



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

**DNA METİLTRANSFERAZ VE METİL BAĞLAYAN BÖLGE  
PROTEİNLERİNİ HEDEFLEYEN MİRNA GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN AKCİĞER KANSERİ İLE  
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**CANSU ÖZBAYER**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.İRFAN DEĞİRMENCİ**

**2014**



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

**DNA METİLTRANSFERAZ VE METİL BAĞLAYAN BÖLGE  
PROTEİNLERİNİ HEDEFLEYEN MİRNA GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN AKCİĞER KANSERİ İLE  
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**CANSU ÖZBAYER**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.İRFAN DEĞİRMENCİ**

**Proje No: 201241020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Cansu ÖZBAYER'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "DNA Metiltransferaz ve Metil Bağlayan Bölge Proteinlerini Hedefleyen miRNA Gen Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri İle İlişkisinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih  
08/09/2014

Üye: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ (Danışman)

Üye: Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ

Üye: Prof. Dr. Solmaz ERDEM

Üye: Yrd.Doç.Dr. M. Cengiz ÜSTÜNER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16. /09/2014 tarih ve 1014/4729 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## Özet

Akciğer kanseri, akciğer dokusundaki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile meydana gelir ve kanser kaynaklı ölümlerin en yaygın nedenidir. En önemli nedenleri uzun süreli sigara dumanı maruziyeti, genetik faktörler, radon gazı ve asbest maruziyetidir.

MikroRNA'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. Çeşitli çalışmalarda malignan tümörlerin gelişimi ve ilerlemesi ile miRNA ekspresyon düzensizliklerinin ilişkili olduğu, miRNA'ların onkogen veya tümör süpresör olarak hareket edebileceği belirtilmiştir.

Tümör baskılayıcı genlerin downregülasyonu ve CpG dinükleotidlerindeki promotör hipermetilasyonu tümörögenезis için önemli bir mekanizmadır. Bir diğer epigenetik düzenleme olan miRNA'ların, promotör bölgelerdeki anormal metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaları düzenleyebileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda, güncel veri tabanları ile DNA metilasyonunda görevli olan DNA metiltransferazları ve metil bağlayan proteinleri hedefleyen miRNA'lar tespit edildikten sonra bu miRNA genlerindeki varyantlar belirlenmiş ve sonuç olarak DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen 22 miRNA geni ile 37 SNP ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda da miRNA genlerine ait bu varyantlar ile akciğer kanseri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmamıza 90 sağlıklı kontrol birey ve 90 akciğer kanseri hastası dahil edildi. EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA izole edildi ve bu DNA'lar Sequenom MassARRAY sistemi ile genotiplendirildi. Hastaların genetik varyasyon tipleri ve demografik özellikleri uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirildi.

MeCP2 proteinini hedefleyen miR3202 geni rs188912830 varyantı hem akciğer kanseri hem de alt tipleri ile ilişkili bulunmuştur. C aleli varlığı akciğer kanseri hastalarında ve alt tiplerinde anlamlı oranda düşük olup C aleli yokluğunun varlığına göre 7,429 kat riskli olduğu belirlendi.

DNMT3B'yi hedefleyen miR1274a geni rs318039 genetik varyantı ile akciğer kanseri alt tipleri arasında anlamlı oranda fark bulundu. Alel dağılımları karşılaştırıldığında C aleline sahip olan birey sayısı NSCLC ve SCLC alt gruplarında anlamlı oranda düşüktü.

DNMT3A'yi hedefleyen miR200b geni rs72563729 varyantı ve DNMT1'i hedefleyen miR513c'nin rs145416750 varyantı ile akciğer kanseri ve alt tipleri karşılaştırıldığında genotip ve alel dağılımları yönünden fark bulunmadı. Çalışmamızdaki diğer 33 varyasyon için tüm bireyler atasal genotipe sahipti.

Sonuç olarak rs188912830 ve rs318039 varyasyonlarının akciğer kanseri ve alt tipleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Araştırmamız DNA metilasyon mekanizmasını hedefleyen diğer miRNA gen varyantlarının da fonksiyonel karakterizasyonunun yapıldığı ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer Kanseri, DNA metilasyonu, DNA Metiltransferazlar, Metil Bağlayan Proteinler, miRNA, SNP.

## Summary

Lung cancer (LC) is a disease that develops by uncontrolled cell growth in tissues of the lung and the most common cause of cancer-related death. Most significant risk factors for LC are tobacco smoke, genetic factors, radon gas and asbestos.

MicroRNAs are highly conserved, non-protein-coding, 18-24 nucleotides length, small RNAs. miRNAs bind target mRNAs which are complementary to their sequences and post-transcriptionally regulate gene expression through translational repression or mRNA degradation. Several observations link dysregulation of miRNA expression to the development and progression of tumors and miRNAs can act as oncogenes or tumor suppressors.

The hypermethylation of CpG-dinucleotides in the promoter of genes and downregulation of tumor suppressors are important for tumorigenesis. It has been reported that being a type of epigenetic modifier, miRNAs, may regulate epigenetic mechanism including abnormal methylation of the promoter regions or histone modifications.

In our study, we used current data bases and determined miRNAs that targets DNMTs and MBDs involved in DNA methylation. In addition, genetic variants of this miRNA sequences were scanned and 37-SNPs on 22-miRNA genes that targets DNMTs and MBDs were determined. The aim of our study was to determine of association between these variants of miRNA genes and LC.

Accordingly, 90-controls and 90-patients were included in our study. DNAs were isolated from blood samples and these DNA samples were genotyped by Sequenom MassARRAY System. The demographic characteristics of patients and types of genetic variation were evaluated by appropriate statistical methods.

The association between rs188912830 gene variant of miR3202 targeting MeCP2 protein and LC has been indicated both subtypes. The presence of C allele in patients with LC and its subtypes was significantly lower and the absence of C-allele was determined to be hazardous 7,429-times compared to presence.

Significant association between rs318039 gene variant of miR1274 targeting DNMT3b and subtypes of LC were determined. When allele distributions were compared, the number of individuals with C-allele was significantly lower in the subgroups.

No significant association was found for rs72563729 variant of *miR200b*-gene targeting DNMT3a and rs145416750 variant of *miR513c*-gene targets DNMT1 in terms of genotype and allele-distribution when compared to subtypes of LC. All individuals were found to be ancestral genotypes regarding other 33-variations.

Consequently rs188912830 and rs318039 variations have been determined to be associated with subtypes of LC. Our research is important due to being the first study to indicate the functional characterization of gene variants of miRNA genes targeting DNA methylation.

**Keywords:** Lung cancer, DNA methylation, DNA methyltransferases, Methyl Binding Proteins, miRNA, SNP.

# 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. Tanım .....	4
2. 1. 2. Epidemiyoloji .....	4
2. 1. 3. Etyoloji .....	4
2. 1. 4. Akciğer kanserinin sınıflandırılması .....	6
2. 1. 4. 1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) .....	8
2. 1. 4. 1. 1. Adenokarsinom .....	8
2. 1. 4. 1. 2. Skuamöz hücreli kanser .....	8
2. 1. 4. 1. 3. Büyük hücreli kanser .....	8
2. 1. 4. 2. Küçük hücreli kanser .....	8
2. 1. 5. Evreleme sistemi .....	9
2. 2. Epigenetik Mekanizmalar .....	11
2. 2. 1. DNA metilasyonu .....	11



2. 2. 1. 1. Genomik imprinting ve X kromozomu inaktivasyonu .....	13
2. 2. 1. 2. DNA metil transferazlar (DNMT).....	14
2. 2. 1. 3. Metile CpG'ye bağlanan proteinler .....	15
2. 2. 1. 3. 1. DNA metilasyonu ile transkripsiyonun baskılanması ve adaptör proteinler .....	16
2. 2. 1. 4. DNA metilasyonunun kanser gelişiminde etkilediği mekanizmalar .....	17
2. 2. 2. Histon modifikasyonları .....	19
2. 2. 2. 1. Histon kod hipotezi ve histon etkileşimi .....	19
2. 2. 3. Kodlamayan RNA'lar .....	21
2. 2. 3. 1. Mikro RNA'lar .....	22
2. 2. 3. 1. 1. miRNA biyogenezi .....	23
2. 2. 3. 1. 2. miRNA'lar ve kanser .....	24
2. 2. 3. 1. 3. miRNA ve DNA metilasyonu .....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	27
3.1. Gereç .....	27
3.1.1. Çalışma grubu bireyleri ve örneklerin toplanması .....	27
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	28
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler .....	28
3.2. YÖNTEM .....	32
3.2.1. miRNA hedeflerinin ve miRNA genleri üzerinde yer alan SNP'lerin belirlenmesi .....	32
3.2.2. DNA İzolasyonu ve miktarının belirlenmesi .....	35
3.2.3. Genotip analizi .....	38

3.2.3.1 İplex GOLD SNP genotipleme prensibi .....	39
3.2.3.2 İplex GOLD SNP genotipleme protokolü .....	43
3.2.4 İstatistiksel analiz .....	53
4. BULGULAR .....	54
5. TARTIŞMA .....	65
5.1. Demografik Özelliklerin Değerlendirilmesi .....	65
5.2. Genetik Varyasyonların Değerlendirilmesi .....	66
5.2.1. MeCP2'yi hedefleyen miRNA gen varyantları .....	66
5.2.2. DNMT3b'yi hedefleyen miRNA gen varyantları .....	67
5.2.3. DNMT3a'yi hedefleyen miRNA gen varyantları .....	70
5.2.4. TRDMT1'i hedefleyen miRNA gen varyantları .....	71
5.2.5. MBD1 ve MBD2'yi hedefleyen miRNA gen varyantları .....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	75
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	77
Özgeçmiş .....	88

## Tablo Dizini

<b>Tablo 2.1.</b> Akciğer kanseri riski ile ilişkili faktörler .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> İnvaziv malign epitelyal akciğer tümörleri sınıflaması .....	7
<b>Tablo 2.3.</b> TNM'ye göre evreleme .....	9
<b>Tablo 2.4.</b> Akciğer kanserinde TNM sınıflaması .....	10
<b>Tablo 2.5.</b> Küçük kodlamayan RNA'lar ve işlevleri .....	22
<b>Tablo 3.1.</b> DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen 22 miRNA ile bu miRNA'lar üzerinde yer alan 37 SNP .....	34
<b>Tablo 3.2.</b> DNA amplifikasyonu için dizayn edilen oligonükleotid primer çiftleri .....	44
<b>Tablo 4.1.</b> Demografik özelliklerin dağılımı ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	54
<b>Tablo 4.2.</b> Grupların demografik özellikleri ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması .....	55
<b>Tablo 4.3.</b> Hasta grupları ile sigara içme süresinin (yıl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	55
<b>Tablo 4.4.</b> <i>miR3202</i> geni rs188912830 varyantı ve alel varlığı ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	56
<b>Tablo 4.5.</b> rs188912830 varyantının C aleli ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması .....	58
<b>Tablo 4.6.</b> <i>miR1274a</i> geni rs318039 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	58
<b>Tablo 4.7.</b> rs318039 varyantının C aleli ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması .....	60
<b>Tablo 4.8.</b> <i>miR200b</i> geni rs72563729 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	60

<b>Tablo 4.9.</b> <i>miR513c</i> geni rs145416750 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	62
<b>Tablo 4.10.</b> Kontrol ve akciğer kanserli bireylerde tamamı atasal genotip olarak belirlenen SNP'ler, genler ve hedefleri .....	63

## Şekil Dizini

<b>Şekil 2.1.</b> DNA metilasyonu .....	12
<b>Şekil 2.2.</b> MeCP2 tarafından transkripsiyonun baskılanması .....	17
<b>Şekil 2.3.</b> miRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu .....	24
<b>Şekil 3.1.</b> miRDB veri tabanı ile DNMT1'i hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi .....	32
<b>Şekil 3.2.</b> TargetScan veri tabanı ile DNMT1'i hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi .....	32
<b>Şekil 3.3.</b> NCBI Gene veri tabanından varyasyon tespiti (miR148B).....	33
<b>Şekil 3.4.</b> Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 .....	37
<b>Şekil 3.5.</b> Sequenom MassARRAY® Sistemi .....	39
<b>Şekil 3.6.</b> İplex GOLD Reaksiyonu .....	40
<b>Şekil 3.7.</b> 384 kuyucuklu PCR plakası yerleşimi .....	47
<b>Şekil 3.8.</b> Bio-Rad C1000 Thermal Cycler .....	48
<b>Şekil 3.9.</b> Rezin ile temizlik aşaması .....	51
<b>Şekil 3.10.</b> Sequenom SpectroCHIP, PCR ürünlerinin çip üzerinde yerleşimi ve Nanodispenser .....	52
<b>Şekil 3.11.</b> Kütle spektrometre analiz raporu .....	53

## Grafik Dizini

<b>Grafik 3.1.</b> 100 µl kandan izole edilen DNA'nın elüsyon hacmine göre konsantrasyon grafiği .....	35
<b>Grafik 4.1.</b> <i>miR3202</i> geni rs188912830 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı .....	56
<b>Grafik 4.2.</b> <i>miR3202</i> geni rs188912830 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	57
<b>Grafik 4.3.</b> <i>miR3202</i> geni rs188912830 C aleline sahip bireylerin kontrol ve akciğer kanseri gruplarında dağılımı .....	57
<b>Grafik 4.4.</b> <i>miR1274a</i> geni rs318039 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı .....	59
<b>Grafik 4.5.</b> <i>miR1274a</i> geni rs318039 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	59
<b>Grafik 4.6.</b> <i>miR1274a</i> geni rs318039 C aleline sahip bireylerin kontrol akciğer kanseri gruplarında dağılımı .....	60
<b>Grafik 4.7.</b> <i>miR200b</i> geni rs72563729 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı .....	61
<b>Grafik 4.8.</b> <i>miR200b</i> geni rs72563729 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	61
<b>Grafik 4.9.</b> <i>miR513c</i> geni rs145416750 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	62
<b>Grafik 4.10.</b> <i>miR513c</i> geni rs145416750 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı .....	63

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

<b><u>Simge ve Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
<b>5meC</b>	5-metil-sitozin
<b>Ago2</b>	Argonaute
<b>DMAP1</b>	DNA metiltransferaz 1 ilişkili protein 1
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferaz
<b>dsRNA</b>	Çift sarmal RNA
<b>GWAS</b>	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
<b>HAT</b>	Histon asetiltransferaz
<b>HDAC</b>	Histon deasetilazlar
<b>KLL</b>	Kronik lenfositik lösemi
<b>LC</b>	Akciğer kanseri
<b>lncRNA</b>	Uzun kodlamayan RNA
<b>MALDI-TOF</b>	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
<b>MBD</b>	Metil-CpG bağlanma bölgesi
<b>MeCP2</b>	Metile-CpG'ye bağlanan protein
<b>miRNA</b>	Mikro RNA
<b>ncRNA</b>	Kodlamayan RNA
<b>NSCLC</b>	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
<b>PCNA</b>	Hücre çoğalması nükleer antijeni
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>piRNA</b>	PIWI (P-element induced wimpy testis) RNA

<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RISC</b>	RNA'nın indüklediği sessizleştirme kompleksi
<b>RNAi</b>	RNA interferans
<b>SAH</b>	S-adenozil homosistein
<b>SAM</b>	S-adenozil metionin
<b>SAP</b>	Shrimp alkalen fosfataz
<b>SCLC</b>	Küçük hücreli akciğer kanseri
<b>siRNA</b>	Küçük interferans RNA
<b>SNP</b>	Tek nükleotid polimorfizmi
<b>SRA</b>	SET ve RING uç-ilifkili
<b>sRNA</b>	Küçük RNA
<b>ssRNA</b>	Tek sarmal RNA
<b>SUMO</b>	Küçük ubukitin benzeri düzenleyici
<b>TRD</b>	Transkripsiyonel baskılama bölgesi
<b>TRDMT1</b>	tRNA aspartik asit metiltransferaz 1
<b>TS-mir</b>	Tümör süpresör miRNA
<b>Ub</b>	Ubukitin
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında ilk sırada olup, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan ve akciğer doku hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan ölümcül bir hastalıktır (Ak & Metintaş, 2014; Aydın, 2007).

Etiyolojide en önemli faktörlerden biri sigaradır ve akciğer kanseri gelişimine etkisinin yaklaşık %85-90 olduğu bilinmektedir. Akciğer kanseri riski sigara içenlerde içmeyenlere göre 30 kat fazladır. Ülkemizde akciğer kanserinin oluşumunda rol oynayan diğer bir faktör asbest temasıdır. Havayla taşınan, küçük partiküllere bölünen bir mineral bileşiği olan asbest; hava yoluyla taşınan liflerle karşılaşan kişilerde, özellikle de sigara içenlerde, akciğer kanseri riskini artıran bir karsinojendir (Ak & Metintaş, 2014; Aydın, 2007; Metintaş, 2005).

Akciğer kanserli bireylerin ailelerinde de akciğer kanseri ve diğer kanser tiplerinin izlenme sıklığı önemli düzeyde yüksek olup, ailesel geçiş ve genetik yatkınlık da hastalığın oluşmasında önemli rol oynar. Onkogenler veya tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonlar, karsinojen metabolizmasındaki değişiklikler, hücre çoğalması, DNA replikasyonu veya onarımındaki bozukluklar genetik olarak kalıtılabilir ve kansere neden olabilir (Aydın, 2007; Topu, Ülger & Numanoğlu, 2004).

Hücrelerin kanserleşme sürecinde önemli role sahip olan bu yollar "DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri" ile yani epigenetik düzenlemeler ile de kontrol altındadır (Onay, 2006; Yaykaşlı, Hatipoğlu, Ertuğrul, & Yaykaşlı, 2012). Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olarak sınıflandırılabilir (Bora & Yurter, 2007; Novik et al., 2002; Onay, 2006).

DNA metilasyonu en önemli epigenetik değişimlerden biri olup, genomda guaninden (G) sonra gelen sitozinlerin (C) metillenmesi ile oluşur. Genlerin promotör bölgelerinde bulunan sitozin ve guanin dinükleotidlerince zengin bölgelere CpG adacıkları ismi verilir ve CpG adacıklarında metilasyon az ise (hipometile) gen aktif yani açık, metilasyon çok ise (hipermetile) gen sessiz diğer bir ifadeyle kapalıdır (Çelik, 2007; Lüleyap, 2008; Yaykaşlı et al., 2012). DNA'nın metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir ve metil bağlanma proteinleri (MBD1, MBD2, MBD3 vb) yardımıyla gerçekleşir (Varol, 2007; Yaykaşlı et al., 2012).

DNMT'ler metil vericisi olarak S-adenozil metionin'i kullanır ve sitozin 5-metiltransferaz olarak da adlandırılır. DNA metiltransferaz enziminin hedef bölgeleri CpG adacıklarıdır (Varol, 2007; Yaykaşlı et al., 2012). Günümüzde memelilerde 5 DNMT saptanmıştır: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L (Çelik, 2007; Onay, 2006).

MBD ailesi proteinleri in vitro ve in vivo koşullarda metile DNA'yı seçici olarak tanıyıp bağlanan proteinlerdir. Metillenmiş CpG adalarına MBD proteinlerinin bağlanması histon deasetilaz gibi transkripsiyon baskılayıcı proteinlerin bu komplekse katılmasına ve kapalı kromatin yapısının oluşmasına neden olur (Kaymak, 2012).

Gen ekspresyonu değişikliklerine bağlı olarak DNA metiltransferaz ve MBD proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler akut miyeloid lösemide (Garzon et al., 2009), akciğer (Belinsky et al., 2003; Tang, Xu, Wang, Xiao & Xu, 2009), meme (Ballestar et al., 2003; Lin & Nelson, 2003), kolorektal ve mide (Kanai, Ushijima, Kondo, Nakanishi & Hirohashi, 2001) kanserlerinin de içinde bulunduğu biręok kanser tipinde rapor edilmiştir.

Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonu kontrolünde yer alan en önemli moleküllerden biri de mikroRNA (miRNA)'lardır. miRNA'lar mRNAların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yapıp hedef mRNA yıkımını sağlayarak veya traslasyona uğramalarını engelleyerek hedef gen ekspresyonunu azaltırlar (Bandres et al., 2009; Lehmann et al., 2008; Lujambio et al., 2007; Saito et al., 2006). miRNA'lar dokuya özgü olarak eksprese olur ve hücre farklılaşması, çoğalması ve apoptozis gibi önemli hücreyel yolakların düzenlenmesinde rol oynarlar (Lehmann et al., 2008; Saito et al., 2006; Saydam, Değirmenci & Güneş, 2011).

miRNA ekspresyon değişiklikleri karsinogeneziste önemli role sahiptir. DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların bu düzenlenmeden etkilenebileceği ve miRNA ekspresyonunun DNA metilasyonunu direkt veya dolaylı olarak düzenleyebileceği belirtilmektedir (Han, Witmer, Casey, Valle & Sukumar, 2007; Iorio, Piovon & Croce, 2010; Weber, Stresemann, Brueckner & Lyko, 2007). Paralel olarak son yıllarda yapılan ęalıřmalarda, bazı miRNA'ların DNA metiltransferazları hedeflediği ve kanserdeki metilasyon değişiklikleri ile ilişkili oldukları belirlenmiştir (Fabbri et al., 2007). Ayrıca miRNA dizilerindeki genetik varyasyonların (Single nucleotide polymorphism; SNP) miRNA ekspresyonunu veya olgunlaşmasını değiştirebileceği ve böylece kanser gelişimi ve ilerlemesine neden olabileceği belirtilmiştir (Kim, Yoo, Choi & Park, 2010).

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).

Araştırmamız kapsamında TargetScanHuman® veri bankası taraması yapılmış ve DNA metilasyonunda görevli DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b, MBD1, MBD2 ve MeCP2'yi hedefleyen yüzden fazla miRNA olduğu belirlenmiştir. Bu miRNA'ların hepsi için NCBI (National Center for Biotechnology Information)'ın gen veri bankası taranmış ve toplam 22 miRNA üzerinde 37 SNP tespit edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında; miR148b (Song et al., 2011), miR339 (Wu et al., 2010), miR15b (Xia et al., 2009) ve miR125a (Jiang et al., 2010) gibi hücre döngüsü, hücre büyümesi, invazyon ve metastaz gibi mekanizmalar üzerine etkili olduğu bildirilen tümör süpresör miRNA'lar ile miR561 (Yu, Zou, Bao & Dong, 2011), miR200b (Hiroki et al., 2010), miR429 (Chen, Wang, Matyunina, Hill & McDonald, 2011), miR720 (Lin et al., 2013), miR25 (Xu et al., 2012) ve miR92b (Li et al., 2013) gibi onkogenik özellik göstererek invazyon ve metastazı arttırdığı belirlenen miRNA'lar yer almaktadır.

Belirlediğimiz hedef miRNA gen varyasyonları arasında yalnızca *miR200b* geni rs72563729 varyantı (Leng et al., 2011) ve *miR125a* rs143525573 varyantı (Lehmann et al., 2013) fonksiyonel olarak araştırılmış olup, belirlediğimiz diğer varyasyonlar ilk defa araştırmamız kapsamında fonksiyonel olarak yer almaktadır.

DNA metilasyonu ve miRNA gibi epigenetik kontrol mekanizmaları günümüz kanser araştırma çalışmalarında önemli bir yere sahip olmakla birlikte Ülkemiz'de ve Dünya'da global veya promotör DNA metilasyonunda görevli olan DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen miRNA'lara ait genetik varyasyonların araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla biz de güncel veri tabanları ile DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b, MBD1, MBD2 ve MeCP2'yi hedefleyen 22 miRNA genine ait toplam 37 SNP belirleyerek bu SNP'lerin Türk toplumundaki sıklığını geniş bir gen profilinde araştırmayı amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2. 1. Akciğer Kanseri**

#### **2. 1. 1. Tanım**

Akciğer kanseri genetik veya çevresel etkenler nedeniyle hava yolu epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan ölümcül bir hastalıktır. Akciğerin malign epitelyal tümörleri sıklıkla akciğer kanseri veya bronşial karsinom olarak adlandırılır ve bu tümörlerin çoğu bronşial sistem içinde santral ve daha küçük hava yollarının epitelyal veya nöroendokrin hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Ak & Metintaş, 2014).

#### **2. 1. 2. Epidemiyoloji**

Akciğer kanserleri, en sık görülen kanser tipleri arasında üst sıralarda ve kanser sebepli ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Kanser nedeni ölümlerin %28,4'ü akciğer kanseri kaynaklı olmakla birlikte hastalık dünya genelinde yılda ortalama 1,4 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır (Coşkunpınar, 2013).

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'lük oranla erkeklerde birinci, kadınlarda meme, kolorektal ve serviks kanserinden sonra %8.5'lük oranla dördüncü sırada; yine kanserden ölümlere bakıldığında da erkeklerde birinci, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir (Ak & Metintaş, 2014).

Akciğer kanseri nedenleri arasında ilk sırayı sigara kullanımı ve tütün dumanı maruziyeti almaktadır. Akciğer malign lezyonlarının %80-90'ına tütün neden olurken fiziksel ve kimyasal karsinojenlerden etkilenme de etiyolojideki diğer bir etkidir (Coşkunpınar, 2013; Gönüllü, 1995; Köktürk, Öztürk & Kırıçoğlu, 2003).

#### **2. 1. 3. Etiyoloji**

Akciğer kanserinin etyolojisinde birçok faktör rol oynamaktadır (Tablo 2. 1). Bu faktörler aktif sigara içimi; pasif sigara içimi; pipo ve puro içimi; başta asbest, nikel, krom, arsenik olmak üzere mesleki temas; radyasyon maruziyeti (ev ve madenlerde); iç ve dış ortam hava kirliliği olarak sıralanabilir (Ak & Metintaş, 2014).

**Tablo 2.1.** Akciğer kanseri riski ile ilişkili faktörler (Alberg, Brock, Ford, Samet & Spivack, 2013).

<b>Faktör</b>	<b>Tanımı</b>
A. Kişi ve populasyon riskinin en önemli tek nedensel belirteci, klinik riskin en değerli göstergesi	Sigara ve diğer tütün ürünlerinin aktif içimi (Günlük içilen sigara sayısı ve sigara içilen yılların fazla olması kişi bazında riski artırır. Populasyon riski aktif içicilerin prevalansı ile artar, çünkü populasyon prevalansı 20 yıllık latent periyod ile akciğer kanseri oluşumunu belirler.)
B. Akciğer kanseri ile nedensel olarak ilişkili diğer risk faktörleri	İkinci el sigara maruziyeti İyonize radyasyon (radon dahil) Mesleki temaslar (arsenik, krom, nikel, asbest, katran, kurum) İç ve dış ortam hava kirliliği
C. İlave klinik risk göstergeleri	Yukarıda belirtilen risk faktörlerine ilave olarak: İleri yaş Erkek cinsiyet Ailede akciğer kanseri öyküsü Kazanılmış akciğer hastalıkları (KOAH, TB, pnömokonyoz, idiyomatik pulmoner fibrozis, sistemik sklerozis) Mesleki temas (silika tozu gibi) HIV enfeksiyonu
D. Uygun kanıtlar ile ilişkisi gösterilmiş ancak nedensel rol halen oluşmamış örnekler	Meyve ve sebze tüketimi (riski azaltır) Fiziksel aktivite (riski azaltır) Marihuana içimi (risk ile ilişkili değildir)

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, TB: Tüberküloz, HIV: Human immunodeficiency virus.

### *Sigara:*

Akciğer kanserinin en önemli nedeni sigaradır. Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal vardır ve bunların en az 50'si karsinogenlerdir. Akciğer kanseri olgularının en az %90'ında neden sigaradır. Sigara kullananlarda akciğer kanseri riski kullanmayanlardan 10 – 30 kat daha fazladır. Hiç sigara içmeyenlerde yaşam boyu akciğer kanseri gelişme riski %1 civarında iken, ağır içicilerde bu oran %30 civarındadır (Ak & Metintaş, 2014).

Sigara; karsinogenler, kokarsinogenler (kendileri karsinogen olmayan ancak diğer maddelere karsinogen özellik kazandıran) ve tümör tetikleyiciler (karsinogeneze neden olabilen ve kendileri karsinogen olmayan maddeler) gibi binlerce substrat içerir. Bu substratlar, DNA'da doğrudan hasar oluşturabilir veya enzimler tarafından aktif metabolitlerine dönüşerek etki gösterebilir (Köktürk et al., 2003).

Sigarada bulunan birçok mutajen karsinogen hücrede serbest oksijen radikal oluşumunu artırarak DNA da hasara neden olur (Koçer, 2013; Köktürk et al., 2003). Terpenoid ve forbol esterleri gibi tümör tetikleyiciler ise kendileri direkt DNA hasarı oluşturmamakla birlikte hücre yüzeyindeki spesifik reseptörler, özellikle de "protein kinaz C" ile etkileşerek dolaylı

olarak DNA transkripsiyonunu başlatır ve böylelikle hücre çoğalmasını etkiler (Gopalakrishna, Chen & Gundimeda, 1994; Köktürk et al., 2003).

#### *Mesleksenel ve çevresel karsinojenler:*

Mesleksenel ve çevresel karsinojenler içinde en iyi bilinenler asbest ve radondur. Bunun dışında krom, arsenik, formaldehid, berilyum, kadmiyum, silika, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, vinil klorid, nikel, iyonize radyasyon gibi etkenler ile akciğer kanseri riski artmakta ve bu etkenler ile sigara birlikteliği sinerjistik etki göstermektedir (Ak & Metintaş, 2014).

Asbest akciğer kanserine neden olduğu iyi bilinen bir mineraldir. Ülkemizde Eskişehir, Kütahya, Yozgat, Sivas, Diyarbakır gibi bölgelerde toprak üstünde diğer minerallerle karışım halinde bulunur. Bu bölgelerde, asbest içerikli toprağın duvarlara badana olarak kullanılması, çatı izolasyonu olarak damlara serilmesi hatta bebeklerde pudra olarak kullanılması ve dişlerin temizlenmesinde kullanılması sonucunda insanlar asbeste maruz kalmaktadırlar (Altuntaş, Öztürk, Yılmaz & Eröz, 2009; Metintaş, 2005).

Asbest bazı bölgelerde aktoprak, bazı bölelerde ise çorak olarak adlandırılır ve birçok türde lif içermesine rağmen en fazla tremolit, tremolit+krizotil tip lifler içerir. Aktoprak içerdiği asbest lifleri nedeniyle bölgede yaşayanlarda doğumdan itibaren asbest teması oluşmasına neden olur (Metintaş, 2005).

Tüm asbest tipleri karsinojeniktir, ancak karsinojenik etki lifler arasında farklılık göstermektedir. Amfibol grubunda yer alan lifler boy/en oranı daha fazla olduğu için serpentin grubunda yer alan ve boy/en oranı daha az olan krizotilden çok daha fazla karsinojeniktir. Asbest lifleri solunduktan sonra fiziksel yapıları nedeniyle bronşial alanda kolaylıkla ilerleyebilir. Asbest lifleri, hem mutajenik hem de fibrojenik aktiviteyi başlatıp temas ettikleri hücrelerdeki genetik yapıda fiziksel hasar oluşturabilir. Özellikle mitoz sırasında kromozom anomalilerine de neden olabilirler (Ak & Metintaş, 2014; Metintaş, 2005).

#### **2. 1. 4. Akciğer kanserinin sınıflandırılması**

Akciğer kanserleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kaynak aldığı dokuya göre histolojik olarak sınıflandırılmıştır. Akciğer tümörlerinin yaklaşık % 95' i bronş epitelinden kaynaklandığı için bu grup tümörler bronkojenik karsinomlar adını alır. Geri kalan % 5 ise akciğer parankiminden – bronkoalveoler alandan köken alır. Akciğer kanseri; biyoloji, tedavi ve prognoz göz önüne alındığında küçük hücreli akciğer kanseri (Small Cell Lung Cancer, SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Nonsmall Cell Lung Cancer, NSCLC) olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılmıştır. Adenokarsinom, skuamoz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom NSCLC olarak sınıflandırılır (Coşkunpınar, 2013). WHO'nun 2004

yılı detaylı histolojik sınıflandırması Tablo 2.2'de gösterilmiştir (Ak & Metintaş, 2014; Coşkunpınar, 2013; Ettinger et al., 2012).

**Tablo 2.2.** İnvaziv malign epitelyal akciğer tümörleri sınıflaması-WHO 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

---

#### *2. 1. 4. 1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)*

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), tüm akciğer kanseri olgularının %80- 85'ini oluşturur ve başlıca üç tipi vardır; Adenokarsinom, skuamöz hücreli kanser ve büyük hücreli kanser (Aydiner, 2007).

