



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)
TEKNİĞİ KULLANILARAK KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERLERİYLE
İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN İNCELENMESİ**

Hazırlayan
Ümit Karadeli

Tez Danışmanı
Yard. Doç. Dr. Ahmet Uludağ

TIBBİ GENETİK

ÇANAKKALE-2015



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)
TEKNİĞİ KULLANILARAK KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERLERİYLE
İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN İNCELENMESİ**

Hazırlayan
ÜMİT KARADELİ

Tez Danışmanı
YARD. DOÇ. DR. AHMET ULUDAĞ

TIBBİ GENETİK

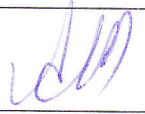
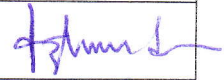
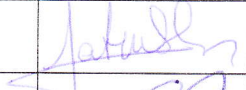
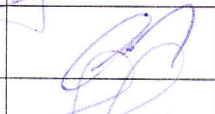
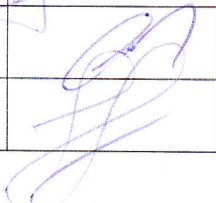
ÇANAKKALE-2015

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Tıbbi Genetik
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Ümit KARADELİ
Tez Başlığı : Multiplex Ligation- Dependent Probe Amplification (MLPA) Tekniği
Kullanılarak Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseriyle İlişkili Bazı
Genlerin İncelenmesi
Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Hastanesi, Terzioğlu
Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 04.02.2015

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Yard. Doç. Dr. Ahmet Uludağ	Tıp Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		
Prof. Dr. Öztürk Özdemir	Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Fatma Sılan	Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Coşkun Sılan	Tıp Fakültesi	
Yard. Doç. Dr. Fahri Güneş	Tıp Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05/02/2015 tarih ve 5/6 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name :

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ()

Department : Medical Genetics

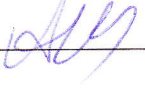
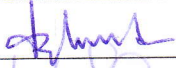

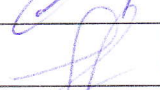
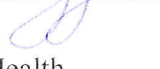
Student Name and Surname: Umit KARADELI

Title of the Thesis : The Investigation of Some Genes Associated with NSCLC By Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique (MLPA)

Examination Place : Canakkale Onsekiz Mart University, Research Hospital, Terzioğlu
Campüs

Examination Date : 04.02.2015

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Asist. Prof. Dr. Ahmet Uludag	Medical School	
Members of Examination Jury (Titles and Names)		
Prof. Dr. Ozturk Ozdemir	Medical School	
Prof. Dr. Fatma Silan	Medical School	
Assoc. Dr. Coskun Silan	Medical School	
Asist. Prof. Dr. Fahri Gunes	Medical School	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated 05/02/2015 and numbered 5/6.

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8' de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih: 28/01/2015

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Ümit KARADELİ

İmza: 

ÖZET

Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında, akciğer kanseri ilk sıralarda yer almaktadır. Tümör süpressör genler, hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Metillenme, genlerin transkripsiyonunu engelleyen epigenetik bir mekanizmadır. Çalışmamızda MLPA yöntemi ile akciğer kanserlerine özel dizayn edilen Salsa MLPA Probemix 175/294 ve Salsa MLPA ME002 kitleri kullanılarak, akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş genlerin amplifikasyon, delesyon ve metilasyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız da histopatolojik olarak incelenip, “küçük hücre dışı akciğer kanseri” tanısı almış 30 olgu ve her hastaya ait kanser dokularından elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen 30 çevre dokularından elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde, akciğer kanserli tümöral dokularda en sık 22q, 13q, 1p ve 10q delesyonları; 9q ve 17q amplifikasyonları görülmüştür. Akciğer kanserli tümöral dokularda ve çevre akciğer dokularında birbirlerine yakın oranlarda en sık *ATM*, *CDH13*, *MGMT* ve *BRCA2* prob bölgelerinde metilasyon görülmüştür.

Sonuç olarak MLPA ve MS- MLPA yöntemleri akciğer kanserlerindeki tümör süpressör genlerinin değişimlerini inceleyen, ucuz, hızlı ve kolay bir yöntemdir. Bu yöntemlerin rutin kullanımda sıklığının artması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: Akciğer kanseri, Metilasyon, MLPA, MS-MLPA, Tümör süpressör genler.

ABSTRACT

The Investigation of Some Genes Associated with NSCLC By Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique (MLPA)

The lung cancer is in the first ranks among the causes of death due to cancer. Tumor suppressor genes inhibit tumor growth by regulating cell growth. Methylation is an epigenetic mechanism that prevents the transcription of genes. In this study, it was aimed to investigate amplifications, deletions and methylations of genes associated with lung cancer with MLPA method by using Salsa MLPA Probemix 175/294 and Salsa MLPA ME002 kits designed specifically for lung cancer. The test group consisted of DNA samples obtained from cancer tissue of 30 patients that histopathologically examined and diagnosed as non-small cell lung cancer. The DNA samples obtained from surrounding 30 cancer-free tissue of the same patients were considered as the control group. When the results were analyzed, 22q, 13q, 1p and 10q deletions and 9q and 17q amplifications were observed as the most common changes among lung tumor tissues. Methylation in *ATM*, *CDH13*, *MGMT* and *BRCA2* prob regions were seen as the most frequently in lung cancer tissues and the surrounding lung tissue in similar rates.

In conclusion, MLPA and MS- MLPA methods are cheap, quickly and easily methods analyzing the changes in the tumor suppressor genes in lung cancer. It is thought that these methods should be used more common in routine practise.

Keywords: Lung cancer, Methylation, MLPA, MS-MLPA Tumor suppressor genes.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, değerli fikirleriyle bana yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında sabırla isteklerimi yerine getirmeye çalışan danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Ahmet Uludağ' a,

Başarının teori peşinde koşmak ve öğrenilen her şeyi uygulamaya dökmek olduğunu benimseten, fikirleri ve hoşgörülü yaklaşımlarıyla desteklerini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Öztürk Özdemir' e ve Sayın Prof. Dr. Fatma Sılan' a,

Çalışma grubu hasta doku örneklerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji AD' dan Sayın Yard. Doç. Dr. Nur Büyükpınarbaşılı' ya,

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD' dan Sayın Doç. Dr. Nihal Kılınç ve teknik desteklerini esirgemeyen Sayın Çetin Karakaya' ya,

Çalışmalarım sırasında laboratuvarlarını ve bilgilerini benimle paylaşan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden başta Sayın Doç. Dr. Emre Tepeli ve Araş. Gör. Levent Elmas olmak üzere değerli Tıbbi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına,

Her konuda yanımda olan iş arkadaşlarım, Uzm. Dr. Nilgün Özbey İnal, Uzm. Dr. Aslı Kiraz, Lab. Fidan Ünal, Lab. Vildan Düzdağ, Bio. Betül Koçer, Lab. Mehmet Güleç, Bio. Özlem Değirmencioğlu, Kim. Duygu Kankaya, Uzm. Bio. Diğdem Uysal, Kim. Hülya Has, Lab. Gülay Ekinci, Lab. Şengül Türünz ve samimiyetleriyle moralimi yüksek tutan değerli dostlarım Lab. H. Resul Ay ve Bio. Mümin Sargın' a,

Hayatımın en değerli varlıkları can tanelerim annem ve babama; destekleri sayesinde çalışmalarına odaklandığım canım ablam Meral Şöyle, hayatıma anlam ve yön veren canım yeğenim Zekiye Şöyle ve sabırlı sevgisiyle yanımda duran yol arkadaşım Nimet Açikkol' a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	I
THESIS APPROVAL FORM.....	II
BEYAN FORMU.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	IX
TABLO LİSTESİ.....	X
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	XII
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Kanser ve Genetik.....	4
2.1.1.Hücre Döngüsü.....	7
2.1.1.1.Hücre Döngüsünün Basamakları.....	8
2.1.1.2.Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	9
2.1.1.3.Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi.....	10
2.1.2.Kanserin Genetik Yapısı.....	13
2.1.2.1.Onkogenler.....	14
2.1.2.2.Tümör Süpressör Genler.....	16
2.1.2.3.DNA Tamir Genleri.....	17
2.1.2.4.Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi.....	18
2.2.Akciğer Kanseri.....	19
2.2.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	19
2.2.2.Akciğer Kanseri Belirtileri.....	21
2.2.3.Akciğer Kanserinin Tipleri.....	22
2.2.3.1.Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	23
2.2.3.2.Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri.....	23
2.2.4.Akciğer Kanserinde Tanı ve Evrelendirme.....	24
2.3.Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	28
2.3.1.Onkogenlerin Aktivasyonu.....	29
2.3.2.Tümör Süpressör Genler (TSG)'in İnaktivasyonu.....	31
2.3.3.DNA Tamir Genlerindeki Değişiklikler.....	33
2.3.4.Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Değişiklikler.....	33
2.4.DNA Metilasyonu.....	35
2.4.1.DNA Metilasyonu ve Kanser.....	38
2.4.2.Akciğer Kanseri ve DNA Metilasyonu.....	40
2.5.Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi....	41
2.5.1.Akciğer Kanserinde MLPA Tekniğinin Kullanımı.....	43
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	48
3.1.Kullanılan Gereçler.....	48
3.2.Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	48
3.3.Materyal Seçimi.....	49
3.4.Yöntemler.....	49

3.4.1.Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu.....	49
3.4.2.İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi.....	51
3.4.2.1.DNA Denatürasyonu ve SALSA ME002B, SALSA P175-A1 ve SALSA P294-A1 Probe Miksleriyle Hibridizasyonu.....	51
3.4.2.2.Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu.....	51
3.4.2.3.PCR.....	52
3.4.2.4.Beckman Coulter CEQ 8000 Cihazına Yükleme.....	53
3.4.2.5.Değerlendirme.....	53
4.BULGULAR.....	56
4.1.Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri.....	56
4.2.Araştırma Grubu Bireylerinin P294 ve P175 Prob Kitleri ile MLPA Bulguları.....	58
4.3.Metilasyona Duyarlı <i>HhaI</i> Endonükleaz Kesim Sonuçları.....	74
5.TARTIŞMA.....	81
5.1.Parafine Gömülü Dokulardan DNA Elde Etme Protokollerinin Karşılaştırılması.....	81
5.2.Amplifikasyon ve Delesyon Durumlarının Değerlendirilmesi.....	82
5.3.Metilasyon Profillerinin Değerlendirilmesi.....	87
5.4. MLPA'nın Avantajları ve Dezavantajları.....	90
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92
7.KAYNAKLAR.....	95
8.EKLER.....	102
Ek-1 Spiralli Tez Kontrol Formu.....	102
Ek-2 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi.....	103
Ek-3 Etik Kurul Onay Formu.....	104
9.ÖZGEÇMİŞ.....	105

KISALTMALAR VE SİMGELERİN LİSTESİ

ATM: Ataxia- Telangiectasia Mutated

ATR: ATM ve Rad-3

BAC: Bronkoalveolar Kanser

Cdc: Hücre bölünme döngüsü

Cdk: Siklin Bağımlı Kinaz

cm: Santimetre

CSF: Koloni Stimüle edici Faktör

DNA: Deoksiribonükleik asit

DQ: DNA Kalitesi

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

mm: Milimetre

MPF: Olgunlaşmayı ilerleten faktör

MR: Manyetik rezonans

MS-MLPA: Metilasyon Spesifik MLPA

Ng: Nanogram

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

TGF: Transforming Growth Faktör

TNM: Tümör Node Metastaz

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Akciğer Kanserinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi.....	26
Tablo 2. KHDAK' lerinde Evre Grupları.....	27
Tablo 3. SALSA MLPA 175-A1 Tümör Gain Prob Bölgeleri.....	45
Tablo 4. SALSA MLPA 294-A1 Tümör Loss Prob Bölgeleri.....	46
Tablo 5. SALSA ME002 B Probe Bölgeleri.....	47
Tablo 6. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.....	56
Tablo 7. Vakaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları.....	57
Tablo 8. Vakaların evre' lerine göre dağılımları.....	57
Tablo 9. Vakaların TNM sınıflamasına göre dağılımları.....	57
Tablo 10. Hastalardan birine ait 1p, 3p, 22q delesyon bölgeleri.....	61
Tablo 11. Hastalardan birine ait 9p ve 17q delesyon bölgeleri.....	63
Tablo 12. Hastalardan birine ait 16p, 13q, 9q,10q delesyon bölgeleri.....	65
Tablo 13. Hastalardan birine ait 9q ve 17q amplifikasyon bölgeleri.....	67
Tablo 14. Akciğer kanserli tümöral dokudan ve çevre akciğer dokularından elde edilen MLPA sonuçları.....	69
Tablo 15. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının Grade' lere göre dağılımları.....	70
Tablo 16. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının evre'lere göre dağılımları.....	70
Tablo 17. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının T1, T2, T3 ve T4' lü olgulara göre dağılımları.....	71
Tablo 18. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının T1, T2, T3 ve T4' lü olgulara göre dağılımları.....	72
Tablo 19. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının N0, N1 ve N2' li olgulara göre dağılımları.....	72
Tablo 20. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının N0, N1 ve N2' li olgulara göre dağılımları.....	73
Tablo 21. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının M0, M1 ve M2' li olgulara göre dağılımları.....	73
Tablo 22. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının M0, M1 ve M2' li olgulara göre dağılımları.....	74

Tablo 23. Çevre ve tümöral dokularda saptanan metilasyon sıklıkları.....	77
Tablo 24. TNM sınıflamasına göre tümöral dokulardaki metilasyon sıklıkları.....	78
Tablo 25. TNM sınıflamasına göre çevre dokularda saptanan metilasyon sıklıkları.	79
Tablo 26. Evrelere göre saptanan metilasyon sıklıkları.....	80

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 1. Hücre Döngüsü.....	8
Şekil 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	11
Şekil 3. 2009 Yılı Erkeklerde Kanser İnsidansları (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)..	20
Şekil 4 2009 Yılı Kadınlarda Kanser İnsidansları (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)..	20
Şekil 5. 5-metilsitozin oluşumu.....	35
Şekil 6. Metilasyon ve asetilasyon ilişkisi.....	37
Şekil 7. Genel MLPA yönteminin basamakları.....	43
Şekil 8. MS- MLPA yönteminin basamakları.....	43
Şekil 9. Kontrollere ait MLPA SALSA P175-A1 GAİN pik görüntüleri.....	59
Şekil 10. Kontrollerden birine ait MLPA SALSA P294-A1 LOSS pik görüntüleri..	59
Şekil 11. Delesyon saptanan hastalardan birine ait pik görüntüleri.....	60
Şekil 12. Amplifikasyon saptanan hastalardan birine ait pik görüntüleri.....	60
Şekil 13. Normal metilsyon profiline sahip bir hastanın enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü.....	75
Şekil 14. ATM genine ait metilasyon spesifik MLPA görüntüsü.	76
Resim 1. Örnek DNA' lara ait %1' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser büyüme özellikleri bozulan hücrelerin klonal bir şekilde yayılmasıyla gelişen bir hastalıktır. Halen dünyada genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır (Futreal ve ark., 2001). Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin büyüüp gelişmesi, bölünmesi ve çoğalmasına gereksinim vardır. Bazen süreç bu şekilde ilerlemez ve yeni hücrelere gerek olmadan hücreler bölünmeye devam eder. Kontrollü bölünme özelliğini kaybetmiş kanser hücreleri, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğaldıkça çoğalırlar. Hücrenin normal yaşam siklusunda DNA hasarı olsa bile çoğu zaman hücreler bu duruma karşı koyarlar ve hücre ya bunu onarır ya da ölür. Kanserli hücrelerde hasarlı DNA onarılamaz ve bu durum sonucunda kontrolsüz çoğalma başlar. DNA çevresel etkenler (kimyasallar, virüsler, veya aşırı güneş ışını gibi) nedeniyle hasar görebilir. Kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör dokuları oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir (<http://www.kanser.gov.tr>, Erişim Tarihi: 21 Eylül 2014).

Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında verilere göre, akciğer kanseri ilk sıralarda yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde insidansı 100000' de 71, gelişmekte olan ülkelerde 14' tür. Avrupa birliği ülkelerinde ise 52,5 bulunmuştur. Akciğer kanseri tüm kanserlerin %12-16; kansere bağlı ölümlerin %17,8-28' ini oluşturur. En ileri tedavi yöntemleri uygulansa bile tanı konulduktan sonra tüm akciğer kanserli hastaların ancak %10 ile %15' i beş yıldan fazla yaşayabilmektedir (Alberg ve ark., 2007).

Akciğer kanserinin artışı sigara kullanımına bağlı olarak devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde sigara kullanımında azalma akciğer kanseri görülme sıklığında azaltmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde sigara kullanımında azalma olmaması bilakis artması sonucunda hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser ölümleri içinde önemli yerini korumakta ve belirgin artış gözlenmektedir.

Ülkemizde toplama bakılacak olursa ve erkeklerde en sık görülen kanser tipi yine akciğer kanseridir. Yıllık insidans erkeklerde: 100000' de 66, kadınlarda: 100000' de 8,1' dir. Bu oranlar dikkate alındığında, tüm kanserler içinde erkeklerde birinci sırayı alırken, kadınlarda ise beşinci sıradadır (TC Sağlık Bakanlığı., 2009). Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı bölgelerimizde en yüksek (Akdeniz 41/100000, Ege ve İç Anadolu 39,5/100000) Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerimizde en düşük (sırayla 17,7/100000, 11,7/100000) değerdedir (TC Sağlık Bakanlığı., 1997).

Tümör süpressör genler, hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör süpressör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve apoptozise neden olmaktadır.

Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasındaki ilişki, 1980' li yılların başından beri bilinmektedir (Warnecke ve ark., 2000). O tarihten itibaren, kanser oluşumunda metilasyonun rolünün anlaşılmasında önemli ilerlemeler olmuştur. Bu çalışmalarda temel araştırma konusu, kanser hücrelerinde metilasyonun artıp artmadığı olmuştur. Araştırmalarda elde edilen sonuçlar, metilasyon profilinin, spesifik genlere göre, özellikle promoter bölgelerinde değişebildiğini göstermiştir (Safar ve ark. 2005, 2007, Sato ve ark. 2004).

Çalışmamızda Türkiye' de rutin olarak kullanıma geçmekte olan Multilex Ligation- dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ve bu tekniğe metilasyon spesifitesinin eklendiği metilasyona spesifik MLPA(MS- MLPA) tekniği kullanılarak şimdiye kadar akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş farklı tümör süpressör genler ve onkogenler araştırılmıştır. MLPA, multiplex dozaj analizi yapabilen, PCR temelli, kolay bir yöntemdir. İncelenecek gen bölgelerine spesifik dizayn edilmiş probmix' ler kullanılarak bu genlerde delesyon, amplifikasyon ve metilasyon profilleri kolayca saptanabilir.

Çalışmamızda MLPA yönteminin akciğer kanserlerine özel dizayn edilmiş olduğu Salsa MLPA Probemix 175/294 ve Salsa MLPA ME002 kitleri kullanılarak, akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş genlerin amplifikasyon, delesyon ve metilasyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek veriler sayesinde, Türk populasyonunda küçük hücre dışı akciğer kanserlerinin türlerine göre etiyolojisinde

yer alan genler ve bu genlerdeki değişimler değerlendirilmiştir. Diğer yöntemlere göre, ucuz, kolay ve sadece 20 ng DNA ile çalışılabilen MLPA tekniği avantajlıdır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser ve Genetik

Kanser; Latince’ de yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiş bir kelimedir. Hipokrat; bu tanımı hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek yapmıştır.

