



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSER TANILI HASTALARDA EGFR
MUTASYONLARININ KEMOTEROPATİK İLAÇLAR İLE
YANIT İLİŞKİLERİNİN VE BU MUTASYONLARIN TÜMÖR
HÜCRELERİNDEKİ *P53*, *PTEN*, *TRAIL RESEPTÖR*, *FAS
RESEPTÖR*, *SURVİVİN*, *BAX* VE *BCL-2* İFADELERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Aydın DEMİRAY

**Nisan 2015
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSER TANILI HASTALARDA EGFR
MUTASYONLARININ KEMOTEROPATİK İLAÇLAR İLE
YANIT İLİŞKİLERİNİN VE BU MUTASYONLARIN TÜMÖR
HÜCRELERİNDEKİ *P53*, *PTEN*, *TRAIL RESEPTÖR*, *FAS
RESEPTÖR*, *SURVİVİN*, *BAX* VE *BCL-2* İFADELERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

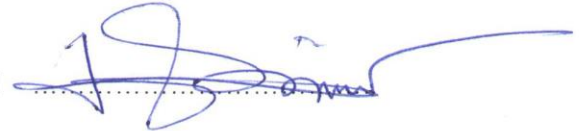
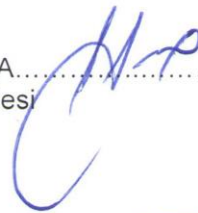
Aydın DEMİRAY

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2015

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Aydın DEMİRAY tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan “Akciğer Kanseri Tanılı Hastalarda EGFR Mutasyonlarının Kemoteropatik İlaçlar ile Yanıt İlişkilerinin ve Bu Mutasyonların Tümör Hücrelerindeki P53, PTEN, TRAIL Reseptör, Fas Reseptör, Survivin ve Bax ve BCL-2 İfadelerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI
Pamukkale Üniversitesi

Üye(DANIŞMAN)Prof. Dr. Hakan AKÇA
Pamukkale Üniversitesi

Üye:Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Pamukkale Üniversitesi

Üye:Prof. Dr. Arzu YAREN
Pamukkale Üniversitesi

Üye:Doç. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi


Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 4.6.2015
Tarih ve62....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zekiye Melek BOR KÜÇÜKATAY

Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı : Aydın DEMİRAY

İmza :

ÖZET

AKCİĞER KANSER TANILI HASTALARDA EGFR MUTASYONLARININ KEMOTEROPATİK İLAÇLAR İLE YANIT İLİŞKİLERİNİN VE BU MUTASYONLARIN TÜMÖR HÜCRELERİNDEKİ P53, PTEN, TRAIL RESEPTÖR, FAS RESEPTÖR, SURVİVİN, BAX VE BCL-2 İFADELERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aydın DEMİRAY

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Nisan 2015, 66 Sayfa

Akciğer kanserleri, Dünya genelinde kanser nedenli ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Prostat ve meme kanserlerinden sonra akciğer kanserleri üçüncü sırada görülmektedir. Akciğer kanserlerinde Epidermal Büyüme Faktör Reseptöründe (EGFR) meydana gelen mutasyonlar özellikle tirozin kinaz bölgesi mutasyonlarıdır. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) tümörleri özellikle Asyalı, beyaz ve sigara içmeyen bayanlarda daha sık görülmektedir. Bu çalışma da KHDAK hastalarında EGFR- Kirsten Ras Sarcoma (KRAS) mutasyon profilleri, erlotinib ilişkisi ve p53, pten, trail reseptör, fas reseptör, survivin, bax ve bcl-2 ifadeleri araştırılmıştır. EGFR mutasyonuna sahip 97 hastanın 39'unda delE746-A750 (%36.4), 29'unda L861Q (%18.5), 10'unda L747-T751 ins P (%12.3), 10'unda L858R (%9.8), 9'unda G719A (%9.8), 5'inde del E746-T751 ins P, 3'ünde T790M (%3.6), 3'ünde G719S (%3.6), 3'ünde del E746-A750 ins I, 3'ünde L747-P753 ins S, 1'inde delE746-A750 IP (%1.2), 1'inde G719C (%1.2), 1'inde L747-T751 ins Q tespit edilmiştir. KRAS mutasyonuna sahip 75 hastanın 32'sinde G12V (%6.6), 10'unda G12S (%22.3), 8'inde G12C (%17.8), 6'sında G12D (%13.3), 18'inde Q61R (%15.5), 15'inde Q61H (%22.3), 1'inde G12A (%2.2), 1'inde G13D tespit edilmiştir EGFR ve KRAS mutasyonun ikisini birden sahip 20 hasta (%6.6) tespit edilmiştir. EGFR mutasyonları demografik olarak kadın (%48 kadın, %28 erkek), sigara içmeyen (sigara içmeyen %49, sigara içen %26) ve adenokarsinomlu (adenokarsima %37.8, skuamöz %26.8) hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu hastalarda EGFR mutasyonu daha sık tespit edilmiştir. Bu hastalardan sağkalım oranı EGFR-TKI tedavisi alan hastaların almayanlara göre tüm sağkalımı oranı istatistiksel olarak anlamlıdır (146±22, 84±12(hafta) p:0.020). KHDAK hastaların tümör dokularında EGFR ve KRAS mutasyonları Bcl-2 ve survivin ekspresyonlarını artırırken Bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ekspresyonlarını azalttığı saptanmıştır. EGFR ve KRAS mutasyonları KHDAK hastalarında antiapoptotik yolları indüklerken, apoptotik yolları baskılamaktadır. Sonuç olarak KRAS mutasyonları KHDAK hastaları için yeni bir prognostik faktör olabilir.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, EGFR, KRAS, Erlotinib

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012BE009).

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE RESPONSE RELATIONSHIPS OF EGFR MUTATIONS TO CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS AND THE EFFECTS OF THESE MUTATIONS ON THE EXPRESSIONS OF *P53*, *PTEN*, *TRAIL* RECEPTOR, *FAS* RECEPTOR, *SURVIVIN*, *BAX* AND *BCL-2* ON PATIENTS DIAGNOSED WITH LUNG CANCER.**

DEMİRAY; Aydın
PhD. Thesis in Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. Hakan AKÇA (PhD)

Nisan 2015, 66 Pages

Lung cancer is the leading cause of cancer death in the World. Breast and prostate cancers are more common than lung cancer. Mutations in the EGFR gene are critical determinants of treatment with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. The frequency of EGFR mutations is reported high among white Asian, female and non-smokers. DNA was isolated from the formalin-fixed, paraffin- embedded 300 Turkish NSCLC patients and their EGFR mutation status was examined by pyrosequencing. EGFR mutations were detected in 97 of the 300 patients (36%); 39 patients with delE746-A750, 29 patients with L861Q, 10 patients with L747-T751 ins P, 10 patients with L858R, 9 patients with G719A, 3 patients with T790M, 3 patients with G719S, 5 patients with delE746-T751 ins I, 1 patients with delE746-A750 IP, 1 patients with delL747-P753 S and 1 patients with G719C. Kirsten Ras Sarcoma (KRAS) mutations were detected in 75 of the 300 patients (20.8%); 10 patients with G12S, 8 patients with G12C, 6 patients with G12D, 20 patients with G12V, 15 patients with Q61H, 18 patients with Q61R and 1 patients with G12A. EGFR and KRAS mutations both detected in 20 patients (%6.6). EGFR mutations were associated with gender (48% in females vs. 28% in males; $p < 0.001$), non-smoker status (49% vs 26%; $p < 0.001$), adenocarcinoma (37.8% vs 26.8%). EGFR mutations was EGFR mutation status objective response to erlotinib ($P < 0.05$). Over-all survival time was significantly longer in the patients with EGFR mutations than in the patients without EGFR mutations (146 vs 84 week, $O = 0,020$). We detected that EGFR, KRAS mutations let the increases of bcl-2 and surviving expressions but decreases of Bax, p53, PTEN, FADD and TNFR expressions on tumor tissue in NSCLC. EGFR and KRAS mutations both includes anti apoptotic pathways and inhibits apoptotic pathway on NSCLC patients. We concluded that KRAS mutations can be candidate as a new prognostic marker for NSCLC patients.

Keywords: NSCLC, EGFR, KRAS, Erlotinib

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2012SBE009.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya, TİK üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Arzu YAREN ve Prof Dr. Gülseren BAĞCI'ya

Doktora eğitimim boyunca bilimsel alt yapımın gelişmesinde katkıda bulunan değerli bölüm hocalarıma,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan başta ailem ve tüm sevenlerime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 AMAÇ.....	5
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	6
2.1 Akciğer Kanseri.....	6
2.1.1 Akciğer Kanserinin Alt Tipleri	7
2.1.2 KHDAK'ın Sınıflandırılması.....	9
2.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	11
2.2.1 EGFR'nin Yapısı	11
2.2.2 EGFR'nin Dimerizasyonu	12
2.2.3 EGFR'nin Alt Yolakları.....	14
2.2.4 EGFR'nin Mutasyonları	15
2.2.5 EGFR TK İnhibitörleri.....	16
2.3 Kirsten Rat Sarkoma (KRAS)	17
2.3.1 KRAS'ın Yapısı	17
2.3.2 Aktivasyonu	17
2.3.3 KRAS Yolakları.....	18
2.3.4 KRAS Mutasyonları	19
2.4 Kanser ve Apoptozis	20
2.4.1 Apoptozis	20
2.4.2 Apoptoziste Dış Yolak.....	22
2.4.3 Apoptoziste İç Yolak	22
2.4.4 Bcl-2 Ailesi	23
2.4.5 Kaspazlar	24
2.4.6 Apoptozisin İnhibisyonu.....	24
2.4.7 Apoptozisin Kanser ile ilişkisi.....	25
2.5 Hipotez	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1 Materyallerin Toplanması	26
3.2 DNA İzolasyon Protokolü.....	26
3.3 RNA İzolasyonu Protokolü	27
3.4 cDNA Eldesi	28
3.5 EGFR ve KRAS Mutasyon Analizi	28
3.6 Pürifikasyon ve Sekans İşlemi	31
3.7 Real-time PCR Analizi.....	31
3.7.1 Reaksiyon Şartları.....	32
3.8 İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR	34

4.1	Hasta Klinopatolojik Özellikleri	34
4.2	EGFR Mutasyon Profilleri	35
4.3	KRAS Mutasyon Profilleri.....	37
4.4	EGFR-KRAS Mutasyonlarının Sağkalım ile İlişkisi	40
4.5	EGFR-KRAS Mutasyonlarının Apoptotik ve Anti-apoptotik Genler ile İlişkisi	43
5.	TARTIŞMA.....	45
6.	SONUÇ	56
7.	KAYNAKLAR	60
8.	ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Akciğer alveolar hücresinin, kanser hücresine dönüşüm süreci.....	3
Şekil 2.1 Akciğerin Histolojisi	8
Şekil 2.2 Akciğer Kanserlerinin sınıflandırılması	9
Şekil 2.3 EGFR'nin yapısı	12
Şekil 2.4 EGFR'lerin homodimerizasyon ve heterodimerizasyon şeması	13
Şekil 2.5 EGFR'nin dimerizasyonu.....	13
Şekil 2.6 EGFR ailesi adaptör proteinlerin bağlanma bölgeleri.....	14
Şekil 2.7 EGFR yolağı	15
Şekil 2.8 Akciğer kanserinde sıklıkla görülen EGFR mutasyonları	16
Şekil 2.9 EGFR TKI konformasyonel gösterimi	17
Şekil 2.10 KRAS geninin genel yapısı.....	18
Şekil 2.11 Ras proteinin alt yolakları	19
Şekil 2.12 K-ras yaban tip ve mutant tiplerin konformasyonel görüntüsü.....	20
Şekil 2.13 Apoptozis	21
Şekil 2.14 KHDAK kanserinde apoptotik ve anti apoptotik genlerin ifadesi.....	25
Şekil 3.1 Pyrosequencing çalışma prensibi.....	29
Şekil 3.2 Taqman prob çalışma prensibi	32
Şekil 3.3 SYBR green prob çalışma sistemi.....	32
Şekil 4.1 EGFR mutasyonuna sahip hastalardan erlotinib tedavisi alan ve almayan hastaların sağkalım grafiği	41
Şekil 4.2 EGFR mutasyonuna sahip olup erlotinib tedavisi alan hastaların KRAS mutasyonuna sahip hastaların sağkalım grafiği	42
Şekil 4.3 Real time pcr sonuçlarının kat analizi	44

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 DSÖ'nün akciğer kanserlerini sınıflandırması.....	7
Tablo 2.2 KHDAK 7. TNM sınıflandırması.....	11
Tablo 3.1 EGFR ve KRAS ekzonlarının wild tip ve mutant sekanslanan DNA dizileri.....	28
Tablo 3.2 EGFR ve KRAS PCR primerleri	30
Tablo 3.3 EGFR ve KRAS sekans primerleri.....	31
Tablo 3.4 Real-time primerleri ve prob UPL numaraları	33
Tablo 4.1 Hastaların Demografik özellikler.....	34
Tablo 4.2 EGFR sekans analizinin ki-kare testi sonuçları.....	35
Tablo 4.3 EGFR mutasyon tipleri	36
Tablo 4.4 KRAS mutasyon tipleri	37
Tablo 4.5 Tüm hastaların EGFR-KRAS mutasyon profilleri.....	39
Tablo 4.6 Real-time sonuçlarının t testi analizi.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL 1	Abelson murin lösemi viral onkogen homolog 1
AJCC	Amerikan Kanser Birliği
APAF 1	Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör 1
ATM	Ataksi-Telanjektezi Mutant protein
ATP	Adenosin Tri Fosfat
BAC	Bronş Alveolar Karsinoma
BAX	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	B-Hücreli Lenfoma-2
BIRC	Baculoviral Tekrar dizili IAP
BİD	BH ₃ ilişkili Ölüm Domaini
CAD	Kaspaz ile Aktive olan DNaz
Cbl	Lenfoma Bağlantılı casitas B
CDC 44	Hücre Döngü Proteini 44
DAG	DiAçilGliserol
DED	Ölüm Etkili Domain
DIABLO	Düşük pI de Direk IAP Bağlanan Protein
DİSC	Ölüm İndüleyen Sinyal Kompleksi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EGFR-TKI	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü Trozin Kinaz İnhibitörü
ERK	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
FADD	Fas ilişkili Ölüm Domaini
FasL	FAS Ligandı
GAP	GTPaz Etkinleştirici Protein
GEF	Guanin-nükleotid Değişirme Faktörü
IAP	Apoptozis İnhibitörü
IASCL	Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü
ICAD	CAD inhibitörü
IP3	İnositol 1,4,5 Tri Fosfat
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten Ras Sarcoma
MDM 2	Fare İki Dakika homoloğu
MEK	Mitojen Aktifleyen Protein Kinaz
MMP	Matriks MetalloProtein
PI3K	Fosfoİnositol 3,4,5 Tri Fosfat
PLC ϵ	FosfoLipaz C Epsilon
PLD	RAL Protein Fosfolipaz D
PTEN	Kromozon 10'dan Fosfat ve Tensin Delesyonu
RAC 1	Ras ilişkili C3 botilium Toksini 1
RAF	Ras ilişkili Faktör
RAL	Ras Benzeri Protein
RALGDS	Ras Benzeri Protein Guanin-Nükleotid Değişim Faktörü
Rho	Ras Homolog gen ailesi
RIN 1	Ras ve Rab ilişkili Protein
RTKs	Reseptör Tirozin Kinaz
SHC2	SRC Homoloji 2
SHP1	Fosfotaz 1 domain içeren Src Homoloji sahip protein
SMAC	Mitokondriden Türemiş Kaspaz İnhibitörü
SOS	Son Of Sevenless
TİAM 1	T-Hücreli İnvazyon ve Metastaz Faktörü 1
TNF	Tümör Nekrozis Faktör

TNFR.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNM.....	Tümör, lenf Nodu, Metastaz
TRADD.....	Trail Reseptör İlişkili Ölüm Domaini
TRAIL.....	TNF İlişkili Apoptozis İndülleyen Lİgand
UICC.....	Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Bilim ve teknolojik gelişmelerin baş döndürücü hızla ilerlediği günümüzde hala bazı konularda aydınlatılamayan noktalar mevcuttur. Bunların başında ise yüksek ölüm oranına sahip olan kanser hastalığı gelmektedir. Dünya genelinde kanser alanında çok sayıda araştırmacı geniş bütçeler ile çalışmasına rağmen halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır.

Kanser üzerine yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar ışığında, kanserleşen hücrelerin, normal vücut hücrelerine göre birçok değişim geçirdiğini anlayabilmekteyiz. Ancak bu değişimler her kanser tipinde aynı olmadığı gibi aynı kanser tipinin ilerleyen dönemlerinde de farklılıklar arz etmektedir. Ayrıca aynı kanser tipi insandan insana da farklılık göstermektedir. Dolayısıyla bu durum hastalığın tedavisini oldukça güçleştirmektedir.

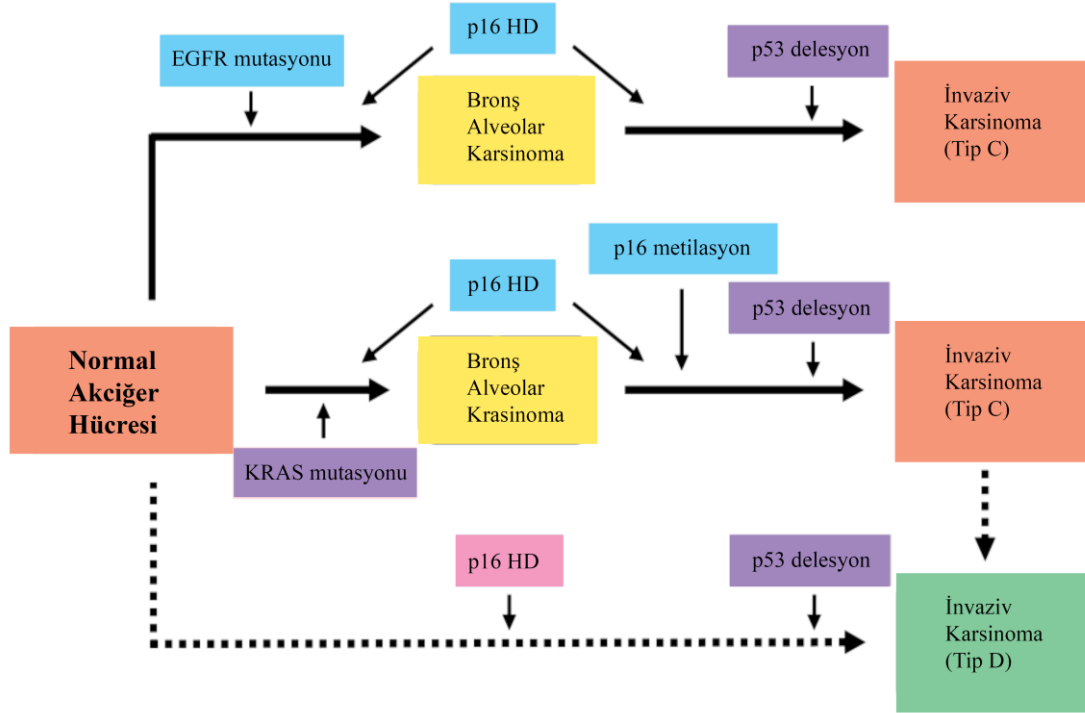
Kanseri köken aldığı hücre tipine göre üç ana grupta toplayabiliriz. İnsan kanserlerinin çok büyük kısmını oluşturan epitel hücre kaynaklı karsinomlar, diğeri en az görülen kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku kaynaklı sarkomlar ve kan veya immün sistem hücrelerinden kaynaklanan lösemi veya lenfomalar. Ayrıca kanser köken aldığı hücre haricinde olduğu organa göre de değişiklik göstermektedir. Aynı kanser türü ayrı coğrafyaya, insan ırklarına, yaşam koşullarına ve beslenme alışkanlıklarına göre de değişiklikler göstermektedir.

Dünya genelindeki ölüm nedenleri sıralamasında, kanser nedenli ölümler ikinci sırada yer almaktadır (Web 1 , Web 2). Kanser nedenli ölümlerin başında %27 oranla akciğer kanseri gelmektedir (Web 1, Web 2, Siegel R vd 2012). Kanser vakalarının görülme oranında ise, prostat ve meme kanserlerinden sonra akciğer kanserleri üçüncü sırada yer almaktadır (Web 2, Siegel R vd 2012). Akciğer kanserinin beş yıllık sağ kalım oranı ise % 15 olarak bilinmektedir. (Web 2, Siegel R vd 2012). Erkeklerde akciğer kanserine yakalanma ihtimali 1/13 iken kadınlarda bu olasılık 1/16'dır (Web 2,

Siegel R vd 2012). Ayrıca Siyah ırk erkekler, beyaz ırk erkeklere göre % 20, kadınlarda ise siyah ırkta beyaz ırka göre % 10 daha fazla akciğer kanseri görülmektedir (Web 2, Siegel R vd 2012).

Normal hücreden, kanser hücresine dönüşüm süreci karsinogenez olarak adlandırılmaktadır. Bu değişim hücrenin genetik materyalinde meydana gelen mutasyonların birikimi ile oluşur. Hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyon ile hücre kontrolsüz olarak bölünmeye başlar ve kontrolsüz çoğalma eğilimi kanser gelişimine zemin hazırlar (Aparicio CB vd 2007).

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir. Bir hücrede meydana gelen mutasyon düzeltilmeden hücre çoğalmaya başlar ve apoptoza uğramaz ise oluşan transforme hücre bölünerek çoğalmaya başlar. Ancak bu çoğalma monoklonal kitle oluşturmaz aksine yeni mutasyonlar ile daha büyük, invaziv yeteneği olan ve uzak yayılım (metastaz) yapabilen birçok alt tipte hücreye dönüşür. Örneğin; akciğer adenokarsinomları incelendiğinde, invaziv karsinoma dönüşüm sürecinde normal bronş alveolar hücreleri sigara içimine bağlı olarak Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen (KRAS) mutasyonu veya sigara içmeyenlerde ise Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) mutasyonu görülmektedir. Bu mutasyonlar sonucunda invaziv karakterli olmayan bronş alveolar karsinomaya (BAC) dönüşmektedir. Bu kitle, 2 milimetreyi (mm) geçmeyen hiperplazik bir kitledir. BAC hücrelerinde p16 heterozigot delesyonu görülebilmektedir. Bu delesyon kanser hücresine proliferasyon yeteneği kazandırmaktadır. Bu süreç p53 delesyonu ile invaziv karakterli ve metastatik invaziv karakterli akciğer adenokarsinomaya dönüştürmektedir. İnvaziv karsinoma tip C sigara içmeyenlerde EGFR mutasyonu ile başlarken, sigara içenlerde KRAS mutasyonu ile başlamaktadır. İnvaziv karsinoma tip D ise de novo p16 heterozigot delesyonu ve p53 delesyonu ile invaziv karsinomaya dönüşmektedir (Reika Iwakawa vd 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Akciğer alveolar hücresinin, kanser hücreğine dönüşüm süreci (Reika Iwakawa vd 2008)

Normal hücreler, bölünmek için bölünmeyi uyaran ajanlara ihtiyaç duyarlar. Bu uyaranlar ilgili reseptörlere bağlanarak bölünmeyi uyarır. Kanser hücrelerinde ise böyle bir ajana gerek duyulmadan ilgili reseptörün mutasyonu veya ikinci mesajcının aktif bölgesinin mutasyonu sürekli hücre bölünmesini uyarabilir. Bu da kanser hücresinin proliferasyonuna ve kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olmaktadır. Örneğin; KRAS geninde özellikle kodon 12/13'te meydana gelen mutasyonlar KRAS'ın guanin trifosfat (KRAS/GTP) bağlı formu olarak davranmasına neden olmaktadır. Bunun neticesinde aktif KRAS alt yollardaki diğer molekülleri aktif hale getirerek hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (Cox ve Der 2010).

Kanser hücreleri, çeşitli etmenlerin proliferasyonu artırıcı etkileri ile bölünme sürecini devam ettirirken bulunduğu organın veya dokunun konumuna göre belli bir kitle halini aldıktan sonra çevre dokulara doğru baskı yapmaya başlar. Önceleri mekanik stres olduğu düşünülen invazyon mekanizmasının bugün böyle olmadığı bilinmektedir. EGFR ile aktive olan matriks metalloproteaz 7 (MMP-7) ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalamaktadır (Dage Liu vd. 2007). Bilindiği gibi birçok kanser tipinde EGFR mutasyona uğramaktadır (Bing-Hua Jing ve Ling Zhiliu 2007). Bu durumda EGFR kendi kendini otofosforilleyip aktifleşerek hem proliferasyonu hem de invazyonu indükleyebilir. Bu sayede hücre ekstraselüler matrikste ilerleyebilmektedir.

Bu ilerlemesini kendi ekstraselüler matriks bileşenlerine integrin ile tutunarak ve miyozin ile kasılarak gerçekleştirmektedir. Bu da hücreye invazyon yeteneği kazandırmaktadır. İnvazyon yeteneği kazanan hücre aynı zamanda metastatik fenotipe de sahip olabilir. Çünkü ekstraselüler matriks bileşenlerine tutunamadan yaşayabilen ve hareket yeteneği kazanan hücre aynı zamanda uzak organlara yayılım yapabilir.

