



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NOTCH3 C381T VE G684A POLİMORFİZMLERİNİN AKCİĞER  
KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EMİNE YAĞCI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. İRFAN DEĞİRMENCİ**

**2015**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NOTCH3 C381T VE G684A POLİMORFİZMLERİNİN AKCİĞER  
KANSERİ İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EMİNE YAĞCI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. İRFAN DEĞİRMENCİ**

**Proje No: 201411D11**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Emine YAĞCI'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Notch3 C381T ve G684A Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri ile İlişkinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih

Üye: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ (Danışman)



Üye: Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



Üye: Prof. Dr. Muzaffer METİNTAŞ



Üye: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN



Üye: Yrd. Doç. Dr. M. Cengiz ÜSTÜNER



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31 / 07 / 2015 tarih ve 1056487 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## Özet

Akciğer kanseri hava yolu epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan bir hastalıktır. 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken günümüzde en sık görülen kanser tiplerinden biridir ve erkeklerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kalıtsal faktörlerin akciğer kanseri gelişimindeki rolü araştırılmış, birinci derece akrabalarında kanser görülen kişilerde akciğer kanseri riskinin 2.4 kat arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle akciğer kanserinin gen polimorfizmleri ve mutasyonlarla ilişkisinin belirlenmesi hastalığın erken prognozunda önem taşımaktadır.

Akciğer kanseri oluşumu büyüme, farklılaşma, çoğalma, apoptoz gibi hücresel aktiviteleri düzenleyen proteinlerin bozulması veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı proteinlerin işlevini yitirmesi ile ilişkilendirilmiştir. Notch sinyal yolağı, gelişim döneminde hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan bir mekanizmadır. Notch organ oluşumu ve morfogenezde çeşitli görevler üstlenerek çoğalma, farklılaşma ve apoptozu etkiler. Son çalışmalar notch sinyalinin hücre çoğalması ve farklılaşması ile apoptotik olaylarda rol oynadığı kanıtlanmıştır. Ayrıca kanserli hücrelerde notch aktivasyonunun anormal hücre çoğalmasına neden olduğu görülmüştür.

İnsanlardaki kalıtsal genetik değişiklikler, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler ve insersiyon/delesyon gibi moleküler değişimler kanser riskini artırabilen başlıca genetik faktörlerdir. Genomda binlerce aday polimorfik gen bulunmaktadır ve bu farklılıkları taşıyan kişiler hastalıkların gelişimine daha duyarlıdırlar. Bireyler arasındaki genetik varyasyonların hastalıklarla ilişkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır.

Bu çalışma akciğer kanseri hastalarında NOTCH3 C381T ve A684G polimorfizmlerinin sıklığını belirleyerek, akciğer kanseri gelişiminde genetik yatkınlık yönünden ilişkili olup olmadığını araştırmak amacıyla planlandı.

Çalışmada; akciğer kanseri tanısı konan 100 hasta ve 100 sağlıklı bireyden alınan venöz kan örneklerinden DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilen genomik DNA analiz edildi. PCR metodu ile NOTCH3 geni C381T ve A684G bölgeleri ilgili primerler kullanılarak çoğaltıldı. Bu örnekler NOTCH3 ürünü için %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, CCD (Charge Coupled Device) kamera ile değerlendirildi.

Çalışma sonunda , NOTCH3 geni C381T ve A684G polimorfizmleri için hasta ve kontrol grupları genotip ve alel frekansları bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

Akciğer kanseri hastalarında C381T polimorfizmi açısından, %73 C aleli ve %27 T aleli bulunurken, kontrol grubunda; %61,5 C aleli, %38,5 T aleli tespit edilmiştir. Genotipler açısından değerlendirildiğinde, akciğer kanseri hastalarında %46 CC genotipi, %54 CT genotipi belirlenirken, kontrol grubunda %25 CC genotipi, %2 TT genotipi, %73 CT genotipi belirlenmiştir. Yine, akciğer kanseri hastalarında A684G polimorfizmi açısından, %52 A aleli ve %48 G aleli bulunurken, kontrol grubunda; %66,5 A aleli, %33,5 G aleli tespit edilmiştir. Genotipler açısından değerlendirildiğinde, akciğer kanseri hastalarında %9 AA genotipi, %5 GG genotipi, %86 AG genotipi belirlenirken, kontrol grubunda %39 AA genotipi, %6 GG genotipi, %55 AG genotipi belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer Kanseri, Notch3 geni, C381T ve A684G polimorfizmi

## Summary

Lung cancer is a disease caused by uncontrolled proliferation of airway epithelium cells. It is one of the most common types of cancer nowadays, while it was a rare disease in the early 20th century. It is the leading cause of death in men. It has been investigated the role of hereditary factors in the development of lung cancer and established increasing risk of lung cancer in patient's first-degree relatives by 2.4 times. Therefore determination of association with gene polymorphism and mutation of lung cancer is important in prognosis.

Lung cancer associated with degradation of proteins which regulate cellular activities such as cell growth, differentiation, proliferation and apoptosis or the loss of function of proteins due to mutations in the genes which express these proteins. Notch signaling pathway is a mechanism which plays role in determination of cell fate during cell development. Notch plays role in organogenesis and morphogenesis and effects on cell differentiation, proliferation, apoptosis. Also, investigations are shown that notch activation causes abnormal proliferation in cancer cells.

Heritable genetic defects, polymorphisms, molecular changes such as insertion/deletion are major factors that may increase the risk of cancer. There are thousands of candidate polymorphic genes in the genome and people carrying these differences in their genome are more susceptible to the development of diseases. Thus, it is necessary to focus more research on this subject.

This study was designed to determine frequency of NOTCH3 C381T and A684G polymorphisms and planned to investigate whether this gene associated with genetic predisposition of development of lung cancer or not.

In this study, venous blood samples were obtained from 100 patients with lung cancer and 100 healthy subjects and genomic DNA was isolated by using DNA isolation kit. NOTCH3 gene C381T and A684G regions were amplified with polymerase chain reaction (PCR) method by using suitable primers. PCR products were separated by 3% agarose gel electrophoresis and visualized by a charge-coupled device (CCD) camera.

At the end of the study, between patient and control groups for NOTCH3 gene C381T and A684G regions was found statistically significant difference when evaluated in terms of genotype and allele frequencies. The allele distributions were: patients with lung cancer, C 73%, T 27%; controls C 61,5%, T 38,5%. The genotype distributions were: patients lung cancer, CC 46%, CT %54; controls CC 25%, TT 2%, CT 73%. The allele distributions were: patients with lung cancer, A 52%, G 48%; controls A 66,5%, G

33,5%. The genotype distributions were: patients with lung cancer, AA 9%, GG %5, AG %86; controls AA 39%, GG 6%, AG 55%.

**Keywords:** Lung cancer, Notch3 gene, C381T and A684G polymorphism.

# İçindekiler

Özet .....	i
Summary .....	iii
İçindekiler .....	v
Tablo Dizini .....	viii
Şekil Dizini .....	x
Grafik Dizini .....	xii
Simge ve Kısaltmalar Dizini .....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2. 1. Akciğer Kanseri .....	4
2. 1. 1. Akciğer Kanseri Tanımı.....	4
2. 1. 2. Epidemiyoloji .....	4
2. 1. 3. Etyoloji .....	5
2. 1. 3. 1. Sigara .....	5
2. 1. 3. 2. Yaş .....	5
2. 1. 3. 3. Mesleki Karsinojenler .....	5
2. 1. 3. 4. Çevresel Etmenler .....	6
2. 1. 3. 5. Besin Maddeleri .....	6
2. 1. 3. 6. Akciğer hastalıkları .....	6
2. 2. 3. 7. Genetik yatkınlık .....	6
2. 1. 4. Patoloji .....	7
2. 1. 5. Histopatoloji .....	8
2. 1. 5. 1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) .....	9



2. 1. 5. 1. 1. Skuamöz hücreli karsinom .....	9
2. 1. 5. 1. 2. Adenokarsinom .....	9
2. 1. 5. 1. 3. Büyük hücreli karsinom .....	9
2. 1. 5. 2. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) .....	9
2. 1. 6. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi .....	10
2. 1. 7. Polimorfizm .....	10
2. 2. Notch Sinyal Yolağı .....	12
2. 2. 1. Notch sinyal yolağı elementleri .....	13
2. 2. 2. Notch sinyal yolağının aktivasyonu .....	15
2. 2. 3. Notch, apoptoz ve kanser .....	16
2. 2. 3. 1. Apoptoz .....	16
2. 2. 3. 2. Notch-p53 sinyal yolları ve kanser .....	17
2. 2. 3. 3. Notch- NF-KB sinyal yolları ve kanser .....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	19
3. 1. Gereç .....	19
3. 1. 1. Araştırma grubu .....	19
3. 1. 2. Kullanılan cihaz ve gereçler .....	19
3. 1. 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler .....	20
3. 2. Yöntem .....	21
3. 2. 1. DNA izolasyonu .....	21
3. 2. 2. Çalışma dizaynı .....	23
3. 2. 3. İzole edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu .....	23
3. 2. 3. 1. Kullanılan çözeltiler .....	23
3. 2. 3. 2. Amplifikasyon şartları .....	24

3. 2. 4. Agaroz jel elektroforezi .....	25
3. 2. 5. Jelin CCD kamera ile değerlendirilmesi .....	26
3. 2. 6. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	33
4. BULGULAR .....	34
5. TARTIŞMA .....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	44
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	46
Özgeçmiş .....	52

## **Tablo Dizini**

<b>Tablo 2.1.</b> İnvaziv malign epitelyal akciğer tümörleri sınıflaması.....	7
<b>Tablo 4.1.</b> C381T ve A684G polimorfizmi genotip ve alel frekansları ...	35
<b>Tablo 4.2.</b> Alele göre hastalık riski .....	38
<b>Tablo 4.3.</b> Genotipe göre hastalık riski .....	39

## Şekil Dizini

<b>Şekil 2.1.</b> NOTCH3 reseptörünün yapısı .....	14
<b>Şekil 2.2.</b> Notch reseptörleri ve DSL ligandları .....	17
<b>Şekil 3.1.</b> C381T gen bölgesinde optimum PCR ürünü elde etmek için yapılan PCR çalışmaları .....	27
<b>Şekil 3.2.</b> NOTCH3 C381T bölgesinin enzim kesim bölgeleri .....	28
<b>Şekil 3.3.</b> AciI enzimi ile kesilen C381T gen bölgesi .....	29
<b>Şekil 3.4.</b> A684G gen bölgesinde optimum PCR ürünü elde etmek için yapılan PCR çalışmaları .....	30
<b>Şekil 3.5.</b> NOTCH3 A684G bölgesinin enzim kesim bölgeleri .....	37
<b>Şekil 3.6.</b> MwoI enzimi ile kesilen A684G gen bölgesi .....	37

## **Grafik Dizini**

<b>Grafik 4.1.</b> C381T polimorfizmi genotip ve alel frekansları grafiği .....	35
<b>Grafik 4.2.</b> C381T genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	36
<b>Grafik 4.3.</b> A684G polimorfizmi genotip ve alel frekansları grafiği .....	36
<b>Grafik 4.4.</b> A684G genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	37

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

### Simge ve Kısaltma

### Açıklama

**EGF**

Epidermal büyüme faktörü

**HAT**

Histon asetiltransferaz

**HDAC**

Histon deasetilazlar

**KOAH**

Kronik obstruktif akciğer hastalığı

**MAPK**

Mitojen-aktive protein kinaz

**NF-KB**

Nüklear faktör kappa B

**NICD**

Notch intraselüler bölge

**NSCLC**

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

**OR**

Odds ratio

**PCR**

Polimer zincir reaksiyonu

**PKC**

Protein kinaz C

**Rb**

Retinoblastoma

**TGF- $\beta$**

Tümör büyüme faktörü  $\beta$

**WHO**

Dünya Sağlık Örgütü

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri hava yolu epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan genetik değişikliğin fenotipe yansıdığı bir hastalıktır. Akciğerdeki malign epitelyal tümörler akciğer kanseri ve bronşiyal karsinom olarak da adlandırılır ve bu tümörlerin çoğu bronşiyal sistem içinde santral ve daha küçük hava yollarının epitelyal veya nöroendokrin hücreleri ve %10'dan daha azı da akciğer parankiminden kaynaklanmaktadır (Ak & Metintaş, 2014).

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken günümüzde en sık görülen kanser tiplerinden biridir ve erkeklerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2008 raporuna göre kanser ölümlerinin erkeklerde % 29.3'ü, kadınlarda % 11'i akciğer kanseri nedeniyle olmaktadır (Ferlay et al., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1981 yılında yapılan akciğer tümörleri sınıflaması daha sonra patolojik tanı yöntemleri ve kriterlerindeki değişikliklerle birlikte 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir (Beverly, Felsher, & Capobianco, 2005; Coşkunpınar, 2013). Buna göre; akciğer karsinomlarının iki ana grubu vardır. Bunlar; Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (%80.4) ve Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)(%16.8)'dir (Coşkunpınar, 2013).

Histolojik kriterlere göre yapılan sınıflandırma, klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu için önemlidir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının tek bir grupta toplanmasının nedeni, bu gruptaki karsinom tiplerinin prognozları ve tedavi yaklaşımlarının benzer olmasıdır. KHDAK 'de başlıca üç alttip; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomdur (Coşkunpınar, 2013).

Bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülmeyecek oranlarda var olan, nadir sıklıkta, süreklilik göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin birlikte oluşumu durumuna "polimorfizm" denilmektedir (Brookes, 1999). Toplumun %1 veya daha fazlası nadir bir aleli taşıyorsa bu durum polimorfiktir. Polimorfizmler insan genetik araştırmalarında anahtar fonksiyon üstlenerek, genetik bir marker gibi görev yapmaktadır. Günümüze kadar akciğer kanserinde birçok gen (örneğin; MAPK yolağı genleri ve PI3K yolağı genleri) polimorfizm yönünden araştırılmış ve bazılarında önemli bulgular elde edilmiştir (Kitano et al., 2014; Li et al., 2013; Qiu et al., 2013; Wei et al., 2014).

Akciğer kanseri gelişim sürecinde yaklaşık 10-20 genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir (Özkan, 2008). Akciğer karsinogenezinde önemli genetik olaylar; onkogenlerin mutasyona bağlı aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı, hücre döngüsü ve apoptoz regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, DNA onarımında görev alan genlerde meydana gelen değişiklikler ve büyüme

faktörleri ile reseptörlerine ilişkin değişikliklerdir (K. M. Fong & Minna, 2002).

Akciğer kanserinin oluşumunda diğer kanser tiplerinde olduğu gibi büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücresel aktiviteleri düzenleyen proteinlerin bozulması veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı proteinlerin işlevini yitirmesi rol oynamaktadır. Bu proteinlerin ve proteinleri kodlayan genlerin bir kaçı tanımlanmış olmasına rağmen daha birçok tanımlanamamış genetik faktörün akciğer kanseri oluşumunda ve yayılmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu protein ve proteinleri kodlayan genlerden bazıları ras, myc, bcl-2, erbB-2 gibi onkogenler ile p53, Rb, p16 gibi tümör baskılayıcı genlerdir (Alp, 2013; Sagawa, Saito, Fujimura, & Linnoila, 1998).

Notch sinyal yolağı şu anda bir insan kanseri yolağı olduğu kesin olarak ispatlanmış bir yolaktır. Notch yolağında hem inaktivasyon hem de aşırı aktivite kanser gelişimini teşvik eder. Kanserde etkinliği bilinen TGF $\beta$  ve STAT yolakları gibi Notch yolağı da farklı hücre tiplerinde fonksiyon kaybı ya da aşırı aktivite gibi farklı özellikler göstererek kanser gelişimine neden olur (Krauss, 2006; Pazarbaşı, Kasap, & Kasap, 2011; Schulz, 2005).

Notch yolağı kök ve öncü hücre katmanlarını kontrol eder. Karakteristik fonksiyonu iki yönlü hücre akıbeti kararlarının regülasyonudur. Bu, hücrenin bir doku öncülü olarak mı kalacağı veya epidermin bazal tabakasında olduğu gibi farklılaşmaya mı gideceği kararlarını da içerir. Notch sinyalleşmesi aynı zamanda farklılaşmış bir intestinal hücrenin bir enterosit mi, goblet hücresi mi olacağı veya lenfosit hattında T hücre veya B hücresi alt hatlarına mı geçeceği ile ilgili kararları da içerir (Pazarbaşı et al., 2011). Notch reseptörü ve ligandları arasındaki etkileşim farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücre kaderinin kararlarını yöneten bir sinyal kaskadını başlatır (Ohishi et al., 2000). Notch hücre döngüsü, gelişim ve sağ kalım ile ilgili yolakları içeren geniş ağlar boyunca apoptozu düzenler (Dang, 2012).

Yapılan birkaç çalışmada, NOTCH3 geni ile akciğer kanseri arasında muhtemel bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda Notch sinyal sistemindeki anormalliklerin bronşlarla ilgili kanserlerde rol oynayabileceği ve NOTCH3'ün bronşiyal karsinoma patogeneğinde özellikle akciğer kanseri onkogenlerinin tanınmasında kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca çok değişkenli analizler NOTCH3'ün KHDAC (Non-small cell lung cancer: NSCLC) için bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermiş ve hastaların prognozisini tahmin için kullanışlı bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Akciğer kanseri ile yapılan çalışmalarda, Notch sinyalinin solunum yollarının epitelyal gelişimini düzenlemede önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Notch normal akciğer gelişiminde rol oynamaktadır, ancak adenokarsinomayı da içeren küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde bu gelişimsel yolağın daha aktif olduğu görülmüştür. Bu nedenle de Notch



yolağının farmakolojik inhibisyonu akciğer kanseri tedavisinde potansiyel bir yaklaşımdır. Yine akciğer kanserli hastalarda NOTCH3'ün aşırı eksprese olduğu belirlenmiştir, ayrıca NOTCH3 aşırı ekspresyonunun birçok kanser tipi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Collins, Kleeberger, & Ball, 2004; Ye et al., 2013; Zhou, Jin, Fan, & Han, 2013).