Kanser tek bir hastalık olmayıp tümör oluşumuna neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize, neoplazminin kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Malign neoplazmi, kontrolsüz hücre proliferasyonu, komşu hücreleri istila edebilme ve daha uzak bölgelere metastaz yapabilme gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikler “tümör progresyonu” olarak isimlendirilen aşamalardan sonra kazanılır. Anormal hücre birikimi olan neoplazi ise, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelir. Her hücre yaşamı boyunca, hücre siklusuna girer ve mitoz bölünmeye uğrayarak yavru hücrelerini oluşturur. Normal koşullarda her hücrenin belirli bir yaşam süresi vardır. Hücre gelişimi, farklılaşması, yaşlanması ve ölümü belirli bir programda gerçekleşir ve her aşamada farklı gen ürünleri görev alır. Her zaman dokuda çoğalan hücre miktarı ile ölen hücre miktarı arasında, sabit bir oran vardır. Ancak hücrenin normalin dışında çoğalması, buna karşılık ölmesi gereken hücrelerin sonsuz yaşayabilme yeteneği kazanması dengenin bozulmasına ve hücre birikimine neden olur. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım ya da epigenetik olay o genin kodladığı protein ya da polipeptidin üretilmemesi, yanlış üretilmesi ya da normalden az üretilmesi ile sonuçlanır. Kısaca ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar meydana gelir (Geoffey ve ark. 2006, Kumar ve ark. 2003, Nussbaum ve ark. 2005).

Kanserin yüzden fazla değişik türü mevcuttur ve onkolojide neoplazmin, klinik davranışının değerlendirilmesine göre benign ve malign olarak ikiye ayrılır.

Benign tümör, çevredeki dokuya zarar vermeyen, yayılmayan ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınıp, hastanın sağ kalımını etkilemeyen türüdür.

Malign tümörlerin hepsi komşu yapılara invaziv olup, onları harab edebilir. Uzak bölgelere yayılarak (metastaz) ölüme yol açabilir (Uludağ A., 2007).

Benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği güvenilir kriterler bulunmaktadır (William ve ark., 2000). Bu farklar dört ana başlık altında toplanabilir:

1. Diferansiasyon ve Anaplazi: Benign tümörler, iyi diferansiye ve yapıları köken aldıkları doku için tipik iken, malign tümörlerde anaplazi ile diferansiyasyonda kayıp vardır ve yapıları sıklıkla köken aldıkları dokuya göre atipiktir.

2. Büyüme Hızı: Benign tümörler genellikle ilerleyici ve yavaş büyürler. Hatta bazı dönemlerde durabilir veya gerileyebilirler. Mitoz seyrek veya normaldir. Malign tümörlerin ise büyüme hızı kararsızdır. Yavaştan hızlıya doğru değişebilir. Mitoz çok sayıda ve anormal olabilir.

3. Lokal İnvazyon: Benign tümörler, genellikle yapışık ve iticidir. İyi sınırlı kitle, çevre dokulara invaze ve infiltre etmez. Malign tümörler ise, lokal olarak invazedirler. Çevre normal dokuları infiltre eder, bazen yapışık ve itici görülebilirler.

4. Metastaz: Benign tümörlerde yoktur, fakat malign tümörlerde sıklıkla görülür. Daha büyük ve daha az diferansiye, primer tümör daha sık metastaz yapar.

Malign ve benign tümörler tuedikleri hücreye göre sınıflandırılırlar. Kanseler genel olarak üç ana grupta toplanabilir. Bu gruplar, karsinomlar, sarkomlar ve lösemi/lenfomalardır. İnsan kanselerinin yaklaşık %90' ını oluşturan karsinomlar, epitelyum hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kırık ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanselerinin yaklaşık %7' sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir (Geoffey ve ark. 2006, Kumar ve ark. 2003, Nussbaum ve ark. 2005, William ve ark. 2000).

Halen kanser klinikte rastlanılan ciddi hastalıkların başında gelir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında kanserin görüldüğünü, ölümlerin ise yüzde yirmiden fazlasının kanserden kaynaklandığını ve gelişmiş ülkelerin sağlık harcamalarının yaklaşık %10' unun kanser tedavileri için ayrıldığını gösterir. Bu veriler doğrultusunda denilebilir ki kanser tüm dünya üzerinde yapılan çalışmaların başını çekmektedir. Bunun kötü bir açıklaması ise, tedavi edilmediği takdirde kanser ölümle sonuçlanabilmektedir. Bu sonda kaçınmak için erken tanı önemli bir kriterdir. Kansere yatkınlığı yüksek olan bireylerin, kanser gelişmeden önce bu tanıyı alması büyük ölçüde önemlidir.

Kanser başlangıcı ve tümör hücrelerinin bazı önemli özelliklerini aşağıdaki şekilde belirtmek gerekirse:

- ✓ Moleküler hücre biyolojisinin neredeyse her noktasına temas eden hücresel davranıştaki temel bozukluk kanser olarak isimlendirilir ve vücut hücrelerinin pek çoğu kanser hücrelerinin oluşmasına öncülük eder.
- ✓ Kök hücrelerinden ve çoğalma yeteneğinde olan hücrelerden, kanser hücreleri köken alırlar.
- ✓ Kanser hücreleri, normal hücre çoğalması için gerekli olan büyüme faktörlerinin bazılarını gerek duymazlar ve bunların yokluğunda çoğalma yetenekleri vardır. Normal hücre ölüm programlarına karşı koyarlar.
- ✓ Kanser hücreleri çoğunlukla, buldukları dokudan çevre dokulara kadar yayılırlar. Metastatik olarak adlandırılan yayılım, tümör hücrelerinden salgılanan proteazlar ile komşu dokuların ekstraselüler matriksini etkileyerek meydana gelir.
- ✓ Tümör oluşumu, kan damarlarının oluşması anlamına gelen anjiyogeneze gereksinim duyar. Anjiyogenez, tümörlü dokunun gelişmesi için mutlaka gereklidir.
- ✓ Kanser oluşumunun açıklandığı birkaç model vardır. Bunlardan bir tanesi çoklu vuruş hipotezidir. Bu hipoteze göre, kanser oluşumu için mutlaka farklı mutasyonlar gereklidir. Bu mutasyonların, özellikle hücre döngüsünde görevli genlerde meydana geldiği öne sürülmektedir.
- ✓ Somatik hücrelerin çoğunda onkogenik mutasyonlar meydana gelir. Bu mutasyonlar, üreme hücreleri DNA'sını etkilemediğinden dolayı, genetik geçişi söz konusu değildir.
- ✓ Birçok doku tipinden gelişen kanser türlerinde, spesifik tümör süpressör genler ve proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar etkili olmaktadır (Bienz ve ark. 2000, Hesketh ve ark. 1997).

Karsinogenesisiz tümör oluşumunun en önemli basamağıdır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, karsinogenesisiz sürecinde farklı türlerdeki genlerin rol oynadığını göstermiştir. Bu genler:

- ✓ Hücre proliferasyonunda ve hücreler arası sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlayan genler
- ✓ Mitoz hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayan genler
- ✓ Programlanmış hücre ölümünde görev alan elemanları kodlayan genler

- ✓ Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili elemanları kodlayan genler
- ✓ DNA tamir mekanizmasından sorumlu proteinleri kodlayan genler (Nussbaum ve ark., 2005) .

Bugüne kadar kanser oluşum mekanizmalarını araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Literatür taramaları yapıldığında farklı kanser tiplerinin oluşumunda etkili olduğu düşünülen gen gruplarında meydana gelen anomalilerin olduğu görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda şu varsayım doğrulanmaktadır: “ Bir kanserin sporadik olarak bireylerde izlenmesinde ya da herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar edilmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır.” (Nussbaum ve ark., 2005). Kanser türlerinin birçoğunda mutasyonlar tek bir hücrede oluşur ve o hücre bölünerek kanser oluşumuna neden olur. Bunlar arasında daha nadir görülen ise herediter kanser sendromunda görülen durumdur. Bu kanser türünde kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar, germ hücrelerine aktarılır ve buradan vücudun tüm hücrelerine yayılır ve adındanda anlaşılacağı üzere genetik geçişi olan bir durum oluşur.

Oluşum mekanizması ne olursa olsun, kanser oluşumu bir kez başlıyorsa, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA’ da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar toplu bir artış göstererek kanseri yaygınlaştıracaktır (William ve ark., 2000).

2.1.1. Hücre Döngüsü

Hücrelerin çoğunda büyüme döngüsü birbiri ile bağlantılı dört süreçten oluşur:

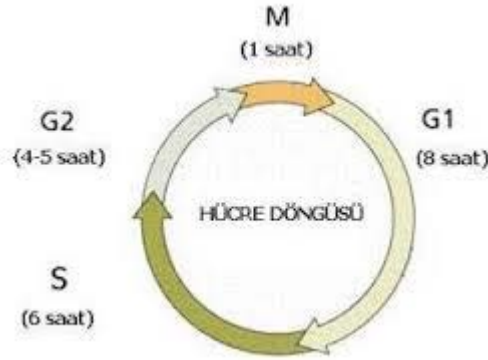
- Hücre büyümesi
- DNA replikasyonu
- Kromozomların kutuplara dağılması
- Hücre bölünmesi

Hücre döngüsünün bu basamakları denetleyici bir sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını düzenlemez aynı zamanda hücre döngüsünün, hücre çoğalmasını kontrol eden hücre-dışı sinyallerle bağlantısını da sağlar. Hücre büyümesi kesintisiz bir süreç gibi görünür fakat DNA sentezi hücre döngüsünün sadece bir evresinde gerçekleşir ve sonra kopyalanmış olan kromozomlar, hücre bölünmesi öncesinde, yavru hücrelere dağıtılır. Hücre döngüsünde sinyallerde bile meydana gelecek problemler, hücre döngüsünü

tamamen etkileyerek, kanser oluşumuna neden olabilir. Bu problemlerin ve meydana geldiği noktaların tespiti, kanser oluşumunun anlaşılmasında önemlidir (Geoffrey ve ark., 2006).

2.1.1.1. Hücre Döngüsünün Basamakları

Kültür ortamında insan lenfositlerinin, yaklaşık her 24 saatte bir bölündüğü gözlemlenmiştir. Hücre döngüsü genel olarak mitoz ve interfaz olarak iki gruba ayrılır. Hücre bölünmesi (sitokinez) ile son bulan mitoz döngüsü, yalnızca yaklaşık bir saat sürerken, hücre döngüsünün neredeyse %95' ini interfaz kısmı oluşturur. Hücre interfaz safhasında iken, kromozomlar yoğunluğunu kaybederek nükleus içine yayılırlar. Bu süreçte nükleus homojen görünür. İnterfaz safhası, hücre büyümesi ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği, bölünmeye hazırlık safhasıdır.



Şekil 1. Hücre Döngüsü

DNA sentezi ökaryotik hücrelerde hücre döngüsünün sentez evresi olarak adlandırılan S fazında meydana gelir. S fazından önce ve sonra birer zaman aralığı oluşur ki bu boşluk Gap diye adlandırılır. Bundan dolayı hücre döngüsü:

- ✓ G1
- ✓ S
- ✓ G2
- ✓ M olmak üzere dört farklı evreden oluşur.

Bu evrelerden G1, S ve G2 evrelerinin hepsine birden “ interfaz”adı verilir. İnterfaz genel anlamda mitoz hazırlık evresidir. Fibroblastlar gibi birçok bölünmeyen hücre S evresinden hemen önce yeterli miktarda DNA sentezlenmemiş ise hücre döngüsünü durdurarak dinlenme durumuna geçerler. Bu tip hücrelere G0

durumundaki hücre denilir. G0 evresi, birkaç gün, birkaç hafta hatta süresiz olarak devam edebilir (William ve ark. 2000, Güneş ve ark. 2003).

2.1.1.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücrelerin bölünme döngülerini tamamlayıp, işlevlerini devam ettirmeleri hücre içi sinyallerle birlikte çevresinde yer alan dış uyarılara bağlıdır. Hücre döngüsü olayları sırasında; hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve mitoz gibi birbirinden farklı olaylar kontrol edilmektedir. Bu kontrol edilme yerlerine “ kontrol noktaları” ismi verilir. Hücrelerin hemen hemen hepsinde tanımlanmış olan en önemli kontrol noktalarından biri G1 evresinde görülür. Bu kontrol noktası G1’ den S evresine geçişi kontrol eder, START olarak isimlendirilir. Tüm hücreler genelde START noktasını geçerek S evresine girerler. START noktası dış uyarılar tarafından kontrol edilir. Bu nokta, döngünün devam etmesine karar verme noktasıdır ve aynı zamanda DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi tarafından kontrol edilen, hücre büyümesi noktasıdır.

Hücre döngüsü kontrol noktalarının belirli görevleri vardır. Bunlar; Tamamlanmamış veya hasarlı kromozomların replikasyonunu ve bu hasarlı kromozomların yavru hücrelere geçişini engellemektir. Kısaca bu kontrol noktaları, kendinden bir önceki evrede eksiklik varsa, o eksiklik kapanmadan bir sonraki evreye geçişi durdurur. En önemlisi ise, bu noktaların, replike olmamış ya da hasarlı DNA’ ya duyarlı olmalarıdır. Hücre döngüsü boyunca belirlenmiş 4 ana kontrol noktası mevcuttur:

- ✓ **G1 kontrol noktası:** Hasarlı bir DNA var ise döngünün G1 evresinde durmasını sağlar.
- ✓ **G2 kontrol noktası:** Eğer DNA replikasyonunda bir hata olur ve ortamda replike olmamış DNA bulunursa, döngünün G2’ de durmasını ve G2 kontrol noktası ile S evresi tamamlanmadan, M evresine geçişini engeller. Bu durumda ise, hücreler, genom tamamen replike oluncaya kadar G2’ de kalırlar. Replikasyon tamamen gerçekleştikten sonra, G2’ deki bu inhibisyon ortadan kalkarak hücre mitozu geçer ve bu replike olmuş kromozomları yavru hücrelere aktarır. Bu nokta sadece replikasyonla ilgili değildir. Bunun yanında DNA hasarını da algılayan ve hasarın giderilmesi için gerekli zamanı tanıyan önemli bir noktadır.

✓ **S kontrol noktası:** Hasarlı DNA' nın replike olmadan onarılması için DNA bütünlüğünün sürekli olarak izlemeye alındığı noktadır. DNA replikasyonu sırasında yanlış baz eşleşmesi gibi oluşabilecek hataları bulur ve onarır.

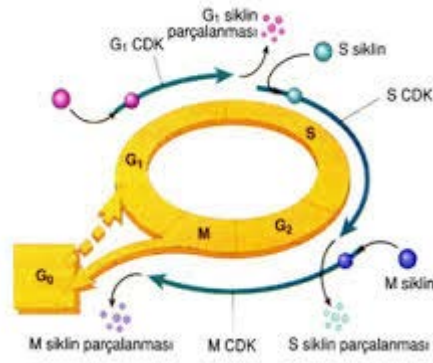
✓ **M kontrol noktası:** Mitoz bölünme esnasında, kromozomların eksik dizilmesi gibi hataları algılayıp, bölünmenin metafaz evresinde durmasını sağlar. Bu şekilde yanlış dizilmiş kromozomların yavru hücrelere geçişi engellenir (Geoffey ve ark., 2006).

2.1.1.3. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Mitoz bölünmesinde içinde olduğu hücre döngüsü, bütün ökaryot hücrelerde aynıdır. Birçok farklı organizmada hücrenin kendini eşlemesine yol açan olayların benzerliği, hücre döngüsünün evrim boyunca korunmuş bir genetik program tarafından yönetildiğini ve bu nedenle genetik olarak düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Bu düzenlenmenin ortadan kalkması, kanserleşmeyi karakterize eden kontrolsüz hücre bölünmesine yol açtığı için, genlerin hücre döngüsünü nasıl düzenlediği merak konusu olmuştur.

Mutasyonların çoğu, etkisini hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında gösterir. Günümüzde insanlarda ve diğer organizmalarda görülen bu mutasyonlar, cdc mutasyonları (cell division cycle mutations; hücre bölünmesi döngüsü mutasyonları) olarak isimlendirilir.

Bu genlerin birçoğunun ürünü, cdc kinazlar adı verilen enzimlerdir ve bu enzimler, diğer proteinlere fosfat eklerler. Cdc kinazlar, ana kontrol molekülleri olarak işlev görürler. Bu görevlerini siklin adı verilen proteinlerle birlikte gerçekleştirirler. Bu kinazlar siklinleri fosforile ederek bunların hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki hücre döngüsünü düzenleyen aktivitelerini etkiler. Bir Cdc kinaz, bir siklinle birlikte çalıştığında, buna Cdk protein (Cyclin- dependent kinase protein; siklin bağımlı kinaz proteini) denir (William ve ark., 2003).



Şekil 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları.

Bu proteinler, DNA hasarını algılar, sinyal yollarını uyarır, DNA onarımını ve programlı durumlarda hücre ölümünü aktive eder. Bu algılayıcı proteinlerin doğrudan hedefi, ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) ve ATR (ATM and Rad3-related) olarak simgelenen, birbiriyle ilişkili protein kinazlardır. Bunlar DNA hasarına cevap olarak aktifleşirler. Bir kez aktifleşen, ATM ve ATR sırasıyla Chk2 (Checkpoint kinase 2) ve Chk1 (Checkpoint kinase 1) kinazları fosfatlayarak aktive ederler. Aktifleşen Chk1 ve Chk2, hücre döngüsünü düzenleyen sistemin bileşenlerini fosfatlayarak, hücre döngüsünü duraksatırlar (Geoffrey ve ark., 2006).

G1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, p53 adı verilen proteinin etkisi ile gelişir. Fosforillenme, aksi halde süratle yıkılacak olan p53'ü kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızla artışa neden olur. p53 proteini transkripsiyon faktörüdür. Ekspresyon artışı, hücre döngüsünü duraksatacak hedef genlerin uyarılmasına yol açar. Birçok kanser türünde, p53'ü kodlayan gen incelenmiş ve sıklıkla mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonlarla, p53 proteininin fonksiyon kaybı, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G1 evresinde durmayı engeller. Hasarlı DNA böylelikle replikasyonuna devam eder ve onarılması mümkün olmadan yavru hücrelere aktarılır. p53 genindeki mutasyonlar insan kanserlerinde görülen en yaygın kanser olarak bildirilmiştir (Taşdemir Ş., 2010).