Elbette ki normal bir hücre belli bir yaşam sürecinden sonra programlı bir şekilde kendini yok etmektedir. Bu süreç apoptozis ya da programlı hücre ölümü olarak bilinmektedir. Bu süreç ile yaşlanmış hücreler yerine genç ve yeni hücreler ile organizma canlılığını sağlar. Apoptozis hücrenin kendi kendini yok ettiği bir süreçtir. Bu süreç enerji gerektiren belli proteinlerin aktifleşmesi ile başlar. Bu durumun en belirgin özelliği DNA'nın 50-200 baz çifti ve katları şeklinde kesilmesidir. Bu işlem aktif kaspaz ile sağlanmaktadır. Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik olarak iki yolak üzerinden indüklenebilmektedir (Thomas F. Franke vd 2003).

Apoptotik süreçte, özellikle Bcl-2 ailesi üyeleri rol almaktadır. B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) antiapoptotik molekül olarak rol alırken, Bcl-2 ilişkili X proteini (BAX) ve BH₃ ilişkili ölüm domaini (BİD) apoptotik moleküllerdir. Apoptozisin indüklenmesinde p53 ve kromozom 10'dan fosfat ve tensin delesyonlu (PTEN) rol alırken, apoptozisi inhibe eden protein ailesinin üyesi olan survivin proteini yer almaktadır. Apoptozis ekstrinsik yolağında Fas ilişkili protein Domaini (FADD) ve Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü (TNFR) apoptozisin indüklenmesinde rol almaktadır (Lanxi Song vd 2006).

Karsinogenez sadece bir genden sorumlu bir mekanizma olmadığı gibi birçok genin etkisi ile oluşan bir süreçtir. Bu süreçte, bir genin mutasyonu veya aşırı ifadesi hücre içinde başka yolların aktifleşmesine neden olmaktadır. Ya da tümör baskılayıcı genler olarak bilinen genlerin delesyonu, promotor metilasyonu veya mutasyonu ile bu genlerin ifadelerinin ortadan kaybolması karsinogenezi ilerletici bir etkiye sahip moleküllerin artışına neden olmaktadır. Böylece hücre proliferasyonunu indükleyerek, kontrolsüz büyüyen hücre yeni mutasyonlar geçirerek normalden tamamen farklı bir hücre haline gelir (Bing-Hua Jing ve Ling Zhiliu 2007).

Hücre, genetik mutasyonlar ile metastatik fenotipe sahip olduğunda birçok tümör baskılayıcı proteinleri inaktif olduğu kadar onkogenleri de sürekli aktiftir. Bu da kanser tedavisini zorlaştıran etmenlerdendir. Bu yüzden hedefe yönelik tedavi anlayışının doğmasına neden olmuştur. Özellikle EGFR mutasyonuna spesifik ajanlar mevcuttur, bunlar gefinitib (2002) ve erlotinib (2005) (Ying Yuan vd 2005) etken madde ismi ile yer almaktadır. Tek ajan hedef moleküller oral olarak alınmakta ve EGFR reseptörünün Adenozin trifosfat (ATP) bağlanma bölgesine ATP ile yarışmalı olarak bağlanmaktadır.

Bu geri dönüşümsüz bağlanma sonucunda mutant EGFR sahip hücrede aktif EGFR 'yi bloke etmektedir. Hastaların sağkalım da anlamlı oranda artış sağlamaktadır (Ying Yuan vd 2005).

1.1 AMAÇ

Bu çalışmada Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde EGFR ve KRAS mutasyonlarının Türk toplumundaki mutasyon oranları ve bu hastaların erlotinib ile olan ilişkisi, ayrıca Bcl-2, bid, bax, p53, PTEN, FADD, TNFR ve survivin genlerinin ifadesi, bu ifadelerin mutasyonlar ve erlotinib ile olan ilişkilerinin araştırılması planlanmıştır

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanserleri, kanser nedenli ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri, oluştuğu organ sıklığına göre prostat ve meme kanserlerinden sonra gelmektedir (Rebecca Siegel vd 2012). Akciğer kanserli hastaların ortalama yaşı erkeklerde 71, kadınlarda ise 72 'dir (Rebecca Siegel vd 2012). Erken evre hastalar % 15 'ini oluştururken, % 56'sını metastatik olgular oluşturmaktadır (Rebecca Siegel vd 2012). Bunun nedeni ise hastalığın asemptomatik olmasıdır. Bu durumun önüne geçebilmek için uzmanlar tarama amaçlı yıllık akciğer filmi veya düşük doz bilgisayarlı tomografi önermektedir (Rebecca Siegel vd 2012).

Evre 1 ve 2 olan hastalara cerrahi girişimde bulunulurken, evre 3 hastalarının bazılarında cerrahi girişim, bir kısmına ise radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Dage Liu 2007). Yine de 3 yıllık yaşam ömrü evre 2 hastaları için %35-50, evre 3 hastaları için ise % 28 iken (Dage Liu 2007), 5 yıllık sağ kalım KHDAK hastalarında %15 dir (Siegel R vd 2012). Yani erken evre hastalarının cerrahi girişim, kemoterapi ve radyoterapi uygulanması ile sağkalım oranı artmaktadır. Ancak ileri evre hastaların büyük bir kısmı operasyona alınamamaktadır. Bu durum sağkalım oranını da etkilemektedir. Ayrıca ileri evre hastaların kemoterapiye ve radyoterapiye olan dirençleri nedeniyle sağkalım oranı azalmaktadır (Rina Ohashi 2007).

KHDAK moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın moleküler temelini anlaşılmasının hem ilaç dirençliliğinin düşürülmesine hem de yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine katkısı olacaktır.

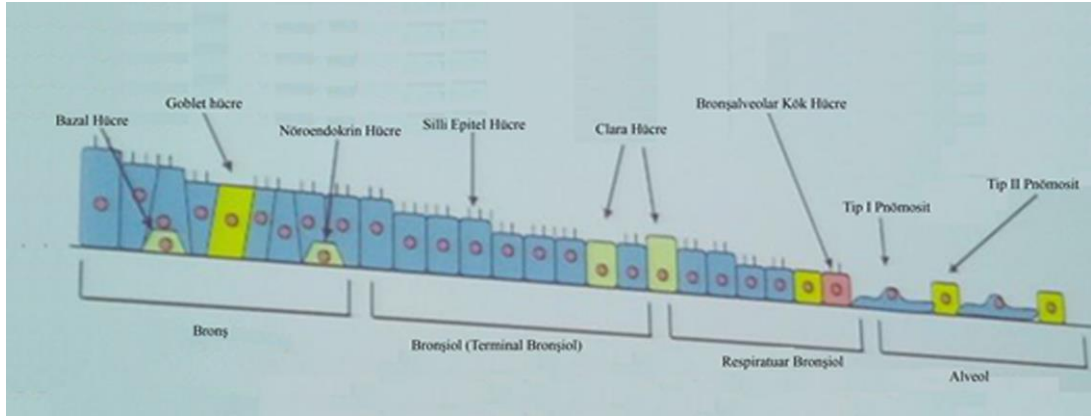
Akciğer parankimi veya solunum yollarından kaynaklanan tümörler akciğer kanserlerini oluşturur. Akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) önerisine göre yapılmaktadır. Buna göre temel olarak akciğer kanserleri küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) ve küçük hücre dışı akciğer kanserleri (KHDAK) olarak iki gruba ayrılır. Bu iki grup tüm akciğer kanserlerinin %95'ini teşkil eder. Geri kalan %5'lik oran akciğerlerden kaynaklanan diğer tümörlerdir (Travis WD vd 2004) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 DSÖ'nün akciğer kanserlerini sınıflandırması

Akciğer kanseri Tipleri	insidans
Küçük hücreli akciğer kanserleri	%15
Küçük hücre dışı akciğer kanserleri	%80
• adeno kanser	%40
• skuamöz hücreli kanserler	%30
• büyük hücreli kanser	%10
Diğerleri	%5
• karsinoid tümörler	
• pulmoner lenfoma	
• mukoepidermoid karsinoma	
• adenoid kistik karsinoma	
• Sarkomlar	

2.1.1 Akciğer Kanserinin Alt Tipleri

Akciğer kanserlerinin % 85'ini küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) (Rina Ohashi 2007), % 15 'ini ise küçük hücreli akciğer kanseri oluşturmaktadır (KHAK). KHDAK'nın yaklaşık %65'i heterojenite gösterirken, %45'i adeno ve skuamoz tipi KHDAK tipidir (Karthikeyan Kandasamy vd 2002). Akciğer kanserleri histolojik olarak incelendiğinde KHAK'leri nöroendokrin hücrelerinin, skuamöz hücreli KHDAK'leri bazal hücrelerinin ve adenokarsinom tipi KHDAK'leri ise clara hücrelerinin, tip 2 pnömosit hücrelerinin ve bronşalveolar kök hücrelerinin farklılaşmasından meydana geldiği görülmektedir (Şekil 2.1).



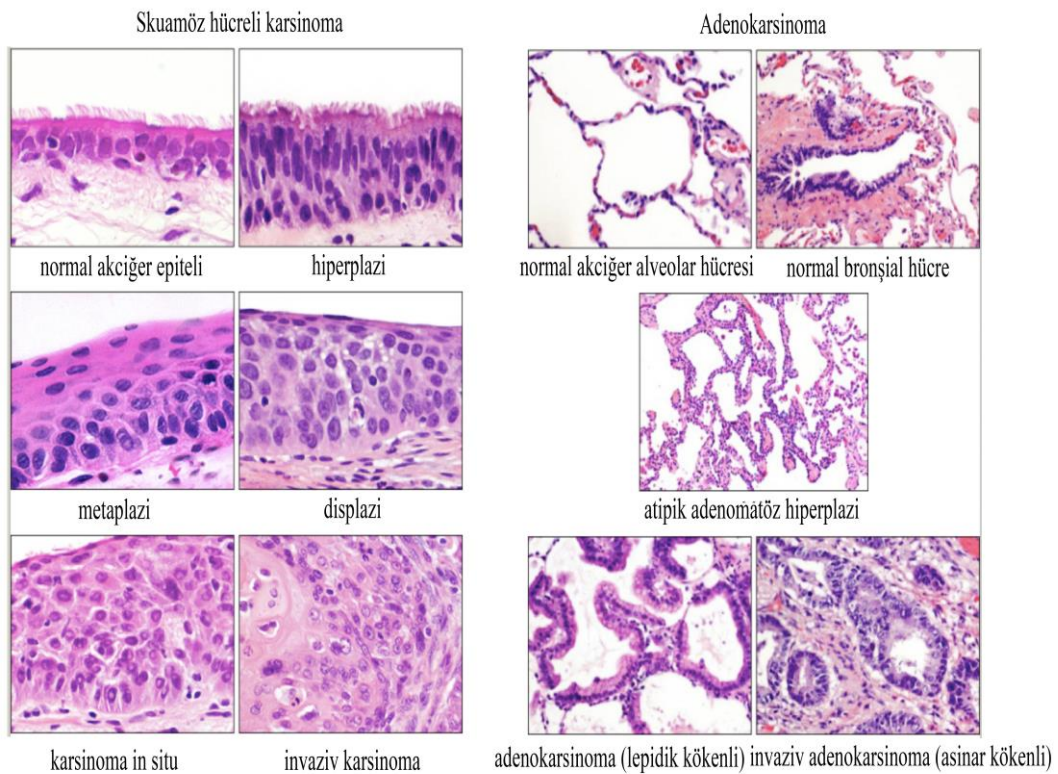
Şekil 2.1 Akciğerin Histolojisi

Skumöz hücreli karsinom: Erkeklerde daha sık rastlanır. Büyük bronşların santralinden çıkmaya eğilimlidir. Lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır; fakat toraks dışına diğer tiplerden daha geç yayılır (Kumar vd 2004). Skumöz hücreli karsinoma, bronş epitelinde yıllar öncesinde başlayan metaplazi veya displaziye izleyen *in-situ* karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 mm çapında kalınlaşma ve irregüler nodül şeklinde kabarıklık oluşmaya başlar. Bu safhada klinik açıdan bir bulguya rastlanmamasına rağmen; balgamda atipik epitel hücrelere rastlanır. Kısa süre içerisinde tümör; bronş lümenini kapatacak şekilde bir kitle haline gelir, akciğerin diğer kısımlarına invaze olur. Histolojik olarak, keratin inciler ve intersellüler köprüler oluşturan iyi diferansiye tip ya da az derecede skumöz özelliğe sahip andiferansiye tip şeklinde görülebilir. Skumöz hücreli karsinomlar metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan bir kitle oluşturduğu için diğer akciğer kanseri tiplerinden daha iyi bir prognoza sahiptir (Kumar vd 2004) (Şekil 2.2).

Adenokarsinom : Kadınlarda ve sigara içmeyenlerde en yaygın görülen akciğer kanseri tipidir (Kumar vd 2004). Genellikle akciğerdeki mukus üreten hücrelerden kaynaklanır. Adenokarsinomada tümör hücreleri tarafından müsin üretimi gerçekleşir ya da glandular farklılaşma olur (Kumar vd 2004). Çoğunlukla periferal yerleşimlidir. Yavaş büyür ve daha küçük kitle oluştururlar. Diğer alt tiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Tipik olarak tübüler, asiner ya da papiller yapılar oluştururlar (Kumar vd 2004). Yoğun müsin sekresyonu olduğunda mukoid görünümündedir (Kumar vd 2004). Solid, gri-beyaz renkli alanlar içerdiğinde pnömoni benzeri bir görünüm oluşturabilir (Kumar vd 2004). Kaviteasyon oldukça az görülür. Periferal skar veya bal peteği görünümü de sıklıkla karşımıza çıkar. Rezeksiyon sırasında, %77 oranında plevral fibrozis şeklinde visseral plevra tutulumu saptanır (Rosai vd 2004). Akciğerin periferinde yerleşip, diffüz olarak plevrayı tutan tümörlere psödomezotelyomatöz

karsinom denir (Rosai vd 2004). Solid, gri-beyaz renkli Psödomezotelyomatöz Karsinom tanısı için, akciğer alanlarında kitle bulunmaması ve başka bir primerin olmaması şarttır. Mesane, böbrek, pankreas, parotis ve prostatdan kaynaklanan tümörler de psödomezotelyomatöz görünüm yapabilirler. Psödomezotelyomatöz karsinomların %70'ini adenokarsinomlar oluşturur. Mezotelyomadan ayrımı immünohistokimyasal boyama ile yapılır (Rosai vd 2004) (Şekil 2.2).

Büyük hücreli karsinoma: Sitolojik diferansiyasyon göstermez. Hücreler genellikle anaplastiktir ve büyük veziküler nükleusları vardır. Çoğunlukla periferal yerleşimli olup büyük hacimlidirler. Erken fazda metastaz görülür bu nedenle kötü prognoza sahiptir. Tanı konulan hastaların çoğunda beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşam oranı %2-3 dür (Kumar vd 2004)



Şekil 2.2 Akciğer Kanserlerinin sınıflandırılması (Ignacio I. Wistuba I.I. 2012)

2.1.2 KHDAK'ın Sınıflandırılması

Akciğer kanserinin tedavisindeki ilk aşama hastalığın evresinin tanımlanmasıdır. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü (IASCL), 1997 yılında tanımlanan uluslararası evreleme sisteminde birçok problem bulunduğu için yeni bir akciğer

kanseri evreleme projesi gerçekleştirmiştir. Uluslararası Kanserele Mücadele Birliği (UICC) ve Amerikan Kansere Birliği (AJCC) tarafından da kabul edilen akciğer kanserinde yeni evreleme sistemindeki tümör, lenf nodu ve metastaz (TNM) ifadeleri ve evre gruplarının tanımı için IASCL tarafından oluşturulan Uluslararası evreleme komitesinin son bildirisine göre 7.TNM sınıflandırması şu şekildedir;

T sınıflandırılmasında son durum;

1. Tümör ≤ 3 cm ise T1
 - a. Tümör ≤ 2 cm T1a
 - b. $2\text{cm} < \text{tümör} \leq 3\text{cm}$ t1b
2. $3\text{cm} < \text{tümör} \leq 7\text{cm}$ ise T2
 - a. $3\text{cm} < \text{tm} \leq 5\text{cm}$ t2a
 - b. $5\text{cm} < \text{tm} \leq 7\text{cm}$ t2b
3. Tümör $> 7\text{cm}$ ise T3
4. Aynı lobda ayrı tümör nodülleri T3
5. Aynı tarafta farklı lobda yer alan tümör nodülleri T4
6. Klinik plevral yayılım saptanan olgular M1a

N sınıflandırılması için lenf nodları haritalaması;

1. Üst zon: (1-4. düzey)
2. Aortikopulmoner zon (AP zon): (5. ve 6. düzey)
3. Subkarinal zon: (7. düzey)
4. Alt zon: (8. ve 9. düzey)
5. Hiler zon: (10. ve 11. düzey)
6. Periferel zon: (12-14. düzey)

Buna göre N sınıflandırılması ki son durum;

N0: Lenf nodu metastazı yok

N1: Aynı taraf peribronşiyal/hiler lenf nodu metastazı veya primer tümörün direkt invazyonu ile intrapulmoner lenf nodu

N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodu metastazı

N3: Karşı taraf mediastinal veya hiler, aynı taraf veya karşı taraf supraklavikuler veya skalen lenf nodu metastazı

M sınıflandırılması için

1. Plevral ya da perikardial malign sıvı ya da nodül M1a
2. Karşı akciğerdeki nodüller M1a
3. Akciğer ya da plevra dışındaki uzak metastazlar M1b

Tablo 2.2 KHDAK 7. TNM sınıflandırması

	T skoru	N skoru	M skoru
Evre 1A	T1a,b	N0	M0
Evre 1B	T2a	N0	M0
Evre 2A	T1a,b	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre 2B	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre 3A	T1a,b, T2a,b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Evre 3B	T4	N2	M0
	Herhangi bir T	N3	M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a,b

Akciğer kanserlerinde tedavi, kanserin evre ve tipine göre değişir. Buna göre evre I,II cerrahi girişime uygun iken bazı evre IIIA hastaları cerrahi girişime uygundur. Diğer evre IIIB ve IV hastaları, yayılımın yaygın olması nedeniyle cerrahi girişimde bulunulamamaktadır. Bütün hastalara radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilmektedir (Travis WD vd 2004).

2.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

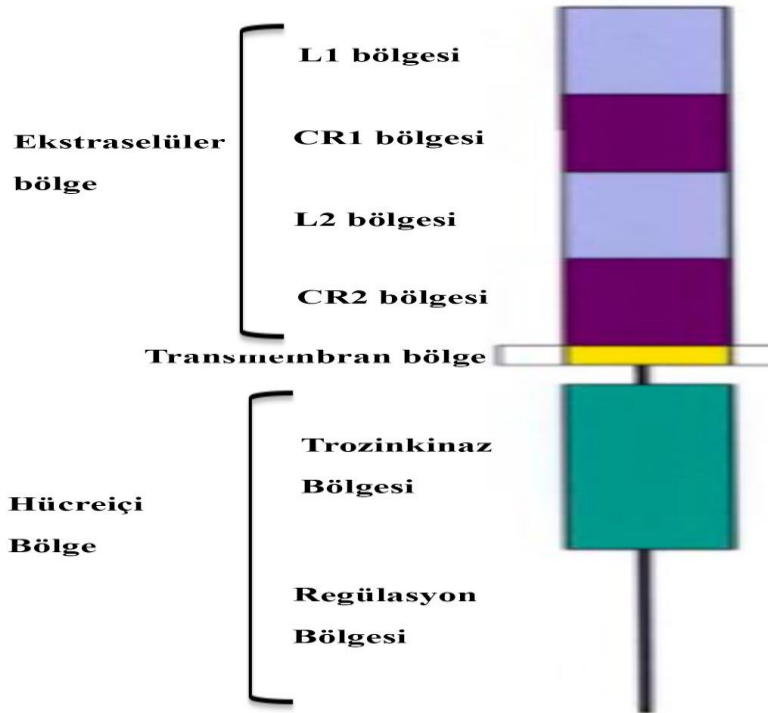
2.2.1 EGFR'nin Yapısı

EGFR geni, 7p12 kromozom bölgesinde lokalizedir ve 28 ekzon içerir. EGFR proteini 1186 aminoasitten oluşur, 170 kDa büyüklüğünde transmembran bir glikoproteindir (Şekil 2.3). EGFR transmembran proteini üç bölümden oluşur; ligandların tanınması ve bağlanmasını sağlayan bir ekstraselüler bölgesi (ekzon 1-16),

hidrofobik özelliğe sahip membran (ekzon 17) içinde diğer reseptörlerle ilişkileri sağlayan transmembran bölgesi (ekzon 18-28) (Miller 2008).

2.2.2 EGFR'nin Dimerizasyonu

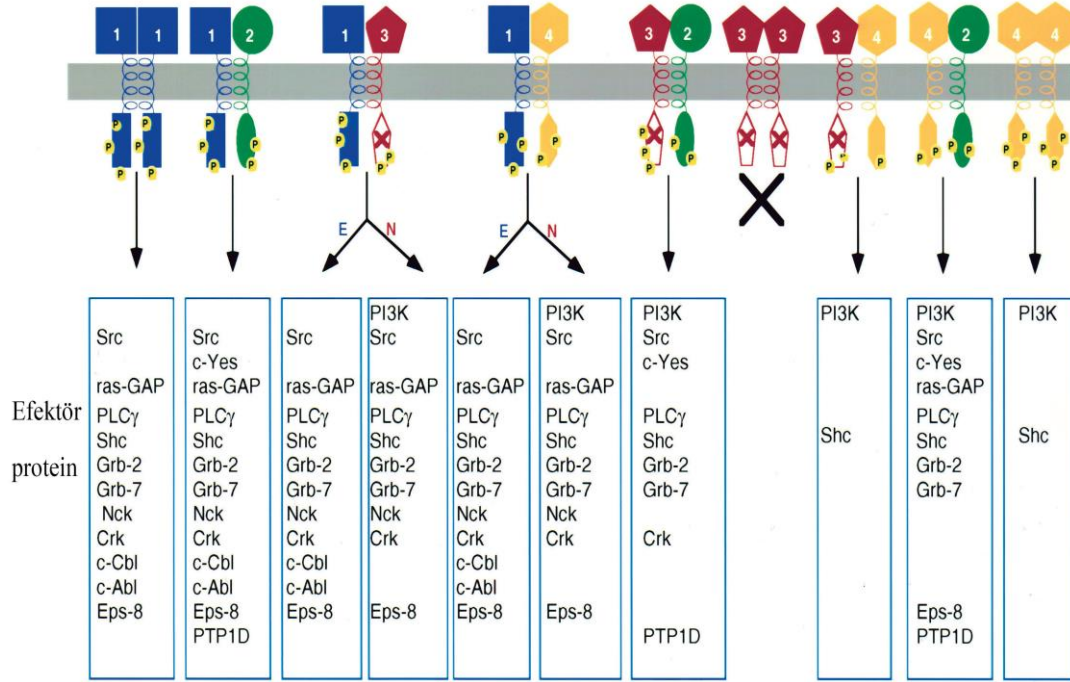
EGFR, Reseptör tirozin kinaz (RTKs) üst ailesinin üyesidir. EGFR (Erb) ailesi dört üyeden oluşur. Bunlar: ErbB-1/HER-1, ErbB-2/neu/HER-2, ErbB-3/HER-3 ve ErbB-4/HER-4'tür. ErbB-1/HER-1 ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. EGFR ailesi üyesi özellikle ekstraselüler ve transmembran alt birimlerinde yapısal olarak yüksek oranda homoloji göstermektedirler (Ferguson vd 2003, Yarden 2001, Burgess vd 2003, Capuzzo 2007).