Çalışmamız, akciğer kanseri ile NOTCH3 geni C381T ve A684G polimorfizmleri arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Ayrıca yapılan literatür taramaları sonucunda akciğer kanseri açısından henüz çok kısıtlı çalışıldığı görülen bu genin, toplum taraması yönünden değerlendirildiğinde ülkemizdeki akciğer kanseri gelişiminde genetik yatkınlığın rolünün belirlenmesine yönelik katkı sağlayacağı ve erken teşhise yardımcı olacağı düşünülerek planlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Akciğer Kanseri**

#### **2.1.1. Akciğer kanseri tanımı**

Akciğer kanseri hava yolu epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan genetik değişikliğin fenotipe yansıdığı bir hastalıktır. Akciğerdeki malign epitelyal tümörler akciğer kanseri ve bronşiyal karsinom olarak da adlandırılır ve bu tümörlerin çoğu bronşiyal sistem içinde santral ve daha küçük hava yollarının epitelyal veya nöroendokrin hücreleri ve %10'dan daha azı da akciğer parankiminden kaynaklanmaktadır (Ak & Metintaş, 2014).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji**

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken günümüzde en sık görülen kanser tiplerinden biri olup, erkeklerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kadınlarda da sıklığı giderek artmaktadır ve kadınlar arasında sigara içme oranının yükselmesi akciğer kanseri insidansındaki artışın sebebi olarak gösterilmektedir. Tüm dünyada akciğer kanserinin küresel sıklığı her yıl % 0.5, kadınlarda ise % 4.1 artmaktadır (Coşkunpınar, 2013; Kiyohara & Ohno, 2010; Kligerman & White, 2011; Köktürk, Yeğın, Çiftçi, Mullaoglu, & Öztürk, 2004; Rayet & Gelinas, 1999).

Tüm dünyada yeni kanser olgularının %12.7'sinden (yaklaşık 1.6 milyon kişi) ve kanser ölümlerinin %18.2'sinden (yaklaşık 1.4 milyon kişi) akciğer kanseri sorumludur. Bir yılda tahmin edilen yeni kanser vakaları dikkate alındığında %16.5'luk oranla erkeklerde birinci, kadınlarda meme, kolorektal ve serviks kanserinden sonra %8.5'luk oranla dördüncü sırada; yine kanserden ölümlere bakıldığında da erkeklerde birinci, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir (Ak & Metintaş, 2014).

Akciğer kanseri insidansını etkileyen bir başka faktör ırksal farklılıktır. Bu kanser türü Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Çin'de yaygın olarak görülmesine rağmen Afrika ülkelerinde özellikle de Batı Afrika'da insidansı çok düşüktür (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005).

Akciğer kanseri önlenabilir bir hastalıktır. Bilinen risk faktörleri ortadan kaldırıldığında % 85-100 oranında gelişiminin engellenebileceği öngörülmektedir (Skuladottir, Olsen, & Hirsch, 2000; Spiro & Porter, 2002). Bu konuda en önemli adım, sigara kullanımını minimum düzeye indirecek hatta tümüyle ortadan kaldıracak önlemlerin alınmasıdır. Akciğer kanseri etyolojisinde sorumlu başlıca faktör olan sigara içimi ülkemizde siyasi irade ve meslek örgütlerinin tüm çabalarına rağmen oldukça yüksek oranlarda olup, bu oran %30'lar civarındadır. Bu durum önümüzdeki yıllar boyunca bu sorunun devam edeceğinin göstergesidir (Ak & Metintaş, 2014).

### **2.1.3. Etyoloji**

#### **2.1.3.1. Sigara**

Akciğer kanseri etyolojisinde sorumlu primer faktör sigaradır (Köktürk, Öztürk, & Kırıçoğlu, 2003). Akciğer kanseri hastalarının %90'dan fazlası sigara kullanmaktadır (Coşkunpınar, 2013). Sigaranın akciğer kanserindeki rolü ilk olarak 1950 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Aşırı ve uzun dönem sigara kullanımının bronşiyal karsinoma oluşumunda önemli bir faktör olduğu bu çalışmada ortaya koyulmuştur ve daha sonra yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (Wynder & Graham, 1950).

Amerika Birleşik Devletlerinde akciğer kanserinden ölen erkeklerin % 90'ının, kadınların ise % 70-85'inin sigara kullandığı belirlenmiştir (Hecht, 1999). Sigara kullananlarda akciğer kanseri görülme riski 24-36 kat daha fazladır (Müsellim, 2007).

Sigarada 4000 çeşit kimyasal madde bulunmaktadır. Bu maddelerin 60 tanesi Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından karsinojen madde olarak tanımlanmıştır (Hecht, 2002; Hoffmann, 1997). Sigara dumanındaki başlıca karsinojenler; polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenlerdir (Matakidou, Eisen, & Houlston, 2005; Schwartz, Yang, & Swanson, 1996). Sigaradaki karsinojen maddeler, DNA'da doğrudan hasar oluşturabildikleri gibi, enzimler tarafından metabolitlerine dönüşerek de etki gösterebilirler (Matakidou et al., 2005).

#### **2.1.3.2. Yaş**

Akciğer kanseri etyolojisinde sigara %90'lık bir pay ile başlıca faktördür, diğer %10'luk kısmı ise yaş, ırk, meslek, çevresel faktörler (hava kirliliği), aile hikayesi, viral faktörler, immünolojik faktörler ve genetik faktörler oluşturur. Bunlar arasında ise yaş sigaradan sonra ikinci sırayı alır. Amerika Birleşik Devletlerinde akciğer kanseri tanısı koyulmuş her üç hastadan ikisi 65 yaş üzeridir (Blanchard, Arnaoutakis, & Hesketh, 2010). Yaşlı insanlardaki insidansın bu artışı hormonal değişikliklerle, direncin azalması ile ve sigara kullananlarda sigaranın zararlı etkilerine uzun süre maruz kalmayla direkt olarak ilişkilidir (Alberg & Samet, 2003).

#### **2.1.3.3. Mesleki karsinojenler**

Tüm kanserler arasında mesleki maruziyetle ilişkili olduğu en çok bilinen kanser türü akciğer kanseridir. Radon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, bis (klorometil) eter, katran, is, nikel, krom, inorganik arsenik bileşenleri, asbest gibi karsinojenlere mesleki maruziyet sonucu akciğer kanseri riski artmaktadır (Siegfried, 1998).

#### 2.1.3.4. Çevresel etmenler

Hava kirliliği, biyolojik yakıtlar, radon gazı, asbest, kimyasal ürünler (böcek ilaçları, formaldehit) akciğer kanseri riskinde artışa neden olan çevresel etmenlerdir (Siegfried, 1998).

Asbest akciğer kanserine neden olduğu iyi bilinen bir mineraldir. Asbest ile temas hem mesleki hem de çevresel şekilde olabilir. Asbest ve akciğer kanseri arasında ilişki olabileceği 1930'lu yıllarda düşünülmüş ve 1955'te kanıtlanmıştır. Asbest temaslı grupta risk yaklaşık 6 kat artmakta, sigara ile sinerjistik etki görülmekte ve risk katlanarak 60 kata kadar çıkabilmektedir (Ak & Metintaş, 2014).

#### 2.1.3.5. Besin maddeleri

Akciğer kanseri ile beta karoten ve vitamin C arasında koruyucu ilişki olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Davidson, Hsu, & Schantz, 1993). Ayrıca vitamin A eksikliği de solunum sistemi epitelinde skuamöz metaplaziye neden olmaktadır. Vitamin A açısından fakir diyetle beslenenlerde, zengin diyetle beslenenlere kıyasla akciğer kanseri riskinin 4,6 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Karlıkaya et al., 2003). Bütün bu verilere rağmen etyolojide beslenmenin yeri ile ilişkili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Diyetle sebze ve meyvenin yer almasıyla akciğer kanseri riskinin azaltılabileceği düşünülmektedir. Ancak retinoidler ve alfa tokoferol ile yapılan önlem çalışmalarında bu ajanların akciğer kanseri riskini azaltmadığı hatta artırdığı saptanmıştır (Ak & Metintaş, 2014).

#### 2.1.3.6. Akciğer hastalıkları

Tüberküloz, pnömoni, abse, pulmoner emboli gibi geçirilmiş akciğer hastalıkları, KOAH, silikozis, fibrozis ise bir başka risk faktörünü oluşturur. Daha önce geçirilmiş akciğer kanseri hikayesi ve radyasyonda etyolojide önemlidir (Carney, 2002). Diğer malign hastalıklar nedeniyle radyoterapi uygulanan hastalar ikinci bir kanser, primer akciğer kanseri açısından risk altındadır (Ak & Metintaş, 2014).

#### 2.1.3.7. Genetik yatkınlık

Akciğer kanseri hastalarının hem sigara içen hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riski 2.4 kat artmıştır (Devereux, Taylor, & Barrett, 1996). Karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir ve çeşitli karsinojenlerin bu süreçte genetik ve epigenetik hasarlara yol açan 202'den fazla mutasyonu bilinmektedir (Coşkunpınar, 2013; Hussain & Harris, 2000). Akciğer kanserinin ailesel geçişli olduğu özellikle de vaka-kontrol çalışmaları ile gösterilmiştir (Gao et al., 1987; Ooi, Elston, Chen, Bailey-Wilson, & Rothschild, 1986).

## 2.1.4. Patoloji

Akciğer kanserinin histopatolojik alt tiplerine göre sınıflandırılması hastalığın evresi, tedavisi ve prognozu hakkında önemli bilgiler sağlar. Yine bu sınıflandırma hastaların tedavisinde uyum sağlamasının yanında epidemiyolojik ve biyolojik çalışmaların temelini oluşturması bakımından da önemlidir. Bu kapsamda yapılan sınıflandırmada akciğer kanserlerinin yaklaşık % 95'inin küçük hücreli dışı akciğer kanseri veya küçük hücreli akciğer kanseri olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda kanser moleküler biyolojisindeki önemli gelişmeler bu kaba sınıflandırmanın yetersiz olduğunu ortaya koymuş ve daha ayrıntılı bir değerlendirmeye ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu ayrıntılı sınıflandırma özellikle hedefe yönelik tedavilerin gelişmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1981'de yapmış olduğu 'Akciğer Tümörleri Sınıflandırması'nı 2004'te yeniden düzenlemiştir.

**Tablo 2.1.** İnvaziv malign epitelyal akciğer tümörleri sınıflaması-DSÖ 2004

---

1. Skuamöz hücreli karsinom
Varyantlar;
Papiller
Berrak hücreli
Küçük hücreli
Bazaloid
2. Küçük hücreli karsinom
Varyant;
Kombine küçük hücreli karsinom
3. Adenokarsinom
Adenokarsinom, miks subtip
Asiner adenokarsinom
Papiller adenokarsinom
Bronkioloalveoler karsinom
Varyantlar:
Non-müsinöz
Müsinöz
Miks müsinöz ve non-müsinöz ya da belirsiz
Müsin salgılayan solid adenokarsinom
Varyantlar:
Fetal adenokarsinom
Müsinöz (kolloid) karsinom
Müsinöz kistadenokarsinom
Taşlı yüzük adenokarsinom
Berrak hücreli adenokarsinom
4. Büyük hücreli karsinom
Varyantlar:
Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Bazaloid karsinom
Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
Berrak hücreli karsinom

---

---

Rabdoid fenotipi ile büyük hücreli karsinom

5. Adenoskuamöz karsinom

6. Sarkomatoid karsinom

Varyantlar:

Pleomorfik karsinom

İğ hücreli karsinom

Dev hücreli karsinom

Karsinosarkom

Pulmoner blastom

7. Karsinoid tümör

Varyantlar:

Tipik karsinoid

Atipik karsinoid

8. Tükrük bezi tümörleri

Varyantlar:

Mukoepidermoid karsinom

Adenoid kistik karsinom

Epitelyal – miyoepitelyal karsinom

---

Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa Ülkeleri'nde skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom insidansının 1990'lı yıllardan itibaren azaldığı, buna karşın adenokarsinom insidansının artmaya başladığı görülmektedir. Bu ülkelerde alt tiplerin görülme sıklığı şu şekildedir: %38 adenokarsinom, %20 skuamöz hücreli karsinom, %5 büyük hücreli karsinom, %13 küçük hücreli karsinom , %18 küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve %6 diğer tiplerdir.

Ülkemizde ise en sık skuamöz hücreli karsinom (%45) görülmekte, bunu küçük hücreli karsinom (%20), adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom izlemektedir. Ancak son yıllarda ülkemizde de adenokarsinom sıklığının ciddi şekilde artmaya başladığı görülmektedir (Ak & Metintaş, 2014).

### **2.1.5. Histopatoloji**

Daha önce 1981 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan akciğer tümörleri sınıflaması daha sonra patolojik tanı yöntemleri ve kriterlerindeki değişikliklerle birlikte 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir (Coşkunpınar, 2013; Travis, Brambilla, Muller-Hermelink, Harris, & Cancer, 2004). Akciğer karsinomlarının iki ana grubu vardır: (Coşkunpınar, 2013).

1) Küçük hücreli dışı (%80.4)

2) Küçük hücreli (%16.8)

Histolojik kriterlere göre yapılan sınıflandırma, klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu için önemlidir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının tek bir grupta toplanmasının nedeni, bu gruptaki karsinom tiplerinin prognozları ve tedavi yaklaşımlarının benzer olmasıdır. KHDAK'de başlıca üç alttip; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomdur.

#### *2.1.5.1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)*

Farklı hücrelerden kökenlenmeleri, tedavi yanıtları ve prognozlarının benzerlik göstermesinden dolayı hepsine ortak bir ad ile KHDAK denilmektedir (Passlick et al., 2000). Metastaz yapma oranı KHAK'a göre çok azdır. Türkiyede en çok rastlanan tipi skuamöz hücreli akciğer kanseridir.

##### *2.1.5.1.1. Skuamöz hücreli karsinom*

En sık görülen akciğer kanseri tipidir. Erkeklerde daha sık görülür (Kargı, 1999). Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-30'u skuamöz hücreli karsinomdur.

##### *2.1.5.1.2. Adenokarsinom*

Genellikle akciğerin periferinden, alveoler yüzey epiteli ya da bronşiyal mukoza bezlerinden kaynaklanır. Sigara ile en az ilişkisi olan akciğer kanseridir. Erkeklerle oranla kadınlarda daha fazla görülür ve diğer alt tiplere nazaran daha genç yaşta ortaya çıkmaktadır (Passlick et al., 2000). Metastazlarını genellikle kemik, santral sinir sistemi, adrenal bezler ve karaciğere yaparlar (Kargı, 1999).

##### *2.1.5.1.3. Büyük hücreli karsinom*

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Santral veya periferik yerleşim gösterebilen, büyük nükleuslu, kötü diferansiye özelliktedir (Passlick et al., 2000). Erken metastaz yaptığından prognozu kötüdür (Kargı, 1999).

#### *2.1.5.2. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)*

Erkeklerde daha sık görülmektedir ve sigara içimi ile ilişkisi en belirgin akciğer kanseridir (Kargı, 1999). Mikroskop altında görülen kanser hücrelerinin boyutu yüzünden küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak adlandırılır. Erken ve yaygın metastaz gösteren agresif bir tümördür (Spivack, Fasco, Walker, & Kaminsky, 1997). Tanı koyulduğunda %80 uzak metastaz yapmıştır.

#### *Karsinoid Tümör*

Tüm akciğer tümörlerinin %1 kadarını oluşturan karsinoidler küçük hücreli akciğer karsinomu gibi bronş mukozasındaki nöroendokrin

hücrelerden kaynaklandıkları düşünülmektedir. Tedavi konusunda iyi bir tanımlama yapılmamıştır, genelde cerrahi yöntem kullanılır. Tipik karsinoidler metastaz olasılığı düşük olan iyi prognozlu tümörlerdir (Coşkunpınar, 2013).

### **2.1.6. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi**

Karsinogenezin temelinde öldürücü olmayan genetik hasarlar vardır (Yang, Schwartz, McAllister, Swanson, & Aston, 1999). Bu genetik hasarlar veya mutasyonlar; kimyasal maddeler, radyasyon, UV gibi çevresel ajanlar ya da virüslerin etkisiyle ortaya çıkabilir. Genetik hasarın hedefi olan genler; onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarımını düzenleyen genlerdir. Karsinogenez, fenotipik ve genetik düzeyde çok basamaklı bir olaydır.

Akciğer kanseri gelişme sürecinde yaklaşık 10-20 genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir (Özkan, 2008). Akciğer karsinogenezinde önemli genetik olaylar; onkogenlerin mutasyona bağlı aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı, hücre döngüsü ve apoptoz regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, DNA onarımında görev alan genlerde meydana gelen değişiklikler ve büyüme faktörleri ile reseptörlerine ilişkin değişikliklerdir (K. M. Fong & Minna, 2002).

