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklı ekspresyona sahip olduğu bulunmuştur. Bunlardan bazı circRNA'ların ekspresyon seviyeleri veya bu seviyelerdeki değişiklikler nedeniyle tanısız ve tedaviye yanıtta takipsel biyobelirteç adayı olabileceği düşünülmüştür.

Bu 4 eksozomal circRNA genlerinden hsa_circ_0001900'ün bütün deney gruplarında (A549, WI38, A549-RT ve WI38-RT) eksprese edildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda hsa_circ_0001900 geni circCAMSAP1 olarak adlandırılmaktadır. Zhou ve ark., tarafından yapılan çalışmada, hsa_circ_0001900 geninin kolorektal kanser (CRC) dokularında önemli ölçüde eksprese edildiği tespit edilmiştir. Hsa_circ_0001900, miR-328-5p'nin süngerı olarak görev yapıp, E2F1 transkripsiyon faktörünün baskılanmasını engelleyip, circCAMSAP1/miR-328-5p/E2F1 ekseninin ile tümör büyümesini desteklediği rapor edilmiştir. Ayrıca artan circCAMSAP1 ekspresyonunun, ileri tümör/düğüm/metastaz (TNM) evresi ve kısa genel sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Zhou ve ark., 2020). Wang ve ark., tarafından yapılan çalışmada ise hsa_circ_0001900'ün KHDAC akciğer dokularında ve hücre hattında aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada yapılan lusiferaz testiyle, hsa_circ_0001900'ün, doğrudan miR-1182'ye bağlanarak baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat containing 5 (BIRC5) ekspresyonunu düzenleyebileceği ve circCAMSAP1/miR-1182/BIRC5 eksenı ile KHDAC proliferasyonunu desteklediği ve hücre apoptozunu inhibe ettiğı ortaya konulmuştur. Ayrıca aşağı regüle edilmiş circCAMSAP1'in hücre proliferasyonunu baskıladığı, in vitro olarak KHDAC hücrelerinin apoptozunu artırdığı ve in vivo olarak ksenograft tümör büyümesini baskıladığı bulunmuştur (Wang ve ark., 2022). Bir başka çalışmada ise circCAMSAP1'in nazofarinks karsinom (NPC) dokularında yüksek oranda eksprese edildiğı bulunmuştur. Ayrıca, circCAMSAP1, SERPINH1'in 3'UTR bölgesine bağlanarak mRNA stabilitesi sağlayarak ekspresyonu desteklemektedir. Yüksek oranda eksprese edilen SERPINH1, c-Myc'nin ubiquitination-degradasyon oranını azaltarak tümörögenezin artmasına neden olmaktadır. Bu arada, SRSF10 ile bağlantılı olan c-Myc, CAMSAP1 pre-mRNA transkripsiyonunu ve geri eklemeyi de desteklemektedir. CircCAMSAP1 üretiminin pozitif bir geri bildirimini oluşturarak NPC'nin çoğalmasına ve metastazına neden olmaktadır (Wang ve ark., 2022).

Çalışmamızda hsa_circ_0001900 geninin A549 kanser deney grubunda, WI38 sağlıklı deney grubuna göre daha yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Işınlanma uygulandıktan sonra da A549-RT deney grubunda (A54-R ve WI38-R) gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı seviyede arttığı, buna rağmen WI38-RT hücre hattında anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu da ışınlanmanın hem kanser hem de sağlıklı hücre hattı üzerinde farklı etki oluşturduğu ve kanser hücrelerinde gen

ekspresyonunun artmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hsa_circ_0001900 geninin RT takibinde bir biyobelirteç olma potansiyelini göstermektedir.

Deney gruplarında eksprese olan bir diğer circRNA geni hsa_circ_0014235 olarak tespit edilmiştir. Xu ve ark., tarafından yapılan çalışmada hsa_circ_0014235'in ekspresyonu, KHDAK hastalarının serum eksozomlarında, tümör dokularında ve hücrelerinde belirgin şekilde yüksek olarak bulunmuştur. KHDAK hastalarının serumlarından elde edilen eksozomların, in vitro olarak sisplatine karşı KHDAK hücre direncini, hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu ve ayrıca in vivo olarak tümör büyümesini ve sisplatine direncini desteklediği gözlemlenmiştir. Hsa_circ_0014235, miR-520a-5p'i hedef alıp ona bağlanarak, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)'ün ekspresyonunu arttırmaktadır. Hsa_circ_0014235/miR-520a-5p/CDK4 eksenini, sisplatin direncini arttırmakta ve hücrenin malignite mekanizmasını desteklemektedir (Xu ve ark., 2020).

Bir çalışma hsa_circ_0014235 ekspresyonunun, akciğer skuamöz hücreli karsinomu (ASHK) hastalarının eksozom örneklerinde belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu genin hücre döngüsü, Jak-STAT sinyal yolu ve Wnt sinyal yolunun düzenlenmesinde rolü olabileceği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2020).

Çalışmamızda eksozomal hsa_circ_0014235 geninin A549 kanser hücrelerinde, WI38 sağlıklı hücrelerine göre daha yüksek seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir. Işınlanma sonrası hem sağlıklı hem de kanserli hücre hattından elde edilen eksozomlarda hsa_circ_0014235'nin eksprese olmadığı saptanmıştır. Bu da RT'nin kanser ve sağlıklı hücrelerde hsa_circ_0014235 geni üzerinde negatif bir etki göstermesi şeklinde yorumlanmıştır. Bu durum hsa_circ_0014235 geninin tanısal ve RT takibinde bir biyobelirteç olma potansiyelini göstermektedir.