##### *2. 1. 4. 1. 1. Adenokarsinom*

Adenokarsinomlar çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Glandular veya salgılayıcı özellikte hücrelerden oluşurlar. Merkezi boşluk yaygın değildir. Histolojik olarak adenokarsinomlar bez formunda, papiller yapıda veya müsin yapıda özellik gösterirler (Ak & Metintaş, 2014; Coşkunpınar, 2013). Akciğer kanserleri içinde gelişmiş ülkelerde ilk sırada izlenen, sigara içmeyenlerde ve kadınlarda en sık görülen akciğer kanseri tipi adenokarsinomdur. Ancak, hastaların çoğunda sigara geçmişi bulunur. Akciğer periferinde yerleşen tümörlerin yarısından fazlasında lenf nodu metastazı bulunur (Aydiner, 2007). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde en çok metastaz yapan alt tip adenokarsinomdur (Ak & Metintaş, 2014). Amerika'da ve Avrupa'da kadınlarda sık rastlanan adenokarsinom, Ülkemizde akciğer kanserlerinin %28.5'ini oluşturur ve erkeklerde kadınlara oranla daha siktir (Coşkunpınar, 2013).

##### *2. 1. 4. 1. 2. Skuamöz hücreli kanser*

Skuamöz hücreli kanser santral bronşlarda yer alan epitelden köken alır. Skuamöz hücre karsinomlu tümörler sıklıkla nekroz ve tümör hücre döküntülerinden oluşan merkezi kavitelede bulunurlar. Merkezi konumuyla birlikte bu karakteristik özellikler skuamöz hücre karsinomu hücrelerinin erken dönemde belirlenmesini sağlar (Coşkunpınar, 2013).

##### *2. 1. 4. 1. 3. Büyük hücreli kanser*

Akciğer kanserlerinin %9'unu oluşturur. Tümör hücreleri büyük olup, belirgin çekirdekçik, iri çekirdek ve orta derecede sitoplazma içerir. Genellikle periferik yerleşim göstermekle birlikte santral yerleşimli de olabilir. Plevra, göğüs duvarı ve çevredeki yumuşak dokuya invazyon gösterebilir (Akkaya, 2012).

##### *2. 1. 4. 2. Küçük hücreli kanser*

Malign epitelyal bir tümör olan SCLC'de hücreler dar sitoplazmik yapı, iyi tanımlanamayan hücre sınırları, ince granüler çekirdek kromatinini varlığı (hiperkromatik çekirdek), nükleolusun olmayışı veya çok küçük olması ile karakterizedir. Balgam ve/veya bronkoskopi ile alınan materyalde tanı şansı çok yüksektir. Hücre çekirdekleri yuvarlak, oval veya iğsi şekildedir ve oldukça dar sitoplazmalıdır. Mitoz sayısı çok yüksektir (Aydiner, 2007; Koçer, 2013).



Küçük hücreli kanserler akciğer dışı organlardan da (örn. Gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem vb.) kaynaklanabilir. Akciğer ve akciğer dışı küçük hücreli kanserlerin klinik ve biyolojik davranışları benzerdir; erken evredeyken yaygın metastaz yapabilirler (Aydiner, 2007).

### **2. 1. 5. Evreleme sistemi**

Akciğer kanserinin evrelemesinde halen TNM sınıflamasının 2009 yılında gözden geçirilip, 2010 yılında kullanıma giren 7. baskısı kullanılmaktadır (Tablo 2.3 ve 2.4). Bu yeni evreleme sistemi için IASLC tarafından 1998’de multidisipliner katılımlı Uluslararası Evreleme Komitesi kurulmuş ve akciğer kanseri evreleme projesi adı altında bir çalışma planı yapılmıştır. Bu çalışma planı çerçevesinde uluslararası katılımlı bir veri tabanı oluşturulmuş ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin evrelemesi için 1990 ile 2000 yılları arasında tanı almış yaklaşık 68 bin hasta dikkatli ve detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir. Burada analiz edilen veri tabanının daha önceki veri tabanlarından 15 – 20 kat daha geniş olduğu görülmektedir. Evre grupları ve T, N, M faktörleri sağ kalım dikkate alınarak yeniden şekillendirilmiştir. Her ne kadar bu sistem küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarına göre belirlenmişse de validasyon çalışmalarında küçük hücreli akciğer kanseri ve karsinoid tümör için de uygun olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu sınıflamanın bu alt tiplere de uygulanması önerilmektedir (Ak & Metintaş, 2014; Akkaya, 2012).

**Tablo 2.3.** TNM’ye göre evreleme (Ak & Metintaş, 2014).

Gizli karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a, b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a, b T2a T2b	N1 N1 N0	M0 M0 M0
Evre IIB	T2b T3	N1 N0	M0 M0
Evre IIIA	T1, T2 T3 T4	N2 N1, N2 N0, N1	M0 M0 M0
Evre IIIB	T4 Herhangi bir T	N2 N3	M0 M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a, b

**Tablo 2.4.** Akciğer kanserinde TNM sınıflaması (Ak & Metintaş, 2014).

<b>T (Primer tümör)</b>	
Tx	Primer tümörün değerlendirilememesi veya Balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin varlığı ile ispat edilen, ancak görüntüleme teknikleri ya da bronkoskopi ile gösterilemeyen tümör
T0	Primer tümör belirtisi yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	En geniş çapı $\leq 3$ cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon kanıtı olmayan tümör (örneğin: ana bronşta olmayan) <sup>a</sup>
T1a	En geniş çapı $\leq 2$ cm tümör
T1b	En geniş çapı $> 2$ cm fakat $\leq 3$ cm tümör
T2	$>3$ cm fakat $\leq 7$ cm veya Aşağıdaki özelliklerden en az biriyle birlikte olan tümör (bu özellikleri olan T2 tümör eğer $\leq 5$ cm ise T2a olarak sınıflandırılır) - Karinaya $\geq 2$ cm uzaklıkta ana bronş tutulumu - Visseral plevra ivazyonu - Hiler bölgeye uzanan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni
T2a	En geniş çapı $> 3$ cm fakat $\leq 5$ cm tümör
T2b	En geniş çapı $> 5$ cm fakat $\leq 7$ cm tümör
T3	$>7$ cm veya Göğüs duvarı (superior sulcus tümörleri dahil), diafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, paryetal perikard'dan birini direkt invaze eden tümör veya Karinaya 2 cm'den daha yakın fakat karinayı tutmayan ana bronştaki tümör <sup>a</sup> veya Tüm akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan tümör veya Aynı lobda ayrı tümör nodül(leri) olan tümör
T4	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebral cisim, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi veya Aynı taraf farklı lobda ayrı tümör nodül(leri)
<b>N (Bölgesel lenf nodu)</b>	
Nx	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı taraf peribronşial ve / veya hiler ve intrapulmoner lenf nodlarında direkt yayımı da içeren metastaz
N2	Aynı taraf mediastinal ve / veya subkarinal lenf nodlarında metastaz
N3	Karşı taraf mediastinal, hiler, aynı veya karşı taraf supraklavikuler veya skalen lenf nodlarında metastaz
<b>M (Uzak metastaz)</b>	
Mx	Uzak metastazın değerlendirilememesi
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Karşı tarafta ayrı tümör nodül(leri), plevral nodül veya malign plevral (veya perikardiyal) sıvı <sup>b</sup>
M1b	Uzak metastaz

<sup>a</sup>Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşial duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1 olarak sınıflandırılır.

<sup>b</sup>Akciğer kanseri ile birlikte olan plevral (veya perikardiyal) sıvıların çoğu tümöre bağlıdır. Ancak bazı hastalarda plevral (perikardiyal) sıvının yinelenen sitolojik incelemelerinde tümör negatiftir ve sıvı kanlı ve eksuda değildir. Bu bulgular ve klinik bulgular sıvının tümörle ilişkili olduğunu düşündürmüyorsa, sıvı evrelemede dikkate alınmamalı ve hasta T1, T2, T3 veya T4 olarak sınıflandırılmalıdır.

## **2. 2. Epigenetik Mekanizmalar**

Epigenetik terimi 1940'ların başında Conrad Hal Waddington tarafından "fenotipin ortaya çıkmasını sağlayan genler ile bu gen ürünleri arasındaki etkileşim" olarak tanımlanmıştır (Yaykaşlı et al., 2012). Günümüzde ise epigenetik "DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri" olarak tanımlanmaktadır (Novik et al., 2002; Onay, 2006; Yaykaşlı et al., 2012).

Geçmişte, kalıtımı sağlayan ve biyolojik süreçlerde gerekli olan proteinlerin üretimine karar veren tek molekülün DNA olduğu düşünülmüştür. Ancak insan genom projesinin tamamlanmasıyla 100.000 olarak tahmin edilen gen sayısının 30.073 olduğu, 21.598 genin protein kodladığı diğer 8.475 genin RNA geni olduğu belirlenmiş olup, insanların DNA dizilimlerinde % 99,9 oranında benzerlik bulunmuştur. Bu % 0,1'ik DNA dizilim farklılığı, insanlar arasındaki fenotipik farklılıkları açıklamada yetersiz kalmıştır (Tobias, Connor & Ferguson-Smith, 2011; Yaykaşlı et al., 2012).

Epigenetik mekanizmaların keşfedilmesiyle birlikte DNA dizilimi kadar post-translasyonel epigenetik mekanizmaların da gen ifadesi ve kalıtımda rol aldığı anlaşılmıştır. Genom bilgiyi genetik ve epigenetik olmak üzere iki şekilde taşır. Genetik bilgiler canlıların tüm hayati proteinlerinin üretimi için gerekli bilgiyi yani genleri taşırken; epigenetik bilgiler bu üretimin ne zaman, nerede ve nasıl kullanılacağına dair bilgiyi taşırlar. İhtiyaç olduğunda gerekli genlerin açık olması ve ihtiyaç olmadığında bu genlerin kapalı halde tutulması epigenetik mekanizmalar ile kontrol edilir (Kaymak, 2012; Novik et al., 2002; Yaykaşlı et al., 2012).

Genotip-çevre etkileşiminin fenotipi oluşturması, epigenetik mekanizmaların dinamik bir yapıda olduğunu ve çevresel etkilere hızlı bir şekilde cevap oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca organizmadaki biyolojik işlevlerde önemli rol oynayan bu epigenetik dengenin bozulması durumunda kanser gibi birçok patolojik hastalığın ortaya çıkabildiği gösterilmiştir (Novik et al., 2002; Yaykaşlı et al., 2012).

Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar olarak sınıflandırılabilir (Bora & Yurter, 2007; Novik et al., 2002; Onay, 2006).

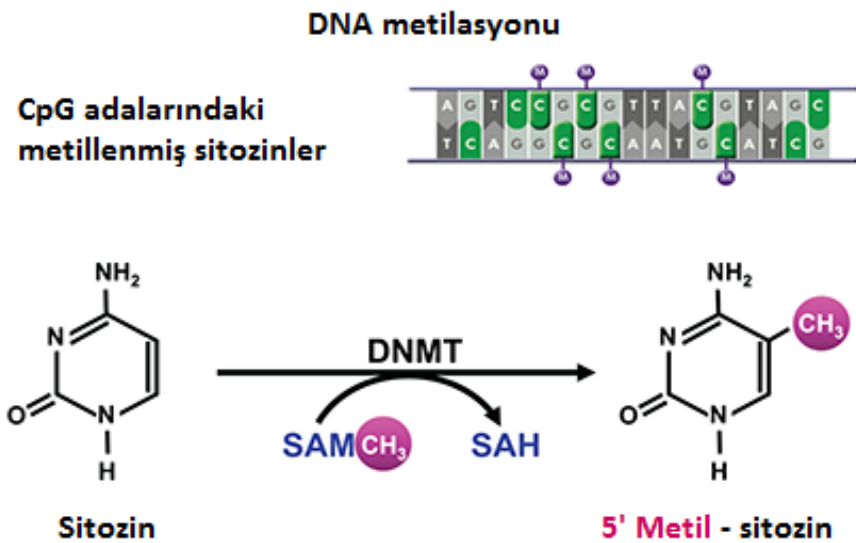
### **2. 2. 1. DNA metilasyonu**

Omurgalı bir canlının her bir dokusunda bulunan farklı hücreler genom bakımından eşdeğer olmalarına rağmen farklı fonksiyonlar için özelleşmiştir. Farklı hücre tiplerinde gen transkripsiyonu ve transkripsiyon miktarı gibi farklılıklar bulunmakla birlikte temel fark genom yapısındaki düzenleyici gen bölgelerinin açık ya da kapalı durumda olmasını sağlayan metilasyon ile farklı proteinlerin üretilmesidir (Alberts et al., 2002; Lüleyap, 2008).

DNA metilasyonu, en iyi bilinen epigenetik değişimlerden biridir ve genomda guaninden (G) sonra gelen sitozinlerin (C) metillenmesi ile oluşur. İnsan genomunda genellikle genlerin promotör bölgelerinde bulunan sitozin ve guanin dinükleotidlerinde zengin bu bölgelere CpG adacıkları denir. Burada C sitozin bazını, G guanin bazını ve p ise iki baz arasındaki fosfodiester bağını gösterir. CpG adacıkları 0,5-3 kilobaz (kb) uzunlukta olup, CpG içerikleri %50'nin üzerindedir. CpG adacıkları housekeeping genlerde, genlerin 3'- bölgelerinde, ekzonik bölgelerde ve promotör bölgelerde bulunur. Promotör bölgeler genlerin 5' ucunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraza bağlanma bölgesi oluşturarak gen ekspresyonunu kontrol eden bölgelerdir. Bu nedenle özellikle promotör bölgelerde bulunan CpG metillenmesi transkripsiyonel aktiviteyi etkiler (Bora & Yurter, 2007; Çelik, 2007; Kaymak, 2012; Onay, 2006; Sayin, 2008; Yaykaşlı et al., 2012). CpG dinükleotitlerinde metilasyon az ise (hipometile) gen aktif yani açık, metilasyon çok ise (hipermetile) gen sessiz diğer bir ifadeyle kapalıdır (Lüleyap, 2008).

Ökaryotlarda DNA metilasyonu; S-adenozil metionin (SAM) amino asidi kaynaklı bir metil grubunun (-CH<sub>3</sub>) CpG adacıklarında bulunan sitozinin primidin halkasındaki 5. karbonuna kovalent olarak bağlanarak 5'metil-sitozini oluşturması ile meydana gelir (Şekil 2.1). SAM, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından katalizlenen reaksiyonda metil vericisi olarak görev yapar ve metil transferinden sonra DNMT'nin potansiyel bir inhibitörü olarak görev yapan S-adenozil homosistein (SAH) formunu alır (Çelik, 2007; Subramaniam, Thombre, Dhar & Anant, 2014; Zakhari, 2013).

Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde sitozin rezidülerinde metilasyon görülmektedir. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenir (Çelik, 2007; Yaykaşlı et al., 2012).



**Şekil 2.1.** DNA metilasyonu (Zakhari, 2013).

Metillenmemiş durumda bulunan CpG adalarındaki yeniden metillenmeler, yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Gen promotörlerinde genellikle hipometile halde olan CpG adaları, genomik imprinting ve kadınlarda inaktif X kromozomunda metile halde bulunur (Kaymak, 2012; Onay, 2006).

### 2. 2. 1. 1. Genomik imprinting ve X kromozomu inaktivasyonu

Memeli hücreleri biri anneden biri babadan kalıtılan iki otozomal gen kopyası içeren diploid hücrelerdir. Gen kopyalarının her ikisi de fonksiyoneldir ancak bazı durumlarda gen kopyasının ekspresyonu anne ya da babadan gelmesine bağlı olarak kalıtsal olarak susturulmuş olabilir. Bu genlere damgalanmış veya mühürlenmiş (imprinted) genler veya genom damgalanması adı verilir. Damgalanmış genler, germ hücrelerinin oluşumu sırasında yumurta ya da sperm hücresinde bulunmalarına bağlı olarak metilasyon ile işaretlenir, böylece embriyoda genin hangi ebeveynden geldiği DNA metilasyon durumu ile belirlenebilir (Alberts et al., 2002; Kaymak, 2012).

Damgalanma, normal gelişim süreci için gereklidir ve bu nedenle insanlar damgalanmış genlerin yalnızca bir kopyasını taşır. Yanlış damgalanma sonucu bireyin iki aktif veya inaktif gen kopyası taşıması, gelişimsel anomaliler, nörolojik bozukluklar, Angelman ve Prader-Wili sendromu ve lösemi, akciğer ve meme gibi birçok kanser tipine yol açabilir (Kaymak, 2012).

Damgalanmış genlerde olduğu gibi dişilerdeki iki X kromozomundan biri erken embriyonik dönemde susturulur. Her ne kadar dişilerde iki X kromozomu bulunsa da biri inaktif haldedir. Bilindiği gibi erkeklerdeki cinsiyet kromozomları farklıdır. Dişilerde iki adet X kromozomu bulunurken erkeklerde bir X ve bir Y kromozomu bulunur. Y kromozomu X kromozomuna göre oldukça küçüktür, ayrıca Y kromozomu 100'den az gen içerirken X kromozomu 1000'den fazla gen içerir. Bu nedenle dişilerdeki X kromozomunun birinin epigenetik olarak susturulmuş olması "dozaj telafisi" olarak isimlendirilir. Yalnızca bir X kromozomuna sahip olmalarından dolayı erkeklerde X inaktivasyonu görülmez. Dişilerde de hangi atadan gelen X kromozomunun inaktive edileceği rastlantısaldır, ancak ilk seçim yapıldıktan sonraki tüm bölünmelerde aynı atasal kromozom sessiz kalır. İnaktif X kromozomu yoğunlaşmış halde bulunur ve interfaz nükleusunda çekirdek zarının yakınına yerleşmiş bir nokta olarak gözlenir (Alberts et al., 2002; Kaymak, 2012). Bu nedenle Barr cisimciği olarak adlandırılmıştır. İlginç bir biçimde, X kromozomunda bulunan bazı genler, Barr cisimciği oluşuktan sonra bile eksprese edilmeye devam ederler. Bu genler aynı zamanda Y kromozomunda da bulunur. Ancak bu durumun nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak açıklanamamıştır (Kaymak, 2012).

## 2. 2. 1. 2. DNA metil transferazlar (DNMT)

DNA'nın metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir ve metil bağlanma proteinleri (MBD1, MBD2, MBD3 vb) yardımıyla gerçekleşir. DNMT'ler metil vericisi olarak S-adenozil metionin'i kullanır ve sitozin 5-metiltransferaz olarak da adlandırılır. DNA metiltransferaz enziminin hedef bölgeleri CpG adacıklarıdır (Varol 2007; Yaykaşlı et al., 2012).

DNMT'lerin karboksil (C) uç bölgesi katalitik aktiviteden sorumlu iken, amino (N) uç bölgesi düzenleyici fonksiyona sahiptir. N uç bölgesi DMAP1 (DNA metiltransferaz 1 ilişkili protein 1), PCNA (hücre çoğalması nükleer antijeni), Rb (retinoblastoma) gibi birçok proteinle ilişki halindedir. Günümüzde memelilerde 5 DNMT saptanmıştır: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L (Çelik, 2007; Onay, 2006).

İnsanda karakterize edilen ilk metiltransferaz enzimi DNMT1 aynı zamanda somatik hücrelerde en çok bulunan DNMT'dir. Ökaryotlarda DNMT1'in 3 izoformu bulunur: DNMT1s somatik hücrelerde, DNMT1o oositlerde ve DNMT1p pakiten evresindeki (mayozda profaz1'in fazının üçüncü evresi) spermatozoidlerde eksprese olur (Robertson, 2002).

Kanser çalışmalarında ilk olarak kolon kanserlerinde DNMT1'in ekspresyonunun arttığı ve DNA metilasyon seviyesinin değiştiği belirtilmiştir (Bozkurt, 2010; Varol, 2007). DNMT1, DNA replikasyonundan sonra oluşan ve bir yarısı metillenmiş (kalıp DNA) diğer yarısı metillenmemiş olan yani yeni sentezlenmiş olan DNA'ya 10-40 kat fazla afinite ile bağlanır ve metillenmemiş zincirde metilasyon kalıplarını oluşturur. Bu nedenle maintenance (devamlılığı sağlayan, idame) metiltransferaz olarak adlandırılmıştır. DNMT1 enzimi, normal embriyonik gelişim, genomik imprinting ve X kromozom inaktivasyonu için gereklidir (Alberts et al., 2002; Çelik, 2007; Kaymak, 2012; Yaykaşlı et al., 2012).

DNMT2'ler küçük metiltransferazlar olup, sadece C uç bölgesi içerirler. Son yıllarda DNMT2'ler, tüm DNA metiltransferazlarda ortak olan 10 dizi motifine sahip olmalarından dolayı bir DNA metiltransferaz homoloğu olarak nitelendirilmiş ve DNA'yı metillemek yerine aspartik asit tRNA'sının antikodon ilmiğindeki sitozin-38'i metillediği için tRNA aspartik asit metiltransferaz 1 (TRDMT1) olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte bu enzimin; DNA hasarının tanınması, DNA rekombinasyonu ve mutasyon onarımı için gerekli olduğu, eksikliğinde embriyonik kök hücrelerde global DNA metilasyonunun görülmediği belirlenmiştir (Goll et al., 2006; Subramaniam et al., 2014; Varol, 2007).

DNMT3a ve DNMT3b ise hem yarı metillenmiş DNA'nın metillenmesinden hem de erken gelişim döneminde gözlenen de novo (DNA zincirlerinin her ikisi de metillenmemiş) metilasyondan sorumludur. DNMT3b özellikle spesifik genom bölgelerinde de novo metilasyon için gereklidir ve bu gende mutasyon varsa X kromozom inaktivasyonunda ve

perisentromerik tekrar DNA sekanslarında metilasyon defektleri görülmektedir (Bodur & Demirpençe, 2010; Çelik, 2007; Onay, 2006; Varol, 2007; Yaykaşlı et al., 2012).

DNMT3a ve DNMT3b, parazitik kaynaklı olarak genoma entegre olan DNA'ların da de novo metilasyonunda görevlidir. Bu özellikleri ile konak hücrenin "genom savunma mekanizmasını" oluştururlar (Kaymak, 2012).

DNMT3L metiltransferaz aktivitesi göstermez ancak DNMT3a ve DNMT3b enzimlerinin aktivitesini düzenleyerek de novo metilasyonu katalizler. DNMT3L gametogenez sırasında eksprese edilir ve maternal genomik imprintlenmede rolü bulunmaktadır (Onay, 2006; Yaykaşlı et al., 2012).

### 2. 2. 1. 3. Metile CpG'ye bağlanan proteinler

DNA metilasyonu ve gen ekspresyonunun sessizleşmesi arasındaki ilişkiyle ilgili 1980'lerin sonu ve 1990'ların başında önemli bir gelişme kaydedildi. Bu gelişme heterokromatin oluşumu ve gen susturmada görev alan histon değiştirici enzimler gibi protein komplekslerini bir araya getiren ve metile CpG'lere bağlanabilen proteinlerin keşfiydi. Moleküler seviyede ilk olarak belirlenen metile CpG'ye bağlanan protein (methyl-CpG-binding domain-MBD) 53-kDa ağırlığında olan MeCP2'dir (Parry & Clarke, 2011). MeCP2 kromatin ilişkilidir ve genomun yoğun metilenmiş bölgelerine (majör satellit DNA) lokalizedir. MeCP2'nin sadece küçük bir bölümünü metil CpG'yi seçici olarak tanıyan bölgedir (MBD bölgesi). Ayrıca, nükleer lokalizasyon sinyali ile örtüşen bir transkripsiyonel baskılama bölgesi (transcriptional repression domain -TRD) içerir (Wade, 2001).

MeCP2'nin MBD yapısı, korunmuş halde olduğundan bu aileye ait dört adet proteinin de keşfine yardımcı olmuştur. Bunlar MBD1, MBD2, MBD3 ve MBD4'tür. MBD2 ve MBD4, MBD yapıları bakımından %77 oranında benzerlik gösterirler (Kaymak, 2012).

MBD3 dışındaki MBD proteinlerinin tümü in vitro ve in vivo koşullarda metile DNA'yı seçici olarak tanır ve bağlanırlar. MBD3 ise memelilerde MBD bölgesinde kritik bir mutasyona sahiptir ve metile DNA'ya bağlanamaz. Ailenin diğer bir üyesi olan MBD4 ise aslında DNA onarımında görev alan timidin glikozilaz grubu bir onarım enzimidir. Ancak transkripsiyonel represyonda da görev alabildiğine dair bazı veriler mevcuttur (Kaymak, 2012).

Son on yılda metille DNA'ya ya da bir bileşenine bağlanma özelliği gösteren iki yeni protein ailesi tanımlanmıştır. Bunlardan biri, X kromozomu üstünde yer alan *ZBTB33* geni tarafından kodlanan Kaiso proteindir ve bu proteinin C-uç kısmı metile CpG'ye bağlanma özelliği gösteren 3 adet çinko parmak motifi içerir. İkincisi ise SRA (SET and RING finger-associated) bölgesi içeren protein ailesidir ve UHRF1 ve UHRF2 olmak üzere iki üyesi vardır. Kromozom 19'da bulunan UHRF1 (aynı

zamanda Np95 ve ICBP90 olarak da bilinir) metillenmiş DNA'ya bağlama özelliği gösterir. Aynı zamanda topoizomerez IIa gen ekspresyonu, hücre çoğalması, hücre döngüsü, apoptoz ve tümör biyolojisi ile ilişkilidir. UHRF2 (NIRF veya Np97 olarak da bilinir) hücre döngüsünde rol aldığı ve çoğalan hücrelerde ekspresyonunun fazla olduğu belirlenmiştir (Parry & Clarke, 2011).

### *2. 2. 1. 3. 1. DNA metilasyonu ile transkripsiyonun baskılanması ve adaptör proteinler*

DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyon iki tip mekanizma ile baskılanır;

Transkripsiyon aktivatör faktörünün bağlanmasına direk müdahale:

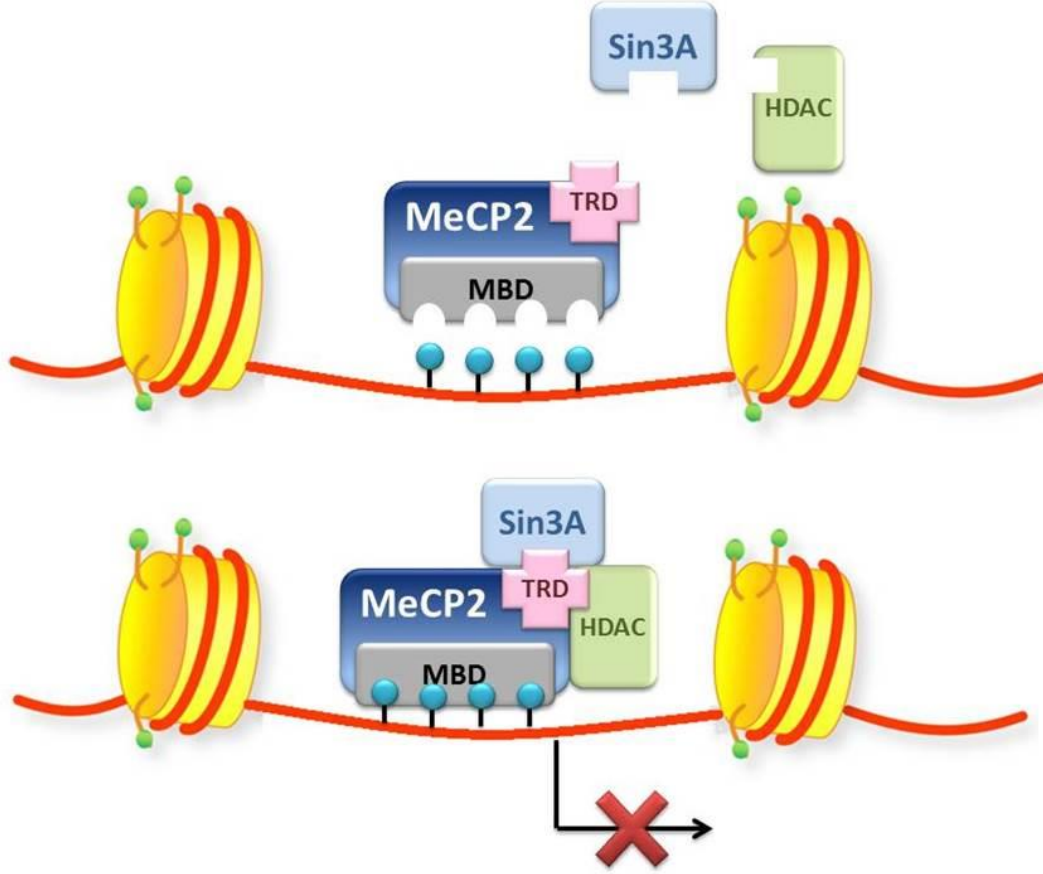
Bazı transkripsiyon faktörlerinin tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG adacıkları içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyon sayesinde transkripsiyon faktörleri bağlanamadığından transkripsiyon baskılanmış olur (Bozkurt, 2010).

Metil bağlayan bölge proteinleri ile müdahale:

İkinci bir mekanizma, bu metillenmiş bölgeleri tanıyıp buralara bağlanan proteinler ile gerçekleşir. Metile-CpG'ye bağlanan proteinler adı verilen protein ailesinin üyeleri (MBD 1, 2, 4 ve MeCP2), histon modifiye edici enzimler (örn. histon deasetilazlar gibi) ve histon metiltransferazlar gibi ko-represör kompleksleri metillenmiş bölgelere çekerek inaktif kromatin yapının oluşmasına aracılık ederler. Böylece genin transkripsiyonu baskılanmış olur (Bozkurt, 2010; Varol, 2007).

Örneğin MeCP2 ile transkripsiyonun baskılanması şu şekilde özetlenebilir: MeCP2'nin metil bağlanma bölgesi (MBD: methyl binding domain), DNA üzerindeki metillenmiş CpG adalarına spesifik olarak bağlanır. Ardından MeCP2'nin transkripsiyon baskılama bölgesi (TRD), histon deasetilazlar (HDAC) ve Sin3A (transkripsiyon düzenleyici protein) gibi diğer ko-represör proteinleri komplekse dahil ederek transkripsiyon mekanizmasını ulaşılmaz hale getirir ve kromatin yapısını inaktifleştirir. Böylelikle MeCP2'nin bağlandığı DNA bölgesindeki gen eksprese olamaz (Şekil 2.2) (Williamson & Christodoulou, 2006).





**Şekil 2.2.** MeCP2 tarafından transkripsiyonun baskılanması (kaynak metnine uygun olarak çizilmiştir).

#### 2. 2. 1. 4. DNA metilasyonunun kanser gelişiminde etkilediği mekanizmalar

##### *Kanser hücrelerindeki C-T dönüşümü*

Kanser oluşumunda metilasyon nedenli mekanizmaların ilki 5meC'nin mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA daki sitozin bazının deaminasyon ile urasile (U) dönüşmesi yaygın bir mutasyondur ve DNA tamir mekanizmalarınca Urasil-DNA glikosilaz enzimi sayesinde kolaylıkla onarılır.

Ancak DNMT enziminin katalizlediği sitozin metilasyonundan sonra oluşan 5meC deaminasyona uğrarsa timin (T) bazı oluşur. Ancak timin bazı normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için, tamir mekanizmalarından kaçır ve böylece nokta mutasyonları meydana gelir. Bu olaya tümör baskılayıcı gen olan p53 örnek verilebilmektedir. İnsan solid tümörlerinin %50'sinden fazlasında p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyon görülmektedir ve bunların %24'ünü, CpG adacıklarındaki C/T dönüşümünden oluşturmaktadır (Çelik, 2007; Sayin, 2008).

### *DNA hipometilasyonu*

Genomik metilasyon düzeyindeki düşüş bir diğer mekanizmadır. Bu olay sonucunda metilasyon aracılığıyla inaktifleşmiş olan genler, metilasyonun kalkması ile aktif duruma geçerler. Böylelikle inaktif onkogenler tekrar aktive olarak kanser oluşumuna neden olabilir (Çelik, 2007).

### *Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu*

Knudson'un çift-vuruş hipotezine göre, belirli bir tümör baskılayıcı genin ekspresyon kaybına bağlı olarak ortaya çıkan tümör, ancak o genin her iki alelinin inaktive edilmesi sonucu gelişir. Yapılan birçok çalışmada, eşey hücreleriyle kalıtılan ilk mutasyonun ardından ikinci alelin susturulmasındaki en önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu görülmüştür (Kosova, Özel & Aktan, 2011).

Özellikle ailesel kanser tiplerinde tümör süpresör genlerden birinde kalıtsal olarak eşey hücresi veya somatik hücre mutasyonu bulunur. Bu mutasyon sebebiyle genin bir kopyası fonksiyonunu kaybeder. Genin ikinci kopyasının kaybı somatik mutasyonlar veya hipermetilasyon ile olabilir (Kaymak, 2012).

DNMT1 enziminin artması sonucunda CpG adacıklarındaki metilasyon artar. CpG adalarının genlerin sıklıkla promotör bölgelerinde bulunması nedeniyle özellikle tümör baskılayıcı genler gibi kanser oluşumunda önemli rol oynayan genlerin promotör dizilerindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon bu genleri inaktive eder ve kanser oluşumuna neden olur (Çelik, 2007; Yaykaşlı et al., 2012).