DNA hasarının oluşumu, kimyasal karsinogenezin ilk aşamasıdır. Genetik hasarın temelinde, mutasyonlar ve delesyonlar vardır (Donnellan & Chetty, 1998). Bir organizmanın taşıdığı tüm genler, bireyin genotipini, ortaya çıkardığı fiziksel görünüm ve işlevi ise fenotipini oluşturur. Genlerin nükleotid dizilimindeki herhangi bir değişiklik, kodladığı tüm proteinin kopyalarını etkilediği için mutasyonlar bir organizmanın tüm hücrelerinin zarar görmesine neden olabilir. Bir genin, kontrol ya da yapısal bölgesindeki mutasyon, proteinin işlev kazanmasına, kaybetmesine ya da yeni bir özellik kazanmasına neden olur (Sarasin, 2003).

Toplumda %1'den daha yüksek oranda bulunan gen değişimleri polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. Genetik mutasyonlar, bir çeşit genetik polimorfizmdir. Polimorfizmler mutasyonlar gibi bazı DNA bölgelerinde eksilme, artma ve rekombinasyon şeklinde görülse de genomda en çok tek nükleotid polimorfizmi olarak görülürler (Hartl & Clark, 1997).

Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalık riski olan kişilerin ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesini sağlar. Kimyasalları ya da karsinojenleri metabolize eden enzim polimorfizmleri, kalıtsal ya da çevresel olarak hastalık oluşumunda doğrudan etki gösterirken, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler dolaylı etki gösterir (Özkan, 2008). Eğer polimorfizm, enzimi kodlayan bölgede oluşmuş ise vücuttaki enzim seviyesi populasyon içerisinde farklılıklar oluşturur. Enzimlerin bu



polimorfik durumları, çeşitli hastalıklara, özellikle kansere yatkınlık sağlar (Hartl & Clark, 1997).

Akciğer kanserinin oluşumunda diğer kanser tiplerinde olduğu gibi büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücrel aktiviteyi düzenleyen proteinlerin bozulması veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı proteinlerin işlevini yitirmesi rol oynamaktadır. Bu proteinlerin ve proteinleri kodlayan genlerin bir kaç tanımlanmış olmasına rağmen daha birçok tanımlanamamış genetik faktörün akciğer kanseri oluşumunda ve oluşumundan sonra rol oynadığı düşünülmektedir. Bu protein ve proteinleri kodlayan genlerden bazıları ras, myc, bcl-2, erbB-2 gibi onkogenler ile p53, RB, P16 gibi tümör baskılayıcı genlerdir (Alp, 2013; Sagawa et al., 1998).

Ras onkogeni tüm tümör tiplerinde %25 oranında, kolon kanserinde %50 ve akciğer kanserinde %25 oranında bulunur (Alp, 2013). RasK geninin 12. kodonundaki nokta mutasyon akciğer adenokarsinomunda önemli bir genetik değişikliktir (Sagawa et al., 1998).

Myc proteinleri önemli transkripsiyon faktörleridir. Üç tip myc proteini vardır; L-myc, C-myc ve N-myc. Bu üç proteini sentezleyen genlerin akciğer kanseriyle ilişkisi vardır. Bunlardan en önemlisi L-myc'dir. C-myc daha çok meme kanserinde, N-myc ise nöroblastomada önemlidir (Alp, 2013). L-myc onkogeni 1P34 kromozomuna lokalize olmuştur. Hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen transkripsiyonel bir faktördür (Shih et al., 2002). L-myc küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve adenokarsinomda daha az artışa uğrarken küçük hücreli akciğer kanserinde sağlıklı hücreye göre %80-90 daha fazla ifade edilmektedir (Takahashi et al., 1989).

ErbB-2 protoonkogeni (her2/neu olarak da adlandırılır; Human epidermal growth factor 2); tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörünü kodlar. İnsan tümörlerinde erbB-2'nin genellikle arttığı ve aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir (Alp, 2013). ErbB-2 genindeki artış veya fazla ifadelendirilme küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %25 iken, küçük hücreli akciğer kanserinde görülmemiştir (Imyanitov et al., 1992).

p53 mutasyonları küçük hücreli akciğer kanserinde %50, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %80'den fazla görülür (Lee et al., 1995).

p16 mutasyonları küçük hücreli akciğer kanserinde görülmezken, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %50 oranında görülür (Andujar et al., 2010).

RB'nın küçük hücreli akciğer kanserinin %80'inde, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin %40'ında mutasyona uğradığı belirlenmiştir (Shimizu et al., 1997).

### **2.1.7. Polimorfizm**

Genetik polimorfizmler toplumda bulunma frekansı yüksek, bir gen veya DNA dizisindeki değişikliklerdir. DNA dizisindeki bu değişiklikleri mutasyondan ayıran özellik, en az 100 kişiden 1'inde bulunmasıdır. Genetik polimorfizmlerin en yaygın türü tek baz çifti varyasyonu içeren tek nükleotid polimorfizmleridir (Shenfield, 2004).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genomda tek bir nükleotidin (A,T,C veya G) bir başkasıyla yer değiştirdiğinde oluşan DNA dizi değişimleridir (Vignal, Milan, SanCristobal, & Eggen, 2002).

Bazı gen polimorfizmleri bir hastalık riskini arttırırken bazıları azaltabilmekte (koruyucu alel), bazı polimorfik aleller ise yalnızca çevresel bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir (Ekmekçi, Konaç, & Önen, 2008).

## **2.2. Notch Sinyal Yolağı**

Kansere neden olan 250'nin üzerinde gen tanımlanmıştır ve çeşitli mekanizmaların bu genler aracılığıyla insan kanserlerine sebep olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmalar henüz tamamlanmamıştır ancak son olarak onkogenlerin büyük çoğunluğunun bu yolaklarda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu yolaklar aynı zamanda normal hücrelerinde çoğalmasını, farklılaşmasını, yaşamını ve fonksiyonunu düzenleyen sistemlerdir. Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma, farklılaşmanın bloke edilmesi, azalmış apoptoz, değişmiş doku yapısı gibi karakteristik özelliklere sahiptir ve kanser hücrelerinde bu yolakların aktivitesi artmış veya inaktive edilmiştir. Bazı kanser yolakları spesifik bir kanser türüne neden olurken, diğerleri malignant tümörlerin geniş bir aralığında kritik rollere sahip olabilirler. Bir "kansere ilişkili yolak" en azından bir insan kanserinin gelişimi için bir genetik veya epigenetik mutasyonla aktivasyonu veya inaktivasyonu gerekli olan bir hücresel regülatör sistemdir. Tipik olarak kanser yolakları bir kanser tipine veya farklı kanser tiplerine sahip bireylerde aynı regülatör sistemlerin farklı bileşenlerindeki değişimlerle ortaya çıkabilirler (Schulz, 2005).

Bu son kriterlere göre çeşitli düzenleyici sistemler, prototipik kanser yolakları olarak değerlendirilebilir. Bunlar MAPK yolağı, TP53 düzenleyici sistemi ve RB1 yolağı etrafında yoğunlaşmış olan hücre döngüsü düzenleme ağından oluşmaktadır. Bu yolakların hepsi birbiri ile etkileşim halindedir. Bunlar aynı zamanda PI3K yolağı, PKC kinazlar, STAT yolağı, NFkB yolağı ve TGFβ yanıt yolağı gibi diğer yolaklar ve proteinlerle de bağlantılıdır. Üçüncü bir kanser yolağı grubu da WNT ve Hedgehog yanıt yolağı ve Notch regülatör sisteminden oluşmaktadır (Pazarbaşı et al., 2011).

Notch yolağına ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de rastlanmıştır ve insandan ziyade model organizmalarda gelişimdeki fonksiyonu daha yoğun

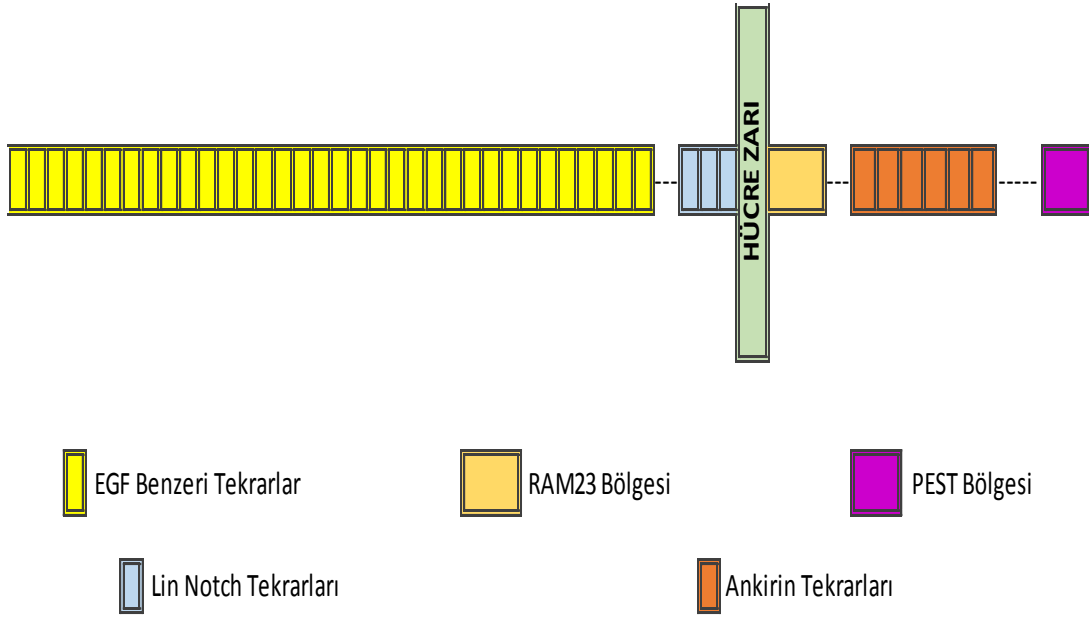
olarak çalışılmıştır. Şu anda bir insan kanseri yolağı olduğu kesin olarak ispatlanmıştır ve aynı zamanda Alzheimer hastalığında bir faktör olarak nitelendirilir. Kanserde etkinliği bilinen TGFB ve STAT yolakları gibi Notch yolağı da farklı hücre tiplerinde fonksiyon kaybı ya da aşırı aktivite gibi farklı özellikler göstererek kanser gelişimine neden olur (Krauss, 2006; Pazarbaşı et al., 2011; Schulz, 2005).

Notch yolağı kök ve öncü hücre katmanlarını kontrol eder. Karakteristik fonksiyonu iki yönlü hücre akıbeti kararlarının regülasyonudur. Bu, hücrenin bir doku öncülü olarak mı kalacağı veya epiderminin bazal tabakasında olduğu gibi farklılaşmaya mı gideceği kararlarını da içerir. Notch sinyalleşmesi aynı zamanda farklılaşmış bir intestinal hücrenin bir enterosit mi, goblet hücresi mi olacağı veya lenfosit hattında T hücre veya B hücresi alt hatlarına mı geçeceği ile ilgili kararları da içerir (Pazarbaşı et al., 2011).

### **2.2.1. Notch sinyal yolağı elementleri**

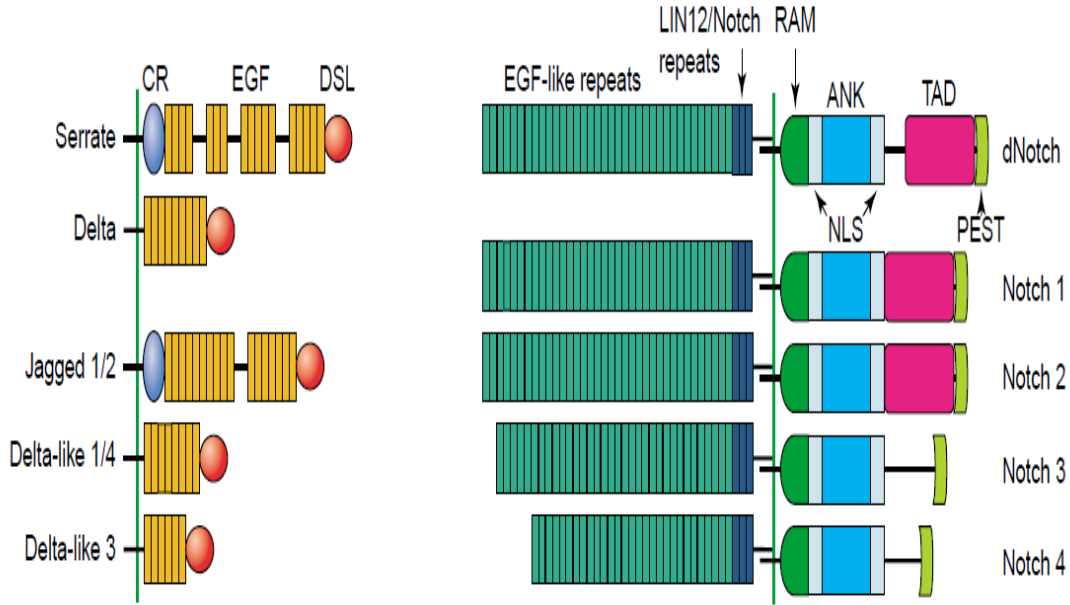
Notch sinyali evrim süresince korunmuş, gelişim döneminde hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan hücre etkileşim mekanizmalarından biridir. Notch sinyal yolağı organ oluşumunu ve morfogenezini etkileyerek proliferasyonda, farklılaşmada ve apoptozda düzenleyici rol oynar (Artavanis-Tsakonas, Rand, & Lake, 1999).

Notch, komşu hücreler ile liganlar aracılığıyla iletişim kurarak hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan bir proteindir. İlk olarak *Drosophila melanogaster*'de karakterize edilen Notch geni 300 kd'luk tek geçişli transmembran reseptörü kodlar. Notch reseptörü hücre içi ve hücre dışı kısımlar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Büyük ekstraselüler bölge 36 ardışık EGF (Epidermal Growth Factor) benzeri tekrar ve 3 sisteince zengin LIN 12 tekrarı bulundurur. EGF tekrarları Notch reseptörünün ligandlarla etkileşimini sağlar. Notch reseptörünün hücre içi kısmına Notch hücre içi bölge (Notch Intraselüler Domain: NICD) de denir. Hücre içi bölgede ise; 6 ardışık ankirin tekrarı, RAM 23 bölgesi, bir glutamin zengin bölge (opa) ve prolin, glutamat, serin ve treonince zengin PEST bölgesi bulunur (Şekil 2.1). RAM 23 domaini ve ankirin tekrarları Notch reseptörünün nükleustaki transkripsiyon faktörleri ile bağlantısını güçlendirir (Kidd, Kelley, & Young, 1986; Wharton, Johansen, Xu, & Artavanis-Tsakonas, 1985).



**Şekil 2.1.** NOTCH3 reseptörünün yapısı

Memelilerde dört Notch geni (Notch 1, 2, 3, 4) bulunur. Notch sinyal sisteminin temel elementleri; Notch reseptörü, DSL (Delta ve Serrate Benzeri) Ligandlar ve CSL (omurgalılarda **CBF1/RBPJK-kappa**, *Drosophila*'da **Su(H)**, *C. elegans*'ta **Lag 1**) DNA bağlayıcı proteinlerdir. Notch reseptörünün ligandları Delta benzeri ligandlar (DLL1, DLL3 ve DLL4) ve Serrate Benzeri ligandlar (JAG1 ve JAG2) olmak üzere iki gruba ayrılır (Şekil 2.2). Hücre hücre etkileşimlerinde bir hücrede Notch reseptörü diğer hücrede ise Notch ligandı bulunur (Acar et al., 2008; Miele, 2006; Ohishi et al., 2000). Komşu hücrelerde notch reseptörü ve ligandları eksprese olur. Eğer hücrelerin birinde diğerine göre ligand fazla ise o hücre sinyalci rolüne bürünür (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).



**Şekil 2.2.** Notch reseptörleri ve DSL bigandları (Dallman, Smith, Benson, & Lamb, 2005)

### 2.2.2. Notch sinyal yolağının aktivasyonu

Notch reseptörü ve ligandları arasındaki etkileşim farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücre kaderinin kararlarını yöneten bir sinyal kaskadını başlatır (Ohishi et al., 2000).

Aktivasyonu sırasında Notch reseptörü en azından 3 kere ayrılma işlemine maruz kalır. İlk olarak Notch reseptörünün biyosentez işleminin bir parçası olarak, golgi içinde furin-benzeri proteazlar Notch proteinlerini heterodimerlere dönüştürür. Bu ayrılma 'S1 ayrılması' olarak adlandırılır ve aktif hücre içi bölgenin (NICD) ligand indüklü salınımı ile ilgili değildir, fakat Notch reseptörünün hücre yüzey ifadesi için gereklidir. Notch reseptörü sentez işleminden sonra olgunlaşarak hücre zarına yerleşir. Bir transmembran protein olan Notch reseptörü hücre içi bölge, hücre dışı bölge ve zarı kateden bölge olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Notch reseptörü ligandı ile hücre dışı bölge aracılığıyla bağlantı kurar. Bu bağlantıyı sağlayan Notch reseptörünün hücre dışı bölgesinde yer alan EGF benzeri tekrarlarıdır. Ayrıca ligandlar da reseptörlerle DSL bölgeleri aracılığıyla bağlantı kurarlar. Ligand reseptör bağlantısı gerçekleştiği zaman ikinci ayrılma gerçekleşir. Bu ayrılma 'S2 ayrılması' olarak adlandırılır ve Notch'un hücre dışı bölgesi serbest kalır. Bu proteolitik ayrılma işlemi hücre zarında bulunan ADAM17 metalloproteazın katkısıyla olur. 'S3 ayrılması' olarak adlandırılan üçüncü ayrılma hemen sonrasında gerçekleşir. Transkripsiyonel olarak aktif olan hücre içi kısım (NICD) zardan ayrılır ve böylece aktive Notch oluşur. Son ayrılma da proteolitik bir işlemdir ve bu işlemde yine zarıya yer alan presenilin ve nicastrin bünyesinde bulunduran Gamma sekretaz kompleksi sorumludur. Gamma sekretaz Notch'un karboksil ucunu (NICD) keser ve NICD sitoplazma

içinde serbest kalır. Aktive Notch bundan sonra bir taşıyıcı protein aracılığıyla nükleusa geçer (Kramer, 2000).