Tez çalışmasında, hsa_circ_0000190 geninin ise sadece A549 kanser deney grubunda eksprese olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı hücrelerde ve tedavi gruplarının hiçbirinde eksprese olmadığı için sadece AK tanısı için belirteç adayı olabileceği düşünülmüştür. Luo ve ark., tarafından yapılan çalışmada A549 hücre hattı ve AK hastalarının plazma örneklerinde hsa_circ_0000190'ın ifade seviyesi RT-qPCR ve RT-ddPCR analizi ile önemli ölçüde yüksek bulunmuş ve potansiyel biyobelirteç adayı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca daha yüksek hsa_circ_0000190 ekspresyon seviyeleri, büyük tümör boyutu, kötü histolojik adenokarsinom tipi, uzak metastaz, ekstra torasik

metastaz ve kötü sağkalım/prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte hsa_circ_0000190'ın yüksek plazma seviyesi ($p < 0.0001$) ile tümör dokusundaki artmış programlanmış ölüm-ligand1 (PD-L1) seviyesi ($p = 0.0283$) arasında korelasyon saptanmıştır. Özellikle, immünoterapi ile tedavi edilen vakaların uzun süreli takibinde, plazmada yüksek hsa_circ_0000190 seviyesinin sistemik tedaviye ve immünoterapiye zayıf yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada hsa_circ_0000190'ın, hastalığın ilerlemesini ve tedavi etkinliğini izlemek için kan bazlı biyobelirteç olabileceği önerilmiştir (Luo ve ark., 2020). Aynı grubun başka bir çalışmasında ise hsa_circ_0000190'ın soluble PD-L1 ekspresyonunu arttırdığı, sonuç olarak anti-PD-L1 antikorunun ve T-hücresi aktivasyonunu inhibe ederek immünoterapi direncine yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar, hsa_circ_0000190'ın, sPDL1 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek KHDAK'nin oluşumunu ve bağışıklıktan kaçmasını kolaylaştırdığı ve KHDAK'nin moleküler immünoterapogenезinin aydınlatılmasında farklı bir yön geliştirdiğini ortaya koymuştur. Hsa_circ_0000190 yukarı regülasyonun KHDAK'nin progresyonunu gösteren etkili bir belirteç olabileceği, aşağı regülasyonun immünoterapi ile kombinasyon halinde KHDAK tedavisi için potansiyel bir terapötik değere sahip olabileceği önerilmiştir (Luo ve ark., 2021).

Hsa_circ_0000190 geninin mide kanseri dokularında ve hasta plazma örneklerinde aşağı regüle olduğu bulunmuştur. Ayrıca hsa_circ_0000190'ın ekspresyon seviyesinin, tümör çapı, lenfatik metastaz, distal metastaz, TNM evresi ve CA19-9 seviyeleri ile önemli ölçüde korele olduğu gözlemlenmiştir. CA19-9 en sık kullanılan serum mide kanseri belirteçidir fakat erken mide kanseri taramasında düşük bir pozitif orana sahiptir (Yang ve ark., 2016). Bu nedenle hsa_circ_0000190'ın, mide kanseri taramasında daha yüksek bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle mide kanseri tanısı için yeni bir non-invaziv biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2017). Shi ve ark.'nın yaptığı çalışmada CircCNIH4 olarak adlandırılmış olan hsa_circ_0000190 geninin mide kanseri dokularında ve hücrelerinde aşağı regüle edildiği tespit edilmiştir. İn vitro olarak circCNIH4'ün aşırı ekspresyonunun, Wnt/ β -katenin yolunu inaktive ederek mide kanser hücresinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe ettiği ve apoptozu stimüle ettiği saptanmıştır. Ayrıca CircCNIH4'ün, mide kanseri hücrelerinde DKK2 ve FRZB ekspresyonunu indüklediği, DKK2 veya FRZB'nin susturulmasının mide kanseri hücreleri üzerindeki

circCNIH4 aşırı ekspresyonuna aracılık ettiği ve etkileri tersine çevirdiği gösterilmiştir (Shi ve ark., 2021). Başka bir çalışmada osteosarkom hastalarının plazma ekstraselüler nanoveziküllerinde ve dokularında hsa_circ_0000190 geninin ekspresyon seviyesinde bariz bir azalma saptanmıştır. Ayrıca, circ-0000190'ın çoğunluğu EV tarafından kapsanmakta ve osteosarkom hastaları ile kontrol grubu arasında bir ayırım yapılmasında ve tanı için uygun bir belirteç olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu genin miR-767-5p'ye yarışmalı bağlanarak TET1'in ekspresyonunu engellediği ve böylece tümör progresyonunu önlediği belirtilmiştir. Ek olarak osteosarkom hücrelerinde EV circ-0000190 genlerin biyolojik malign davranışlarını engellediği ve osteosarkom hücrelerinin göç etme, çoğalma ve invazyon kapasitelerini zayıflattığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2020). Hung ve ark.'nın yaptığı çalışmada, oral skuamöz hücreli karsinom hastalarında hsa_circ_0000190'ın plazma seviyesinin önemli ölçüde azaldığı ve kanserin ilerlemesiyle korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Hung ve ark., 2022).

Tez çalışmasında hsa_circ_0000003 geni A549 kanser ve WI38 sağlıklı deney gruplarında eksprese olmaz iken ışınlama uygulamasından sonra eksprese olduğu tespit edilmiştir. Qian ve ark. tarafından yapılan çalışmada hsa_circ_0000003 ekspresyonunun dil skuamöz hücreli karsinom (DSHK)'un dokularında ve hücre hatlarında yüksek olduğu ve bunun da ileri TNM evresi, artan tümör boyutu ve düşük sağkalımı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Hsa_circ_0000003'ün rakip bir endojen RNA (ceRNA) gibi davranarak miR 330 3p'yi süngerleyip glutaminaz (GLS) ekspresyonunun artmasına sebep olup circ_0000003/miR 330 3p/GLS yolunu düzenleyerek DSHK hücre çoğalmasını, göçünü, invazyonunu ve glutamin katabolizmasını kolaylaştırdığı ortaya konulmuştur. Buna göre, DSHK hücrelerinde circ_0000003'ün azalmasıyla hücre invazyonunun, göçünün, glutamin tüketiminin, a ketoglutarat üretiminin ve ATP üretiminin önemli ölçüde azaldığı ve bu etkilerin miR 330 3p inhibisyonu ile tersine çevrildiği gözlemlenmiştir (Qian ve ark., 2021).