MPF: Cdc2 ve Siklin Dimeri: Bir sitoplazmik faktörün, hormon uygulanmış oositlerde, G2' den M' ye geçişini uyardığı deneysel olarak gösterilmiştir. Oositlerin mayoz bölünmeye geçişi genel olarak yumurtanın olgunlaşması kabul edildiğinden, bu sitoplazmik faktöre "olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF)" ismi verilmiştir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda, MPF aktivitesinin, oositlerin sadece mayoz girişiyile

sınırlı olmadığı gösterilmiştir. MPF somatik hücrelerde de bulunur ve hücrelerin, mitotik döngüsünün M evresine girişini uyarır. Siklin B sentezi, hücre döngüsünün S evresinde başlar. Sentezlenen siklin B, Cdc2 ile kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks, hücre döngüsünün S ve G2 evresi boyunca görev yapar. Bu kompleksin oluşması esnasında Cdc2, düzenleyici olan iki noktadan fosforlanır. İlk fosforilasyona, Cdc2' nin kinaz aktivitesini gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç vardır. İkinci fosforilasyonda ise, Cdc2' nin aktivitesi engellenir ve Cdc2/siklin B kompleksinin, S ve G2 evreleri boyunca inaktif olarak bir arada kalmaları sağlanır. Daha sonra Cdc25 olarak isimlendirilen bir protein fosfataz tarafından threonin-14 ve tirozin-15' in defosforile edilmesi ile Cdc2/siklin B kompleksi aktifleşir. Bunun sonucunda, G2 evresinden M evresine geçiş gerçekleşir. Cdc2 protein kinazın aktifleşmesi ile hedef proteinler fosforlanabilir. Bu şekilde M evresi olayları başlamış olur. Aynı zamanda Cdc2' nin aktivitesi siklin B' nin dağılmasını sağlar. Siklin B' nin bu proteolitik dağılımı Cdc2' yi inaktive eder ve bunun sayesinde mitozun sonlanıp sitokinezinde tamamlanmasıyla interfaza dönmesini sağlar (Güneş HV., 2003).

Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Aileleri: Cdc2 ve siklin B benzer proteinlerdir. Cyclin Dependant Kinaz (Cdk) ailesinin bu üyeleri, hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca ilerlemeyi yönlendirmek için özgün siklinlerle bağlanırlar. Cdk 4 ve 6' nın D-tipi siklinlerle (siklin D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler, G1' de restriksiyon noktasından geçişte önemli bir role sahiptir. Siklin E, G1' in ileriki evresinde eksprese edilir ve Cdk2/siklin E kompleksi G1' den S' ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. Cdk2' nin siklin A ile yaptığı kompleksler, hücrelerin S evresi boyunca, ilerlemesi için işlev görür. G2' den M' ye geçiş ise Cdc 2' nin daha sonra siklin B ile oluşturduğu kompleks tarafından sağlanır (Geoffey MC ve ark., 2006).

Büyüme Faktörleri ve D-Tipi Siklinler: Büyüme faktörlerinin yokluğunda, hücreler, restriksiyon noktasını geçemezler. Bu noktaları geçemeyen hücreler durağan hale gelirler. Genellikle, G0 olarak isimlendirilen dinlenme durumuna geçerler ve orada kalırlar. Bu durumdan çıkmaları ve tekrar hücre döngüsüne girmeleri ancak büyüme faktörü uyarıları sayesinde gerçekleşir. Büyüme faktörü uyarısına bağlı olarak siklin D sentezi artmakta ve büyüme faktörü ortamda olduğu

sürece siklin D sentezi de devam etmektedir. Siklin D, büyüme faktörü uyarısının hedefi olduğundan siklin D düzenlenmesindeki bir defekt, kanser hücrelerinin bir karakteristiği olan büyüme faktörü düzenlenmesinin bozulmasına neden olur. Hücre döngüsündeki bu defekt sonucu bazı insan kanserlerinin arttığı bulunmuştur (Taşdemir Ş., 2010).

Hücre Döngüsü İnhibitörleri: Hücre çoğalması sadece büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmez aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesini baskılayan bir grup sinyal tarafından da kontrol edilir.

G1 kontrol noktasında, DNA hasarına cevap olarak p53 proteini aracılığı ile hücre döngüsünün duraklatılması, Cdk inhibitörlerinin etkisine uygun bir örnektir. Transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev gören p53 proteini, kısmen de olsa, Cdk inhibitörü p21' in ekspresyonunu uyarır ve p21 proteini birçok Cdk/siklin kompleksini inhibe eder. p53 tarafından uyarılması, DNA hasarını takiben p53' e bağlı hücre döngüsü duraklatılmasının mekanizmalarından biridir. Hücre döngüsünü S ve G2 noktalarında kontrol etmek için, replike olmamış ya da hasara uğramış DNA' lara yanıt olarak hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyen, farklı bir moleküler mekanizma kullanılır. Bu kontrol noktalarında hücre döngüsünün duraklatılması Chk1 ve Chk2 protein kinazlar tarafından sağlanır. Chk1 ve Chk2, Cdc25 ailesinin diğer bir üyesi olan Cdc25A'yı fosfatlar. Cdc25A, S evresinin başlatılması ve devamından sorumlu olan Cdk2, siklin A veya E komplekslerini defosforile ve aktive eder. Bu, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün duraklatılması ile sonuçlanır (Geoffey ve ark. 2006, Güneş HV. 2003).

2.1.2. Kanserin Genetik Yapısı

Hücre bölünmesi ve ölümünü kontrol eden çeşitli genler vardır. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden bu genlerin mutasyona uğramasının kanser oluşumunda etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Birçok kanser türünde, kanser gelişimi mutasyonların tek bir somatik hücrede oluşması ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açması şeklinde görülürken, daha nadir olarak ise kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun bütün hücrelerinde yer almaktadır. Bu mekanizma herediter kanser sendromlarında açıkça görülmektedir. Kanserde etkili olduğu düşünülen tüm genler

birlikte değerlendirildiğinde, 3 ana grup altında toplanırlar (William SK. 2000, Albert ve ark. 1994).

- Onkogenler
- Tümör süpressör genler
- DNA tamir genleri

Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogen adı verilen normal genlerin mutant allelleridir ve telomerazları kodlayan veya apoptozisi bloke eden genler de olabilirler.

Tümör süpressör genler, hücre büyümesini düzenleyip tümör gelişimini durduran genlerdir. Tümör süpressör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz ve düzensiz hücre bölünmesine ve defektif apoptozise neden olmaktadır.

Kanserdeki mutasyonların diğer mutasyonlardan farkı, mutasyonlarının güçlü bir şekilde hücresel proliferasyon ve uzun hücresel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmasıdır. Kanser hücresi fenotipik olarak kontrolsüz ve aşırı proliferasyon özelliğine sahiptir ve tek bir mutant hücre yaşamı tehdit eden bir hastalık gelişimine yol açmaktadır (Nussbaum ve ark., 2005).

2.1.2.1. Onkogenler

Onkogenler, fonksiyon veya ekspresyon değişimi sonucunda hücre bölünmesi ve proliferasyonunun anormal uyarımına yol açan genlerdir. Bunlardaki aktive edici mutasyon, onkogenin kendisinde, onun regülatör elementlerinde yada onkogenin genomik kopya sayısında olabilir.

Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere “protoonkogen” ismi verilir. Bu genler (src, ras ve raf gibi), hücrede önemli rol oynar ve genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görevlidirler. Onkogenler ise, bu protoonkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant (aktif) şekilleridir. Bu genlerde oluşacak mutasyon sonrasında, onkogenler anormal hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine neden olurlar.

Retroviral genoma yerleşen onkogen, birçok özelliği ile hücresel protoonkogeninden farklıdır. Öncelikle, viral onkogenin transkripsiyonu protoonkogenin transkripsiyonunu düzenleyen normal dizilerde değil, viral promotör ve güçlendirici dizilerin etkisinde gerçekleşir. Bu yüzden onkogenler

protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazı durumlarda ise olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar.

Onkogenler, yapısal ve işlevsel açılardan farklılıklar gösteren proteinler kodlarlar. Onkogenlerin çoğu amino ucunda viral diziler taşıyan proteinlerin sentezine neden olurlar ve bu tür proteinlerin oluşmasına neden olan rekombinasyon olayları çoğunlukla, protoonkogenlerin virüslere geçişi sırasında gerçekleşir ki bu işlem sırasında protoonkogenin hem amino hem de karboksil ucu sıklıkla delesyona uğrar. Bu delesyonlar, protoonkogenin aktivitesini düzenleyen, düzenleyici bölgelerin kaybına, bu ise aktivitesi kontrol edilemeyen onkogen proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir (Nussbaum ve ark. 2005, William SK. 2000).

Bugüne kadar seksen civarında protoonkogen saptanmış ve tanımlanmış olup, her birinin onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynadığı araştırmalarca ortaya konulmuştur. Protoonkogenlerin büyük bir kısmı, vücutta hücrelerin davranışlarını düzenleyen mekanizmalarda görev alan elemanları kodlarlar. Hücrenin komşusundan gelen sinyaller, hücreyi bölünmeye, farklılaşmaya ya da ölmeye yönlendirir. Protoonkogenler, ekstrasellüler ortamdan gelen sinyalleri alıp, hücre içerisinde bu sinyalin, nükleusta DNA'ya kadar ulaşmasını sağlayan olaylar zincirinde rol alan proteinleri kodlarlar. Protoonkogen ürün listesine bakıldığında, hücre sinyal ileti sisteminde görev alan her tip proteini içermektedir. Başkalaşım bu genlerin fonksiyonlarını değiştirir, hücre gereksinimi olmasa bile hücrenin bu sinyalleri almasına ve hücre bölünmesinin devam etmesine neden olur (Alberts ve ark. 1994, Köktürk ve ark. 2003).

Nokta mutasyonları, protoonkogenlerin onkogene dönüşme şekillerinden biridir. Birçok kanser türünde, kromozom yapısında, translokasyon, duplikasyon (amplifikasyon) ve delesyon gibi anormallikler görülür. Kromozom translokasyonlarının neden olduğu gen düzenlemeleri, sıklıkla onkogenlerin ortaya çıkmasına yol açar. Lösemi ve lenfoma gibi hastalıklarda sıklıkla gözlenen ve özellikle kromozom translokasyonları başta olmak üzere diğer kromozomların yeniden düzenlenmeleri solid tümörlerde de rapor edilmiştir (Nussbaum ve ark. 2005, Alberts ve ark. 1994, Sasaki ve ark. 2003).

Kromozom translokasyonu sonucu oluşan onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanan ilk örnek c-myc geninin, antikor üreten B lenfositlerinin tümörü olan

insan Burkitt lenfoması ve bunun fare plazmasitomlarındaki rolüdür. Burkitt lenfomada kromozom 8q' da lokalize c-myc protoonkogeni ile kromozom 14q' da lokalize IgH genleri arasındaki karşılıklı parça değişimi sonucunda c-myc immüoglobulin lokusuna dahil olmakta ve burada kontrolsüz şekilde ürün oluşturmaktadır (William SK. 2000, Cooper M. 1997, Franks ve ark. 1998). C-myc geni ise, büyüme faktör uyarısı durumunda aktif hale gelen bir transkripsiyon faktörüdür. Kontrolsüz ürün oluşturması hücre proliferasyonunu yönlendirmesi için yeterli olmakta ve tümör gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Nussbaum ve ark., 2005).

Bazı protoonkogenlerin translokasyonu da genlerin protein kodlayan bölgesinde değişiklikler ve anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Bu tür translokasyonların en tipik örneği, kronik myeloid lösemide, kromozom 9q2' de lokalize olan abl protoonkogenin kromozom 22q' da lokalize bcr geni ile translokasyonudur (Nussbaum ve ark. 2005, Alberts ve ark. 1994, Cooper M. 1997). Kronik myeloid lösemi gelişiminin %90 kadarından sorumlu olan bu anomali sonucunda oluşan bcr/abl füzyon proteininde, abl protoonkogen proteinin normal amino terminalinin bcr aminoasit sekansları ile değişimi söz konusudur ve bunun sonucunda bcr/abl füzyon proteini sentezlenir (Gelehrler ve ark., 1998). Abl protoonkogeni onkogenik aktivite kazanmıştır (Nussbaum ve ark. 2005, William SK. 2000, Alberts ve ark. 1994, Cooper M. 1997).

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktive olmasında etkili diğer bir mekanizma genlerin hızlı ve yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Gen amplifikasyonu, normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha sık gözlenir. Pek çok tümörün progresyonunda, tümörün daha hızlı gelişmesi ve malign yapısının artmasında onkogen amplifikasyonu önemli rol oynar. Bu gruba en iyi örnek nöroblastomda N-myc; meme ve over karsinomlarında ise erbB-2 onkogen amplifikasyonlarıdır. Amplifiye N-myc kopyaları hızla gelişen agresif tümörlerde sıklıkla gözlenir ki bu da N-myc' nin nöroblastomanın malign özelliğinin artmasında önemli bir rolü olduğunu ifade eder (Nussbaum ve ark. 2005, Alberts ve ark. 1994).

2.1.2.2. Tümör Süpressör Genler

Bir diğer mekanizma ise tümör süpressör genlerin inaktivasyonudur. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerle anormal hücre

çoğalmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasının kontrolünde bu mekanizmanın tam tersi bir yolu simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Oluşan birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle, hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücrelerinde normal çoğalma başlar.

Tümör süpressör genlerin aktivitesine ilişkin ilk bilgiler Henry Haris ve arkadaşları tarafından 1969 yılında başlatılan somatik hücre hibridizasyon deneylerinden elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile birleşmesi sonucu oluşan hibrit hücrelerde her iki ebeveyne ait kromozomlar vardır. Ancak çoğu hücre deney hayvanlarında herhangi bir tümör oluşturmamıştır. Bunun nedeni, normal hücreden köken alan genlerin tümör gelişimini baskılamasıdır (Cooper M., 1997). Tümör süpressör genlerin tümör gelişimindeki mekanizmalara ilişkin bilgiler 1971 yılında Knudson tarafından ortaya atılmıştır. Bugün “ Knudson hipotezi” veya “ iki vuruş” hipotezi olarak ifade edilen bu görüşte tümör süpressör genin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör süpressör gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder (Alberts ve ark., 1994).

2.1.2.3. DNA Tamir Genleri

DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğundan onun yapısındaki değişiklikler, diğer hücre bileşenleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA’ ya katılmasından dolayı oluşur. Ayrıca DNA’ da spontan veya kimyasal ajanlara ve radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar (Cooper M. 1997, Franks ve ark. 1997). Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler hasarlı olan DNA’ yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadırlar. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır (Cooper M., 1997):

1. DNA hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi
2. Hasarlı olan bazların DNA’ dan çıkartılması

Ancak bu gruba dahil olan genlerde oluşacak değişimler, fonksiyonel ürün sentezlenmesini engellediğinden DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır. Bu durumda karsinogenez sürecine giriş başlamış olmaktadır. Örneğin

kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser gelişiminin %50 kadarındaki moleküler patoloji, yanlış eşleşme tamirinden sorumlu genlerdeki başkalaşımın nedeniyle tamirinin gerçekleşmemesinden kaynaklanır (Cooper M., 1997).

2.1.2.4. Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi

Aktivatör ve baskılayıcıların ikisi de, ökaryotlarda transkripsiyonu, kromatin yapısındaki değişiklikler ile düzenlerler. Ökaryotik DNA nükleus içerisinde çıplak DNA olarak bulunmaz, histonlarla sıkıca bağlıdır. Kromatinin temel yapısal birimi ise nükleozomdur. Nükleozom, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer adet içeren molekülün etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA ile, nükleozom çekirdek partikülüne eklenen, DNA'ya bağlı bir histon olan H1 molekülünden oluşur (Geoffey ve ark. 2000, Nussbaum ve ark. 2005). Kromatin daha sonra, büyük DNA ilmikleri oluşturmak üzere, üst düzey dolanmalarla yoğunlaşır. Ökaryotik DNA'nın kromatine paketlenmesi, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilme koşullarını önemli ölçüde etkilediğinden, kromatin yapısı, ökaryot hücrelerde gen ekspresyonunu etkileyen önemli bir faktördür. Aktif olarak transkribe edilen genler, büyük olasılıkla kromatin iplik yapısındaki göreceli olarak daha az yoğun kromatinde bulunur. Bununla birlikte, aktif olarak kopyalanan genler, nükleozomda paketlenmiş olarak histonlara bağlı kaldığından, transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz, kromatin ile etkileşimde çıplak DNA'ya göre daha fazla problemle karşılaşılırlar. DNA'nın nükleozom çekirdek partikülü etrafında sıkıca dolanmış olması hem transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmesini hem de RNA polimerazın kromatin kaplı kalıptan transkripsiyonunu etkilediği için, transkripsiyon için başlı başına önemli bir engeldir (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005). Birçok hücre tipinde, histon asetillenmesi, transkripsiyonel olarak aktif kromatinle alakalıdır. Çekirdek histonlar, iki işlevsel bölge içerirler; biri histon- kıvrım bölgesi olup, diğer histonlarla etkileşimde ve DNA'nın nükleozom çekirdek partikülünün çevresinde dolanmasında görevlidir ve diğeri, amino ucu kuyruk bölgesidir ki nükleozomdan dışarı uzar. Amino ucu kuyruk bölgeleri lizince zengindir ve özgün lizinlerin asetillenmesiyle değiştirilebilir. Asetillenme, histonların net pozitif yükünü azaltır. Böylece hem DNA'ya bağlanmasını hem de diğer proteinlerle etkileşimini zayıflatabilir. Ayrıca histon asetillenmesinin, nükleozomal DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırdığı görülmüştür. Bu histonların

asetillenmesinin DNA'ya bağlanan proteinlerin, kromatine ulaşılabilirliğini artırdığının belirteçidir. Histonlar sadece asetillenerek değil, serin birimlerinin bağlanması, lizin ve arjininin metillenmesi ve lizinlere ubükitin eklenmesiyle de modifiye olurlar (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005).

2.2. Akciğer Kanseri

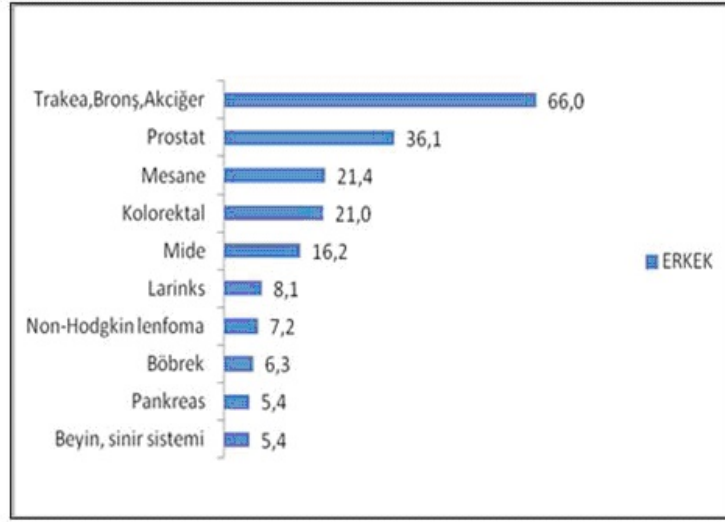
2.2.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında, akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde insidansı 100000' de 71, gelişmekte olan ülkelerde 14' tür. Avrupa birliği ülkelerinde ise 52,5 bulunmuştur. Akciğer kanseri tüm kanserlerin %12-16; kansere bağlı ölümlerin %17,8-28' ini oluşturur. En ileri tedavi yöntemleri uygulanmasına rağmen, tanı konulduktan sonra tüm akciğer kanserli hastaların ancak %10 ile %15' i beş yıldan fazla yaşayabilmektedir (Alberg ve ark., 2007).