NICD'nin nükleustaki metabolizması E3 ubikutin ligazlar ile ubikütinasyon ve fosforilasyon ile kontrol edilir. Fosforilasyona maruz kalan NICD aktif haldedir. NICD ubikütinlenerek yıkıma uğrarsa hücre eski haline gelir ve Notch sinyalinin bir sonraki turu için hazırlanır (Kopan, 2002).

Nükleusta NICD ile bağlantı kurduğu bilinen tek transkripsiyon faktörü CSL'dir. NICD'nin yokluğunda CSL, histon deasetilazlar (HDACs) veya korepresörlerle bağlantılı halde bulunur ve transkripsiyonel olarak baskılanmış haldedir. NICD'nin CSL'ye bağlanması ile birlikte NICD korepresör kompleksinin yerine geçer ve aktif haldeki NICD/CSL histon asetilazlara (HATs) veya Mastermind/Lag3'e bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edip kromatin yeniden düzenlenmesini sağlayabilir. Ayrıca NICD/CSL kompleksi Notch ilişkili transkripsiyon faktörlerinden RBPJK ile bağlantı kurarak da hedef genlerin transkripsiyonunu sağlayabilir (Kopan, 2002).

### **2.2.3. Notch, apoptoz ve kanser**

#### *2.2.3.1. Apoptoz*

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak adlandırılır ve tüm çok hücreli organizmalarda gelişim sırasında düzgün organogenezi yöneten ve doku homeostazını sağlayan önemli bir işlemdir. Örneğin; uzuvların gelişimi sırasında bağımsız parmakların oluşumu için fazladan hücreleri seçici olarak yok eder. Ayrıca immün sistemin olgunlaşması sırasında görevini yitirmiş T hücrelerinin yıkımından da sorumludur. Yine apoptoz hücrelere geri dönüşümsüz zararlar veren iyonize radyasyon gibi dış etkilere karşı hücrel savunma mekanizması olarak görev yapar (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972).

Düzenli embriyonik gelişim ve normal doku homeostazisi; hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu içeren bir seri moleküler işlemde oluşur. Bu işlemlerden herhangi birinde devamlı olarak oluşan bir aksaklık kanserin gelişimine katkıda bulunur. Özellikle apoptozdaki kusurlar neredeyse tüm kanser tiplerinde görülmektedir (Dang, 2012).

Notch sinyal yolağı hem embriyonik gelişimde hem de organ homeostazında hücre kaderinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Notch hücre döngüsü, gelişim ve sağ kalım ile ilgili yolları içeren geniş ağlar boyunca apoptozu düzenler (Dang, 2012).

Notch sinyal yolağı ve p53 ve NF-KB sinyal yolları arasındaki ilişki apoptozu çeşitli yollardan etkileyerek kanserleşme sürecine katkıda bulunabilir.

### 2.2.3.2. Notch - p53 sinyal yolaklar ve kanser

p53; hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe eder ve DNA hasarından sonra apoptozu başlatarak hücre döngüsü regülatörü olarak görev yapar. Bir hücre DNA'ya zarar veren kemoterapotik, UV ışık veya iyonize radyasyon gibi ajanlara maruz kaldığı zaman p53 ekspresyonu artar bu da p21 aktivasyonu ile sonuçlanır ve nihayetinde hücre döngüsü bloke edilir. Bu noktada, hasarlı hücre hasarın geri dönüşümlü olup olmadığına bağlı olarak ya tamir edilir ya da apoptozu yönlendirilir (Vousden & Lane, 2007). p53 geninde oluşan inaktive edici mutasyonlar tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında görülür.

INK4a/ARF bir tümör baskılayıcıdır ve normalde Mdm2 (murine double minute) ile birlikte bulunarak Mdm2'yi inaktive eder. INK4a/ARF ile Mdm2 ayrıldığında Mdm2'nin yarı ömrü uzar. Ortamda serbest Mdm2 bulunduğunda, p53 Mdm2 tarafından Mdm2'nin E3 ubiquitin-ligaz aktivitesi sayesinde inaktive edilir. Bu da p53'ün hasarlı hücreyi apoptozu yönlendirmesini engeller (Ladanyi et al., 1993; Sanchez-Cespedes et al., 1999).

Notch sinyal yolağı apoptoz ve kanser üzerindeki etkisinden dolayı p53 sinyal yolağı ile ilişkilidir. Aktive olmuş Notch'un ekspresyonu p53 ekspresyonu ile negatif olarak ilişkilidir (Beverly et al., 2005).

Notch sinyal yolağı çeşitli mekanizmalarla p53 ekspresyonunu ve aktivitesini baskılamaktadır. Aktive olmuş Notch bir tümör süpressör olarak görev yapan INK4a/ARF'nin ekspresyonunu baskılar, bu da daha fazla Mdm2'nin serbest kalmasına yol açar. Ortamda fazla miktarda bulunan Mdm2 p53'e bağlanarak onun degradasyonuna neden olur (Beverly et al., 2005). Ayrıca Notch ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan RBJK p53 promotörü ile bağlanarak p53'ün transkripsiyonunu engelleyebilir (Boggs, Henderson, & Reisman, 2009). Notch sinyal yolağı bu mekanizmalar aracılığıyla kanserde p53 fonksiyonlarını baskılar ve böylece kanserleşme sürecine katkıda bulunur (Dang, 2012).

### 2.2.3.3. Notch - NF- $\kappa$ B sinyal yolakları ve kanser

Nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B), B hücrelerinde inhibitör kappa (I $\kappa$ ) zincirinin ekspresyonunu düzenleyen nükleer faktördür. NF- $\kappa$ B sinyal yolağı immünite, çoğalma, inflamasyon ve apoptoz gibi çok sayıda hücrel fonksiyonda çeşitli roller oynar. Kanserleşme sürecinde bu sinyal yolağı onkogeneze her yönden katkıda bulunur (Basseres & Baldwin, 2006).

Memelilerde bu ailenin 5 üyesi vardır; Sınıf 1: NF- $\kappa$ B1 (p50 ve onun prekürsörü p105) ve NF $\kappa$ B2 (p52 ve onun prekürsörü p100) ve Sınıf 2: (RelA-p65, RelB, cRel). Bu proteinler homodimer ve heterodimer yapıda olabilir.

NF- $\kappa$ B dimerleri normalde sitoplazmada I $\kappa$ B ile bağlı inaktif halde bulunurlar. TNF- $\alpha$ , IL-1, virüsler, DNA'ya zarar veren ajanlar gibi çeşitli uyarılara maruz kalındığı zaman I $\kappa$ B Kinaz (IKK) kompleksi uyarılır ve bu da I $\kappa$ B'nin fosforlanarak yıkımı ile sonuçlanır. I $\kappa$ B'nin inhibitör etkisi olmayınca NF- $\kappa$ B dimerleri serbest kalır ve hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmek üzere çekirdeğe geçerler (Dang, 2012).

NF- $\kappa$ B'nin en iyi bilinen fonksiyonu hücre sağ kalımını desteklemesi ve apoptozu inhibe etmesidir (Beg, William, Bronson, Ghosh, & Baltimore, 1995; White, Roy, & Gilmore, 1995). Apoptoz üzerinde Notch sinyalinin etkisi; NF- $\kappa$ B yolağında Notch'un regülasyonu ile olur. RBP-JK, NF- $\kappa$ B yolağında promoter element olarak görev yapar ve NF- $\kappa$ B prekürsör p100'ün transkripsiyonunu baskılar. Aktive Notch varlığında RBP-JK'nın promoter aktivitesi indüklenir ve bu da transkripsiyonun artmasına neden olur (Cheng et al., 2001). RBP-JK ayrıca I $\kappa$ B- $\alpha$ 'nın transkripsiyonunu baskılar ve NICD varlığında transkripsiyon benzer olarak tekrar aktive edilir (Oakley et al., 2003).

Apoptozu düzenlemede Notch'un NF- $\kappa$ B yolağını nasıl düzenlediğine dair modeller;

Birinci modelde ; aktive Notch p50, Re1A, Re1B ve cRe1 NF- $\kappa$ B genlerinin transkripsiyonunu uyarır. RBP-JK, bir Notch CSL proteini, normalde bu genlerin transkripsiyonunu baskılar. NICD varlığında transkripsiyon aktive edilir.

İkinci modelde ; NICD NF- $\kappa$ B'ye bağlanmak için I $\kappa$ B- $\alpha$  ile yarışır. Aktive Notch (NICD) sitoplazmik I $\kappa$ B'ye benzerlik gösteren 6 ankirin tekrarı içerir. I $\kappa$ B- $\alpha$  ile inhibe olan NF- $\kappa$ B dimerleri NICD ile ilişki kurunca serbest kalır ve bu da onların aktivasyonuyla sonuçlanır.

Diğer bir modelde ise; NICD IKK'ya bağlanarak I $\kappa$ B'nin fosforilasyonunu artırır ve yıkımı ilerletir. Böylece serbest kalan NF- $\kappa$ B dimerlerinin aktivitesi artar (Dang, 2012).

Bütün bu mekanizmalar aracılığıyla Notch NF- $\kappa$ B'nin apoptozu inhibe etme fonksiyonuna NF- $\kappa$ B aktivitesini artırarak dahil olur ve böylece kanserleşme sürecine katkıda bulunur.



## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. Gereç**

#### **3.1.1. Araştırma grubu**

Bu çalışma, **2014/164** sayılı ve **12.06.2014** tarihli etik kurul kararı ile onayı alınan ve **2011-2012** yılları arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi **Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na** başvuran akciğer kanseri tanısı konulmuş 100 hasta ve 100 sağlıklı birey ile gerçekleştirildi.

#### **Çalışma aşamalarımız şu şekildedir:**

1. Akciğer kanseri hastası ve sağlıklı kontrollerin periferel arterlerinden EDTA'lı tüpe 10 ml kan alınımı
2. Kandan PureLink™ Genomic DNA İzolasyon Kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu
3. DNA'nın miktar ve kalitesinin Nano drop (Mikro Ölçekli Spektrofometre) ile ölçümü
4. İzole edilen DNA'dan NOTCH3 geni C381T ve A684G gen bölgelerinin PCR'da çoğaltılması
5. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve UV translüminatörde görüntülenmesi
6. C381T ve A684G gen bölgelerinin uygun restriksiyon enzimleri ile kesimi
7. Elde edilen kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve UV translüminatörde görüntülenmesi
8. Çekilen jel görüntülerinden faydalanılarak genotiplerin belirlenmesi ve istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi.

#### **3.1.2. Kullanılan cihaz ve gereçler**

1. Buzdolabı (Bosch)
2. Soğutmalı santrifüj (Scanspeed 1580 R)
3. Su banyosu (GFL)
4. Hassas terazi (Presica 125 A)
5. Vorteks (IKA- MS2 minishaker)
6. Derin dondurucu (-20) (Bosch)
7. Mikro dalga fırın (Arçelik MD 55 I)
8. Elektroforez için güç kaynağı (Bio-Rad power Pac- 3000)
9. PCR cihazı (Runik Thermal cyler)(Sacem)
10. UV translüminatör (Syngene)

11. Otomatik pipet seti(Bio Hit)
12. Çeker ocak
13. Mikro Ölçekli Spektrofometre (ATCGene ASP-3700)
14. Buz makinesi (Hoshizaki FM- 120 DE)

### **3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler**

1. Deiyonize su (dH<sub>2</sub>O)
2. DNA örneklerini saklama kutusu
3. Polypropilen kapaklı tüp (0.2 ml)
4. Polypropilen kapaklı tüp (1.5 ml)
5. Eldiven (Steril)
6. Steril mikropipet ucu (100-1000 µl)
7. Steril mikropipet ucu (10-100 µl)
8. Steril mikropipet ucu (0,5-10 µl)
9. 10x TBE Buffer
10. PCR için Master Mix
11. C381T Bölgesi için Primer çifti
12. A684G Bölgesi için Primer çifti
13. Agaroz
14. Nükleik Asit Jel Boyası
15. Marker ( 50 bç)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) kullanıldı.

#### *İzolasyon Prensipleri*

PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, spin ile kolon bazlı nükleik asit izolasyonu tekniğini kullanmaktadır. Bu teknik katı bir faz kullanarak nükleik asitlerin hızlı bir şekilde saflaştırılmasını sağlamaktadır. Nükleik asitlerin bağlandığı bu katı faz, genellikle silika bazlı bir zardan meydana gelmektedir. PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, hücreleri lize eden ve hücre proteinlerini denatüre eden kaotropik tuzların varlığında silika bazlı zara DNA'yı seçici olarak bağlamaktadır. Guanidin hidroklorid tuzu kaotropik tuz olarak kit çözeltisinde kullanılmıştır. Kit kullanma klavuzu, izolasyon protokolü sonunda isteğe göre 25-200 µl aralığında elüsyon solüsyonu kullanılabileceğini bildirmiştir.

#### *İzolasyon Protokolü*

- Su banyosu 55°C olarak ayarlandı.
- EDTA'lı tüpe alınmış taze kandan steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kondu. Eğer kan +4°C'de birkaç gün bekletilmiş ise yavaşça alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra tam kan halinde mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Kit solüsyonları içerisinde bulunan proteinaz K'dan 20 µl, mikrosantrifüj tüpündeki örnek üzerine eklendi.
- Yine kit solüsyonları içerisinde bulunan RNAaz A'dan 20 µl, örnek üzerine eklendi. Karışım iyice vortekslendi. Daha sonra karışımın oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyonu yapıldı.
- Karışım üzerine kit solüsyonları içerisinde bulunan PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer'dan 200 µl eklenerek homojen bir solüsyon elde etmek için mikrosantrifüj tüpü iyice vortekslendi.
- Proteinlerin parçalanmasını teşvik etmek için karışım su banyosunda 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra lizat üzerine 200 µl %98,9'luk etil alkol eklendi. Homojen bir solüsyona ulaşmak için mikrosantrifüj tüpü 5 saniye iyice vortekslendi.
- Kit ambalajı içerisinde bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş PureLink™ Spin Column çıkarıldı.

- PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer ve etil alkol ile birlikte yaklaşık olarak 640 µl gelen lizat, mikrosantrifüj tüpünden alınarak PureLink™ Spin Column içerisine aktarıldı.
- İçerisinde lizat bulunan PureLink™ Spin Column, oda sıcaklığında 1 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında içerisinde atık solüsyon bulunan toplama tüpü atıldı. PureLink™ Spin Column, kit ambalajı içerisinde bulunan yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş PureLink™ Spin Column içerisine kit solüsyonları ile birlikte verilen ve protokol öncesinde etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 1 eklendi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında 1 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken toplama tüpü atılarak PureLink™ Spin Column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- PureLink™ Spin Column içerisine kit solüsyonları ile birlikte verilen ve protokol öncesinde etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 2 eklendi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken toplama tüpü atıldı. PureLink™ Spin Column, 2 ml'lik, kapağı koparılmış, steril mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek kapağı açıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- PureLink™ Spin Column içerisine 50 µl PureLink™ Genomic Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında, PureLink™ Spin Column altında bulunan mikrosantrifüj tüpü saflaştırılmış genomik DNA içeren yaklaşık olarak 50 µl çözeltiye sahipti.
- Üst kısımdaki PureLink™ Spin Column, DNA içeren mikrosantrifüj tüpünden çıkarılarak steril yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- PureLink™ Spin Column içerisine 50 µl PureLink™ Genomic Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.

- Yeni santrifüj tüpüne yerleşik PureLink™ Spin Column, oda sıcaklığında maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında PureLink™ Spin Column altında bulunan mikrosantrifüj tüpü saflaştırılmış genomik DNA içeren yaklaşık olarak 50 µl çözeltiye sahipti.
- Saflaştırılmış genomik DNA içeren birinci ve ikinci santrifüj tüpleri birleştirilerek genotip analiz zamanına kadar -20'de saklandı.

İlk 50 µl'lik elüsyon muamelesi, silikaya bağlanmış DNA'nın yaklaşık olarak %80'ni elde etmekte, ikinci 50 µl'lik elüsyon muamelesi ise geri kalan kısmı yakalamayı sağlamaktadır.

### **3.2.2 Çalışma dizaynı**

Çalışmamız kapsamında araştırılan gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu için öncelikle veri bankası analizleri ve literatür değerlendirmeleri yapılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda aşağıda belirtilen primer dizilerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

C381T (rs3815188) ve A684G (rs1043994) bölgeleri için veri bankası analizleri yapılmış ve bu gen bölgeleri NCBI ve Ensembl genom veri tabanında taranmıştır. Primerlerin yerleştiği sekanslar ve restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri belirlenip restriksiyon fragmentlerinin uzunlukları tespit edilmiştir (Şekil 3.2. ve 3.5.).

Bununla birlikte yapılan veri bankası değerlendirmesi sırasında G684A (rs1043994) bölgesindeki atasal alelin A aleli olduğu ve varyasyonun 684A>G (A684G) olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5.).