Li ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise hsa_circ_0000003 geninin ekspresyonunun, KHDAK dokularında ve hücre hattında önemli ölçüde yüksek olduğu ve yüksek ekspresyon seviyesinin, özellikle lenf nodu metastazı ve TNM evrelemesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca circ_0000003'ün rakip endojen RNA olarak işlev görerek doğrudan miR-338-3p'yi hedeflediği ve IRS2 ekspresyonunun pozitif olarak düzenlemesini yaparak miR-338-3p/insulin receptor

substrate 2 yolağın ilerlemesini sağlayarak KHDAK hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını teşvik ettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2019).

AK'nin erken tespiti ve tedavi yanıtının belirlenmesi için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulduğundan, eksozomal circRNA'lar, bollukları, stabiliteleri ve doku spesifiklikleri nedeniyle umut verici biyobelirteç adayları olabilir. Bu çalışma, eksozomal hsa_circ_0014235, hsa_circ_0001900 ve hsa_circ_0000190'ın KHDAK'de belirgin şekilde yukarı doğru düzenlendiğini gösterdi ve bu da circRNA'ların eksozom bazlı kanser biyobelirteçleri için yeni bir sınıf olduğunu düşündürdü. Ayrıca, ışınlamadan sonra eksozomal hsa_circ_0001900 ekspresyonunun yukarı doğru regülasyonu ve eksozomal hsa_circ_0014235'in eksprese olmaması, AK'nin RT'si için terapötik belirteçler olarak hizmet edebilir. Gelecek dönemde bu tümör kaynaklı eksozomal circRNA'ların özellikle de hsa_circ_0014235 ve hsa_circ_0001900'in ışınlanmış KDHAK hücre hatları üzerindeki etkisinin araştırılması ve RT alan AK hastalarının dahil olduğu translasyonel ve ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç ve Öneriler

Akciğer kanseri hastalarına genellikle ileri evrelerde veya metastaz olduğu aşamada teşhis konulmakta ve bu nedenle uygulanan tedavi rejimlerine rağmen mortalite oranı yüksektir. Bu nedenle hastaların erken tanısını ve tedavi rejimlerinin etkinliğini belirlemek için yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip biyobelirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda sağlık ve kanser araştırmalarında önemli bir konu haline gelen hücre arası iletişim araçları olan eksozomlar ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli role sahip olan circRNA'lar, birçok biyolojik ve kanser gibi patolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır.

Eksozomal circRNA'ların stabilite ve yüksek özgüllükleri ve kan, plazma, tükürük gibi vücut sıvılarında bulunmaları nedeniyle kanserin erken tanısı, prognoz takibi ve uygun tedavi stratejisinin belirlenmesi için potansiyel ve invazif olmayan biyobelirteçler olarak uygun aday özellikleri taşımaktadırlar. Bu çalışma ile KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan radyoterapinin, eksozomların salınımı ve eksozomal circRNA'lar üzerindeki etkisi tespit edilmiştir. Nitekim eksozomal hsa_circ_0000190, ve hsa_circ_0014235 KHDAK hastalarının erken tanısında, eksozomal hsa_circ_0001900 ve hsa_circ_0014235 hem erken tanı hem de tedavi takibi için potansiyel biyobelirteç adayları olabileceği düşünülmüştür.

Bu in vitro çalışmanın, ileride in vivo çalışmalar ve vücut sıvıları (kan, plazma, tükürük, idrar vb.) veya doku örnekleri kullanılarak klinikte insan çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Alenquer, M., & Amorim, M. J. (2015). Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. *Viruses*, 7(9), 5066-5083.
- Al-Mayah, A., Bright, S., Chapman, K., Irons, S., Luo, P., Carter, D., Goodwin, E., & Kadhim, M. (2015). The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutation research*, 772, 38–45.
- Arscott, W. T., Tandle, A. T., Zhao, S., Shabason, J. E., Gordon, I. K., Schlaff, C. D., Zhang, G., Tofilon, P. J., & Camphausen, K. A. (2013). Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Translational oncology*, 6(6), 638–648.
- Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., Evtal, N., Memczak, S., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2014). circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Molecular cell*, 56(1), 55–66
- Bao, C., Lyu, D., & Huang, S. (2016). Circular RNA expands its territory. *Molecular & cellular oncology*, 3(2), e1084443.
- Barrett Steven, P., & Julia, S. (2016). Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*, 143(11), 1838-1847.
- Bernadette, S. T., József, D., Herbert, R., & Ira-Ida, S. (2017). The role of exosomes in cancer metastasis. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 44, pp. 170-181).
- Boriachek, K., Islam, M. N., Möller, A., Salomon, C., Nguyen, N. T., Hossain, M., Yamauchi, Y., & Shiddiky, M. (2018). Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 14(6), 10.1002/sml.201702153.
- Boukouris, S., & Mathivanan, S. (2015). Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 9(3-4), 358-367.
- Chen, C. Y., & Sarnow, P. (1995). Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*, 268(5209), 415-417.
- Chen, L., Huang, C., Wang, X., & Shan, G. (2015). Circular RNAs in eukaryotic cells. *Current genomics*, 16(5), 312-318.
- Chen, S., Li, T., Zhao, Q., Xiao, B., & Guo, J. (2017). Using circular RNA hsa_circ_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer. *Clinica chimica acta*, 466, 167-171.

- Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K. K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*, 14(8), 535-546.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Th  ry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, 126(Pt 24), 5553–5565.
- Couraud, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., & Souquet, P. J. (2012). Lung cancer in never smokers—a review. *European journal of cancer*, 48(9), 1299-1311.
- Dai, X., Chen, C., Yang, Q., Xue, J., Chen, X., Sun, B., Luo, F., Liu, X., Xiao, T., Xu, H., Sun, Q., Zhang, A., & Liu, Q. (2018). Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation. *Cell death & disease*, 9(5), 454
- de Margerie-Mellon, C., De Bazelaire, C., & De Kerviler, E. (2016). Image-guided biopsy in primary lung cancer: Why, when and how. *Diagnostic and interventional imaging*, 97(10), 965-972.
- Delaney, G. P., & Barton, M. B. (2015). Evidence-based estimates of the demand for radiotherapy. *Clinical Oncology*, 27(2), 70-76.
- Detterbeck, F. C., & Bach, P. B. (2013). Lung Cancer Screening: Response. *Chest*, 144(5), 1737-1738.
- Dong, R., Ma, X. K., Li, G. W., & Yang, L. (2018). CIRCpedia v2: an updated database for comprehensive circular RNA annotation and expression comparison. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 16(4), 226-233.
- Dong, W., Bi, J., Liu, H., Yan, D., He, Q., Zhou, Q., Wang, Q., Xie, R., Su, Y., Yang, M., Lin, T., & Huang, J. (2019). Circular RNA ACVR2A suppresses bladder cancer cells proliferation and metastasis through miR-626/EYA4 axis. *Molecular cancer*, 18(1), 95.
- Du, W. W., Zhang, C., Yang, W., Yong, T., Awan, F. M., & Yang, B. B. (2017). Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics*, 7(17), 4183.
- Du, W. W., Zhang, C., Yang, W., Yong, T., Awan, F. M., & Yang, B. B. (2017). Identifying and characterizing circRNA-protein interaction. *Theranostics*, 7(17), 4183.

- Ebahimzadeh, K., Shoorei, H., Mousavinejad, S. A., Anamag, F. T., Dinger, M. E., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2021). Emerging role of non-coding RNAs in response of cancer cells to radiotherapy. *Pathology-Research and Practice*, 218, 153327.
- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 347-357.
- Enuka, Y., Lauriola, M., Feldman, M. E., Sas-Chen, A., Ulitsky, I., & Yarden, Y. (2016). Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic acids research*, 44(3), 1370-1383.
- Fanale, D., Taverna, S., Russo, A., & Bazan, V. (2018). Circular RNA in exosomes. *Circular RNAs*, 109-117.
- Fei, P., & El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774-5783.
- Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., & Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic?. *Proteomics*, 15(2-3), 260-271.
- Gao, L., Wang, L., Dai, T., Jin, K., Zhang, Z., Wang, S., Xie, F., Fang, P., Yang, B., Huang, H., van Dam, H., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity. *Nature immunology*, 19(3), 233–245.
- Gao, Y., Wang, J., Zheng, Y., Zhang, J., Chen, S., & Zhao, F. (2016). Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat Commun* 7: 12060.
- Gharsalli, H., Mlika, M., Sahnoun, I., Maalej, S., El Gharbi, L. D., & El Mezni, F. (2018, September). The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. In *Seminars in diagnostic pathology* (Vol. 35, No. 5, pp. 280-287). WB Saunders.
- Granados-Riveron, J. T., & Aquino-Jarquin, G. (2016). The complexity of the translation ability of circRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(10), 1245-1251.
- Granados-Riveron, J. T., & Aquino-Jarquin, G. (2016). The complexity of the translation ability of circRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(10), 1245-1251.
- Guarnerio, J., Bezzi, M., Jeong, J. C., Paffenholz, S. V., Berry, K., Naldini, M. M., Lo-Coco, F., Tay, Y., Beck, A. H., & Pandolfi, P. P. (2016). Oncogenic Role of Fusion-

circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell*, 165(2), 289–302.

- Guarnerio, J., Zhang, Y., Cheloni, G., Panella, R., Mae Katon, J., Simpson, M., Matsumoto, A., Papa, A., Loretelli, C., Petri, A., Kauppinen, S., Garbutt, C., Nielsen, G. P., Deshpande, V., Castillo-Martin, M., Cordon-Cardo, C., Dimitrios, S., Clohessy, J. G., Batish, M., & Pandolfi, P. P. (2019). Intragenic antagonistic roles of protein and circRNA in tumorigenesis. *Cell research*, 29(8), 628–640.
- Gudkov, A. V., & Komarova, E. A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(2), 117-129.
- Guo, F., Chang, C. K., Fan, H. H., Nie, X. X., Ren, Y. N., Liu, Y. Y., & Zhao, L. H. (2008). Anti-tumour effects of exosomes in combination with cyclophosphamide and polyinosinic-polycytidylic acid. *Journal of International Medical Research*, 36(6), 1342-1353.
- Han, D., Li, J., Wang, H., Su, X., Hou, J., Gu, Y., Qian, C., Lin, Y., Liu, X., Huang, M., Li, N., Zhou, W., Yu, Y., & Cao, X. (2017). Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 66(4), 1151–1164.
- Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14240-14269.
- Hansen, T. B., Kjems, J., & Damgaard, C. K. (2013). Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer research*, 73(18), 5609-5612.
- Hao, S., Bai, O., Yuan, J., Qureshi, M., & Xiang, J. (2006). Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. *Cell Mol Immunol*, 3(3), 205-211.
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
- Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran Jr, W. J., Wu, Y. L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, 389(10066), 299-311.
- Hoffman, R. M., & Sanchez, R. (2017). Lung cancer screening. *Medical Clinics*, 101(4), 769-785.