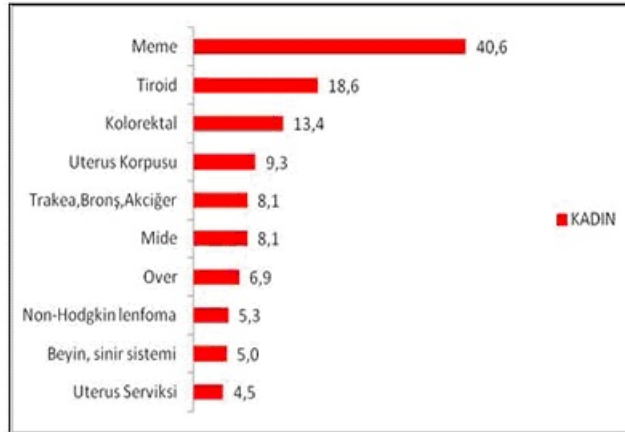
Ülkemizde toplamda ve erkeklerde en sık görülen kanser tipi yine akciğer kanseridir. Yıllık insidans erkeklerde 100000' de 66, kadınlarda 100000' de 8,1' dir. Bu oranlar dikkate alındığında, tüm kanserler içinde erkeklerde birinci sırayı alırken, kadınlarda ise beşinci sıradadır (TC Sağlık Bakanlığı., 2009). Sağlık Bakanlığı verilerine göre akciğer kanseri sıklığı batı bölgelerimizde en yüksek (Akdeniz 41/100000, Ege ve İç Anadolu 39,5/100000) Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerimizde en düşük (sırayla 17.7/100000, 11.7/100000) değerdedir (TC Sağlık Bakanlığı., 1997).

Histopatolojik olarak Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya' da en sık adenokanser saptanırken, Asya ülkelerinde skuamöz hücreli kanser hala en sık kanser tipidir (Spiro ve ark., 2002). Ülkemizde ise en sık skuamöz hücreli kanser (yaklaşık %45) görülmekte, bunu benzer oranla (yaklaşık %20) küçük hücreli kanser ve adenokanser izlemektedir. Büyük hücreli kanser %2 oranıyla en az görülen kanser tipidir (Göksel ve ark., 2002). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesinin raporuna göre, 1996 yılında tüm akciğer kanserleri içinde skuamöz hücreli karsinom en sık görülen histopatolojik tip olarak rapor edilmiştir (Kanser bildirimlerinin değerlendirilmesi. 1997, Yurdakul ve ark. 2002). Yurdakul ve arkadaşlarının (2002) yaptığı 2216 akciğer kanseri olgusu içeren çalışmada skuamöz hücreli karsinom %40,5' lik oranla en sık görülen histopatolojik tip iken, ikinci

sırada adenokarsinom (%25,6), üçüncü sırada küçük hücreli karsinom (%15,5) gelmektedir.



Şekil 3. 2009 Yılı Erkeklerde Kanser İnsidansları (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).



Şekil 4. 2009 Yılı Kadınlarda Kanser İnsidansları (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

Akciğer kanseri etyolojisinde çok sayıda faktör rol oynamaktadır. Sigara, hava kirliliği gibi çevresel faktörler; mesleki karsinojenler, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları; genetik ve immünolojik faktörler başlıca etiyolojik faktörlerdendir (Alberg ve ark., 2007). Sigara akciğer kanserli hastaların %85-94'ünde, kanser gelişiminden sorumlu etyolojik faktördür. Sigara içenlerde içmeyenlere göre, akciğer kanseri gelişme riski 24-36 kat daha fazladır. Pasif sigara içiminde ise bu risk %3,5' tir. Gelişmiş ülkelerde sigara içimi prevalansı kadınlarda %20-40, erkeklerde %30-40 iken gelişmekte olan ülkelere bu oranlar sırasıyla %2-10 ve

%40-60' tır (Savaş ve ark., 2006). Dünya genelinde ise erkeklerde %47-52, kadınlarda %10-12 sıklıkta sigara kullanımı olduğu tahmin edilmektedir. Erkekler kadınlara göre sigara içmeye daha küçük yaşlarda başlamakta ve daha uzun süreli sigara alışkanlığına sahiptirler. Son zamanlarda yapılan olgu çalışmaları, günlük sigara tüketimi ve yaş faktörü göz önünde bulundurulmadığında, sigara içen kadınlarda akciğer kanseri gelişme riskinin erkeklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Spiro ve ark., 2002). Türkiye' de ise sigara içme prevalansı, kadınlarda %24, erkeklerde %63' tür. Toplumumuzun büyük kısmını kapsayan yüksek sigara tüketimi göz önüne alındığında, günümüzde, eğer gerekli önlemler alınmazsa yakın gelecekte bir akciğer kanseri epidemisi ile karşı karşıya olduğumuzu söylemek yanlış olmaz (Savaş ve ark., 2006).

Asbest, kadmiyum, nikel, krom gibi mesleki etkenler ve radyasyon akciğer kanseri riskini artırır. Asbest maruziyetinde bu risk 5 iken, sigara ile birlikte olduğunda risk 50-100 kat artar. Mesleki radona maruz kalındığında risk 20 kat artmaktadır. Tütün kullanımıyla beraber bu artış daha fazladır. Ev içi radon maruziyetinin akciğer kanserlerinin %10' unun nedeni olduğu tahmin edilmektedir (Savaş ve ark., 2006).

Tüberküloz, bronşektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, interstisyel akciğer hastalıkları gibi akciğerde skar bırakan hastalıklarda, skar dokusunun kanser gelişimine zemin oluşturduğu ve akciğer tüberkülozu geçiren olgularda akciğer kanseri gelişme riskinin sekiz kat fazla olduğu belirtilmektedir (Kreuzer ve ark., 2002). Toraks Derneği- Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu çalışmasında olguların %0,3' ünde idiyopatik pulmoner fibrozis ve %2,9' unda akciğer tüberkülozuna ikincil gelişen fibrotik skar dokusu saptanmıştır (Göksel ve ark., 2002). Kanserli hastaların birinci derece yakınlarında akciğer kanseri riski 2,4 kat artmaktadır. Suçlanan genetik faktörlerden biri olan P-450 enzim sisteminde yer alan aril hidrokarbon hidroksilaz enziminin artmış aktivitesi akciğer kanseri riskini sekiz kat artırır (Savaş ve ark., 2006).

2.2.2. Akciğer Kanseri Belirtileri

Akciğer kanseri başlangıçta pek özel olmayan bir grup genel şikayetlerle birlikte başlamaktadır. En basit bir soğuk algınlığı ve yorgunlukta da görülebilen bu şikayetlere çok defa önem verilmemektedir. Halbu ki, erken tanı konulan, uygun ve

gerekli cerrahi tedavi yapılan hastalarda beş yıllık yaşama oranları %70-80 düzeylerine çıkabilmektedir. Hastalığın belirtilerinin iyi bilinmesi erken tanı açısından yarar sağlamaktadır. En sık görülen akciğer kanseri belirtileri:

- Bitmek bilmeyen ve zamanla daha kötüye giden öksürük
- Kalıcı göğüs ağrısı
- Kan tükürmek
- Nefes darlığı
- Hırıltılı nefes alıp-vermek
- Sık sık zatürre, bronşit gibi hastalıklara yakalanması ve geçmemesi
- Boyun ve yüzde şişkinlik
- İştahsızlık ve kilo kaybı
- Yorgunluk

Akciğer kanserinin akciğer dışı belirtileri, tümörün diğer organlara metastazlarına bağlı olabilir ve aynı zamanda tümörden salınan bazı immünolojik ve hormonal maddelere de bağlıdır. Metastaz belirtileri organa özgü olup, örneğin kemik metastazlarında ağrı, beyin metastazlarında bilinç bozukluğu, kasılmalarla seyreden nöbet, görme bozuklukları olabilir. Metastaz belirtilerinin dışında iştahsızlık, kilo kaybı, kuvvet kaybı, halsizlik, ateş gibi şikayetler olguların birçoğunda görülebilir. Ayrıca özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde, tümörden salınan bazı hormonal maddelere bağlı olarak parmaklarda çomaklaşma, deri lezyonları, nörolojik tablolar, kan tablosunda bozulma gibi bulgular olabilir (Tepeli E., 2007).

2.2.3. Akciğer Kanserinin Tipleri

Primer akciğer tümörlerinin %95' i bronşial epitelden kaynaklanır (bronkojenik karsinomlar). Kalan %5' i içinde bronşial karsinoidler, mezoteliomlar, bronşial gland neoplazmları, mezenkimal malignensiler (fibrosarkomlar, leiomyomlar), lenfomalar ve birkaç benign lezyon bulunur. En sık görülen benign lezyon küçük (3-4 cm), küresel hamortamlardır. Başlıca dört histolojik tipte bronkojenik karsinoma vardır. Bunlar:

1. Squamöz hücreli
2. Adenokarsinoma
3. Büyük hücreli indifferansiye karsinoma

4. Küçük hücreli karsinoma.

Günümüzde, tedavi açısından değerlendirme yapılırken ilk 3 tip bir kategoriye sokulup “ Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinomu” (KHDAK) diye adlandırılır. Bu şekilde “ Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu” (KHAK) bu gruptan ayrılmış olur (Kumar ve ark., 2003).

2.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Erkeklerde kadınlara oranla daha sık olup, sigara içimi ile çok yakın ilgileri vardır. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitleler olup, hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Bu kanserler, küçük, oval- yuvarlak, lenfosit benzeri ve çok mitoz gösteren hücrelerden meydana gelmiştir. Bu klasik yulaf hücreli (oat cell) kanserdir. KHAK’ ler hızlı büyüyen, geniş infiltrasyon yapan ve erken yayılan lezyonlardır ve nadiren rezekte edilebilir durumda yakalanırlar. Bu nedenle hemen her zaman kombine radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilirler. İki yıllık sağ kalım oranı %5-8 dolayındadır (Kumar ve ark. 2003, Uludağ A. 2007).

2.2.3.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Squamöz hücreli karsinoma, özellikle sigara içen erkeklerde daha sık görülmektedir. Büyük bronşların santralinden çıkmaya meyillidir. Lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılırlar. Squamöz karsinoma, bronş epitelinde yıllar önce başlayan bir metaplazi veya displazi izleyen in-sitü karsinomdan sonra ortaya çıkar. Squamöz hücreli karsinomlar, metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan semptomatik kitle yaptıklarından, diğer tiplere göre hafifçe daha iyi bir prognoza sahiptir. Tanı konulduğunda genellikle cerrahi olarak çıkarılabilir durumdadırlar (Uludağ A., 2007).

Adenokarsinomlar, tüm KHDAK içinde %30-35 oranında görülmektedir. Erkek ve kadında görülme sıklığı eşittir. Santral yerleşimli olabileceği gibi, çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Periferik akciğer skarları ile ilgili olarak ortaya çıkar. Adenokarsinomlar yavaş büyürler ve daha küçük kitle yaparlar. Ayrıca diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Bronchio alveolar karsinoma (BAC), özel bir adenokarsinoma türüdür. İki çeşidi vardır. BAC’ ın yarısından azı multifokal müsinöz tümörlerdir. Bazen tek başlarına kitle yaparlar, bazen de

birbirleri ile birleşen kitleler oluştururlar. BAC' ın prognozu diğer bronkojenik karsinoma göre daha iyidir.

Büyük hücreli karsinomlar; sitolojik diferansiyasyon göstermeyen belki de squamöz veya glandüler neoplazmların, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar, indifferansiye şeklidir. Tümör bazen vahşi bir anaplazi gösteren dev hücrelerden oluşmuştur. Erken fazda uzak yerlere yayılma eğiliminden dolayı kötü prognozludurlar. Yarısından fazlasında tanı konduğu zaman beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşama oranı %2-3' tür (Kumar ve ark. 2003, Uludağ A. 2007).

2.2.4. Akciğer Kanserinde Tanı ve Evrelendirme

Birçok olguda görüntüleme yöntemi ile tümör ya da tümörün oluşturduğu enfeksiyon, plörezi, atelektazi (akciğerin çökmesi) gibi tablolar saptanabilir. Akciğer grafisinde tümör ya da tümör ile ilişkili olabilecek diğer görünümünün saptanması halinde atılacak ikinci adım genellikle akciğerin bilgisayarlı tomografisinin çekilmesidir. Bilgisayarlı tomografi, görülen lezyon hakkında detaylı bilgi verdiği gibi standart akciğer grafisinde görülemeyecek kadar küçük olan diğer lezyonların görülmesine de olanak sağlar. Standart akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografilerin incelenmesinden sonra hastalığın bölgesel yayılımı ve lokalizasyonu ortaya çıkar. Hekim bu noktada artık kesin tanı için gerekli olacak biyopsi yönteminin ne olacağına karar verebilir. Örneğin cerrahi müdahale düşünülen olgularda ve santral bölgede yer alan tümörlerde bronkoskopi yapılması hem evreleme hem de tanı için gerekli iken, bronkoskopi ile ulaşılamayacak periferik bölgelerde yer alan tümörlerde bilgisayarlı tomografi rehberliğinde iğne biyopsisi tercih edilebilir. Yine bu ilk incelemelerin sonucunda, tümöre cerrahi bir girişim düşünülüyorsa, tanı için ilk aşamada balgam muayenesi istenebilir. Bu tür hastalarda balgamın sitolojik incelemesi sonucunda tanıya ulaşılamaz ise diğer yöntemlere başvurulur. Akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografi ile görüntülenen tümörde balgam, plevra sıvısı sitolojisi, bronkoskopi veya iğne biyopsisi gibi yöntemlerle hücre tipi tanısı da konulduktan sonra elde edilen sonuca göre evreleme çalışmalarına başlanmalıdır. Kanserde evreleme hastalığın seyri ve uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesi açısından son derece önemlidir ve mutlaka yapılması gerekir (Kumar ve ark. 2003, Tepeli E. 2007).

KHAK, sınırlı ve yaygın evre olmak üzere iki evrede incelenir. Sınırlı evrede hastalık göğsün tek bir tarafı ile sınırlıdır. Karşı akciğere veya diğer organlara yayılım yoktur. Yaygın evre KHAK' lerinde hastalık, akciğer dışı diğer organlara ya da karşı akciğere metastaz yapmıştır. Sınırlı ve yaygın evrelerde tedavi KHAK tanısı konulan olgularda en azından beyin tomografisi ya da MR' 1, kemik sintigrafisi ve üst batin tomografisi veya ultrasonografisi ile uzak organ metastazları araştırılmalıdır (Tepeli E., 2007).

KHDAK' lerinin erken evrelerinde cerrahi tedavi sağkalım üzerine en etkili tedavi modalitesi olduğundan bu hastalıkta evreleme çalışmaları KHAK' lerine göre daha detaylı incelenmelerini gerektirir. KHDAK' lerinde evreleme TNM sistemine göre yapılır. Bu sistemde T ile tümör boyutu, tümörün komşu doku ve organlarla ilişkisi, tümörün bronkoskopik görünümü gibi birçok özelliği tanımlarken, N tümöre ait bölgesel veya uzak lenf bezlerindeki metastaz varlığını ya da yokluğunu tanımlar. M uzak organ metastazları ile ilişkili olup, M1 olarak tanımlanan olgular yani uzak organ metastazı saptanan olgular doğrudan başka bir incelemeye gerek olmaksızın evre IV olarak sınıflandırılır. TNM sistemine göre, akciğer kanseri olguları evre I, evre II, evre III ve evre IV olarak dört grupta ele alınır. Evre I ve II, erken evre akciğer kanseri olarak tanımlanır ve bu tür olgularda mutlaka cerrahi tedavi olanakları araştırılmalıdır (Tepeli E., 2007).

Akciğer kanserinin anatomik yaygınlığının saptanması yani evrelendirilmesi, hastalığa prognozunun belirlenmesi, tedavi şeklinin seçimi ve farklı klinik tedavi serilerinin sonuçlarının karşılaştırılması için gerekli bilgiyi sağlar. Özellikle KHDAK olgularında, küratif cerrahi veya radyoterapi arasındaki seçimde evrelendirme esas rolü oynamaktadır. Bu nedenle Amerikan Kanser Birliği ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği, akciğer kanser için primer tümörün büyüklüğü ve yaygınlığına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastazın varlığına (M) dayanan TNM evrelendirme klasifikasyonunu, 1997 yılında modifiye etmişler ve bugün kullanılan tanımı yapmışlardır (Tablo 1).

Tablo 1. Akciğer Kanserinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi

PRİMER TÜMÖR (T)	
Tx	Primer tümörün belirlenmemesi veya balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin saptanmasına karşın bronkoskopi ya da görüntüleme yöntemleri ile tümörün gösterilememesi
T0	Primer tümör belirtisi yok
Tis	Karsinoma insitu
T1	En geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer ve visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale invazyon göstermeyen tümör
T2	Tümörün en geniş çapı > 3 cm veya ana bronşa invaze fakat ana karnaya uzaklığı ≥ 2 cm veya visseral plevra invazyonu var veya hiler bölgeye uzanan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni var ise
T3	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, mediastinal plevra, pariyetal perikard gibi yapılardan birine direkt invazyon göstermesi veya karınaya 2 cm'den daha yakın olup karınayı tutmayan ana bronştaki tümör veya bütün bir akciğeri kapsayacak atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan tümör
T4	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özafagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan birini invaze etmesi veya malign plevral ya da perikardial efüzyon ile birlikte olan tümör ya da tümörle aynı lob içinde olan satelit nodül ya da nodüller BÖLGESEL LENF BEZLERİ (N)
Nx	Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Karşı taraf mediastinal ve/veya hiler, aynı veya karşı taraf supraklaviküler veya skalen lenf bezlerine metastaz
UZAK METASTAZ (M)	
Mx	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Evre Grupları

“Oscult” karsinom (TXN0M0), bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücreler belirlenmiş, fakat radyolojik ve bronkoskopik olarak gösterilememiştir (Tablo 2).

1997’ de evre I tümörler IA ve IB olarak ikiye ayrılmıştır. Evre I’ de lezyonlar tamamen akciğer içerisindedir. Uzak metastaz veya lenf bezi tutulumu yoktur. Evre IA’ da (T1 N0 M0) hastaların 5 yıllık yaşam süreleri, evre IB hastalardan daha iyidir. Bu hastalarda cerrahi tedavi tercih edilir. Evre IA’ da beş yıllık yaşam süresi %7, IB’ de ise %57’ dir. KHDAK’ li hastaların %13’ ü IA, %23’ ü ise evre IB’ dir.

Tablo 2. KHDAK' lerinde Evre Grupları

Evre	Tx	Nx	M
Occult carsinoma	X	?	?
Evre 0 (Karsinoma in situ)	IS	0	0
Evre IA	1	0	0
Evre IB	2	0	0
Evre IIA	1	1	0
Evre IIB	2	1	0
	3	0	0
Evre IIIA	3	1	0
	1-3	2	0
Evre IIIB	Herhangi N	3	0
	4	Herhangi T	0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	1

Evre II, 1997' de bu gruptaki hastalar yaşam sürelerine göre, IIA ve IIB olarak ikiye ayrılmıştır. Evre IIA (T1N1M0) hastaların 5 yıllık yaşam süreleri %55' tir. KHDAK' li hastaların %1' den daha azı bu evrededir. Evre IIB hastalar ise, T2N1M0 ve T3N0M0 gruplarını kapsar. Göğüs duvarına invaze, ancak lenf nodu tutulumu olmayan (T3N0M0) tümörlerin prognozu, lenf nodu tutulumu olan küçük tümörlere göre daha iyidir. Bu nedenle T3N0M0 tümör, evre III yerine evre IIB olarak evrenmektedir. Evre IIB hastaların 5 yıllık yaşam süreleri %38' dir.