### **3.2.3. İzole edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu**

#### **3.2.3.1. Kullanılan çözeltiler**

##### **Master miks**

PCR karışımı için içinde taq polimeraz, dNTP karışımı ve uygun tampon çözeltiler bulunan PCR master miks kullanıldı. Master miks içeriği şu şekildedir; 20 mM Tris-HCl (ph 8,9), 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 22 nM NH<sub>4</sub>Cl, 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP ,dNTP, dTTP), %5lik gliserol, %0,06 IGEPAL CA-630, %0,05 Tween 20, Xylene Cyanol FF, Tartrazine, 25 ünit/ml One Taq DNA polimeraz.

## Primer

C381T ve A684G bölgeleri için üretici firmadan temin edilen liyofilize primerler ddH<sub>2</sub>O ile 100µM'lik konsantrasyonda hazırlandı ve stok primer çözeltisi olarak kullanıldı. Daha sonra bu stok çözeltiden 5µM ve 10µM konsantrasyonda dilüsyonlar yapıldı. C381T bölgesi için 5µM, A684G bölgesi için 10µM derişimindeki primer çözeltileri kullanıldı.

Çalışmamızda C381T ve A684G gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri şu şekildedir;

### C381T Gen Bölgesi için Kullanılan Primerler

#### C381T Gen Bölgesi için:

**Forward Primer:** 5'-TGT GCT GCC CAA CCA AGC CA-3'

**Reverse Primer:** 5'-ACT GAC CAC ACC CCC GAC TA 3'

#### A684G Gen Bölgesi için:

**Forward Primer:** 5'-TAG TCG GGG GTG TGG TCA GT -3'

**Reverse Primer:** 5'-CCT CTG ACT CTC CTG AGT AG- 3'

#### 3.2.3.2. Amplifikasyon şartları

Araştırma grubu bireylerinden elde edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için 25 µl lik karışım hazırlandı. PCR amplifikasyon hazırlığı DNA, PCR miks, forward-reverse primer ve su ile hazırlandı ve Thermal Cycler cihazında yürütüldü. PCR reaksiyonları, primer dizileri ve annealing ısıları aşağıda özetlenmiştir.

PCR reaksiyonu	25 µl
Master mix	12,5 µl
Primer F (5-10 µM)	0,5 µl
Primer R (5-10 µM)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	10,5 µl
DNA	1 µl

Her bir DNA örneği için hem C381T hem de A684G primerleri kullanılarak ayrı ayrı PCR işlemi yapıldı.

C381T için PCR şartları;

<b>94 °C de</b>	<b>30 sn</b>		
<b>94 °C de</b>	<b>20 sn denatürasyon</b>	}	<b>30 Döngü</b>
<b>59.4 °C de</b>	<b>1 dk bağlanma</b>		
<b>68 °C de</b>	<b>90 sn sn uzama</b>		
<b>68°C de</b>	<b>5 dk son bağlanma</b>		

G684A için PCR şartları;

<b>94 °C de</b>	<b>30 sn</b>		
<b>94 °C de</b>	<b>20 sn denatürasyon</b>	}	<b>30 Döngü</b>
<b>61.8 °C de</b>	<b>1 dk bağlanma</b>		
<b>68 °C de</b>	<b>90 sn sn uzama</b>		
<b>68°C de</b>	<b>5 dk son bağlanma</b>		

+4 °C de bekleme olmak üzere amplifikasyon şartları düzenlendi.

### **3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için % 3'lük agaroz jeli hazırlandı ve örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutuldu.

#### **3.2.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri**

##### **10 X Tris borat EDTA (TBE) buffer**

- Bir mezür içine 108 g tris base, 50 g borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH=8) kondu.
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

### **%3'lük agaroz jelin hazırlanması**

• 3 gr agaroz tartılıp bir beher içerisinde TBE buffer ile 100 ml'ye tamamlandı.

• Mikrodalga fırında kaynatıldı.

• Yaklaşık 60 dereceye kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 µl nükleik asit jel boyası eklendi.

• Elektroforez başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlendi.

• Jel donduktan sonra üzeri 1XTBE Buffer ile dolduruldu.

• 14 µl PCR ürünü alınıp jeldeki kuyucuklara yüklendi (her jelin bir kuyusuna marker yüklendi).

• Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek 100 voltta 30 dakika yürütüldü.

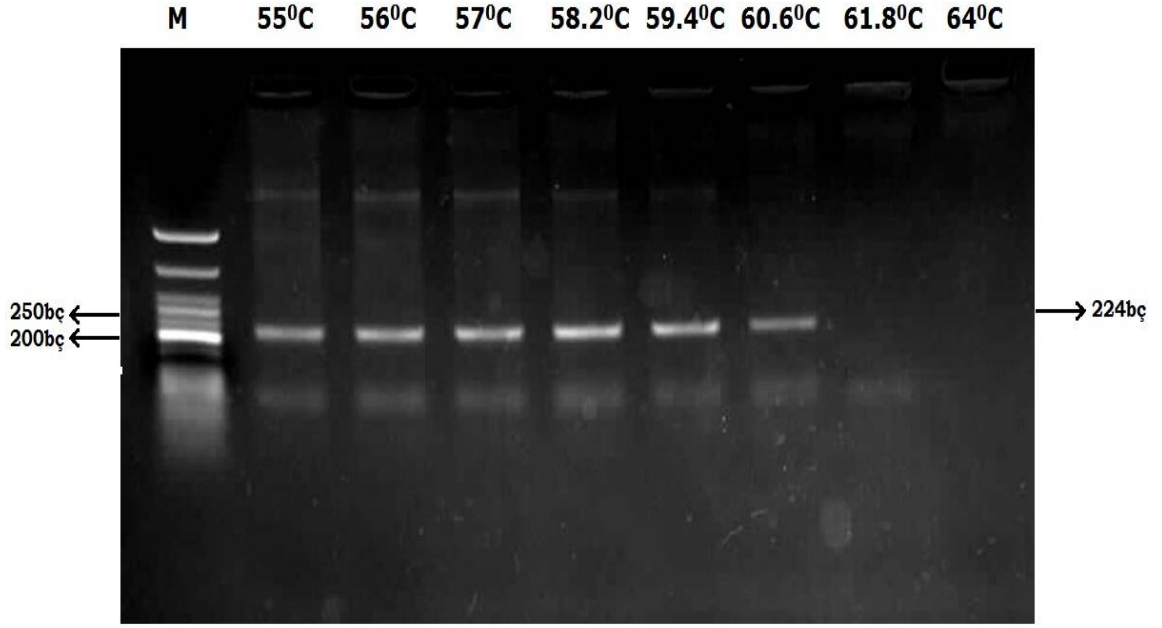
• Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, CCD kamera altında incelenerek fotoğrafı çekildi.

### **3.2.5. Jelin CCD kamera ile değerlendirilmesi**

#### **C381T Gen Bölgesi**

C381T bölgesinin toplam uzunluğu 224 bç'dir. C381T bölgesi için yapılan gradiyent çalışmasında jelde sırasıyla 55, 56, 57, 58.2, 59.4, 60.6, 61.8 ve 64 °C sıcaklıklar kullanılarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda Şekil 3.1'de görüldüğü 224 bç'lik bantlar elde edilmiştir ve en parlak bantın gözlemlendiği ve non-spesifik bant açısından en temiz olan sıcaklık bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir. Bu sıcaklık C381T bölgesi için 59.4 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1.).





**Şekil 3.1.** C381T gen bölgesinde optimum PCR ürünü elde etmek için yapılan PCR çalışmaları

C381T bölgesi için forward ve reverse primerler uygun bölgelere yerleştirildiğinde oluşan tam dizi 224 bç olarak bulunmuştur. Enzim kesim bölgeleri, C alleli ve T alleli varlığında kesim bölgelerinin değişimleri ve oluşan kesim bölgelerinin uzunlukları Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

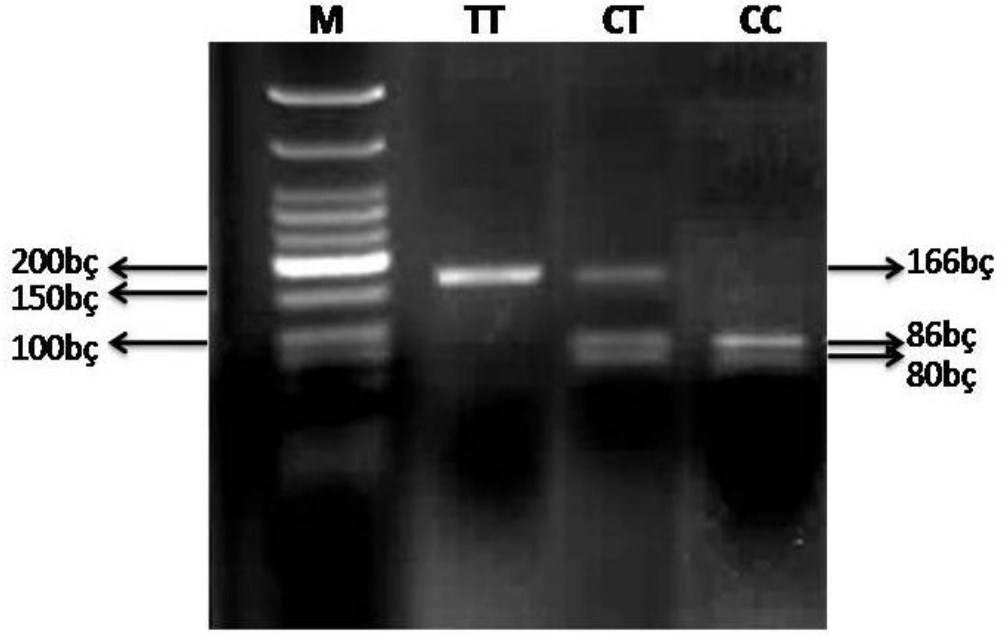
C381T gen bölgesinin restriksiyon enzimi (AciI) kesimi için hazırlanan tek örneklik kesim şartları ve miktarları aşağıdaki gibidir.

Malzeme Adı	Miktarı (µl)
Cut smart	1.5
AciI	0.1
Su	1.4
PCR ürünü	12

AciI enzimi ile kesim sırasında yabancı tip allel (C alleli) varlığında jelde dört kesim bölgesi (86 bç, 80 bç, 38 bç, 20 bç) oluşmaktadır. Polimorfizm görülüp C alleli T alleli ile yer değiştirdiğinde ise üç kesim bölgesi (166 bç, 38 bç, 20 bç) oluşmaktadır. Burada belirleyici bantlar C alleli için 86 ve 80 bç'lik, T alleli için 166 bç'lik bantlardır (Şekil 3.3).

<b>PRİMER DİZİLERİ</b>	C381T FORWARD : 5' TGTGCTGCCCAACCAAGCCA 3' C381T REVERSE : 5' ACTGACCACACCCCGACTA 3'
<b>TAM DİZİ</b>	TGTGCTGCCCAACCAAGCCA TCTCTGCCACAGGTGCC <b>CCGC</b> CTGGCTGGGT GGGTGA <b>GCGG</b> TGTCAGCTGGAGGACCCCTGTCACTCAGGCCCTGTGCTG GCCGTGGTGTCTGCCAGAGTTCAGTGGTGGCTGGCA <b>CCGC</b> CCGATTCTCAT GCCGGTGCCCCGTGGCTTCCGAGGTGAGAGGGGAAGAGTCTGGAGGGGA GGTAGTCGGGGGTGTGGTCAGT
<b>ENZİM KESİM BÖLGESİ</b>	5'...C <sup>∨</sup> CGC...3' 3'...GGC <sup>∨</sup> G...5'
<b>C ALLELİ</b>	TGTGCTGCCCAACCAAGCCA TCTCTGCCACAGGTGCC <b>C (38)</b>  <b>CGC</b> CTGGCTGGGTGGGTGAG <b>G (20)</b>  <b>CGG</b> TGTCAGCTGGAGGACCCCTGTCACTCAGGCCCTGTGCTGGCCGTGG TGTCTGCCAGAGTTCAGTGGTGGCTGGCA <b>C (80)</b>  <b>C</b> <b>GC</b> CCGATTCTCATGCCGGTGCCCCGTGGCTTCCGAGGTGAGAGGGGA GAGTCTGGAGGGGAGGTAGTCGGGGGTGTGGTCAGT <b>(86)</b>
<b>T ALLELİ</b>	TGTGCTGCCCAACCAAGCCA TCTCTGCCACAGGTGCC <b>C (38)</b>  <b>CGC</b> CTGGCTGGGTGGGTGAG <b>G (20)</b>  <b>CGG</b> TGTCAGCTGGAGGACCCCTGTCACTCAGGCCCTGTGCTGGCCGTGG TGTCTGCCAGAGTTCAGTGGTGGCTGGCA <b>CTGC</b> CCGATTCTCATGCCGGT GCCCGGTGGCTTCCGAGGTGAGAGGGGAAGAGTCTGGAGGGGAGGTAGT CGGGGGTGTGGTCAGT <b>(166)</b>

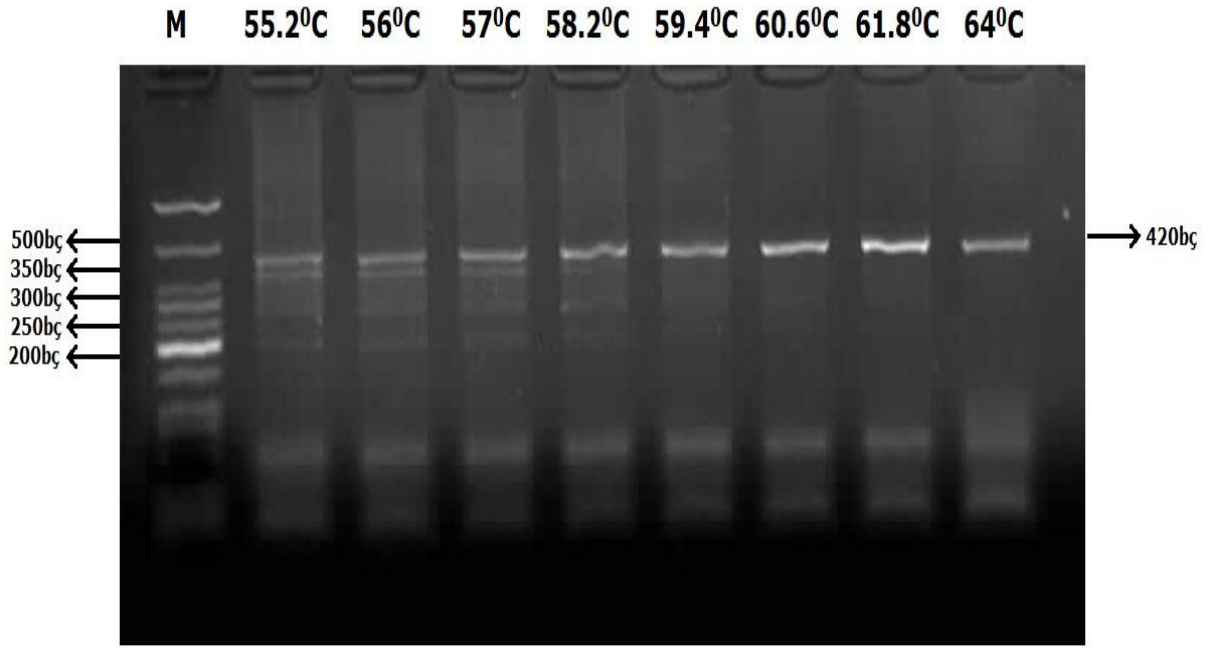
**Şekil 3.2.** NOTCH3 C381T bölgesinin enzim kesim bölgeleri



**Şekil 3.3.** AclI enzimi ile kesilen C381T gen bölgesi

### **A684G Gen Bölgesi**

A684G bölgesinin toplam uzunluğu 420 bç'dir. G684A bölgesi için yapılan gradiyent çalışmasında jelde sırasıyla 55.2, 56, 57, 58.2, 59.4, 60.6, 61.8 ve 64<sup>0</sup>C sıcaklıklar kullanılarak amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda Şekil 3.4'de görüldüğü gibi 420 bç'lik bantlar elde edilmiştir ve en parlak bantın gözlendiği ve non-spesifik bant açısından en temiz olan sıcaklık bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir. Bu sıcaklık A684G bölgesi için 61.8 <sup>0</sup>C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** A684G gen bölgesinde optimum PCR ürünü elde etmek için yapılan PCR çalışmaları

A684G bölgesi için forward ve reverse primerler uygun bölgelere yerleştirildiğinde oluşan tam dizi 420 bç olarak bulunmuştur. Enzim kesim bölgeleri, A alleli ve G alleli varlığında kesim bölgelerinin değişimleri ve oluşan kesim bölgelerinin uzunlukları Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

A684G gen bölgesinin restriksiyon enzimi (MwoI) kesimi için hazırlanan tek örneklik kesim şartları ve miktarları aşağıdaki gibidir.