- Holdt, L. M., Kohlmaier, A., & Teupser, D. (2018). Molecular roles and function of circular RNAs in eukaryotic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(6), 1071-1098.
- Huang, S., Yang, B., Chen, B. J., Bliim, N., Ueberham, U., Arendt, T., & Janitz, M. (2017). The emerging role of circular RNAs in transcriptome regulation. *Genomics*, 109(5-6), 401-407.
- Huang, X., Li, Z., Zhang, Q., Wang, W., Li, B., Wang, L., Xu, Z., Zeng, A., Zhang, X., Zhang, X., He, Z., Li, Q., Sun, G., Wang, S., Li, Q., Wang, L., Zhang, L., Xu, H., & Xu, Z. (2019). Circular RNA AKT3 upregulates PIK3R1 to enhance cisplatin resistance in gastric cancer via miR-198 suppression. *Molecular cancer*, 18(1), 71.
- Hung, K. F., Chen, B. H., Wang, T. Y., Yang, Y. P., Chien, Y., Lo, J. F., Yang, L., Peng, B. Y., Kao, S. Y., & Wu, C. H. (2022). Identification of plasma hsa_circ_0000190 and 0001649 as biomarkers for predicting the recurrence and treatment response of patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 85(4), 431–437.
- Hurwitz, M. D., Kaur, P., Nagaraja, G. M., Bausero, M. A., Manola, J., & Asea, A. (2010). Radiation therapy induces circulating serum Hsp72 in patients with prostate cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 95(3), 350-358.
- Jacobsen, M. M., Silverstein, S. C., Quinn, M., Waterston, L. B., Thomas, C. A., Benneyan, J. C., & Han, P. K. (2017). Timeliness of access to lung cancer diagnosis and treatment: a scoping literature review. *Lung cancer*, 112, 156-164.
- Jeck, W. R., & Sharpless, N. E. (2014). Detecting and characterizing circular RNAs. *Nature biotechnology*, 32(5), 453-461.
- Jelonek, K., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2016). The influence of ionizing radiation on exosome composition, secretion and intercellular communication. *Protein and peptide letters*, 23(7), 656-663.
- Jelonek, K., Wojakowska, A., Marczak, L., Muer, A., Tinhofer-Keilholz, I., Lysek-Gladysinska, M., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2015). Ionizing radiation affects protein composition of exosomes secreted in vitro from head and neck squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica*, 62(2), 265–272.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420.

- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1208-1215.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977.
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., & Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of molecular biology*, 428(4), 688–692.
- Kemp, R. A., Reinders, D. M., & Turic, B. (2007). Detection of lung cancer by automated sputum cytometry. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(11), 993-1000.
- Kholia, S., Ranghino, A., Garnieri, P., Lopatina, T., Deregibus, M. C., Rispoli, P., Brizzi, M. F., & Camussi, G. (2016). Extracellular vesicles as new players in angiogenesis. *Vascular pharmacology*, 86, 64–70.
- Kim, K. M., Abdelmohsen, K., Mustapic, M., Kapogiannis, D., & Gorospe, M. (2017). RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(4), e1413.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17442-17452.
- Kulcheski, F. R., Christoff, A. P., & Margis, R. (2016). Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *Journal of biotechnology*, 238, 42-51.
- Kumar Jella, K., Rani, S., O'driscoll, L., McClean, B., Byrne, H. J., & Lyng, F. M. (2014). Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiation research*, 181(2), 138-145.
- Lanier, L. L. (2015). NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer immunology research*, 3(6), 575-582.
- Latimer, K. M. (2018). Lung Cancer: Clinical Presentation and Diagnosis. *FP essentials*, 464, 23-26.
- Lee, C. K., Kim, S., Lee, J. S., Lee, J. E., Kim, S. M., Yang, I. S., Kim, H. R., Lee, J. H., Kim, S., & Cho, B. C. (2017). Next-generation sequencing reveals novel resistance mechanisms and molecular heterogeneity in EGFR-mutant non-small cell lung cancer with acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 113, 106–114.

- Lee, S. Y., Jeong, E. K., Ju, M. K., Jeon, H. M., Kim, M. Y., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. (2017). Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Molecular cancer*, 16(1), 10.
- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., & Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer research*, 68(19), 7864-7871.
- Li, I., & Nabet, B. Y. (2019). Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Molecular cancer*, 18(1), 1-10.
- Li, S., Niu, X., Li, H., Liang, Y., Sun, Z., & Yan, Y. (2019). Circ_0000003 promotes the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells via miR-338-3p/insulin receptor substrate 2. *Cell Cycle*, 18(24), 3525-3539.
- Li, S., Pei, Y., Wang, W., Liu, F., Zheng, K., & Zhang, X. (2020). Extracellular nanovesicles-transmitted circular RNA has_circ_0000190 suppresses osteosarcoma progression. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(3), 2202-2214.
- Li, W., Li, C., Zhou, T., Liu, X., Liu, X., Li, X., & Chen, D. (2017). Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Molecular cancer*, 16(1), 1-12.
- Li, X., Yang, L., & Chen, L. L. (2018). The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Molecular cell*, 71(3), 428-442.
- Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P., Chang, Z., Wu, Q., Zhao, Y., Jia, Y., Xu, P., Liu, H., & Shan, G. (2017). Corrigendum: Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology*, 24(2), 194.
- Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., Zhu, P., Chang, Z., Wu, Q., Zhao, Y., Jia, Y., Xu, P., Liu, H., & Shan, G. (2015). Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology*, 22(3), 256–264.
- Liang, W. C., Wong, C. W., Liang, P. P., Shi, M., Cao, Y., Rao, S. T., Tsui, S. K., Waye, M. M., Zhang, Q., Fu, W. M., & Zhang, J. F. (2019). Translation of the circular RNA circ β -catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway. *Genome biology*, 20(1), 84.