### *DNA metilasyonundaki bozulmadan dolayı kromozomal instabilite*

Kanser gelişimi ve ilerleyişinde etkili olan önemli mekanizmalardan biri de kromozomal instabilitedir. DNA metilasyonunun, DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesi ve böylelikle transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini kapatması yoluyla transkripsiyonu baskıladığı bilinmektedir. Bu sıkı paketlenme aynı zamanda transpozonların genom içerisinde hareket etmelerini de engeller. Ancak metilasyon kaybıyla, DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceği için transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olur (Çelik, 2007).

### *Hücre döngüsü kontrolünde rol alan genlerin hipermetilasyonu*

Hücre döngüsünün kontrolünde görevli olan veya pro-apoptotik süreçte yer alan genler de hipermetilasyona bağlı olarak kanser hücrelerinde fonksiyon kaybına uğrayabilir. Bu genlerin ekspresyonlarının inhibe olması ile birlikte, hücre bölünmesi sırasındaki kontrol noktaları da pas geçilir, hatalı DNA replikasyonları düzeltilemez ve hasarlı DNA'lar

yavru hücrelere geçerek anormal hücre yapıları ortaya çıkar (Kaymak, 2012).

## **2. 2. 2. Histon modifikasyonları**

DNA paketlenmesi, gen ekspresyonunun kontrolü için önemli bir basamak olup, paketlenmenin ilk aşamasında histon proteinleri rol oynamaktadır. Bilindiği gibi DNA çekirdekte çok iyi paketlenmiş bir şekilde bulunur. 146 baz çiftlik DNA sarmalı önce histon proteinlerden (H2A, H2B, H3, H4) oluşan bir oktomerik yapıya yaklaşık 2 (1.65) dönüş yapacak şekilde makara gibi sarılarak nükleozomları oluşturur. Nükleozomlar da H1 histon proteinleri ile birbirlerine tutunarak solenoid yapıyı oluşturur (Güneş, 2013; İzmirli, 2013; Tatar, Erden & Yurter, 2010).

DNA paketlenmesindeki temel rollerinden beklendiği gibi histonlar en yüksek düzeyde korunmuş ökaryot proteinleri arasındadır. Örneğin bir sığır ile bezelyenin H4 histon proteinlerindeki aminoasit dizisinde 102 konumdan yalnızca ikisi farklıdır. Bu güçlü evrimsel korunma histonların işlevi için bütün aminoasitlerin gerekli olduğunu ve herhangi bir konumdaki aminoasit değişikliğinin hücreye zarar vereceğini göstermektedir. Histon dizilerindeki değişikliklerin çoğu ölümcüldür (Alberts et al., 2002).

Nükleozomu oluşturan histon proteinlerinin N uç bölgelerindeki diziler de yüksek düzeyde korunmuştur ve kromatin yapısının düzenlenmesinde önemli görev üstlenirler (Alberts et al., 2002). Bu uç bölgeler nükleozomun dışarısında kalmaları nedeniyle asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinizasyon, sumolizasyon gibi çeşitli posttranslasyonel değişikliklere uğrayabilmektedir. Bu değişiklikler tek başlarına ya da farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatin yapısını değiştirmekte, bu sayede DNA'ya bağlanan proteinler için etkileşim yüzeyi oluşmakta ve gen ekspresyonu kontrolü başta olmak üzere replikasyon, tamir gibi birçok biyolojik olay kontrol edilmektedir (İzmirli, 2013; Tatar et al., 2010).

### **2. 2. 2. 1. Histon kod hipotezi ve histon etkileşimi**

Histon kuyruklarında meydana gelen değişiklikler, üzerinde bulunan kromatin dizisinde ifade farklılıklarına neden olur (Alberts et al., 2002). Histonlar üzerinde gerçekleşen eş zamanlı kovalent değişiklikler, özel bir fonksiyonu yerine getirmek için genleri aktive ve/veya inaktive eder ve buna histon kod hipotezi adı verilir. Histon değişiklikleri statik yapıda değildir, sinyal iletim yollarıyla iletişim halindedir ve dinamik bir yapıdadır. Yani meydana gelen bir histon değişikliği, yanındaki veya uzaktaki diğer bir histon protein değişikliğine sebep olmaktadır. Histonların bu dinamik etkileşimine histon etkileşimi (histone cross-talk) adı verilir. Bu etkileşim mekanizmalarının vücudumuzda çok yaygın olarak görüldüğü ve transkripsiyon gibi önemli mekanizmaların yanı sıra kanser gibi hastalıklarda da rol aldığı kanıtlanmıştır (Yaykaşlı et al., 2012).

Histon değişiklikleri, translasyon sonrasında histon kuyruklarına asetil, metil, fosfor, ubukitin ve SUMO (small ubuquitin-like modifier) gruplarının kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur (Tatar et al., 2010; Yaykaşlı et al., 2012).

*Asetilasyon:* Gen ekspresyonunun kontrolünü sağlayan en önemli histon değişimi asetilasyondur. Histon asetilasyonu gen ekspresyonunu birden fazla yolla etkiler. Negatif yüklü asetil (CH<sub>3</sub>CO) grubunun histon proteinin N uç bölgesindeki pozitif yüklü lizin (K) aminoasitine eklenmesi pozitif yükün nötrale olmasına bu da kromatinin gevşemesine neden olur. Böylece kromatin yapısı değişir, transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerin promotör bölgelerine ulaşabilmesi kolaylaşır ve o bölgedeki genlerin ekspresyonu artar. Ayrıca, asetilli histonlar bazı transkripsiyonel aktivatör proteinler için bağlanma bölgesi oluşturur (Tatar et al., 2010).

Asetilasyon geri dönüşümlü bir değişimdir. Asetil grubunun histon proteinlerinden ayrılması deasetilasyon olarak tanımlanır ve kromatinin tekrar sıkı paketlenmesi ve transkripsiyonun baskılanması ile sonuçlanır (İzmirli, 2013; Tatar et al., 2010).

Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu birbirine zıt fonksiyon gören iki büyük enzim ailesi olan histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından katalizlenir (İzmirli, 2013; Tatar et al., 2010).

HDAC enzimleri histonlardaki asetil gruplarını uzaklaştırıp DNA'yı ökromatik yapıdan heterokromatik duruma sokarak transkripsiyon faktörlerinin hedef promotör bölgelerine bağlanmasını engeller ve böylece gen ekspresyonu baskılar. Gen ekspresyonunun artırılması ve baskılanmasında en önemli rolü bu iki enzim oynar. Asetilasyonun bu iki enzim tarafından düzenlenmesi ile belirli bir hücre tipine özgü gen ekspresyonu ve hücrenin kaderine karar verilmesi epigenetik kontrolün merkezini oluşturmaktadır (Demirci, 2009).

Histon asetilasyonunun yanı sıra histon olmayan proteinlerin asetilasyonu ve deasetilasyonu da HAT ve HDAC enzimleriyle düzenlenir. Bu asetilasyonlar da sinyal iletişim yolları (STAT vb.) aracılığıyla gen ifade seviyelerini düzenlemektedir (Yaykaşlı et al., 2012).

*Metilasyon:* Histon metilasyonları, asetilasyon ve fosforilasyonun aksine elektriksel yük değişimine neden olmazlar. Ayrıca DNA metilasyonu gibi uzun süreli değil, kısa süreli sen suskunluğuna neden olurlar. Histon metilasyonları, histon metiltransferaz enzimi ile S-adenozin metioninden alınan 1, 2 veya 3 tane metil grubunun histon proteinindeki (genellikle H3 ve H4) lizin ve arginin amino asitlerine eklenmesiyle oluşur (İzmirli, 2013; Yaykaşlı et al., 2012).

Histon proteinindeki lizin metilasyonu önemli bir histon değişimi olup, heterokromatin oluşumu, X kromozomu inaktivasyonu, genomik kararlılık, kök hücre olgunlaşması, genomik baskılama (imprinting) ve

transkripsiyonel düzenleme gibi birçok biyolojik süreçte önemli role sahiptir (Yaykaşlı et al., 2012).

*Fosforilasyon:* Her histon kuyruğunun N uç kısmında korunmuş serin bölgeleri bulunur. Bu bölgeler kinazların birçoğu için fosfor-alıcı (phosphoacceptor) bölgeler olup, çeşitli fizyolojik yollar için gereklidir. Örneğin histon H3 de Ser10 bölgesindeki fosforilasyon mitoz sırasında aktif gen ekspresyonuna veya kromatin yoğunlaşmasına yol açabilir. Buna ek olarak, belirli bölgelerdeki fosforilasyon, asetilasyon ve metilasyon gibi diğer modifikasyonlara bağlanarak çeşitli fizyolojik süreçlere cevap verir (histon kod hipotezi) (Loury & Sassone-Corsi, 2003).

*Ubukitinasyon:* Ubukitin (Ub) lizin rezidüsü ile bağlanabilen küçük bir proteindir. Üç aşamalı bir enzimatik reaksiyonun oluşumuna neden olur. Bu reaksiyonlar; E1, E2, E3 adı verilen enzimler tarafından gerçekleştirilir ve neticesinde proteinler proteozom yolağına girerek yıkılırlar (Güneş, 2013; İzmirli, 2013).

*Sumolasyon:* SUMO (small ubuquitin-like modifier) 1, 2, 3 proteinlerinin ubukitin ile birleşmesi olayıdır. Ubukitin benzer bir protein olan SUMO proteinleri lizin rezidülerinden proteinlere bağlanır ve sumolasyon sonucunda protein yıkımı engellenir (İzmirli, 2013).

### **2. 2. 3. Kodlamayan RNA'lar**

Yüksek organizasyonlu canlılarda genetik materyal DNA'dır ve DNA'daki bilgi RNA'ya transkripte edildikten sonra RNA bu şifreyi proteine çevirir. RNA'nın; proteine çevrilebilen mRNA ile proteine çevrilemeyen yani kodlamayan RNA (non-coding RNA veya ncRNA) çeşitleri bulunmaktadır. RNA'nın %98'den fazlası proteine çevrilemez ve bu çevrilemeyen kısımların da %70'ini intronlar oluşturur (Güzelgöl & Aksoy, 2009).

Kodlamayan RNA'lar büyüklüklerine göre uzun (200 nükleotidden uzun: long non-coding RNAs-lncRNAs) ve küçük (200 nükleotidden kısa) RNA'lar olarak ikiye ayrılır. Uzun kodlamayan RNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Bu grupta yer alan RNA'lar Xist, Tsix ve Linc RNA'lardır (Akkaya & Dinçer, 2013; Güzelgöl & Aksoy, 2009).

Küçük RNA'lar (sRNA), çift sarmal RNA'lardan (dsRNA) oluşan 19-28 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan ve henüz bütün işlevleri aydınlanmamış RNA'lardır. Bilinen en önemli işlevleri gen susturulmasında rol oynamalarıdır. Küçük kodlamayan RNA'lara örnek olarak miRNA, siRNA ve piRNA verilebilir. Küçük kodlamayan RNA'lar ve işlevleri Tablo 3'de özetlenmiştir (Güzelgöl & Aksoy, 2009).

**Tablo 2.5.** Küçük kodlamayan RNA'lar ve işlevleri (Güzelgöl & Aksoy, 2009).

Sınıf	Tanım	Biyogenez ve genomik orjini	İşlevi
miRNA	Micro RNA	DİCER ve RNAazIII benzeri enzimlerle daha büyük öncüllerden kesim sonucu oluşur	Pek çok genin transkripsiyon sonrası regülasyonundan sorumludur
siRNA	Small İnterfering RNA	dsRNA'nın DİCER enzimi tarafından kesilmesi sonucu oluşur	Transkripsiyon sonrası regülasyondan ve heterokromatin oluşumundan sorumludur
piRNA	Piwi RNA	DİCER'den farklı Argonat-bağımlı enzim kesimi sonucu oluşur	Sinek ve memelilerin eşey hücrelerinde transpozon ve retroelementlerin baskılanmasından sorumludur

Çift sarmal RNA'nın hücreye girmesi ve hedef mRNA zincirinin yıkımına neden olarak sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması RNA interferans (RNAi) olarak adlandırılır. RNAi aracılıklı sessizleşme mekanizmasında etkili başlıca RNA'lar, eksojen kaynaklı çift sarmal RNA (dsRNA) orjinli siRNA ve endojen kaynaklı ve tek sarmal RNA (ssRNA) orjinli miRNA'lardır (Güzelgöl & Aksoy, 2009).

siRNA'lar, çift sarmal RNA kökenli, virüs gibi eksojen bir kaynaktan gelmeleri ve tamamen mRNA'ya bağlanıp mRNA'yı parçalayarak gen ifadesini susturmaları ile miRNA'lardan ayrılırlar (Bodur & Demirpençe, 2010; Güzelgöl & Aksoy, 2009).

piRNA'lar PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA'lardır. piRNA'lar PIWI proteinleriyle bir araya gelerek ribonükleoprotein yapısı oluştururlar. Germ-line hücrelerinde, özellikle spermatogenezde retrotranspozonların ve diğer genetik elementlerin susturulmasını sağlarlar. piRNA'ların etki mekanizması halen araştırılmaktadır (Akkaya & Dinçer, 2013).

### 2. 2. 3. 1. Mikro RNA'lar

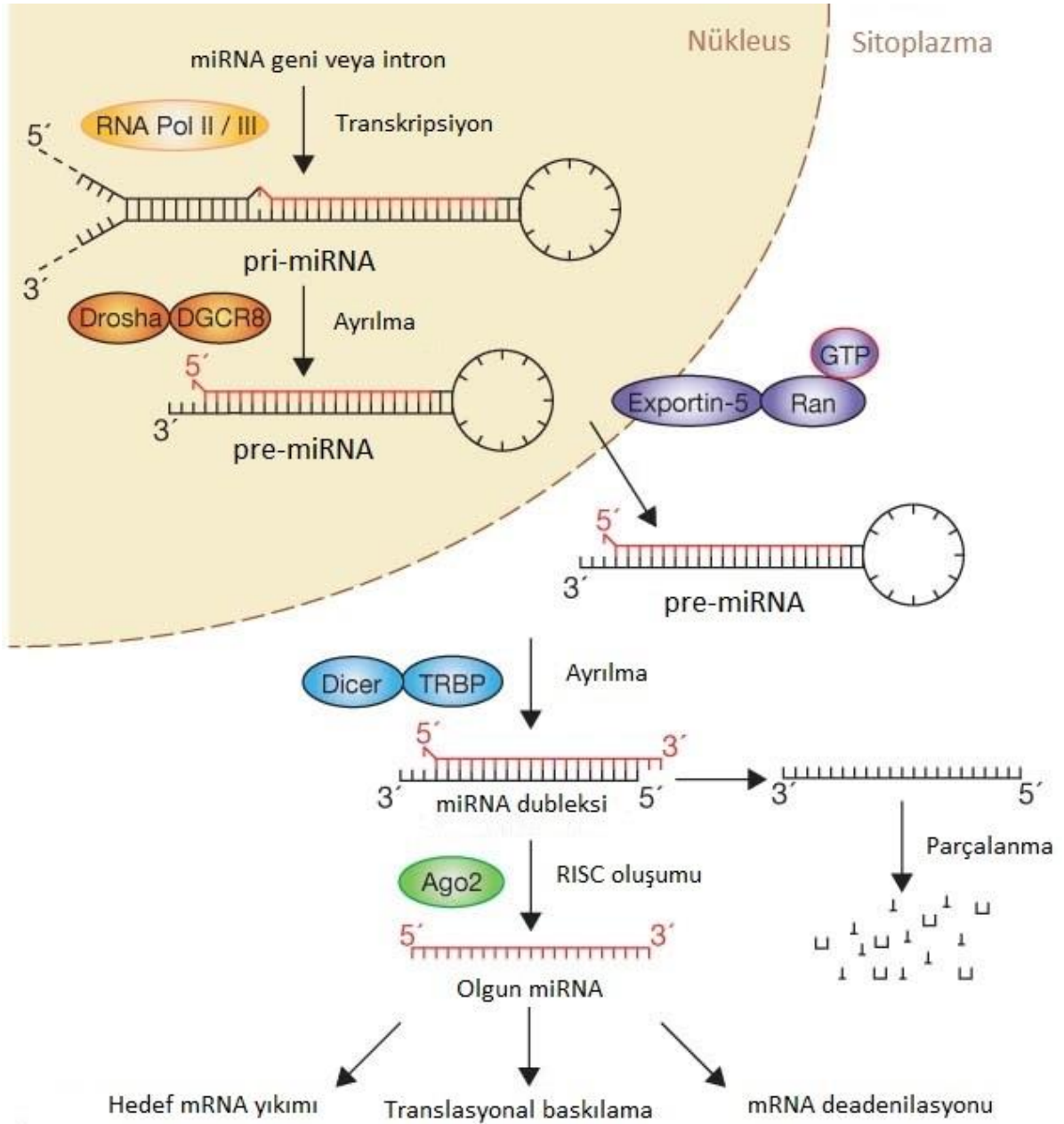
Lee ve arkadaşları 1990'lı yılların başlarında bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans* ile yapılan genetik testler sırasında ilk keşfedilen miRNA olan lin-4'ü tanımlanmışlardır. Lin-4'ün hedefe özgü translasyonel inhibisyona neden olduğunun belirlenmesi gen düzenlenmesinde yeni bir mekanizma olan miRNA'ların araştırılmasını sağlamış ve Lin-4'ün tanımlanmasından 7 yıl sonrada diğer bir miRNA olan let-7 tanımlanmıştır (Seydel & Aksoy, 2009).

Mikro RNA'lar (miRNA) saç tokası yapısı içeren, yaklaşık 18-24 nükleotidlik kısa ve kodlamayan RNA'lar olup, diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA

molekülleri halinde gen regülasyonunda görev alırlar (Bandres et al., 2009; Lehmann et al., 2008; Lujambio et al., 2007; Saito et al., 2006; Saydam et al., 2011).

### 2. 2. 3. 1. 1. miRNA biyogenezi

miRNA oluşum süreci çekirdekte genomik DNA'dan RNA polimeraz II veya III enzimi ile transkripsiyon ile başlar. Oluşan transkriptte primer transkript (pri-miRNA) ismi verilir. pri-miRNA, bir RNAaz olan Drosha-DGCR8 (Pasha) kompleksi ile kesilerek yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA şeklinde ayrılır. Öncül saç tokası yapısında olan pre-miRNA nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada bir RNAaz olan Dicer ve çift zincir RNA'ya bağlanan bir protein olan TRBP'nin oluşturduğu kompleks pre-miRNA saç tokası yapısını keser böylece 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA (miRNA dublesi) oluşur. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Olgun uzunluktaki miRNA'nın fonksiyonel zinciri (bu zincir klavuz zincir olarak isimlendirilir ve Şekil 2'de kırmızı renkte gösterilmiştir) Argonaute (Ago2) proteini ile birlikte RISC kompleksine dahil olur. Diğer zincir, anti-klavuz veya yolcu zincir olarak adlandırılır (Şekil 2'de siyah renkte gösterilmiştir), RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Böylece oluşan olgun miRNA hedef mRNA'ları, mRNA yıkımı, translasyonel baskılama veya deadenilasyon yoluyla sessizleştirir (Saydam et al., 2011; Winter, Jung, Keller, Gregory & Diederichs, 2009). miRNA'nın hedefi olan mRNA üzerinde 2-8 nükleotidlik bir bağlanma bölgesi bulunur ve bu bölge miRNA davranışı için kritik öneme sahiptir. miRNA-mRNA komplementerliği tam ya da tama yakın ise hedef mRNA'nın yıkımı gerçekleşir, komplementerlik daha az ise translasyon baskılanır (Topal, 2014) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** miRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu (Winter et al., 2009)

### 2. 2. 3. 1. 2. miRNA'lar ve kanser

Onkogen ve/veya tümör süpresör proteinleri kodlayan genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda kanser gelişimi ve tümör oluşumunda miRNA'ların da önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiş ve kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu anlaşılmıştır. Kansere ilişkilendirilmiş genomik alanların %50'sinden fazlasının miRNA kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (Aşçı Çelik, Aslan Koşar & Özçelik, 2013).



miRNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. miRNA'lar mRNAların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak mRNA yıkımını sağlar veya traslasyona uğramalarını engellerler (Bandres et al., 2009; Lehmann et al., 2008; Lujambio et al., 2007; Saito et al., 2006). miRNA'lar dokuya spesifik olarak eksprese olur ve hücre farklılaşması, çoğalması ve apoptozis gibi anahtar hücrel yolakların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Lehmann et al., 2008; Saito et al., 2006; Saydam et al., 2011).

MikroRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi ilk olarak miR-15a ve miR16-1'in keşfedilmesi ile rapor edilmiş olup, bu mikroRNA'ların etki mekanizması ise 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışma ile ortaya konmuştur. Bu iki miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle Cimmino ve arkadaşları miR-15a ve miR16-1'in tümör süpresör aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir (Cimmino et al., 2005; Saydam et al., 2011).

miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak belirlenmiştir. Çeşitli kanser olgularında, ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen miRNA ya da onkomir olarak tanımlanmış olup, bu grup miRNA'lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler. İlk olarak keşfedilen onkogenik miRNA'lardan bir tanesi miR-155'tir. Mir-155'in hedef mRNA'sı tam olarak belirlenmemiş olmakla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miR-155'in B hücreli lenfoma, meme, pankreas, akciğer ve Hodgkin's lenfoma gibi kanserlerde yüksek ekspresyon sergilediği gösterilmiştir (Aşçı Çelik et al., 2013; Saydam et al., 2011; Tam, Ben Yehuda & Hayward, 1997).

Onkomir'lerin aksine onkogenlerin ekspresyonu üzerine etkili olan miRNA'lar tümör süpresör miRNA'lar (TS-mir) olarak tanımlanır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunu onkogenleri baskılayarak ve farklılaşmayı sağlayan genlerin aktivitesini artırarak engel olurlar. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur (Topal, 2014).

İlk keşfedilen miRNA'lardan biri olan let-7, aynı zamanda tümör baskılayıcı özellik gösterdiği belirlenen ilk miRNA'lardandır. let-7'nin kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkojenik farklılaşma kaybına yol açtığı belirlenmesi let-7'nin tümör baskılayıcı etki gösteren bir miRNA olarak kabul edilmesine sebep olmuştur (Aşçı Çelik et al., 2013; Topal, 2014).

### 2. 2. 3. 1. 3. miRNA ve DNA metilasyonu

Değişmiş miRNA seviyelerinin karsinogeneziste önemli role sahip olduğu bilinmesine rağmen miRNA ekspresyonunun epigenetik mekanizmalar üzerine etkisi çok net değildir. DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların bu düzenlenmeden etkilenebileceği ve miRNA ekspresyonunun DNA metilasyonunu direkt veya dolaylı olarak düzenleyebileceği belirtilmektedir (Han et al., 2007; Iorio et al., 2010; Weber et al., 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bazı mikroRNA'ların DNA metiltransferazları hedeflediği ve kanserdeki metilasyon değişiklikleri ile ilişkili oldukları belirlenmiştir (Fabbri et al., 2007). Bu şekilde epigenetik kontrol bileşenlerini hedefleyen miRNA grubuna epi-miRNA adı verilir. Epi-miRNA alt grubu ilk kez akciğer kanserinde miR-29'un DNA metiltransferaz DNMT3a ve DNMT3b'yi hedeflediğinin belirlenmesi ile tanımlanmıştır. Bu keşif daha önce bilinmeyen bir düzenleyici mekanizma olan miRNA'ların doğrudan DNA metiltransferazlar ve histon deasetilazlar gibi epigenetik elemanları kontrol ettiğini göstermiştir (Asrih & Steffens, 2013; Valeri et al., 2009).

Benzer şekilde miR-148a ve miR-148B'nin de DNMT3b ekspresyonunu kontrol ettiği belirlenmiştir. Mir148 ailesi, DNMT3b mRNA'sının kodlama bölgesinden farklı bir bölgeye bağlanarak (3'-UTR'ye değil) de novo DNMT'nin ekspresyonunu düzenlediği gibi DNMT3b'nin birkaç farklı splice varyantının ekspresyonunu düzenleyebilir. miR148 ailesinin epi-miRNA olarak tanımlanmasından bu yana çeşitli tümör tiplerinde araştırılmış ve kendi promötör bölgesinin de sıklıkla hipermetile olduğu bulunmuştur (Duursma, Kedde, Schrier, Le Sage & Agami, 2008; Valeri et al., 2009).

Epi-miRNA ailesinin bir diğer üyesi miR-200 ile yapılan bir çalışmada mide tümör dokuları ve gastrik kanser hücre dizilerinde miR-200b ve miR-200c'nin DNMT3a, DNMT3b ve SP1'i (*DNMT1* geninin bir transaktivatörü) hedeflediği ve aşırı eksprese olduklarında DNMT1, DNMT3a ve 3b proteinlerinin ekspresyonlarını baskıladığı belirlenmiştir. Bu etkinin önce global DNA metilasyonunda azalmaya daha sonra promotör DNA metilasyonu nedeniyle de p16, RASS1A1 ve e-kaderin'in yeniden ekspresyonuna neden olduğu ve böylelikle bu epi-miRNA ailesinin kanserleşme sürecinde önemli role sahip olduğu belirlenmiştir (Tang et al., 2013).

Translasyon sonrası düzenlemede önemli role sahip olan miRNA'lar aynı zamanda genetik olarak kontrol edilmektedir. miRNA dizilerinde meydana gelen genetik varyasyonların miRNA ekspresyonunu veya olgunlaşmasını değiştirebileceği ve bu mekanizma üzerinden de kanser gelişimi ve ilerlemesine neden olabileceği belirtilmiştir (Kim et al., 2010).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1. Gereç

Çalışmamız için gerekli olan Etik Kurul onayı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2012 yılı 45 karar numarası ile verilmiştir. Araştırmamızda analizi gerçekleştirilecek genetik polimorfizmler için gerekli malzemelerin sağlanabilmesi amacıyla çalışma proje önerisi haline getirilmiştir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 6 Temmuz 2012 tarihinde 201241020 proje numarası ile proje önerimizi destekleme kararı almıştır.

#### 3.1.1. Çalışma grubu bireyleri ve örneklerin toplanması

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalına 1 Ağustos 2012 ile 1 Ocak 2014 tarihleri arasında başvuran 80 yaş altı 90 akciğer kanseri hastası ile 90 sağlıklı kontrol birey çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmanın içeriğiyle ilgili olarak tüm hastalara detaylı bilgi verilerek hastalardan imzalı onam formu alınmış, bilgilendirilmiş ayrıntılı onam formlarını imzalamayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamızın dışlama kriterleri aşağıda belirtilmiştir:

- 30 yaşından küçük, 80 yaşından büyük bireyler
- Akciğer kanseri haricinde başka bir malignensiye sahip hastalar
- Akciğer kanseri tanısı konmuş ancak kemoterapi veya radyoterapi tedavisine başlamış hastalar
- Kontrol bireylerde herhangi bir malignensiye veya kronik bir hastalığa sahip olanlar

Her hastadan genetik varyasyon analizi için EDTA'lı tüpe 2 ml venöz kan örneği alınmıştır. Çalışmamıza dahil edilen bireylerin demografik ve klinik özellikleri hakkındaki bilgiler kendilerinden ve kemoterapi hazırlık dosyalarından elde edilmiştir.

Hastalardan elde edilen demografik ve klinik özellikler şu şekildedir;

Demografik Özellikler:

- Cinsiyet
- Yaş
- Beden kütle indeksi

#### Hastanın Klinik Özellikleri:

- Günlük sigara kullanımı ve süresi
- Ak toprak (asbest) maruziyeti
- Ailede kanser hikayesi
- Sahip olunan kronik hastalıklar

#### **3.1.2. Kullanılan cihazlar**

- Mikrosantrifüj
- Buzdolabı
- Vorteks
- Nano spektrofotometre
- Derin dondurucu
- PCR (Polimerase Chain Reaction) cihazı (Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, California, USA)
- Otomatik pipet seti
- Elektronik pipetleme ve dağıtım seti (Eppendorf Repeater® Xstream Electronic Pipette)
- Çeker ocak
- MassARRAY Nanodispenser
- MassARRAY Kütle Spektrometresi
- Su banyosu
- PCR plaka rotorlu santrifüj
- PCR plaka döndürücü

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

- Vacutainer kan toplama seti
- Steril laboratuvar eldiveni
- EDTA'lı mor kapaklı kan alma tüpü (2 ml)
- Plastik pastör pipeti
- % 98,9'luk Etil alkol
- DNA izolasyon kiti (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit)
- Polipropilen kapaklı steril mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
- Steril mikropipet ucu (100-1000 µl)
- Steril mikropipet ucu (10-100 µl)
- Steril mikropipet ucu (0,5-10 µl)

- Vida kapaklı, contalı polipropilen yapıda mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
- DNA örneklerini saklama kutusu
- miR 15b (rs146020563) varyantı için primer çifti
- miR 15b (rs192595529) varyantı için primer çifti
- miR 25 (rs41274221) varyantı için primer çifti
- miR 26b (rs188612260) varyantı için primer çifti
- miR 92b (rs12759620) varyantı için primer çifti
- miR 101-2 (rs138231885) varyantı için primer çifti
- miR 125a (rs12975333) varyantı için primer çifti
- miR 125a (rs143525573) varyantı için primer çifti
- miR 128-1 (rs117812383) varyantı için primer çifti
- miR 148b (rs185315720) varyantı için primer çifti
- miR 148b (rs74878365) varyantı için primer çifti
- miR 200b (rs72563729) varyantı için primer çifti
- miR 339 (rs13232101) varyantı için primer çifti
- miR 339 (rs145196722) varyantı için primer çifti
- miR 339 (rs72631820) varyantı için primer çifti
- miR 339 (rs72631831) varyantı için primer çifti
- miR 367 (rs150161032) varyantı için primer çifti
- miR 377 (rs189165474) varyantı için primer çifti
- miR 429 (rs138358853) varyantı için primer çifti
- miR 429 (rs183812340) varyantı için primer çifti
- miR 513c (rs145416750) varyantı için primer çifti
- miR 513c (rs184216167) varyantı için primer çifti
- miR 513c (rs193119939) varyantı için primer çifti
- miR 561 (rs112456539) varyantı için primer çifti
- miR 561 (rs184508542) varyantı için primer çifti
- miR 720 (rs182926610) varyantı için primer çifti
- miR 1274a (rs318039) varyantı için primer çifti
- miR 1275 (rs76156362) varyantı için primer çifti
- miR 3202 (rs188912830) varyantı için primer çifti
- miR 3662 (rs117905199) varyantı için primer çifti
- miR 3662 (rs182791806) varyantı için primer çifti

- miR 4465 (rs111516728) varyantı için primer çifti
- miR 4465 (rs5880480) varyantı için primer çifti
- miR 4465 (rs62919962) varyantı için primer çifti
- miR 4465 (rs72556173) varyantı için primer çifti
- miR 4747 (rs182946132) varyantı için primer çifti
- miR 4747 (rs77046863) varyantı için primer çifti
- miR 15b (rs146020563) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 15b (rs192595529) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 25 (rs41274221) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 26b (rs188612260) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 92b (rs12759620) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 101-2 (rs138231885) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 125a (rs12975333) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 125a (rs143525573) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 128-1 (rs117812383) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 148b (rs185315720) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 148b (rs74878365) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 200b (rs72563729) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 339 (rs13232101) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 339 (rs145196722) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 339 (rs72631820) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 339 (rs72631831) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 367 (rs150161032) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 377 (rs189165474) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 429 (rs138358853) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 429 (rs183812340) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 513c (rs145416750) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 513c (rs184216167) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 513c (rs193119939) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 561 (rs112456539) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 561 (rs184508542) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 720 (rs182926610) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 1274a (rs318039) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 1275 (rs76156362) varyantı için Extension PCR primeri

- miR 3202 (rs188912830) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 3662 (rs117905199) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 3662 (rs182791806) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4465 (rs111516728) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4465 (rs5880480) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4465 (rs62919962) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4465 (rs72556173) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4747 (rs182946132) varyantı için Extension PCR primeri
- miR 4747 (rs77046863) varyantı için Extension PCR primeri
- Deiyonize su (dH<sub>2</sub>O)
- PCR reaksiyonları için ultra saflaştırılmış distile su
- 384 kuyucuklu PCR plakası
- 384 kuyucuklu PCR plakasına uygun steril optik yapışkan film
- PCR Buffer (10X, 20 mM MgCl<sub>2</sub> içeren)
- 25 mM Mg<sub>2</sub>Cl
- HotStarTaq DNA Polimeraz (5U/μl)
- dNTP karışımı (Her birinden 25 mM)
- Shrimp Alkalen Fosfataz Buffer (10X)
- Shrimp Alkalen Fosfataz enzimi (1.7 U/μl)
- iPLEX GOLD Buffer
- iPLEX Termination Mix
- iPLEX Enzim
- Steril Rezin (Resin)
- 3-point kalibrant
- MassARRAY sistemine uygun çip (SpectroCHIP)

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. miRNA hedeflerinin ve miRNA genleri üzerinde yer alan SNP'lerin belirlenmesi

Çalışmamızda DNA metilasyonunda görevli olan DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen miRNA'lara ait genetik varyasyonların belirlenmesi planlanmıştır. Bunun için öncelikle <http://mirdb.org/miRDB> ve <http://www.targetscan.org> veri tabanları kullanılarak DNA metilasyonunda görevli DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b, MBD1, MBD2 ve MeCP2'yi hedefleyen miRNA'lar tespit edilmiştir. Örnek olarak miRDB ve TargetScanHuman veri tabanlarında DNMT1'i hedefleyen miRNA'lar Şekil 3.1 ve 3.2.'de gösterilmiştir.