Şekil 2.3 EGFR'nin yapısı

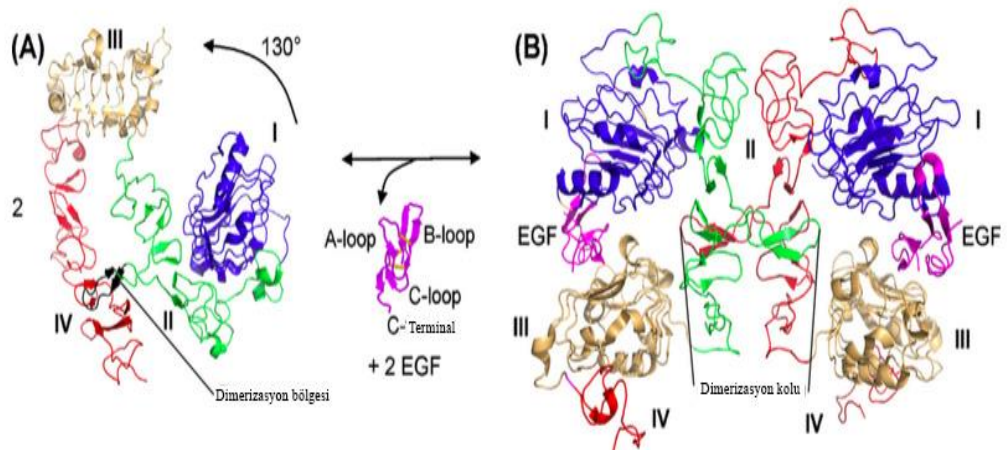
Erb ailesi reseptörlerinin tirozin kinaz aktivitesi, aile içindeki reseptörlerin birbirleri ile homo ve heterodimerizasyonuna izin verebilecek yapıdadır. Homo ve heterodimer oluşunca reseptör karşılıklı olarak tirozin bölgelerinden birbirini fosforilleyerek aktive olmaktadır. ErbB-2 reseptörünün ekstraselüler bölgesinin ikinci bölgesi olmadığı için ErbB-2/ErbB-2 homodimeri oluşturamaz. Bu yüzden ErbB ailesi diğer reseptörleri ile heterodimer yapabilirler (Gschwind vd 2004, Nakamura vd 2003). ErbB-3'ün ise tirozin kinaz bölgesi otofosforilasyon yapamamaktadır. Bunun sonucunda bu reseptöre ligand bağlansa bile fosforilasyon için heterodimer yapıya ihtiyaç duyar. ErbB-3/ErbB-3

homodimeri aktif değildir (Ciardiello vd 2004, Gschwind vd 2004, Nakamura vd 2003, Chang vd 1997). ErbB ailesinin dimerleşmeleri şu şekildedir: (ErbB-1/ErbB- 2, ErbB-1/ErbB-3, ErbB-1/ErbB-4, ErbB-2/ErbB-3, ErbB-2/ErbB-4, ErbB-3/ErbB-4). Bu dimerizasyon hücre içinde farklı yolları aktive etmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 EGFR'lerin homodimerizasyon ve heterodimerizasyon şeması

EGFR'ye bağlanacak ligand molekülü iki reseptörün ilk olarak 1. ve 3. kolların arasında bağlı kalır. Ardından 2. kol 130° dönerek ortada bağ oluşturur. 4. kol ise dimer yapısının membrana bağlı kalmasını sağlar (Roskoski R 2004) (Şekil 6).



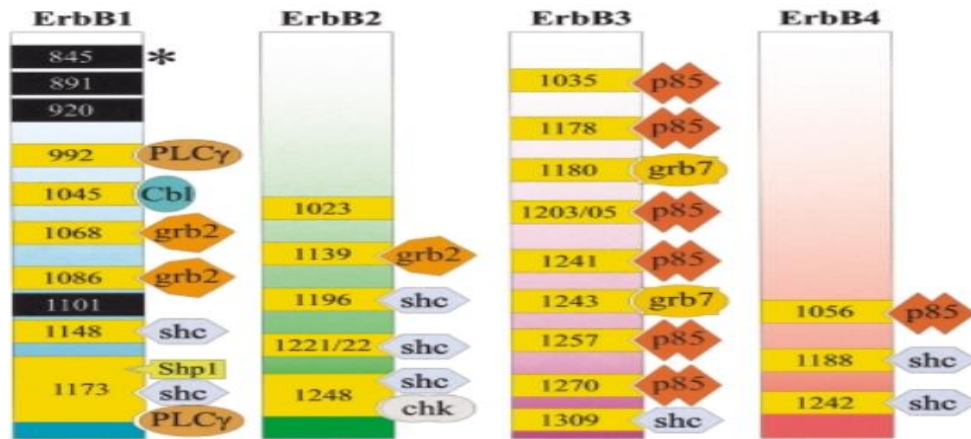
Şekil 2.5 EGFR'nin dimerizasyonu (Roskoski R 2014)

EGFR üç önemli domaine sahiptir. Hücre dışında ligandların bağlandığı ekstraselüler domain, hidrofobik transmembran bir domain ve intraselüler bölgede

sitoplazmik bir tirozin kinaz domaini içerir. Hücre dışı domain L1, CR1, L2 ve CR2 olmak üzere 4 farklı bölgeden oluşur. L bölgeleri birinci ve üçüncü kolu oluşturan lösinden zengin bölgeler iken, CR bölgeleri ikinci ve dördüncü dolu oluşturan sisteinden zengin bölgelerdir. Her biri disülfid bağıyla bir arada tutulur. Hücre içi domain ise C-terminal düzenleyici bölge ve tirozin kinaz bölgesinden oluşur. Tirozin kinaz bölgesi N-terminal ve C-terminal olmak üzere iki bölümden oluşur. N-terminal bölge ve daha büyük C-terminal bölgede ATP bağlanma bölgeleri bulunur. EGFR'nin C-terminal bölgesi tirozin aminoasitleri içerir. Reseptör üzerindeki bu alıcı, tirozin aminoasitlerine ATP'nin γ -fosfat gruplarından fosfat transfer eder. Bu şekilde EGFR aracılığıyla sinyal iletimi tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile reseptör aktivitesi gerçekleştirilmiş olur (Martin vd 2006, Nair 2005, Jorrisen 2003).

2.2.3 EGFR'nin Alt Yolakları

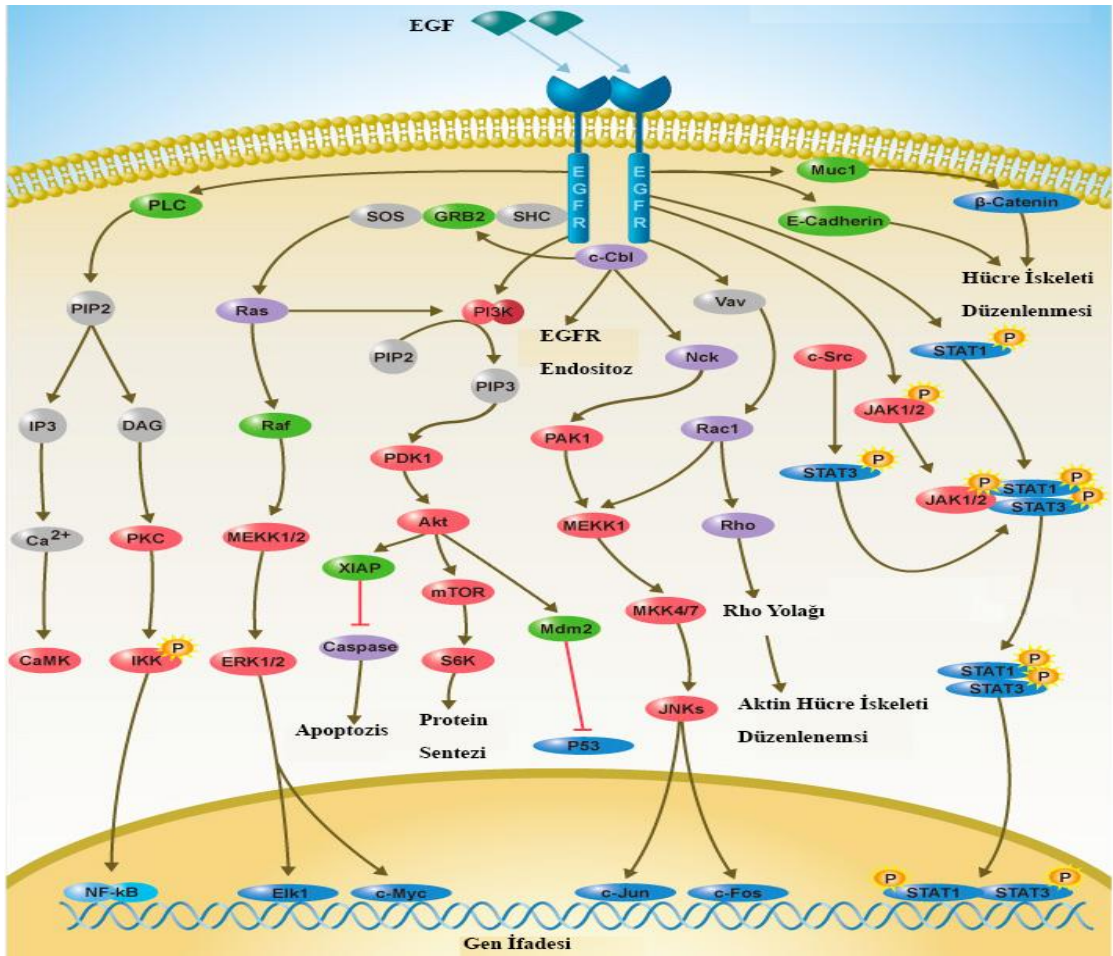
EGFR'leri otofosforilasyon sonrasında C-terminal bölgesinden p85, src homology 2 (shc 2), Growth factor receptor-bound protein 2 (grb 2), Phospholipase C (PLCY), Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (shp 1), grb7, Casitas B-lineage Lymphoma (Cbl) adaptör proteinleri için spesifik bağlanma bölgeleri oluşur (Şekil 2.6) (Olayioye MA vd 2000).



Şekil 2.6 EGFR ailesi adaptör proteinlerin bağlanma bölgeleri (Olayioye MA vd 2000)

EGFR'ler tarafından fosforillenen adaptör proteinler, hücre içinde birçok yolda rol alan proteinleri fosforiller (Şekil 2.7). Bunun sonucunda hücrenin sağkalımı, proliferasyonu, protein sentezi ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi sağlanır (Olayioye MA vd 2000). Bu yollardan kanser oluşumunda en önemlisi PI3K/Akt, Ras/Raf/Mek ve Jak/Stat yolaklarıdır (Olayioye MA vd 2000). Birçok kanser türünde

EGFR'leri aşırı ifade edilmekte ve daha fazla ligand da bağlanma kapasitesini artırmaktadır. Bazı kanser türlerinde ise, örneğin; glioblastoma kanserlerinde ekstraselüler bölgesi delesyon sonucu ifade edilememekte ve meydana gelen konformasyon değişikliği sonucu bu reseptör devamlı aktivite kazanmaktadır (Roskoski R 2004). Akciğer kanserlerinde ise özellikler ErbB ailesinin EGFR reseptörünün tirozin kinaz bölgesinde ekzon 18-21 arasındaki mutasyonlara sahiptir. Bu durum özellikle kanser hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozisten kaçışını, invazyonunu ve metastazını tetiklemektedir (Roskoski R 2014).

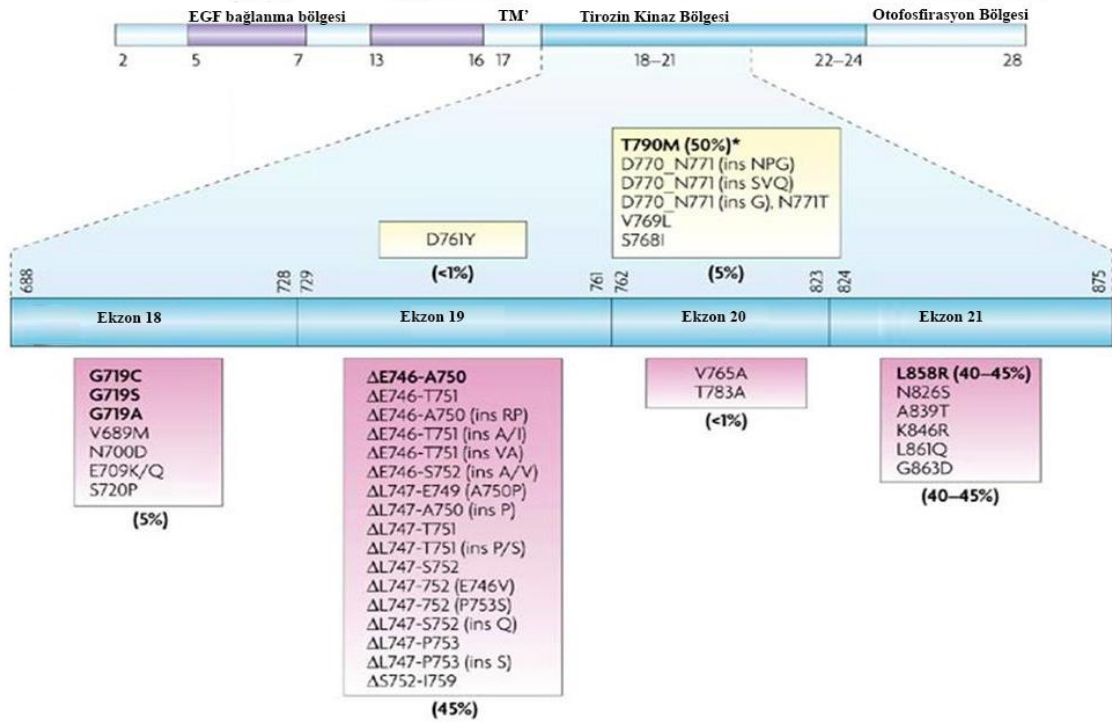


Şekil 2.7 EGFR yolağı (web 3)

2.2.4 EGFR'nin Mutasyonları

Akciğer kanserlerinde EGFR'de meydana gelen mutasyonlar özellikle tirozin kinaz bölgesi mutasyonlarıdır (Şekil 2.8). KHDAK tümörleri özellikle Asyalı, beyaz ve sigara içmeyen bayanlarda daha sık görülmektedir (Soria vd 2012). Amerika, Asya ve Avrupa'da akciğer kanserli hastaların EGFR mutasyonları analiz edilmiş ve bu mutasyonların %45-50 oranında Asya kökenli hastalarda ekzon 19'da delesyon

mutasyonu, %15-10 oranında Amerika kökenli hastalarda ekzon 18 ve 21'de nokta mutasyonu bulunduğu saptanmıştır. Bu mutasyonlardan ekzon 19 delesyonu %4-80 oluştururken ekzon 21 ve ekzon 18 mutasyonları %20-40 arasındadır. Ekzon 21 mutasyonları ise %10 civarındadır. Asya ırklarında ekzon 19 delesyonu daha sık rastlanırken, Avrupa ve Amerika toplumlarında nokta mutasyonları daha sık yer almaktadır (Soria vd 2012).

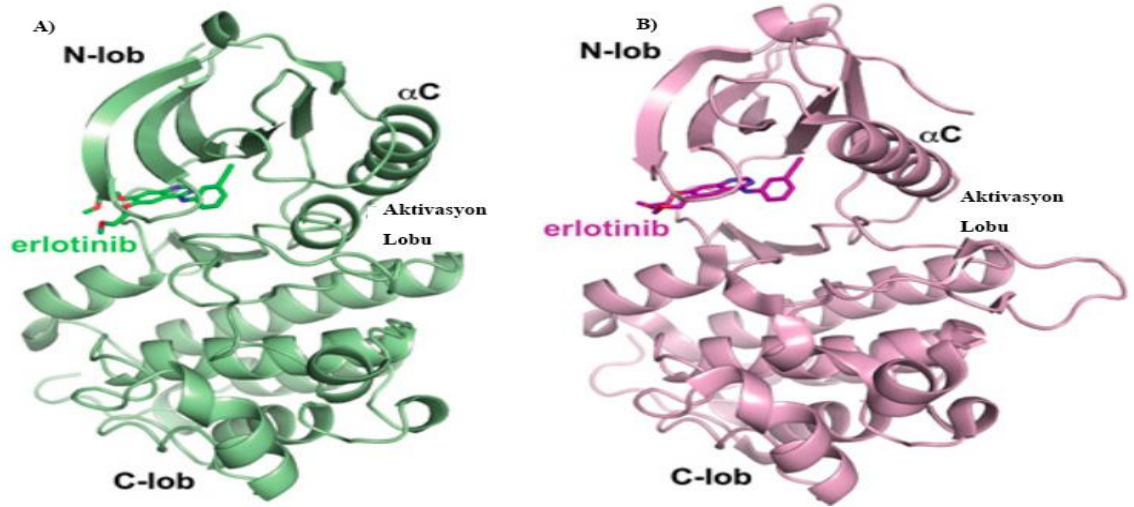


Şekil 2.8 Akciğer kanserinde sıklıkla görülen EGFR mutasyonları (Sharma 2007)

2.2.5 EGFR TK İnhibitörleri

EGFR tirozin kinaz mutasyonlarına özgü hedefe yönelik ajan olarak erlotinib ve gefitinib kullanılmaktadır. Küçük moleküller olarak hücre içine fosfolipid tabakadan direk geçiş yapabilen bu ajanlar tirozin kinaz bölgesinde ATP bağlanma cep bölgesine ATP ile yarışmalı olarak bağlanır. Bu durumda anti-EGFR inhibitörleri bağlanan EGFR'leri ATP bağlanamaz ve inaktif olur. Ancak yapılan araştırmalarda şekil 9 üzerinde sarı renkli mutasyonlara sahip tümör hücrelerinde anti-EGFR ajanlarının bağlanmadığı dolayısıyla direnç oluşturduğu rapor edilmiştir. EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ekzon 18-21 mutasyonlarında konformasyonel olarak değişime uğramakta ve ATP bağlanma bölgesinde kapatılmaktadır. Ancak direnç mutasyonlarında ise EGFR-TK inhibitörleri bu bölgeye bağlanamamakta ve konformasyonel olarak değişmemektedir. Bu durumda ATP bağlanma bölgesi aktif olarak çalışmaktadır (Şekil 2.9). EGFR-TK inhibitörleri KHDAK hastalarda üzerinde

progresyonsuz sağkalımı 2-9, ay tüm sağkalımda ise 9 ay artırdığı rapor edilmiştir (Barbara Melonsky 2014)



Şekil 2.9 EGFR TKI konformasyonel gösterimi A) inaktif EGFR B) aktif EGFR (Park j vd 2012)

2.3 Kirsten Rat Sarkoma (KRAS)

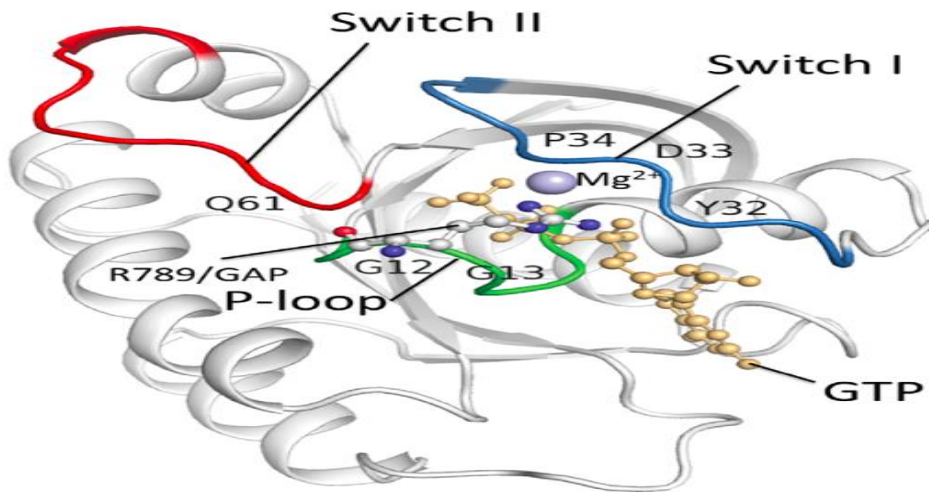
2.3.1 KRAS'ın Yapısı

Ras gen ailesinin bir üyesi olan Kras geni, Kirsten Rat Sarkoma (Ki- veya K-Ras) viral onkogen homologudur (Adjei 2001, Monticone vd 2008). Kras geni, 12. kromozomun 12p12.1 bölgesinde lokalizedir ve 6 ekzondan oluşmaktadır. Küçük bir GTPaz olan Kras proteini, 21 kDa'dan ve 189 aminoasitten oluşmaktadır. Kras hücre zarında sitoplazmik bölgesinde lokalize bir proteindir. Kras geninde kodon 12 ve 13, GTP'nin bağlandığı "P-loop"da yer almaktadır. Kodon 61'in lokalizasyonu ise, Ras regülatörlerinin ve efektörlerinin bağlanmasını kontrol eden "switch II" bölgesidir (Şekil 2.10). "switch I" ve switch II" bölgeleri GDP/GTP duyarlı bölgelerdir. Kras proteininin G domaini, yüksek düzeyde korunmuştur. Çok değişkenli bölge ise, aminoasit rezidülerinin membran lokalizasyonunu kontrol etmektedir (Wicki vd 2010).

2.3.2 Aktivasyonu

Ras proteinin aktif ve inaktif formunu düzenleyen iki protein vardır. Bu proteinlerden aktif ras proteini, guanin-nükleotid değiştirme faktörü (GEF), inaktif ras ise GTPaz etkinleştirici protein (GAP) ile düzenlenir. Ras aktif formunda GTP bağlı iken inaktif

formunda GDP bağlıdır (Şekil 2.10). Normal hücrelerde GAP etkinliği, GEF'in etkinliğinden 300 kat daha fazladır ancak tümör hücrelerinde GAP etkinliği azdır. Aynı zamanda GEF etkinliği, tümör hücrelerinde normal hücelere göre 10 kat daha fazladır. Bu durum tümör hücrelerinde ras proteininin sürekli aktif olmasına neden olmaktadır. Tirozin kinaz reseptörlerinin otofosforilasyonu sonucu tirozin kinaz bölgelerine src homoloji 2 (SH2) domaine sahip grb 2 proteinin fosforilmesi ile aynı zamanda SH3 domaine sahip grb 2 proteini Son Of Sevenless (SOS) adaptör proteini aktifleştirir. Aktif sos proteini, GDP bağlı inaktif ras proteininin switch I ve II bölgelerinin konformasyonunu değiştirir. İnaktif ras proteinine bağlı GDP'nin yerine GEF proteini ile beraber GTP bağlar ve ras aktif hale geçer. Aktif ras proteini birçok yolağın aktifleşmesinde rol alır (Cox ve Der 2010).



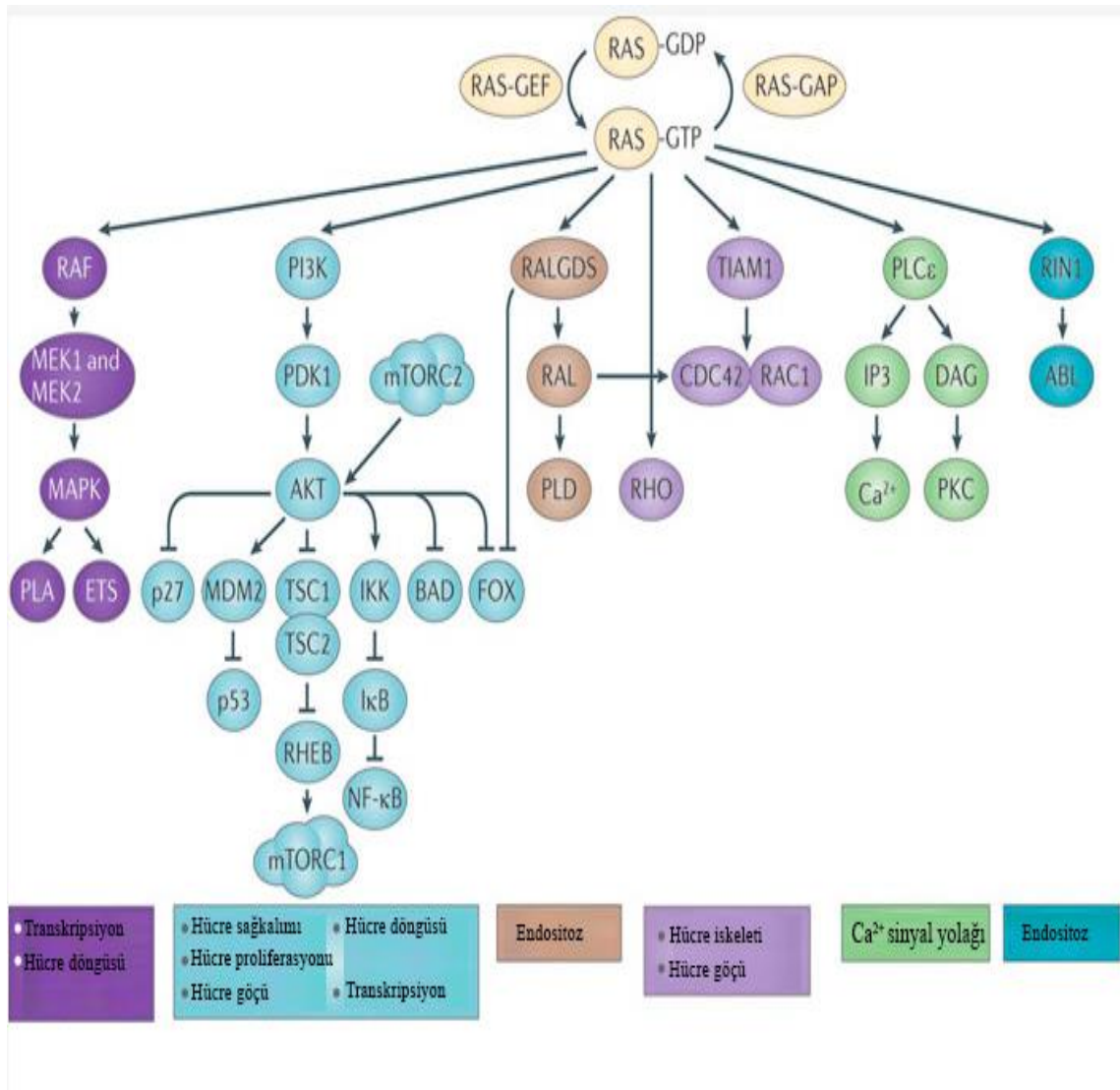
Şekil 2.10 KRAS geninin genel yapısı (Chen CC vd 2013)

2.3.3 KRAS Yolakları

EGFR/grb 2/sos proteinleri tarafından aktiveleşen ras proteini en önemli yolağı MAP kinaz kaskatıdır. Aktif ras MAP kinaz kinaz kinaz (RAF(ras ilişkili faktör)), MAP kinaz kinaz (MEK (mitojen aktifleyen protein kinaz)), MAP kinaz (ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz)) proteinlerini aktifler. Raf/mek/erk proteinleri sitoplazma içinde iskele proteinine bağlı olarak bulunur ve birbirlerini GTP ile aktifleyerek kinaz kaskatını tamamlarlar. ERK fosforillendikten sonra konformasyonel değişikliğe uğrar ve iskele proteini terk ederek çekirdeğe geçer ve transkripsiyon faktörü olarak protein sentezi ve hücre proliferasyonunu indükleyen proteinlerin transkripsiyonunda rol alır (Cox ve Der 2010).