Evre III hastalar, cerrahi rezektabiliteye göre, IIIA ve IIIB olarak ikiye ayrılırlar. Evre IIIA tümörler, cerrahi olarak çıkarılabilmesine rağmen, evre IIIB tümörlere cerrahi tedavi yapılamaz. Evre IIIA hastalarda tümörün akciğer dışı yayılımı olmasına rağmen, sınırlı bir lenf bezi yayılımı vardır. Bu hastalar T3N1M0 veya T3N2M0 gruplarını kapsar. KHDAK' lerin %10' bu evrededir. Bu hastalarda tedavi değişkendir. Son yapılan çalışmalarda, evre IIIA hastalarda cerrahi öncesi kemoterapinin, yaşam süresini düzelttiği ve cerrahi sonrası hastalısız süreyi uzattığı gösterilmiştir. Evre IIIA hastalarda 5 yıllık yaşam süresi %23' tür.

Evre IIIB hastalarda, tümörün akciğer dışı yayılımı ile beraber, karşı taraf hiler ve mediastinal lenf bezlerine, aynı veya karşı taraf skalen ve supraklaviküler lenf bezlerine, uzak metastaz olmaksızın yaygın mediastinal lenf bezlerine yayılım ve sitoloji pozitif malign plevral efüzyon mevcuttur. Bu hastalar T1- 3N3M0 veya T4-N0-3M0 gruplarını kapsar ve KHDAK' nin %20' sini oluşturur. Bu hastalara palyatif tedavi uygulanır. Kesin tedavileri yoktur. Beş yıllık yaşam süresi çok yönlü tedavi ile %5' tir.

Evre IV, herhangi bir metastatik yayılımı olan hastaları kapsar. Bu hastalar herhangi T ve herhangi N' i olan M1 hastalar olarak gruplandırılır. KHDAK' li hastaların %27' si evre IV' dür. Bu hastalara cerrahi tedavi uygulanmaz. Palyatif olarak tedavi edilirler. Beş yıllık yaşam süreleri %1' dir. Bu hastaların ortalama yaşam süreleri 1 yıldan daha azdır (Karlıkaya C., 2005).

2.3. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanserlerinin çoğu, sigara içme alışkanlığına bağlanmasına karşın, ağır sigara içicilerin yaklaşık %20' sinde akciğer kanseri oluşur. Konak faktörleri bu değişik kişisel duyarlılıkta önemli rol oynarlar. Ailesel soy ağacının analizi, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü göstermiştir. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2-5 kez daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir (Siegfried SM. 1999, Wei Q ve ark. 1997).

Son yıllarda moleküler biyolojiye dayanan uzun süreli sağkalımı belirleyebilecek yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yapılan moleküler biyolojik çalışmalar bu nedenle önem kazanmıştır. Ayrıca bu sayede belirlenecek belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi veya yeni gelişmekte olan özel hedeflenmiş ajanların kullanımı mümkün olacaktır (Cox G ve ark. 2001, Greoger AM ve ark. 1997).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada Akciğer kanseri ile ilişkili birçok tümör süpressör gen ve onkogen tanımlanmıştır. Bu çalışmalar sırasında görülmüştür ki, özellikle kanser metabolizması ile ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel etkenler ile uyarılması sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığı artmaktadır. Bunun dışında, DNA tamiri, hücre büyümesi, sinyal iletimi ve hücre siklus kontrolü ile ilişkili genler de akciğer karsinogenezinin değişik aşamalarında

zarar görür. Akciğer kanserlerinde görülen genomik dengesizlik; pek çok sayısal (anöploidi) ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, translokasyon) içerir (Akbulut ve ark. 1997, Fong ve ark. 2002).

Akciğer kanserlerinde görülen anöploidik değişimler, mitotik kontrol noktalarındaki (mitotik checkpoint) fonksiyonel kayıp ile ilişkilidir (Akbulut H ve ark. 1997, Fong ve ark. 2002). Gelişen genetik teknikler sayesinde bu hücrel değişimler daha ayrıntılı incelenmektedir.

Akciğer karsinogenezinde oluşan majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir (Field JK. 1999, Jakobson DR. 1999, Lecture GFF. 1996).

- I. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- II. Tümör süpressör genlerin inaktivasyonu
- III. Hücre siklus regulasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler

2.3.1. Onkogenlerin Aktivasyonu

Onkogenler, protoonkogen ismi verilen normal hücrel genlerden gelişir. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regulasyonunda rol alırlar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregulasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Genin yapısal bir bölgesindeki değişiklik sonucu farklı fonksiyon gösteren bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ki en sık *ras* onkogen ailesinde görülür. Bir diğer mekanizma, genin ekspresyonunu düzenleyen bölgede oluşan değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün miktarındaki artıştır. Kromozomal translokasyonlarda, kromozomun bir bölgesi koparak başka bir bölgeyle yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin, regülatör bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile hücre içerisindeki DNA miktarı artar. *Myc* ailesi bu duruma bir örnek oluşturur (Roth JA., 1994).

Ras Ailesi

Ras ailesi; *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras*' tan oluşan bir gruptur. Bu genler kanser gelişiminde özellikle nokta mutasyonu ile rol oynarlar. Ras proteinleri, membranda bulunan Guanozin trifosfaz (GTPase) aktivitesine sahiptir ve hücre membranından nükleusa sinyal transdüksiyonunda ve hücre büyümesinde rol oynar (Fong ve ark. 1999, Lecture GFF. 1996. Spivack SD ve ark. 1997).

Ras proteininin normal hücredeki görevi, uyarıcı sinyallerin olduğu durumlarda Guanozin trifosfat (GTP)' a bağlanarak aktif hale geçmektir. Mutant *Ras* proteini GTPase aktivitesini inhibe ettiğinden dolayı, gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilir (Fong ve ark. 2002, Jacobson DR. 1999, Mabry M. 1998).

H-ras, *K-ras* ve *N-ras* genleri 11p15.5' te yerleşiktir ve 12, 13 ve 61. kodonlarda kodlanır. En sık *K-ras* mutasyonu görülür ki bu mutasyon sıklıkla 12. kodonda oluşur. *H-ras* mutasyonu daha seyrek, *N-ras* mutasyonu ise çok nadirdir (Mabry M., 1998). *K-ras* aktivasyonu, KHDAK' lerinin %15-50' sinde görülür. Adeno ve büyük hücreli kanserlerde %30-60 oranında, yassı hücreli kanserlerde ise daha az oranda görülür. KHDAK' lerinde ise çok daha nadir görülür. *K-ras* mutasyonu görülürken sağkalımda azalma, erken relaps ve kötü prognoz görülür (Fong ve ark. 1999, Groeger ve ark. 1997, Jacobson DR. 1999, Lecture GFF. 1996, Mabry M. 1998). *K-ras* mutasyonu sigara içimi ile ilişkilidir. Sigara içen akciğer kanserli olgularda hiç içmemiş olanlara göre daha sık görülür (Fong ve ark. 1999, Jacobson DR. 1999, Spivack ve ark. 1997).

Myc Ailesi

Myc genleri, DNA' ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Klonlandıkları kültüre ve elde edilme şartlarına göre bu genler, *C-myc*, *N-myc* ve *L-myc*' den oluşur (Köktürk ve ark., 2003). KHAK' lerinin %18- 31, KHDAK' lerinin ise %8-20' sinde *myc* aktivasyonu izlenir. *C-myc* amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksinimi azalır. Hücre siklusunda G1 fazı kısalır ve bunun sonucunda proliferasyon oluşur. *C-myc* tümör büyüme hızında artış ve sağkalımda kısalma ile ilişkilidir (Fong ve ark. 1999, Groeger ve ark. 1997, Mabry M. 1998).

Hücre İçi Sinyal İleticileri ve Nükleer Transkripsiyon Faktörleri

Bu grupta *c-erb B-1*, *c-erb B-2*, *c-met*, *c-srs*, *c-raf-1*, *c-fos* ve *c-jun* yer alır. Bunlar çeşitli büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlarlar. Bazı akciğer kanseri türlerinde ekspresyonları artmıştır.

c-erb B-1; Epidermal growth faktör (EGF) reseptörünü kodlar. Membran glikoproteini olup, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve özellikle yassı hücreli kanserlerde aşırı ekspresyonu görülür.

c-erb B-2; Transmembran büyüme reseptör faktörü olarak görev yapan bir proteini kodlar. p185 neu, kodlanan protein olup, hem yassı hücreli hem de adenokanserlerde kötü prognostik bir göstergedir. Kemorezistans ve yüksek metastatik potansiyel ile ilişkilidir (Mabry M., 1998). Akciğer kanserlerinin %30-64'ünde görülür (Spivack ve ark., 1997).

c-fms; Koloni Stimüle Edici Faktör (CSF) için protein kodlar. KHAK' de ekspresyonu görülür (Mabry M., 1998).

c-met; Hepatosit Growth Faktör (HGF) reseptörünü kodlar. KHAK' lerinin çoğunda KHDAK' lerinin ise yarısında ekspresyonu görülür. KHDAK' lerinde özellikle adeno ve yassı hücreli kanserlerde görülür (Mabry M., 1998).

c-src; pp60c-src N tirozin kinazları kodlayan protoonkogenlerdir. KHAK' de adeno kanserlerinin %60'ında ve kötü diferansiye yassı hücreli akciğer kanserlerinin bir kısmında tespit edilmiştir (Mabry M., 1998).

c-raf-1; Hücre dışındaki reseptörlerden nükleusa sinyal transdüksiyonunu sağlayan serin treonin kinaz aktivitesine sahip bir protoonkogendir. KHAK' lerinin %80'inde delesyonu görülür (Mabry M., 1998).

c-fos ve *c-jun*; Erken transkripsiyon faktörleridir. Protein sentezi olmaksızın mutajenik uyarılarla aktive olurlar.

2.3.2. Tümör Süpressör Genler (TSG)' in İnaktivasyonu

p53 Tümör Süpressör Geni

İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. Tüm kanserlerin %50'inde görülürken KHAK' lerinin %90'ında, yassı hücreli kanserlerin %65'inde, büyük hücreli kanserlerin %60'ında ve adeno kanserlerin %33'ünde gösterilmiştir (Fong ve ark. 1999, Groeger ve ark. 1997, Hussain ve ark. 2000, Levin ve ark. 1994, Spivack ve ark. 1997, Tchia ve ark. 1991).

p53 proteinin hücre fonksiyonlarındaki görevi; gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun arresti, büyümeyi sonlandırma ve hücre ölümüdür (Hussain ve ark. 2000, Lecture GFF. 1996). Hipoksemi ya da DNA hasarı p53 üretimini uyarır. p53 gen fonksiyon kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri yapılmaksızın hücre siklusu kontrolsüz olarak çoğalır.

p53 fonksiyon kayıpları genellikle allellik kayıplar ve somatik missense mutasyonlar şeklindedir. Bu mutasyonlar KHAK' lerinin %90' ında KHDAK' lerinde %50' sinden fazlasında görülür. Bu mutasyonlar sonucunda, hem tümör süpressör fonksiyonlarında kayıp hem de onkojenik fonksiyon kazanma şeklinde dual bir etki ortaya çıkabilir (Fong ve ark. 2002, Hussain ve ark. 2000, Levin ve ark. 1994).

p53 gen mutasyonları karsinogenezin erken basamaklarında görülür. *K-ras* geninde belli bir noktada mutasyon olurken, p53 mutasyonları 17. kromozomun üzerinde tüm gen boyunca oluşabilir (Spivack ve ark. 1997, Hussain ve ark. 2000). Yapılan çalışmalar akciğer kanserlerinde p53 mutasyonunun sigara içimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Tepeli E., 2007).

Retinoblastom Geni (RB)

RB geni ilk bulunan tümör süpressör gendir. 13. kromozom üzerinde lokalizedir (13q14). *RB* protein yokluğu KHAK' lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK' lerinin sadece %10-30' unda görülür (Cox ve ark. 2001, Fong ve ark. 1999, Tchia ve ark. 1991). Bu gen hücrel farklılaşmada önemli bir role sahiptir (Tepeli E., 2007).

p16 siklinD1/CDK 4-6 *RB* yolu, hücre siklusunun G1' den S transisyonunda önemli görevlere sahiptirler. Bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktiviteyle sonlanır (Fong ve ark. 2002, Greoger ve ark. 1997, Levin ve ark. 1994, Sclafani ve ark. 1998). Bu yoldaki proteinlerden biri olan p16, kromozom 9p21' de lokalize olup, genellikle akciğer kanserinde allellik kayba ya da mutasyona uğrar. KHDAK' lerinin %10-40' ında homozigot delesyonlar ve nokta mutasyonları saptanır (Tepeli E., 2007).

Kromozom 3p Kaybı

Kromozom 1p, 1q, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 11p, 11q, 14q, 17q, 18q ve 22q tümör süpressör genlerinin lokalize olduğu bölgelerdir. Bu bölgelerdeki

hemizigot delesyonlar ile tümör süpressör genler azalmış olur. Akciğer kanserlerinde sık görülen kırılma noktaları 1p, 3p, 9p ve 17p' dir (Tepeli E., 2007).

Frajl histidin triad geni (*FHIT*) 3p14.2 lokalizasyonunda bulunur. Akciğer kanserinde bu bölgenin hemizigot ya da bazen homozigot olarak delesyona uğradığı gösterilmiştir. *FHIT* gen anomalileri KHAK'lerinin %80' inde KHDAK' lerinin ise %42' sinde gösterilmiştir (Gemill ve ark. 1998, Sozzi G. 1998).

3p delesyonunun karsinogenezin erken basamaklarında gerçekleştiği düşünülür. Bu değişiklik KHAK'lerinin %100' ünde , KHDAK' lerinin %50' sinde görülür (Greoger ve ark., 1997). 3p delesyonunda hücre döngüsü regulasyonu bozulur. 3p bölgesinde bulunan bir gen, ubiquitin aktive edici enzim ile homologdur. Ubiquitin, aktive edici enzim ile fosforile olduktan sonra, *CCND1* degradasyonu ile hücre döngüsü regulasyonunda görev alır. Tütüne bağlı gelişen kanserlerde hücre döngüsü kontrolünün kaybı *CCND1* gen amplifikasyonu ve/veya ubiquitin aktive edici enzim delesyon mekanizmaları ile açıklanabilir (Davidson ve ark., 1993).

3p21.3 bölgesinde yer alan bir başka *TSG* ise *RASSF1* olup, KHDAK' lerinin %30' unda ve KHAK' lerinin %90' ından fazlasında promotör bölge hipermetilasyonuna uğrar. Bu hipermetilasyon kötü prognoz ile ilişkilidir (Fong ve ark., 2002).

2.3.3. DNA Tamir Genlerindeki Değişiklikler

DNA tamiri normal hücre döngüsünün devamı için esastır ve hatalı DNA tamiri karsinogenez gelişiminden sorumlu önemli bir faktördür. DNA hasarını gidermek üzere işlev gören başlıca genler bir önceki kısımda da belirtilen kromozom 3p üzerinde lokalizedir. Kromozom 3p kayıpları akciğer kanseri gelişimini 14 kat artırmaktadır. Diğer DNA tamir genleri (*ERCC1*, *XPO*, *XPF*, *XRCC3*, *XRCC1*, *RRM1*) ile de artan sayıda çalışmalar yapılmaktadır (Köktürk N ve ark., 2003).

2.3.4. Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Değişiklikler

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü akciğerde kanser hücreleri ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler (Siegfried SM., 1999). Bu büyüme faktörleri otokrin, parakrin jukstakrin yollarla kanser büyümesinde rol oynarlar (Siegfried SM. 1999, Takanami ve ark. 1996). Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörünü sentezliyor hem de reseptörünü taşıyorsa, kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna "Otokrin Büyüme Halkası" denir. Normal

hücrelerde bu düzenleyici sistemler bir denge içerisinde işlemektedir. Kanser hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur (Hastürk S., 2000).

Epidermal Growth Faktör (EGF) ve Transforming Growth Faktör- a (TGF-a) , hücre proliferasyon ve differansiyasyonunu uyaran mitojenik etkileri gösterilmiş olan peptidlerdir. EGF, yüzey reseptörü aracılığı ile etkilerini gösterir (Groeger ve ark. 1997, Jacobson DR. 1999, Tateishi ve ark. 1990). EGF reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteindir. Tirozin kinazlar hem normal hücre büyümesi ile hem de malign transformasyon ile ilişkili proteinlerdir. Pek çok çalışmada aberran EGFR sinyalizasyonu ve EGFR regulasyon bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fernandes ve ark. 1999, Lei ve ark. 1998, Raymond ve ark. 2000). KHDAK' lerinin %13-80' inde EGFR aşırı ekspresyonu saptanmıştır. Özellikle yassı hücreli akciğer kanserlerinde normal dokunun 2-3 katı EGFR ekspresyonu söz konusudur (Perez-Soler ve ark., 1998).

Transforming Growth Faktör- β 1 (TGF- β 1), hücre fonksiyonlarının regulasyonunda rol oynayan bir polipeptid olup, normal epitelyal hücrelerin büyümesini inhibe eder (Hasegawa ve ark. 2000, Takanami ve ark. 1996). TGF- β peptidleri, hücre büyümesi, diferansiyasyonu, adezyon, migrasyon, anjiogenez, ekstrasellüler matriks formasyonu ve immun fonksiyonları etkileyen multifonksiyonel polipeptidlerdir (Takanami ve ark., 1997).

TGF- β in vitro olarak kanser proliferasyonunu baskılar. TGF- β 1 angiogenezi stimüle eder, immun fonksiyonları baskılar, adezyon molekül ekspresyonunu ve ekstrasellüler matriks komponentini artırarak metastatik potansiyeli artırır (Hasegawa ve ark. 2000, Takanami ve ark. 2001). TGF- β 1 ekspresyonu olan hastalarda sağkalımın daha kötü olduğu gösterilmiştir. Özellikle adeno kanserli olgularda TGF- β 1 ekspresyonunun sağkalımda azalma ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Spivack ve ark., 1997).

Hepatosit Growth Faktör (HGF), plazmada bulunur ve trombositlerden sentezlenir. Esas olarak karaciğer rejenerasyonunda rol oynar. HGF, endotel hücreleri ve melanositler için mitojenik etki gösterir ve endotel hücrelerinde tübül oluşumunu uyarır (Akbulut ve ark., 1997). HGF normal akciğerlerde çok düşük düzeyde eksprese edilir. KHAK ve KHDAK' lerinde HGF ekspresyonu artmıştır.

Opere edilebilir KHDAK' lerinde yüksek HGF düzeyi kötü prognozu gösterir (Fong ve ark. 1999, Hastürk S. 2000).