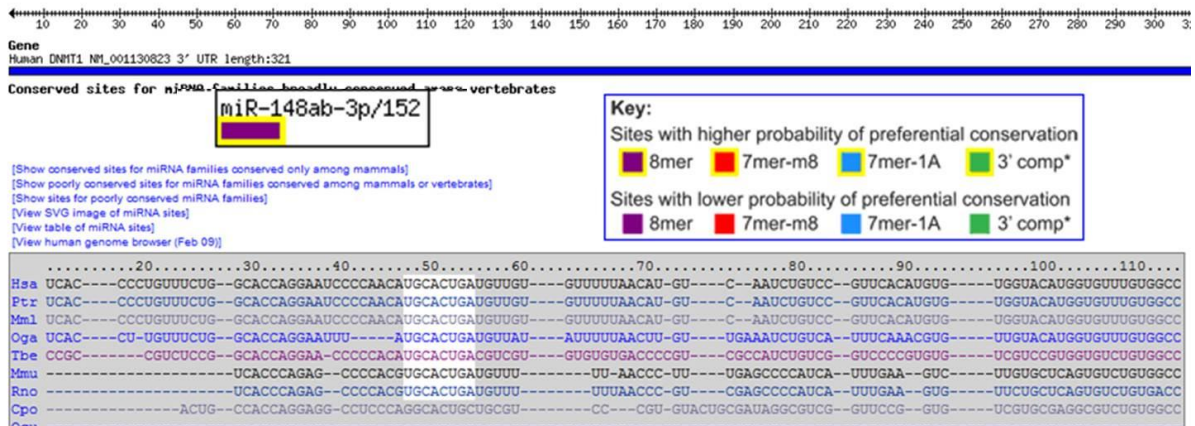
Gene 1786 is predicted to be targeted by 6 miRNAs in [miRDB](#)

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
<a href="#">Details</a>	1	80	hsa-miR-152	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<a href="#">Details</a>	2	77	hsa-miR-148b	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<a href="#">Details</a>	3	76	hsa-miR-148a	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<a href="#">Details</a>	4	66	hsa-miR-185	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<a href="#">Details</a>	5	64	hsa-miR-142-5p	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<a href="#">Details</a>	6	55	hsa-miR-1264	<a href="#">DNMT1</a>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1

Şekil 3.1. miRDB veri tabanı ile DNMT1'i hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi



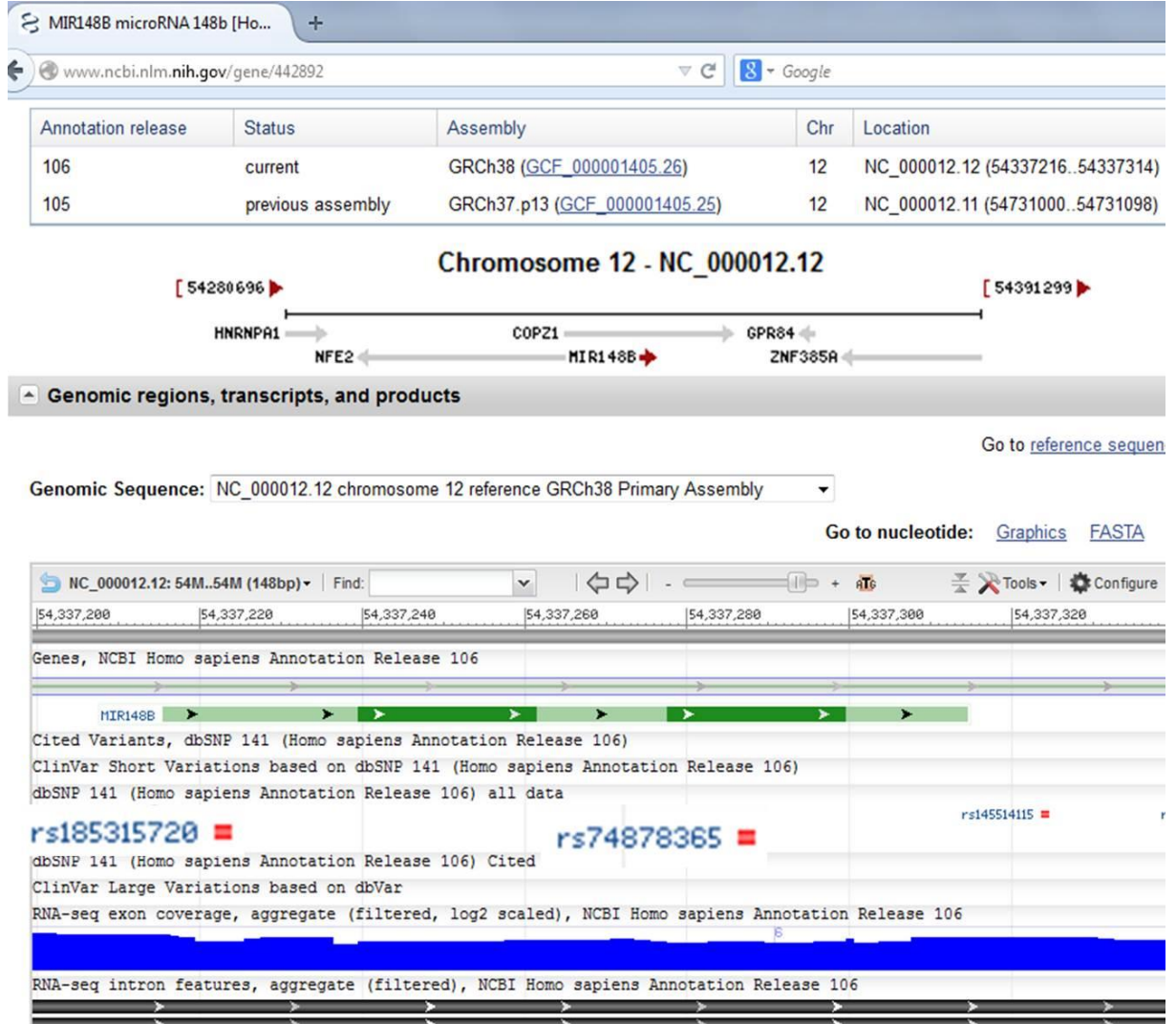
#### Human DNMT1 3' UTR



Şekil 3.2. TargetScan veri tabanı ile DNMT1'i hedefleyen miRNA'ların belirlenmesi



Belirlenen miRNA'lar NCBI Gene veri tabanında taranmış ve genetik varyasyona sahip miRNA genleri belirlenmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, 13-03-2012) (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** NCBI Gene veri tabanından varyasyon tespiti (miR148B).

miRDB, TargetScanHuman ve NCBI veri tabanı taramaları sonucunda genetik varyasyona sahip olup, DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen 22 miRNA ile 37 SNP (tek nükleotid polimorfizmi) ilişkilendirilmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** DNMT'ler ve MBD'leri hedefleyen 22 miRNA ile bu miRNA'lar üzerinde yer alan 37 SNP.

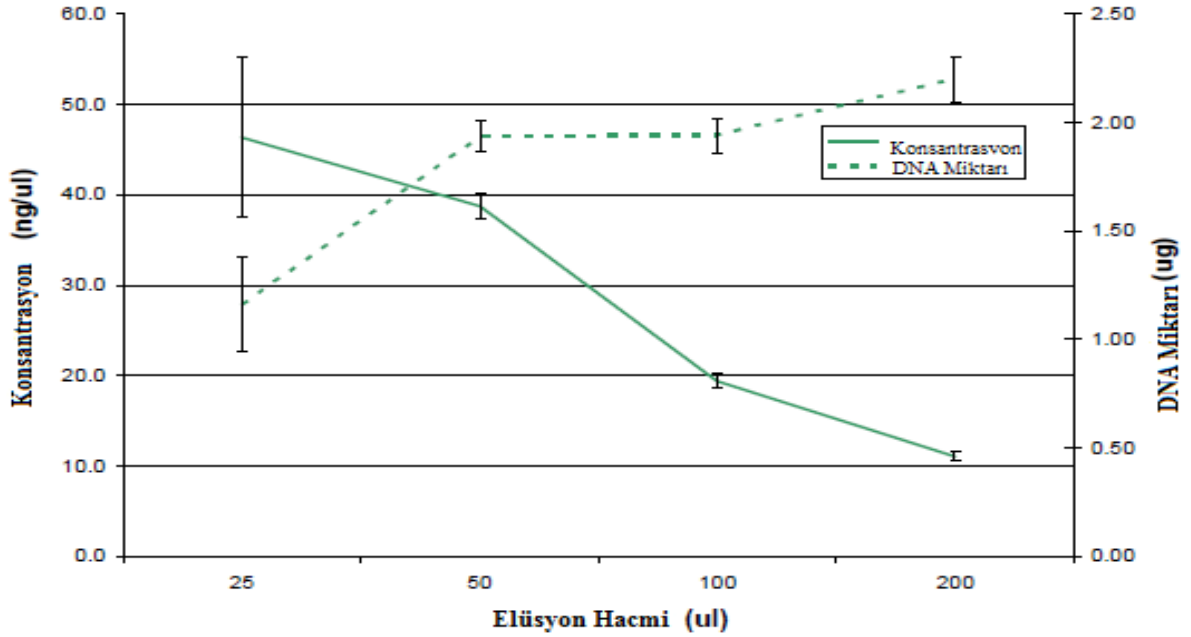
<b>miRNA</b>	<b>Hedefi</b>	<b>SNP</b>
MIR 15B	MBD1	<a href="#">rs146020563</a> <a href="#">rs192595529</a>
MIR 25	MBD2	<a href="#">rs41274221</a>
MIR 26B	DNMT3B	<a href="#">rs188612260</a>
MIR 92B	MBD2	<a href="#">rs12759620</a>
MIR 101-2	DNMT3A	<a href="#">rs138231885</a>
MIR 125A	MBD1	<a href="#">rs12975333</a> <a href="#">rs143525573</a>
MIR 128-1	MBD2	<a href="#">rs117812383</a>
MIR 148B	DNMT1 DNMT3B	<a href="#">rs185315720</a> <a href="#">rs74878365</a>
MIR 200B	DNMT3A	<a href="#">rs72563729</a>
MIR 339	DNMT3B	<a href="#">rs72631831</a> <a href="#">rs145196722</a> <a href="#">rs72631820</a> <a href="#">rs13232101</a>
MIR 367	MBD2	<a href="#">rs150161032</a>
MIR 377	MBD1	<a href="#">rs189165474</a>
MIR 429	DNMT3A	<a href="#">rs183812340</a> <a href="#">rs138358853</a>
MIR 513c	TRDMT1	<a href="#">rs145416750</a> <a href="#">rs184216167</a> <a href="#">rs193119939</a>
MIR 561	DNMT3B	<a href="#">rs112456539</a> <a href="#">rs184508542</a>
MIR 720	DNMT3A	<a href="#">rs182926610</a>
MIR 1274a	DNMT3B	<a href="#">rs318039</a>
MIR 1275	MeCP2	<a href="#">rs76156362</a>
MIR 3202	MeCP2	<a href="#">rs188912830</a>
MIR 3662	TRDMT1	<a href="#">rs182791806</a> <a href="#">rs117905199</a>
MIR 4465	DNMT3B	<a href="#">rs111516728</a> <a href="#">rs62919962</a> <a href="#">rs5880480</a> <a href="#">rs72556173</a>
MIR 4747	MeCP2	<a href="#">rs182946132</a> <a href="#">rs77046863</a>

### 3.2.2. DNA İzolasyonu ve miktarının belirlenmesi

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. 100 µl kan örneğinden saflaştırılan genomik DNA'nın kullanılan elüsyon solüsyonuna göre konsantrasyonu ve miktarı Grafik 3.1'te gösterilmiştir ([http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf), 30-11-2013).



**Grafik 3.1.** 100 µl kandan izole edilen DNA'nın elüsyon hacmine göre konsantrasyon grafiği

([http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf), 30-11-2013)

### *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 içerisinden 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.

#### *DNA miktarının belirlenmesi*

DNA izolasyon kiti ile elde edilen DNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, ABD) spektrofotometresi ile ölçüldü (Şekil 3.4).



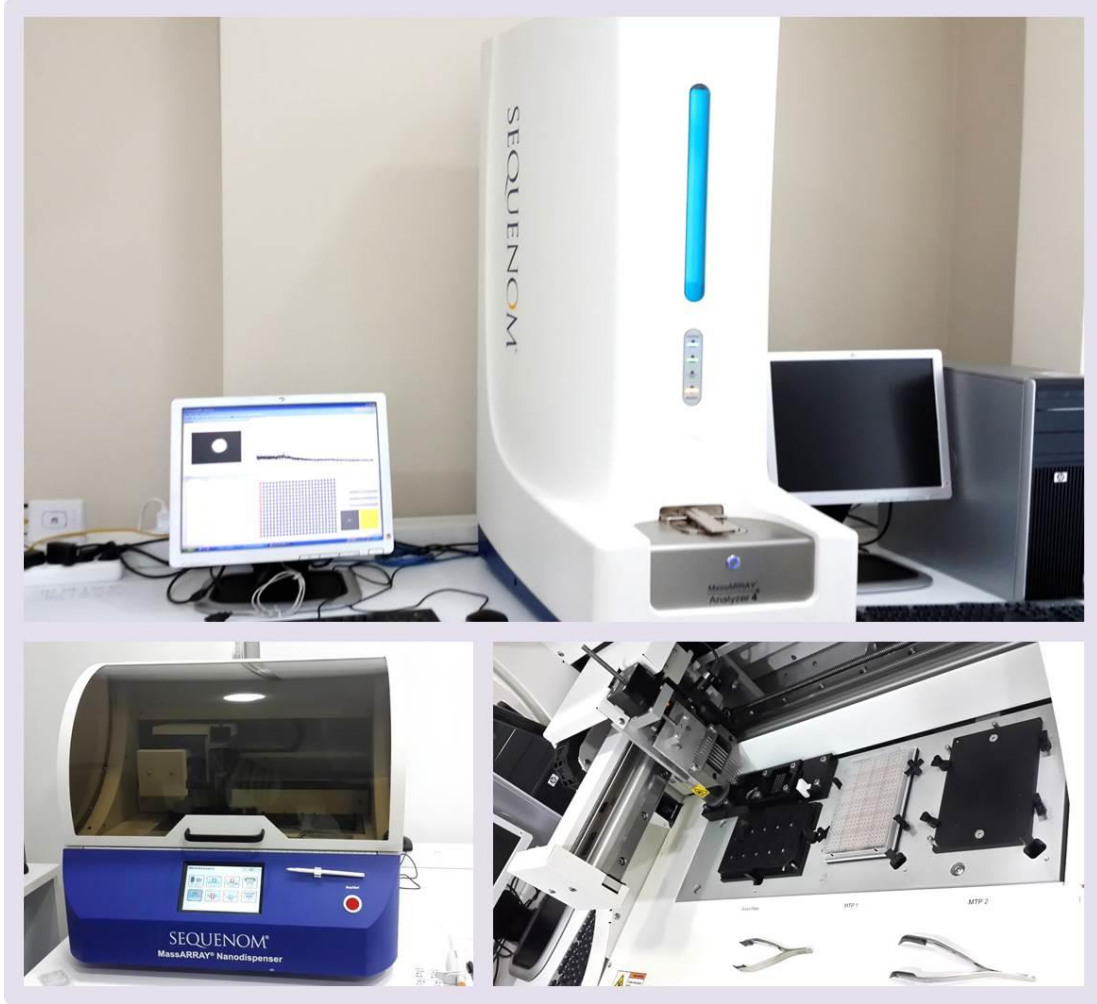
**Şekil 3.4.** Thermo Scientific NanoDrop™ 1000

Genotip analizlerin yapılacağı MassARRAY sistemi, fazla miktarda PCR ampliconlarına ihtiyaç duyduğu için kalıp genomik DNA'nın yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Bu nedenle, Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spektrofotometrenin 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçtüğü absorban değerlerinin oranının ( $A_{260}/A_{280}$ ) 1,7 ile 2,0 arasında olması şartı arandı. Bu aralıktaki oran değerleri en düşük protein kontaminasyonunu göstermektedir(<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>, 27-10-2013). Ölçümden sonra, DNA stok konsantrasyonu 50 ng/ $\mu$ L olacak şekilde örnekler elüsyon solüsyonu ile sulandırıldı.

### **3.2.3. Genotip analizi**

Çalışmamızda araştırmayı hedeflediğimiz ilgili genlerdeki varyasyonların genotipleri, Sequenom MassARRAY® System (Sequenom Inc., San Diego, California, ABD) kullanılarak analiz edildi. Sequenom MassARRAY® sistemi hedefteki genetik materyalin ve/veya varyantın miktarının etkin ve hassas ölçümünün yapıldığı DNA analizi platformudur. Bu platform, MassARRAY Nanodispenser ve MassARRAY Analyzer cihazlarından oluşmaktadır (Şekil 3.5). MassARRAY Nanodispenser, SpectroCHIP array üzerine hızlı şekilde örnek transferini gerçekleştirmek için kullanılmaktadır. MassARRAY Analyzer ise özellikle genomik uygulamalar için dizayn edilmiş, masa üstü tam otomatik bir MALDI-TOF (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) kütle spektrometresidir (Millis, 2011).

Sequenom MassARRAY® sistemi, somatik mutasyon profillemesi, genotiplendirme, metilasyon analizi ve kantitatif gen ekspresyonu gibi çeşitli uygulamaların yapılmasına imkan tanımaktadır (Millis, 2011). Biz bu platformda İplex GOLD SNP genotiplendirmesini yürüttük.



**Şekil 3.5.** Sequenom MassARRAY® Sistemi

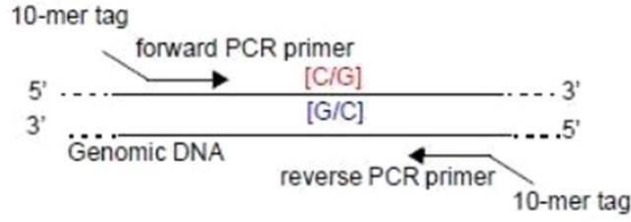
### 3.2.3.1 İplex GOLD SNP genotiplendirme prensibi

İplex GOLD, SNP genotiplendirme için önde gelen bir teknolojidir. MassARRAY sistemi üzerinde yürütülen bu uygulama GWAS (Genome-Wide Association Studies) ve bağlantı analizi çalışmalarının doğru haritalandırılmasında ve validasyonunda, hatta ilgili alanlara yönelik SNP panelleri ile rutin genetik test olarak çok yaygın kullanılmaktadır (Millis, 2011).

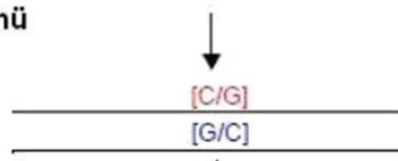
İplex GOLD analizinin onlarca SNP'nin aynı anda genotiplendirilmesi özelliği yüzlerce çalışmada kullanılmıştır. Rutin olarak istenilen bölgelere yönelik dizayn kapasitesi ile hem yüksek seviyede esnekliğe sahip, hem de her bir genotip için çok düşük maliyet sunmaktadır (Gabriel, Ziaugra & Tabbaa, 2009; Millis, 2011).

İplex GOLD reaksiyonu insersiyonlar, delesyonlar, yer değişimler ve diğer polimorfizmler için evrensel bir yöntemdir. DNA amplifikasyonu, SAP (Shrimp Alkalen Fosfataz) reaksiyonu, İplex GOLD reaksiyonu, rezin ile temizleme ve MALDI-TOF analizi aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 3.6) (Gabriel et al., 2009).

### Amplifikasyon

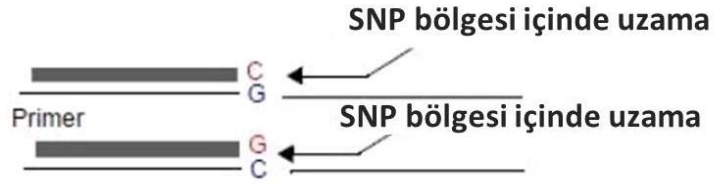


### PCR Ürünü



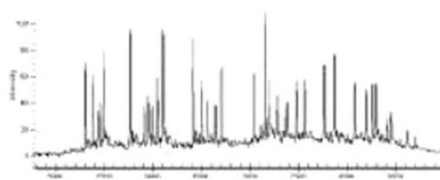
### SAP Uygulaması

### İPLEX Reaksiyonu



### Örneklerin işlenmesi ve dağıtımı

### Spekto Görüntüsü



24-plex spectrum

### MALDI-TOF Kütle Spektrometre Analizi

Şekil 3.6. İplex GOLD Reaksiyonu (Gabriel et al., 2009)



İplex GOLD genotiplemesinde ilk önce, hedeflenen SNP veya mutasyonlar belirlenerek varyasyona uygun amplifikasyon ve uzama primerleri için dizayn yapılır. Bu analiz için varyasyon bölgesini içine alan en uygun amplikon uzunluk aralığı 80-120 bç'dir. Amplikonların 400 bç'den yukarı olmasından kaçınılmalıdır. Kütle spektrumundaki karışıklığı önlemek ve PCR performansını arttırmak için, amplifikasyon primerlerinin kütlelerinin uzama primerlerinden ve uzama ürünlerinden farklı olmasına dikkat edilmelidir. Primer dizaynı yaparken primer dimer oluşumuna dikkat etmek, özellikle multipleks reaksiyonlar için çok önemlidir. Amplifikasyon ve uzama primerlerinin dizaynının Sequenom Assay Designer v3.1 yazılımında yapılması en uygun olanıdır. Primerlerin kütlelerini arttırmak için amplifikasyon primerlerinin 5' uçlarına bir 10-mer tag dizisi (5'-ACGTTGGATG-3') eklenerek dizayn yapılır. Böylelikle bu primerler MALDI-TOF kütle spektrometresinin tespit aralığı dışında kalır (Gabriel et al., 2009).

Primerler dizayn edildikten sonra genotiplendirilecek DNA örnekleri miktarınca multipleks PCR reaksiyonu için primer karışımı hazırlanır. Sequenom Assay Designer v3.1 yazılımında aynı ortamda dimer oluşumuna neden olan primerler için PCR plakalarında farklı bir kuyucuk ve farklı bir primer karışımı uygulanmaktadır. PCR reaksiyonları için hasta kapasitesine ve analiz edilecek varyasyonların miktarına göre 384 kuyucuklu veya 96 kuyucuklu PCR plakaları seçilmektedir. Tek primer karışımı hazırlanacak ise her bir DNA örneği plaka üzerinde tek kuyucuğa, dimer oluşumu göz önüne alınarak birden fazla karışım hazırlanacak ise karışım sayısı miktarınca kuyucuğa DNA pipetlenmelidir. Negatif kontrol oluşturmak için primer karışım sayısı miktarınca plakanın ilk kuyucuklarına örnek pipetlemesi yapılmaz, buralara sadece PCR karışımı eklenmelidir. Kütle spektrometresinin analizi sırasında bu kuyucuklarda herhangi bir pik tespiti kontaminasyon olduğunu bize gösterir (Gabriel et al., 2009).

İplex GOLD reaksiyonu protokolünde bildirilen miktarlar uyarınca multipleks PCR karışımı ve PCR şartları belirlenir. Primer karışımı sayısınca PCR karışımı hazırlanarak PCR plakası üzerinde her biri önceden belirlenen DNA örneğinin bulunduğu yere pipetlenir. Daha sonra, protokolde bildirilen şartlara göre termal cyclus'da PCR reaksiyonu yürütülür (Gabriel et al., 2009).

İstenilen PCR bölgelerinin amplifikasyonu yapıldıktan sonra, SAP reaksiyonu için protokol oranlarına göre SAP karışımı hazırlanmaktadır. SAP reaksiyonu PCR amplifikasyonunda bağlanmamış dNTP'leri nötralize etmek için uygulanmaktadır. Nötralizasyon işlemi fosfat gruplarını kopararak (defosfarilasyon) gerçekleştirilir. Karidesten elde edilen bu enzim alkalen ortamda ve 37°C'de en etkin reaksiyonu gösterdiği için bu ismi almıştır. SAP karışımı, PCR plakasındaki amplifikasyonu yapılmış kuyucukların üzerine dağıtılmaktadır. Daha sonra PCR plakası, protokolde

bildirilen şartlara göre termal cycler cihazında yürütülür (Gabriel et al., 2009).

SAP reaksiyonundan sonra primer uzama reaksiyonu veya İplex GOLD reaksiyonu olarak adlandırılan PCR aşamasına geçilir. Primer uzama reaksiyonu, amplifikasyonu yapılmış DNA'da SNP'leri veya küçük insersiyon/delesyon polimorfizmlerini belirlemek için kullanılan evrensel bir yöntemdir. Bu reaksiyonda kullanılan primerler, 3' ucu polimorfik bölgeye bitişik şekilde tek uzama primeri olarak dizayn edilir. Uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler PCR karışımı hazırlanırken kütlelerine göre 2-4 arasında değişen gruplara ayrılır. Grup sayısına göre, PCR reaksiyonunda yer alacak primerlerin konsantrasyonları belirlenerek primer uzama reaksiyonu için multipleks primer karışımı hazırlanır. Daha sonra, İplex GOLD reaksiyonu protokolünde bildirilen miktarlarda PCR karışımı meydana getirilir. Bu reaksiyona özel kütlesi modifiye edilmiş ddNTP karışımı kullanılır (iPLEX Termination Mix). PCR karışımı, PCR plakaları üzerinde her örnek için ilgili konumdaki kuyucuğa yüklenir. Optimum duruma getirilmiş ve protokolde bildirilmiş PCR şartlarına göre plaka termal cycler cihazında yürütülür (Gabriel et al., 2009).

Primer uzama reaksiyonundan sonra uzamış ürünlerin kütle spektrometre analizini optimize etmek için önemli bir temizlik aşaması gerçekleştirilir. Katyonik rezin maddesinin kullanıldığı bu aşamada amaç; katyonik rezinin iyonlar ile yer değiştirme özelliğini kullanarak  $Na^+$ ,  $K^+$ , ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının ortadan kaldırılmasını sağlamaktır. MassARRAY sisteminin sunduğu bir düzenek sayesinde rezin bütün kuyucuklara aktarılır. Daha sonra, PCR plakasının döndürülerek oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika inkübasyonu yapılır (Gabriel et al., 2009).

Rezin ile temizleme yapıldıktan sonra en önemli ve son basamak kütle spektrometre analizidir. MassARRAY sisteminde bu analizi gerçekleştirebilmek için plakadaki PCR ve temizleme sonrası ürünlerin sistemin kendine spesifik çipi olan SpectroCHIP'e aktarılması gerekmektedir. PCR plakasında her bir kuyucuktaki ürünlerin çip üzerindeki kuyucuklara aktarım işlemini Nanodispenser RS1000 cihazı gerçekleştirmektedir (Gabriel et al., 2009).

Nanodispenser RS1000 cihazı, çip üzerinde nano boyutundaki kuyucuklara programlanabilir şekilde pipetleme yapabilen tam otomatik, kapalı robotik bir sistemdir. Kütle spektrometresinin kalibrasyonunu yapmak için, çip üzerinde önceden belirlenen bir kuyucuğa 3-point kalibrant solüsyonu pipetlemesi cihaz tarafından yükleme sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, çalışmaya başlamadan önce kalibrant bölmesine 3-point kalibrant eklenmelidir. Nanodispenser RS1000 cihazı üzerinde matris spotları bulunan çip üzerindeki kuyucuklara pipetleme yapabilen iğneler ile yaklaşık olarak 20 nl PCR ürünü yüklemektedir (Gabriel et al., 2009).

PCR ürünlerinin analizini MassARRAY kütle spektrometresinde gerçekleştirmek için, SpectroCHIP cihaza gerekli şekilde yerleştirilir. MassARRAY, MALDI-TOF tekniğini kullanmaktadır. Sistem açıldıktan sonra, cihaza yerleştirilen çip üzerindeki matriks spotlar lazer sayesinde patlatılarak PCR ürünlerinin yüzey salınımı (desorpsiyon) ve iyonizasyonu gerçekleştirilir (MALDI). Lazer ışını, kütle spektrometresinde desorpsiyon ve iyonizasyon kaynağı olarak görev yapar. Matriks, lazer ışınının enerjisini absorbe ederek ve PCR ürünlerinin desorpsiyonunu sağlayarak bu teknikte önemli bir rol oynamaktadır. Lazer ışını etkisiyle hızla dağılan matriks kümesi, vakum ortamına PCR ürünlerini taşıyarak iyonizasyon aşamasına destek olur. Ayrıca, matriks molekülleri lazer enerjisinin tamamını absorbe ederek örnek zararını ve iyon fragmentasyonunu minimize etmektedir (Gabriel et al., 2009).

Uçurulan ve iyonize edilen örnek molekülleri elektrostatik olarak uçuş zamanlı bir kütle spektrometresi (TOF-MS) tüpü içine aktarılır. Burada matriks iyonlarından ayrıştırılan örnekler, kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayrı ayrı tespit edilerek analiz edilir. Teorik olarak sınırsız kütle aralığı ile birlikte yüksek iletim ve duyarlılık TOF cihazının kendine has avantajları arasındadır. Tüp sonundaki bir iyonun analizi, kütle/yük (m/z) oranının karekökü ile doğru orantılı olan uçuş zamanına dayanarak yapılmaktadır (Gabriel et al., 2009).

### *3.2.3.2 İplex GOLD SNP genotipleme protokolü*

#### *Primer dizaynı ve primer karışımı hazırlanması*

Çalışmamızda DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b, MBD1, MBD2 ve MeCP2'yi hedefleyen 22 miRNA genine ait toplam 37 varyasyonu analiz etmeyi amaçladık. Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonu için dizayn edilen ve üretici firmadan temin edilen primer çiftleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonundan sonra İplex GOLD reaksiyonu ile varyasyonun tespit edilmesine yardımcı olan uzama primerleri de dizayn edilerek üretici firmadan temin edildi (Tablo 3.3).

Yapılan primer dizayn çalışması ile bütün primerlerin aynı anda multipleks PCR reaksiyonu için kullanılmasının dimer oluşumuna sebep olacağı belirlendi. Bu nedenle, dimer oluşumuna neden olmayacak şekilde 20 adet primer çiftinin PCR plakasında 1. kuyucukta, 11 adet primer çiftinin 2. kuyucukta, 5 adet primer çiftinin 3. kuyucukta ve 1 adet primer çiftinin 4. kuyucukta PCR reaksiyonuna sokulması planlandı. Uzama reaksiyonu primerleri de aynı plan çerçevesinde kullanıldı. Bu dört kuyucukta (kuyucuk 1-4) yer alacak primerler Tablo 3.2'de ve Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Dört farklı kuyucuk için dört farklı primer karışımı dolayısıyla dört farklı PCR karışımı hazırlanması planlandı.

Üretici firmadan temin edilen amplifikasyon primerleri 50 µM konsantrasyonda gönderilmişti. Kuyucuk 1-4 için hazırlanacak primer karışımında her bir primer konsantrasyonu 0.5 µM, final hacminin ise distile su ile tamamlanarak 200 µl olacak şekilde hesaplaması yapıldı. Sonuç olarak, toplam hacmi 200 µl olan 20, 11, 5 ve 1 primer seti içeren dört ayrı primer karışımı hazırlanarak PCR amplifikasyonu için hazır duruma getirildi.