Aktif ras proteininin bir diğer yolağı ise hücre zarına bağlı bulunan fosfoinositol 3,4 bi

fosfatı fosfoinositol 3,4,5 tri fosfata (PI3K) dönüştürür. PI3K p110 alt ünitesinden bağlanan fosfat grubu konformasyonel değişikliği sonucu zardan ayrılır ve akt (protein B) proteinini 308. tirozininden fosforiller. Fosfo akt hücre de birçok yolağı aktifler. Hücre sağkalımı, hücre proliferasyonu, hücre göçü, hücre döngüsü ve PI3K/akt/Nf-Kb yolağı ile birçok sağkalım ve proliferasyon proteinin transkripsiyonunu düzenler (Norbert Berndt vd 2011) (Şekil 2.11).

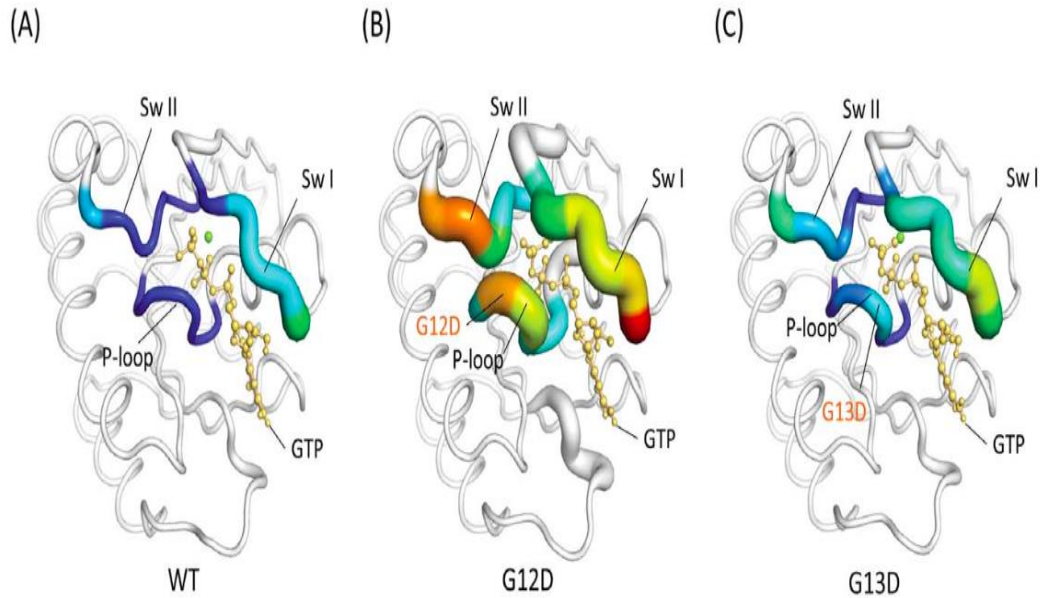


Şekil 2.11 Ras proteinin alt yolakları (Berndt N vd 2011)

2.3.4 KRAS Mutasyonları

Ras proteini özellikle embriyonik dönemde aktif süreçte rol alır. Yetişkin bir insanda kemik iliği gibi sürekli bölünen hücrelerde aktif olarak bulunur. Bunun haricinde kanser hücrelerinde özellikle mitotik aktivite ve göç için ideal bir proteindir. Bu nedenle ras proteinin üç formu, K-ras, N-ras ve H-ras, değişik kanser türlerinde farklı noktalarda

mutasyon gösterir. K-ras akciğer kanserlerinde özellikle ekzon 1'de kodon 12 ve 13'de P-loop bölgesinde mutasyon gösterir (Şekil 2.12). Ayrıca ekzon 2'de kodon 61'de switch I'de mutasyon gösterir. P-loop bölgesinde mutasyon sonucu her iki kodonda da glisin yerine gelen aminoasitler daha büyük olduğu için GTP bağlanma bölgesine GTP bağlandıktan sonra GTP'nin hidrolizini konformasyonel olarak engeller ve sürekli aktif K-ras molekülü hücre içinde yer alır. Bu durum hastalar için kötü prognosis ile ilişkilidir. Ayrıca K-ras mutasyonuna sahip KHDAK hastalarının sağkalımı K-ras mutasyonu olmayanlara göre daha kısa olduğu rapor edilmiştir. K-ras mutasyonları KHDAK kanserlerinde skuamöz tip ve sigara kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle sigara içerisinde bulunan benzamin türevleri ile ilgili olduğuna dair raporlar mevcuttur. Aynı zamanda K-ras mutasyonu ve EGFR mutasyonuna sahip hastalarında EGFR-TKI ilaçlara karşı direnç olduğu rapor edilmiştir (Cox ve Der 2010).



Şekil 2.12 K-ras yaban tip ve mutant tiplerin konformasyonel görüntüsü A) yaban tip B) G12D mutasyonu C) G13D mutasyonu (Chen CC vd 2013)

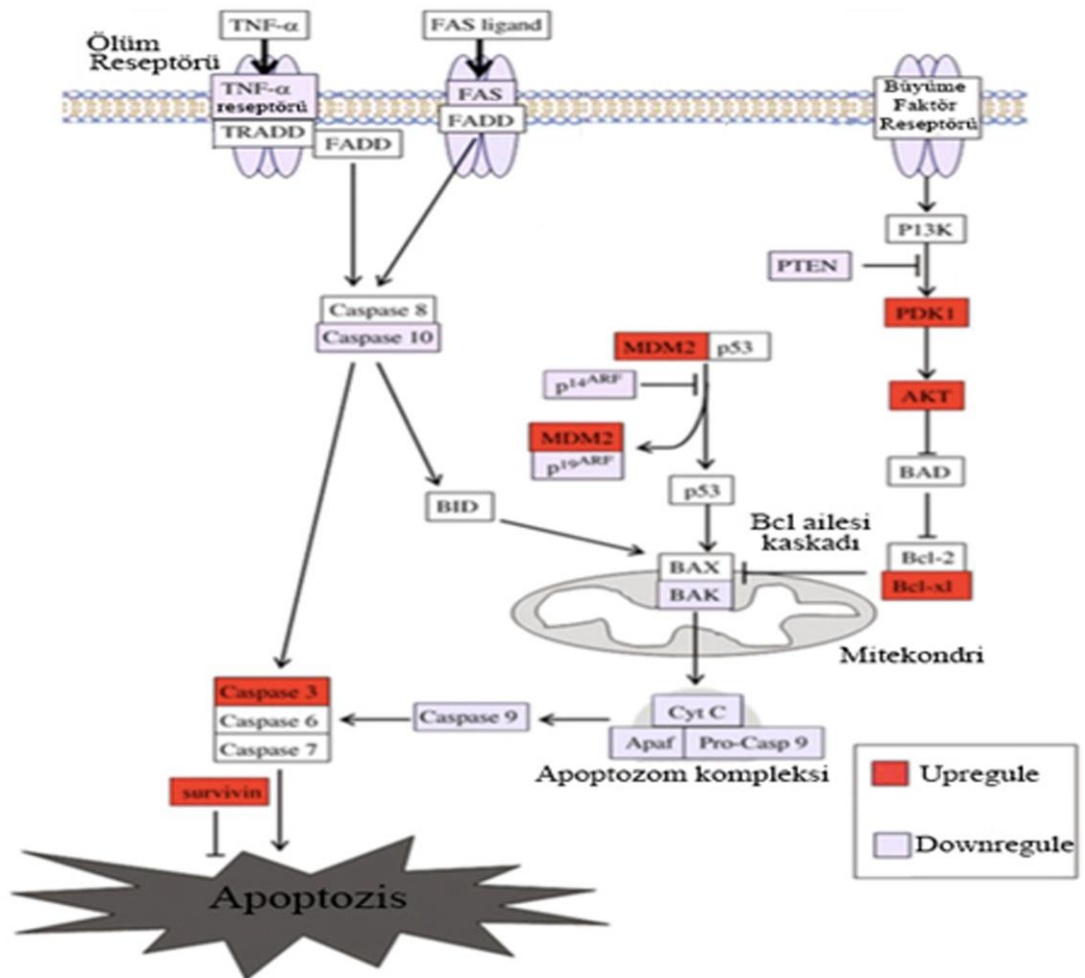
2.4 Kanser ve Apoptozis

2.4.1 Apoptozis

Apoptozis kelime anlamı olarak Yunanca sonbaharda dökülen yaprak anlamındadır. Apoptozis, programlı hücre ölümü demektir. Normal bir metabolizmada hücre bölünmesi ve hücre ölümü bir denge halindedir. Özellikle embriyonik dönemde ve doğumun ilk aylarında apoptozis sık rastlanan bir durumdur. Apoptozis bir takım kronik hastalıkların belirteci olduğu gibi hiç olmaması da anormal bir durumdur. Özellikle tümör hücreleri apoptozisten kaçma eğilimindedirler. Apoptozis, iç ve dış yoldan bir

takım medyatör proteinler ile başlar hücre çekirdeğinde bulunan kromatinlerin kondensansları ve 200 nükleotidlik kesimleri ile devam eder. Hücre zarının stabilitesi bozulur ve dışı doğru baloncuk şeklinde yapılar oluşur, hücre küçük parçalar halinde baloncuklar şeklinde paketlenir ve fagositoz ile sonlanan bir süreçtir. Bir başka hücre ölüm şekli olan nekroz ise hücrenin zar yapısının bozulması ile başlayan ve hücre içeriğinin hücrelerarası boşluğa akması sonucu oluşan bir inflamasyon yanıt ile devam eden bir süreçtir. Apoptozisin, nekrozdan ayrılan yönü budur. Apoptoziste herhangi bir inflamasyon yanıt oluşmaz. Nekroz patolojik bir yanıt iken apoptozis doğal bir süreçtir. Ayrıca nekrozda lizozomların hücrelerarası sıvıda bulunması ortamda pH değişikliğine ve doku yıkımına neden olurken, apoptoziste fagositoz ile hücre ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Elmore 2007).

Apoptozis hücre içi ve hücre dışı uyarılar ile başlayan bir süreçtir. Bu nedenle apoptozis dışı yolak ve içi yolak olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Apoptozis

2.4.2 Apoptoziste Dış Yolak

Apoptoziste dış yolak, tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi reseptörler ile başlar. TNF'ler 29 çeşittir ve 18 farklı ligandı bulunur (Paul ve Jones 2014). Bu reseptörlerden TNF ilişkili Apoptozis İndükleyen Ligand (TRAIL) üst ailesinin TRAIL-R1 (DR4), R2 (DR5) ve CD95 ligandı (FasL) apoptozis ile ilişkilidir. TRAIL Tümör Nekrozis Faktör α ve fas ligandı (FasL) ile aktifleşir. TRAIL ve FasL ligand da üç reseptörün bir araya gelmesi (trimerizasyon) ile aktifleşir (Paul ve Jones 2014). Aktifleşen bu moleküller TRAIL ölüm domain proteini ilişkili tümör nekroz faktör reseptörü 1'e (TRADD) ölüm domaini (death domain) bölgesinden bağlanır. Aynı komplekse, ölüm domaini bulunan fas ilişkili protein'de (FADD) ölüm domaini bölgesinden bağlanır. FasL reseptörüne ise sadece FADD bağlanır. Oluşan bu komplekse ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) denir. TRADD ve FADD moleküllerinin ölüm domaini C-terminal bölgelerinde bulunur. N-terminal bölgede ise ölüm etkili domainin (DED) bölgeleri bulunur. DED'ler inaktif olan prokaspaz 8 molekülünü bu komplekse bağlar ve prokaspaz 8'ler birbirini N-terminal ucundan keserek aktifleştirir. Aktif kaspaz 8 diğer efektör kaspazları keserek aktifleştirir (kaspaz 3,6,7). Kaspazlar birbirlerini N terminal bölgede ki aspartik asitten sonraki aminoasitten kestikleri için bu ismi almışlardır (C-asp-ase). Aktif kaspaz 3 hem prokaspaz 6'yı hem de protein kinaz C ϵ 'nu (PKC ϵ) aktifler. Aktif PKC ϵ çekirdek zar proteini lamin B'yi fosforlar (Cross vd 2000). Çekirdek zarının düzeni bozulur ve kromatinler sitoplazmaya yayılır. Çekirdek zarı bozulduktan sonra aktif kaspaz 3 tarafından kesilerek aktive edilen DNaz inhibitör (ICAD) proteini ile aktive olan DNaz (CAD) olarak DNA'yı 200 bp nükleotid ve katları şeklinde keser. Bir diğer yolak ise aktif kaspaz 8, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi üyesi BH₃ (Bcl 2 Homoloji) ilişkili ölüm domaini agonisti (BID) proteinini N terminal bölgesinden keser. BID kalan C-terminal bölgesi mitokondride dış membran geçirgenliğini bozar ve sitoplazmaya sitokrom c salınımına neden olur. Sitokrom c, sitoplazmada Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör 1 (APAF 1) proteini ve prokaspaz 9 ile üçlü protein yapısı apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom kompleksindeki prokaspaz 9, aktif kaspaz 9 formuna geçer. Apoptozom kompleksi efektör kaspazlardan prokaspaz 3 'ü N-terminal bölgesinden keserek kaspaz kaskatının oluşumuna ve hücrenin apoptozise gitmesine yol açar (Paul ve Jones 2014).

2.4.3 Apoptoziste İç Yolak

Hücre stres altında kaldığında, ultraviyole maruziyeti, kimyasal ajanlar, radyasyon gibi nedenler ile oluşan DNA hasarı sonucu ataksi-telanjiektezi (ATM) proteini

tarafından p53 proteini ifadesi artar. p53 transkripsiyonel bir aktivatördür (Mogi ve Kuwano 2011). İlk olarak hücreyi bölünme siklusunun ilk basamağı olan G1 fazında durduran p21 proteininin ifadesini artırır. Hücre siklusu durur. Ayrıca Mouse Doble Minute homology (fare İki Dakika Homoloğu) 2 (MDM2) proteini p53'ü N-terminal bölgesinden bağlar çekirdekte sitoplazmaya taşıyarak inaktif konumda tutar ve bir süre sonra ubiquitin E3 enzimi ile parçalar (Mogi ve Kuwano 2011). Çekirdek içerisinde p21 artışına paralel olarak p14ARF proteininin ifadesi artar. Çekirdek içerisinde p14ARF hedef molekül MDM2 proteindir. MDM2'ye bağlanan p14ARF proteini, p53'ün çekirdekte serbest kalmasını sağlar, p53 çekirdekte MDM2'ye bağlı olarak inaktif konumdadır (Mogi ve Kuwano 2011). p53, DNA hasarının düzeltilmemesine bağlı olarak, Bcl-2 ilişkili X proteinin (BAX) ifade artışına neden olur. Bax, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir BH1,2,3 ve 4 domaini içerir (Paul ve Jones 2014). Mitokondri dış membranında Bcl-2/Bax dengesi vardır. Ancak aşırı ifade edilen Bax bu dengeyi bozar ve Bax/Bax homodimerlerini oluşturur. Bunun sonucunda mitokondri dış membran geçirgenliği bozulur ve sitokrom c dışarıya salınır. Sitokrom c, sitoplazmada APAF 1 proteini ve prokaspaz 9 ile üçlü protein yapısı apoptozom kompleksini oluşturur (El more 2007). Apoptozom kompleksindeki prokaspaz 9, aktif kaspaz 9 formuna geçer. Apoptozom kompleksi efektör kaspazlardan prokaspaz 3 'ü N-terminal bölgesinden keserek kaspaz kaskadının oluşumuna ve hücrenin apoptozise gitmesine yol açar (Paul ve Jones 2014).

2.4.4 Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi, apoptoziste önemli rol oynayan bir protein ailesidir. Bcl-2 ailesi pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir. Anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkışını indüklerler. Anti- apoptotikler ise sitokrom c çıkışını baskılar. Bu iki hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks yapısına bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluştururken amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde bulunur. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer Bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesinden bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de bulunduran üyeler (Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini bulunduran üyeler (Bid, Bad, Bim). Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi de bulunur. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom c'nin çıkışını baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar, mitokondri zar potansiyeli gerilir ve sitokrom c çıkışı gerçekleşir. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ifadesi apoptozisi baskılaması buna karşın

pro-apoptotik üyelerin aşırı ifadesi sonucu hücreler apoptozise uğrar. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri: Bcl-2, Bcl-XI, Mcl-1 iken, pro-apoptotik ise: Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (Paul ve Jones 2014).

2.4.5 Kaspazlar

Kaspazlar sistein proteazlardır. Kaspazlar hedef proteinlerin aspartik asitten sonraki peptit bağını kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve aktif olabilmek için proteolitik olarak birbirlerini keserler. Böylece bir kaspaz kaskadı oluştururlar. Apoptoziste rol alan kaspazlar 3,6,7,8,9; inflamasyonlar da rol alanlar ise 1,4,5,12'dir. Ayrıca başlatıcı kaspazlar 8,9 iken, efektör kaspazlar 3,6,7 olarak rapor edilmiştir (McIlwain vd 2015).

2.4.6 Apoptozisin İnhibisyonu

Apoptotik süreçte yer alan ayrıca bu süreci inhibe eden proteinlerin (IAP) varlığı rapor edilmiştir. Bu protein ailesinin; X bağlı apoptozis inhibitör protein (XIAP), baculoviral tekrar dizili IAP-2 (BIRC 2 (cIAP1)), baculoviral tekrar dizili IAP-3 (BIRC 3(cIAP2)), NAIP, livin ve survivin (BIRC 5) olmak üzere beş üyesi vardır (Budhidarmo ve Day 2015). Ayrıca mitokondri yerleşimli, Düşük pI de Direk IAP Bağlanan Protein (DIABLO) ve Mitokondriden Türemiş Caspaz İnhibitörü (SMAC) inhibitör proteinler olarak rapor edilmiştir. IAP ailesinin genel yapısında bir çinko atomu ile 3 sistein ve bir histidin aminoasidi ile beraber aynı yapı içerisinde bacoviral IAP dizisi içeren 80 amino asit rezidüsünden oluşur. Yapısında 2-3- β sarmal ve 4-5 α heliks yapı bulunmaktadır. IAP bağlanma motifi ile alanin-treonin-prolin-fenilalanin aminoasitleri prokaspaz 9 ile bağlanarak kaspazların birbirini kesmesini inhibe eder. Ayrıca α heliks yapısı prokaspaz 9'un proteolitik bölgelerini maskeler. Aynı mekanizmalar efektör kaspaz 3 ve 7 içinde geçerlidir. SMAC/DIABLO proteinleri IAP bağlanma bölgeleri ile alanin-valin-prolin-izolosin amino asitleri ile bağlanarak aktif hale geçerler. IAP bağlı SMAC/DIABLO proteinleri apoptozom kompleksini maskeler ve efektör kaspazları bloke eder (Budhidarmo ve Day 2015).

Apoptozis hücre içi yollar ile de bloke edilir. Özellikle sağkalım ile ilişkili PI3K/Akt yolağında fosfo-Akt, BAD proteinini fosforladığı zaman fosfo-BAD konformasyonel olarak değiştiği için Bcl-2 ile heterodimer olamayacağı ve BAD kendi içinde homodimer olamayacağı için mitokondri zarının bütünlüğü bozulmaz. Ayrıca fosfo-BAD'ın kendisi gibi fosfo-BAD molekülleri ile birleşerek kompleks bir yapı oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu yolağın anahtar proteinlerinden birisi fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tümör

baskılayıcı proteindir. PTEN, PI3K'nın üçüncü halkasındaki fosfat molekülünü defosforilize ederek fosfoinositol 2 fosfata dönüştürür. Bu sayede Akt proteinin fosfatlanmasını bloke eder (Budhidarmo ve Day 2015).

2.4.7 Apoptozisin Kanser ile ilişkisi

Yapılan araştırmalarda KHDAK tümörlerinde Bcl-2 ailesi üyelerinin anti apoptotik Bcl-2 Bcl-xL proteinlerinin ifadeleri artarken, proapoptotik BAD, BİD, BAX moleküllerinin ifadelerinde azalma rapor edilmiştir. Aynı şekilde apoptozis inhibe eden BIRC3,4,5 (survivin) ifadelerinin aşırı ifade edildiğini gösteren raporlar mevcuttur. Özellikle akciğer kanserinde survivin artışına dikkat çekilmiştir. IAP üyelerinin artışı invazyon ve metastaz ile direk ilişkilidir. Bunun yanında p53 ve PTEN ifadelerinde de azalma p53 delesyonu, PTEN'in ise promotor bölgesinde hipermetilasyon veya katalik bölgesinde mutasyon varlığı rapor edilmiştir. TNFR1 ve Fas reseptörlerinin ifadesinde azalma rapor edilmiştir. Ancak kemokin reseptör ilişkili TNF ailesi üyelerinde metastatik tümör dokularında ifade artışı rapor edilmiştir (Budhidarmo ve Day 2015) (Şekil 2.14).

Gene symbol	Gene name	Upregulated	p-Value
(A) Genes over-expressed in patients with lung adenocarcinomas			
BIRC5	Survivin	3.9	0.00154
AKT1	Akt	3.5	0.00873
MAP3K14	NIK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14)	2.6	0.00382
BCL2L1	Bcl-xL	2.1	0.01604
MDM2	MDM2	1.9	0.00212
CASP3	Caspase 3	1.6	0.02170
Gene symbol	Gene name	Down-regulated	p-Value
(B) Genes down-regulated in patients with lung adenocarcinomas			
PRF1	Perforin	3.5	0.00001
CTLA1	Granzyme B	3.4	0.00856
AXUD1	Axud1	2.8	0.00011
S100A9	p14 (ARF, S100 calcium binding protein A9, calgranulin B)	2.2	0.00326
DAPK2	DAPK 2 (death-associated protein kinase 2)	2.1	0.00010
BAK1	BAK1	2.1	0.00376
PTEN	PTEN (phosphatase and tensin homolog)	1.9	0.00346
TNFRSF6	FAS (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6)	1.8	0.00023
MAP3K7	TAK 1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7)	1.8	0.00034
TNFRSF1A	TNF-alpha receptor	1.7	0.00225
CASP10	Caspase 10	1.7	0.00235
NFKBIA	IkappaB	1.7	0.00750
CDKN2D	p19 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2D, inhibits CDK4)	1.6	0.00336

Şekil 2.14 KHDAK kanserinde apoptotik ve anti apoptotik genlerin ifadesi (Budhidarmo ve Day 2015)

2.5 Hipotez

Çalışmamızın hipotezi; EGFR mutasyonu sahip hastaların sahip olmayanlara göre erlotinib ile daha uzun sağkalıma sahip olduklarını, ayrıca KRAS mutasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu, EGFR veya KRAS mutasyonuna sahip hastaların proapoptotik belirteçleri azalırken antiapoptotik belirteçlerinin arttığını ortaya koymaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Materyallerin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na 2011-2014 yılları arasında başvuran KHDAK tanılı 300 hastanın parafine gömülü dokusundan çalışma yapıldı. Bu çalışmada parafine gömülü dokular Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan 10 µm kalınlığında kesitler lizinli lamlara aktarılarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na transferi sağlandı. Lizinli lam üzerindeki parafine gömülü tümör dokusu deparafinizasyon işlemi uygulanarak tümör hücrelerinden DNA ve RNA izolasyonu planlandı.