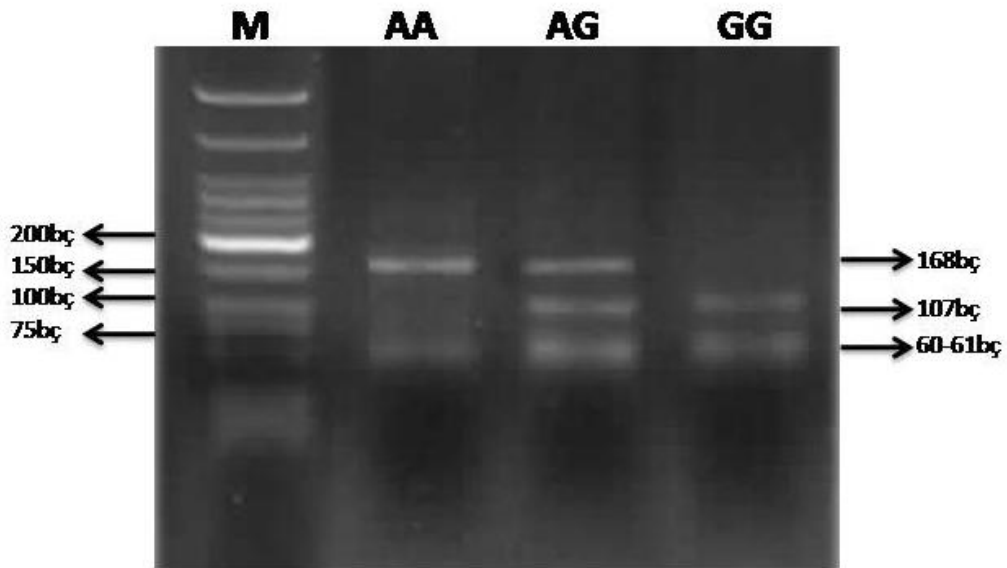
<b>Malzeme Adı</b>	<b>Miktarı (µl)</b>
Cut smart	1.5
MwoI	0.2
Su	1.3
PCR ürünü	12

MwoI enzimi ile kesim sırasında yabancı tip allel (A alleli) varlığında sekiz kesim bölgesi (168 bç, 60 bç, 57 bç, 44 bç, 37 bç, 30 bç, 15 bç, 9 bç) oluşmaktadır. Polimorfizm görülüp A alleli G alleli ile yer değiştirdiğinde ise jelde dokuz kesim bölgesi (107 bç, 61 bç, 60 bç, 57 bç, 44 bç, 37 bç, 30 bç, 15 bç, 9 bç) oluşmaktadır. Burada belirleyici bantlar G alleli için 107 ve 61 bç'lik, A alleli için 168 bç'lik bantlardır (Şekil 3.6).

<b>PRİMER DİZİLERİ</b>	G684A FORWARD : 5' TAGTCGGGGGTGTGGTCAGT 3' G684A REVERSE : 5' CCTCTGACTCTCCTGAGTAG 3'
<b>TAM DİZİ</b>	<p><b>TAGTCGGGGGTGTGGTCAGT</b>CCTAAACTCACCCCTGTCCTGGTCCCTCCAGG  CCCTGACTGCTCCCTGCCAGATCCCTGCCTCAGCAGCCCTTGTGCCACGGT  GCCCCGCTGCTCAGTGGGGCCCGATGGACGCTTCCTCTGCTCCTGCCACCT  GGCTACCAGGGCCGCAGCTGCCGAAGCGACGTGGATGAGTGCCGGGTGGG  TGAGCCCTGCCGCATGGTGGCACCTGCCTCAACACACCTGGCTCCTCCG  CTGCCAGTGTCCAGCTGGCTACACAGGGCCACTATGTGAGAACCCCGCGGT  GCCCTGTGCACCCTCACCATGCCGTAACGGGGGCACCTGCAGGCAGAGTGG  CGACCTCACTTACGACTGTGCCTGTCTTCCTGGTGAGTGAGCC<b>CTACTCAGG</b>  <b>AGAGTCAGAGG</b></p>
<b>ENZİM KESİM BÖLGESİ</b>	5'...GCNNNNN~NNGC...3' 3'...CGNN~NNNNCG...5'
<b>A ALLELİ</b>	<p><b>TAGTCGGGGGTGTGGTCAGT</b>CCTAAACTCACCCCTGTCCTGGTCCCTCCAG<b>G</b>  <b>CCCTGA (57)</b></p> <p>CT<b>GC</b>TCCCTGCCAGATCCCTGCCTCAGCAGCCCTTGT<b>GC</b>CCACG <b>(44)</b></p> <p>GT<b>GC</b>CCGCTGCTCAGTGGGGCCCGATGGAC<b>GC</b>TTCT <b>(37)</b></p> <p>CT<b>GC</b>TCCT<b>GC</b>CCACC <b>(15)</b></p> <p>TG<b>GC</b>TACCA <b>(9)</b></p> <p>GG<b>GC</b>CGCAGCTGCCGAAGCGACGTGGATGAGTGCCGGGTGGGTGAGCCCT  GCC<b>GC</b>CATGG <b>(60)</b></p> <p>TG<b>GC</b>ACCTGCCTCAACACACCTG<b>GC</b>TCCTT <b>(30)</b></p> <p>CC<b>GC</b>TGCCAGTGTCCAGCTGGCTACACAGGGCCACTATGTGAGAACCCCGC  GGTGCCCTGTGC<b>A</b>CCCTCACCATGCCGTAACGGGGGCACCTGCAGGCAGA  GTGGCGACCTCACTTACGACTGTGCCTGTCTTCCTGGTGAGTGAGCC<b>CTACT</b>  <b>CAGGAGAGTCAGAGG (168)</b></p>

<b>G ALLELİ</b>	TAGTCGGGGGTGTGGTCAGTCTAAACTCACCCCTGTCCTGGTCCCTCCAGG CCCTGA (57)
	CTGCTCCCTGCCAGATCCCTGCCTCAGCAGCCCTTGTGCCACG (44)
	GTGCCCGCTGCTCAGTGGGGCCCGATGGACGCTTCCT (37)
	CTGCTCCTGCCACC (15)
	TGGCTACCA (9)
	GGGCCGCAGCTGCCGAAGCGACGTGGATGAGTGCCGGGTGGGTGAGCCCT GCCGCATGG (60)
	TGGCACCTGCCTCAACACACCTGGCTCCTT (30)
	CCGCTGCCAGTGTCCAGCTGGCTACACAGGGCCACTATGTGAGAACCCCGC GGTGCCCTGT (61)
	GCCTCACCATGCCGTAACGGGGGCACCTGCAGGCAGAGTGGCGACCT CACTACGACTGTGCCTGTCTTCTGGTGAGTGAGCCCTACTCAGGAGAGTC AGAGG (107)

**Şekil 3.5.** NOTCH3 A684G bölgesinin enzim kesim bölgeleri



**Şekil 3.6.** MwoI enzimi ile kesilen A684G gen bölgesi

### **3.2.6. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi**

Hasta ve kontrollerde alel ve genotip dağılımını Pearson Ki-Kare analizleriyle değerlendirildi. Genotip ve alellerin ODDS oranları (OR) ikili lojistik regresyon analizi ile değerlendirildi.  $P < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi. Tüm analizler IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamız kapsamında 100 hasta ve 100 kontrol bireyin C381T polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltıldı ve *AciI* enzimi kullanılarak örneklerin enzim kesimi gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, Tablo 4.1'de de görüldüğü gibi 100 akciğer kanseri hastasından oluşan grupta C381T polimorfizmi açısından, 146 adet C aleli (%73) ve 54 adet T aleli (%27) olduğu tespit edildi. 100 bireyden oluşan kontrol grubunda ise 123 adet C aleli (%61,5) görülürken, 77 adet T aleli (%38,5) tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu alel frekansı bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,014$ ).

Genotipler açısından değerlendirildiğinde, 100 Akciğer kanseri hastasının 46'sı (%46) CC genotipi, 54'ü (%54) CT heterozigot genotipi belirlenmiştir. Kontrol grubunun ise 25'i (%25) CC genotipi, 2'si (%2) TT genotipi, 73'ü (%73) CT heterozigot genotipi belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ( $p= 0,002$ ). (Tablo 4.1) (Grafik 4.1)

A684G polimorfizmini belirleyebilmek için 100 hasta ve 100 kontrol bireyin ilgili bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve *MwoI* enzimi kullanılarak örneklerin enzim kesimi gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda, Tablo 4.1'de de görüldüğü gibi 100 akciğer kanseri hastasından oluşan grupta A684G polimorfizmi açısından, 104 adet A aleli (%52) ve 96 adet G aleli (%48) olduğu tespit edildi. 100 bireyden oluşan kontrol grubunda ise 133 adet A aleli (%66,5) görülürken, 67 adet G aleli (%33,5) tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu alel frekansı bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,003$ ).

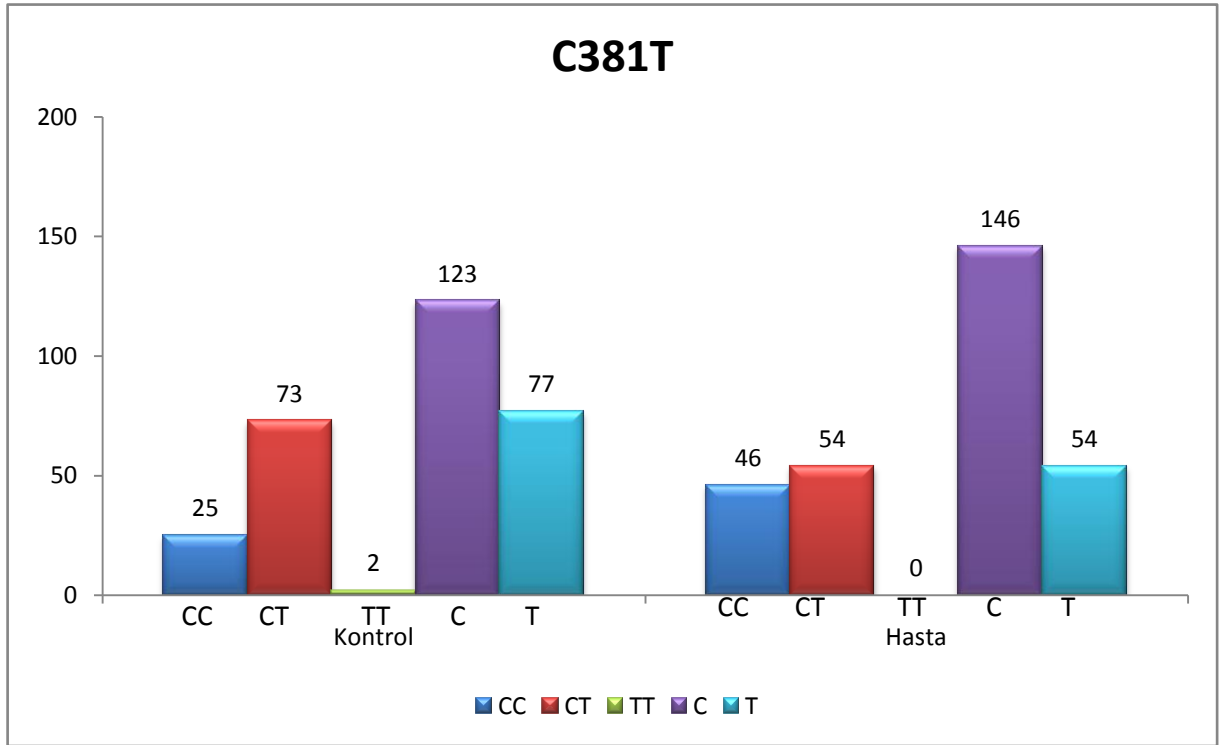
Genotipler açısından değerlendirildiğinde, 100 Akciğer kanseri hastasının 9'u (%9) AA genotipi, 5'i (%5) GG genotipi, 86'sı (%86) AG heterozigot genotipi belirlenmiştir. Kontrol grubunun ise 39'u (%39) AA genotipi, 6'sı (%6) GG genotipi, 55'i (%55) AG heterozigot genotipi belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu genotip frekansı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark elde edilmiştir ( $p= 0,000$ ). (Tablo 4.1) (Grafik 4.3)



**Tablo 4.1.** C381T ve A684G polimorfizmi genotip ve alel frekansları

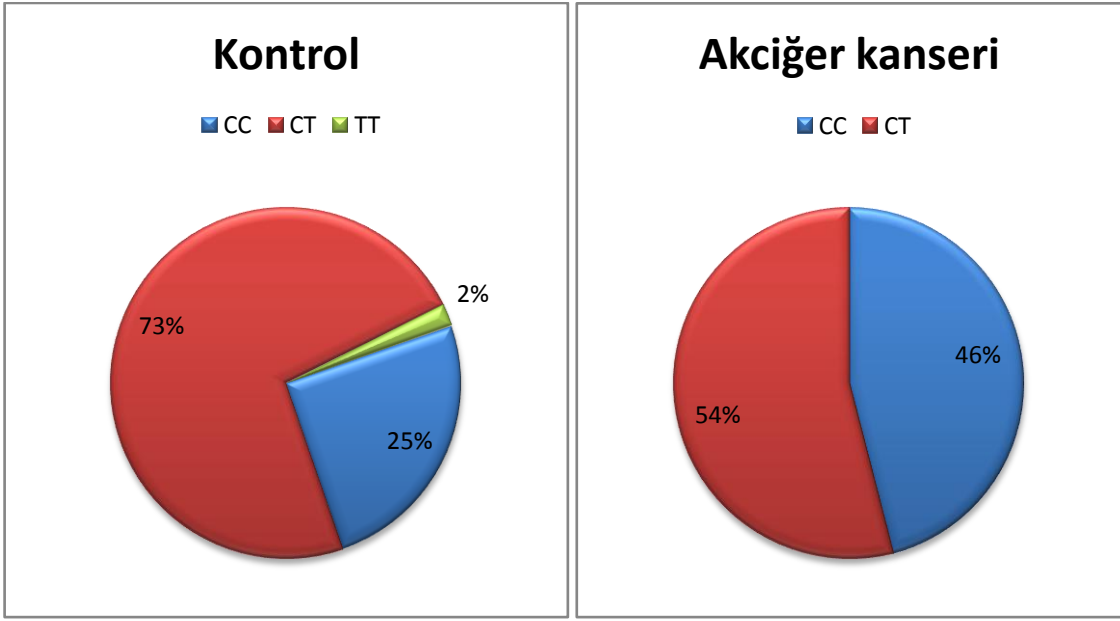
		GENOTİP				ALEL		
C381T	n	CC (%)	CT (%)	TT (%)	P	C (%)	T (%)	P
Kontrol	100	25 (25)	73 (73)	2 (2)	0.002	123 (61.5)	77 (38.5)	0.014
Akciğer Kanseri	100	46 (46)	54 (54)	0 (0)		146 (73)	54 (27)	
A684G	n	AA (%)	AG (%)	GG (%)	P	A (%)	G (%)	P
Kontrol	100	39 (39)	55 (55)	6 (6)	0.000	133 (66.5)	67 (33.5)	0.003
Akciğer Kanseri	100	9 (9)	86 (86)	5 (5)		104 (52)	96 (48)	

p<0,05 değerleri önemli bulundu.

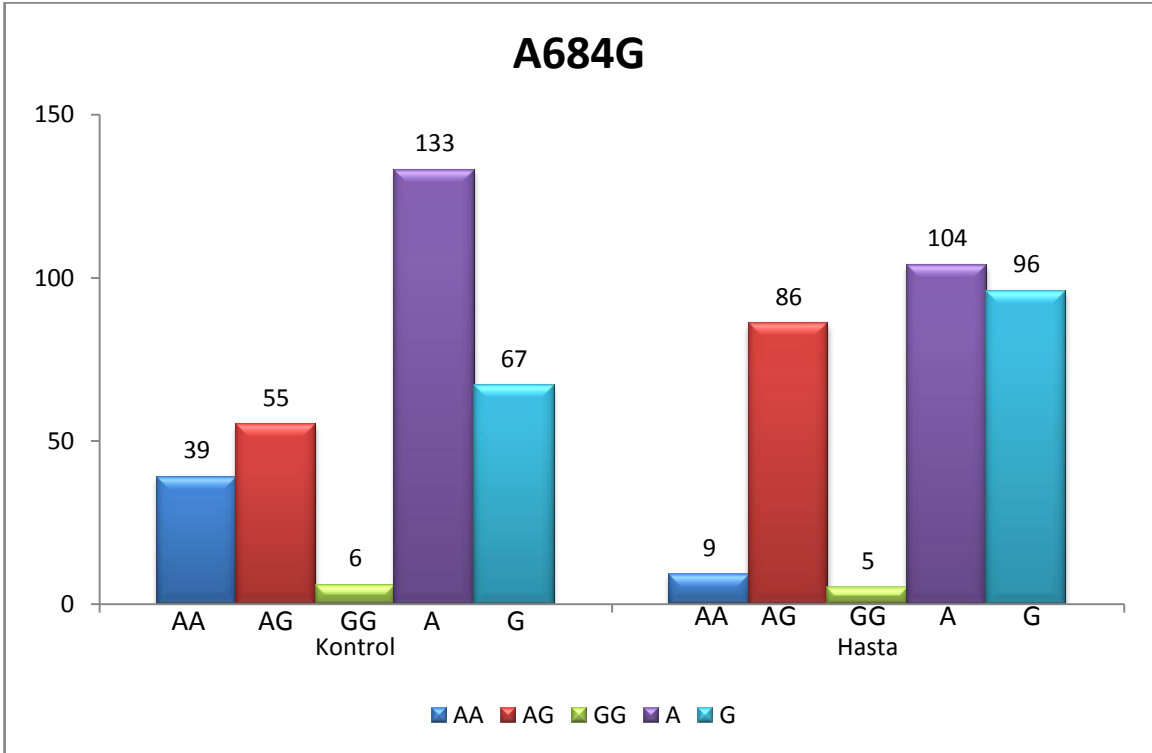


**Grafik 4.1.** C381T polimorfizmi genotip ve alel frekansları grafiği

## C381T BÖLGESİ

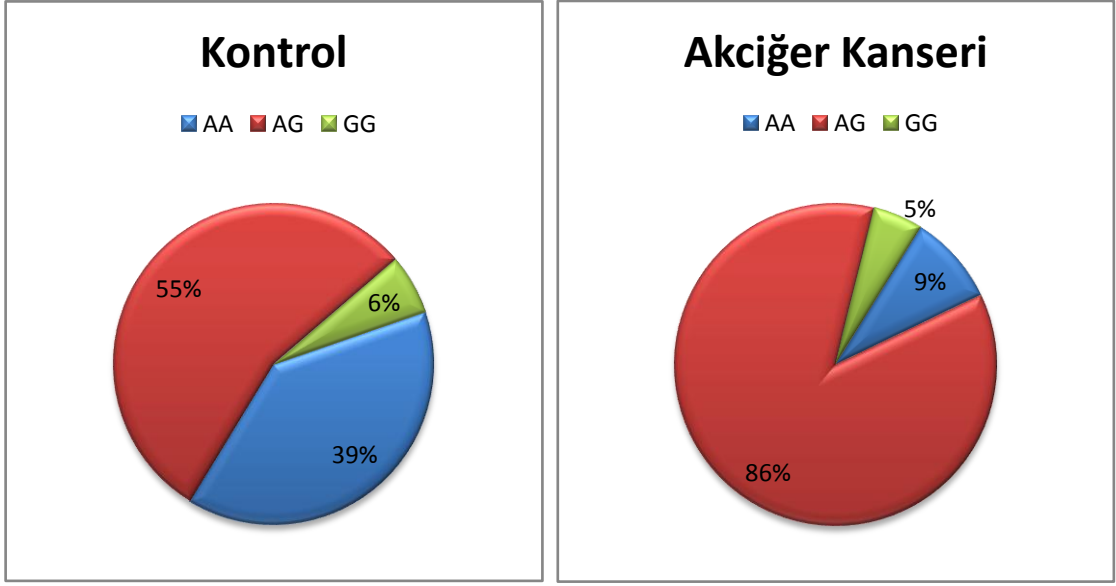


**Grafik 4.2.** C381T genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı



**Grafik 4.3.** A684G polimorfizmi genotip ve alel frekansları grafiği

## A684G BÖLGESİ



**Grafik 4.4.** A684G genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı

Aleller ile hastalık arasında risk olup olmadığını belirlemek amacıyla risk analizi yapılmış olup, buna göre C381T polimorfizmine bakıldığında; T aleli frekansının hasta ve kontrol grubu açısından C aleli ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (OR=2,627 ve p=0,001). C aleli bulunduran bireylerin hastalık riski T aleli bulunduran bireylere göre 2,627 kat daha fazladır (Tablo 4.2.).