**Tablo 3.2.** DNA amplifikasyonu için dizayn edilen oligonükleotid primer çiftleri

Kuyucuk	SNP	Forward (5'-3') Primer Dizisi	Reverse (5'-3') Primer Dizisi
1	rs184508542	ACGTTGGATGCCAGAGCTACAAAGGCAAAG	ACGTTGGATGCCACAGTATTCACTCTCCTC
	rs72631820	ACGTTGGATGTCCTCCAGGAGCTCACGTGT	ACGTTGGATGACACTGGGGCAGGCGCCG
	rs143525573	ACGTTGGATGACCCCTTTAACCTGTGAGGAC	ACGTTGGATGATTCCCCAGGTGTGTGGTTG
	rs12759620	ACGTTGGATGCCCGCCAATATTGCACTC	ACGTTGGATGATGGAGAGCCAGGAGGGCG
	rs145416750	ACGTTGGATGACATAAACGACACCTCCTTG	ACGTTGGATGTAGGGAACATTTGGTCTGGG
	rs188612260	ACGTTGGATGCCAGTTCAAGTAATTCAGG	ACGTTGGATGCGAGCCAAGTAATGGAGAAC
	rs41274221	ACGTTGGATGAAAACAGGAGTGGAAATCCCC	ACGTTGGATGAATTGCTGGACGCTGCCCTG
	rs182926610	ACGTTGGATGGATCTCACACGGTGGTGTTA	ACGTTGGATGTTTCTCTAACACCCCTGGGC
	rs182791806	ACGTTGGATGTGCTTCATCAGTCACTACTC	ACGTTGGATGTCAGTTCTAGAGGAAGTGTG
	rs188912830	ACGTTGGATGAACTGGAGCCACCCTTCT	ACGTTGGATGATCATTAAGCTCTTCTCCC
	rs182946132	ACGTTGGATGTTTCCCATTGAGGGAAGGAG	ACGTTGGATGTGGAGTTCATCTGGACCACG
	rs138358853	ACGTTGGATGACACCACCGCCGGCCGATG	ACGTTGGATGGACAGTATTAGACAGAGGGC
	rs146020563	ACGTTGGATGGAGGCCCTTAAAGTACTGTAG	ACGTTGGATGGAGCAGCAAATAATGATTCCG
	rs138231885	ACGTTGGATGGGCAGGGAATATTAGGTAG	ACGTTGGATGAGCATCGGTACCATGATAAC
	rs189165474	ACGTTGGATGGATGTTTGACCCTTGAGCAG	ACGTTGGATGCCAAGCAGGATTTGATACTC
	rs185315720	ACGTTGGATGCTCCACAAAACAATCTGCC	ACGTTGGATGCCACAGCCTGAGTGTATAAC
	rs72563729	ACGTTGGATGGGTCTCTAATACTGCCTGGT	ACGTTGGATGAGTGTGGGGCTCGGCCGGA
	rs150161032	ACGTTGGATGATTGCTAAAGTGAATTCC	ACGTTGGATGTGCAGTTCCTGGCTACAGG
	rs76156362	ACGTTGGATGACTCACAGAAGCTGAGTTCC	ACGTTGGATGCTCCTCTGTGAGAAAGGGTG
	rs62919962	ACGTTGGATGGTTTCGTTTCTTAGACAGCCC	ACGTTGGATGGTCAGACTACTTGAGGTTCC
2	rs183812340	ACGTTGGATGCCGGCCGATGGGCGTCTTA	ACGTTGGATGGATGGACGGTTTTACCAGAC
	rs12975333	ACGTTGGATGCCATGTTGCCAGTCTTAGG	ACGTTGGATGCCAAGAACCTCACCTGTGAC
	rs111516728	ACGTTGGATGGTTTCGTTTCTTAGACAGCCC	ACGTTGGATGGTCAGACTACTTGAGGTTCC
	rs77046863	ACGTTGGATGAGGAGGCTTGGTCTTAGCAC	ACGTTGGATGTGGAGTTCATCTGGACCACG
	rs145196722	ACGTTGGATGTGGGGCAGGCCCGGCTCT	ACGTTGGATGCCGCTCTCCCTGTCTCCA
	rs318039	ACGTTGGATGTCCTGTTTGTCCCTGTTCA	ACGTTGGATGACTGTCGTAGTGATGGTCTC
	rs193119939	ACGTTGGATGTAGGGACACCACATATGCAG	ACGTTGGATGCCTTTCTCAAGGAGGTGTGCG
	rs112456539	ACGTTGGATGAAACTTCATCCACCAGTCC	ACGTTGGATGCTTTGCCTTTGTAGCTCTGG
	rs192595529	ACGTTGGATGACTGTAGCAGCACATCATGG	ACGTTGGATGCCTTAAATTTCTAGAGCAGC
	rs74878365	ACGTTGGATGGTTATACACTCAGGCTGTGG	ACGTTGGATGACTCCCAAAATGGGTAGCTG
	rs117905199	ACGTTGGATGTGTGCTTCATCAGTCACTAC	ACGTTGGATGCCTCAACGCTCACAGTTAC
3	rs13232101	ACGTTGGATGAGTCCAGGGGCTGCTACAAA	ACGTTGGATGCAGAGCCGGCGCCTGCC
	rs72631831	ACGTTGGATGCAGGAAGCGTCTGTGCTC	ACGTTGGATGAGGCACACGTGAGCTCCTG
	rs5880480	ACGTTGGATGGTTTCGTTTCTTAGACAGCCC	ACGTTGGATGGTCAGACTACTTGAGGTTCC
	rs117812383	ACGTTGGATGGTTTCCTGAGCTGTTGGATT	ACGTTGGATGGCTGAAAAAGAGACCGGTT
4	rs184216167	ACGTTGGATGGTGCATGCTGTACTACTC	ACGTTGGATGCCTTTCTCAAGGAGGTGTGCG
4	rs72556173	ACGTTGGATGGTTTCGTTTCTTAGACAGCCC	ACGTTGGATGGTCAGACTACTTGAGGTTCC

**Tablo 3.3.** Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen oligonükleotid primerler

Kuyucuk	SNP	Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler
1	rs184508542	CATCCATGGTTCCCC
	rs72631820	GTGAGCGCCTCGACG
	rs143525573	CACAGGTGAGGTTCTT
	rs12759620	ATATTGCACTCGTCCCG
	rs145416750	TTGAGAAAGGCACTGTA
	rs188612260	TCAGGATAGGTTGTGTG
	rs41274221	GTGCATTGCACTTGTCTC
	rs182926610	CACATTTTGGAGGCCCCAG
	rs182791806	GGAAGTGTGTTTTCTCAA
	rs188912830	TCTTCTCCCTTCCATATTAA
	rs182946132	GGGTAGGCTTGGTCTTAGCA
	rs138358853	TGCCAGGTCTAACCATGTCTG
	rs146020563	CTCCTGATTGCATCTTGACTG
	rs138231885	GTACCATGATAACCGAAAAAGG
	rs189165474	GGGGAAAGCGAATTCACCAAGG
	rs185315720	GCAATCTGCCTATACATCATTTT
	rs72563729	CAATCCTGCCTGGTAATGATGAC
	rs150161032	GTTCCACAGAGTTGCATATTAGCA
	rs76156362	GGAAAATAAGTTTGGCATACTTAC
rs62919962	TTCCTAGTAAACCTCAAATAGCGT	
2	rs183812340	GGCCAGGTCTAACCA
	rs12975333	GTCTCTAGGTCCCTGA
	rs111516728	CCCTCATGTGTCCCCTG
	rs77046863	GCACGGGGTCTAAGGCC
	rs145196722	CCTGCCTCCAGGAGCTCAC
	rs318039	CCTTTGGCAGACAGCCACA
	rs193119939	CACCTTTCTGAGAAGAGTA
	rs112456539	GGTGTAGCTCTGGCAAAGT
	rs192595529	TAGAGCAGCAAATAATGATT
	rs74878365	TCCCTCGAGACAAAGTTCTGT
	rs117905199	TCAATATGAATGGATTGAGAG
3	rs13232101	CGCCTGCCCCAGTGT
	rs72631831	GACAGGGAGAGCGGC
	rs5880480	ATCATGTGTCCCCTGG
	rs117812383	CCTCTCAGACAGTGCTA
	rs184216167	TCAGAAAGGTGAAATTTATATTTTAG
4	rs72556173	CTCATGTGTCCCCTG

Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler, üretici firma tarafından 400 µM konsantrasyonda gönderilmişti. Toplamda her bir kuyucuk için 200 µl uzama primer karışımı hazırlamak adına primerler kütlelerine göre kendi kuyucukları içerisinde 4 gruba ayrıldı. Bu gruplandırma düşük kütle, orta kütle, yüksek ve en yüksek kütle olarak isimlendirildi.

Kuyucuk 1 için (20 primer çifti) düşük kütleli olan 5 adet uzama primeri karışımında 3.50 µM, orta kütleli olan 5 adet uzama primeri karışımında 4.67 µM, yüksek kütleli olan 5 adet uzama primeri karışımında 5.83 µM, en yüksek kütleli olan 5 adet uzama primeri ise karışımında 7.00 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

Kuyucuk 2 için (11 primer çifti) düşük kütleli olan 3 adet uzama primeri karışımında 3.50 µM, orta kütleli olan 3 adet uzama primeri karışımında 4.67 µM, yüksek kütleli olan 3 adet uzama primeri karışımında 5.83 µM, en yüksek kütleli olan 2 adet uzama primeri ise karışımında 7.00 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

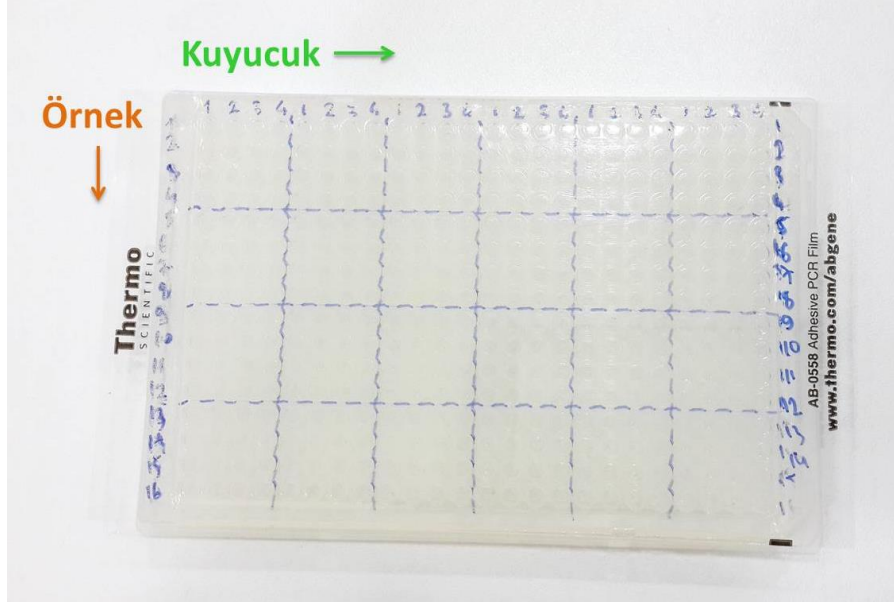
Kuyucuk 3 için (5 primer çifti) düşük kütleli olan 2 adet uzama primeri karışımında 3.50 µM, orta kütleli olan 1 adet uzama primeri karışımında 4.67 µM, yüksek kütleli olan 1 adet uzama primeri karışımında 5.83 µM, en yüksek kütleli olan 1 adet uzama primeri ise karışımında 7.00 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

Kuyucuk 4'de bulunan tek primer çifti için uzama primeri karışımında 3.50 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

#### *DNA miktarının optimizasyonu ve pipetlenmesi*

DNA izolasyonundan sonra DNA örneklerinin saflık derecesi ölçülmüş ve stok konsantrasyonu 50 ng/µL olarak ayarlanmıştı. Her bir İplex GOLD reaksiyonu için 5-10 ng/µL aralığında DNA miktarı gerekmektedir. Bu nedenle, DNA konsantrasyonu 10 ng/µL olacak şekilde stok solüsyonundan elüsyon solüsyonu ile sulandırma yapıldı.

Her bir DNA örneği için dört farklı kuyucukta PCR reaksiyonları yürütüleceğinden dolayı 384 kuyucuklu PCR plakasında önceden planlanan şekilde dört farklı kuyucuğa (kuyucuk 1-4) 1'er µl DNA örneği pipetlendi. Üzerlerine PCR karışımları eklenene kadar, plaka optik yapışkan PCR filmi ile kapatılıp +4°C'de saklandı (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** 384 kuyucuklu PCR plakası yerleşimi

### *Multipleks DNA Amplifikasyonu*

Multipleks DNA amplifikasyonu için PCR karışımı her bir kuyucukta DNA miktarı ile birlikte toplam 5 µl olacak şekilde planlandı. PCR karışımında yer alan reaktifler ve miktarları aşağıda gösterilmiştir. Kuyucuk 1-2 için dört farklı primer karışımımız bulunduğundan her bir örnek için dört farklı PCR karışımı oluşturuldu. Örnek miktarı ve negatif kontrol kuyucuğu düşünülerek toplam karışım hacmi hesaplandı. Daha sonra, dört farklı PCR karışımı 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine hazırlandı.

<b>Multipleks PCR Karışımı</b>	<b>Bir Örnek İçin</b>
0.5 µM Primer Mix	1.0 µl
25 mM dNTP Mix (Applied Biosystems®)	0.1 µl
10X PCR Buffer (20 mM MgCl <sub>2</sub> içeren) (Qiagen GmbH)	0.5 µl
5 U/µl HotStarTaq DNA polimeraz (Qiagen GmbH)	0.2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Qiagen GmbH)	0.4 µl
Ultra saflaştırılmış su (Invitrogen™)	1.8 µl
DNA	1.0 µl
<b>Toplam</b>	<b>5.0 µl</b>

+4°C’de saklanan PCR plakası üzerindeki optik yapışkan PCR film çıkartılarak hazır duruma getirildi. Mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan PCR karışımları ise vortekslenip hafif şekilde santrifüj edildi. Daha sonra, dört farklı PCR karışımı (kuyucuk 1-4 için) elektronik pipetleme seti (Eppendorf Repeater® Xstream Electronic Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) yardımıyla önceden DNA pipetlenmiş kuyucuklara 4’er µl dağıtıldı. Her bir örnek plaka üzerinde kuyucuk 1-4 olarak adlandırdığımız dört farklı kuyucuğa pipetlendi.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, 2000 rpm’de çok kısa bir süre santrifüj edilerek Bio-Rad C1000™ Thermal Cyler (California, USA) cihazına yerleştirildi (Şekil 3.8). PCR şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.



**Şekil 3.8.** Bio-Rad C1000 Thermal Cyler

### **PCR Şartları**

- 95°C’de 2 dakika
  - 95°C’de 30 saniye
  - 56°C’de 30 saniye
  - 72°C’de 60 saniye
  - 72°C’de 5 dakika
  - 4 °C’de bekleme
- } 45 Döngü

### *SAP (Shrimp Alkalen Fosfataz) reaksiyonu*

SAP reaksiyonu için aşağıda belirtilen miktarlarda reaktifler kuyucuk miktarı kadar 2 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra, termal cyler cihazından çıkarılan PCR plakasının reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklarına 2’şer µl bu karışımdan dağıtıldı.

<b>SAP Karışımı</b>				<b>Bir kuyucuk için</b>
Ultra saflaştırılmış (Invitrogen™)	distille	su		1.53 µl
10X SAP Buffer (Sequenom Inc.)				0.17 µl
1.7 U/µl SAP Enzim (Sequenom Inc.)				0.30 µl
<b>Toplam</b>				<b>2.00 µl</b>



SAP karışımı, reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklara pipetlendikten sonra PCR plakası optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, plaka 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cyclus cihazına yerleştirildi. SAP şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

### **SAP Reaksiyonu Şartları**

1. 37°C'de 40 dakika
2. 85°C'de 5 dakika
3. 4°C'de bekleme

### *Pimer uzama reaksiyonu (İplexGOLD reaksiyonu)*

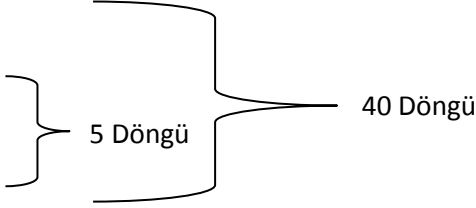
Primer uzama reaksiyonu veya İplexGOLD reaksiyonu olarak ifade edilen bu PCR aşaması için önceden dört primer karışımı (kuyucuk 1-4 için) hazırlanmıştı. Bu nedenle, aşağıda miktarları belirtilen reaktiflerin bulunduğu ve dört farklı primer karışımının kullanıldığı her bir kuyucuk için toplamda 2 µl olan dört farklı PCR karışımı hazırlandı.

<b>İplexGOLD Reaksiyonu Karışımı</b>	<b>Bir kuyucuk için</b>
Ultra saflaştırılmış distile su (Invitrogen™)	0.619 µl
10X İplexGOLD Buffer (Sequenom Inc.)	0.200 µl
İplex Termination mix (Sequenom Inc.)	0.200 µl
Primer karışımı	0.940 µl
İplex enzim (Sequenom Inc.)	0.041 µl
<b>Toplam</b>	<b>2.000 µl</b>

Kuyucuk miktarına göre hesaplanan ve mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan dört farklı PCR karışımı vortekslenip hafif şekilde santrifüj edildi. Daha sonra, elektronik pipetleme seti yardımıyla PCR plakası üzerindeki her bir örnek ve negatif kontrol için ayrılan kuyucuk 1-4'e 2'şer µl dağıtıldı.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslenildi. Sonrasında, 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cycler cihazına yerleştirildi. PCR şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

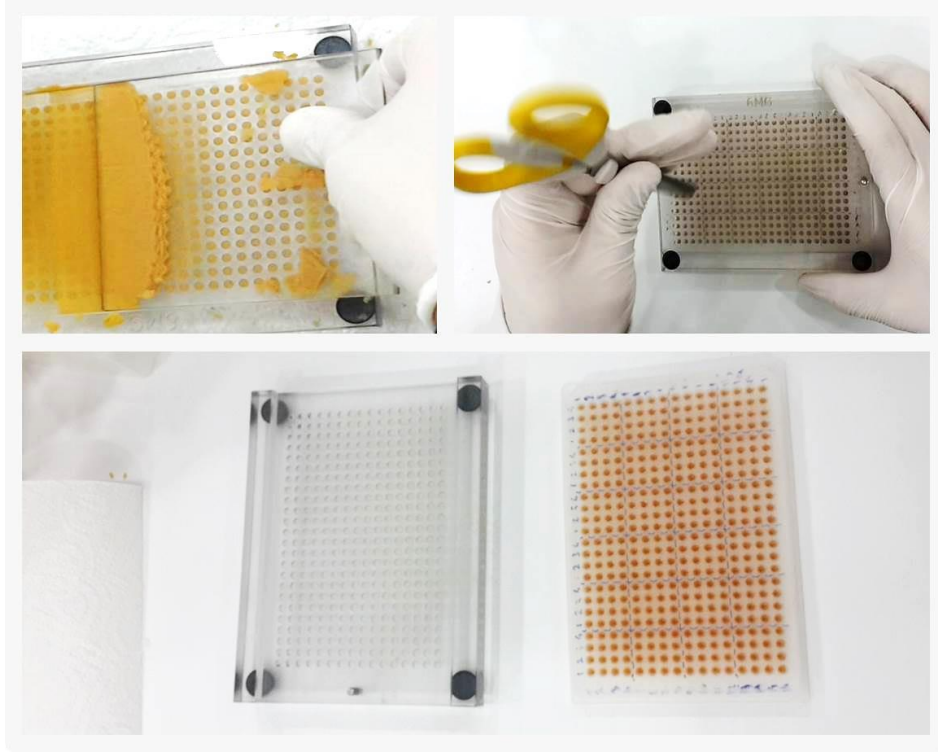
### **İplex GOLD Reaksiyonu Şartları**

1. 94°C'de 30 saniye
  2. 94°C'de 5 saniye
  3. 52°C'de 5 saniye
  4. 80°C'de 5 saniye
  5. 72°C'de 3 dakika
  6. 4 °C'de bekleme
- 

#### *Rezin ile temizlik aşaması*

İplexGOLD reaksiyonu sonrasında termal cycler cihazından çıkartılan PCR plakasını rezin ile muamele edebilmek için ilk önce optik yapışkan film kaldırıldı. Daha sonra, rezinin daha iyi çözünüp istenilen sonucu verebilmesi adına reaksiyon yürütülen her bir kuyucuğa 16'şar µl ultra saflaştırılmış su eklendi. Su dağıtıldıktan sonra PCR plakasının üzeri yapışkan film ile kapatılarak kısa bir süre 2000 rpm'de santrifüj edildi.

PCR plakasındaki 384 kuyucuk için toz halinde, steril 6 mg rezin yeterlidir. Bu miktar baz alınarak transfer plakaya steril rezin eklendi, steril cam palet yardımıyla transfer plakaya yayıldı. Transfer plaka 384 kuyucuklu örnek plate'ine kapatıldı ve sert bir darbe ile rezinin transfer plakadan örnek kuyucuklarına dağıtılması sağlandı (Şekil 3.9). Resin dağıtımı sonrası PCR plakamız yeniden farklı bir yapışkan film ile kapatıldı. Sonrasında, PCR plaka döndürücü ile 35 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.



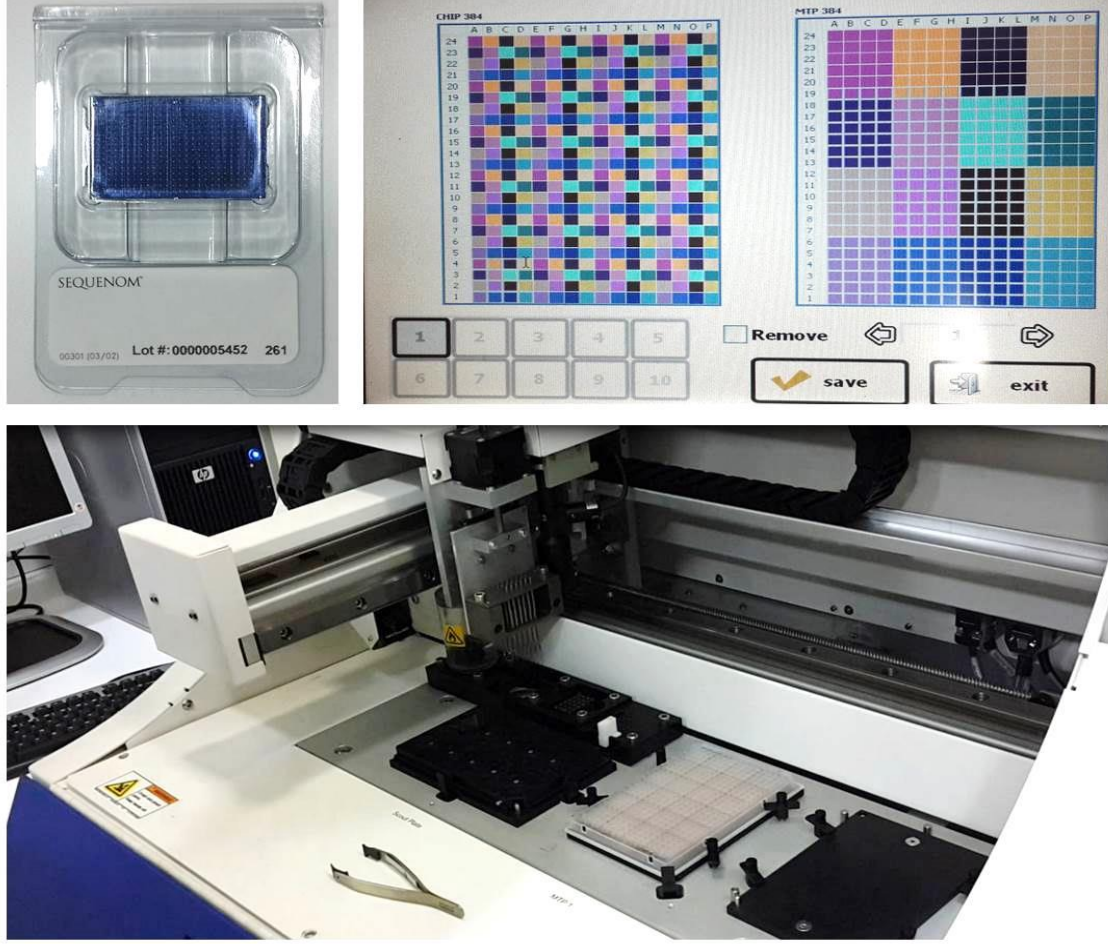
**Şekil 3.9.** Rezin ile temizlik aşaması

### *SpectroCHIP üzerine PCR ürünlerinin aktarılması*

Rezin ile temizlik aşamasından sonra PCR plakasının kuyucuklarında bulunan reaksiyon ürünlerini SpectroCHIP üzerine aktarma işlemine geçildi. Bunun için nano boyutunda pipetleme yapabilen MassARRAY™ Nanodispenser RS1000 cihazı kullanıldı.

İlk önce cihazın gerekli bölmelerine distile su, % 98.9'luk etil alkol, % 50'lik etil alkol ve 3-point kalibrant eklenerek sistemin hazırlığı yapıldı. Daha sonra, PCR plakamız ve SpectroCHIP cihaz içerisinde kendileri için ayrılan yerlerine oturtuldu. Nanodispenser RS1000 cihazının kendisine ait ekranından PCR plakamızın 384 kuyucuklu olduğu, hangi kuyucuklarda hangi varyasyonların analiz edileceği ve plakadan pipetlenecek miktarın ne kadar olması gerektiği programlandı. SpectroCHIP üzerine aktarma işlemi başlatmadan cihazın kendini temizleme programı aktif hale getirildi. Cihaz pipetleme yapacağı iğnelerini yıkayarak hazır duruma geldi.

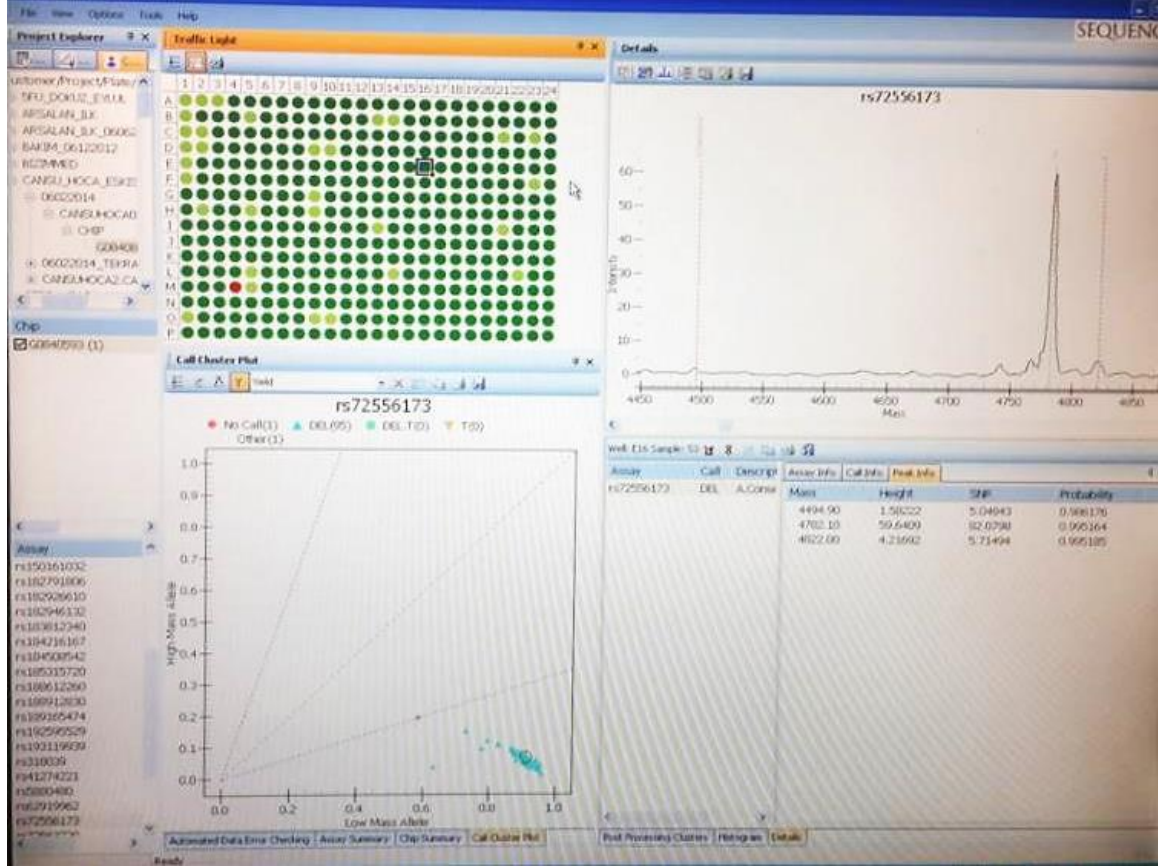
Cihaza başlama komutu verilerek üzerinde matriks spotlar bulunan SpectroCHIP'deki kuyucuklara her bir PCR ürününden yaklaşık olarak 12 nl pipetleme yapması sağlandı. Böylelikle, PCR ürünlerimiz yaklaşık olarak 10 cm X 10 cm boyutundaki SpectroCHIP üzerine yerleştirilmiş oldu (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** Sequenom SpectroCHIP, PCR ürünlerinin çip üzerinde yerleşimi ve Nanodispenser.

### *Kütle Spektrometre Analizi*

SpectroCHIP üzerine aktarılan PCR ürünlerimizi kütlelerine göre analiz etmek için MALDI-TOF kütle spektrometre tekniğini kullanan MassARRAY analizörü kullanıldı. Güç kaynağı düğmesi açılarak çalıştırılan analizörün çip koyulması için dizayn edilen bölmesine kendi örneklerimizi taşıyan SpectroCHIP yerleştirildi. Daha sonra bölme kapatılarak bilgisayar üzerindeki analizörün programından SpectroCHIP üzerindeki kuyucukların koordinatları girildi. Gerekli bilgiler girildikten sonra analiz işlemi başlatıldı. Böylelikle, analizör teker teker bütün kuyucukların matrislerini lazer ile patlatarak içindeki PCR ürünlerinin kütlelerini analiz etmeye başladı. Kısa bir süre sonunda kütlelerine göre yaptığı analiz ile genotip sonuçlarının tamamını bilgisayar ekranında raporladı (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11.** Kütle spektrometre analiz raporu

### 3.2.4 İstatistiksel analiz

Sürekli verilerin (süre, yıl, vb.) normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılması Kruskal-Wallis analizi ile yapıldı.

Genotiplerin ve alellerin varlığı gibi kategorik yapıdaki değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında ki-kare analizleri (pearson, pearson ve exact ki-kare) analizleri kullanıldı. Genotiplerin gruplara göre ikili karşılaştırılmasında ise iki oran testi (Fisher's exact test) kullanıldı. ODDS oranları tek değişkenli ve çok değişkenli lojistik regresyon analizi ile hesaplandı.

Tüm analizler IBM SPSS Statistics 21 paket programı ile yapıldı. 0,05'den küçük olan p değeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda DNA metilasyonunda görevli olan DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b, MBD1, MBD2 ve MeCP2'yi hedefleyen 22 miRNA genine ait toplam 37 SNP'nin Türk toplumundaki sıklığını geniş bir gen profilinde araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, istatistiksel anlamlılıkları belirtilerek tablo ve grafik olarak bu bölümde sunulmuştur.

Bireylerin cinsiyet, yaş, ak toprak maruziyeti ve sigara kullanımı gibi demografik özellikleri ile hastalık arasındaki ilişki karşılaştırıldığında çalışmamıza dahil edilen demografik verilerin tamamı hem NSCLC hem SCLC için anlamlı oranda farklı bulundu ( $p<0,001$ ) (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Demografik özelliklerin dağılımı ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Demografik Özellikler		Tüm Bireyler (n=180)		Kontrol (n=90)		Akciğer Kanseri (n=90)				İstatistik
						NSCLC (n=78)		SCLC (n=12)		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Cinsiyet</b>	Erkek	126	70	42	46,7	73	93,6	11	91,7	$\chi^2= 46,685$ $p<0,001$
	Kadın	54	30	48	53,3	5	6,4	1	8,3	
<b>Sigara</b>	Var	109	60,6	26	28,9	71	91	12	100	$\chi^2=75,919$ $p<0,001$
	Yok	71	39,4	64	71,1	7	9	0	0	
<b>Ak toprak</b>	Var	42	23,3	0	0	40	51,3	2	16,7	$\chi^2= 61,749$ $p<0,001$
	Yok	138	76,7	90	100	38	48,7	10	83,3	
<b>Aile Hikayesi</b>	Var	81	45	35	38,9	37	47,4	9	75	$\chi^2= 5,909$ $p<0,001$
	Yok	99	55	55	61,1	41	52,6	3	25	
<b>Yaş</b>	≤ 50	88	48,9	80	88,9	6	7,7	2	16,7	$\chi^2= 115,592$ $p<0,001$
	> 50	92	51,1	10	11,1	72	92,3	10	83,3	

Demografik verilerin akciğer kanser riski ile ilişkisi çoklu karşılaştırıldığında yaş ve sigara kullanımının hem NSCLC hem SCLC için anlamlı oranda riske sahip olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ). Kontrol bireylerde de aile hikayesine sahip bireylerin bulunması, ayrıca kontrol grubunda hiçbir bireyin ak toprak maruziyeti bulunmaması nedeni ile bu iki veri bu teste dahil edilmedi. Çalışmamızda yer alan bireylerin demografik verileri çoklu karşılaştırıldığında, akciğer kanseri riski kadınlara göre erkeklerde 4.652 kat, sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde 35.104 kat ve artan her bir yaşa göre 1.373 kat daha fazla bulundu (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Grupların demografik özellikleri ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması.