- Lin, S., Xiong, W., Liu, H., Pei, L., Yi, H., & Guan, Y. (2020). Profiling and Integrated Analysis of Differentially Expressed Circular RNAs in Plasma Exosomes as Novel Biomarkers for Advanced-Stage Lung Adenocarcinoma. *OncoTargets and therapy*, 13, 12965.
- Liu, S., Zhan, Y., Luo, J., Feng, J., Lu, J., Zheng, H., Wen, Q., & Fan, S. (2019). Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 111, 338–346.
- Ludwig, N., Hong, C. S., Ludwig, S., Azambuja, J. H., Sharma, P., Theodoraki, M. N., & Whiteside, T. L. (2019). Isolation and analysis of tumor-derived exosomes. *Current protocols in immunology*, 127(1), e91.
- Luo, Y. H., Yang, Y. P., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Adekunle Ishola, A., Chien, Y., Chen, Y. M., Tsai, P. H., Lin, T. W., Wang, M. L., & Chiou, S. H. (2021). Circular RNA hsa_circ_0000190 Facilitates the Tumorigenesis and Immune Evasion by Upregulating the Expression of Soluble PD-L1 in Non-Small-Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 64.
- Luo, Y. H., Yang, Y. P., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Ishola, A. A., Chien, Y., Chen, Y. M., Huang, T. W., Lee, K. Y., Huang, W. C., Tsai, P. H., Lin, T. W., Chiou, S. H., Liu, C. Y., Chang, C. C., Chen, M. T., & Wang, M. L. (2020). Plasma Level of Circular RNA hsa_circ_0000190 Correlates with Tumor Progression and Poor Treatment Response in Advanced Lung Cancers. *Cancers*, 12(7), 1740.
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., & Costa-Silva, B. (2018). Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 18.
- Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25(3), 439-445.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F., & Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495(7441), 333–338.
- Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(5), 328-335.

- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological chemistry*, 394(10), 1253–1262.
- Morton, D. J., Kuiper, E. G., Jones, S. K., Leung, S. W., Corbett, A. H., & Fasken, M. B. (2018). The RNA exosome and RNA exosome-linked disease. *Rna*, 24(2), 127-142.
- Morvan, J., Rinaldi, B., & Friant, S. (2012). Pkh1/2-dependent phosphorylation of Vps27 regulates ESCRT-I recruitment to endosomes. *Molecular biology of the cell*, 23(20), 4054-4064.
- Mu, H., Sun, J., Li, L., Yin, J., Hu, N., Zhao, W., Ding, D., & Yi, L. (2018). Ionizing radiation exposure: hazards, prevention, and biomarker screening. *Environmental science and pollution research international*, 25(16), 15294–15306.
- Muftuoglu, C. (2022). *Baş-boyun kanser hücrelerinde biyobelirteç olarak circRNA'ların tanımlanması ve radyoterapinin bu biyobelirteçler üzerindeki etkilerinin araştırılması*.
- Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W. E., & Whiteside, T. L. (2016). Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Noguchi, M., Morikawa, A., Kawasaki, M., Matsuno, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kondo, H., & Shimosato, Y. (1995). Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*, 75(12), 2844–2852.
- Nolte-'t Hoen, E. N., Buermans, H. P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H., & 't Hoen, P. A. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic acids research*, 40(18), 9272-9285.
- Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
- Postmus, P. E., Kerr, K. M., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D. A., & Vansteenkiste, J. (2017). Early-stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*, 28(suppl 4), iv1-iv21.
- Pucci, M., Reclusa Asiáin, P., Duréndez Sáez, E., Jantus-Lewintre, E., Malarani, M., & Khan, S. (2018). Extracellular vesicles as miRNA nano-shuttles: dual role in tumor progression. *Target Oncol*.

- Puhka, M., Takatalo, M., Nordberg, M. E., Valkonen, S., Nandania, J., Aatonen, M., Yliperttula, M., Laitinen, S., Velagapudi, V., Mirtti, T., Kallioniemi, O., Rannikko, A., Siljander, P. R., & Af Hällström, T. M. (2017). Metabolomic Profiling of Extracellular Vesicles and Alternative Normalization Methods Reveal Enriched Metabolites and Strategies to Study Prostate Cancer-Related Changes. *Theranostics*, 7(16), 3824–3841.
- Purushothaman, A. (2019). Exosomes from cell culture-conditioned medium: isolation by ultracentrifugation and characterization. In *The Extracellular Matrix* (pp. 233-244). Humana Press, New York, NY.
- Qian, C., Chen, S., Li, S., Wang, Y., & Yao, J. (2021). Circ_0000003 regulates glutamine metabolism and tumor progression of tongue squamous cell carcinoma via the miR-330-3p/GLS axis. *Oncology reports*, 45(4), 1-15.
- Qian, L., Yu, S., Chen, Z., Meng, Z., Huang, S., & Wang, P. (2018). The emerging role of circRNAs and their clinical significance in human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1870(2), 247-260.
- Rahman, M. A., Barger, J. F., Lovat, F., Gao, M., Otterson, G. A., & Nana-Sinkam, P. (2016). Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(34), 54852.
- Riches, A., Campbell, E., Borger, E., & Powis, S. (2014). Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells—a new regulatory pathway. *European journal of cancer*, 50(5), 1025-1034.
- Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M., & Melo, S. A. (2017). The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives Biology of Cancer Exosomes. *Cancer research*, 77(23), 6480-6488.
- Rybak-Wolf, A., Stottmeister, C., Glažar, P., Jens, M., Pino, N., Giusti, S., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., Herzog, M., Schreyer, L., Papavasileiou, P., Ivanov, A., Öhman, M., Refojo, D., Kadener, S., & Rajewsky, N. (2015). Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Molecular cell*, 58(5), 870–885.
- Salido-Guadarrama, I., Romero-Cordoba, S., Peralta-Zaragoza, O., Hidalgo-Miranda, A., & Rodriguez-Dorantes, M. (2014). MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *OncoTargets and therapy*, 7, 1327.

- Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L., & Brown, P. O. (2013). Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS genetics*, 9(9), e1003777.
- Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O. (2012). Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PloS one*, 7(2), e30733.
- Santivasi, W. L., & Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & redox signaling*, 21(2), 251-259.
- Schey, K. L., Luther, J. M., & Rose, K. L. (2015). Proteomics characterization of exosome
- Schreiber, G., & McCrory, D. C. (2003). Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest*, 123(1), 115S-128S.
- Schuette, W., Schirmacher, P., Eberhardt, W. E., Dietel, M., Zirrgiebel, U., Muehlenhoff, L., & Thomas, M. (2018). Treatment decisions, clinical outcomes, and pharmacoeconomics in the treatment of patients with EGFR mutated stage III/IV NSCLC in Germany: an observational study. *BMC cancer*, 18(1), 1-10.
- Seimiya, T., Otsuka, M., Iwata, T., Shibata, C., Tanaka, E., Suzuki, T., & Koike, K. (2020). Emerging roles of exosomal circular RNAs in cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 568366.
- Shafiq, J., Hanna, T. P., Vinod, S. K., Delaney, G. P., & Barton, M. B. (2016). A population-based model of local control and survival benefit of radiotherapy for lung cancer. *Clinical oncology*, 28(10), 627-638.
- Shi, Q., Zhou, C., Xie, R., Li, M., Shen, P., Lu, Y., & Ma, S. (2021). CircCNIH4 inhibits gastric cancer progression via regulating DKK2 and FRZB expression and Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 28(1), 1-11.
- Shi, X., Wang, B., Feng, X., Xu, Y., Lu, K., & Sun, M. (2020). circRNAs and exosomes: a mysterious frontier for human cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 19, 384-392.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(3), 177-193.
- Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in lipid research*, 66, 30-41.

- Su, Y., Lv, X., Yin, W., Zhou, L., Hu, Y., Zhou, A., & Qi, F. (2019). CircRNA Cdr1as functions as a competitive endogenous RNA to promote hepatocellular carcinoma progression. *Aging (Albany NY)*, 11(19), 8182.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Surova, O., & Zhivotovsky, B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32(33), 3789-3797.
- Syn, N., Wang, L., Sethi, G., Thiery, J. P., & Goh, B. C. (2016). Exosome-mediated metastasis: from epithelial–mesenchymal transition to escape from immunosurveillance. *Trends in pharmacological sciences*, 37(7), 606-617.
- Taieb, J., Chaput, N., Scharz, N., Roux, S., Novault, S., Ménard, C., Ghiringhelli, F., Terme, M., Carpentier, A. F., Darrasse-Jèze, G., Lemonnier, F., & Zitvogel, L. (2006). Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(5), 2722–2729.
- Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 30, 255-89.
- Tomic, R., Podgaetz, E., Andrade, R. S., & Dincer, H. E. (2015). Cryotechnology in diagnosing and treating lung diseases. *Journal of Bronchology & Interventional Pulmonology*, 22(1), 76-84.
- van den Boorn, J. G., Daßler, J., Coch, C., Schlee, M., & Hartmann, G. (2013). Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 65(3), 331-335.
- Vinod, S. K., & Hau, E. (2020). Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology*, 25, 61-71.
- Wang, F., Nazarali, A. J., & Ji, S. (2016). Circular RNAs as potential biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *American journal of cancer research*, 6(6), 1167.
- Wang, G., Liu, W., Zou, Y., Wang, G., Deng, Y., Luo, J., Zhang, Y., Li, H., Zhang, Q., Yang, Y., & Chen, G. (2019). Three isoforms of exosomal circPTGR1 promote hepatocellular carcinoma metastasis via the miR449a-MET pathway. *EBioMedicine*, 40, 432–445.

- Wang, R., Zhang, S., Chen, X., Li, N., Li, J., Jia, R., Pan, Y., & Liang, H. (2018). CircNT5E Acts as a Sponge of miR-422a to Promote Glioblastoma Tumorigenesis. *Cancer research*, 78(17), 4812–4825.
- Wang, Y., & Wang, Z. (2015). Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *Rna*, 21(2), 172-179.
- Wang, Y., Li, X., Wang, H., & Zhang, G. (2022). CircCAMSAP1 promotes non-small cell lung cancer proliferation and inhibits cell apoptosis by sponging miR-1182 and regulating BIRC5. *Bioengineered*, 13(2), 2428-2439.
- Wang, Y., Liu, J., Ma, J., Sun, T., Zhou, Q., Wang, W., Wang, G., Wu, P., Wang, H., Jiang, L., Yuan, W., Sun, Z., & Ming, L. (2019). Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases. *Molecular cancer*, 18(1), 116.
- Wang, Y., Yan, Q., Mo, Y., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, S., Guo, C., Wang, F., Li, G., Zeng, Z., & Xiong, W. (2022). Splicing factor derived circular RNA circCAMSAP1 accelerates nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis via a SERPINH1/c-Myc positive feedback loop. *Molecular cancer*, 21(1), 62.
- Wang, Y., Zhang, H., Wang, J., Li, B., & Wang, X. (2020). Circular RNA expression profile of lung squamous cell carcinoma: identification of potential biomarkers and therapeutic targets. *Bioscience reports*, 40(4).
- Wang, Z., Tang, J., Wang, Y., Sun, S., Chen, Y., Shen, Y., & Yang, H. Y. (2019). Circular RNA hsa_circ_009755 downregulation correlates with clinicopathology in oral squamous cell carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 12, 4025.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 13(3), 269-288.
- Wortzel, I., Dror, S., Kenific, C. M., & Lyden, D. (2019). Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. *Developmental cell*, 49(3), 347-360.
- Wu, H., Zhou, J., Mei, S., Wu, D., Mu, Z., Chen, B., Xie, Y., Ye, Y., & Liu, J. (2017). Circulating exosomal microRNA-96 promotes cell proliferation, migration and drug resistance by targeting LMO7. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(6), 1228–1236.
- Xu, K., Zhang, C., Du, T., Gabriel, A., Wang, X., Li, X., Sun, L., Wang, N., Jiang, X., & Zhang, Y. (2021). Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 134, 111111.