A684G polimorfizmine bakıldığında ise; G aleli frekansı hasta ve kontrol grubu açısından A aleli ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (OR=3,389 ve p=0,000). G aleli bulunduran bireylerin hastalık riski A aleli bulunduran bireylere göre 3,389 kat daha fazladır (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Alele göre hastalık riski

<b>HASTALIK RİSKİ (ALEL)</b>					
<b>C381T</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>Alt limit</b>	<b>Üst limit</b>
C/T	10,421	0,001	2,627	1,461	4,721
<b>A684G</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>Alt limit</b>	<b>Üst limit</b>
G/A	14,665	0,000	3,389	1,814	6,329

$p < 0,05$  değerleri önemli bulundu.

Genotipler açısından risk faktörleri değerlendirildiğinde, C381T polimorfizmi için CT genotip frekansı hasta ve kontrol grubu açısından CC ile karşılaştırıldığında (OR=2,487 ve  $p=0,003$ ) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CC genotipi bulunduran bireylerde hastalık görülme riski CT genotipi bulunduran bireylere göre 2.487 kat artmaktadır. Bu değerlendirmede C381T polimorfizmi için TT genotip frekansının hasta ve kontrol grubu açısından CC genotipi ile karşılaştırılması yapılmamıştır. Kontrol grubunda TT genotipi bulunmaması ve örnek hacmi yetersizliğinden dolayı TT genotipi dikkate alınmamıştır (Tablo 4.3).

A684G polimorfizmi için genotipler açısından risk faktörleri değerlendirildiğinde AG ve GG genotip frekansı hasta ve kontrol grubu açısından AA ile karşılaştırıldığında (OR=6,776 ve  $p=0,000$  , OR=3,611 ve  $p=0,070$ ) AG genotipi için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, GG genotipi için istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. AG genotipi bulunduran bireylerde hastalık görülme riski AA genotipi bulunduran bireylere göre 6,776 kat artmaktadır (Tablo 4.5).

**Tablo 4.3.** Genotipe göre hastalık riski

<b>HASTALIK RİSKİ (GENOTİP)</b>					
<b>C381T</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>Alt limit</b>	<b>Üst limit</b>
CC/CT	8,838	0,003	2,487	1,364	4,545
<b>A684G</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>Alt limit</b>	<b>Üst limit</b>
AG/AA	21,979	0,000	6,776	3,045	15,078
GG/AA	3,275	0,07	3,611	0,899	14,507

$p < 0,05$  değerleri önemli bulundu.

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri hava yolu epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan genetik değişikliğin fenotipe yansıdığı bir hastalıktır (Ak & Metintaş, 2014). Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken günümüzde en sık görülen kanser tiplerinden biridir ve erkeklerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kadınlarda da sıklığı giderek artmaktadır ve kadınlar arasında sigara içme oranının yükselmesi akciğer kanseri insidansındaki artışın sebebi olarak gösterilmektedir (Coşkunpınar, 2013; Kiyohara & Ohno, 2010; Kligerman & White, 2011; Köktürk et al., 2004; Rayet & Gelinas, 1999).

Akciğer kanseri gelişim sürecinde yaklaşık 10-20 genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir (Özkan, 2008). Akciğer karsinogenezinde önemli genetik olaylar; onkogenlerin mutasyona bağlı aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı, hücre döngüsü ve apoptoz düzenlenmesinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, DNA onarımında görev alan genlerde meydana gelen değişiklikler ve büyüme faktörleri ile reseptörlerine ilişkin değişikliklerdir (K. M. Fong & Minna, 2002).

Akciğer kanserinin oluşumunda diğer kanser tiplerinde olduğu gibi büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücresel aktiviteleri düzenleyen proteinlerin bozulması veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı proteinlerin işlevini yitirmesi rol oynamaktadır. Bu proteinlerin ve proteinleri kodlayan genlerin bir kaç tanımlanmış olmasına rağmen daha birçok tanımlanamamış genetik faktörün akciğer kanseri oluşumunda ve sonrasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu protein ve proteinleri sentezleyen genlerden bazıları; ras, myc, bcl-2, erbB-2 gibi onkogenler ve p53, RB, P16 gibi tümör baskılayıcı genlerdir (Alp, 2013; Sagawa et al., 1998).

Notch sinyal yolağı karsinogenezde önemli role sahiptir. Günümüzde kanser ilişkili bir yolak olduğu kesin olarak ispatlanmıştır ve farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücre kaderinin kararlarını yöneten bir sinyal yolağını başlatır. Son yıllarda akciğer kanseri ve diğer kanser tipleri ile Notch sinyal yolağının ilişkisini araştırmayı amaçlayan pek çok çalışma yapılmaktadır.

Notch sinyal yolağı, kanserlerde kemik metastazında önemli rol oynar. Bu yolak göğüs ve prostat kanserinde kemiklere metastaza katkıda bulunur fakat NSCLC'de bu yöndeki etkisi henüz net değildir. Liu ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada NSCLC'de kemiklere metastazın görüldüğü durumlarda NOTCH3'ün aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (L. Liu et al., 2014).

Min Zhou ve arkadaşları 2013 yılında yetişkin akciğer kanserinde NOTCH3 reseptör proteininin ekspresyon analizini yapmışlardır. Notch sinyal

sistemindeki anormalliklerin bronşlarla ilgili kanserlerde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada yetişkin akciğer kanserli hastalarda NOTCH3'ün ifadesinin primer bronşiyal kanserin patolojisindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Notch mRNA'sının ekspresyonunun akciğer adenokarsinoma grubunda normal akciğer grubundan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Zhou et al., 2013).

Yuan-zi Ye ve arkadaşları, 2013 yılında, Çin'de küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) hastalarda NOTCH3'ün ekspresyonunu değerlendirmek ve onun prognozu ile ilişkisini belirlemek için immünohistokimya ve western blot tekniklerini kullandılar. Ameliyatla tedavi altındaki 131 hastadan kanser dokusuna komşu olup kanser olmayan akciğer dokuları ve NSCLC dokuları alınarak NOTCH3 ifadesinin belirlenmesi için 5 yıl süren bir araştırma planladılar. 131 hastadan 67'sinde NOTCH3'ün yüksek ekspresyonu gözlemlendi ve ekspresyonun bitişik kanser olmayan dokulardan daha yüksek olduğu görüldü. NSCLC'de NOTCH3'ün ifade edildiği hastalarda tüm yaşam zamanının daha kısa olduğu ve NOTCH3'ün NSCLC için bağımsız bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (Ye et al., 2013).

Fuming Yi ve arkadaşları 2013 yılında Notch sinyal yolağı kanserin oluşumunun yanı sıra gelişimde de önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Çalışmada NOTCH3'ün akciğer kanseri gelişimi ve sağkalım için önemli olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir (Yi, Amarasinghe, & Dang, 2013).

Yapılan bir çalışmada memelilerde NOTCH3 reseptörünün akciğer doku gelişimi ve akciğer karsinogenezi ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Akciğer kanserli dokularda ve hücre hatlarında NOTCH3 reseptörünün ekspresyonunu belirlemek için immünohistokimya ve western blot teknikleri uygulanmıştır. Hücresel farklılaşma ve lenf nodu metastazı görülen tümör dokularında NOTCH3 reseptörünün ekspresyonu normal dokulara göre daha yüksek bulunmuştur (Chang et al., 2009).

Yapılan diğer bir çalışmada Notch sinyal yolağının onkogenezi de içeren kritik embriyonik gelişim yolağı olduğu ve NSCLC'de tümörögenezden sorumlu kanser kök hücrelerinin korunmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında NOTCH3'ün özellikle insan akciğer kanseri hücre hatlarında regülasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Osanyingbemi-Obidi, Dobromilskaya, Illei, Hann, & Rudin, 2011).

Jun Konishi ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada NOTCH3'ün apoptozu düzenleyerek ve EGFR/MAPK yolağı işbirliği yaparak akciğer kanserinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Konishi et al., 2009).

Jun Konishi ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise Notch sinyalinin birçok kanser tipinde kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu ve Notch reseptörü aktivasyonunun inhibe edilmesinin

tedavide strateji olabileceği belirtilmiştir. NOTCH3 aktivasyonunun gamma sekretaz inhibitörü kullanılarak inhibisyonu proliferasyonu azaltıp, apoptozu indükler. Bu da akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi için yeni bir yaklaşımdır (Konishi et al., 2007).

NOTCH3'ün akciğer kanserindeki rolü ile ilgili ekspresyon ve hücre kültürü çalışmaları bulunmasına rağmen bu gen üzerindeki polimorfizmlerin hastalık ile ilişkisinin araştırıldığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. 2014 yılında yapılan bu çalışmada Chunlei ve arkadaşları tarafından NSCLC hastalarının prognozu ve kemoterapiye yanıtlarıyla NOTCH3 proteininin ve gen polimorfizmlerinin ilişkisi araştırılmış ve NSCLC'nin farklı evrelerindeki 594 hasta ile çalışılmıştır. Tümörlü dokularda NOTCH3 ekspresyonu ve gen polimorfizmleri belirlenmiştir. NOTCH3 605 C-T ve 1735 T-C gen polimorfizmlerinin genotip ve alel frekansları ile kemoterapiye iyi veya kötü yanıt verme arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. Ancak yüksek NOTCH3 ekspresyonunun görüldüğü tümörlerin kemoterapiye daha fazla direnç gösterdiği görülmüştür. Ayrıca NOTCH3 ekspresyonunun yüksek olduğu hastalar NOTCH3 ekspresyonunun düşük olduğu hastalardan daha zayıf prognoza sahip olduğu saptanmıştır. İn vitro çalışmalarda NSCLC hücrelerinde NOTCH3 inhibisyonunun çoğalma, göç ve yayılma yeteneklerini baskıladığı ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Çalışmada NOTCH3'ün ilerlemiş NSCLC'nin prognozunda ve kemoterapiye yanıtın belirlenmesinde marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Shi, Qian, Ma, Zhang, & Han, 2014).

Menon ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada migrende sırasıyla ekson 3 ve 4'te bulunan C381T ve G684A tek nükleotid polimorfizmlerinin rolü araştırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında 275 migrenli ve 275 kontrol birey C381T polimorfizmi açısından kıyaslandığında C381T varyantı ve migren arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Yine bu hasta ve kontrol grupları için G684A varyantı da migrenle önemli derecede ilişkili bulunmuştur. Takip eden çalışmada 300 migren ve 300 kontrol birey kullanılarak aynı polimorfizmler değerlendirilmiş ve C381T varyantı ile migren arasında bir ilişki gösterilemezken, G684A varyantı tekrar migrenle önemli derecede ilişkili bulunmuştur (Menon et al., 2011).

Menon ve arkadaşları (Menon et al., 2011) gibi yapılan bazı çalışmalarda (Wang et al., 2000); (J. Liu et al., 2009); (Schwaag et al., 2006) G684A bölgesi için atasal alel G ve varyasyon değişikliği G>A olarak ifade edilmiş olmasına rağmen, genom browser veri tabanları (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs1043994>, <http://www.ensembl.org/>) ve güncel literatürlerde ((Joutel & Debette, 2011); (J. C. Fong, 2015)) belirtildiği gibi rs1043994 varyasyonu 684. pozisyonundaki A alelinin G aleli ile değişmesi ile meydana gelmekte ve atasalalelin de A aleli olduğu belirtilmektedir. Paralel olarak bizim çalışmamızdaki kontrol bireylerdeki yaygın alel de A alelidir.



Çalışmamızda, C381T polimorfizmi genotip ve alel frekansları ile akciğer kanseri arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Yine çalıştığımız ikinci bölge olan A684G polimorfizmi genotip ve alel frekansları ile akciğer kanseri arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, NOTCH3 geninin çalıştığımız bölgeleri ile ilgili başka hastalık türlerinde polimorfizm çalışmaları yapılmış olmasına rağmen akciğer kanseri ile C381T ve A684G bölgeleri arasında ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri sıklıkla aile öyküsünün eşlik ettiği sigara dumanı ve asbest maruziyeti sonucu oluşan kötü prognozlu, düşük sağ kalımlı ve ölümcül bir hastalıktır. Tüm dünyada ve ülkemizde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Akciğer kanserinin oluşumunda diğer kanser tiplerinde olduğu gibi büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücrel aktiviteyi düzenleyen proteinlerin bozulması veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayı proteinlerin işlevini yitirmesi rol oynamaktadır. Akciğer kanseri ve karsinogenezle ilgili araştırmalara her gün bir yenisi eklenmekte olup, hastalığın moleküler nedenlerinin belirlenmesi ve yeni geliştirilen terapilerin hedeflenmesi günümüz kanser araştırmalarının ana hedefidir.

Biz de araştırmamızda karsinogenezde önemli role sahip olan, günümüzde kanser ilişkili bir yolak olduğu kesin olarak ispatlanmış farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücre kaderinin kararlarını yöneten bir sinyal yolağı olan Notch sinyal yolağının akciğer kanseri ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla NOTCH3 geni C381T ve A684G bölgelerinin polimorfizm durumlarını değerlendirdik.

Akciğer kanseri hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında NOTCH3 geni polimorfizmine ait C381T gen bölgesinin alel ( $p=0,014$ ) ve genotip frekansı ( $p=0,002$ ) istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

Yine akciğer kanseri hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında NOTCH3 geni polimorfizmine ait A684G gen bölgesinin alel ( $p=0,003$ ) ve genotip frekansı ( $p=0,000$ ) istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

Akciğer kanseri ile sağlıklı kontrol grubu C381T bölgesi için hastalık riski CT genotip frekansı açısından CC ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,003$ ). Türk toplumunda NOTCH3 geni C381T polimorfizmi için CC genotipinin artması durumunun akciğer kanseri için risk faktörü olduğu belirlenmiştir. CC genotipini bulduran bireylerin CT genotipini bulduran bireylere göre hastalık riski 2,487 kat artmaktadır.

Akciğer kanseri ile sağlıklı kontrol grubu A684G bölgesi için hastalık riski AG ve GG genotip frekansı açısından AA ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,000$ ). Türk toplumunda NOTCH3 geni A684G polimorfizmi için AG genotipinin artması durumunun akciğer kanseri için risk faktörü olduğu belirlenmiştir. AG genotipini bulduran bireylerin AA genotipini bulduran bireylere göre hastalık riski 6,776 kat artmaktadır.