3.2 DNA İzolasyon Protokolü

Lizinli lam üzerindeki tümör dokusu 75°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından lamlar ksilol içeren 4 şalede ikişer dakika inkübe edilerek parafin dokudan uzaklaştırıldı. Dokudan ksilolu uzaklaştırmak için ise % 70'lik alkol solüsyonundan 4 adet alkol serisinden daldırılıp çıkarılarak geçirildi. Alkolü uzaklaştırmak için lam kurumaya bırakıldı. Patoloji Anabilim Dalı'ndaki hematoksilen-eozin boyalı aynı örneğin tümör bölgesi bizim preparatımızda işaretlenip bidistile steril su damlatılıp bisturi yardımıyla tümör dokusu lam üzerinden kazınarak steril 1,5 ml'lik plastik tüplerine aktarıldı. Tümör dokusunun üzerine 180 µl lizis tamponu ve 25 µl proteinaz K eklendi. Süspanse sıvı saydam olana kadar kibarca vorteks edildi. 56°C'de 16 saat inkübe edildi. 1,5 ml'lik plastik tüp çıkartılarak kuru inkübatör 96°C'ye çıkarılarak 1 saat inkübe edildi. Ardından oda ısısına gelmesi için bekletildi. Qiagen marka Qiamp DNA FFPE tissue kit yardımıyla DNA izolasyonu basamakları takip edildi. Lizis tamponu ve Proteinaz K içeren tümör dokusuna %96-100 absollü alkolden 200 µl konup ve 10 saniye vorteksledi. DNA izolasyon kartuşları (spin kolon) +4°C'den alınıp tüm karışım aktarılarak 6000 xg' de 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun alt kısmı değiştirildi ve

üzerine 500 µl AW1 yıkama solüsyonu eklendi 6000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun alt kısmı tekrar değiştirildi ve 500 µl AW2 yıkama solüsyonu eklendi 20000xg 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun alt kısmına steril 1,5 ml'lik plastik tüp konur ve ATE tamponu (eliminasyon solüsyonu) 30-50 µl konuldu 1 dakika oda ısısında beklendi ardından 20000 xg'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA elde edildi.

3.3 RNA İzolasyonu Protokolü

RNA izolasyonun da ise steril 1,5 ml'lik plastik tüp içerisindeki parafine gömülü doku üzerine 800 µl ksilen konuldu. 56°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. 56°C'de 2 dakika inkübe edildi. Tekrar 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. 56°C'de 5 dakika inkübe edildi. 14000 xg de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Pellet, 800 µl %96'lık alkol içerisinde süspansiyon edildi. 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. 14000 xg de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Pellet, 800 µl %70'lik alkol içerisinde süspansiyon edildi. 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. 14000 xg de 2 dakika santrifüj işlemi tekrar edildi. Pellet kaldırılmadan süpernatant dikkatlice atıldı. Tüp içerisindeki pellet 5-15 dakika 55°C'de buharlaşması için inkübe edildi. Pellet doku 60 µl lizis tamponu ile muamele edildi ve 10 µl %10 SDS eklendi. 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. Kısa süreli santrifüj ardından 30 µl proteinaz K kondu. 4 saniye 3 kez vorteks edildi. Kısa santrifüj edildi. Ardından 55°C'de 3 saat inkübe edildi. Kısa süreli santrifüj ardından 200 µl binding tamponu ve 200 µl % 96'lık etanol eklendi. 4 saniye boyunca 3 kez vorteks edildi. Lizat, membran filtreye aktarıldı. 8000 xg'de 30 saniye santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı. Boş membran filtre 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre membran üzerine 30 µl DNaz solüsyonu (27 µl DNaz inkübasyon tamponu ve 3 µl DNaz) eklendi. 15-25°C de 15 dakika inkübe edildi. Üzerine 300 µl wash tamponu I eklendi 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı. Üzerine 300 µl wash tamponu II eklendi 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı. Üzerine 200 µl wash tamponu II eklendi 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Atık uzaklaştırıldı. Boş bir temiz toplama tüpü konularak 14000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Steril 1,5 ml'lik plastik tüp üzerine kartuş konularak üzerine 20 µl elüzyon tamponu (veya DPEC'li steril su) eklendi ve 15-25°C de 1 dakika inkübe edildi. Ardından 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Elimine olan su tekrar eklendi ve son işlem tekrar edildi. Elde edilen RNA ölçülerek -80°C de saklandı.

3.4 cDNA Eldesi

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'lar üretici firmanın belirttiği şekilde elde edildi (Roche, Germany). Total RNA (1ng-4 ng) 8,4 µl, random hexamer 600 pmol 2 µl, RNaz steril su 2 µl reaksiyon 250 µl'lik steril plastik tüplerde hazırlandı. Ardından 65 °C de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından buz içerisinde bekletilerek mix eklendi. Mix hazırlanışı; reaksiyon tamponu 4 µl, RNaz inhibitörü 0,5 µl, deoksinükleotit 10 nM 2 µl, DTT 1 µl, reverse transkriptaz 1,1 µl, son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları; 55°C de 30 dakika, 85°C de 5 dakika 1 siklus olarak gerçekleştirildi. Ardından reaksiyon sonunda örnekler -20°C de saklandı.

3.5 EGFR ve KRAS Mutasyon Analizi

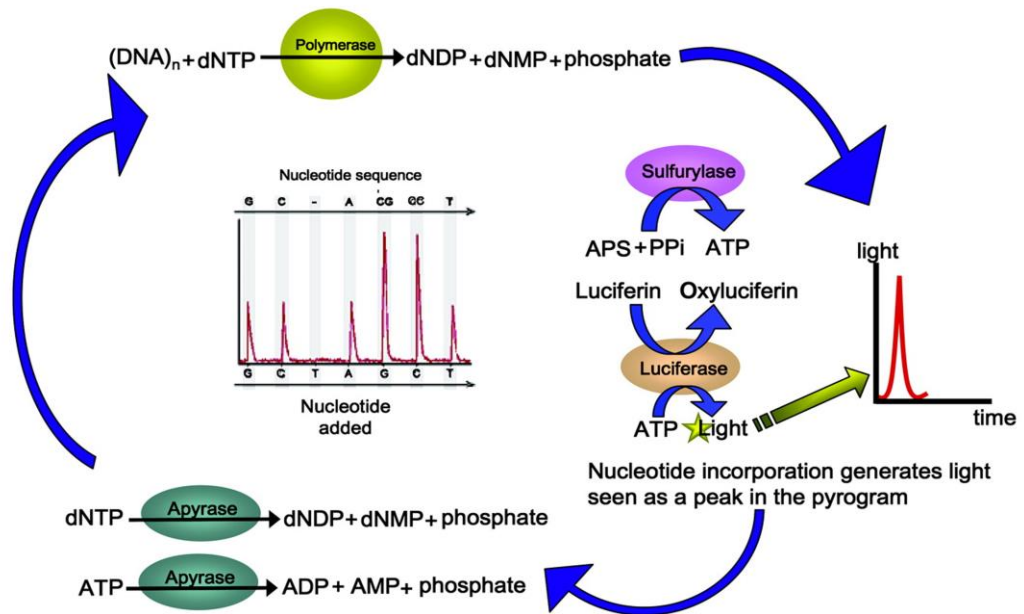
EGFR ve KRAS mutasyon analizi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Moleküler Onkoloji rutin laboratuvarında gerçekleştirildi. EGFR mutasyon analizi EGFR geninin 18-21 ekzonlarına, KRAS mutasyonları ise 12, 13 ve 61 kodonların da pyrosekans yöntemi ile gerçekleştirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 EGFR ve KRAS ekzonlarının wild tip ve mutant sekanslanan DNA dizileri

EKZON	DNA DİZİSİ (WT)	MUTANT
EGFR Ekzon 18 (kodon 719)	GGCTCCGGTG	G/A/T/CCTCCGGTG
EGFR Ekzon 19 (kodon 746-750)	TATCAAGGAATTAAGAGAAGC	TATCA-C
EGFR Ekzon 20 (kodon 768-790)	CAGCGT- ATCACGCA	CAG/TCGT- ATCAC/TGCA
EGFR Ekzon 21 (kodon 858-861)	CTGGCCAAACTGCTGGG	CT/AGGCCAAACT/A/GG
KRAS kodon 12	GGTGGCCTAGG	G/A/T/CG/A/T/CTGGC
KRAS kodon 13	GGT GGC CTAGG	GGT G/A/T/CG/A/T CCTA
KRAS kodon 61	TCCAG TTCTC	TCCAG A/T/CT/A/GTCTC

Pyrosequencing temel olarak DNA sentezi esnasında serbest kalan pirofosfat (PPi) tespit edilerek uygulanan sistemdir. 1977 yılında Sanger ve arkadaşlarının uyguladığı dideoksi tekniği elektroporetik bir sistem olarak güvenli olmasına rağmen yüksek

maliyet ve iş gücü gerektirir. Ayrıca PCR reaksiyonu sonucu toplam ürün miktarı az olduğunda sistem çalışmamaktadır. Daha sonra 1992 yılında Smith ve arkadaşları floresan temelli sekans yöntemini geliştirdiler. Bu yöntem elektroporetik olmayan bir floresan sistemidir. Sistemin temel mantığı, kalıp DNA ipliği üzerine sekans primerinin sentez edilmesi sırasında serbest kalan inorganik pirofosfatların ATP sülfirilaz enzimi ile ADP'nin ATP'ye dönüşümü bu esnada lusiferinin oksiferine dönüşümü ile oluşan ışığın okunması sonucunda diagram üzerine piklerin çıkması temeline dayanır (Novais vd 2011). Burada ayırt edici kriter, her reaksiyon için ayrı ayrı zamanlarda adenin, guanin, timin ve sitozin nükleotitleri ortama verilmektedir. Q24 (Qiagen Heidelberg, Almanya) sekans cihazında hangi nükleotit reaksiyon verir ve ışığa olursa sistem ilgili nükleotitin pikini vermektedir. Aynı zamanda sistemin daha hızlı çalışması için ortama substrat ilave edilmektedir. Sistemin kalibrasyon ayarı için enzim ve substrat bileşiği ölçümü başlangıçta vermektedir. Bu sonuç, sistemin çalışıp çalışmadığı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca ortamda reaksiyon sonrası yanlış pik vermemesi ve diğer reaksiyonu etkilememesi için apiraz enzimi ile nükleotit trifosfatları, mono ve di nükleotitfosfatlara (dNTP); ATP ise mono ve di fosfata parçalanmaktadır. Bu durumda yeni dNTP verildiğinde reaksiyon yeniden başlamaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Pyrosequencing çalışma prensibi (Novais and Thorstenson 2011)

Pyrosequencing sisteminde 15-30 ng DNA ile çalışmaktadır. Bu da çok düşük miktardaki DNA ile sonuç verebilmemizi sağlamaktadır. PCR reaksiyon şartları; pyromark PCR master mix 12,5 µl, PCR primer 1 µl (Tablo 3.1, Tablo 3.2) steril distile su 6,5 µl ve kalıp DNA 30 ng olacak şekilde son hacim 25 µl geçmemek şartıyla termalcykler'a kondu.

PCR protokolü; Denatürasyon 15 dk 95°C'de 1 döngü, annealing 20 sn 95°C-30 sn 53°C-20 sn 72°C 42 döngü ve son uzama 72°C 5 dk olarak uygulandı. Kullanılan PCR primeri 5' ucunda biotin olduğu için post-PCR işleminde streptavidin ile bağlanmasını sağlamaktadır.

Tablo 3.2 EGFR ve KRAS PCR primerleri

EKZON	Forward primer	Reverse primer
EGFR Ekzon 18 (kodon 719)	5' GGCACTGCTTTCCAGCATGGT-	5'- Biotin CCTGTGCCGGGAC
	3'	CTTAC-3'
EGFR Ekzon 19 (kodon 746-750)	5'- CATGTGGCACCATCTCACAAT-	5'-Biotin- CCCACACAGCAAAG
	3'	CAGAAACT-3'
EGFR Ekzon 20 (kodon 768-790)	5'-CTGGGCATCTGCCTCACCT - 3'	5'-Biotin- TGTGTTCCCGGACA TAGTCCA-3'
EGFR Ekzon 21 (kodon 858-861)	5'- GAATTCGGATGCAGAGCTTCTT -3'	5'-Biotin- CTTTCTCTTCCGCA CCCA-3'
KRAS kodon 12	5'- TCGTCCACAAAATGATTCTGA- 3'	5'- biotinTGACTGAATA TAAACTTGTGGTAG TTG-3'
KRAS kodon 61	5'- CAGACTGTGTTCTCCCTTCTCA- 3'	5'-biotin CTCATGTA CTGGTC CCTCATTG-3'

3.6 Pürifikasyon ve Sekans İşlemi

Steril 2 ml'lik plastik tüplere, Streptavidin 2 µl, bağlanma tamponu 40 µl ve steril distile su 28 µl ve PCR ürünlerinden 10 µl eklenir. Orbital shaker ile 10 dk streptavidinin çökmesi engellenerek, kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır. Ardından qiagen vakum sisteminde çektirilerek alkol-denatürasyon-yıkama kuyucuklarından geçirilerek plate içindeki sekans primerlerine bırakılır. Sekans primerleri ise 24,2 µl annealing tampon ve sekans primeri 0,8 µl (Tablo 3.1, Tablo 3.2) olacak şekilde konur. Plate 80°C ısı bloğunda 3 dk bekletilir. Q24 cihazına enzim, substrat ve dNTP konur. Ardından Q24 cihaza yerleştirilir ve sekans işlemi gerçekleştirilir.

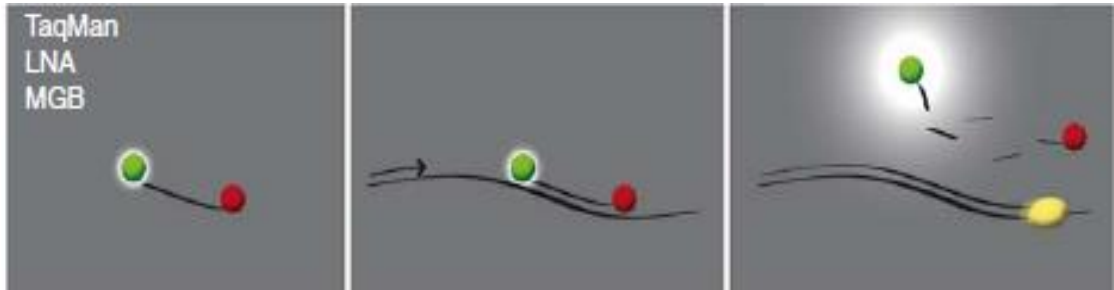
Tablo 3.3 EGFR ve KRAS sekans primerleri

EKZON	SEKANS PRİMERİ
EGFR Ekzon 18 (kodon 719)	5'- CAATGGCTCCGGTG-3'
EGFR Ekzon 19 (kodon 746-750)	5'-TAAAATTCCCGTTCGC-3'
EGFR Ekzon 20 (kodon 768-790)	5'-ACCGTGCAGCTCATCA-3'
EGFR Ekzon 21 (kodon 858-861)	5'-CATGTCAAGATCACAGATT-3'
KRAS kodon 12	5'-GCACTCTTGCCTACG-3'
KRAS kodon 61	5'-ATATTCTCGACACAGCAG-3'

3.7 Real-time PCR Analizi

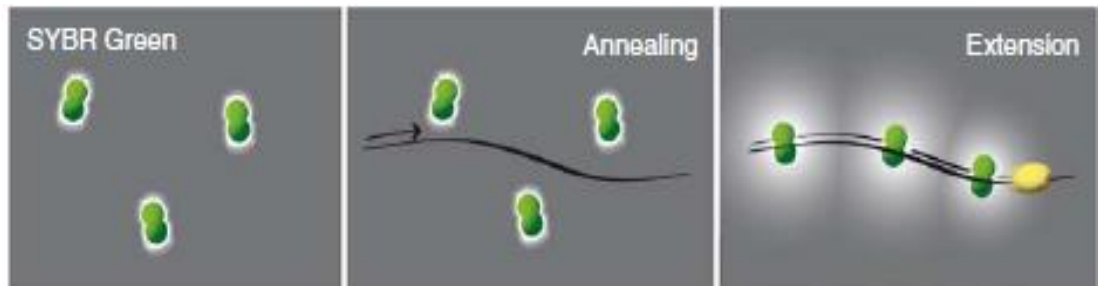
Real-time PCR analizi için taqman prob teknolojisine dayalı real-time sistemi kullanıldı. EGFR mutasyon analizi gerçekleştirilecek olan KHDAK tanılı hastaların parafine gömülü tümör dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen total RNA'nın ancak %5'i mRNA içermektedir. Total mRNA, cDNA izolasyon kiti ile cDNA'ya çevrildi. cDNA kiti; reaksiyon buffer 5 µl, deoksinükleotit mix 2 µl, random nanomer 5,2 µl, dtt 1,25 µl, reverse transkriptaz enzim 1 µl, RNase 0,5 µl ve kalıp mRNA 10 µl olacak steril 250 µl'lik plastik tüplere eklendi. Döngü ise 65°C'de 5 dakika, 0-4°C'de 5 dakika, 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde tek siklusta gerçekleştirildi. Sonuçta, ürün %1,2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntü alınarak kontrol edildi. Daha sonra elde edilen cDNA'lar için 7 gen, 7 ayrı prob ve internal kontrol için beta aktin kullanıldı. Diğer 7 genin ifadesi, beta aktin geninin ifadesi ile karşılaştırılıp değişim oranı saptandı. Kullanılan yedi gen; bax, p53, pten, fadd, tnfra, bcl-2 ve survivin'dir. Taqman prob teknolojisi hibridizasyon teknolojisi ile çalışmaktadır

(Şekil 2). Probun 5' ucunda yeşil ve 3' ucunda kırmızı FAM boyası bulunur. Tek iplikli cDNA'dan sentez başladığı anda erime eğrisi sıcaklığında önce yeşil FAM boyası sonra kırmızı FAM boyası ışığa verir. Bu veriler bilgisayar programında analiz edildi. Taqman probu hidroliz reaksiyonu ile sonuç verdi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Taqman prob çalışma prensibi (Gaspatic vd 2010)

Taqman prob teknolojisi haricinde ayrıca SYBR green teknolojisi vardır. Ancak SYBR green problemlerinin non-spesifik bağlanması dezavantajı olması nedeniyle tercih edilmedi. Tek FAM boyası kullanılması sistemin güvenilirliğini etkilemektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 SYBR green prob çalışma sistemi (Gaspatic vd 2010)

Prosedür; steril su 3 µl, mix (prob-primer(roche)) 0,5 µl, enzim (roche 2x) 5 µl, 1,5 µl cDNA son hacim 10 µl olacak şekilde reaksiyon kuruldu.

3.7.1 Reaksiyon Şartları

Denatürasyon; 95°C'de 10 dakika 1 siklus, ampifikasyon 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye 72°C'de 1 saniye 55 siklus, cooling 40°C'de 30 saniye okuma 72°C'de 540 nm de ROCHE LİGTHCYCLER 480 II cihazında ölçüldü.

Tablo 3.4 Real-time primerleri ve prob UPL numaraları

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	UPL prob(5'- FAM 3')
P53	AGGCCTTGGA ACTCAAGG AT	CCCTTTTTGGACTTCAGGT G	#36 cat.no. 04687949001
BCL2	AGTACCTGAACCGGCACC T	GCCGTACAGTTCCACAAAG G	#75, cat.no. 04688988001
BAX	ATGTTTTCTGACGGCAACT TC	TTGGATCCAGCCCAACAG	#69, cat.no. 04688686001
Fadd	GGTGGACCACAGGCATCT A	TCACAGTGCTGGGCTACCT T	#64, cat.no. 04688635001
Tnfr1	ACTTTGGTTGTTCCGTTGC T	AAACACACCCTGTCCATGC	#83, cat.no. 04689062001
Survivin	TTAACCCCTTGGTGAATTTT TGAA	TGTTGGTTTCCTTTGCAATT T	#142, cat.no. 04694287001
PTEN	GAAAGGGTGGAGCGGATT A	GATTTCTGCTGAAGTCCAT CTTTT	#2, cat.no. 04684982001
Beta aktin	CGACAGGATGCAGAAGGA G	AGGAGGAGCAATGATCTTG ATCT	#37, cat.no. 04687957001

3.8 İstatistiksel Analiz

Hastaların demografik özellikleri EGFR-KRAS mutasyonları ile Ki-kare testi ile incelenmiş olup, sağkalım analizleri için Kaplan-Meier testi kullanılmıştır. Real-time pqr sonuçlarının analizleri t testi ile incelenmiştir. Anlamlılık düzeyi p=0.05 olarak alınmıştır. Tüm analizler için Windows 7.0 işletim sisteminde SPSS 17.0 paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Hasta Klinopatolojik Özellikleri

Çalışma kapsamında 2011-2014 tarihleri arasında Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'na preparatları gönderilen 300 KHDAK tanılı hasta yer almaktadır. Bu hastaların 62'si bayan (%20.7) 238'i erkek (%79.3), 62'si skuamöz tip (%20.7) KHDAK iken 228'i adenokarsinoma (%76) 10 hasta diğer alt tiplerdendir (%3.3), hastaların yaş medyan ve ortalama değeri 62.5 olduğu için hastalar >62 ve ≤62 olarak ikiye ayrılmıştır. Buna göre 152 hasta >62 (%50.7) ≤62 ise 148 (%49.3) olarak saptanmıştır. Üçyüz hastanın 233'ü sigara içerken (%74.3) 77 hasta sigara içmemektedir (%25.7), 70 hasta erken evre (I-3A) (%23.3) 230 hasta ileri evre (3B-4) (%76.7), bu hastaların evre 1 4 hasta, evre 2 13 hasta, evre 3A 54 hasta, evre 3B 27 hasta ve evre 4 202 hastadır. Tüm parametreler tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Hastaların Demografik özellikler

Klinik özelliği	Alt grup	Hasta sayısı (n=300)
Yaş	≤62	148 (%49.3)
	>62	152 (%50.7)
Cinsiyet	Erkek	238 (%79.3)
	Kadın	62 (%20.7)
Sigara durumu	İçen	233 (%74.3)
	İçmeyen	77 (% 25.7)
Alt tip	adeno	228 (% 76)
	Skuamöz	62 (% 20.7)
	Diğer	10 (%3.3)
Evre	Erken evre (I-II-III A)	70 (% 23.3)
	İleri evre (IIIB-IV)	230 (% 76.7)

4.2 EGFR Mutasyon Profilleri

Üçyüz hastanın 203'ü (%67.7) EGFR mutasyonuna sahip değilken 97 hasta ise EGFR mutasyonuna (%32.3) sahiptir. EGFR mutasyonuna sahip hastaların 97 hastanın, 30'si bayan (%48.3), 67'i erkek (%28.2), 13'ü skuamöz tip (%21) iken 77'si adenokarsinoma (%33.7) 7 hasta diğer alt tiplerdendir (%70), 50 hasta >62 (%32.8) ≤62 ise 47 (%31.7), 59'u sigara içerken (%26.4) 38 hasta sigara içmemektedir (%49.3), 18 hasta erken evre (1-3A) (%25.7) 79 hasta ileri evre (3B-4) (%34.3) olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). Yapılan ki-kare testine cinsiyet, alttip ve sigara durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. EGFR mutasyonları kadın, adenokarsinoma ve sigara içmeyen hastalarda daha sık görülmektedir. İstatistiksel olarak p değerleri tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 EGFR sekans analizinin ki-kare testi sonuçları

Klinik özelliği	P değeri
Yaş	0.465
Cinsiyet	0.002
Sigara durumu	0.000
Alt tip	0.004
Evre	0.113
Performans	0.519

EGFR mutasyon tipleri ise 300 hastanın 39'unda delE746-A750 (%36.4), 29'unda L861Q (%18.5), 10'unda L747-T751 ins P (%12.3), 10'unda L858R (%9.8), 9'unda G719A (%9.8), 5'inde del E746-T751 ins P, 3'ünde T790M (%3.6), 3'ünde G719S (%3.6), 3'ünde del E746-A750 ins I, 3'ünde L747-P753 ins S, 1'inde delE746-A750 IP (%1.2), 1'inde G719C (%1.2), 1'inde L747-T751 ins Q tespit edilmiştir (Tablo 4.3)

Tablo 4.3 EGFR mutasyon tipleri

Mutasyon tipi	Ekzon	Nükleotit no ve sekans	Amino asit değişimi	Mutasyonlar arasında % oranı
Nokta mutasyonu	18	2155 G>T	G719C	1 (%0.8)
Nokta mutasyonu	18	2134 G>A	G719S	3 (%2.5)
Nokta mutasyonu	18	2155 G>A	G719A	9(%7.6)
Delesyon	19	2235–2249 del GGAATTAAGAGAAGC	delE746–A750	39(%33.4)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2252 del GGAATTAAGAGAAGC insCA	L747-T751 ins P	10(%8.5)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2252 del GGAATTAAGAGAAGC insAAT	delE746-T751insl	5 (%4.2)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2258 del GGAATTAAGAGAAGC insAATCCA	delE746-A750 IP	1(%0.8)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2249 del GGAATTAAGAGAAGC insAGA	delL747-P753 S	3(%2.5)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2258 del GGAATTAAGAGAAGC insAAT	delE746-A750 ins I	3(%2.5)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2258 del GGAATTAAGAGAAGC insCCA	delA746-A750 ins P	1(%0.8)
Delesyon ve insersiyon	19	2235–2258 del GGAATTAAGAGAAGC insCAA	delL747-T751 ins Q	1(%0.8)
Nokta mutasyonu	20	2369 C>T	T790M	3(%2.5)
Nokta mutasyonu	21	2573 T>G	L858R	10(%8.5)
Nokta mutasyonu	21	2582 T>A	L861Q	29(%24.6)