- Xu, X., Tao, R., Sun, L., & Ji, X. (2020). Exosome-transferred hsa_circ_0014235 promotes DDP chemoresistance and deteriorates the development of non-small cell lung cancer by mediating the miR-520a-5p/CDK4 pathway. *Cancer Cell International*, 20(1), 1-15.
- Yang, Y., Shao, Y., Zhu, M., Li, Q., Yang, F., Lu, X., Xu, C., Xiao, B., Sun, Y., & Guo, J. (2016). Using gastric juice lncRNA-ABHD11-AS1 as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(1), 1183–1188.
- Yu, G., Jung, H., Kang, Y. Y., & Mok, H. (2018). Comparative evaluation of cell-and serum-derived exosomes to deliver immune stimulators to lymph nodes. *Biomaterials*, 162, 71-81.
- Yu, J., Xu, Q. G., Wang, Z. G., Yang, Y., Zhang, L., Ma, J. Z., Sun, S. H., Yang, F., & Zhou, W. P. (2018). Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 68(6), 1214–1227.
- Yu, X., Harris, S. L., & Levine, A. J. (2006). The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer research*, 66(9), 4795-4801.
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288.
- Zhang, P. F., Wei, C. Y., Huang, X. Y., Peng, R., Yang, X., Lu, J. C., Zhang, C., Gao, C., Cai, J. B., Gao, P. T., Gao, D. M., Shi, G. M., Ke, A. W., & Fan, J. (2019). Circular RNA circTRIM33-12 acts as the sponge of MicroRNA-191 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Molecular cancer*, 18(1), 105.
- Zhang, Y., & Wang, X. F. (2015). A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature cell biology*, 17(6), 709-711.
- Zhao, M., Xu, J., Zhong, S., Liu, Y., Xiao, H., Geng, L., & Liu, H. (2019). Expression profiles and potential functions of circular RNAs in extracellular vesicles isolated from radioresistant glioma cells. *Oncology reports*, 41(3), 1893-1900.
- Zhong, Z., Lv, M., & Chen, J. (2016). Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Zhou, C., Liu, H. S., Wang, F. W., Hu, T., Liang, Z. X., Lan, N., He, X. W., Zheng, X. B., Wu, X. J., Xie, D., Wu, X. R., & Lan, P. (2020). circCAMSAP1 Promotes Tumor Growth

in Colorectal Cancer via the miR-328-5p/E2F1 Axis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(3), 914–928.

Zhu, L. P., He, Y. J., Hou, J. C., Chen, X., Zhou, S. Y., Yang, S. J., Li, J., Zhang, H. D., Hu, J. H., Zhong, S. L., Zhao, J. H., & Tang, J. H. (2017). The role of circRNAs in cancers. *Bioscience reports*, 37(5), BSR20170750.



Teşekkür

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, her zaman beni motive eden, bilgisi ve deneyimiyle bana her zaman yol gösterici olan danışmanım Doç. Dr. Ayşe CANER'e;

Çok iyi bir bilimsel ortamda, EgeSAM ekibinde olmamı sağlayan, Prof. Dr. Tuncay GÖKSEL'e;

Teknik ve teorik her konuda bildiklerini paylaşan, laboratuvarında kendimi geliştirmemi sağlayan Dr. Ufuk MERT, Can MÜFTÜOĞLU ve Dr. Milad ASADI'e;

Teorik bilgilerini ve Teknik deneyimlerini paylaşan ve laboratuvarında destekleyen Ahmed AL-OMAR'e;

Hayatımın maddi manevi her alanında desteklerini hissettiğim, daima bilgi ve farkındalıklarının ışığı ile yolumu aydınlatan, başarılarımla gurur duyan annem Noushin HAKİMİ ve babam Saeid RAHİMİ'e;

İzmir, 1.11.2022

Saina RAHİMİ

Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Saina RAHİMİ

Doğum Yeri/Tarihi:

AKADEMİK GEÇMİŞ

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Temel Onkoloji ABD 2020-2022 Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi-Yüksek Lisans

TABRİZ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK FAKÜLTESİ

2015-2019 Tıbbi Laboratuvar Bilimleri-Lisans

ÇALIŞMA DENEYİMİ

Yüksek Lisans Araştırmacısı

- Hücre Kültürü
- Eksozom İzolasyonu
- Eksozom Karakterizasyonu Dinamik Işık Saçılması Yöntemiyle
- Eksozom Karakterizasyonu Flow Sitometri Yöntemiyle
- Real Time PCR
- DNA/RNA İzolasyonu
- Primer Dizaynı

10/2018-06/2019 Tıbbi Laboratuvar

- Kan Alma
- Biyokimya testlerin takibini sağlama
- İmmün testlerin takibini sağlama

EĞİTİMLER VE SERTİFİKALAR

1st International Basic Oncology Congress Sertifikası / TEOD

1st International Basic Oncology Congress'in poster sunum ödülü Sertifikası / TEOD

Kök Hücre ve İmmün Modülasyon Eğitimi / TEOD

Organoid ve 3 Boyutlu Hücre Modelleri Eğitimi / TEOD

Gene Therapy and CRISPR Eğitimi