Kategori	ODDS Oranı	%95 Güven Aralığı	P Değeri
Cinsiyet			
Kadın	1 (referans)	-	0,068
Erkek	4,652	0,892-24,251	
Yaş	1,373	1,220-1,544	<0,001
Sigara			
İçmeyen	1 (referans)	-	<0,001
İçen	35,104	5,166-238,553	

Bulgularımıza göre akciğer kanseri için en büyük risk olan sigara kullanımı değerlendirildiğinde sigara içme süresi ile hem NSCLC hem SCLC birey sayıları arasında anlamlı oranda fark bulundu ( $p<0,001$ ) (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Hasta grupları ile sigara içme süresinin (yıl) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Kontrol (1)	NSCLC (2)	SCLC (3)	*P	**Çoklu Karşılaştırma
<b>Ortalama ± Standart Sapma</b>	19,54±6,889	41,93±11,333	41,75±9,715	<0,001	1-2 <0,001
					1-3 <0,001
<b>Medyan (25-75) PLTL</b>	20 (15-21,25)	40 (35-50)	46 (32,5-48)		2-3 P=1

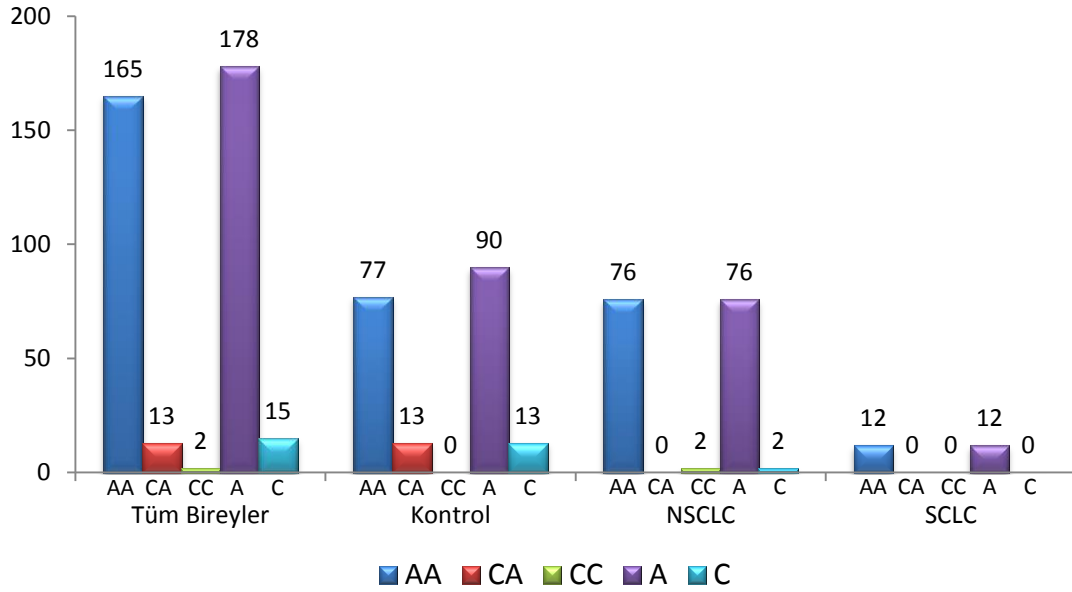
\*Kruskal-Wallis Test, \*\*Dunn's Test, PLTL: percentile

Çalışmamızda araştırdığımız genetik varyantlardan MeCP2'yi hedefleyen *miR3202* geni, rs188912830 genetik varyantı ile akciğer kanseri alt tipleri arasında anlamlı oranda fark bulundu ( $p=0,007$ ). Alel dağılımları karşılaştırıldığında C aleli varlığı akciğer kanseri hastalarında ve alt tiplerinde anlamlı oranda düşüktü ( $p=0,012$ ) (Tablo 4.4, Grafik 4.1, 4.2, 4.3).

**Tablo 4.4.** *miR3202* geni rs188912830 varyantı ve alel varlığı ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

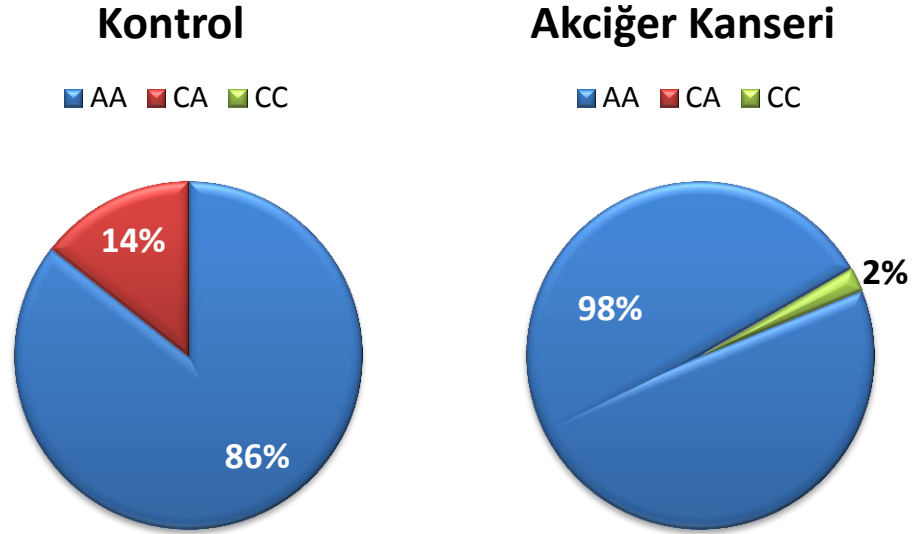
rs188912830 genotipler ve aleller	Tüm Bireyler (n=180)		Kontrol (n=90)		Akciğer Kanseri (n=90)				İstatistik	
	n	%	n	%	NSCLC (n=78)		SCLC (n=12)			
					n	%	n	%		
<b>AA</b>	165	91,7	77	85,6	76	97,4	12	100		
<b>CA</b>	13	7,2	13	14,4	0	0	0	0	p=0,007	
<b>CC</b>	2	1,1	0	0	2	2,6	0	0		
<b>A</b>	<b>Var</b>	178	98,9	90	100	76	97,4	12	100	p=0,312
	<b>Yok</b>	2	1,1	0	0	2	2,6	0	0	
<b>C</b>	<b>Var</b>	15	8,3	13	14,4	2	2,6	0	0	$\chi^2= 8,890$ p=0,012
	<b>Yok</b>	165	91,7	77	85,6	76	87,4	12	100	

### rs188912830



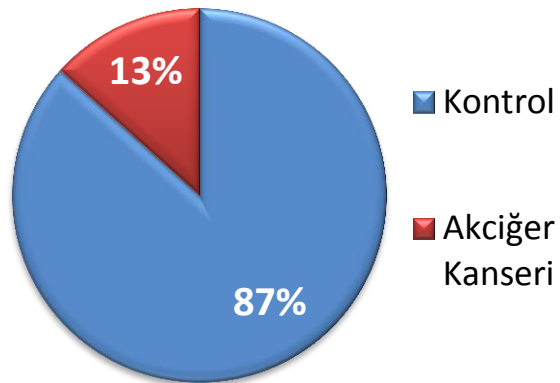
**Grafik 4.1.** *miR3202* geni rs188912830 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı





**Grafik 4.2.** *miR3202* geni rs188912830 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı

### rs188912830 - C Aleli



**Grafik 4.3.** *miR3202* geni rs188912830 C aleline sahip bireylerin kontrol ve akciğer kanseri gruplarında dağılımı

*miR3202* geni rs188912830 varyantının C alelli ile akciğer kanseri için risk değerlendirmesi yapıldığında akciğer kanseri için C aleli yokluğunun varlığına göre 7,429 kat riskli olduğu belirlendi ( $p= 0,010$ ) (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** rs188912830 varyantının C aleli ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması.

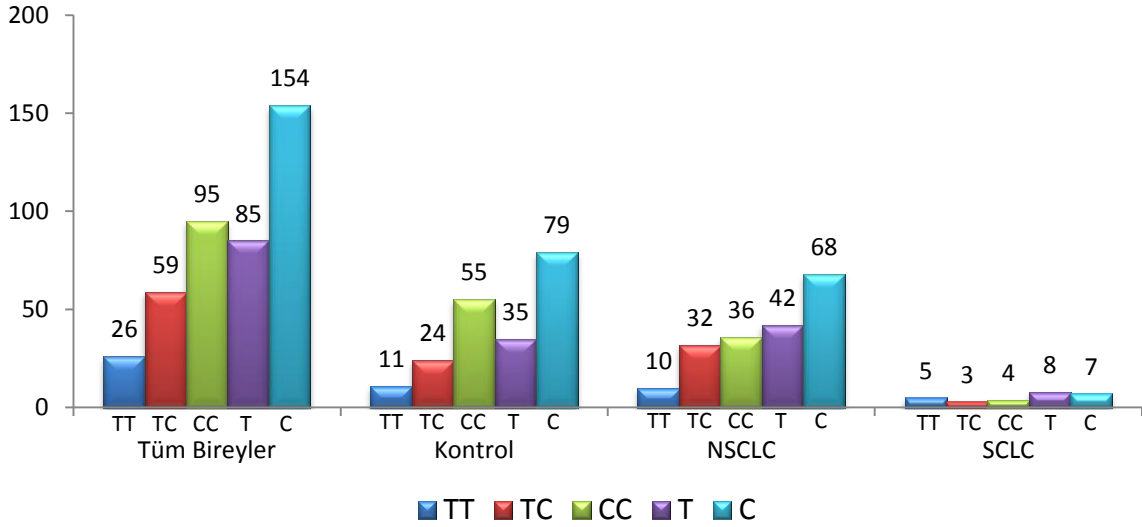
rs188912830		ODDS Oranı	%95 Güven Aralığı	P Değeri
C aleli				
	Var	1 (referans)	-	0,010
	Yok	7,429	1,625-33,958	

DNMT3B'yi hedefleyen *miR1274a* geni rs318039 genetik varyantı ile akciğer kanseri alt tipleri arasında anlamlı oranda fark bulundu ( $p=0,018$ ). Alel dağılımları karşılaştırıldığında C aleline sahip olan birey sayısı NSCLC ve SCLC alt gruplarında anlamlı oranda düşüktü ( $p=0,021$ ) (Tablo 4.6, Grafik 4.4, 4.5).

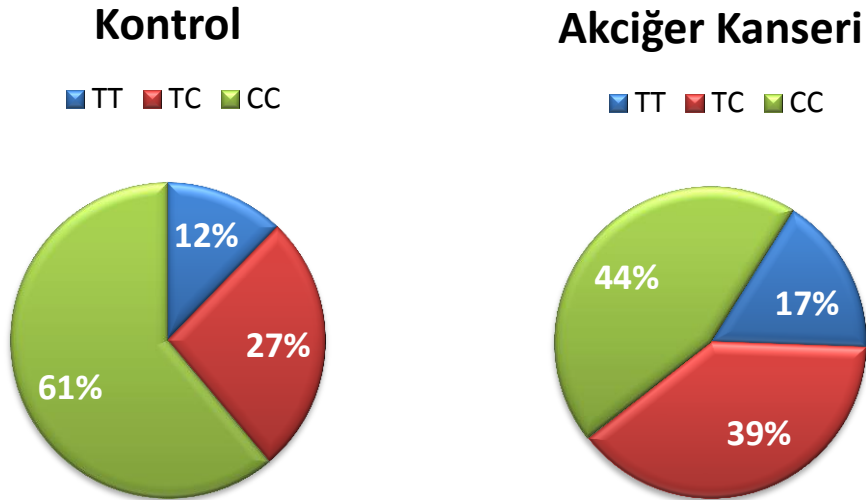
**Tablo 4.6.** *miR1274a* geni rs318039 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

rs318039 genotipler ve aleller	Tüm Bireyler (n=180)		Kontrol (n=90)		Akciğer Kanseri (n=90)				İstatistik	
	n	%	n	%	NSCLC (n=78)		SCLC (n=12)			
					n	%	n	%		
TT	26	14,4	11	12,2	10	12,8	5	41,7	p=0,018	
TC	59	32,8	24	26,7	32	41,0	3	25,0		
CC	95	52,8	55	61,1	36	46,2	4	33,3		
T	Var	85	47,2	35	38,9	42	53,8	8	66,7	$\chi^2=5,701$
	Yok	95	52,8	55	61,1	46	46,2	4	33,3	p=0,058
C	Var	154	85,6	79	87,8	68	87,2	7	58,3	$\chi^2= 7,722$
	Yok	26	14,4	11	12,2	10	12,8	5	41,7	p=0,021

## rs318039



**Grafik 4.4.** miR1274a geni rs318039 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı



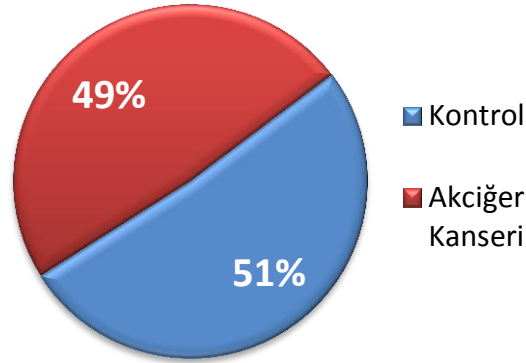
**Grafik 4.5.** miR1274a geni rs318039 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı

miR1274a geni rs318039 varyantının C aleli ile akciğer kanseri hastalığı (alt tipleri değil) için lojistik regresyon analizi ile değerlendirildiğinde anlam bulunmadı ( $p = 0,398$ ) (Tablo 4.7, Grafik 4.6).

**Tablo 4.7.** rs318039 varyantının C aleli ve akciğer kanserinin çoklu lojistik regresyon analizi ile karşılaştırılması.

rs318039		ODDS Oranı	%95 Güven Aralığı	P Değeri
C aleli	Var	1 (referans)	-	0,398
	Yok	1,436	0,620-3,326	

### rs318039 - C Aleli



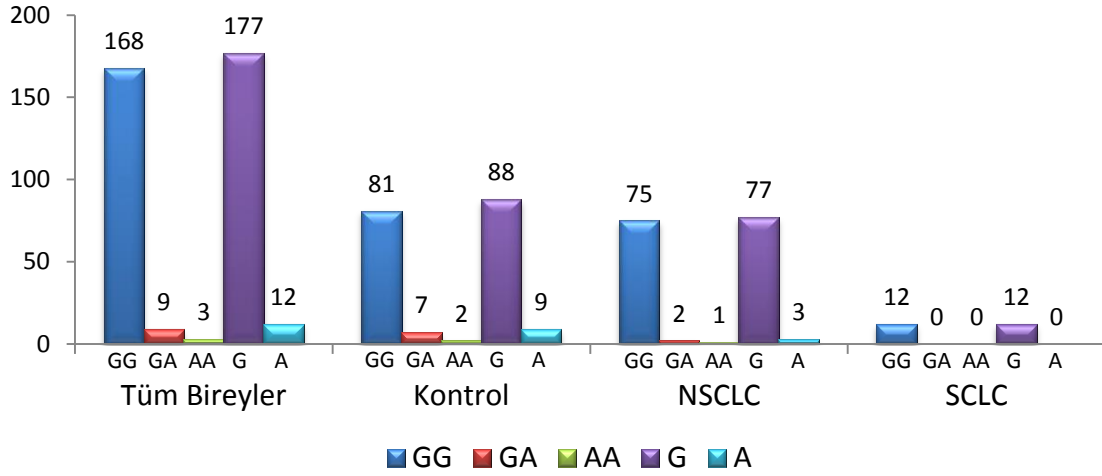
**Grafik 4.6.** *miR1274a* geni rs318039 C aleline sahip bireylerin kontrol akciğer kanseri gruplarında dağılımı

DNMT3A'yı hedefleyen *miR200b* geni rs72563729 varyantı ile akciğer kanseri ve alt tipleri karşılaştırıldığında genotip ve alel dağılımları yönünden fark bulunmadı (genotip için  $p=0,528$ ; G aleli için  $p=1,000$ ; A aleli için  $p=0,177$ ) (Tablo 4.8, Grafik 4.7, 4.8).

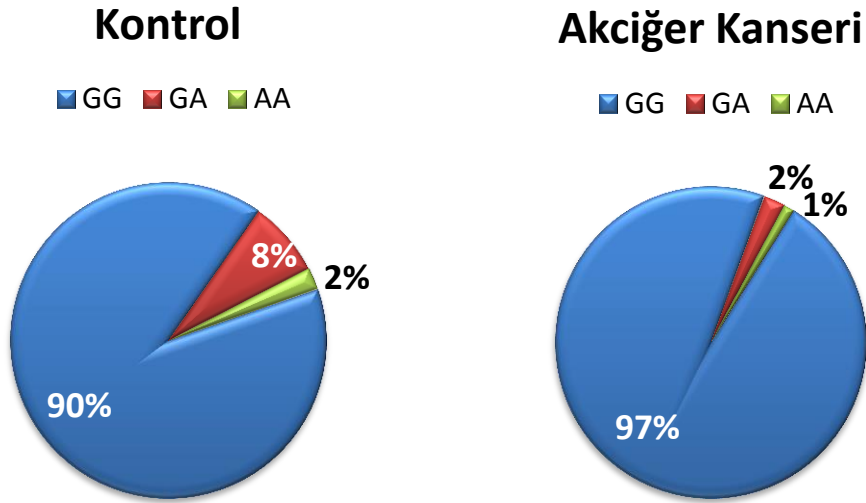
**Tablo 4.8.** *miR200b* geni rs72563729 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

rs72563729 genotipler ve aleller	Tüm Bireyler (n=180)		Kontrol (n=90)		Akciğer Kanseri (n=90)				İstatistik	
					NSCLC (n=78)		SCLC (n=12)			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
<b>GG</b>	168	93,3	81	90,0	75	96,2	12	100	$p=0,528$	
<b>GA</b>	9	5,0	7	7,8	2	2,6	0	0		
<b>AA</b>	3	1,7	2	2,2	1	1,3	0	0		
<b>G</b>	<b>Var</b>	177	98,3	88	97,8	77	98,7	12	100	$p=1,000$
	<b>Yok</b>	3	1,7	2	2,2	1	1,3	0	0	
<b>A</b>	<b>Var</b>	12	6,7	9	10,0	3	3,8	0	0	$\chi^2= 3,462$ $p=0,177$
	<b>Yok</b>	168	93,3	81	90,0	75	96,2	12	100	

## rs72563729



**Grafik 4.7.** *miR200b* geni rs72563729 varyantı ve alel varlığının tüm gruplarda dağılımı



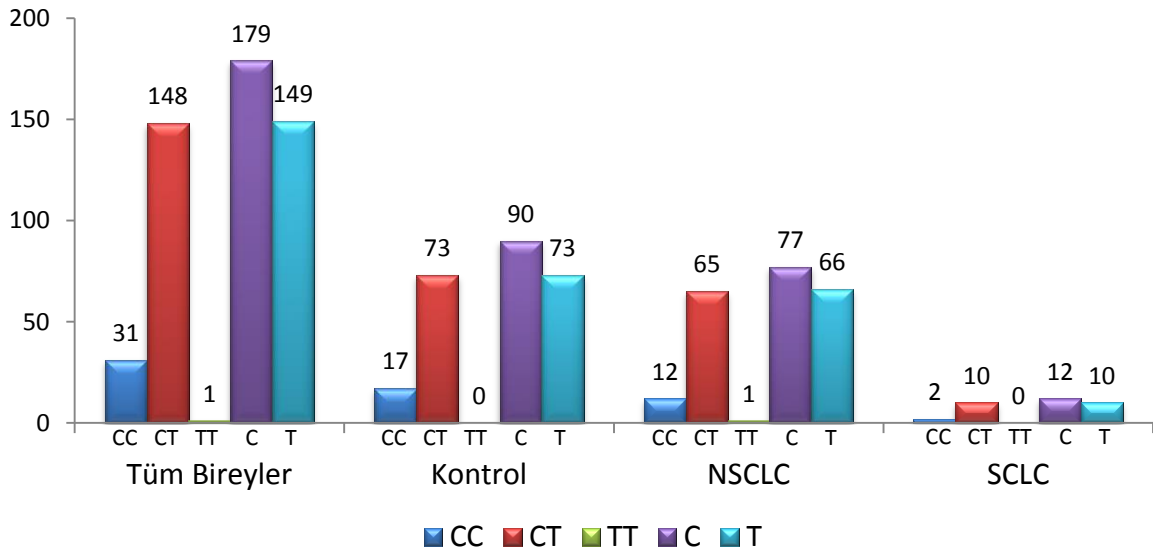
**Grafik 4.8.** *miR200b* geni rs72563729 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı

TRDMT1'i hedefleyen *miR513c* geni rs145416750 varyantı ile akciğer kanseri ve alt tipleri karşılaştırıldığında genotip ve alel dağılımları yönünden fark bulunmadı (genotip için  $p=0,855$ ; C aleli için  $p=0,501$ ; T aleli için  $p=0,905$ ) (Tablo 4.9, Grafik 4.9, 4.10).

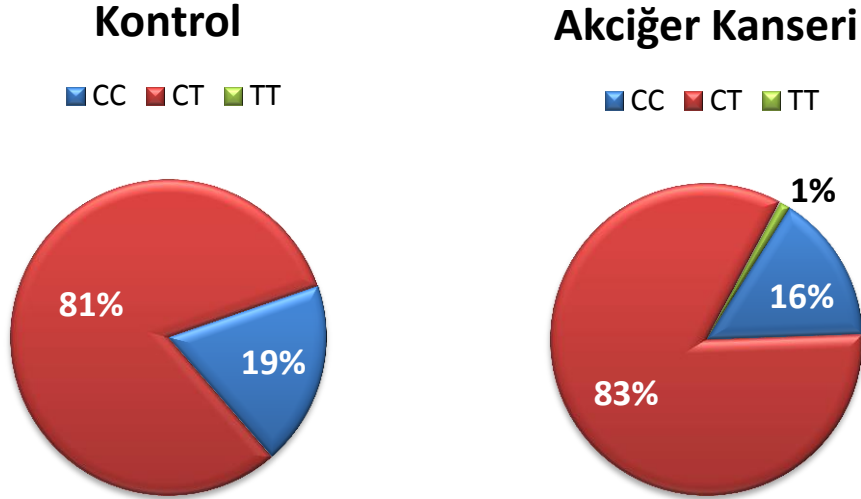
**Tablo 4.9.** *miR513c* geni rs145416750 varyantı ve alel dağılımları ile akciğer kanseri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

rs145416750 genotipler ve aleller	Tüm Bireyler (n=180)		Kontrol (n=90)		Akciğer Kanseri (n=90)				İstatistik	
	n	%	n	%	NSCLC (n=78)		SCLC (n=12)			
					n	%	n	%		
CC	31	17,2	17	18,9	12	15,4	2	16,7		
CT	148	82,2	73	81,1	65	83,3	10	83,3	p=0,855	
TT	1	0,6	0	0	1	1,3	0	0		
C	Var	179	99,4	90	100	77	98,7	12	100	p=0,501
	Yok	1	0,6	0	0	1	1,3	0	0	
T	Var	149	82,8	73	81,1	66	84,6	10	83,3	p=0,905
	Yok	31	17,2	17	18,9	12	15,4	2	16,7	

### rs145416750



**Grafik 4.9.** *miR513c* geni rs145416750 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı



**Grafik 4.10.** *miR513c* geni rs145416750 genotiplerinin kontrol ve akciğer kanseri hastalarında dağılımı

Çalışmamızda araştırdığımız diğer 33 SNP için, kontrol ve akciğer kanserli bireylerin tamamı atasal genotipe sahipti. Değişken bulunmaması nedeni ile istatistik değerlendirme yapılmayan SNP'lerin dağılımı Tablo 4.10'da sunulmuştur.

**Tablo 4.10.** Kontrol ve akciğer kanserli bireylerde tamamı atasal genotip olarak belirlenen SNP'ler, genler ve hedefleri

SNP	Değişim	Genotip	miRNA	Hedefi
<u>rs146020563</u>	A/G	AA	MIR 15B	MBD1
<u>rs192595529</u>	G/A	GG		
<u>rs41274221</u>	C/T	CC	MIR 25	MBD2
<u>rs188612260</u>	C/T	CC	MIR 26B	DNMT3B
<u>rs12759620</u>	G/C	GG	MIR 92B	MBD2
<u>rs138231885</u>	T/C	TT	MIR 101-2	DNMT3A
<u>rs12975333</u>	G/T	GG	MIR 125A	MBD1
<u>rs143525573</u>	G/A	GG		
<u>rs117812383</u>	G/A	GG	MIR 128-1	MBD2
<u>rs185315720</u>	C/T	CC	MIR 148B	DNMT1

<u>rs74878365</u>	C/A	CC		DNMT3B
<u>rs72631831</u> <u>rs145196722</u> <u>rs72631820</u> <u>rs13232101</u>	G/A C/T A/G G/T	GG CC AA GG	MIR 339	DNMT3B
<u>rs150161032</u>	A/G	AA	MIR 367	MBD2
<u>rs189165474</u>	C/T	CC	MIR 377	MBD1
<u>rs183812340</u> <u>rs138358853</u>	A/G -/CAGA	AA Del.Del.	MIR 429	DNMT3A
<u>rs184216167</u> <u>rs193119939</u>	T/C T/C	TT TT	MIR 513c	TRDMT1
<u>rs112456539</u> <u>rs184508542</u>	A/G G/C	AA GG	MIR 561	DNMT3B
<u>rs182926610</u>	G/A	GG	MIR 720	DNMT3A
<u>rs76156362</u>	A/T	AA	MIR 1275	MeCP2
<u>rs182791806</u> <u>rs117905199</u>	G/A T/C	GG TT	MIR 3662	TRDMT1
<u>rs111516728</u> <u>rs62919962</u> <u>rs5880480</u> <u>rs72556173</u>	G/T -/T -/T -/T	GG Del.Del. Del.Del. Del.Del.	MIR 4465	DNMT3B
<u>rs182946132</u> <u>rs77046863</u>	C/T C/T	CC CC	MIR 4747	MeCP2



## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanserleri, en sık rastlanan kanser tiplerinden biri olup, kanser nedeni ölümler arasında hem erkeklerde hem kadınlarda ilk sıraları almaktadır. Akciğer kanseri nedenleri arasında ilk sırayı sigara kullanımı ve tütün dumanı maruziyeti alır. Akciğer malign lezyonlarının %80-90'ına tütün neden olurken, fiziksel ve kimyasal karsinojenlerden etkilenme de etiyolojideki diğer bir etkidir (Coşkunpınar, 2013; Gönüllü, 1995; Köktürk et al., 2003). Akciğer kanseri dünyada her yıl yaklaşık 1,4 milyon kişinin ölümüne sebep olmakla birlikte Ülkemizde de sigaraya bağlı ölümlerin trafik kazalarına bağlı ölümlerden 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Başer et al., 2007; Coşkunpınar, 2013)

DNA metilasyonu ve miRNA gibi epigenetik kontrol mekanizmaları akciğer kanseri ve birçok kanser tipinde önemli moleküler yollardandır. Biz de çalışmamızda DNA metilasyonunda görevli olan DNMT'ler (DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3a, DNMT3b) ve MBD'leri (MBD1, MBD2 ve MeCP2) hedefleyen 22 miRNA genine ait toplam 37 SNP'nin Türk toplumundaki sıklığını geniş bir gen profilinde araştırmayı amaçlamıştık. Bu bölümde ise elde ettiğimiz verileri tartışacağız.

### 5.1. Demografik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Birçok kanser türünde olduğu gibi akciğer kanserinin de oluşumunda birçok faktör etkidir. Yaş, cinsiyet, kimyasal karsinojenlere maruziyet ve aile hikayesi kanser etyolojisinde önemli yere sahiptir (Spitz et al., 2007).

Yapılan risk analiz çalışmalarında, sigaranın hastalığın oluşumu için en önemli risk faktörlerinden biri olduğu, sigara kullanım miktarı ve süresinin bu risk ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Sigaraya bağlı hasarın ortaya çıkması ortalama 20 yıl sürmekte bu nedenle hastalık 50 yaş ve sonrasında ortaya çıkmaktadır (Spitz et al., 2007; Tammemaği et al., 2011). Benzer şekilde bizim çalışma grubumuzda yapılan çoklu risk analizinde artan her bir yaş için 1.373 kat ve sigara içmeyenlere göre içenlerde 35.104 kat daha fazla risk olduğu belirlenmiştir. Cinsiyetin akciğer kanser riski üzerine etkileri tartışmalıdır. Kimyasal karsinojenlere maruz kalma durumu erkeklerde daha fazla olduğu için akciğer kanseri riskinin erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu ama bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmayabileceği belirtilmiştir (Spitz et al., 2007). Benzer şekilde bizim çalışmamızdaki çoklu karşılaştırmada erkek bireylerde kadınlara göre 4.652 kat risk belirlenmiş, ancak sigara ve yaş faktörleri ile birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel anlam bulunmamıştır.

Akciğer kanser gelişiminde rol oynayan mesleki karsinojenlerden en önemlisi asbesttir. Asbest ve arsenik, silika ve radon gibi mesleki karsinojenlere maruz kalma akciğer kanseri riskini artırırken aynı zamanda sigara içen bireylerde risk 50 kata kadar artabilir (Frost, Darnton & Harding, 2011; Karlıkaya, Öztuna, Solak, Özkan & Örsel, 2006). Ak toprak

olarak da bilinen asbeste Ülkemizde yalnızca mesleki olarak değil coğrafi olarak maruziyet profili oluşturmaktadır. Özellikle Eskişehir, Kütahya ve çevresinde izolasyon malzemesi olarak kullanılan asbest bu bölgelerde akciğer kanseri gelişimi için önemli bir risk unsurudur (Metintaş, 2005). Bizim çalışmamızda yer alan akciğer kanserli bireylerin % 46.6'sında asbest maruziyeti bulunmaktadır. Bu nedenle çalıştığımız popülasyon için asbest maruziyeti de önemli bir risk faktörü olarak belirlenmiştir.

Ailede akciğer kanseri veya herhangi bir kanser varlığının da akciğer kanseri için anlamlı bir risk unsuru olduğu belirtilmektedir. Özellikle birinci derece akrabalarında akciğer kanseri hastalığı bulunan bireylerde bu risk artmaktadır (Spitz et al., 2007). Benzer şekilde çalışmamızda yer alan 180 bireyin 81'inde (% 45) ve 90 akciğer kanserli bireyin 46'sında (% 51.1) birinci derece akrabalarda akciğer kanseri öyküsü bulunmaktadır. Çalıştığımız popülasyon için aile öyküsünün de önemli risk faktörlerinden biri olduğu belirlenmiştir.

## **5.2. Genetik Varyasyonların Değerlendirilmesi**

### **5.2.1. MeCP2'yi hedefleyen miRNA gen varyantları**

MBP süper ailesinin kurucu proteini olan 50-kDa'lık MECP2 proteini, X kromozomundaki *MeCP2* geni tarafından kodlanır ve MeCP2 proteini global transkripsiyon baskılayıcı olarak görev alır. Tek bir metile CpG'ye bağlanır ve histon deasetilasyonu aracılığıyla transkripsiyonu susturmak için Sin3A repressör kompleksine katılır. Nörogelişimsel bir bozukluk olan Rett sendromu ile ilişkili olmakla birlikte, aynı zamanda pek çok kanserde kendi promotörünün hipermetilasyonu yoluyla susturduğu genler ile tümörögenizde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Parry & Clarke, 2011).

Metil bağlayıcı protein MeCP2 veya MBD2'nin DNMT1 ile doğrudan etkileşimde olduğu ve tümör süpresör genlerin baskılanması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda hem DNMT1 proteininin hem de MeCP2 proteininin hipermetile tümör süpresör gen promotörlerine bağlandığı ve DNMT'lerin tümör dokularında hedeflenen bölgelerde tümör süpresör genlerin spesifik hipermetilasyonunu sağlamak için DNMT-MeCP2 kompleksine katıldığı belirlenmiştir (Lin et al., 2007).