4.3 KRAS Mutasyon Profilleri

Üçyüz hastanın 225'i (%75) KRAS mutasyonuna sahip değilken 75 hasta ise KRAS mutasyonuna (%25) sahiptir. KRAS mutasyonuna sahip 75 hastanın 12'si bayan (%19.3) 63'i erkek (%26.4), 18'i skuamöz tip (%29) KHDAK iken 55'i adenokarsinoma (%24.1) 2 hasta diğer alt tiplerdendir (%20), 32 hasta >62 (%21) ≤62 ise 43 (%29), 58'u sigara içerken (%26) 17 hasta sigara içmemektedir (%22), 16 hasta erken evre (1-3A) (%22.8) 59 hasta ileri evre (3B-4) (%25.6) olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). Yapılan ki-kare testinde KRAS mutasyonu taşıyan hastaların mutasyonu taşımayan hastalara göre demografik özellikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

KRAS mutasyon tipleri ise 300 hastanın 32'sinde G12V (%6.6),10'unda G12S (%22.3), 8'inde G12C (%17.8), 6'sında G12D (%13.3), 18'inde Q61R (%15.5), 15'inde Q61H (%22.3), 1'inde G12A (%2.2), 1'inde G13D tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 KRAS mutasyon tipleri

Mutasyon tipi	Kodon	Nükleotit no ve sekans	Amino asit değişimi	Mutasyonlar arasında % oranı
Nokta mutasyonu	12	34 G>A	G12S	10(%12.7)
Nokta mutasyonu	12	34 G>T	G12C	8(%10.1)
Nokta mutasyonu	12	35 G>A	G12D	6(%7.6)
Nokta mutasyonu	12	35 G>T	G12V	20 (%25.2)
Nokta mutasyonu	12	35 G>A	G12A	1(%1.3)
Nokta mutasyonu	13	37 G>A	G13D	1 (%1.3)
Nokta mutasyonu	61	183 A>C	Q61H	15 (%19)
Nokta mutasyonu	61	182 A>G	Q61R	18(%22.8)

Üçyüz hastada hem EGFR hem de KRAS mutasyonun ikisini birden sahip 20 hasta (%6.7) tespit edilmiştir. Bu 20 hastanın 4'ü bayan (%6.5) 16'sı (%6.7) erkek, 2'si skuamöz (%3.2) 16'sı adenokarsinom (% 7) 2'si (% 20) diğer alt tiplerden, 2'si erken evre (%2.5) iken 18'i ileri evredir (%7.8), 7'si ≤62 yaş grubunda (% 4.6) 13'ü >62 yaş

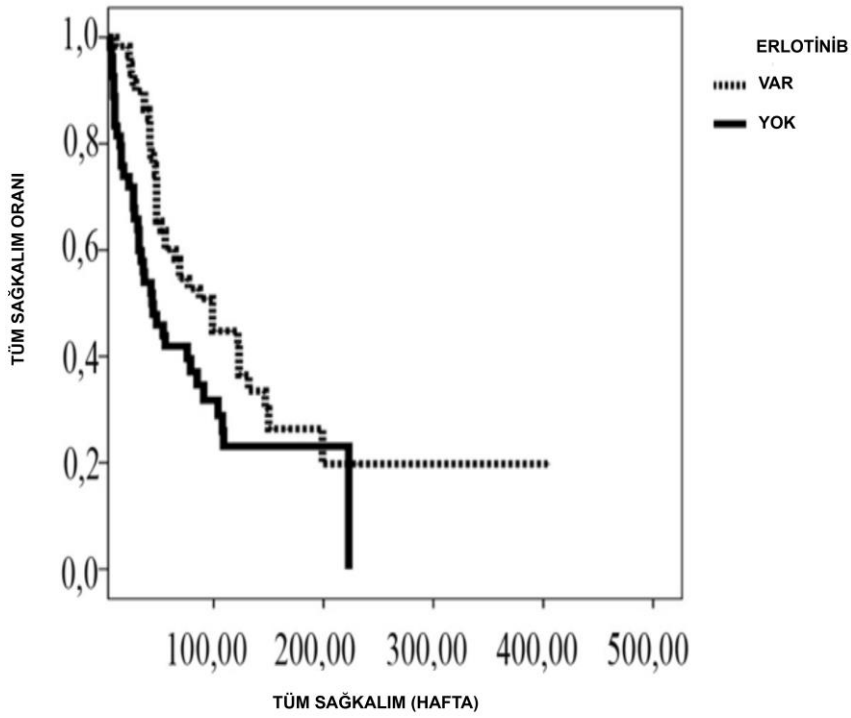
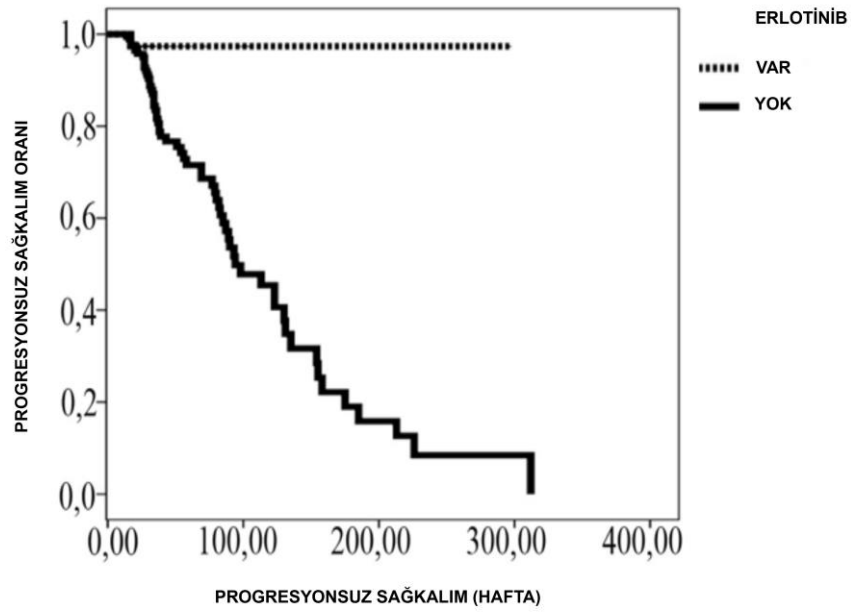
grubunda (% 8.8), 11'i sigara içmeyenlerin (%5) grupta yer alırken 9'u sigara içen grupta (%11.6) yer almaktadır (Tablo 4.5). İstatistiksel analize göre sadece sigara içenlerde içmeyenlere göre EGFR ve KRAS birlikte mutasyonu daha fazla görülmektedir ($P<0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.5 Tüm hastaların EGFR-KRAS mutasyon profilleri

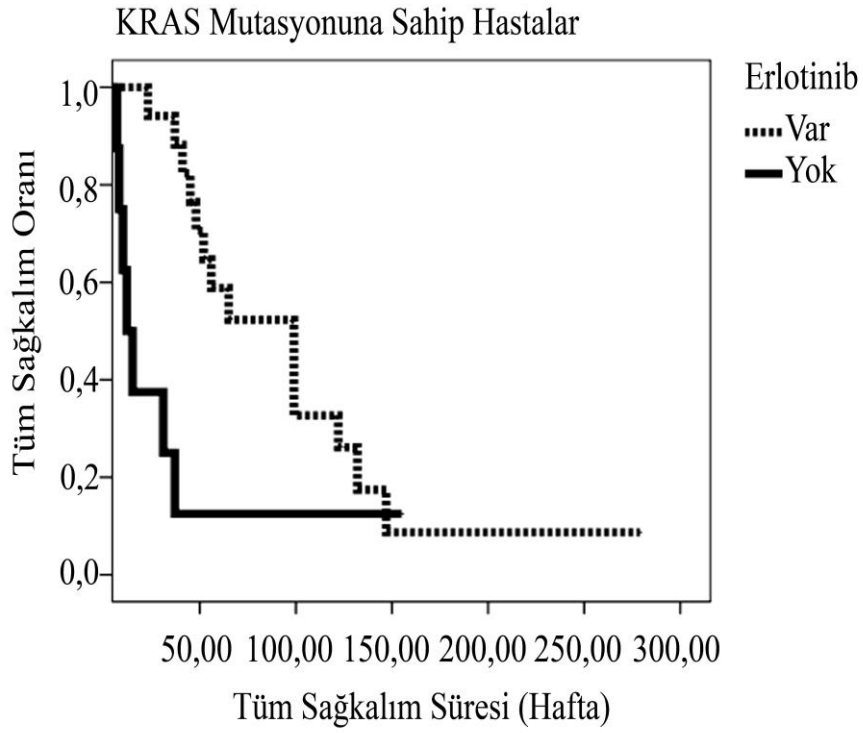
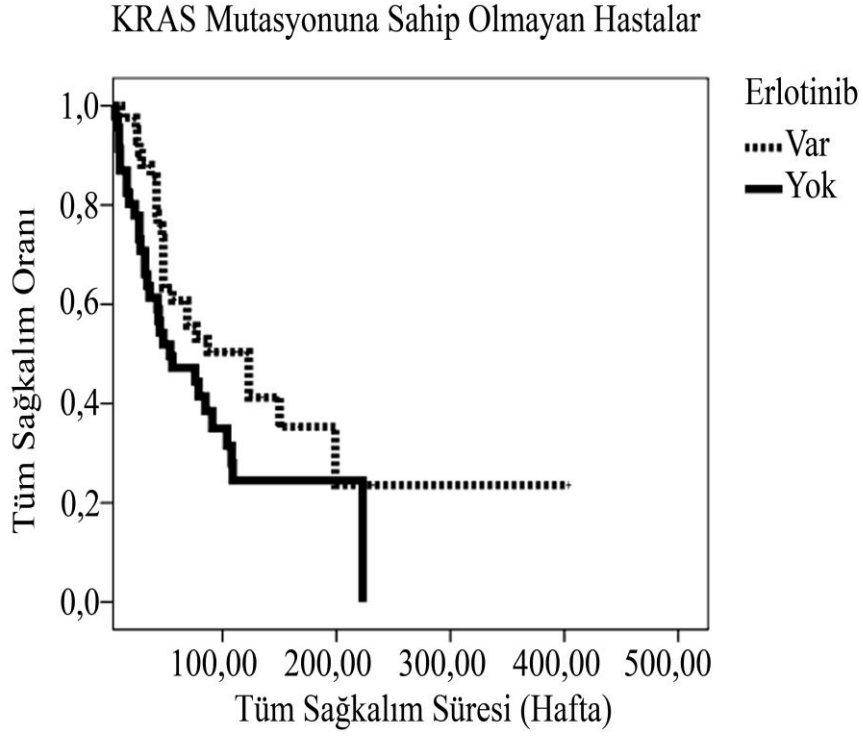
Klinik özelliği	Alt grup	Hasta sayısı (n=300)	EGFR mutasyon (%36)		KRAS mutasyonu (%20.8)		EGFR-KRAS mutasyonu (%6.6)	
			(+)(n=97)	(-)(n=203)	(+) (n=75)	(-) (n=225)	(+) (n=20)	(-) (n=280)
Yaş	≤62	152	50 (%32.9)	102 (%67.1)	32 (%21.1)	120 (%78.9)	7 (%4.6)	145 (%95.4)
	>62	148	47 (%31.8)	101 (%68.2)	43 (%29.1)	105 (%70.9)	13 (%8.8)	135 (%91.2)
Cinsiyet	Erkek	238	67 (%28.2)	171 (%71.8)	63 (%26.5)	175 (%73.5)	16 (%6.7)	222 (%93.3)
	Kadın	62	30 (%48.3)	32 (%51.7)	12 (%19.4)	50 (%80.6)	4 (%6.5)	58 (%93.5)
Sigara durumu	İçen	223	59 (%26.5)	164 (%73.5)	58 (%26)	165 (%74)	11 (%4.9)	212 (%95.1)
	İçmeyen	77	38 (%49.4)	39 (%50.6)	17 (%22)	60 (%78)	9 (%11.6)	68 (%88.4)
Alt tip	adeno	228	77 (%33.7)	151 (%66.3)	55(%24.1)	173 (%75.9)	16 (%7)	212 (%93)
	Skvamöz	62	13(%21)	49 (%79)	18 (%29)	44 (%71)	2 (%3.2)	60 (%96.8)
	Diğer	10	7 (%70)	3 (%30)	2 (%20)	8 (%80)	2 (%20)	8 (%80)
Evre								
	Erken evre (I-II-III A)	70	18 (%25.7)	52 (%74.3)	16 (%22.8)	54 (%77.2)	2 (%2.8)	68 (%97.2)
	İleri evre (IIIB-IV)	230	79 (%34.3)	151 (%65.7)	59 (%25.6)	171 (%74.4)	18 (%7.8)	212 (%92.2)

4.4 EGFR-KRAS Mutasyonlarının Sağkalım ile İlişkisi

EGFR mutasyonunu taşıyan 97 hastanın 59'u (%61) tirozin kinaz inhibitörü (EGFR-TKI) erlotinib tedavisi uygulanmıştır. Bu hastalardan sağkalım oranı EGFR-TKI tedavisi alan hastaların almayanlara göre tüm sağkalımı oranı istatistiksel olarak anlamlıdır (146 ± 22 , 84 ± 12 (hafta) $p=0.020$) (Şekil 4.1). Ayrıca EGFR mutasyonuna sahip 97 hastanın aynı zamanda 20'si KRAS mutasyonuna da sahiptir. EGFR-TKI tedavisi alan 59 hastanın tedavi almayan 38 hastaya göre KRAS mutasyonuna sahip olmayıp tedavi alan 39 hasta diğer hastalara göre tüm sağkalım oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. EGFR mutasyonuna sahip 97 hastanın KRAS mutasyonuna sahip olmayan 77 hastadan erlotinib tedavisi alan hastalar 161 ± 30 hafta, erlotinib tedavisi almayan hastalar ise 90 ± 13 hafta, KRAS mutasyonuna sahip 20 hastadan erlotinib tedavisi alan hastalar 98 ± 16 hafta, erlotinib tedavisi almayan hastalar 34 ± 16 hafta olarak bulunmuştur ($p=0.007$) (Şekil 4.2). EGFR-TKI tedavisi alan hastaların progresyonsuz sağkalım üzerine ise etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (EGFR-TKI tedavisi alanlar 288 ± 11 , almayanlar 119 ± 11 (hafta) ($p=0.004$) (Şekil 4.1). Ayrıca erlotinib tedavisini alanları çıkardığımızda 241 hastadan EGFR mutasyonu sahip olan ve olmayan hastaların tüm sağkalımı oranı ve progresyonsuz sağkalım oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (EGFR mutasyonu olan hastalar tüm sağkalım 126 ± 11 , olmayanlar 121 ± 9 (hafta) $p=0.266$, progresyonsuz sağkalım EGFR mutasyonu olan hastalar 32 ± 5 , olmayan hastalar 33 ± 3 (hafta) $p=0.755$). 241 hastadan KRAS mutasyonu sahip hastaların tüm sağkalım üzerine etkisi anlamlı iken (KRAS mutasyonuna sahip olanlar 100 ± 14 , olmayanlar 131 ± 11 (hafta) $p=0.038$) ve progresyonsuz sağkalım üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (KRAS mutasyonuna sahip olanlar 31 ± 5 , olmayanlar 33 ± 3 (hafta) $p=0.807$). EGFR-KRAS mutasyonuna sahip hastaların tüm sağkalım ve progresyonsuz sağkalım hem de EGFR-TKI tedavisi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (sırasıyla $p=0,405$, $p=0,069$).



Şekil 4.1 EGFR mutasyonuna sahip hastalardan erlotinib tedavisi alan ve almayan hastaların sağkalım grafiği ($p=0.004$, $p=0.020$)



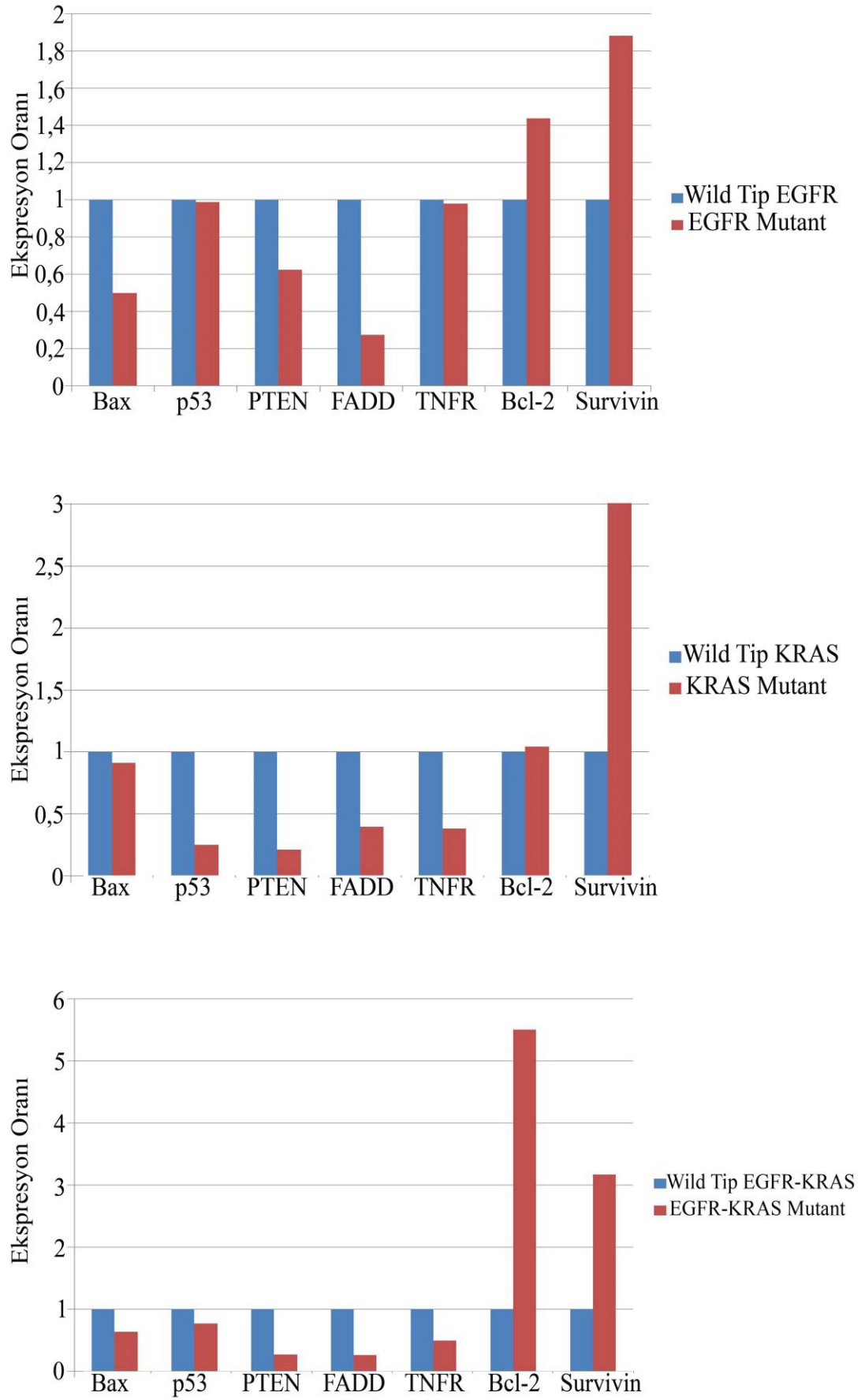
Şekil 4.2 EGFR mutasyonuna sahip olup erlotinib tedavisi alan hastaların KRAS mutasyonuna sahip hastaların sağkalım grafiği ($p=0,007$)

4.5 EGFR-KRAS Mutasyonlarının Apoptotik ve Anti-apoptotik Genler ile İlişkisi

Üç yüz hastanın biyopsi/ameliyat materyallerinden total RNA elde edilerek yapılan çalışmada apoptotik bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri ile anti apoptotik bcl2 ve survivin ifadeleri ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır. Sonuçlar rezekte ameliyat materyalindeki tümör olmayan akciğer dokusunun ekspresyon seviyelerini ile tümör hücrelerinde ki ekspresyonlar seviyelerine oranlanarak t testi yapılmıştır. Yapılan analizde EGFR, KRAS ve EGFR-KRAS mutasyonuna sahip hastaların bu mutasyona sahip olmayan hastalara oranla bax, p53, PTEN, FADD, TNFR, bcl2 ve survivin ifadelerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.6). Bu çalışma sonucunda gen ifadelerinin gruplar arasında ki değişimini belirlemek için oranlama (fold) analizi yapılmıştır. Bu analize göre; EGFR mutasyonuna sahip hastaların bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri azalırken bcl2 ve survivin ifadeleri artmaktadır (sırası ile 0.5, 0.98, 0.62, 0.27, 0.98, 1.43, 1.88) (Şekil 4.3). KRAS mutasyonunda apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (sırası ile 0.91, 0.24, 0.21, 0.39, 0.38, 1.04, 3.00) (Şekil 4.3). EGFR-KRAS mutasyonunda da apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (0.63, 0.76, 0.26, 0.25, 0.49, 5.51, 3.17) (Şekil 4.3).

Tablo 4.6 Real-time sonuçlarının t testi analizi

	EGFR	KRAS	EGFR-KRAS
BAX	0.002	0.003	0.001
p53	0.000	0.000	0.000
PTEN	0.000	0.000	0.000
FADD	0.000	0.000	0.000
TNRF1	0.002	0.002	0.000
Bcl-2	0.001	0.001	0.001
Survivin	0.000	0.000	0.000



Şekil 4.3 Real time pcr sonuçlarının kat analizi

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, kanser görülme sıklığına göre üçüncü sırada yer alırken kanser nedenli ölümler sıralamasında ilk sırada yer almaktadır (Rebecca Siegel vd 2012). Bu durumun en önemli nedeni ise akciğer kanserleri erken evre de herhangi bir klinik belirti vermemesidir. Hastaların şikayeti olan öksürük, genel olarak basit bir enfeksiyon olarak değerlendirilip hastanelere başvurmaması sonucu tümör dokusunun ilerlemesine neden olmaktadır. Bu yüzden klinikte birçok hastaya ileri evre akciğer kanseri olarak tanı konulmaktadır. Bu durum sağkalıma da yansımaktadır. 5 yıllık sağkalımı %15'tir (Jian-Miny Yany vd 2005). Cerrahi müdahale, kemoterapiye ve radyoterapiye rağmen sağ kalımın düşüklüğü araştırmacıları hedefe yönelik tedaviye yöneltmiştir. Küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarında EGFR mutasyonu taşıyan hastalar için EGFR-tirozin kinaz inhibitörü (erlotinib veya gefitinib) üretilmiştir (Barbara Melonsky vd 2014). Ülkemizde erlotinib sağlık bakanlığı tarafından onaylı tek EGFR-TKI'dir. Ayrıca KRAS mutasyonları klinikte hem progresyona hem de EGFR-TKI'ne karşı direnç olduğu rapor edilmiştir (Cox ve Der 2010). Bu sebeple EGFR mutasyonlarının ve KRAS mutasyonlarının KHDAK hastalarında araştırılması ve bu mutasyonları taşıyan hastaların erlotinib'e verdikleri yanıtın sağkalım ile ilişkisinin Türk toplumunda belirlenmesi oldukça önemlidir. Biz bu çalışmamızda EGFR mutasyonları ile KRAS mutasyonlarının ilişkisini KHDAK tanılı 300 hastada araştırdık. Bu mutasyonlara sahip hastaların TKI'lerden erlotinib'e verdikleri yanıtı göstermeyi planladık.

Bizim çalışmamızda EGFR ve KRAS mutasyonlarının tespiti için pyrosequencing sekans sistemi kullanılmıştır. 1977 yılında Sanger ve Maxam-Gilbert tarafından rapor edilen terminal sekanslama yöntemi olan dideoksi sekans sistemi uzun yıllar kullanılmıştır (Harrington vd 2013). Dideoksi sekanslama sistemi; PZR işlemi için yüksek konsantrasyonlu DNA gerektirmektedir, PZR işlemi sonrası sistem ikinci bir kit ile yıkama (clean-up) işlemi yapılması gerekmektedir, işlem 800 baz çiftine kadar okuma gerçekleştirmektedir, elektroporetik bir sistemdir (Harrington vd 2013, Ahmadian vd 2006, Ronaghi 2015). Bunun yanı sıra pyrosequencing sistem real-time tabanlı PZR reaksiyonuna sahiptir. Ayrıca PZR ürünleri 100-400 baz çifti

uzunluğa sahiptir, çok az DNA ile dahi ürün elde edilmektedir. Sistem non-elektroporetik olduğu için maliyeti daha düşüktür. Sistemde biyotin kaplı primerlerin magnetik toplara bağlanması ve streptavidinin biyotin ile bağlanması sekans işleminin gerçekleşmesi temeline dayalıdır. Ayrıca okuma işlemi sırasında luciferinin oksilusiferine dönüşü ile diagram oluşması sonucu sekans pikleri oluşmaktadır (Harrington vd 2013, Ahmadian vd 2006, Ronaghi 2015). Ayrıca Akça vd (2013) yılında yayınladığı rapora göre dideoksi sekans işlemi EGFR mutasyon analizinde 100 ng DNA ile pozitif sonuç verirken 10 ng ve 1 ng ile yapılan sekanslarda mutasyonu yakalayamadığını göstermişler, aynı örnekler pyrosequencing sistem ile sekans analizi gerçekleştirildiğinde 10 ng ve 1 ng DNA miktarında dahi EGFR mutasyonu saptanmıştır. Dolayısıyla pyrosequencing klasik sekans yöntemine göre EGFR mutasyonunu tespit etmekte daha güvenilir ve daha güçlü bir yöntemdir. Bizim çalışmamızda da birçok hasta örneğinin biopsi materyali olması nedeniyle toplam DNA konsantrasyonları 7-80 ng/μl olarak analiz edilmiştir. Bunun sonucunda sekans işlemi için pyrosequencing sistemi tercih edilmiştir.