2.4. DNA Metilasyonu

Epigenetik, herhangi bir gen/ genom mutasyonu olmamasına rağmen gen ekspresyonundaki kalıtsal ya da sporadik değişimlerle ilgilenen bilimsel disiplin olarak tanımlanır. Hücre döngüsü sırasında dimanik değişimler söz konusudur. Epigenetik değişimler aşağıdaki gibi gruplandırılır:

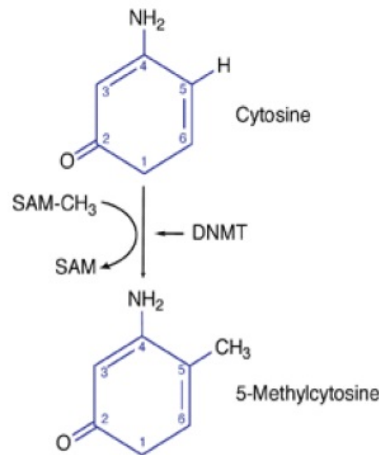
DNA metilasyonu: DNA düzeyinde

1. DNA metiltransferaz
2. Metil CpG bağlantı proteinler

Histon modifikasyonları: Nükleozom düzeyinde

1. Merkez histon proteinlerinde translasyon sonrası modifikasyonlar
2. Asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon
3. Enzimler: Histon asetiltransferaz, histon deasetilaz

DNA' nın metillenmesi, omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili bir mekanizmadır. Omurgalı DNA' sındaki sitozin birimleri, 5- karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilir (Şekil 5). DNA' nın tek dalında bulunan CpG dinükleotidlerinde sitozinin 5- karbonuna bağlanması ile metillenme gerçekleşir. Bu işlem DNA metiltransferazlar yardımıyla olmaktadır. Bu metillenme, promotörlerin çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir (Geoffey ve ark., 2006).



Şekil 5. 5-metilsitozin oluşumu

DNA metillendiğinde 5-metilsitozin oluşur. Bu metillenme CpG dinükleotidlerinde ve DNA' nın major oluğunda meydana gelir. Burada nükleotid değişimi yoktur. Sadece bağ ilişkisinde değişim söz konusudur (epigenetik değişim). CpG' lerin genomdaki dağılımları rastgele değildir. Genomda nadiren dağınık CpG dinükleotidleri görülür. Bazı doku spesifik genlerde, housekeeping genlerin promoter bölgelerinde lokalize, 26 000- 45 000 civarında CpG adaları olduğu tahmin edilmektedir (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005, William SK. 2000).

İnsanlarda iki tür CpG dinükleotid dizisi vardır:

1. Dağınık halde bulunan, düşük frekansta metilli
2. Adacıklar halde bulunanlar

Normalde genin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki sitozinler metilli değilken 3' bölgesindeki tekrarlayan CpG' ler metilli olarak bulunurlar. Memeli genomunda, %5 sitozin metillidir. DNA metilasyonu normal koşullarda hücrel farklılaşmada rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Hücreler arasında genom aynı olmasına rağmen farklı hücre gruplarında doku spesifik genlerin eksprese olmasında DNA metilasyonu etkili olmaktadır. Diğer bir deyişle DNA metilasyonu genomda genin eksprese olmaması gereken bölgelerde, kodlanmayan bölgelerde transkripsiyon sürecini durdurur. Örneğin heterokromatin yoğun metilasyonun görüldüğü bir yapıdır. Bu kromatin yapısının olduğu bölgelerde DNA replikasyonu geç olmakta, transkripsiyon ise gerçekleşmemektedir. DNA metilasyonunun aynı zamanda viral sekans kontaminasyonunun önlenmesi, tekrarlayan sekanslar arasına giren transpozonların etkisiz hale getirilmesinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

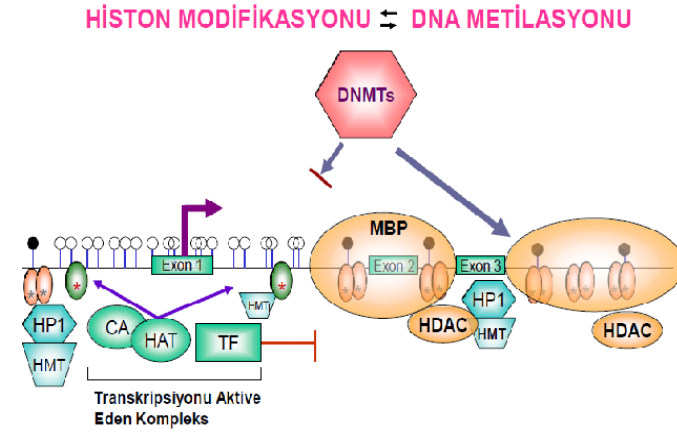
Erişkin dokulardaki CpG adacıklarındaki DNA metilasyonu aracılığıyla gen ekspresyonunu baskılama görevi iki küçük gen grubu ile sınırlıdır:

- a. İnaktif X kromozomundaki CpG adacıklarının yaygın metillenmesi.
- b. İmprint genlerde, eksprese olmayan allelin inaktivasyonu promoterdeki metilasyonla ilişkilidir (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005).

Metillenme, genlerin transkripsiyonunu, hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek, hem de metillenmiş DNA' ya özgül olarak bağlanan baskılayıcıların katılımını sağlayarak engeller. Bu baskılayıcılar, histon deasetilazlar ile kompleks oluşturarak çalışır. DNA metillenmesini, histon asetilasyonu ve

nükleozom yapısındaki değişimlerle ilişkilendirir. Genel olarak, gen aktivitesi ve metilasyon arasında ters bir ilişki vardır.

Transkripsiyona uğrayabilecek, aktif DNA, histonlar asetillenmiş, metile olmamış DNA iken, baskılanmış DNA ise histonlar asetillenmemiş, metillenmiş DNA' dır. Şekil 4' te de görüldüğü gibi histon asetilasyonu histonlardaki (+) yükün kaybolmasına, histon-DNA arasındaki çekimin azalmasına, DNA' nın serbestleşerek transkripsiyon faktörlerinin DNA' ya bağlanmasına neden olur. Ancak CpG adacıklarının metillenmesi ve histon deasetilasyonu ile histonlar (+) yük kazanırlar ve DNA- histon ilişkisi kompakt bir yapı oluşturur. Bu durumda da transkripsiyon inhibe olur.



Şekil 6. Metilasyon ve asetilasyon ilişkisi

DNA metillenmesi transkripsiyonu engelleyebilmesine rağmen, genellikle önceden baskılanmış olan genlerin metillendiği görülür. DNA metillenmesi, transkripsiyon inaktivasyonunun primer nedeni olmaktan çok temel gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliğinde ve korunmasında katkı sağlar. DNA' nın metillenmesi, DNA Metiltransferaz enzimleri ile olmaktadır. DNA Metiltransferaz enziminin yapısını inceleyecek olursak, bugün için DNA metiltransferazların üçü iyi tanımlanmıştır (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005):

Dnmt 1: Kalıcı metilazdır. Bölünmesi sırasında oluşan yeni DNA, sentezi sonrası eski DNA metilasyon paternini korumakla görevli, replikasyon bölgesine lokalizedir.

Dnmt 3A ve 3B: De nova metilasyondan sorumludurlar. Normal metiltransferaz aktivitesi gösterirler. Dnmt1' in aksine hemimetilli DNA' ya karşı eğilimleri yoktur. Dnmt3 ailesi benzer katalitik domain içerirler. Fakat regülatör domainleri farklıdır.

DNA metillenmesinin önemli bir düzenleyici rolü, memeli embriyosunun gelişiminde yer alan bazı genlerin ekspresyonunu denetleyen ve genomik damgalanma olarak bilinen fenomende tanımlanmıştır. Diploid hücrelerde, genellikle, bir genin hem anne kökenli hem de baba kökenli allelleri eksprese olur. Bununla birlikte, ekspresyonları anneden veya babadan kalıtılanlarına bağlı olan birkaç damgalanmış gen vardır. Bazı durumlarda, damgalanmış genin sadece baba kökenli alleli eksprese olur ve anne kökenli allel inaktiftir. Damgalanmış diğer bazı genlerde anne kökenli gen eksprese olurken, baba kökenli allel inaktiftir (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005, William ve ark. 2000).

2.4.1. DNA Metilasyonu ve Kanser

Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasındaki ilişki, 1980' li yılların başından beri bilinmektedir (Warnecke ve ark., 2000). O tarihten itibaren, kanser oluşumunda metilasyonun rolünün anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalarda temel araştırma konusu, kanser hücrelerinde metilasyonun artıp artmadığı olmuştur. Araştırmalarda elde edilen sonuçlar, metilasyon profilinin, spesifik genlere göre, incelenen genlerin farklı bölgelerinde, özellikle promoter bölgelerinde değişebildiğini göstermiştir (Safar ve ark. 2005, 2007, Sato ve ark. 2004).

1983 yılında Feinberg ve Vogelstein, onkogenlerin yeniden düzenlenmesi ve mutasyonlarını araştırırken, kanser hücrelerinde genel bir hipermetilasyon olduğunu, bu durumda onkogen aktivasyonunda rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır (Geoffey ve ark., 2006).

Kanser hücreleri genellikle hipermetiledir. Bu, enzimatik metodlarla ya da HPLC yöntemiyle, total 5- metilsitozin miktarına bakılarak gösterilmiştir. Metilenden yoksun diyetle beslenen fare ve ratlarda, DNA hipermetilasyonu olduğu ve sonucunda karaciğer kanserinin geliştiği rapor edilmiştir (Nussbaum ve ark., 2005).

DNA hipometilasyonu, kromozomal yeniden düzenlenmeleri ve artan delesyon oranına yol açar. Bunun sonucunda da artan somatik instabilite oranı görülür (Uludağ A., 2007).

Bununla birlikte kanserin türüne göre değişmekle birlikte başta tümör baskılayıcı ve DNA tamir genleri olmak üzere bazı spesifik genlerin özellikle promoter bölgelerinde metilasyon profilinde bir artış olduğu da birçok çalışmada gösterilmiştir (Bowman ve ark. 2006, Tsou ve ark. 2004, Yan ve ark. 2005).

Her bir CpG adacık analizinde artan metilasyon paternleri saptanmıştır. Geniş çaplı CpG adacık analizini sağlayan PCR orjinli yöntemlerin uygulanmasıyla, bir tümördeki yüzlerce hatta binlerce CpG adacığının normalin dışında artmış metilasyon paterni gösterdikleri ortaya konmuştur. DNA metittransferaz enzim aktivitesinde de artış söz konusudur (Geoffey ve ark. 2006, Nussbaum ve ark. 2005).

CpG adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna yol açtığı gibi, DNA' daki hipermetilasyon da kromozom insatabilitesi, retrotranspozan aktivasyonu ve onkogen aktivasyonu yolu ile kanser gelişiminde önemli rol oynar (Uludağ A., 2007).

Örnek olarak *GSTP1* (Glutasyon S Transferaz Pi) geni verilebilir. Bu gen, DNA harabiyetine yol açan elektrofillerin detoksifikasyonundan sorumludur. Prostat tümörlerinin %90' ından fazlasında bu genin ekspresyonunda anlamlı bir azalma söz konusudur. Bu azalmanın %95' inden fazlasında promotor hipermetilasyonudur (Yegnasubramanian ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilerde akla gelen ilk soru, kanserdeki genel hipometilasyonun mu, yoksa spesifik bazı genlerin hipermetilasyonunun mu kanserin gerçek sebebi olduğudur. Bu sorunun cevabı kanser etyolojisinin aydınlanması ve dolayısıyla kansere yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından da önem taşımaktadır (Ehrlich M., 2006).

Karsinogenez, ister tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyona, ister onkogen aktivasyonuna bağlı gelişsin karsinogenezis sürecindeki bir sonraki aşama DNA' da meydana gelen genel bir hipometilasyondur. Bu durum, kanserin prognozunu, yayılımını ve agresif karakterinin dozunu tayin eden DNA instabilitesi, kromozomal kırık ve kayıplara neden olur. İşte bu kritik aşamada devreğe girecek olan DNA tamir genlerinin fonksiyonlarında meydana gelebilecek bir zamlı hastalığın seyrini

dramatikleştirebilir (Geoffey ve ark. 2006, Ehrlich M. 2006, Safar ve ark. 2005, Sato ve ark. 2004).

Çalışmalar sonucunda ortak kanı, CpG adalarının metilasyonunun tümör gelişiminin özellikle erken dönemlerinde önemli olduğu, kanser için bir çeşit zemin hazırladığı, kanserin prognoz ve yayılım hızına etki ettiği yönündedir. Bu durum, bir tümör markeri olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır. Bu doğrultuda kanserdeki CpG adalarının metilasyon profilini inceleyen çalışmalardan elde edilecek veriler ile kanserin erken tanısı, tümör klasifikasyonu, hastalığın prognozu, tedavi protokollerinin düzenlenmesi, tedaviye yanıtın kontrolü ve kanserden korunma yolları konularına ışık tutulabilir (Safar ve ark. 2005, 2007, Sato ve ark. 2004).

Kanser olgularında tümör markeri olarak DNA metilasyonunun incelenmesinin mutasyonlara göre bir avantajı da, metilasyonun genin her zaman belirli bir bölgesinde oluşması ve PCR teknikleri ile metilasyon anomalilerinin kolaylıkla incelenebilmesidir (Sato ve ark., 2004).

2. 4. 2. Akciğer Kanseri ve DNA Metilasyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, akciğer kanserlerinin erken evrelerinde kan ve balgam gibi biyolojik sıvılarda metile DNA sekanslarının saptanabileceği belirtilmiştir (Palmisano ve ark. 2000, Sato ve ark. 2004).

Akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş genlerden 3 veya daha fazlasında metilasyon saptanması durumunda akciğer kanseri gelişme riskinin %64 spesivite ve sensivite ile 6,5 kat arttığı ortaya konulmuştur (Palmisano ve ark., 2000).

Safar ve arkadaşlarının (2007) 180 KHDAK hastasında yaptıkları çalışmada akciğer kanseri için erken sayılabilecek N0 olan hastalarda %67' ye varan bir oranda *E-cadherin*, *APC*, *MGMT*, *hMLH1*, *RASSF1A*, *DAPK*, *ATM* genlerinden en az birinde hipermetilasyon olduğunu belirlemişlerdir.

Etseller ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada birçok kanser türünde *p14*, *p15*, *p16*, *p73*, *APC* ve *BRCA1* gibi tümör baskılayıcı genler, *hMLH1*, *GSTP1* ve *MGMT* gibi DNA tamir genleri, *CDH1*, *TIMP3* ve *DAPK* gibi invazyon ve metastazda etkili olan genlerin metilasyon profillerini araştırmış ve çok değerli veriler elde etmişlerdir. Buna göre akciğer kanserinde en sık metilasyon saptanan gen %31 ile *p16* olmuştur. Ancak Kim ve arkadaşlarının (2005) KHDAK' li hastalarda

yaptıkları bir başka çalışmada da *BRCA1* geninde saptanan hipermetilasyonun *p16* geninin homozigot delesyonu ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu bilgiler akciğer kanserlerinde metilasyon profilini inceleyecek çalışmaların geniş kapsamlı ve çok yönlü planlanması gereğini ortaya koymaktadır. Şöyle ki, çalışılacak materyalin alındığı lokalizasyon, alındığı zaman kadar, çalışılacak genlerin sayısı ve çalışma yöntemi ile irdelenmelidir. Ayrıca metilasyon çalışmaları ile beraber ekspresyon ve diğer moleküler yöntemlerde kombine edilmelidir (Uludağ A., 2007).

Gen mutasyonlarının aksine DNA metilasyonu geri dönebilen bir süreçtir. Bu da onu kanser tedavisinde önemli bir yere yerleştirir. Myelodisplastik sendrom tedavisinde kullanılan ve sağ kalımı artırdığı gösterilen *azacitidine* (Vidaza) aslında bir DNA metilasyon inhibitörüdür. Ancak bu ilacın akciğer kanserlerinde nasıl bir etkisi olacağı bilinmemektedir. Histon deasetilasyonu gen ekspresyonunu baskılayan başka bir epigenetik mekanizmadır. *Suberoylanilide hidoksamik asit* ve *depsipeptit* gibi histon deasetilasyonunu engelleyen ilaçlarda akciğer kanserlerinin tedavisi için tartışılmalıdır (Sato ve ark., 2004).

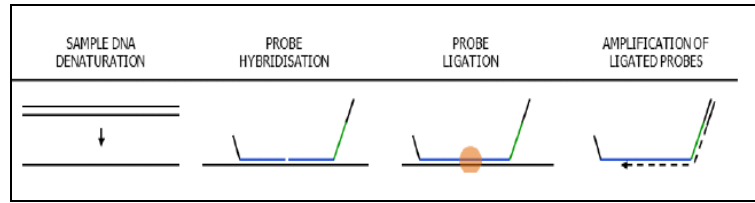
2.5. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tanımlamışlar ve son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir (Schouten ve ark., 2002). Metilasyon spesifik MLPA (MS- MLPA) ve MLPA; spesifik dizilerin, bir mutiplex PCR' dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği bir metottur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130-490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneği ile karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin delesyon/duplikasyon taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda belirli dizilerin amplifikasyonu için sadece 20 ng insan DNA' sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri (bağlanma bölgesindeki) görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MS-MLPA ve MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir (<http://www.mlpa.com>, Erişim tarihi: 25 Ekim 2014). Tekniğe; kolay uygulanabilir, üretken, sensitif olması ve doğru multiplex analiz sonucu

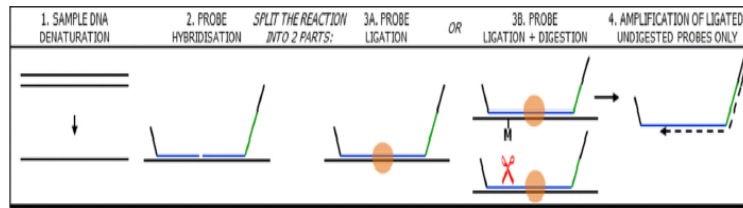
verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır. Her bir MLPA probu hedef diziyi hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış problemler 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 490 bp arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probu diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25- 43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziyi hibridize olan diziyi içerir. 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA' sını kullanılmıştır. M13 DNA' sını komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA' yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziyi mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle problemler arasında 6 ya da 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodupleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziyi spesifik sentetik oligonükleotidler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 bp uzunluğundaki problemler, amplifikasyonda başarılı bir şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziyi yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (Schouten ve ark., 2002).

MS-MLPA' da ligasyon işlemi ile birlikte aynı hasta örneğinin yarısı da *HhaI* metilasyon spesifik enzimi ile kesime uğratılır.

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problemler için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (Slater ve ark., 2003). Genomik DNA' da olduğu gibi mRNA araştırmalarında da kullanılabilir (<http://www.mlpa.com>, Erişim Tarihi: 25 Ekim 2014).



Şekil 7. Genel MLPA yönteminin basamakları



Şekil 8. MS- MLPA yönteminin basamakları

2.5.1. Akciğer Kanserinde MLPA Tekniğinin Kullanımı

Çalışmamızda Türkiye' de son zamanlarda kullanımı artmış olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ve Metilasyon Spesifik MLPA (MS-MLPA) teknikleri ile şimdiye kadar akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiş farklı genlerde dizayn edilmiş prob bölgelerindeki değişimler ve metilasyon paternleri araştırılmıştır. Bu güne kadar yapılmış, literatürde yayınlanmış MLPA tekniği ile ilgili birçok yayın olmasına rağmen, akciğer kanserlerine yönelik bu tekniğin kullanıldığı çok az çalışma yayınlanmıştır. Yaptığımız akciğer kanserine yönelik MLPA tekniğinin kullanıldığı çalışmamız, literatürde önemli bir yer edinecektir.