*miR3202* geni X kromozomu üzerinde yer alır ve yapılan veri bankası taramasında MeCP2'yi hedeflediği belirlenmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>; <http://www.targetscan.org>, 13-03-2012). *miR3202* ile ilgili sınırlı sayıda veri bulunmakla birlikte 2013 yılında Cui ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; radon gazına maruz bırakılarak transforme edilen BEAS2B hücreleri ile akciğer kanseri modeli oluşturulmuş ve bu hücrelerde *miR3202*'nin de ekspresyonunda farklılık belirlenen miRNA'lar arasında olduğu belirtilmiştir (Cui et al., 2013).

rs188912830 numaralı SNP, *miR3202* geni üzerinde yer alan A/C değişimi olup, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs188912830>) bu genetik varyantın araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda MeCP2'yi hedefleyen *miR3202* geni rs188912830 genetik varyasyonu hem akciğer kanseri hem de alt tipleri ile ilişkili bulunmuştur. C aleli varlığı kontrol bireylerde %14.4, NSCLC bireylerde % 2.6, SCLC bireylerde % 0 olarak belirlenmiştir. C aleli için yapılan risk analizi, akciğer kanseri için C aleli yokluğunun varlığına göre 7,429 kat riskli olduğunu göstermiştir. Bu veriler doğrultusunda rs188912830 C aleli değişiminin akciğer kanser gelişimi için koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.

miR1275 ve miR4747 MeCP2 proteinini hedeflediği belirlenen diğer miRNA'lar olup, miR1275 6. kromozom, miR4747 19. kromozom üzerinden kodlanır. rs76156362, *miR1275* geni üzerinde yer alan A/T değişimi, rs182946132 ve rs77046863'ün her ikisi de *miR4747* geni üzerinde yer alan C/T değişimidir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>).

Bu üç genetik varyant ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ise hem hasta hem kontrol bireylerin tamamının bu varyasyonlar için atasal genotipe sahip olduğu belirlenmiş olup, bu varyantlar akciğer kanseri ile ilişkili bulunmamıştır. rs76156362, rs182946132 ve rs77046863 genetik varyantları çalıştığımız popülasyon için oldukça korunmuş bölgeler olarak belirlenmiş ve çalışmamız bu anlamda literatüre yeni bilgi sağlamıştır.

### **5.2.2. DNMT3b'yi hedefleyen miRNA gen varyantları**

DNMT3b, memeli genomunda yer alan DNA metiltransferaz enzimlerinden biri olup, hem yarı metillenmiş DNA metillenmesinde hem de de novo metilasyonda görev alır (Çelik, 2007; Yaykaşlı et al., 2012). Bilindiği gibi hücre döngüsünün düzenlenmesinde, DNA tamiri ve apoptozda görev alan tümör süpresör genlerin epigenetik olarak sessizleşmesine neden olan bozulmuş DNA metilasyonu karsinogenezde önemli role sahiptir (Chen et al., 2012). Yapılan çalışmalarda DNMT3b'nin, akciğer kanseri (Shen et al., 2002), skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri (Liu, Wang, Wang, Sturgis & Wei, 2008), göğüs kanseri (Sandhu, Rivenbark & Coleman, 2012), özefagal ve gastrik kanser (Chen et al., 2012) gibi birçok kanser tipi ile ilişkili olduğu ve özellikle aşırı ekspresyonunun karsinogeneze önemli etkisi olduğu belirlenmiştir (Chen et al., 2012).

miR1274a, DNMT3b'yi hedefleyen bir miRNA olup, *miR1274a* geni 5. kromozom üzerinde bulunur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Janssen ve arkadaşları miR1274a'nın göğüs kanserinde proliferasyon ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Janssen et al., 2010).

rs318039 genetik varyantı *miR1274a* geni üzerinde yer alan T/C değişimi olup, yalnızca bir çalışmada bu varyantın miR1274a ile ilişkili olduğundan ve 5. kromozomundaki lokalizasyonundan bahsedilmiştir (Duan, Mi, Zhang, & Dolan, 2009). rs318039 varyantı ile ilgili literatürde başka bir veriye rastlanmamakla birlikte bizim çalışmamızda belirlenen genotipler için akciğer kanseri alt tipleri ile kontrol grubu arasında fark bulunmuştur. C aleline sahip olan birey sayısı NSCLC ve SCLC alt gruplarında anlamlı oranda düşük iken ( $p=0,021$ ) kontrol grubunda C aleline sahip birey yüzdesi % 87.8 olarak belirlenmiştir. C aleli risk analizi akciğer kanseri ile kontrol grubu arasında yapılmış ancak istatistik modeline alt gruplar dahil edilememiştir. Alt gruplarda anlamlı olan C aleli yokluğunun, akciğer kanseri için 1.436 kat riskli olabileceği ancak bu riskin istatistiksel anlamı olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak rs318039 genetik varyantı alt tip karakterizasyonu için anlamlı olabilir ancak akciğer kanseri ile ilişkili bulunmamıştır.

DNMT3b'yi hedefleyen bir diğer miRNA miR26b'dir ve bu miRNA'yı kodlayan gen 2. kromozom üzerinde yer alır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>).

Yapılan çalışmalarda miR26b'nin hepatoselüler karsinom, nazofarengeal karsinom, primer skuamöz hücreli akciğer karsinomu ve göğüs kanseri gibi birçok kanser türünde downregüle olduğu, MCF-7 göğüs kanseri hücre dizilerinde ise aşırı ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Jia Li et al., 2013). Agresif özellik gösteren glioma hücrelerine miR26b transfeksiyonu yapıldığında glioma gelişiminde azalma belirlenmiş olup, bu hücreler için artmış ekspresyonun anti-tümör etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir (Wu et al., 2011).

rs188612260, *miR26b* genine ait bir varyant olup, C/T değişimi ile meydana gelir. Bu varyant henüz araştırılmamış olup, literatürde konuyla ilgili bilgiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda hem hasta hem kontrol bireylerin tamamının bu varyasyon için atasal genotipe sahip olduğu belirlenmiş olup, bu varyant akciğer kanseri ile ilişkili bulunmamıştır. rs188612260 genetik varyantlı çalıştığımız popülasyon için oldukça korunmuş bir bölge olarak belirlenmiş ve çalışmamız bu anlamda literatüre yeni bilgi sağlamıştır.

miR148b, rs185315720 ve rs74878365 numaralı 2 genetik varyasyon içeren ve 12. kromozom üzerindeki *miR148b* geni tarafından kodlanan bir miRNA olup, DNMT1 ve DNMT3b'yi hedefler (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>) (Duursma et al., 2008). Yapılan çalışmalarda miR148b'nin gastrik kanser (Song et al., 2011) ve pankreatik kanser (Zhao et al., 2013) gibi kanser türlerinde genellikle downregüle olduğu, ekspresyonun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve tümör süpresör aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Song et al., 2011).

miR148b'ye ait rs185315720 ve rs74878365 genetik varyantları ile ilgili literatürde veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızda hem hasta hem kontrol bireylerin tamamını atasal genotip olarak belirlediğimiz bu iki SNP ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu iki bölgenin de yine ilk defa çalışılan ve korunmuş bölgeler olarak belirlenmesi nedeniyle önemli veriler olduğunu düşünmekteyiz.

miR339, DNMTb'yi hedefleyen bir başka miRNA olup, 7. kromozom üzerinden kodlanan bir miRNA'dır. Zhou ve arkadaşları miR339'un kolorektal kanser hücrelerinde büyümeyi ve metastazı inhibe ederek tümör süpresör aktivite gösterdiğini belirlemiştir (Zhou et al., 2013).

Wu ve arkadaşları miR339 ekspresyonunun agresif hücre hatlarında ve göğüs kanseri hücrelerinde downregüle olduğunu ve miR339 transfeksiyonunun kanser hücre büyümesini, tümör hücresi göçünü ve invazyon kapasitesini azalttığını belirlemiştir (Wu et al., 2010).

rs72631831, rs145196722, rs72631820 ve rs13232101 numaralı genetik varyantlarını araştırdığımız *miR339* geni tüm hasta ve kontrol bireylerde 4 SNP için de atasal genotipe sahip olarak belirlenmiştir. Literatürde veriye rastlanmayan bu 4 SNP ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunamamış olup, bu bölgelerin korunmuş bölgeler olabileceği düşünülmektedir.

miR561, DNMT3b'yi hedeflediği belirlenen ve 2. kromozom üzerindeki geni tarafından kodlanan bir miRNA olup, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>), multiple miyeloma (Ronchetti et al., 2008) ve kolon kanseri hücre hatlarında (Yu et al., 2011) aşırı eksprese olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda akciğer kanseri ile ilişkisini araştırdığımız *miR561* geni rs112456539 ve rs184508542 varyantları tüm bireylerde atasal genotipte belirlenmiş olup, bu varyantlar ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

DNMT3b'yi hedefleyen bir başka miRNA, miR4465 olup, 6. kromozomdaki *miR4465* geni tarafından kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Fonksiyonel karakterizasyonu yapılmamış olan miR4465 ile ilgili çok sınırlı sayıda veri bulunmaktadır.

Araştırmamızda *miR4464* geni üzerinde yer alan rs111516728, rs62919962, rs5880480 ve rs72556173 varyantları araştırılmış ve tüm bireylerin 4 SNP için atasal genotipte olduğu belirlenmiştir. Söz konusu SNP'ler ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

### **5.2.3. DNMT3a'yı hedefleyen miRNA gen varyantları**

DNMT3a hem yarı metillenmiş DNA'nın metillenmesinden hem de erken gelişim döneminde gözlenen de novo metilasyondan sorumludur (Kaymak, 2012). Hepatoma, prostat kanseri, kolorektal kanser ve göğüs kanseri gibi birçok kanser tipinde DNMT3a'nın aşırı eksprese olduğu belirtilmiştir (Lin et al., 2007).

miR200b, 2. kromozom üzerindeki geni tarafından kodlanan ve DNMT3a'yı hedefleyen bir miRNA'dır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). miR200b'nin adenokarsinom (Hiroki et al., 2010), pankreatik kanser (Li et al., 2010), kolanjiyokarsinom (intrahepatik safra yolları epitelinden gelişen adenokarsinom) hücrelerinde (Meng et al., 2006) aşırı eksprese olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda *miR200b* genine ait bir varyasyon olan rs72563729 araştırılmış tüm hastaların %93.3'ünde, kontrol bireylerin %90'ında, NSCLC bireylerin % 96.2'sinde ve SCLC bireylerin tamamında atasal genotip olan GG yaygın genotip olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda akciğer kanseri ve alt tipleri ile kontrol bireyler arasında genotipler ve alel dağılımları açısından bir fark belirlenmemiş olup, akciğer kanseri ile miR200b rs72563729 varyantı arasında bir ilişki bulunmamıştır. Literatürde yalnızca bir çalışmada NSCLC ile miR200b rs72563729 varyantı arasındaki ilişki araştırılmış (Leng et al., 2011) ve bizim çalışmamızın sonuçları ile benzer şekilde akciğer kanseri ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

DNMT3a'yı hedefleyen bir diğer miRNA, miR101-2 olup, 9. kromozom üzerindeki geni tarafından kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Yapılan çalışmalarda miR101'in neuroblastoma hücrelerinde (Buechner et al., 2011) ve NSCLC hücrelerinde (Zhang, Guo, Liu, Liu & Wang, 2011) azalmış ekspresyona sahip olduğu, ekspresyonunun hücre proliferasyonu ve invazyonunu inhibe ederek tümör süpresör etki gösterebileceği belirtilmiştir.

Araştırmamızda *miR101-2* genine ait rs138231885 genetik varyantı araştırılmış olup, literatürde bu varyantla ilgili veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızdaki tüm bireyler rs138231885 varyantı için atasal genotipte belirlenmiş olup, bu varyasyon ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

miR429, DNMT3a'yı hedefleyen bir diğer miRNA olup, 1. kromozom üzerindeki *miR429* geni tarafından kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). miR429, miR200 ailesinin bir üyesi olup, benzer şekilde over kanseri hücrelerinde (Chen et al., 2011) ve kolorektal kanser dokularında (Juan Li et al., 2013) aşırı eksprese olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda *miR429* genine ait iki varyant (rs183812340 ve rs138358853) araştırılmış olup, tüm bireyler her iki varyant için de atasal alele sahip oldukları belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında her iki SNP'nin henüz çalışılmadığı belirlenmiş olup, bizim çalışmamızda rs183812340 ve rs138358853 varyantları akciğer kanseri ile ilişkili bulunmamıştır.

*miR720* DNMT3a'yı hedefleyen miRNA'lardan biri olup 3. kromozom üzerinden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Yapılan çalışmalarda *miR720* ekspresyonunun serviks uteri skuamöz hücreli karsinom, skuamöz hücreli akciğer kanseri, over kanseri (Lin et al., 2013) ve miyelodisplastik sendromda (Li et al., 2014) arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda *miR720* genine ait rs182926610 varyantı çalışılmış olup literatürde bu varyant ile ilgili veri bulunmamaktadır. Araştırmamızda ise tüm bireyler bu varyasyon için atasal genotipte belirlenmiş olup akciğer kanseri ile *miR720* geni rs182926610 varyantı arasında bir ilişki bulunmamıştır.

#### **5.2.4. TRDMT1'i hedefleyen miRNA gen varyantları**

TRDMT1, ilk olarak DNMT2 olarak sınıflandırılmış, ancak sonradan aspartik asit tRNA'sının antikodon ilmiğindeki sitozin-38'i metillediği için tRNA aspartik asit metiltransferaz 1 olarak isimlendirilmiştir (Goll et al., 2006). Yine de TRDMT1'in, DNA hasarının tanınması, DNA rekombinasyonu ve mutasyon onarımı için gerekli olması, eksikliğinde embriyonik kök hücrelerde global DNA metilasyonunun görülmemesi nedeni ile epigenetik kontrol için önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Goll et al., 2006; Subramaniam et al., 2014). Paralel olarak Saito ve arkadaşları normal karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında hepatoselüler karsinomada azalmış TRDMT1 ekspresyonu olduğunu belirlemişlerdir (Saito et al., 2001).

*miR513c*, TRDMT1'i hedeflediği belirlenen, X kromozomu üzerindeki *miR513c* geni tarafından kodlanan ve fonksiyonel karakterizasyonu belirlenmemiş bir miRNA'dır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>).

Çalışmamızda *miR513c* geni rs145416750, rs184216167 ve rs193119939 genetik varyantı araştırılmış olup, rs145416750 varyantı hem kontrol bireyler (%81.1) hem de akciğer kanseri alt tipleri için (NSCLC: %83.3, SCLC: %83.3) yaygın genotip CT olarak belirlenmiştir. Kontrole göre akciğer kanserli bireylerin genotip ve alel dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte henüz fonksiyonel etkileri araştırılmamış olan rs145416750 ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır. *miR513c* genine ait rs184216167 ve rs193119939 varyantlar yönünden ise çalışmamızdaki tüm bireyler atasal genotipe sahip olarak belirlenmiştir. Her iki SNP için de literatür bilgisi

bulunmamakla birlikte çalışmamızın bu anlamda literatür verisi sağlayacağını düşünmekteyiz.

miR3662, 6. kromozom üzerindeki *miR3662* geni tarafından kodlanan, TRDMT1'i hedeflediği belirlenen ve fonksiyonel karakterizasyonu henüz bilinmeyen bir miRNA'dır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>).

Çalışmamızda *miR3662* genine ait iki genetik varyant (rs182791806 ve rs117905199) araştırılmış olup, her iki varyasyon için de tüm bireyler atasal genotipe sahip olarak belirlenmiştir. Her iki SNP için de literatür verisi bulunmamakla birlikte araştırmamızda bu SNP'ler ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

### **5.2.5. MBD1 ve MBD2'yi hedefleyen miRNA gen varyantları**

MBD1 ve MBD2 diğer metil-CpG-DNA'ya bağlanan proteinler gibi memeli nükleer proteinlerinin önemli üyeleridir. MBD1, p16 ve E-kaderin genleri gibi tümör süpresörlerin metile CpG adacıklarına bağlanarak transkripsiyonu düzenler. MBD2'nin ise DNA demetilaz aktivitesi ile represör özellik gösterdiği belirlenmiştir (Patra, Patra, Zhao, Carroll & Dahiya, 2003). Bader ve arkadaşları MBD1 ve 2 geni üzerindeki mutasyonların veya ekspresyon değişikliklerinin kolon ve akciğer kanseri ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Bader et al., 2003).

miR15b MBD1'i hedefleyen miRNA'lardan biri olup, 3. kromozom üzerinden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Xia ve arkadaşları miR15b'nin hücre döngüsü için önemli role sahip olduğunu ve aşırı eksprese olduğunda hücre döngüsünün G0/G1 fazında durduğunu belirlemişlerdir (Xia et al., 2009). Benzer şekilde Chung ve arkadaşları hepatoselüler karsinomada miR15b transfeksiyonun azalmış proliferasyon ve artmış apoptoz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Chung et al., 2010).

Çalışmamızda *miR15b* geni üzerindeki rs146020563 ve rs192595529 varyasyonları araştırılmış olup, söz konusu varyasyonlar için tüm bireyler atasal genotip olarak belirlenmiştir. Her iki varyant için de literatür bilgisi bulunmamakla birlikte rs146020563 ve rs192595529 varyantları akciğer kanseri ile ilişkili bulunmamıştır.

miR125a MBD1'i hedefleyen bir diğer miRNA olup 19. kromozom üzerinden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Jiang ve arkadaşları NSCLC dokularda miR125a'nın ekspresyonunun normal dokulara göre azalmış olduğunu ve miR125a ekspresyonunun akciğer kanseri hücrelerinde invazyon ve metastazı azaltabileceğini rapor etmişlerdir (Jiang et al., 2010). Benzer şekilde miR125a'nın akciğer kanseri hücrelerinde p53'ü aktive ederek apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Jiang, Chang, Zhang, Sun & Qiu, 2013).



Çalışmamızda *miR125a* genine ait iki varyant olan rs12975333 ve rs143525573'ün akciğer kanseri ile ilişkisi araştırılmış olup, bulgularımız her iki varyant için de tüm bireyler atasal genotipte olduğunu göstermiştir. Peterlongo ve arkadaşları, Almanya, İtalya, Avustralya ve İspanya kohortlarında toplam 3145 hasta ve 4114 kontrol bireyde rs12975333 varyantı ile göğüs kanser riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve bizim çalışmamızın bulgularıyla da uyumlu olarak bu varyantın oldukça nadir veya hiç gözlenmeyen bir varyant olduğunu belirlemişlerdir (Peterlongo et al., 2011). Benzer şekilde Lehmann ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanserli hastalarda rs143525573 varyantı ile *miR125a* seviyesi arasında ilişkiyi araştırmışlar ancak bizim bulgularımızla paralel olarak örneklerin hiçbirinde bu varyantın bulunmadığını belirlemişlerdir (Lehmann et al., 2013).

*miR377*, MBD1'i hedefleyen bir diğer miRNA olup, 14. kromozom üzerinden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Araştırmamızda *miR377* geni rs189165474 varyantı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış olup çalışmamızdaki tüm bireyler atasal genotipe sahip oldukları belirlenmiştir. Bu varyant ile ilgili literatür verisi bulunmamakla birlikte çalışmamızda rs189165474 varyantı ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

MBD2 proteinini hedefleyen miRNA'lardan biri *miR25* olup, 7. kromozom üzerindeki *miR25* geninden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Xu ve arkadaşları özefagal skuamöz hücreli kanserde *miR25* ekspresyonunun artmış olduğunu ve *miR25* ekspresyonunun invazyon ve metastazi ilerlettiğini belirlemişlerdir (Xu et al., 2012). Benzer şekilde Zhao ve arkadaşları gastrik kanserde *miR25* ekspresyonunun kanser hücre büyümesini artırdığını rapor etmişlerdir (Zhao, Wang, Yang, Jiang & Li, 2014).

Çalışmamızda *miR25* geni rs41274221 varyantı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış olup, çalışmamızdaki tüm bireyler atasal genotipe sahip olarak belirlenmiştir. Bu varyant ile ilgili literatür verisi bulunmamakla birlikte çalışmamızda rs41274221 varyantı ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

*miR92b* MBD2'i hedefleyen bir diğer miRNA olup, 1. kromozom üzerinden kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Li ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *miR92b* ekspresyonunun NSCLC dokularında artmış olduğunu, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alarak onkogen rolü üstlendiğini bildirmişlerdir (Li et al., 2013).

Çalışmamızda *miR92b* geni rs12759620 varyantı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış ve çalışmamızdaki tüm bireyler atasal genotipe sahip olarak belirlenmiş olup, rs12759620 varyantı ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

miR128-1 MBD2'yi hedefleyen bir miRNA olup 2. kromozom üzerindeki *miR128-1* geni tarafından kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Khan ve arkadaşları miR128-1 ekspresyonunun benign prostat dokusunda, prostat kanser dokusuna göre yüksek olduğunu, artmış ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerinde artmış invazyon ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir (Khan et al., 2010).

Araştırmamızda *miR128-1* geni rs117812383 varyantı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmamızdaki bireylerin hiçbirinde bu varyasyon bulunmamış olup, bireylerin tamamı atasal genotipe sahip olarak belirlenmiştir. Bu varyant ile ilgili literatür verisi bulunmamakla birlikte çalışmamızda rs117812383 varyantı ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

miR367 MBD2'yi hedefleyen bir miRNA olup, 4. kromozom üzerindeki *miR367* geni tarafından kodlanır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.targetscan.org>). Campayo ve arkadaşları, NSCLC tümör dokularında miR367 ekspresyonunun artmış olduğunu, ve yüksek miR367 seviyelerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Campayo et al., 2013).

Çalışmamızda *miR367* geni rs150161032 varyantı ile akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış ve çalışmamızdaki tüm bireyler atasal genotipe sahip olarak belirlenmiş olup, rs12759620 varyantı ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri tüm dünyada ve Ülkemizde sıklıkla aile öyküsünün eşlik ettiği sigara dumanı ve asbest maruziyeti sonucu oluşan kötü prognozlu, düşük sağ kalımlı ve ölümcül bir hastalıktır. Akciğer kanseri ve karsinogenezle ilgili araştırmalara her gün bir yenis eklenmekte olup, hastalığın moleküler nedenlerinin belirlenmesi ve yeni geliştirilen terapilerin hedeflenmesi günümüz kanser araştırmalarının ana hedefidir.

Biz de araştırmamızda karsinogenezde önemli role sahip olan, DNA metilasyonunda görevli DNA metiltransferaz enzimleri ve metil bağlayıcı proteinleri, yine epigenetik olarak kontrol eden miRNA'ların gen varyasyonları ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi ve bu varyasyonların Türk toplumundaki sıklığını geniş bir gen profilinde araştırmayı amaçladık. Araştırdığımız 37 SNP'den yalnızca rs72563729, rs12975333, rs143525573 daha önce farklı hasta gruplarında ve rs318039 genom çalışmasında araştırılmış olup, diğer 33 varyant ilk defa araştırmamız kapsamında çalışılmıştır.

Akciğer kanseri ve alt tipleri ile ilişkili bulduğumuz rs188912830 numaralı SNP, *miR3202* geni üzerinde yer alan A/C değişimi olup, bu varyasyon için C aleli yokluğunun varlığına göre 7.429 kat riskli olduğu belirlenmiştir. Bilindiği gibi DNMT1, DNMT3a ve 3b embriyogenezde de novo metilasyondan da sorumludur. Belirlenen SNP'nin DNMT enzimleri yerine yardımcı protein olan MeCP2'yi hedefleyen bir miRNA üzerinde bulunması anlamlıdır. Çalışmamızın bu bulgusu akciğer kanser araştırmalarımızda bundan sonraki hedeflerimiz için önemli bir veridir. *miR3202* ekspresyonunun ve MeCP2 seviyelerinin belirlenmesi ile çalışma verilerimizin güçlendirilmesi ve yeni bir moleküler yolağın tanımlanması hedeflenmektedir.

Araştırmamızda akciğer kanseri alt tipleri ile kontrol bireyler arasında genotip dağılımı yönünden farklılık bulduğumuz bir diğer varyant DNMT3B'yi hedefleyen *miR1274a* geni üzerinde yer alan rs318039'dir. Polimorfik genotip olan CC kontrol bireylerde akciğer kanseri alt tiplerine göre daha fazla olmakla birlikte C aleli için yapılan risk analizi akciğer kanseri (alt tipler değil) ve kontrol bireyler arasında anlamlı bulunmamıştır. Hastalık alt tipleri ve hasta sayısı artırıldığına bu varyasyonun önemli olabileceği düşünülmektedir. *miR1274a* ekspresyonun ve DNMT3B seviyesinin belirlenmesi de araştırma verilerini güçlendirebilir.

Çalışmamız kapsamında DNMT3A'yı hedefleyen *miR200b* geni rs72563729 ve TRDMT1'i hedefleyen *miR513c* geni rs145416750 varyasyonları hem akciğer kanseri hem de kontrol bireylerde belirlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak önemli bulunamayan bu varyantların akciğer kanseri ile ilişkisi bulunmamıştır. Hasta sayısı, hasta popülasyonu veya hastalık alt tiplerindeki farklılıklara göre bu varyasyonların değişebileceği düşünülmektedir.

Literatür bilgileri tarandığında araştırmamızda yer alan diğer diğer 33 SNP'nin sadece bizim çalışmamızda genotiplendirildiği tespit edilmiş olup, hem kontrol hem de akciğer kanserli bireyler bu varyasyonlar için atasal genotipe sahipti. Oldukça korunmuş bölgeler olarak belirlediğimiz bu varyantlar akciğer kanseri ile ilişkili bulunmadı ancak diğer 4 SNP gibi bu 33 varyant da ilk kez fonksiyonel karakterizasyonu yapılan SNP'ler olup, hem veri bankaları hem araştırmacılar için zgn veri niteliğinde olacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ak, G., & Metintaş, M. (2014). *Akciğer kanseri, tanı ve destek tedavisinde aile hekimi*. Ankara: Rotatıp Kitabevi.
- Akkaya, N. (2012). *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında hsp90a gen varyantlarının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Akkaya, Z. Y., & Dinçer, P. (2013). The new era in therapeutic approaches: Non-coding RNAs and diseases. *Marmara Medical Journal*, 26, 5-10.
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 Suppl), e1S-29S. doi: 10.1378/chest.12-2345
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th edition ed.). New York: Garland Science.
- Altuntaş, H. D., Öztürk, F., Yılmaz, S. İ., & Eröz, R. (2009). Asbest ve erionite bağlı mezotelyomalı hastaların parafin bloklarında p53 tümör supressör ve ras onkogen mutasyonlarının araştırılması. *Erciyes Tıp Dergisi*, 31(1), 1-8.
- Asrih, M., & Steffens, S. (2013). Emerging role of epigenetics and miRNA in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Pathology*, 22(2), 117-125.
- Aşçı Çelik, D., Aslan Koşar, P., & Özçelik, N. (2013). MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 20(3).
- Aydiner, A. (2007). *Akciğer kanseri: tanı-tedavi-takip: Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Bader, S., Walker, M., McQueen, H. A., Sellar, R., Oei, E., Wopereis, S., et al. (2003). MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene*, 22(22), 3506-3510.
- Ballestar, E., Paz, M. F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M. F., Espada, J., et al. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *The EMBO journal*, 22(23), 6335-6345.
- Bandres, E., Agirre, X., Bitarte, N., Ramirez, N., Zarate, R., Roman-Gomez, J., et al. (2009). Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *International journal of cancer*, 125(11), 2737-2743.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Başer, S., Hacıoğlu, M., Evyapan, F., Özkurt, S., Kiter, G., & Zencir, M. (2007). Denizli il merkezinde yaşayan erişkinlerin sigara içme özellikleri. *Türk Toraks Dergisi*, 8(3), 179-184.
- Belinsky, S. A., Klinge, D. M., Stidley, C. A., Issa, J.-P., Herman, J. G., March, T. H., & Baylin, S. B. (2003). Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer research*, 63(21), 7089-7093.
- Bodur, E., & Demirpençe, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89.
- Bora, G., & Yurter, HE. (2007). Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 48-54.
- Bozkurt, S. (2010). *Imatinib mesilat-dirençli ve dirençsiz kronik myeloid lösemi hücre hatlarında bim ve bid proapoptotik genlerinin polikomb grup proteinleri tarafından epigenetik regülasyonu*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Buechner, J., Tømte, E., Haug, B., Henriksen, J., Løkke, C., Flaegstad, T., & Einvik, C. (2011). Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *British journal of cancer*, 105(2), 296-303.
- Campayo, M., Navarro, A., Viñolas, N., Diaz, T., Tejero, R., Gimferrer, J. M., et al. (2013). Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, 41(5), 1172-1178.
- Chen, J., Wang, L., Matyunina, L. V., Hill, C. G., & McDonald, J. F. (2011). Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*, 121(1), 200-205.
- Chen, M. F., Lu, M. S., Lin, P. Y., Chen, P. T., Chen, W. C., & Lee, K. D. (2012). The role of DNA methyltransferase 3b in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 118(16), 4074-4089.
- Chung, G. E., Yoon, J.H., Myung, S. J., Lee, J.H., Lee, S.H., Lee, S.M., et al. (2010). High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*, 23(1), 113-119.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944-13949.