Küçük hücre dışı akciğer kanserli hastaların ortalama % 50'sini adenokarsinoma, %37.5'ini skuamöz, %12.5'ini diğer alt tipleri oluşturmaktadır. Çalışmadaki 300 hasta grubunda ise %76 adenokarsinoma, %20.7 skuamöz, %3.3 diğer alt tipler oluşturmaktadır. Çalışma grubumuzda adenokarsinomaların, diğer gruplardan daha sık görülme nedeni çalışma esnasında sadece bir alt tip olarak adenokarsinoma hastalarının alınmasıdır. Fakat daha sonradan grup genişletilerek tüm KHDAK tanılı hastalar olarak değişmesi nedeniyle diğer alt tipler ortalamanın altında kalmıştır. Türkiye' den yapılan EGFR mutasyon analizi çalışmalarında Unal vd (2013) adenokarsinoma %66, skuamöz %14.5, diğer 19.5 olarak, Akça vd (2013) adenokarsinoma %81.1, skuamöz %18.9 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalar da göstermiştir ki Türkiye'de adenokarsinoma diğer alt tiplere oranla daha fazla görülmektedir. Bu bizim sonuçlarımız ile uyumludur (Tablo 4.5).

Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli hastalarının uzak doğu toplumlarında %54-65'i erkek iken %35-46'sı kadın olarak rapor edilmiş (Chang vd 2009), İngiltere'de ise %55'i erkek, %45'i kadın olarak rapor edilmiştir (web1), Amerika'da %58'si erkek, %42'si kadın olarak rapor edilmiştir (web2). Türkiye'den yapılan çalışmalarda Unal vd (2013) %85'i erkek,%15'i kadın Akca vd (2013) %75'i erkek , %25'i kadın olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda %79 erkek, %21 kadın olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımız daha önce Türkiye'den rapor edilmiş sonuçlar ile uyum göstermekte ve ayrıca Uzak Doğu istatistik verilerine yakınlık göstermektedir (Tablo 4.5).

Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri hastalarının mutasyon çalışmalarında oluşturulan gruplarda ileri evre (3B-4) oranı erken evre ye (1-3A) daha fazla veya eşit olduğu rapor edilmiştir (Arriete vd 2013, Chougule vd 2013, Jang vd 2009, Wang vd 2014, web 1 , web 2). Türkiye’den yapılan çalışmalarda Akca vd (2013) erken evre ile ileri evre sayıları eşit iken, Unal vd (2013) çalışmasında %92 oranında evre 4 yer almıştır. Bizim çalışmamız da ise ileri evre % 76 iken erken evre %24 olarak saptanmıştır. Evrelerin kendi içerisinde ki dağılımı ise evre 1 %1.3, evre 2 %4.2, evre 3A %17.6, evre 3B %8.8 evre 4 %68’dir. Akciğer kanser tanısına sahip hastaların tanı anındaki evreleri ileri evre olması dolayısıyla evre 4 hasta sayısının çok olması beklenen bir durumdur.

KHDAK hasta çalışmalarında yaş ortalamaları genel olarak 60-65 arasındadır (Arriete vd 2013, Chougule vd 2013, Jang vd 2009, Wang vd 2014, web 1, web 2). Bizim çalışmamızda yaş ortalaması 62 olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). Bu grup içinde frekans dağılımı ise 30-39 yaş arası %1.3, 40-49 yaş arası %7.9, 50-59 yaş arası %30.9, 60-69 yaş arası %35.2, 70-79 yaş arası %20, 80-89 %4.7’dir. Amerika, Avrupa ve Uzak Doğu verilerinde özellikle 60-69 yaş gruplarında yığılma olurken Latin Amerika’nın ve Hindistan’ın verileri bizim grubumuz ile uyum göstermektedir (Arriete vd 2013, Chougule vd 2013, Jang vd 2009, Wang vd 2014, web 1, web 2). Bu durumun ortaya çıkmasında gelişmekte olan ülkelerin tüm sağkalımı üzerine etkisi, sağlık hizmetlerin ulaşması ve bireylerin kendi sağlık taramalarındaki bilinç ile alakalı olduğunu düşündürmektedir.

KHDAK tanılı hastalarda EGFR mutasyon sıklığı coğrafi bölgelere göre değişim göstermektedir. Japonya, Çin, Güney Kore, Vietnam bulunduğu Doğu Asya EGFR mutasyon sıklığı %36.4 ile %66.3 arasında değişmektedir. Ancak Amerika’da bu sayı %6-24 iken Avrupa’da %6-16 arasındadır (Smiths vd 2012). Latin Amerika’da ise %19 Arjantin, %31 Meksika, %24 Klombiya, %67 Peru, %27,3 Panama, %31 Costa Rika yer almaktadır (Arrieta vd 2014). Ayrıca Hindistanda %33,2 Afrika kökenli Amerikalılarda %15-20, Avustralya’da %1-4 olarak tespit edilmiştir (Arrieta vd 2014). Unal vd (2013) EGFR mutasyon sıklığı Türkiye’de %42 bulurken Akça vd (2013) Türkiye’de %48 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda bu oran % 36 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Diğer iki Türk popülasyonu çalışması sayısının azlığı ve adekarsinom alt grubun çokluğu mutasyon oranını etkilemektedir. Türkiye’den EGFR mutasyonları ile ilgili yayınlanan çalışmalarda Unal vd (2013) 48 hasta ve Akça vd (2013) 52 hastada çalışmalar yaptıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca yüzde oranında bu çalışmalar bizim çalışmamızdan daha fazla adenokarsinom

içermektedir. Bu durum EGFR mutasyon sıklığı ile ilgili sonuçları etkilemektedir. Ancak her üç sonuçta Türk popülasyonunun Doğu Asya ile benzerliği gösterdiği aşikardır. Avrupa'nın mutasyon oranı Türk popülasyonuna göre daha az mutasyon taşımaktadır. Literatürde Unal vd (2013) ve Akça vd (2013) çalışmalarında sırasıyla 48 ve 52 hasta verisine dayanılarak yazılmıştır. Ancak bizim çalışmamız 300 hasta verisi ile genel popülasyonu daha iyi yansıtmaktadır. Popülasyon çalışmalarında veri sayısı ne kadar çok ise o kadar gerçek popülasyona uygun dağılımı yansıtmaktadır. Veri sayısı ne kadar az ise ortaya çıkan yeni mutasyonlar ve dağılım yığılma yapar. Unal vd (2013) çalışmasında 18 hasta mutasyonlu ve bunlardan 9 hasta ekzon 20 mutasyonu taşıdığı belirtilmiş ancak genel EGFR mutasyon tablosunda hiçbir popülasyonda bu kadar çok ekzon 20 mutasyonuna rastlanmamaktadır. Bu durum ile karşılaşılmaması için popülasyon çalışmalarında hasta sayılarının fazla olması genel literatür açısından daha sağlıklı sonuçlar vermektedir. Bu yüzden bizim hasta sayımız genel popülasyon yansıması açısından güvenilirliği yüksektir.

EGFR mutasyon tipleri olarak bakıldığında iki gruba ayrılmaktadır. Ekzon 19 delesyon mutasyonları ve ekzon 18, 20, 21 nokta mutasyonları. Bu iki grup arasında mutasyonun sık izlendiği Doğu Asya popülasyonunda genel mutasyonların %40-80 arasını kapsamaktadır (Chang vd 2009). Ancak buna karşın Avrupa, Amerika, Latin Amerika'da nokta mutasyonları %60-80 arasındadır (Arrieta vd 2014). Türkiye çalışmalarına bakarsak Unal vd (2013) iki grup birbirine yakın iken Akça vd (2013) delesyon mutasyonları %75 oranındadır. Bizim çalışma sonuçlarımız ise; EGFR mutasyon tipleri ise 300 hastanın 39'unda delE746-A750 (%36.4), 29'unda L861Q (%18.5), 10'unda L747-T751 ins P (%12.3), 10'unda L858R (%9.8), 9'unda G719A (%9.8), 5'inde del E746-T751 ins P, 3'ünde T790M (%3.6), 3'ünde G719S (%3.6), 3'ünde del E746-A750 ins I, 3'ünde L747-P753 ins S, 1'inde delE746-A750 IP (%1.2), 1'inde G719C (%1.2), 1'inde L747-T751 ins Q tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Burada delesyon mutasyonu taşıyan hastalar %54 iken nokta mutasyonuna sahip olanlar %46'dır. Bu durum bizim Ülkemizin delesyon mutasyonları profili ile Doğu Asya'ya, nokta mutasyonları ile Avrupa'ya benzediğini göstermektedir. Özellikle Avrupa, Amerika, Avustralya'da çok nadir görülen insersiyon delesyon veya delesyon mutasyonlarının Ülkemizde yüksek görülmesi Bizim popülasyonumuzun Doğu Asya'ya benzerliğini ortaya koymaktadır. Bunun yanında ekzon 21 ve ekzon 18 mutasyonları yönüyle Doğu Asya'da daha az görülürken bizim Ülkemizde Avrupa popülasyonuna yakın görülmektedir. Bunun nedenleri arasında Ülkemizin yüzyıllar boyu göç alması ve Asya-Avrupa kıtalarının arasında yer düşünülebilir.

EGFR mutasyonların klinikopatolojik özellikler bakımından incelediğimizde mutasyonları tüm KHDAK alttip olarak adenokarsino tanılı hastalarda daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (Chang vd 2009, Arrieta vd 2014, Smiths vd 2012). Türk popülasyon çalışmalarında da adenokarsinom tanılı hastalarda daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (Ünal vd 2013, Akca vd 2013). Bizim çalışmamızda da adenokarsinoma alt tip hastalar %33.7 iken squamöz alt tip %21 diğerleri %70 dir (Tablo 4.5). KHDAK alttip olarak diğerleri grubunun yüksek çıkması miks tip olmaları nedeniyledir. Bizim çalışmamızda da adenokarsinoma tanılı hastaların istatistiksel olarak squamöze göre anlamlı bulunmuştur. EGFR mutasyonun cinsiyete göre yayımlanan tüm raporlarda kadın hastaların, erkek hastalara oranla daha yüksek mutasyon oranına sahip oldukları rapor edilmiştir (Chang vd 2009, Arrieta vd 2014, Smiths vd 2012). Türkiye'den yapılan çalışmalarda da bizim sonuçlarımızı destekleyen veriler yayınlanmıştır (Ünal vd 2013, Akca vd 2013). Bizim çalışmamızda EGFR mutasyonuna sahip kadın hastalar % 48 iken erkek hastalar %28'dir (Tablo 4.5). Yapılan istatistiksel analiz sonuçların da anlamlı bulunmuştur. Sigara alışkanlığı olarak incelendiği zaman EGFR mutasyonu sigara içmeyen hastalarda daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir (Chang vd 2009, Arrieta vd 2014, Smiths vd 2012). Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarda bu durum benzerdir (Ünal vd 2013, Akca vd 2013). Bizim sonuçlarımızda ise sigara içmeyen hastalar %49 iken içen hastalar %28'dir (Tablo 4.5). Bu sonuçta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürde EGFR mutasyonları beyaz Asyalı, kadın ve sigara içmeyen hastalarda daha çok görülmektedir. Bu bilgi ile bizim çalışmamız birebir örtüşmektedir. EGFR mutasyon çalışmalarında Latin Amerika çalışmasında ileri evre vakalarda EGFR mutasyonu daha sık olduğu rapor edilmiştir (Arrieta vd 2014). Aynı şekilde uzak doğu çalışmalarında Japonya ve Vietnam için benzer raporlar mevcuttur (Chang vd 2009). Türk popülasyon çalışmalarında da aynı tespitler mevcuttur (Ünal vd 2013, Akca vd 2013). Ancak bizim çalışmamızda erken evre %25 iken ileri evre %34'tir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ve bu durum literatür ile uyuşmamaktadır. Bu farklar tümör dokusunda örnek alma yöntemi ve alınan örnekteki tümör heterojenitesinden kaynaklanıyor olabilir. Akca vd (2013) çalışması serumdan DNA izolasyonundan yapılan bir çalışma olup elde edilen sirküler tümör DNA'sıdır ve buna karşın Ünal vd (2013) çalışması parafin gömülü bloklar elde edilen ameliyat materyalidir. Bizim çalışmamızda bir çok doku ince iğne biopsi materyalidir. Biopsi materyalleri tümörün sadece bir noktasında alınan çok az bir bölge olduğu için özellikle operasyon olamayacak ileri evre hastalarda uygulanan bir yöntemdir. Bunun yanı sıra erken evre hastalarda lobektomi veya wedge rezeksiyonu ile daha büyük parçalar alınabilmektedir. Bu

durumda tümör hetrojenitesini azaltmaktadır. Rezekte ameliyat materyallerinde sadece tümörün olduğu parafin bloklar çalışılması en büyük avantajdır. Bir diğer klinik parametre ise yaştır. Tüm literatürlerde yaş ile ilgili olarak ileri evre KHDAK olan hastaların erken evreye göre EGFR mutasyon sıklığı anlamlı olan çalışmalarda ileri yaşta KHDAK olan hastaların EGFR mutasyonuna yüksek oranda sahip olmaları istatistiksel olarak anlamlıdır (Chang vd 2009, Smiths vd 2012). Çünkü gelişmiş ülkelerde yaş ortalaması 70-80 yaş arası iken KHDAK görülme yaş frekansı da bu aralıktadır (Chang vd 2009, Smiths vd 2012). Latin Amerika ve Hindistan çalışmalarında EGFR mutasyonu ile yaş arasında bir bağlantı olmadığı rapor edilmiştir (Arrieta vd 2014). Türkiye'den yapılan çalışmalarda aynı şekilde yaş ile orantı kurulamamıştır. Bizim çalışmamızın mod, medyan ve ortalama yaş değeri 62,5 olarak çıkmıştır. Çalışmada 62 yaş ve üstü bir grup 62 yaş dahil ve altı diğer grup olarak dizayn edilmiştir (Tablo 4.1). Bu çalışma yaş parametresi literatür ile uyum göstermektedir. Bizim çalışmamız Türk popülasyonu olarak 300 hastayı kapsamaması nedeniyle diğer iki Türk çalışmalarından daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Ayrıca literatür ile de uyumlu sonuçlar vermiştir. Unal vd (2013) çalışmasında kadın hasta oranı %14 ve ayrıca % 92 ileri evre hastaları kapsamaktadır. Bizim sonuçlarımız toplam 300 KHDAK hasta analiz edildiği için bugüne kadar yapılan en kapsamlı çalışma ve yalnızca lokal olarak Denizli bölgesi değil Antalya, Afyon, Muğla çevresinden de hasta katılımı olması sebebiyle lokal bir sonuç vermeyip, Türkiye popülasyonunu yansıttığı söylenebilir. Fakat daha önce yapılan çalışmaların 50 hasta ve lokal bölgelerde yapılması sebebiyle Türk popülasyonu ve geçerli EGFR mutasyonunu yansıtmamaktadır. Sonuçlarımız bu sebeple Türk popülasyonundaki gerçek EGFR mutasyonlarını yansıttığına inanıyoruz.

KHDAK kanserlerinde KRAS mutasyonlarını incelediğimizde popülasyonlara göre, Doğu Asya'da %2.3-9.4, Kuzey Amerika'da %11-29, Avrupa'da %12-31 Meksika'da %25, Kolombiya'da %12, Peru'da %12'dir (Chang vd 2009, Smiths vd 2012 ve Arrieta vd 2014). Bizim çalışmamızda ise %20.8 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Bizim sonucumuz Avrupa popülasyonunda ki KRAS mutasyon oranı ile uyum göstermektedir.

KRAS mutasyonlarında genel olarak kodon12,13'te yer almaktadır. Bu oran genel çalışmalarda %80-90 arasındadır. Bizim çalışmamız da ise; KRAS mutasyon tipleri 300 hastanın 32'sinde G12V (%6.6),10'unda G12S (%22.3), 8'inde G12C (%17.8), 6'sında G12D (%13.3), 18'inde Q61R (%15.5), 15'inde Q61H (%22.3), 1'inde G12A (%2.2), 1'inde G13D tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda kodon 12,13

mutasyonları %65 oranında iken kodon 64 mutasyonları %35 oranında tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Bizim çalışmamız KHDAK tanılı hastalarda KRAS mutasyonunun gösterildiği ilk Türk popülasyon çalışmasıdır.

KRAS mutasyonların klinikopatolojik özellikler bakımından incelediğimizde, literatürde KHDAK hastalarında KRAS mutasyon sıklığı sigara kullanımı ile korelasyonlu olduğu rapor edilmiştir (Chang vd 2009, Smiths vd 2012 ve Arrieta vd 2014). Ancak bizim çalışmamızda sigara içmeyen hastalar %22 sigara içen hastalar %26 olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). Bu sonuçlar literatür ile uyumsuzdur. KHDAK tanılı hastaların KRAS mutasyonlarının sigara ile ilişkisinin net olmamasının nedenleri arasında iki hipotezimiz mevcuttur. Bunlardan birincisi özellikle kırsal bölgeden gelen kadın hastaların pasif içici olmalarını ve bu durumu bildirmemesi aynı şekilde erkek hastaların hastalığın getirdiği psikoloji ile sigara içtiklerini gizlemesi düşündüğümüz etmenler arasındadır. Ayrıca ikinci olarak hava kirliliği özellikle hastalarının büyük çoğunluğu Ülkemizin sanayi kentlerinden birisi olan Denizli'den geldiği göz önüne alınırsa son 10 yıllık hava kirliliği ölçümlerinde ilk on sırada yer alan Denizli bu nedenle sekonder etki olarak düşündürmektedir. Diğer klinik parametrelere ilişkin literatür bilgisi bulunmamaktadır.

KHDAK hastalarında EGFR-KRAS mutasyonlarının ikisine birden sahip olan hastalar ise literatürde %1-15 arasındadır. (Chang vd 2009, Smiths vd 2012 ve Arrieta vd 2014). Bizim çalışmamızda ise EGFR-KRAS mutasyonlarının ikisine birden sahip hasta oranı ise %6.6 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Bu çalışmada Türk popülasyonunda ilk KRAS çalışması olması dolayısıyla EGFR-KRAS birlikte görülen hasta profili olarak yapılan ilk çalışmadır.

KHDAK hastalarını incelediğimizde EGFR mutasyonu açısından genetik profilimiz Uzak Doğu ırklarına benzerlik gösterirken, KRAS mutasyonu açısından genetik profilimiz Avrupa ırklarına benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bunun nedenleri arasında Ülkemiz'in bulunduğu bölge açısından göç bölgesi üzerinde olmasını en büyük etmendir. Bu da bizim toplum olarak kökenimizin Asya'da olduğunu düşündürmektedir.

KHDAK hastalarının EGFR mutasyonu taşıyanların 97 hastanın 59'u EGFR-TKI tek ajan erlotinib tedavisi almıştır. Bu hastaların sağkalım analizine baktığımızda tüm sağkalımda erlotinib alanlar 146 ± 22 hafta yaşarken tedavi almayanlar 84 ± 12 hafta yaşamıştır. Erlotinib tedavisinin tüm sağkalıma ortalama 62 hafta katkısı olmuştur. Bu durum literatür ile uyumludur. Erlotinib tedavisi EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda sağkalımı ortalama 9 aya kadar artırmaktadır (Barbara Melonsky

2014). Bizim çalışmamızda ise yaklaşık olarak sağkalımı ortalama 13-14 ay artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bizim çalışmamız KHDAK tanılı hastalarda EGFR ve KRAS mutasyonun sağkalım ilişkisi bakımından literatürde ki ilk Türk popülasyonu çalışmasıdır. EGFR-TKI tedavisi alan hastaların progresyonsuz sağkalım üzerine ise etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. EGFR-TKI tedavisi alanlarda sağkalım ortalama 288 ± 11 hafta iken almayanlar ise 119 ± 11 haftadır ve bu da literatür ile örtüşmektedir. Ayrıca hastaların EGFR-TKI tedavisi alanların almayanlara göre KRAS mutasyonuna sahip olmayıp tedavi alan hastalar diğer hastalara göre tüm sağkalım oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2). KRAS mutasyonu sahip olmayıp erlotinib tedavisi alan hastaların ortalama sağkalımı 161 ± 30 hafta iken, erlotinib tedavisi almayan hastaların ortalama sağkalımı 90 ± 13 haftadır. KRAS mutasyonuna sahip olup erlotinib tedavi alan hastaların ortalama sağkalımı 98 ± 16 hafta, erlotinib tedavisi almayan hastaların ortalama sağkalımı 34 ± 16 haftadır. Burada en uzun yaşam KRAS mutasyonuna sahip olmayıp EGFR-TKI tedavisi alanlardır. Hem EGFR hem de KRAS mutasyonları sahip hastaların EGFR-TKI tedavisi ile sağkalımı ortalama 64 hafta artar iken KRAS mutasyonsuz hastalarda bu fark 71 hafta olmaktadır. KRAS, KHDAK için prognostik bir faktördür. Bunun nedeni ise mutant KRAS aktif bir molekül olarak RAF-MEK-MAPK yolağı üzerinden ELK transkripsiyonel faktörün aktivasyonu ile kanser hücre proliferasyonunu tetiklemektedir. Ayrıca aktif KRAS aynı zamanda PI3K/PDK1/AKT yolağını aktifleyerek hücrenin yaşam molekülü AKT'nin fosforillenmesi birçok yolağı aktifler. Özellikle apoptozisten kaçış BAD molekülünün fosforillenmesi, transkripsiyonel faktör olan Nf-kB'nin aktiflenmesi ile birçok hücre proliferasyon molekülünün ifade edilmesi, TSC-1/RHEB/ mTORC1 üzerinden hücre göçü invazyon ve metastaz gibi şekil 13 üzerindeki birçok yolağı aktiflemektedir. EGFR mutasyonu erlotinib tedavisi için gerekli olan bir parametre olduğu kadar bizim çalışmamızın ortaya koyduğu bir durumda KRAS'ın EGFR-TKI tedavisi alan hastaların progresyon nedenlerinin açıklanmasına klavuz olacak bir parametre olarak kullanılmasını ortaya koymuştur. Özellikle tek ajan EGFR-TKI karşı direnç oluşturmaktadır. KRAS mutasyonu taşımayan hastalar ile taşıyan hastalar arasındaki fark ise sağkalım açısından ortalama 63 haftadır. EGFR mutasyonuna sahip hastalar erlotinib tedavisi alanlar dışlanmak süretiyle sağkalım analizi yapıldığında progresyonlu ve tüm sağkalım analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak KRAS mutasyonuna sahip hastaların tüm sağkalımı incelendiğinde KRAS mutasyonuna sahip hastalar 100 ± 14 hafta yaşarken KRAS mutasyonuna sahip olmayan hastalar ise 131 ± 9 hafta yaşamıştır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Mutant KRAS bizim çalışmalarımızda ciddi bir prognostik bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Erlotinib tedavisine bağılı veya bağımsız olarak sağkalımı etkilemektedir. Fakat KRAS mutasyonunun progresyonsuz sağkalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır. Progresyonsuz sağkalım çalışmalarının anlamlı fark çıkmamasının bir diğere etmeni ise hastaların %76 tanı anında ileri evre olmasıdır. KHDAK tanı anında ileri evre olması progresyon çalışmalarında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına neden olmaktadır. Çünkü hasta tedavisini tamamlayamadan yaşamı son buluyor. Bu durumda ölüm tarihi progresyon tarihi olduğu için progresyonsuz sağkalım çalışmalarında bir çok vaka çalışma dışına çıkarılıyor.

KHDAK tanılı hastalarda ilk sıra tedavi olarak platin temelli bir ilaç (sisplatin karboplatin) ilave olarak gemstabin veya taksan türevleri verilerek ikili kemoterapi uygulanmaktadır. Bu tedavi 21 gün ara ile üç doz olarak verilmektedir. Hastanın radyolojik incelenmesine göre progresyon var ise değiştirilmektedir. İnceleme sonucunda yanıt vermesi veya stabil ise devam edilmektedir. Bunun yanı sıra metastatik evre de olan hastalara pemektrekset-vinorelbine gibi ajanlarda tek veya ikili kombine tedavilerde kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda 198 hasta sisplatin gemstabin grubunda iken 64 hasta karboplatin-taksan almıştır. 38 hasta diğere grup olarak sınıflandırılmıştır. Yapmış olduğumuz sağkalım analizinde EGFR mutasyonunda cisplatin gemstabin kolundaki hastalar ortama sağkalımı 157 ± 20 hafta iken karboplatin taksan kolundaki hastalar 138 ± 22 hafta diğere koldaki hastalar ise 128 ± 17 hafta yaşamışlardır. Onkoloji çalışmalarının toplandığı National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline 'na göre her iki çalışmayı ön plana çıkaran araştırmalar mevcuttur. Bu durumda bizim çalışmamızda cisplatin-gemstabin kolu EGFR mutasyon varlığında hastaların sağkalımına pozitif etki etmiş olduğu görülmektedir. Aynı çalışma da KRAS mutasyonuna sahip hastalarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmamıştır.