Çalışmamızda akciğer kanserine yönelik dizayn edilmiş mevcut kitler kullanıldığı için belli kromozom ve gen bölgeleri incelenebilmiştir. Bu prob bölgelerinin dizaynında üretici firma, bugüne kadar yapılan ve literatürde

yayınlanarak akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş bölgeleri dikkate almıştır. Kullanılan problemlerin lokalizasyonları ve gen isimleri Tablo 3 ve Tablo 4’ te belirtilmiştir. Çalışmamız sırasında sadece bu bölgelerin incelenebilir olması bir dezavantaj olarak kabul edilebilir. Fakat yinede yöntem birçok farklı geni bir arada inceleyebilmesi nedeniyle birçok tekniğe göre avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız MS-MLPA tekniği ile, belirli tümör baskılayıcı genler, bazı DNA tamir genleri ve metastaz ve invazyondan sorumlu bazı genlerin metilasyon profilleri de incelenmiştir. MS-MLPA tekniğinde kullanılan problemlerin listesi Tablo 5’ te verilmiştir. MS-MLPA tekniği ile sadece mevcut metilasyon varlığı incelenmiştir. Çünkü üretici firmanın dizayn ettiği kitteki spesifik prob bölgeleri, genlerin genellikle promoter bölgelerine yöneliktir. Bu yüzden genin amplifikasyon ve delesyon paternleri MS-MLPA tekniği ile değil genel MLPA tekniği ile araştırılmıştır.

Akciğer kanserinde birçok genomik değişim tanımlanmıştır. Bunlar büyük kromozom değişimlerinden spesifik genlerdeki nokta mutasyonlarına kadar değişmektedir. MLPA tekniği bu geniş dağılım içerisinde özellikle, tanımlanmış kromozomal değişimlere yönelik bir kit dizaynı yapmıştır. İleriki süreçte belirli genlerdeki spesifik değişimlere yönelik dizayn edilecek yeni problemler ile daha ayrıntılı bir inceleme şansı doğacaktır.

Bu çalışmada amaçlanan, akciğer kanseri tanısı almış hastaların tümör dokuları ile histopatolojik açıdan normal olarak değerlendirilen çevre dokuların DNA örneklerinde MLPA ve MS-MLPA teknikleri ile akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş farklı genlerin promoter bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyon paternleri ve yine farklı gen bölgelerindeki amplifikasyon ve delesyon paternleri açısından değerlendirilmesidir. Çalışmadan çıkan sonuçlar, son yıllarda hız kazanan kanserin erken tanısında çeşitli tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonunun ve amplifikasyon ve delesyonlarının biyomarker olarak kullanımını çalışmalarına da ışık tutacaktır.

Tablo 3. SALSA MLPA 175-A1 Tümör Gain Prob Bölgeleri.

Uzunluk (bp)	SALSA MLPA probe	Kromozomal Pozisyon
64-70-76-82	Q-fragments: DNA control	
118	DHFR probe S0428-L14095	5q14.1
124	AURKA probe S0429-L14094	20q13.31
130	AR probe 01690-L00423	Xq12
136	PDGFRA probe 10247-L10719	4q12
142	CDK4 probe 03173-L02512	12q14
148	ERBB2 probe 00675-L00572	17q12
153	MYC probe 00580-L13856	8q24.12
160	ABLI probe 12502-L13552	9q34.1
166	ALK probe 08324-L08193	2p23.2
172	CCND2 probe 03177-L02516	12p13.3
178	FGFR1 probe 04184-L03583	8p11.2
186	MDM4 probe 03185-L03594	1q32.1
190	AURKB probe 12749-L13865	17p13.1
196	MET probe 10314-L10828	7q31
202	SMO probe 12750-L13866	7q32.1
208	MET probe 10320-L10834	7q31
214	BRAF probe 04260-L14063	7q34
220	EGFR probe 06408-L05383	7p11.2
226	BRAF probe 08780-SP0039-L08904	V600E mutation
232	RET probe 05508-L13858	10q11.2
238	MYC probe 00672-L00169	8q24.12
244	DHFR probe 12753-L13869	5q14.1
250	BRAF probe 10507-L11060	7q34
256	TOP2A probe 01055-L00628	17q21.2
265	CCND1 probe 05401-L04807	11q13
273	CDK4 probe 03174-L12434	12q14
283	MDM2 probe 07179-L06788	12q14.3
292	CCND1 probe 00583-L00148	11q13
301	KDR probe 12755-L14064	4q12
310	ABLI probe 12516-L13566	9q34.1
321	AR probe 12604-L14065	Xq12
328	MDM4 probe 03186-L02525	1q32.1
337	ERBB2 probe 00717-L00390	17q12
346	KIT probe 12756-L14066	4q12
355	CCND2 probe 00498-L00084	12p13.3
364	RET probe 05502-L04925	10q11.2
371	MYCN probe 02572-L09025	2p24.3
382	FGFR1 probe 01046-L01837	8p11.2
391	PDGFRA probe 12762-L13878	4q12
400	SMO probe 12757-L13873	7q32.1
409	MDM2 probe 07180-L06789	12q14.3
418	ALK probe 08323-L08192	2p23.2
427	EGFR probe 02063-L03283	7p11.2
436	MYCN probe 03327-L02466	2p24.3
445	KDR probe 12758-L13874	4q12
454	AURKB probe 12759-L13875	17p13.1
463	CCND1 probe 05402-L04808	11q13
472	KIT probe 12761-L13877	4q12
481	TOP2A probe 01056-L14067	17q21.2
488	AURKA probe 10236-L14068	20q13.2

Tablo 4. SALSA MLPA 294-A1 Tümör Loss Prob Bölgeleri.

Uzunluk (bp)	SALSA MLPA probe	Kromozomal Pozisyon
64-70-76-82	Q-fragments: DNA control	
127	DVLI probe 12057-L04066	1p36.33
133	PTCH probe 09616-L13843	9q22.33
139	TSC2 probe 0 18 19-L13844	16p13.3
144	RB1 probe 02583-L13845	13q14.2
149	DLEU1 probe 0 1062-L00639	13q14.3
154	KIF1B probe 0468 1-L04462	1p36.23
160	CDKN2A probe 0 1524-L13846	9p2 1
166	MIRN15A probe 04019-L03416	13q14.3
172	SMARCB1 probe 08295-L08 109	22q 11.23
178	BRCA2 probe 01599-L13847	13q12.3
184	TSC1probe 02351-L04302	9q34
190	PTENprobe 06729-L06339	10q23.3
196	STK 11probe 03 124-L13848	19p13.3
202	PTCH probe 03709-L03 163	9q22.3
208	BRCA1 probe 00827-L0034 2	17q21.31
214	FHIT probe 02293-L13849	3p 14 .2
220	STK 11probe 03 126-L03339	19p13.3
226	FKBP8 probe 1275 1-L13867	19p 13.11
232	BRCA2 probe 01603-L13850	13q12.3
238	NF1 probe 02519-L01950	17q11.2
244	FAM123B probe 12752-L13868	Xq11.1
251	WTI probe 02755-L13851	11p13
257	TSC1probe 04108-L13904	9q34
263	FKBP8 probe 12754-L1409 1	19p 13.11
270	BRCA1 probe 00830-L14092	17q21.31
276	TP53 probe 02378-L13853	17p13 .1
283	APC probe 11990-L12817	5q2 1
292	TSC2 probe 03 168-L02571	16p13 .3
301	TP53 probe 02262-L0 1496	17p13 .1
310	SMARCB1 probe 08280-L08094	22q11.23
319	TSC1probe 04324-L03897	9q34
328	BRCA1 probe 0282 1-L02250	17q21.31
337	FHIT probe 02290-L0178 1	3p 14.2
346	SMAD4 probe 05143-L04533	18q21.1
355	CDKN2A probe 0 1528-L0603 1	9p2 1
364	PTENprobe 03638-L02945	10q23 .3
372	CAMTA 1probe 04695-L 13854	1p36.3 1
382	APC probe 0 1550-L00993	5q22
391	VHL probe 0 1160-L007 16	3p25.3
400	PTENprobe 03640-L02947	10q23 .3
409	CDKN2B probe 038 14-L03851	9p2 1
418	VHL probe 0 1161-L007 17	3p25.3
427	SMAD4 probe 07800-L07555	18q21.1
436	RB1 probe 0 1798-L0136 1	13q14 .2
445	NF1 probe 04074-L03710	17q11.2
454	TP53 probe 08785-L0 1159	17p13 .1
463	FAM123B probe 12760-L13876	Xq11.1
473	PROM 16 probe 04703-L0408 1	1p36.32
482	WTI probe 02757-L14090	11p13
491	CHDS probe 09114-L09 174	1p36.3

Tablo 5. SALSA ME002 B Probe Bölgeleri.

Uzunluk (bp)	SALSA MLPA probe	HhaI	Kromozom Pozisyonu	Referans Probu İçin	
64-82	Q-fragments: DNA control				
136	CREM probe 00981-	-	10p11.21	Y	Y
140	BRCA1 probe 03296-	+	17q21.3	-	-
148	BRCA2 probe 02285-	+	13q13.1	-	-
154	CFTR probe 02944-	-	7q31.2	Y	Y
160	ATM probe 03023-	+	11q22.3	-	-
168	TP53 probe 02374-	+	17p13.1	-	-
175	PTCH1 probe 03708-	-	9q22.3	Y	Y
183	KLLN probe 03808-	+	10q23.3	-	-
191	MGMT probe 05670-	+	10q26.3	-	-
202	MLH3 probe 01245-	-	14q24.3	Y	Y
208	PAX5 probe 03750-	+	9p13.2	-	-
219	CDH13 probe 02257-	+	16q23.3	Y	-
229	PAH probe 02334-	-	12q23	Y	Y
238	TP73 probe 01684-	+	1p36.3	-	-
247	WT1 probe 02755-	+	11p13	Y	-
256	PMP22 probe 01462-	-	17p12	Y	Y
265	VHL probe 03818-	+	3p25.3	-	-
273	GSTP1 probe 02747-	+	11q13.2	-	-
281	TSC2 probe 01832-	-	16p13.3	Y	Y
292	CHFR probe 02737-	+	12q24.3	Y	-
301	ESR1 probe 02746-	+	6q25.1	-	-
310	CDK6 probe 03184-	-	7q21.3	Y	Y
319	RB1 probe 02734-	+	13q14.2	-	-
328	MSH6 probe 01250-	+	2p16.3	Y	-
337	APC probe 01700-	-	5q22.2	-	Y
346	MGMT probe 13716-	+	10q26.3	-	-
355	THBS1 probe 01678-	+	15q14	Y	-
364	CADM1 probe 03816-	+	11q23	-	-
373	PTEN probe 03638-	-	10q23.3	-	Y
382	STK11 probe 06783-	+	19p13.3	Y	-
390	KLK3 probe 00713-	-	19q13.3	Y	Y
398	PYCARD probe 02252-	+	16p11.2	Y	-
409	PAX6 probe 03749-	+	11p13	Y	-
418	ATM probe 02670-	-	11q23	-	Y
427	CDKN2A probe 01530-	+	9p21.3	-	-
434	GATA5 probe 03752-	+	20q13.3	-	-
445	IL2 probe 00627-L00183	-	4q27	Y	Y
453	RARB probe 04046-	+	3p24.2	Y	-
462	CD44 probe 04500-	+	11p13	Y	-
472	RB1 probe 04502-	+	13q14.2	-	-
483	CASR probe 02683-	-	3q21	Y	Y

- Y metilasyon var, - metilasyon yok

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler

Spektrofotometre(Eppendorf)

Kapiller Elektroforez Cihazı (Beckman Coulter CEQ 8000)

Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)

Mikropipet Takımı (Thermo Scientific)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Bioimagins System MiniLumi)

Elektroforez aleti (Thermo Scientific)

Mikrodalga fırın (Altus)

Therrmomixer (Eppendorf)

Etüv (Nüve)

Vorteks (Thermo)

Deep freze (Regal)

Buzdolabı (Siemens)

Santrifüj tüpleri

PCR Tüpleri (Eppendorf)

Eppendorf tüpü (1,5 ml lik)

Beckman Coulter CEQ yükleme plateleri

Beckman Coulter CEQ Kapiller (33 cm)

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA İzolasyon Kiti (OMEGA bio-tek, E.Z.N.A FFPE DNA Kit)

SALSA MLPA 175-A1 Tümör Gain Probe

SALSA MLPA P294-A1 Tümör Loss Probe

SALSA MLPA ME002B Probe

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (Beckman Coulter)

Hi-Di Formamid (Beckman Coulter)

Mineral Yağ (Roche)

HhaI Restriksiyon Enzimi (Sigma)

Ksilol (Merk-1.08685.2500)

Doku Parçalayıcı Tampon (OMEGA bio-tek, E.Z.N.A Lysis Buffer)

Etanol (95%) (Tekel)

6X Jel Yükleme Tamponu (Sigma)

Agaroz (Sigma)

Etidium Bromid (Sigma)

Proteinaz K (QIAGEN)

Distile Su

Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM)

10X EDTA' lı Buffer (Beckman Coulter)

3.3. Materyal Seçimi

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında, histopatolojik olarak incelenip, “küçük hücre dışı akciğer kanseri” tanısı almış 30 olgu çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış ve Hemotoksilen-Eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleride kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların yaş ve cinsiyetleri hasta dosyalarından temin edilmiştir.

3.4 . Yöntemler

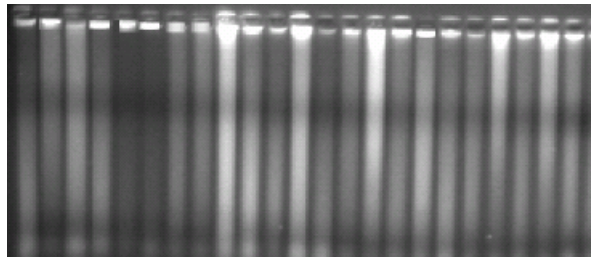
3.4.1. Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu

Omega biotek, E.Z.N.A FFPE DNA ksilen ekstraksiyon metodu ile, parafine gömülü doku örneklerinden, DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protokol:

1. 1 ml ksilen 2' ml lik tüpe konulur.
2. Parafin bloklardan 10 µm' lik kesitler alınarak bu tüpe eklenir ve 20 saniye kadar vortekslenir.
3. 2 dakika maksimum hızda (1400 rpm) ve santrifüj sıcaklığı oda ısısında olacak şekilde santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
4. 1 ml %100' lük etanol eklenir ve vortekslenir.

5. 2 dakika maksimum hızda (1400 rpm) ve santrifüj sıcaklığı oda ısısında olacak şekilde santrifüj edilir süpernatant atılır.
6. Ependorf tüpünün kapağı açılarak, 37 C° ' de 15 dakika kurutulur.
7. 200 µl FTL Buffer ve 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklenir.
8. 55 C°'de yaklaşık 16 saat (overnight) inkübe edilir.
9. 90 C°'de 10 dakika inkübe edilir ve sonrasında kısa santrifüj edilir.
10. 220 µl BL Buffer eklenir ve vortekslenir.
11. 250 µl % 100 etanol eklenir ve vortekslenir.
12. Bu karışım kolumn tüpe transfer edilir.
13. 1000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Toplama tüp atılır ve yeni toplama tüpü alınır.
15. 500 µl HB Buffer eklenir.
16. 1000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
17. Toplama tüpü atılır ve yeni toplama tüpü alınır.
18. 700 µl DNA Wash Buffer eklenir.
19. 1000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
20. Toplama tüp atılır ve yeni toplama tüpü alınır.
21. 18.ve 20. basamaklar tekrarlanır.
22. Kolum tüp 1,5- 2 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne konulur.
23. 50 µl' lik Elution Buffer (70 C°'ye ısıtılmış) eklenir ve oda ısısında 3 dakika beklenir.
24. 1200 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
25. 23-24. basamaklar tekrarlanır.
26. Mikrosantrifüj tüpünde DNA mevcuttur.

Elde edilen DNA örnekleri %1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Elde edilen DNA' lara ait örnek jel görüntüsü Resim 1' de verilmiştir.



Resim 1. Örnek DNA' lara ait %1' lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

3.4.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

3.4.2.1. DNA Denatürasyonu ve SALSA ME002B, SALSA P175-A1 ve SALSA P294-A1 Probe Miksleriyle Hibridizasyonu

- İzole edilen DNA örneklerinden 5 µl alındı.
- Alınan örnekler 200 µl' lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 C°'de 5 dakika Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA' nın denatürasyonu gerçekleştirildi.
- Örnekler 25 C°'ye soğutuldu.
- MLPA buffer ve MLPA Probe Miksleri kullanmadan önce vortekslendi.
- Her reaksiyon için hibridizasyon master mix hazırlandı: 1.5 µl MLPA buffer + 1.5 µl probe mix . Bu karışım hafifçe vortekslendi.
- DNA denatürasyonundan sonra, her örnek tüpüne 3 µl hibridizasyon master mix eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Strip tüplerinin kapakları kapatılarak, Thermal Cycler cihazına yüklendi.
- 95 C°'de 1 dakika inkübasyondan sonra, 16 saat 60 C°'de hibridizasyona bırakıldı.

3.4.2.2. Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu

Hibridizasyon sonrası SALSA ME002B ile yapılan reaksiyon iki ayrı tüpe bölünerek hem standart MLPA reaksiyonu hem de metilasyona spesifik yöntem uygulandı:

- Ligase- 65 master mix hazırlandı: 8,25 µl distile su + 1,5 µl Buffer B + 0,25 µl Ligase-65 enzim.
- Ligase-Digestion master mix hazırlandı: 7,75 µl distile su + 1,5 µl Buffer B + 0,25 µl Ligase-65 enzim + 0,5 µl HhaI
- PCR tüpleri 20 C°'de iken Thermal Cycler cihazından çıkartıldı.
- Her tüpe 3 µl buffer A ve 10 µl distile su eklendi.
- Yeni PCR tüpleri alınarak, bu karışımlardan 10' ar µl bu yeni tüplere aktarıldı.
- Tüpler (eski ve yeni) Thermal Cycler' a kaldırıldı ve program başlatılarak 48 C°'de 1 dakika bekletildi ve bu sıcaklıkta durduruldu.
- 10' ar µl ligase-65 master mix birinci (eski tüp) tüplere ve 10' ar µl ligase-digestion mix ikinci (yeni tüp) tüplere eklendi.
- 48 C°'de 30 dakika inkübasyon devam ettirildi.

- Daha sonra 98 C^o'de 5 dakika bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

Hibridizasyon sonrası SALSA P175-A1 ve SALSA P294-A1 ile yapılan reaksiyon şu şekilde devam ettirildi:

- Her reaksiyon için Ligase- 65 master mix hazırlandı: 25 µl distile su + 3 µl Ligase Buffer A + 3 µl Ligase Buffer eklendi. Bunun üzerine 1 µl Ligase-65 enzim ilave edilerek pipetaj yapıldı.
- Thermal Cycler cihazı başlatılarak 54 C^o'de durduruldu.
- Örnekler cihaza kaldırıldı ve 54 C^o'de iken her tüpe 32 µl Ligase master mix eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Thermal Cycler cihazı programlandı: 15 dakika 54 C^o'de inkübasyon (ligasyon için); 98 C^o'de 5 dakika ligaz- 65 enziminin inaktivasyonu gerçekleştirildi.
- Cihaz 20 C^o'de durduruldu.