Akciğer kanseri ve NOTCH3 gen polimorfizmleri ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca literatür bilgileri tarandığında çalışmamız NOTCH3 geninde polimorfizm durumlarını değerlendirdiğimiz C381T ve A684G bölgeleri ile akciğer kanserinin ilişkisinin araştırılması konusunda yapılan ilk çalışmadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmanın Akciğer

kanseri gelişiminde NOTCH3 gen polimorfizminin etkisinin belirlenmesine yönelik önemli katkı sağlayacağını ve diğer toplumlarda bu polimorfizmin çalışılması için kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N. A., Bellen, H. J. (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell*, 132(2), 247-258.
- Ak, G., & Metintaş, M. (2014). *Akciğer Kanseri, tanı ve destek tedavisinde aile hekimi*. Ankara: Rotatıp Kitabevi.
- Alberg, A. J., & Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *CHEST Journal*, 123(1\_suppl), 21S-49S.
- Alp, H. H. (2013). *Akciğer Kanseri Hastalarda Beta-Fibrinojen -445 G/A ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim I/D Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi*. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Andujar, P., Wang, J., Descatha, A., Galateau-Sallé, F., Abd-Alsamad, I., Billon-Galland, M.-A., Housset, B. (2010). p16<sup>sup</sup> INK4A<sup>sup</sup> inactivation mechanisms in non-small-cell lung cancer patients occupationally exposed to asbestos. *Lung cancer*, 67(1), 23-30.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415), 770-776.
- Basseres, D., & Baldwin, A. (2006). Nuclear factor-κB and inhibitor of κB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 25(51), 6817-6830.
- Beg, A. A., William, C. S., Bronson, R. T., Ghosh, S., & Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-κB.
- Beverly, L. J., Felsher, D. W., & Capobianco, A. J. (2005). Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer research*, 65(16), 7159-7168.
- Blanchard, E. M., Arnaoutakis, K., & Hesketh, P. J. (2010). Lung cancer in octogenarians. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(6), 909-916.
- Boggs, K., Henderson, B., & Reisman, D. (2009). RBP-Jκ binds to and represses transcription of the p53 tumor suppressor gene. *Cell biology international*, 33(3), 318-324.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186.
- Carney, D. N. (2002). Lung cancer--time to move on from chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 346(2), 126-128.
- Chang, J., Lu, P., Cai, C., Li, F., Zhong, Z., & Zhang, D. (2009). [The Relationship between TSG101 Protein and NOTCH3 Receptor in Lung Cancer.]. *Zhongguo fei ai za zhi= Chinese journal of lung cancer*, 12(2), 111-116.
- Cheng, P., Zlobin, A., Volgina, V., Gottipati, S., Osborne, B., Simel, E. J., . . . Gibrilovich, D. I. (2001). Notch-1 regulates NF-κB activity in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4458-4467.
- Collins, B. J., Kleeberger, W., & Ball, D. W. (2004). *Notch in lung development and lung cancer*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Coşkunpınar, E. (2013). *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında RRM1, RRM2 ve ERCC2 gen polimorfizmleri ve serum 8-OHG ve LDH düzeylerinin hastalığın riski ve prognozu üzerine etkilerinin araştırılması*. (Doktora tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Dallman, M. J., Smith, E., Benson, R. A., & Lamb, J. R. (2005). Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. *Current opinion in immunology*, 17(3), 259-266.
- Dang, T. P. (2012). Notch, apoptosis and cancer *Notch Signaling in Embryology and Cancer* (pp. 199-209): Springer.
- Davidson, B. J., Hsu, T., & Schantz, S. P. (1993). The genetics of tobacco-induced malignancy. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 119(11), 1198-1205.
- Devereux, T. R., Taylor, J. A., & Barrett, J. C. (1996). Molecular Mechanisms of Lung Cancer Interaction of Environmental and Genetic Factors. *CHEST Journal*, 109(3\_Supplement), 14S-19S.
- Donnellan, R., & Chetty, R. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Molecular Pathology*, 51(1), 1.
- Ekmekçi, A., Konaç, E., & Önen, H. İ. (2008). Genpolimorfizmi ve kansere yatkınlık. *GEN*, 21(3), 282-295.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Fong, J. C. (2015). *CADASIL Genetic Counseling for Adult Neurogenetic Disease* (pp. 143-156): Springer.
- Fong, K. M., & Minna, J. D. (2002). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in chest medicine*, 23(1), 83-101.
- Gao, Y. T., Blot, W. J., Zheng, W., Ersnow, A. G., Hsu, C. W., Levin, L. I., Fraumeni, J. F. (1987). Lung cancer among Chinese women. *International journal of cancer*, 40(5), 604-609.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics* (Vol. 116): Sinauer associates Sunderland.
- Hecht, S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194-1210.
- Hecht, S. S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The lancet oncology*, 3(8), 461-469.
- Hoffmann, D. H., Ilse. (1997). The changing cigarette, 1950-1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 50(4), 307-364.
- Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2000). Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2), 311-322.
- Imyanitov, E., Chernitsa, O., Serova, O., Nikofova, I., Pluzhnikova, G., & Knyazev, P. (1992). Amplification of HER-2 (erbB-2/neu)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- oncogene as the most significant prognostic factor in a group of Russian breast cancer patients. *Neoplasma*, 40(1), 35-39.
- Joutel, A., & Debette, S. (2011). Mendelian and complex causes of migraine: Bridging the gap. *Cephalalgia*, 31(3), 259-261.
- Kargı, A. (1999). Veral A. Patolojik tanı ve sorunları. *Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşım*. Ankara. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, 23-28.
- Karlıkaya, C., Erdoğan, S., Akkoçlu, A., Oktay, G., Güner, G., Uçan, E. S., & Çımrın, A. H. (2003). Akciğer kanserinde çoklu tümör belirleyicisi analizi. *Toraks Dergisi*, 4(3), 248-259.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- Kidd, S., Kelley, M. R., & Young, M. W. (1986). Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Molecular and cellular biology*, 6(9), 3094-3108.
- Kitano, H., Chung, J.-Y., Ylaya, K., Conway, C., Takikita, M., Fukuoka, J., . . . Hewitt, S. M. (2014). Profiling of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, Phospho-MAPK and EGFR in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 0022155414523022.
- Kiyohara, C., & Ohno, Y. (2010). Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gender medicine*, 7(5), 381-401.
- Kligerman, S., & White, C. (2011). Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening. *American Journal of Roentgenology*, 196(2), 287-295.
- Konishi, J., Kawaguchi, K. S., Vo, H., Haruki, N., Gonzalez, A., Carbone, D. P., & Dang, T. P. (2007).  $\gamma$ -Secretase inhibitor prevents NOTCH3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer research*, 67(17), 8051-8057.
- Konishi, J., Yi, F., Chen, X., Vo, H., Carbone, D. P., & Dang, T. P. (2009). NOTCH3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene*, 29(4), 589-596.
- Kopan, R. (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *Journal of cell science*, 115(6), 1095-1097.
- Köktürk, N., Öztürk, C., & Kırıçoğlu, C. (2003). Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 5(3), 139-145.
- Köktürk, N., Yeğin, D., Çiftçi, T. U., Mullaoglu, B., & Öztürk, C. (2004). Akciğer kanserlerinde epidemiyolojik özellikler yıllar içinde değişim gösteriyor mu. *Toraks Dergisi*, 5, 137-142.
- Kramer, H. (2000). RIPPING notch apart: a new role for endocytosis in signal transduction? *Science Signaling*, 2000(29), pe1.
- Krauss, G. (2006). *Biochemistry of signal transduction and regulation*: John Wiley & Sons.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ladanyi, M., Cha, C., Lewis, R., Jhanwar, S. C., Huvos, A. G., & Healey, J. H. (1993). MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer research*, *53*(1), 16-18.
- Lee, J. S., Yoon, A., Kalapurakal, S. K., Ro, J. Y., Lee, J. J., Tu, N., Hong, W. K. (1995). Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *Journal of clinical oncology*, *13*(8), 1893-1903.
- Li, Q., Yang, J., Yu, Q., Wu, H., Liu, B., Xiong, H., Liao, Z. (2013). Associations between Single-Nucleotide Polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR Pathway and Increased Risk of Brain Metastasis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, *19*(22), 6252-6260.
- Liu, J., Sun, K., Bai, Y., Zhang, W., Wang, X., Wang, Y., Xin, Y. (2009). Association of three-gene interaction among MTHFR, ALOX5AP and NOTCH3 with thrombotic stroke: a multicenter case-control study. *Human genetics*, *125*(5-6), 649-656.
- Liu, L., Chen, X., Wang, Y., Qu, Z., Lu, Q., Zhao, J., Zhou, Y. (2014). NOTCH3 is important for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1. *Cancer gene therapy*, *21*(9), 364-372.
- Matakidou, A., Eisen, T., & Houlston, R. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *British journal of cancer*, *93*(7), 825-833.
- Menon, S., Cox, H., Kuwahata, M., Quinlan, S., MacMillan, J., Haupt, L., Griffiths, L. R. (2011). Association of a Notch 3 gene polymorphism with migraine susceptibility. *Cephalalgia*, *31*(3), 264-270.
- Miele, L. (2006). Notch signaling. *Clinical Cancer Research*, *12*(4), 1074-1079.
- Müsellim, B. (2007). Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi*(58), 113-118.
- Oakley, F., Mann, J., Ruddell, R. G., Pickford, J., Weinmaster, G., & Mann, D. A. (2003). Basal expression of I $\kappa$ B $\alpha$  is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(27), 24359-24370.
- Ohishi, K., Varnum-Finney, B., Flowers, D., Anasetti, C., Myerson, D., & Bernstein, I. D. (2000). Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood*, *95*(9), 2847-2854.
- Ooi, W. L., Elston, R. C., Chen, V. W., Bailey-Wilson, J. E., & Rothschild, H. (1986). Increased familial risk for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *76*(2), 217-222.
- Osanyingbemi-Obidi, J., Dobromilskaya, I., Illei, P. B., Hann, C. L., & Rudin, C. M. (2011). Notch signaling contributes to lung cancer clonogenic capacity in vitro but may be circumvented in

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- tumorigenesis in vivo. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1746-1754.
- Özkan, K. (2008). *Akciğer Kanserli Hastalarda NQO1 Gen Polimorfizminin Araştırılması*. (Doktora tezi ), Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(2), 74-108.
- Passlick, B., Siene, W., Seen-Hibler, R., Wöckel, W., Thetter, O., Mutschler, W., & Pantel, K. (2000). Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(10), 3944-3948.
- Pazarbaşı, A., Kasap, H., & KASAP, M. (2011). Kanser Yolakları. *Arşiv*, 20, 187-229.
- Qiu, F., Yang, L., Fang, W., Li, Y., Yang, R., Yang, X., Zhou, Y. (2013). A functional polymorphism in the promoter of ERK5 gene interacts with tobacco smoking to increase the risk of lung cancer in Chinese populations. *Mutagenesis*, 28(5), 561-567.
- Rayet, B., & Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), 6938-6947.
- Sagawa, M., Saito, Y., Fujimura, S., & Linnoila, R. (1998). K-ras point mutation occurs in the early stage of carcinogenesis in lung cancer. *British journal of cancer*, 77(5), 720.
- Sanchez-Cespedes, M., Reed, A. L., Buta, M., Wu, L., Westra, W. H., Herman, J. G., . . . Sidransky, D. (1999). Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 18(43), 5843-5849.
- Sarasin, A. (2003). An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2), 99-106.
- Schulz, W. A. (2005). *Molecular biology of human cancers* (Vol. 464): Springer.
- Schwaag, S., Evers, S., Schirmacher, A., Stögbauer, F., Ringelstein, E., & Kühlenbäumer, G. (2006). Genetic variants of the NOTCH3 gene in migraine—a mutation analysis and association study. *Cephalalgia*, 26(2), 158-161.
- Schwartz, A. G., Yang, P., & Swanson, G. M. (1996). Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *American journal of epidemiology*, 144(6), 554-562.
- Shenfield, G. M. (2004). Genetic polymorphisms, drug metabolism and drug concentrations. *Clin Biochem Rev*, 25(4), 203-206.
- Shi, C., Qian, J., Ma, M., Zhang, Y., & Han, B. (2014). Notch 3 protein, not its gene polymorphism, is associated with the chemotherapy response and prognosis of advanced NSCLC patients. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(3), 743-752.
- Shih, C.-M., Kuo, Y.-Y., Wang, Y.-C., Jian, S.-L., Hsu, Y.-T., Wu, H.-Y., Wang, Y.-C. (2002). Association of L< i>-myc</i> polymorphism



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- with lung cancer susceptibility and prognosis in relation to age-selected controls and stratified cases. *Lung cancer*, 36(2), 125-132.
- Shimizu, E., Zhao, M., Shinohara, A., Namikawa, O., Ogura, T., Masuda, N., Sone, S. (1997). Differential expressions of cyclin A and the retinoblastoma gene product in histological subtypes of lung cancer cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 123(10), 533-538.
- Siegfried, J. M. (1998). Biology and chemoprevention of lung cancer. *CHEST Journal*, 113(1\_Supplement), 40S-45S.
- Simonato, L., Agudo, A., Ahrens, W., Benhamou, E., Benhamou, S., Boffetta, P., Fortes, C. (2001). Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *International journal of cancer*, 91(6), 876-887.
- Skuladottir, H., Olsen, J. H., & Hirsch, F. R. (2000). Incidence of lung cancer in Denmark: historical and actual status. *Lung cancer*, 27(2), 107-118.
- Spiro, S. G., & Porter, J. C. (2002). Lung cancer—where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(9), 1166-1196.
- Spivack, S. D., Fasco, M. J., Walker, V. E., & Kaminsky, L. S. (1997). The molecular epidemiology of lung cancer. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 27(4), 319-365.
- Takahashi, T., Obata, Y., Sekido, Y., Hida, T., Ueda, R., Watanabe, H., Takahashi, T. (1989). Expression and amplification of myc gene family in small cell lung cancer and its relation to biological characteristics. *Cancer research*, 49(10), 2683-2688.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H. K., Harris, C. C., & Cancer, I. A. f. R. o. (2004). Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart/edited by William D. Travis...[et al.].
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*, 34(3), 275-305. doi: 10.1051/gse:2002009
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(4), 275-283.
- Wang, T., Sharma, S. D., Fox, N., Rossor, M., Brown, M. J., & Sharma, P. (2000). Description of a simple test for CADASIL disease and determination of mutation frequencies in sporadic ischaemic stroke and dementia patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 69(5), 652-654.
- Wei, H., Ke, H. L., Lin, J., Shete, S., Wood, C. G., & Hildebrandt, M. A. (2014). MicroRNA target site polymorphisms in the VHL-HIF1 $\alpha$  pathway predict renal cell carcinoma risk. *Molecular carcinogenesis*, 53(1), 1-7.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)**

- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., & Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, 43(3), 567-581.
- White, D. W., Roy, A., & Gilmore, T. D. (1995). The v-Rel oncoprotein blocks apoptosis and proteolysis of I kappa B-alpha in transformed chicken spleen cells. *Oncogene*, 10(5), 857-868.
- Wynder, E. L., & Graham, E. A. (1950). Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma: a study of six hundred and eighty-four proved cases. *Journal of the American medical association*, 143(4), 329-336.
- Yang, P., Schwartz, A., McAllister, A., Swanson, G., & Aston, C. (1999). Lung cancer risk in families of nonsmoking probands: heterogeneity by age at diagnosis. *Genetic epidemiology*, 17(4), 253-273.
- Ye, Y.-z., Zhang, Z.-h., Fan, X.-y., Xu, X.-l., Chen, M.-l., Chang, B.-w., & Zhang, Y.-b. (2013). NOTCH3 overexpression associates with poor prognosis in human non-small-cell lung cancer. *Medical Oncology*, 30(2), 1-7.
- Yi, F., Amarasinghe, B., & Dang, T. P. (2013). Manic fringe inhibits tumor growth by suppressing NOTCH3 degradation in lung cancer. *American journal of cancer research*, 3(5), 490.
- Zhou, M., Jin, W.-Y., Fan, Z.-W., & Han, R.-C. (2013). Analysis of the expression of the NOTCH3 receptor protein in adult lung cancer. *Oncology letters*, 5(2), 499-504.

## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Emine YAĞCI  
Doğum tarihi ve yeri : 11.07.1988 / Ankara  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

### Eğitim Durumu

İlköğretim : Refet Bele İlköğretim Okulu, 1994-2002, Ankara.  
Lise : Gazi Lisesi, 2002-2005, Ankara.  
Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2006-2010, Kırıkkale.  
Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2008-2010, Kırıkkale.  
Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2010-2012, Kırıkkale.

### Mesleki Deneyim

Araştırma Görevlisi : Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 2011-2013  
Araştırma Görevlisi : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2013-....

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

: Biyologlar Birliği Derneği

## Bilimsel Etkinlikler

### Projeler

#### 1. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201411D04 (Başlama Yılı:2014)**

**PROJE ADI :** Mezotelyoma ile Matriks Metalloproteinaz 2 C1306T ve Metalloproteinaz 9 C1562T, polimorfizmleri arasındaki ilişkinin incelenmesi.

**PROJENİN KAPANMA YILI : 2015**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 14346.00 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ (Tıbbi Biyoloji AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ (Göğüs Hastalıkları AD)

Doç.Dr.Güntülü AKDOĞAN AK (Göğüs Hastalıkları AD)

**Arş.Gör. Emine YAĞCI (Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Gör. Tunç Tuncel (Tıbbi Biyoloji AD)

#### 2. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201411D11 (Başlama Yılı:2014)**

**PROJE ADI :** NOTCH3 C381T ve G684A Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri İle İlişkinin Belirlenmesi

**PROJENİN KAPANMA YILI : 2015**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 14960.78 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ (Göğüs Hastalıkları AD)

Doç.Dr.Güntülü AKDOĞAN AK (Göğüs Hastalıkları AD)

**Arş.Gör. Emine YAĞCI (Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)

Arş.Grv. Faruk SAYDAM (Tıbbi Biyoloji AD)

#### 3. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 2015/11014 (Başlama Yılı:2015)**

**PROJE ADI :** KOAH'lı hastalarda MBL(mannoz-bindig lektin) gen polimorfizmi

**PROJENİN KAPANMA YILI : Devam ediyor.**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 16063.22 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof. Dr. Mehmet Sinan ERGİNEL (Göğüs Hastalıkları AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)

**Arş.Gör. Emine YAĞCI (Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Gör. Çiğdem Turan (Göğüs Hastalıkları AD)