KHDAK EGFR mutasyonuna sahip hastaların tedavisinde erlotinib'in ilk sıra tedavilerde başlanması birçok çalışmada sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Chang vd 2009, Arrieta vd 2014, Smiths vd 2012). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise hastalar iki gruba ayrılmış olup birinci ve ikinci sıra alanlar üçüncü ve dördüncü sıra tedavilerinde erlotinib alanlar olarak tasarlanmıştır. Ancak yapmış olduğumuz istatistiksel analiz sonucunda sağkalımlar arasında erlotinib tedavisine ilk iki sıra tedaviye başlanması ile üçüncü ve daha sonra başlanması arasında tüm sağkalım ve progresyonsuz sağkalım arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Yurt dışı çalışmalarında özellikle ilk sıra tedavilerinde EGFR mutasyonu tespitinden hemen sonra çalışma kapsamında ilaç başlanırken bizim çalışmamızda sosyal

güvenlik kurumundan endikasyon dışı onay beklemek zorunda kalınması zaman kaybı olarak tedavinin aksaması ve hastalığın progresyonu ile sonuçlanmıştır.

KHDAK hastalarındaki tümör dokularında EGFR ve KRAS mutasyonlarının sonucu apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarını nasıl etki ettiğini incelemek için aynı örneklerden total RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar dan real-time PCR yöntemi ile apoptotik bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri ile anti apoptotik bcl2 ve survivin incelenmiştir. Real-time analizinde elde ettiğimiz değerler normal akciğer dokusu sonuçları ile oranlanarak T testi yapılmıştır. Daha sonra ise elde ettiğimiz sonuçları mutasyonlu hasta gruplarını mutasyonsuz hasta grupları ile karşılaştırılarak ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. EGFR mutasyonuna sahip hastaların bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri azalırken bcl2 ve survivin ifadeleri artmaktadır (sırası ile 0.5, 0.98, 0.62, 0.27, 0.98, 1.43, 1.88) (Şekil 4.3). KRAS mutasyonunda apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (sırası ile 0.91, 0.24, 0.21, 0.39, 0.38, 1.04, 3.00) (Şekil 4.3). EGFR-KRAS mutasyonunda da apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (0.63, 0.76, 0.26, 0.25, 0.49, 5.51, 3.17) (Şekil 4.3). Literatür incelemesi sonucunda apoptotik olan bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadelerinde ki azalış ve anti-apoptotik olan bcl-2 ve survivin artışı anlamlı bulunmuştur (Singhal vd 2003, Shin vd 2002, Marzo vd 2008). Ayrıca literatürde bir çok kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda c-met ifade artışı ile de anti apototik proteinlerin ifadelerinde artış saptanmıştır (Shin vd 2002). Ayrıca Papanikolaou vd (2011) yılında yapmış olduğu çalışma da survivin için Nf-kB ve myc transkripsiyonel faktörlerinin ifade edilmesinde rolü olduğunu yayımlanmıştır. Bizim çalışmamızda da EGFR mutasyonu Nf-kB transkripsiyonel faktörünü, KRAS mutasyonu üzerinden Myc transkripsiyonel faktörünü alt yollarda aktive ettiği düşünülebilir. Ayrıca KRAS aynı zamanda Nf-kB'nin aktif hale geçirebilmektedir. Bu nedenle KRAS mutasyonunda survivin ifadesi EGFR mutasyonu taşıyan tümör örneklerinde yüksek oranda ifade edilmektedir. Catz vd (2001) ise diğer anti apoptotik molekül ise Bcl-2'nin nf-kB transkripsiyonel faktör ile ifade edildiğini rapor etmişlerdir. Hem EGFR mutasyonu hem KRAS mutasyonunda alt yollarda Nf-kB aktive olmaktadır. Bunun neticesinde Bcl-2 ifadesi artmaktadır. Datta vd (2002) yapmış oldukları çalışmada Forkhead box O3 (FOXO 3) transkripsiyonel faktör olarak BAD, FAS ve TNFR moleküllerinin transkripsiyonel faktörü olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada FOXO 3 transkripsiyonel faktörün PI3K üzerinden düzenlendiği fosfo-AKT, FOXO 3 bloke ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle PI3k/AKT yolağı EGFR ve KRAS mutasyonu üzerinden aktif olduğu için

proapoptotik BAD, FAS ve TNFR moleküllerinin ifadelerindeki düşüşü açıklamaktadır. Monilols vd (2000) çalışmasında PI3K/AKT yolağında p53 baskılandığını rapor etmiştir. Papanikolaou vd (2011) çalışmasında p53 ile survivin ifadesinin zıt olduğunu rapor etmiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızdaki p53 ifadesindeki azalışı açıklamaktadır. Ayrıca Soria vd (2002) yılında KHDAK tümörlerinde PTEN geninin promotor bölgesinde hipermetilasyon olduğunu rapor etmiştir. Bu sonuç PTEN ifadesinin düşük olmasını açıklamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar bizim hipotezimizi desteklemektedir. Çünkü EGFR ve KRAS mutasyonları anti apoptotik moleküllerin ifadelerinde artışa neden olurken pro apoptotik moleküllerin ifadelerinde düşmesine neden olmaktadır, dolayısıyla prognostik faktör olan KRAS mutasyonunun aynı zamanda apoptozisten kaçışı da tetiklediği ve tümör hücrelerini daha agresif hale getirdiğini göstermektedir. Özellikle EGFR-KRAS mutasyonunu ikisine birden sahip hastalarda survivin ve bcl-2 ifadelerindeki artış diğer parametrelere oranla daha fazladır. Bu durum bu tümörlerin daha agresif olduğunu göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada EGFR mutasyonu, KRAS mutasyonu veya her iki mutasyonu sahip hastaların PI3K/Akt/Nf-kB yolağı üzerinden anti apoptotik Bcl-2 ve survivin ifadelerinin arttığı ve FOXO 3 transkripsiyon faktörünün PI3K/Akt/Nf-kB yolağı üzerinden bloke olması sonucu proapoptotik BAD, FAS ve TNFR moleküllerinin baskılandığı ve PI3K/Akt/Nf-kB yolağından p53'ün baskılandığını düşünmekteyiz. Yapmış olduğumuz çalışmada yolak üzerindeki diğer molekülleri incelememiz bütçemiz ile alakalıdır. Bu çalışmanın devamı olarak hücre dizi modellerinde EGFR ve KRAS mutasyonu taşıyan hücreler kullanılarak ileride yapılması planlanmaktadır. Hücre dizilerinde BAD, FAS, TNFR, survivin, Bcl-2, PTEN, p53 ifadelerinin incelenmesi teorimizi destekleyecek çalışmalardır.

6. SONUÇ

KHDAK hastalarda Türk Populasyonu olarak ilk kez 300 hastalık bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada hem EGFR ve KRAS mutasyon profilleri ortaya çıkartılmış hemde bu mutasyonların kemoterapötik ajanlar ile ilişkili ilk sağkalım çalışması yapılmıştır. Aynı hasta gruplarından total RNA ile bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR, bcl2 ve survivin ifadeleri incelenmiştir. DNA sekans çalışmaları non-elektroporetik sistem pyrosequencing ile çalışılmıştır.

300 KHDAK tanılı hastanın 62'si bayan (%20.7) 238'i erkek (%79.3), 62'si skuamöz tip (%20.7) KHDAK iken 228'i adenokarsinoma (%76) 10 hasta diğer alt tiplerdendir (%3.3), hastaların yaş medyan ve ortalama değeri 62.5 olduğu için hastalar >62 ve ≤62 olarak ikiye ayrılmıştır. Buna göre 152 hasta >62 (%50.7) ≤62 ise 148 (%49.3) olarak saptanmıştır. Üçyüz hastanın 233'ü sigara içerken (%74.3) 77 hasta sigara içmemektedir (%25.7), 70 hasta erken evre (1-3A) (%23.3) 230 hasta ileri evre (3B-4) (%76.7), 4 hasta evre 1, 13 hasta evre 2, evre 3A 54 hasta, 27 hasta evre 3B ve 202 hasta evre 4'tür.

Üçyüz hastanın 203'ü (%67.7) EGFR mutasyonunu taşımazken, 97 hasta (%32.3) EGFR mutasyonuna taşımaktadır. EGFR mutasyonuna sahip hastaların 30'si bayan (%48.3), 67'i erkek (%28.2), 13'ü skuamöz tip (%21) KHDAK iken 77'si adenokarsinoma (%33.7) 7 hasta diğer alt tiplerdendir (%70), 50 hasta >62 (%32.8) ≤62 ise 47 (%31.7), 59'u sigara içerken (%26.4) 38 hasta sigara içmemektedir (%49.3), 18 hasta erken evre (1-3A) (%25.7) 79 hasta ileri evre (3B-4) (%34.3) olarak saptanmıştır. Yapılan ki-kare testine cinsiyet, alttip ve sigara durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Üçyüz hastanın 225'i (%75) KRAS mutasyonunu taşımazken, 75 hasta ise KRAS mutasyonunu (%25) taşımaktadır. KRAS mutasyonunu taşıyan hastaların 12'si bayan (%19.3) 63'i erkek (%26.4), 18'i skuamöz tip (%29) KHDAK iken 55'i adenokarsinoma (%24.1) 2 hasta diğer alt tiplerdendir (%20), 32 hasta >62 (%21)

≤62 ise 43 (%29), 58'u sigara içerken (%26) 17 hasta sigara içmemektedir (%22), 16 hasta erken evre (1-3A) (%22.8) 59 hasta ileri evre (3B-4) (%25.6) olarak saptanmıştır. Yapılan ki-kare testinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

EGFR mutasyonuna sahip 97 hastanın 59'u tirozin kinaz inhibitörü(EGFR-TKI) erlotinib kullanmıştır. Bu hastalardan sağkalım oranı EGFR-TKI tedavisi alan hastaların almayanlara göre tüm sağkalımı oranı istatistiksel olarak anlamlıdır (146±22, 84±12(hafta) p:0.020). Ayrıca EGFR mutasyonuna sahip 113 hastanın aynı zamanda 25 hasta KRAS mutasyonuna da sahiptir. Bu hastaların EGFR-TKI tedavisi alanların almayanlara göre KRAS mutasyonuna sahip olmayıp, tedavi alan hastalar diğer hastalara göre tüm sağkalım oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur KRAS mutasyonu sahip olmayıp erlotinib tedavisi alan hastaların ortalama sağkalımı 161±30 hafta iken, erlotinib tedavisi almayan hastaların ortalama sağkalımı 90±13 haftadır. KRAS mutasyonuna sahip olup erlotinib tedavi alan hastaların ortalama sağkalımı 98±16 hafta, erlotinib tedavisi almayan hastaların ortalama sağkalımı 34±16 haftadır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. KRAS bizim çalışmalarımızda ciddi bir prognostik bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Erlotinib tedavisine bağlı veya bağımsız olarak sağkalımı etkilemektedir. Fakat KRAS mutasyonunun progresyonsuz sağkalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır (p>0.05). Progresyonsuz sağkalım çalışmalarının anlamlı fark çıkmamasının bir diğer etmeni ise hastaların %76 tanısında ileri evre olmasıdır. KHDAK tanısında ileri evre olması progresyon çalışmalarında sıkıntıya neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda 198 hasta cisplatin gemstabin grubunda iken 64 hasta karboplatin-taksan almıştır. 38 hasta diğer grup olarak sınıflandırılmıştır. Yapmış olduğumuz sağkalım analizinde EGFR mutasyonunda cisplatin gemstabin kolundaki hastalar ortama sağkalımı 157±20 hafta iken karboplatin taksan kolundaki hastalar 138±22 hafta diğer koldaki hastalar ise 128±17 hafta yaşamışlardır. Onkoloji çalışmalarının toplandığı National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidilines ' na göre her iki çalışmayı ön plana çıkaran araştırmalar mevcuttur. Bu durumda bizim çalışmamızda cisplatin-gemstabin kolu EGFR mutasyon varlığında daha uzun yaşadığı görülmektedir.

Üç yüz hastanın parafine gömülü materyallerinden total RNA elde edilerek yapılan çalışmada apoptotik bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri ile anti apoptotik bcl2 ve survivin ifadeleri ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır. Sonuçlar normal bir akciğer dokusunun ekspresyon seviyelerine oranlanarak, t testi yapılmıştır. Yapılan analizde EGFR, KRAS ve EGFR-KRAS mutasyonuna sahip hastaların bu mutasyona sahip olmayan hastalara oranla bax, p53, PTEN, FADD, TNFR, bcl2 ve

survivin ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda gen ifadelerinin gruplar arasındaki değişimini belirlemek için oranlama (fold) analizi yapılmıştır. Bu analize göre; EGFR mutasyonunu taşıyan tümör hücrelerinin bax, p53, PTEN, FADD ve TNFR ifadeleri azalırken bcl2 ve survivin ifadeleri artmaktadır (sırası ile 0.5, 0.98, 0.62, 0.27, 0.98, 1.43, 1.88) (Şekil 20). KRAS mutasyonu taşıyan tümör hücrelerinde apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (sırası ile 0.91, 0.24, 0.21, 0.39, 0.38, 1.04, 3.00) (Şekil 20). EGFR-KRAS mutasyonunun ikisini birden taşıyan tümör hücrelerinin apoptotik genlerin ifadeleri azalırken anti-apoptotik genlerin ifadelerinde artış meydana gelmiştir (0.63, 0.76, 0.26, 0.25, 0.49, 5.51, 3.17).

- EGFR mutasyon oranı Türk toplumda %32.3 olarak tespit edilmiş olup en yüksek mutasyon tipi delE746-A750 (%33.4) olarak bulunmuştur.
- KRAS mutasyon oranı Türk Toplumunda %20.8 olarak tespit edilmiş olup en yüksek mutasyon tipi G12V (%25.2) olarak bulunmuştur.
- Sonuçlarımız KHDAK tanılı hastalarda EGFR ve KRAS mutasyonlarının Türk popülasyonunda tespit edildiği ilk çalışmadır.
- EGFR mutasyonları Asya toplumlari ile benzerlik gösterirken, KRAS mutasyonları Avrupa toplumu ile benzerlik göstermektedir.
- Sonuçlarımız KHDAK tanılı hastalarda EGFR ve KRAS mutasyonlarının Türk toplumunda erlotinib ile yanıt ilişkisinin gösterildiği ilk çalışmadır. Bu hastalar EGFR mutasyon analizi yapılması ve bunun sonucunda tedavi alması neticesinde sağkalımı etkilemiştir.
- Bizim çalışmamızın sonucunda EGFR mutasyonu taşıyan hastaların erlotinib tedavisi alması sonucunda ortalama sağkalımı 14 ay olarak bulunmuştur.
- Bu çalışma aynı şekilde KRAS mutasyonun tespit edilmesini de önemli kılmıştır. Çünkü KRAS mutasyonu taşıyan hastaların erlotinib tedavisi alması ortalama sağkalımı 98 hafta iken KRAS mutasyonu taşımayan erlotinib tedavisi alan hastalarda ise ortalama sağkalımı 161 haftadır.
- KRAS klinik olarak prognostik bir faktördür. Aynı zamanda yakın gelecekte üzerinde çalışılacak bir hedef molekül olabilir.
- Bunun yanı sıra erlotinib tedavisini EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda ilk iki sıra verilmesi sağkalım üzerine daha etkilidir.
- Ancak ülkemizde direk reçete edilmemesi ve sosyal güvenlik kurumu'na başvuru ile alınabilmesi zaman kaybı olduğu düşündürmektedir.

- EGFR ve KRAS mutasyonları taşıyan KHDAK tümör dokularında Bcl-2 ve survivin moleküllerinin ifadesinin artışı ve bax, p53, PTEN, FADD, TNFR, moleküllerinin ifadesinin azalması tespit edilmiştir.
- Apoptotik yolda kaspaz aktivasyonu ve transkripsiyonel faktörler Nf-kB ve FOXO 3 'ün ekspresyon seviyelerinin araştırılması bu teorimizi destekleyecektir.
- Ayrıca hücre hatlarında EGFR ve KRAS mutasyonlarını taşıyan hücrelerin Nf-kB aktivitesi bağlı olarak bax, p53, PTEN, FADD, TNFR, Bcl-2 ve survivin ifade seviyelerinin incelenmesi teorimizi destekleyecek çalışmalar olacaktır.

7. KAYNAKLAR

Adjei A. Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1062-74.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006; 363: 83-94.

Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, Bagci G, Yokota J. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Genetics* 2013; 206: 73-80.

Aparicio CB, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, More than the AKT Pathway. *Carcinogenesis* 2007; 8(7): 1379–1386.

Arrieta O, Cardona AF, Martín C, López L, Rodríguez L, Bramuglia G. Updated frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP). *J Thorac Oncol* (Publish Ahead of Print).

Berndt N, Andrew D, Hamilton M, Sebti SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 775-791.

Budhidarmo R, Day CL. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 1704: 1-11.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson, KM, Garrett TP. An open- and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12: 541–552.

Cappuzzo F. Predictive factors for response and for resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2(5 Suppl): 12-14.

Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor Nf-kB and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001; 20: 7342-7351.

Chang ET, Shema SJ, Wakelee HA, Clarke CA, Gomez SL. Uncovering Disparities in Survival after Non–Small–Cell Lung Cancer among Asian/Pacific Islander Ethnic Populations in California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2248-2255.

Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan, UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 1997; 387: 509-512.

Chen CC, Er TK, Liu YY, Hwang JK, Barrio MJ, Rodrigo M, Garcia-Toro E, Herreros-Villanueva M. Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p.G12D and p.G13D mutations. *PLoS One* 2013; 8(2): 1-8.

Chougule A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Thavamani A, Chandrani P.

Frequency of EGFR Mutations in 907 Lung Adenocarcinoma Patients of Indian Ethnicity. *PLoS ONE* 2013; 8(10): 1-5.

Ciardiello F, De Vita F, Orditura M, Tortora G. The role of inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 130-135.

Cox DA, Der JC. Ras history. *Small GTPases* 2010; 1(1): 2-27.

Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME. Survival Factor-Mediated BAD Phosphorylation Raises the Mitochondrial Threshold for Apoptosis. *Dev Cell* 2002; 3: 631–643.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495–516.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003; 11: 507–517.

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters. *Oncogene* 2003; 22: 8983–8998.

Gašparič MB, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Žel J, Gruden K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396(6): 2023-2029.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature* 2004; 4: 361-370.

Harrington CT, Lin EL, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of Pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 137: 1296-1303.

Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Noguchi M, Suzuki K. Association of p16 Homozygous Deletions with Clinicopathologic Characteristics and EGFR/KRAS/p53 Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(12): 3746-53.

Jang TW, Oak CH, Chang HK, Suo SJ, Jung MJ. EGFR and KRAS Mutations in Patients With Adenocarcinoma of the Lung. *Korean J Intern Med* 2009; 24: 48-54.

Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN Signaling in Tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 150–158.

Jin HP, Yingting L, Lemmon MA, Radhakrishnan R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem J* 2012; 448: 417–423.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett, TPJ, Ward CW, Burgess, AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 31–53.

Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase/PTEN/Akt Kinase Pathway in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis- Inducing Ligand-

Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Cancer Res** 2002; 62: 4929–4937.

Karnoub AE, Robert A. Weinberg Ras oncogenes: split personalities. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9: 517-531.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic Basis of Disease 8th ed **Elsevier** Saunders, Philadelphia, 2004, s.712-772.

Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomisea H, Uenob M, Kadotac K, Cheng MU, Long H. Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7) Correlates with Tumor Proliferation, and a Poor Prognosis in Non-Small Cell lung Cancer. **Lung Cancer** 2007; 58: 384-391.

Martin P, Kelly CMA, Carney D. Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer. **Cancer Control** 2006; 13(2): 129-140.

Mcllwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. Cold Spring Harb, **Perspect Biol** 2013; 5: 86-56.

Melosky B. Review of EGFR-TKIs in Metastatic NSCLC, Including Ongoing Trials. **Front Oncol** 2014; 15: 4-244.

Miller VA. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. **Semin Oncol Nurs** 2008; 24(1): 27-33

Mogi A ve Kuwano H. TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer. **J Biomed Biotechnol** 2011; 583929: 1-9.

Monticone, M, Biollo E, Maffei M, Donadini A, Romeo F, Storlazzi CT, Giaretti W, Castagnola P. Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. **Mol Cancer** 2008; 7: 92.

Nair P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. **Curr Sci** 2005; 88: 890-898.

Nakamura H, Saaji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. **Int J Cancer** 2003; 103: 61-66.

Novais RC, Thorstenson YR. The evolution of Pyrosequencing for microbiology: From genes to genomes. **J Microbiol Methods** 2011; 86(1): 1-7.

Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, Tominaga S, Nishio K, Tanabe KK, Takahashi K. Interaction Between CD44 and Hyaluronate Induces Chemoresistance in Non-small Cell Lung Cancer. **Cancer Lett** 2007; 252: 225–234.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J** 2000; 19: 3159-67.

Paul I, Jones MJ. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. **World J Clin Oncol** 2014; 5(4): 588-594.

Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, Dubos S, Kappas C, Kitsiou-Tzeli S, Tsezou A. Survivin regulation by HER2 through NF- κ B and c-myc in irradiated breast cancer cells. **Cell Mol Med** 2011; 15: 1542-1550.

Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Res** 2015; 11: 3-11.

Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9th ed. **Mosby**, Edinburgh, 2004, s.361-364.

Roskoski Jr R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 319: 1–11.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7(3): 169-81.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2012. **CA-Cancer J Clin** 2012; 62: 220-241.

Smits AJJ, Kummer JA, Hinrichs JWJ, Herder GJM, Scheidel-Jacobse KC, Jiwa NM. EGFR and KRAS mutations in lung carcinomas in the Dutch population: increased EGFR mutation frequency in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. **Cell Oncol** 2012; 21: 78-84.

Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival. **Cancer Res** 2006; 66 (11): 5542-5548.

Soria JC, Lee HY, Lee JT, Wang L, Issa JP, Kemp BL, Liu DD, Kurie JM, Mao L, Khuri FR. Lack of PTEN Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Could Be Related to Promoter Methylation. **Clin Cancer Res** 2002; 8: 1178 –1184.

Soria JC, Mok TS, Cappuzzo F, Jänne PA. EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: Current trends and future prospects. **Cancer Treat Rev** 2012; 38: 416–430.

Travis WD, Brambilla E, Hermelink HKM, Harris CC. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. **IARC Pres**, Lyon (France), 2004, s.125-144.

Unal OU, Oztop I, Calibasi G, Baskin Y, Koca D, Demir N, Relationship between Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Clinicopathological Features in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in Western Turkey. **Asian Pacific J Cancer Prev**, 2013; 14 (6): 3705-3709.

Wang S, Wang Z. EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer from mainland China and their relationships with clinicopathological features: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med** 2014; 7(8): 1967-1978.

Wicki A, Herrmann R, Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. **Swiss Med Wkly** 2010; 140: 13112.

Wistuba LL. Molecular Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Carcinomas. **J Lung Cancer** 2012; 11(1): 12-20.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer** 2001; 37(Suppl. 4): 3–8.

Ying Y, Li XF, Chen JQ, Dong CX, Weng SS, Huang JJ. Critical appraisal of the role of gefitinib in the management of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. **Onco Targets Ther** 2014; 7: 841–852.

Web 1 Amerikan sağlık ve hastalık korunma resmi sitesi <http://www.cdc.gov/nchs/> (Son güncellenme tarihi: 01.03.2015, Alındığı tarih 14.02.2015)

Web 2 Amerikan ulusal kanser sitesi <http://www.cdc.gov/nchs/> (son güncellenme tarihi: 01.01.2014, Alındığı tarihi 14.02.2015)

Web 3 EGFR yolak sitesi http://www.sinobiological.com/EGFR-Signaling-Pathway_image_pegfr-signaling-pathway.html (Son güncellenme tarihi: 01.03.2015, Alındığı tarih 14.02.2015)

8. ÖZGEÇMİŞ

Aydın DEMİRAY 1979 yılında Antalya'nın Serik ilçesinde doğdu. İlkokulu Çankırı Mareşal Fevzi Çakmak İlköğretim okulunda, ortaokulu Denizli Atatürk Orta Okulunda, Liseyi Eskişehir Sağlık Meslek Lisesinde bitirdi. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar bölümünü 2002 yılında ardından aynı Üniversitesinin Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2005 yılında mezun olmuştur. 2009 yılında "Küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi pc 14 üzerinde pten tümör baskılayıcı geninin invazyon, proliferasyon ve apoptoz üzerindeki olası etkilerinin mekanizmaları ile araştırılması" isimli tezi ile Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilimdalında Yüksek lisansını tamamlamıştır. Evli ve bir çocuk babasıdır.