## 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, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Cui, F.M., Li, J.X., Chen, Q., Du, H.-B., Zhang, S.Y., Nie, J.H., et al. (2013). Radon-induced alterations in micro-RNA expression profiles in transformed BEAS2B cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(2), 107-119.
- Çelik, S. (2007). *Kronik miyeloid lösemili hastalarda dap kinaz geninin metilasyon analizleri*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Demirci, T. (2009). *Mekanik stress altındaki mezenseşimal kök hücrelerinde histon deasetilasyon inhibitörü varlığında hücrelerin biyolojik yanıtlarının gen ekspresyonu düzeyinde araştırılması*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Duan, S., Mi, S., Zhang, W., & Dolan, M. E. (2009). Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. *RNA Biol*, 6(4), 412-425.
- Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., Le Sage, C., & Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna*, 14(5), 872-877.
- Ekmekçi, A., Konaç, E., & Önen, H. İ. (2008). Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Gen*, 21(3), 282-295.
- Ettinger, D. S., Akerley, W., Borghaei, H., Chang, A. C., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., et al. (2012). Non-small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 10(10), 1236-1271.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., et al. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15805-15810.
- Frost, G., Darnton, A., & Harding, A.-H. (2011). The Effect of Smoking on the Risk of Lung Cancer Mortality for Asbestos Workers in Great Britain (1971–2005). *Annals of Occupational Hygiene*, 55(3), 239-247. doi: 10.1093/annhyg/meq089
- Gabriel, S., Ziaugra, L., & Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 2, Unit 2 12. doi: 10.1002/0471142905.hg0212s60

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C. E., Callegari, E., et al. (2009). MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, *113*(25), 6411-6418.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.L., Zhang, X., et al. (2006). Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, *311*(5759), 395-398.
- Gopalakrishna, R., Chen, Z.-H., & Gundimeda, U. (1994). Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(25), 12233-12237.
- Gönüllü, U. (1995). Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, *15*(6), 361-364.
- Güneş, H. V. (2013). *Moleküler hücre biyolojisi*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Güzelgöl, F., & Aksoy, K. (2009). Function and application areas in medicine of non-coding RNA. *Archives Medical Review Journal*, *18*(3), 141-155.
- Han, L., Witmer, P. D. W., Casey, E., Valle, D., & Sukumar, S. (2007). DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biology and Therapy*, *6*(8), 1284.
- Hiroki, E., Akahira, J. i., Suzuki, F., Nagase, S., Ito, K., Suzuki, T., et al. (2010). Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer science*, *101*(1), 241-249.
- [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf). (30-11-2013).
- <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. (27-10-2013).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. (13-03-2012). Retrieved 13-03-2012
- <http://www.targetscan.org>. (13-03-2012).
- Iorio, M. V., Piovan, C., & Croce, C. M. (2010). Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1799*(10), 694-701.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- İzmirli, M. (2013). Epigenetik mekanizmalar ve kanser tedavisinde epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
- Janssen, E. A., Slewa, A., Gudlaugsson, E., Jonsdottir, K., Skaland, I., Søliland, H., & Baak, J. P. (2010). Biologic profiling of lymph node negative breast cancers by means of microRNA expression. *Modern Pathology*, 23(12), 1567-1576.
- Jiang, L., Chang, J., Zhang, Q., Sun, L., & Qiu, X. (2013). MicroRNA Hsa-miR-125a-3p Activates p53 and induces apoptosis in lung cancer cells. *Cancer investigation*, 31(8), 538-544.
- Jiang, L., Huang, Q., Zhang, S., Zhang, Q., Chang, J., Qiu, X., & Wang, E. (2010). Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC cancer*, 10(1), 318.
- Kanai, Y., Ushijima, S., Kondo, Y., Nakanishi, Y., & Hirohashi, S. (2001). DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *International journal of cancer*, 91(2), 205-212.
- Karlıkaya, C., Öztuna, F., Solak, Z. A., Özkan, M., & Örsel, O. (2006). Tütün kontrolü. *Toraks Dergisi*, 7(1), 51-64.
- Kaymak, A. (2012). *Farklı kanserlerin hücre hatlarında demetilasyon oluşturulması ile tümör süpresör ve stamp ailesi gen ifade değişikliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Khan, A. P., Poisson, L. M., Bhat, V. B., Fermin, D., Zhao, R., Kalyana-Sundaram, S., et al. (2010). Quantitative proteomic profiling of prostate cancer reveals a role for miR-128 in prostate cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(2), 298-312.
- Kim, M. J., Yoo, S. S., Choi, Y.Y., & Park, J. Y. (2010). A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*, 69(1), 127-129.
- Koçer, C. (2013). *Akciğer kanserli hastalarda endotelial nitrik oksit sentaz gen polimorfizmlerinin rolü*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Kosova, B., Özel, R., & Aktan, Ç. (2011). Has DNA methylation any impact in prostate cancer diagnosis? . *Üroonkoloji Bülteni*, 2, 33-40.
- Köktürk, N., Öztürk, C., & Kırıçoğlu, C. (2003). Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 5(3), 139-145.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Lehmann, T. P., Korski, K., Ibbs, M., Zawierucha, P., Grodecka-Gazdecka, S., & Jagodziński, P. P. (2013). rs12976445 variant in the pri-miR-125a correlates with a lower level of hsa-miR-125a and ERBB2 overexpression in breast cancer patients. *Oncology letters*, 5(2), 569-573.
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F., & Kreipe, H. (2008). Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*, 214(1), 17-24. doi: 10.1002/path.2251
- Leng, S., Bernauer, A. M., Zhai, R., Tellez, C. S., Su, L., Burki, E. A., et al. (2011). Discovery of common SNPs in the miR-205/200 family-regulated epithelial to mesenchymal transition pathway and their association with risk for non-small cell lung cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(2), 145.
- Li, A., Omura, N., Hong, S.-M., Vincent, A., Walter, K., Griffith, M., et al. (2010). Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer research*, 70(13), 5226-5237.
- Li, J., Du, L., Yang, Y., Wang, C., Liu, H., Wang, L., et al. (2013). MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2. *Cancer letters*, 329(1), 84-90.
- Li, J., Kong, X., Zhang, J., Luo, Q., Li, X., & Fang, L. (2013). MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell Int*, 13(7).
- Li, L. Z., Zhang, C. Z., Liu, L. L., Yi, C., Lu, S. X., Zhou, X., et al. (2014). miR-720 inhibits tumor invasion and migration in breast cancer by targeting TWIST1. *Carcinogenesis*, 35(2), 469-478. doi: 10.1093/carcin/bgt330
- Li, Y., Li, L., Guan, Y., Liu, X., Meng, Q., & Guo, Q. (2013). MiR-92b regulates the cell growth, cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line and target PTEN. *Biochemical and biophysical research communications*, 440(4), 604-610.
- Lin, R. K., Hsu, H. S., Chang, J. W., Chen, C. Y., Chen, J. T., & Wang, Y. C. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5' CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*, 55(2), 205-213.
- Lin, X., & Nelson, W. G. (2003). Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer research*, 63(2), 498-504.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Lin, Y., Zeng, Y., Zhang, F., Xue, L., Huang, Z., Li, W., & Guo, M. (2013). Characterization of microRNA expression profiles and the discovery of novel microRNAs involved in cancer during human embryonic development. *PLoS One*, 8(8), e69230. doi: 10.1371/journal.pone.0069230
- Liu, Z., Wang, L., Wang, L.-E., Sturgis, E. M., & Wei, Q. (2008). Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: A case-control study. *Cancer letters*, 268(1), 158-165.
- Loury, R., & Sassone-Corsi, P. (2003). Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods*, 31(1), 40-48.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M. F., Cerrato, C., Setién, F., et al. (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer research*, 67(4), 1424-1429.
- Lüleyap, Ü. H. (2008). *Moleküler genetiğin esasları*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J. T., et al. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*, 130(7), 2113-2129.
- Metintaş, M. (2005). Asbest temasına bağlı plevral patolojiler ve mezotelyoma. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 1(32), 96-110.
- Millis, M. P. (2011). Medium-throughput SNP genotyping using mass spectrometry: multiplex SNP genotyping using the iPLEX(R) Gold assay. *Methods Mol Biol*, 700, 61-76. doi: 10.1007/978-1-61737-954-3\_5
- Novik, K., Nimmrich, I., Genc, B., Maier, S., Piepenbrock, C., Olek, A., & Beck, S. (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Current issues in molecular biology*, 4, 111-128.
- Onay, H. (2006). *Konvansiyonel renal hücreli kanser oluşumunda etkili olan genlerin metilasyon durumunun araştırılması*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Parry, L., & Clarke, A. R. (2011). The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. *Genes & cancer*, 2(6), 618-630.
- Patra, S. K., Patra, A., Zhao, H., Carroll, P., & Dahiya, R. (2003). Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochemical and biophysical research communications*, 302(4), 759-766.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Peterlongo, P., Caleca, L., Cattaneo, E., Ravagnani, F., Bianchi, T., Galastri, L., et al. (2011). The rs12975333 variant in the miR-125a and breast cancer risk in Germany, Italy, Australia and Spain. *Journal of medical genetics*, 48(10), 703-704.
- Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21(35), 5361-5379.
- Ronchetti, D., Lionetti, M., Mosca, L., Agnelli, L., Andronache, A., Fabris, S., et al. (2008). An integrative genomic approach reveals coordinated expression of intronic miR-335, miR-342, and miR-561 with deregulated host genes in multiple myeloma. *BMC medical genomics*, 1(1), 37.
- Saito, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., & Hirohashi, S. (2001). Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 33(3), 561-568.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A., & Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, 9(6), 435-443.
- Sandhu, R., Rivenbark, A. G., & Coleman, W. B. (2012). Enhancement of chemotherapeutic efficacy in hypermethylator breast cancer cells through targeted and pharmacologic inhibition of DNMT3b. *Breast cancer research and treatment*, 131(2), 385-399.
- Saydam, F., Değirmenci, İ., & Güneş, H. V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1), 113-120.
- Sayin, D. B. (2008). Methylation and cancer: Review. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28(4), 513.
- Seydel, G. Ş., & Aksoy, K. (2009). Onkogen ve tümör supressör gen olan miRNA'ların özellikleri ve kullanım alanları. *Arşiv*, 18( 1 ), 1-12.
- Shen, H., Wang, L., Spitz, M. R., Hong, W. K., Mao, L., & Wei, Q. (2002). A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer research*, 62(17), 4992-4995.
- Shenfield, G. M. (2004). Genetic polymorphisms, drug metabolism and drug concentrations. *Clin Biochem Rev*, 25(4), 203-206.
- Song, Y. X., Yue, Z. Y., Wang, Z. N., Xu, Y. Y., Luo, Y., Xu, H. M., et al. (2011). MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer*, 10(1), 1.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Spitz, M. R., Hong, W. K., Amos, C. I., Wu, X., Schabath, M. B., Dong, Q., et al. (2007). A Risk Model for Prediction of Lung Cancer. *Journal of the national cancer institute*, 99(9), 715-726. doi: 10.1093/jnci/djk153
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A., & Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in oncology*, 4.
- Tam, W., Ben Yehuda, D., & Hayward, W. S. (1997). Bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Molecular and cellular biology*, 17(3), 1490-1502.
- Tammemagi, C. M., Pinsky, P. F., Caporaso, N. E., Kvale, P. A., Hocking, W. G., Church, T. R., et al. (2011). Lung cancer risk prediction: prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial models and validation. *Journal of the national cancer institute*, 103(13), 1058-1068.
- Tang, H., Deng, M., Tang, Y., Xie, X., Guo, J., Kong, Y., et al. (2013). miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clinical Cancer Research*, 19(20), 5602-5612.
- Tang, M., Xu, W., Wang, Q., Xiao, W., & Xu, R. (2009). Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Current genomics*, 10(5), 336.
- Tatar, G. B., Dayangaç-Erden, D., & Erdem-Yurter, H. (2010). Spinal musküler atrofi tedavisinde histon deasetilaz inhibitörlerinin rolü. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 90-96.
- Tobias, E., Connor, J. M., & Ferguson-Smith, M. A. (2011). *Essential medical genetics*: Wiley-Blackwell.
- Topal, H. (2014). *Kolorektal kanserli hastalarda pre-mir-423 ve pre-mir-608 gen polimorfizmlerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Topu, Z., Ülger, F., & Numanoğlu, N. (2004). Ailesel kanser hikayesi ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 52, 130-136.
- Valeri, N., Vannini, I., Fanini, F., Calore, F., Adair, B., & Fabbri, M. (2009). Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mammalian Genome*, 20(9-10), 573-580.
- Varol, N. (2007). *Akut Lösemilerde Socs-1 Geninin Metilasyon Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- 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
- Wade, P. A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression\*. *Bioessays*, 23(12), 1131-1137.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., & Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle-Landes Bioscience*, 6(9), 1001.
- Williamson, S. L., & Christodoulou, J. (2006). Rett syndrome: new clinical and molecular insights. *European journal of human genetics*, 14(8), 896-903.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228-234.
- Wu, N., Zhao, X., Liu, M., Liu, H., Yao, W., Zhang, Y., et al. (2011). Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *PLoS One*, 6(1), e16264.
- Wu, Z. S., Wu, Q., Wang, C. Q., Wang, X. N., Wang, Y., Zhao, J. J., et al. (2010). MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion in vitro and may be a potential biomarker for breast cancer prognosis. *BMC cancer*, 10(1), 542.
- Xia, H., Qi, Y., Ng, S. S., Chen, X., Chen, S., Fang, M., et al. (2009). MicroRNA-15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(2), 205-210.
- Xu, X., Chen, Z., Zhao, X., Wang, J., Ding, D., Wang, Z., et al. (2012). MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(4), 640-645.
- Yaykaşlı, K. O., Hatipoğlu, Ö. F., Ertuğrul, K., & Yaykaşlı, E. (2012). Epigenetik mekanizmalar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 14(3), 58-68.
- Yu, X. F., Zou, J., Bao, Z. J., & Dong, J. (2011). miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(42), 4711.
- Zakhari, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol research: current reviews*, 35(1), 6.
- Zhang, J. G., Guo, J. F., Liu, D. L., Liu, Q., & Wang, J. J. (2011). MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(4), 671-678.

## **KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)**

- Zhao, G., Zhang, J. G., Liu, Y., Qin, Q., Wang, B., Tian, K., et al. (2013). MiR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK $\alpha$ 1. *Molecular cancer therapeutics*, 12(1), 83-93.
- Zhao, H., Wang, Y., Yang, L., Jiang, R., & Li, W. (2014). miR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK. *Molecular and cellular biochemistry*, 385(1-2), 207-213.
- Zhou, C., Liu, G., Wang, L., Lu, Y., Yuan, L., Zheng, L., et al. (2013). MiR-339-5p regulates the growth, colony formation and metastasis of colorectal cancer cells by targeting PRL-1. *PLoS One*, 8(5), e63142.

## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Cansu ÖZBAYER  
Doğum tarihi ve yeri : 16.06.1981 / Denizli  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

### Eğitim Durumu

İlköğretim : Gazi İlkokulu, 1987-1992, Denizli.  
Ortaöğretim : Pamukkale Ortaokulu, 1992-1995, Denizli.  
Lise : Denizli Lisesi, 1995-1998, Denizli.  
Üniversite : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1998-2002, Eskişehir.  
Yüksek Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 2002-2005, Eskişehir.  
Doktora : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 2008-2014, Eskişehir.

### Mesleki Deneyim

Araştırma Görevlisi : Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, 2005-2008  
Araştırma Görevlisi : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2008-

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

: Tıbbi Biyoloji Derneği



## Yayınlar

### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

**A1.** Ozden H, Canbaz Kabay S, Toker A, Üstüner MC, **Ozbayer C**, Ustüner D, Günes HV: The effects of levetiracetam on urinary 15f-2t-isoprostanelevels in epileptic patients. Seizure: EurJEpilepsy (2010) doi:10.1016/j.seizure.2010.07.010

**A2. Ozbayer C**, Kurt H, Kalender S, Ozden H, Gunes HV, Basaran A, Cakmak EA, Civi K, Kalender Y, Degirmenci I: The Effects of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Extract And N-Nitro-L-Arginine on Renal Function and Ultrastructure of Kidney Cells in Experimental Type 2 Diabetes. J Med Food 14 (0) 2011, 1-8.

**A3.** Bayramoglu G, Kabay S, Ozden H, Ustüner MC, Uysal O, Bayramoglu A, Sentürk H, Güven G, **Ozbayer C**, Kutlu A, Ustuner D, Canbek M: The effect of Echinacea on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(6) 1561-1566, September, 2011

**A4.** Canbek M, Ustüner MC, Kabay S, Uysal O, Ozden H, Bayramoğlu G, Sentürk H, **Ozbayer C**, Bayramoglu A, Ustüner D, Degirmenci I: The effect of gallic acid on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(8), pp. 1027-1033, August 2011

**A5. Ozbayer C**, Değirmenci I, Kurt H, Özden H, Çivi K, Başaran A, Güneş HV: Antioxidant And Free Radical-Scavenging Properties Of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Extracts And L-NNA İn Streptozotocine-Nicotinamide Induced Diabetic Rat Liver. Turkiye Klinikleri J Med Sci 31(1):51-60, 2011.

**A6. Ozbayer C**, Değirmenci I: Sirkadiyen saat, hücre döngüsü ve kanser. Dicle Tıp Dergisi/Dicle Medical Journal. 2011;38 (4):375-380. doi: 10.5798/diclemedj.0921.2011.04.0053

**A7.** Kurt H, **Ozbayer C**, Degirmenci I, Ustuner MC, Ozden H, Civi K, Gunes HV.: Comparative therapeutic potentials of acarbose and a formulated herbal extract on type 2 diabetic rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 6(29), pp. 2194-2204, 8 August, 2012

**A8. Ozbayer C**, Kurt H, Yangı B. Genetic Variants of TLR4 and TLR4 Signal Pathway and its Association with Insulin Resistance and Diabetes Risk. Journal of Clinical and Analytical Medicine. 2012 DOI: 10.4328/JCAM.1379

**A9. Ozbayer C**, Kurt H, Ozdemir Z, Tuncel T, Moheb Saadat S, Burukoglu D, Senturk H, Degirmenci I, Gunes HV. Gastroprotective, cytoprotective and antioxidant effects of Oleum cinnamomi on ethanol induced damage. Cytotechnology. 2013 Jul 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23868387.

**A10.** Turgut Coşan D, Saydam F, **Ozbayer C**, Doğaner F, Soyocak A, Güneş HV, Değirmenci I, Kurt H, Ustüner MC, Bal C. Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in L-NNA-induced hypertensive rats. Cytotechnology. 2013 Dec 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24306272.

**A11.** Tekin N, Ustuner MC, Akyuz F, **Ozbayer C**, Aydın O, Benkli K, Burukoglu D, Degirmenci I, Ozden H. Apoptotic effects of dipyrido [3,2-a:2',3'-c] phenazine (dppz) Au(III) complex against diethylnitrosamine/phenobarbital induced experimental hepatocarcinogenesis in rats. Mol Biol Rep. 2014 Apr 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24756331.

## **B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:**

**B1. Ozbayer C**, Değirmenci İ, Kurt H, Güneş H.V.: Are there any effects of stevia extract and N-nitro L- arginine on diabetes-induced oxidative stress? 2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Isparta, 2008.

**B2.** Kabay SC, Ustuner MC, Toker A , Ozden H, **Ozbayer C**, Karaman HO, Degirmenci I: Oxidative stress status in epileptic patients under antiepileptic treatment. Source: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY Volume: 16 Pages: 478-478 Supplement: Suppl. 3 Published: OCT 2009

**B3.** Kabay SC, Ustuner C, Toker A, Ozden H, **Ozbayer C**, Ustuner D, Gunes HV: The effects of levetiracetam on 15F-2t isoprostane levels in epileptic patients. Source: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY Volume: 16 Pages: 477-477 Supplement: Suppl. 3 Published: OCT 2009

**B4.** Canbek M, Ustuner MC, Kabay S, Uysal O, Ozden H, Bayramoglu G, Senturk H, **Ozbayer C**, Bayramoglu A, Ustuner D, Degirmenci I. The Protective Effect of Gallic Acid on Experimental Renal Ischemia/ Reperfusion Injury in The Rats, volume 31 supplement, Surgical Radiologic Anatomy, 1 September 2009, 117, 95-229, France.

**B5.** Bayramoğlu G, Kabay S, Ozden H, Ustuner MC, Uysal O, Senturk H, Bayramoglu A, **Ozbayer C**, Ustuner D, Kutlu A, Canbek M. The Protective Effect of Echinacea Extract on Experimental Renal Ischemia/Reperfusion Injury in the Rats. 10th Congress of European Association of Clinical Anatomy, 2-5 September 2009 /İstanbul.

**B6.** Ozden H, Senturk H, Guven G, Kabay S, Oz S, Misirlioglu M, Burukoglu D, **Ozbayer C**, Yildiz F, Kaygisiz B, Ustuner MC, Baycu C. The Effects of Lumbricus Extract on The Antioxidant System and Histological Structure of Nephrectomized Rats in a Ischemia-Reperfusion Model. 4. B&H Symposium "Morphology in Science and Practice" With International Participation, 27-30 September 2012, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

**B7.** Öz S, Özden H, Güven G, Şentürk H, Burukoğlu D, Kabay S, Üstüner MC, **Ozbayer C**, Ay H. The Effects of Melatonin and Pyrrolidine on The Antioxidant System and Histological Structure of Nephrectomized Rats After Ischemia-Reperfusion. 4. International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (ISCAA) & 14. National Congress of Anatomy, 28-June/1 July, 2012, Ankara/TURKEY.

**B8. Ozbayer C**, Turgut Coşan D, Saydam F, Soyocak A, Doğaner F, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. The Effect of Tannic Acid on Liver Damage Mediated by Chronic Nitric Oxide Inhibiton. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 41-41, 2012., 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B9. Ozbayer C**, Tekin N, Yangi B, Entok E, Akyüz F , Kurt H , Değirmenci İ, Güneş HV, Üstüner M C. Effects of Nigella sativa L. on NO production and DNA fragmentation in acute inflammation. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 55-55, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B10.** Doğaner F, Turgut Coşan D, **Ozbayer C**, Saydam F, Soyocak A, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. The Effects of Tannic Acid on Heart Tissue and Blood in Experimental Hypertension. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 61-61, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B11.** Moheb Saadat S, Kurt H, **Ozbayer C**, Özdemir Z, Tuncel T, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV. Efficacy of the St John's Wortoil on oxidative stress induced by indomethacin on mucosal damage. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 68-68, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative

Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B12.** Tuncel T, Kurt H, **Ozbayer C**, Moheb Saadat S, Özdemir Z, Burukoğlu D, Değirmenci İ, Güneş HV. Investigation of the effectiveness of oleum Cinnamomum zeylanicum on alcohol induced liver injury. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 77-77, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B13.** Özdemir Z, **Ozbayer C**, Kurt H, Moheb Saadat S, Tuncel T, Üstüner MC, Burukoğlu D, Değirmenci İ, Güneş HV. The Protective and Antioxidant Effect of Hypericum perforatum on Indomethacin-Induced Renal Damage. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 82-82, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B14.** Üstüner MC, Çolak E, Tekin N, Üstüner D, Çolak E, Yangı B, Burukoğlu D, **Ozbayer C**, Akyüz F, Güneş HV, Değirmenci İ. The Curative Effects of Olea europaea L. Leaf Extract on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury and the Oxidative Stress. Cell Membranes and Free Radical Research. Volume 4, Number 1, pp 68-69, 2012. 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 2012, Isparta, TURKEY.

**B15.** Tekin N, Akyüz F, Üstüner MC, **Ozbayer C**, Aydın Ö, Değirmenci İ, Benkli K, Burukoğlu D, Özden H, Güven G. Dipyrido [3,2a:2',3'-c]phenazine (dppz) Au(III) Complex is a Novel Anti-tumor Agent for Hepatocellular Carcinoma. FEBS Special Meeting, Protein Quality Control and Ubiquitin System in Health and Disease, 14-16 November 2012, Kusadasi, TURKEY.

**B16: Ozbayer C**, Değirmenci İ, Üstüner D, Ak G, Saydam F, Üstüner M C, Güneş HV, Metintaş M. The 1303CA mutation of solute carrier family member 2 gene in lung cancer, European Journal of Human Genetics, Volume 22, Supplement 1, pp 455, European Human Genetics Conference 2014, Milan, Italy, May 31- June 3, 2014.

**B17:** Saydam F, Değirmenci İ, Birdane A, Özdemir M, Ulus T, **Ozbayer C**, Bal C, Ata N, Güneş HV. The impact of CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 and PON1 gene variants on the antiplatelet effect of clopidogrel in Turkish patients with acute coronary syndrome, European Journal of Human Genetics, Volume 22, Supplement 1, pp 297, European Human Genetics Conference 2014, Milan, Italy, May 31- June 3, 2014.

### C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında

#### basılan bildiriler:

**C1. Şimşek C,** Kurt H, Özden H, Çivi K, Güneş HV, Başaran A, Değirmenci İ: *Stevia Rebaudiana* ve N –Nitro-L-Arginin'in, Deneysel Tip II Diyabette Hücresel Antioksidan Savunma ve Karaciğer Histolojisine Etkileri. IX. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ KONGRESİ, Manisa, 2005.

**C2. Şimşek C,** Değirmenci İ: Deneysel Tip II Diyabetik Sıçanlarda, *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Ekstresi ile N –Nitro-L-Arginin (L-NNA)'in, Kan Şekeri ve Pankreas Histolojisi Üzerine Etkileri. IX. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ KONGRESİ, Manisa, 2005.

**C3. Şimşek C,** Özden H, Çivi K, Kurt H, Değirmenci İ, Güneş HV, Başaran A: *Stevia Rebaudiana* Ekstresi ve N –Nitro-L-Arginin'in, Deneysel Tip II Diyabette Böbrek Fonksiyonları Üzerine Etkileri. IX. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ KONGRESİ, Manisa, 2005.

**C4. Şimşek C,** Kurt H, Kalender S, Güneş HV, Başaran A, Kalender Y, Değirmenci İ: *Stevia Rebaudiana* ve N –Nitro-L-Arginin'in Deneysel Tip II Diyabette Böbrek İnce Yapısına Etkileri, X. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ, Antalya, 2007.

**C5. Şimşek C,** Üstüner MC, Kurt H, Çivi V, Güneş HV, Başaran A, Değirmenci İ: Deneysel Tip II Diyabetik Sıçanlarda Akarboz ve F13'ün Serbest Oksijen Radikalleri ve Karaciğer Histolojisi Üzerine Etkileri. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, 2007.

**C6. Özbayer C.,** Kurt H., Üstüner D., Üstüner M.C., Güneş H.V., Değirmenci İ.: Tip II diyabette nNOS ekspresyonu ve mikronükleus sıklığı üzerine L-NNA ve stevia rebaudiana (Bertoni)'nin etkileri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009 / Bodrum.

**C7. Üstüner M.C., Doğaner F., Özbayer C.,** Değirmenci İ., Saydam F., Güneş H.: Karaciğer hepatoksisitesinde mitokondriyal lipid peroksit ve süperoksit dismutaz seviyeleri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009 / Bodrum.

**C8. Değirmenci İ., Sağlam Ö., Özbayer C. Üstüner M.C., Akın A., Güneş H.V.:** Deneysel tip I ve tip II diyabet modellerinde mitokondriyal lipid peroksidasyonu ve antioksidan seviyeleri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009 / Bodrum.

**C9. Kurt H, Özdemir Z, Özbayer C,** Moheb Saadat S, Burukoğlu D, Tuncel T, Şentürk H, Güneş HV, Değirmenci İ: Investigation of The Effectiveness of Hypericum perforatum Oil on Drug Induced Liver Damage. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2011, 31(6) Suplemen 1: 133-134. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

**C10. Özbayer C,** Kurt H, Özdemir Z, Moheb Saadat S, Tuncel T, Değirmenci İ, Güneş HV, Üstüner MC: The Protective Effects of Cinnamon Oil on Mucosal Damage in Ethanol Induced Experimental Ulcer Model.

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Suplemen 1: 134-134. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

**C11.** Kurt H, **Özbayer C**, Tuncel T, Moheb Saadat S, Özdemir Z, Burukoğlu D, Değirmenci İ, Üstüner MC, Güneş HV: The Antioxidant Effect of Oleum Cinnamomum zeylanicum on Free Radicals Produced by Acute Renal Injury. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6) Supplement 1: 135-135. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

**C12.** Üstüner MC, Entok E, **Özbayer C**, Tekin N, Kurt H, Akyüz F, Değirmenci İ, Güneş HV: Anti-inflammatuar and Anti-oxidative Effects of Nigella sativa L.: FDG-PET imaging of lung inflammation. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011, 31(6):133. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 / Antalya.

**C13.** Soyocak A, Turgut Coşan D, Doğaner F, **Özbayer C**, Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. Doğal Bir Bileşen olan Tannik Asit Hipertansiyonda Etkili midir? XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27 - 30 Ekim 2011, Antalya. Türkiye Klinikleri, Tıp Bilimleri Derg. (Suppl.) 31(6):130, 2011.

**C14.** Saydam F, Turgut Coşan D, Soyocak A, Doğaner F, **Özbayer C**, Güneş HV, Değirmenci İ, Üstüner MC, Kurt H, Bal C. N (omega)-nitro-L-arjinin uygulanan sıçanlarda tannik asitin sistolik kan basıncı, böbrek dokusundaki oksidatif stres ve bazı idrar parametreleri üzerine etkisi. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27 - 30 Ekim 2011, Antalya. Türkiye Klinikleri, Tıp Bilimleri Derg. (Suppl.) 31(6):130, 2011.

**C15.** Kabay S, Özden H, Güven G, Dönmez DB, Üstüner MC, Topal F, Güneş HV, Üstüner D, **Özbayer C**. Deneysel Testis Torsiyonu Oluşturulan Ratlarda Testis Hasarı Üzerine Pyrrolidine Dithiocarbamate'ın Etkisi. 22. Ulusal Üroloji Kongresi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 02-06 Mayıs 2012.

**C16.** **Özbayer C**, Değirmenci İ, Saydam F, Üstüner D, Ak G, Üstüner MC, Metintaş M, Güneş HV. "Divalent metal taşıyıcı 1 IVS4+44C>A polimorfizmi ve akciğer kanser riski" Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, Sempozyum Kitapçığı, sf 18-19, MS Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesi, İstanbul, 06-07 Aralık 2013.

**C17.** Saydam F, Değirmenci İ, Birdane A, Ulus T, **Özbayer C**, Özdemir M, Bal C, Ata N, Güneş HV. "Impact of CYP2C19 Variants on the Antiplatelet Effect of Clopidogrel in Turkish Patients with Acute Coronary Syndrome" Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, Sempozyum Kitapçığı, sf 28, MS Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesi, İstanbul, 06-07 Aralık 2013.

## Bilimsel Etkinlikler

### Projeler

#### 1. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 200411017**

**PROJE ADI :** *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Ekstresi ve N –nitro-L-arginin (L-NNA)'in, Deneysel Diyabet ve Nitrik Oksit Sentaz Üzerine Etkileri

**PROJENİN KAPANMA YILI : 2007**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 42.656,98 YTL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ :** Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

**Bio. Cansu ŞİMŞEK (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)**

Öğr. Gör. Kısmet BİLDİRİCİ (Patoloji Anabilim Dalı)

Yrd. Doç. Dr. Hilmi ÖZDEN (Anatomi Anabilim Dalı)

Arş.Gör.Dr.Hülyam KURT (Tıbbi Biyoloji A.D.)

#### 2. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201011044 (Başlama Yılı:2010)**

**PROJE ADI :** DEN ve Fenobarbital Uygulanan Ratlarda dipyrido (3, 2-a:2', 3'-c) phenazine (dppz) Au(III) Kompleksinin Apoptotik Proteinler ve Ubikuitin Sistem Üzerine Etkilerinin araştırılması

**PROJENİN KAPANMA YILI : 2013**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 43.630 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Yrd. Doç.Dr. M. Cengiz ÜSTÜNER (Tıbbi Biyoloji AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Danışman: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)

Yrd.Doç.Dr. Fahrettin AKYÜZ (Biyokimya Anabilim Dalı)

Doç. Dr. Hilmi ÖZDEN (Anatomi Anabilim Dalı)

Öğr.Gör. Dilek BURUKOĞLU (Histoloji-Embriyoloji AD)

Arş.Gör.Neslihan TEKİN (Biyokimya Anabilim Dalı)

**Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER (Tıbbi Biyoloji AD)**

### **3. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201241020 (Başlama Yılı:2012)**

**PROJE ADI :** DNA Metiltransferaz ve Metil Bağlayan Bölge Proteinlerini Hedefleyen miRNA Gen Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri İle İlişkinin Belirlenmesi

**PROJENİN KAPANMA YILI : Devam ediyor**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 97.740 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Öğr.Gör. Dr. Derya ÜSTÜNER (Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Danışman: Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)

Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ (Göğüs Hastalıkları AD)

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

**Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Grv.Faruk SAYDAM (Tıbbi Biyoloji AD)

### **4. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201211017 (Başlama Yılı:2012)**

**PROJE ADI :** Türk Toplumunda CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 ve PON1 Gen Polimorfizmlerinin Klopidoğrel'in Antitrombosit Aktivitesi Üzerine Etkileri

**PROJENİN KAPANMA YILI : Devam ediyor**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 85.032,10 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Doç.Dr.Alparslan BİRDANE (Kardiyoloji AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Danışman: Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)

Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ (Tıbbi Biyoloji AD)

Yrd.Doç.Dr.Mahmut ÖZDEMİR (Farmakoloji AD)

Yrd.Doç.Dr.Taner USLU (Kardiyoloji AD)

**Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Grv.Faruk SAYDAM (Tıbbi Biyoloji AD)

### **5. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU**

**PROJE NO : 201311D08 (Başlama Yılı:2013)**

**PROJE ADI :** TLR4, NOD1/2 ve COX-2 Gen Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri ile İlişkinin Belirlenmesi

**PROJENİN KAPANMA YILI : 2014**

**PROJENİN BÜTÇESİ : 14.975 TL**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Doç.Dr.Hülyam KURT (Tıbbi Biyoloji AD)

**PROJE ÇALIŞANLARI :**

Prof.Dr.Muzaffer METİNTAŞ (Göğüs Hastalıkları AD)



Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCİ (Tıbbi Biyoloji AD)  
Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ (Tıbbi Biyoloji AD)  
Yrd.Doç.Dr.Ayşegül BAYRAMOĞLU (Artvin Çoruh Üniv.)  
**Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)**

## 6. PROJEYİ DESTEKLEYEN KURULUŞ :

### TÜBİTAK

**PROJE NO : 113S427 (Başlama Yılı:2013)**

**PROJE ADI :** TLR4 ve TLR4 Sinyal Yolağındaki Gen Polimorfizmlerinin İnsülin Direnci ve Tip 2 Diyabet İle İlişkinin Belirlenmesi

**PROJENİN KAPANMA YILI : Devam ediyor**

**PROJENİN BÜTÇESİ :** 167024 TL

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

### PROJE ÇALIŞANLARI :

Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ (Tıbbi Biyoloji AD)

Doç.Dr.Hülyam KURT (Tıbbi Biyoloji AD)

Prof.Dr.M.Nur Kebapçı (Endokrinoloji AD)

**Arş.Gör. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)**

Bio.Bariş YAŞAR (Tıbbi Biyoloji AD)

## 7. 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 : Devam ediyor**

**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. Cansu ÖZBAYER(Tıbbi Biyoloji AD)**

Arş.Grv. Emine YAĞCI (Tıbbi Biyoloji AD)

Arş.Grv.Faruk SAYDAM (Tıbbi Biyoloji AD)

## Ödüller

- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "Oxidative stress status in epileptic patients under antiepileptic treatment" 2010
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "The effects of levetiracetam on 15f-2t isoprostane levels in epileptic patients" 2010
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "The Effects of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Extract And N-Nitro-L-Arginine on Renal Function and Ultrastructure of Kidney Cells in Experimental Type 2 Diabetes" 2012
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "The effect of Echinacea on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats" 2012
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "The effect of gallic acid on kidney and liver after experimental renal ischemia/reperfusion injury in the rats" 2012
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "Antioxidant and Free Radical-Scavenging Properties of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Extracts and L-NNA in Streptozotocine-Nicotinamide Induced Diabetic Rat Liver" 2012
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü "Comparative therapeutic potentials of acarbose and a formulated herbal extract on type 2 diabetic rats" 2013

## **Kurslar ve Eğitim Programları**

:

- Sorumlu Müdürlük Eğitim Sertifikası. TMMOB Kimya Mühendisleri Odası.
- II.Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri. ESOGÜ-TICAM.
- III.Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri. ESOGÜ-TICAM.
- Deneysel Hayvanları Kullanım-Bakım Sertifikası. Dumlupınar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu.
- IX.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Celal Bayar Üniversitesi.
- III.Dumlupınar Fizyoterapi Seminerleri. Dumlupınar Üniversitesi
- X.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. İstanbul Üniversitesi.
- 2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Suleyman Demirel University.
- XI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Marmara Üniversitesi.
- Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology. Bilkent University.
- Kök Hücre ve Gen Tedavisi Sempozyumu. Uludağ Üniversitesi.
- European Human Genetics Conference 2014, Milan, Italy.