3.4.2.3. PCR

Hem standart MLPA reaksiyonları hem de metilasyona spesifik MLPA reaksiyonları ile amplifikasyonları yapılan örnekler aşağıdaki PCR işlemlerine tabi tutuldu:

- SALSA PCR primer mix vortekslendi. Polimeraz çözünmesi için 10 saniye kadar el içinde ısıtıldı.
- Her tüpe eklenmesi için polimeraz master mix hazırlandı: 7,5 µl distile su + 2 µl SALSA PCR primer mix + 0,5 µl SALSA Polymerase. Pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. Kullanıncaya kadar buz üzerinde tutuldu.
- Oda sıcaklığında, her tüpe 10 µl polimeraz mix eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.

- PCR şartları ayarlandı:

Denatürasyon	95 C ^o 'de 30 sn	} 35 döngü
Annealing	60 C ^o 'de 30 sn	
Ekstansiyon	72 C ^o 'de 60 sn	
Final Ekstansiyon	72 C ^o 'de 20 dk	
Pause	15 C ^o	

3.4.2.4. Beckman Coulter CEQ 8000 Cihazına Yükleme

Amplifikasyonu gerçekleştiren örnekler fragment analizi için aşağıdaki protokolle kapiller jel elektroforez cihazına yüklendi.

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 0,7 µl alınarak µl Beckman Coulter CEQ 8000 cihazı yükleme platelerine aktarıldı.
- Üzerlerine:
- 0,2 µl CEQ- Size standart 600
- 32 µl HiDi formamide
- 1 damla mineral yağ eklenerek pipetaj yapılarak homojenize edildi.
- Beckman Coulter CEQ 8000 cihazı yürütme şartları:
- Yürütme metodu: Fragment
- Kapiller sıcaklığı: 50 C°
- Denatürasyon: 90 C° ' de 120 sn
- İnjesiyon voltajı: 1.6 kv
- İnjesiyon zamanı: 30 sn
- Yürütme zamanı: 60 dk
- Yürütme voltajı: 4.8 kv

Cihaz şartları kontrol edilip ayarlanması yapıldıktan sonra örnekler Beckman Coulter CEQ 8000 cihazına yüklenerek, Gene mapper programında okutulmaya başlandı. Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

3.4.2.5. Değerlendirme

Normal MLPA çalışmalarının değerlendirme basamağında, okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları Excel dosyası formatında kaydedilir. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırılır. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları MLPA analiz programlarıyla değerlendirilir.

Spesifik olmayan pik ürünleri kaldırıldıktan sonra, normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldırıldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları MAP MLPA analiz programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontrol olarak kaydedildi. MAP MLPA analiz programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranlarını otomatik

olarak tayin eder. Kontrol olarak kromozomal açıdan normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 3 eksternal kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı.

MAP MLPA analiz programının otomatik pik değerlendirmesi, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0,7-1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgelerin normal dozda olduğu, 0,5-0,7 değerleri arası gri alan, 0,5' den küçük değerlerde delesyon yani doz eksikliği olduğu, 1,3-1,8 arası değerler gri alan, 1,8' den büyük değerler ise amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirlenmektedir.

Gri alan olarak belirlenmiş değer aralıklarındaki bölgeler, MAP MLPA analiz programında yer alan doğrulama bölümünde gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı yönünde tekrar incelenmiştir. Burada elde edilen pik değerlerinin gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerlerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak doğrulanmaktadır. Program tarafından yapılan gri alan doğrulaması ile bu bölgelerin sonuçları, doz oranı 0,7 ve 1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, $\leq 0,7$ değerlerinde bölgede kesin delesyon olduğu, $\geq 1,3$ değerlerinde ise kesin amplifikasyon olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

MS- MLPA yönteminde hasta değerlendirme şekli diğer MLPA problemlerine göre farklılıklar göstermektedir. Normal MLPA çalışmalarının değerlendirilmesinde, çalışma grubu DNA' larından elde edilen pik alanlarının diğer sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla karşılaştırılması büyük önem taşırken, MS- MLPA' da ise pik alan ve büyüklüğü değil, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi önemlidir. MS- MLPA çalışmasında örnekler iki gruba ayrıldı. Bir grupta normal MLPA reaksiyonu gerçekleştirilirken diğerinde metilasyona duyarlı enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda bir örneğe ait iki ayrı reaksiyondan elde edilen ürünlere ait pik görüntüsü elde edildi. Çalışmamızda ayrıca metilasyon değerlendirilmesi de hedeflendiği için enzim ile kesimi yapılmış örneklerle ait pikler analiz edildi. Ancak yöntemin kendi içinde oluşturduğu internal kontrol basamağı olarak ilk etapda enzim ile kesime tabi tutulmamış örneklerle ait pikler incelenerek, araştırılacak genlerin,

prob bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Bu kontrol sonrasında herhangi bir pik kaybı olmayan örnekler ile ikinci aşamaya geçildi.

Değerlendirmenin ikinci aşamasında enzim kesimine tabi tutulmuş örneklerden elde edilen pik görüntüleri incelendi. Kullanılan kit içerisinde kontrol prob bölgeleri bulunmaktadır. Normal koşullarda sadece kontrol bölgelerine ait pikler elde edilir. Prob bölgelerinde metilasyona spesifik endonükleazlara özgü tanıma bölgeleri bulunmadığından enzim ile kesim olmamakta, ligasyona bağlı olarak pikler elde edilmektedir. Bu kontrol bölgelerine ait piklerden başka pik olup olmadığı Genemapper programı ile değerlendirilir. Çalışmamızda kullandığımız metilasyon spesifik bir restriksiyon enzimi olan HhaI, tanıdığı bölgelerin metile olmaması durumunda diziyi keserek, ligasyon oluşmasını engeller. Böylece bu prob bölgesi PCR ile çoğaltılamaz ve pik elde edilemez. Eğer incelenen prob bölgesi metillenmiş ise HhaI enzimi bu prob dizisini kesemez. Kesilmeyen prob bölgesinde ligasyon işlemi gerçekleşir ve ligasyon ile birleştirilen problemler PCR ile amplifiye olur. Amplifiye olan problemlerden da pik elde edilir. Sonuç olarak HhaI enzimi ile kesim işlemine tabi tutulan örnekler incelendiğinde, HhaI enzim kesim bölgesi içermeyen kontrol pikleri dışında saptanan ekstra pikler, karşılık gelen prob bölgesinin dolayısıyla bu proba spesifik gen bölgesinin metile olduğunu ifade etmektedir. Bu kriterler doğrultusunda çalışmamızda örnekler Genemapper programı ile tek tek incelenerek metile olan prob bölgeleri tespit edildi.

4. BULGULAR

Çalışma materyalleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında, histopatolojik olarak incelenmiş ve “ küçük hücre dışı akciğer kanseri” tanısı almış 30 olgu ve aynı olgulara ait 30 kontrol örneği çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve Hemotoksilen- Eozin ile boyanmış arşiv preperatları, yeniden Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre ve TNM sınıflamasına göre evrelendirildi. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Olguların yaşları, cinsiyetleri gibi bilgiler hasta dosyalarından temin edildi.

4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 6’ sı kadın, 24’ ü erkek ‘tir ve yaş ortalaması $59,96 \pm$ olarak saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.

Yaş	N	%
< 39	1	3,3
40-49	3	10
50-59	12	40
60-69	12	40
70 +	2	6,7
Toplam	30	100

Çalışmamızda yer alan küçük hücre dışı akciğer kanseri tanısı almış vakalar histopatolojik olarak, 11’i squamöz hücreli karsinom, 15’i adenokarsinom, 2’si adenosquamöz karsinom, 1’i nöroendokrin karsinom ve 1’i ise sarkomatöz karsinom şeklinde değerlendirilmiştir (Tablo 7). Bu vakaların grade ve TNM sınıflarına göre dağılımları Tablo 8’ de gösterilmiştir. Bu dağılımlara göre vakaların %80’ i Grade III

(Az diferansiye), TNM sınıflaması kriterlerine göre sınıflandırıldığında ise %30' u T2N1M0 olarak saptanmıştır.

Tablo 7. Vakaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları.

Histopatolojik Tanı	N	%
Squamöz	11	36,7
Adenokarsinom	15	50
Adenosquamöz	2	6,7
Nöroendokrin	1	3,3
Sarkomatöz	1	3,3
Toplam	30	100

Tablo 8 . Vakaların Grade' lerine göre dağılımları

Evre	N	%
Grade I(İyi diferansiye)	1	3,3
Grade II(Orta Diferansiye)	5	16,7
Grade III(Az diferansiye)	24	80
Toplam	30	100

Tablo 9 . Vakaların TNM sınıflamasına göre dağılımları

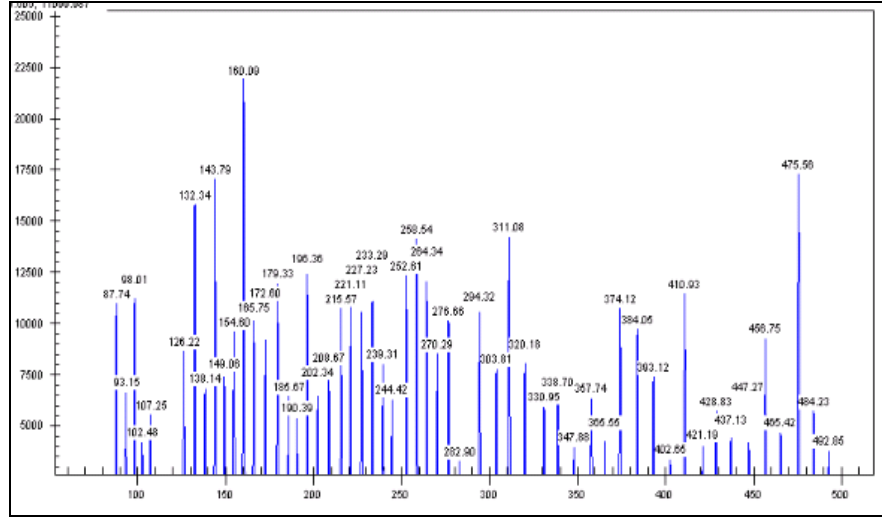
TNM Sınıflaması	N	%
T3N0M0	2	6,7
T3N1M0	6	20
T2N1M0	9	30
T2N0M0	7	23,3
T2N2M0	3	10
T1N0M0	2	6,7
T4N1M0	1	3,3
Toplam	30	100

4.2. Araştırma Grubu Bireylerinin P294 ve P175 Prob Kitleri ile MLPA Bulguları

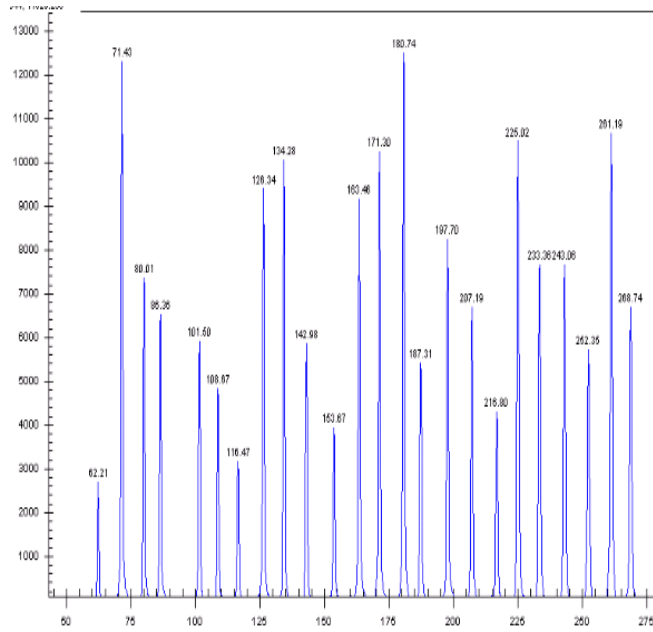
Çalışma grubuna alınan hastaların parafin bloklara gömülü doku örneklerinden elde edilen DNA örneklerin de P175, P294 ve ME002 akciğer kanseri kitleri kullanılarak, MLPA yöntemi çalışılmıştır. Çalışmada Beckman Coulter CEQ 8000 cihazına yüklenen örnekler, Genemapper V.3.7 programı kullanılarak incelenmiştir. Bu programda elde edilen piklerin büyüklükleri kontrol hastaları ile karşılaştırılmak üzere Exel tabanlı MAP MLPA analiz programına aktarılmıştır. Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Kaliteli ve yeterli miktarda (50-500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve non-spesifik olabilmektedir. Çalışmaya alınan 30 tümöral doku ve 30 çevre doku örneklerinde yeterli DNA miktarına bağlı olarak kaliteli pikler elde edildi. MLPA yönteminde kullanılan DNA miktarının düzeyi, prob kitlerinin başlangıcında yer alan D fragmentlerine göre belirlendi. Bu pikler 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda, ligasyon olmasa bile görülen piklerdir. Elde edilen prob piklerine göre bu kontrol piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlenebilmektedir. Buna göre kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse DNA miktarının yeterli olmadığını göstermekte, eğer bu kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyorsa DNA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir.

Her çalışmada sağlıklı olduğu bilinen, sigara içmeyen, ailesinde kanser öyküsü olmayan, bilinen bir kanserojene maruziyeti bulunmayan dört bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Bu kontrol sayısı MLPA yönteminin önerdiği sayıdır. Çalışmada kullandığımız kontrollere ait pik görüntüleri Şekil 9 ve Şekil 10' da gösterilmiştir.

çalışan MAP MLPA analiz programında değerlendirmeye alınır. Bu programda kontrol pikleri ile hasta pikleri karşılaştırılarak bir ortalama değer elde edilir. Bu değer 0.7' nin altında ise delesyon yönünde, 1.3' n üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilir.



şekil 11. Delesyon saptanan hastalardan birine ait pik görüntüleri.



şekil 12. Amplifikasyon saptanan hastalardan birine ait pik görüntüleri.














Çalışılan hasta gruplarından bazı kromozomal bölgelere ait saptanan delesyonların pik area' ları kontrollerin area' ları ile karşılaştırmalı olarak MAP

MLPA analiz programına aktarılmış ve bu şekilde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonuçlarından bazıları aşağıdaki tablolar da verilmiştir.

Tablo 10. Hastalardan birine ait 1p, 3p, 22q delesyon bölgeleri.












































Lengt	SALSA MLPA	Chr#pos	SONUÇ
92	D-fragments	-	0,7914
127	DVL1 probe 12057-L04066	1p36.33	1,7672
133	PTCH1 probe 09616-L13843	9q22.33	0,8199
139	TSC2 probe 01819-L13844	16p13.3	0,9599
144	RB1 probe 02583-L13845	13q14.2	1,819
149	DLEU1 probe 01062-L00639	13q14.3	0,9342
154	KIF1B probe 04681-L04462	1p36.23	0,9697
160	CDKN2A probe 01524-L13846	9p21	0,9342
166	MIR15A probe 04019-L03416	13q14.3	0,7448
172	SMARCB1 probe 08295-L08109	22q11.23	0,9342
179	BRCA2 probe 01599-L13847	13q13.1	0,7899
185	TSC1 probe 02351-L04302	9q34	0,8384
190	PTEN probe 06729-L06339	10q23.3	0,7502
196	STK11 probe 03124-L13848	19p13.3	1,6740
202	PTCH1 probe 03709-L03163	9q22.3	0,9064
208	BRCA1 probe 00827-L00342	17q21.31	0,7856
214	FHIT probe 02293-L13849	3p14.2	0,4222
220	STK11 probe 03126-L03339	19p13.3	1,1514
226	FKBP8 probe 12751-L13867	19p13.11	1,1915
232	BRCA2 probe 01603-L13850	13q13.1	1,0369
238	NF1 probe 02519-L01950	17q11.2	0,7483
244	FAM123B probe 12752-L13868	Xq11.1	2,2069
251	WT1 probe 02755-L13851	11p13	1,2665
257	TSC1 probe 04108-L13904	9q34	1,2309
264	FKBP8 probe 12754-L14091	19p13.11	1,2844
269	BRCA1 probe 00830-L14092	17q21.31	0,9634
275	TP53 probe 02378-L13853	17p13.1	1,2100
283	APC probe 11990-L12817	5q22	1,0858
292	TSC2 probe 03168-L02571	16p13.3	0,7137
301	TP53 probe 02262-L01496	17p13.1	1,6648
310	SMARCB1 probe 08280-L08094	22q11.23	0,4408
319	TSC1 probe 04324-L03897	9q34	1,8780
329	BRCA1 probe 02821-L02250	17q21.31	0,9014
337	FHIT probe 02290-L01781	3p14.2	1,0122
346	SMAD4 probe 05143-L04533	18q21.1	0,7121
356	CDKN2A probe 01528-L06031	9p21	0,8074
364	PTEN probe 03638-L02945	10q23.3	0,8511
373	CAMTA1 probe 04695-L13854	1p36.31	1,1509

Tablo 10. Hastalardan birine ait 1p, 3p, 22q delesyon bölgeleri (devamı).









382	APC probe 01550-L00993	5q22	 0,7047
391	VHL probe 01160-L00716	3p25.3	 1,0703
400	PTEN probe 03640-L02947	10q23.3	 0,8738
409	CDKN2B probe 03814-L03851	9p21	 0,8926
418	VHL probe 01161-L00717	3p25.3	 1,0342
427	SMAD4 probe 07800-L07555	18q21.1	 0,8926
436	RB1 probe 01798-L01361	13q14.2	 0,7854
445	NF1 probe 04074-L03710	17q11.2	 0,8926
454	TP53 probe 08785-L01159	17p13.1	 1,0881
463	FAM123B probe 12760-L13876	Xq11.1	 2,3875
472	PRDM16 probe 04703-L04081	1p36.32	 1,2880
481	WT1 probe 02757-L14090	11p13	 0,7925
490	CHD5 probe 09114-L09174	1p36.31	 0,4222

Tablo 10' da MAP MLPA Analiz programına göre değerlendirilen pik bölgelerinin analiz sonuçları verilmiştir. Bu programa göre delesyon saptanan bölgeler mavi renkte, amplifikasyon saptanan bölgeler kırmızı renkte, normal pik boyutları yeşil renkte ve doğrulamaya girerek sonuçlanan bölgeler gri renkte gösterilmiştir. Gri bölge değerlendirmeleri, program tarafından iki kez ele alındıktan sonra, delesyon ya da amplifikasyon yönünde sonuçlandırılır. Bu şekilde sorunsuz sonuçlanan gri bölgeler, koyu renk ile ifade edilmiştir. Gri bölge sonuçları, 0,5- 0,7 arasında ise delesyon, 1,3- 1,8 arasında ise duplikasyon ve 0,7- 1,3 arasında ise normal olarak değerlendirilir. Bu tabloda hasta grupları arasında en sık karşılaştığımız kesin delesyonlardan olan yani gri bölgeye hiç takılmadan, 0,5 in altında değer veren 1p, 3p, 22 q delesyonları açıkça görülmektedir. Ayrıca, delesyon yönünde olumlu prob kullandığımız halde amplifikasyon (duplikasyon) yönünde de değerlendirilmiş kısımlar mevcuttur. Duplikasyon değerlendirmeleri ileriki kısımlarda ayrıca yapılacaktır.

Tablo 11. Hastalardan birine ait 9p ve 17q delesyon bölgeleri.




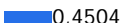









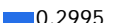











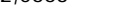















Length	SALSA MLPA probe	Chr#pos	SONUÇ
92	D-fragments	-	 0,6745
127	DVL1 probe 12057-L04066	1p36.33	 0,9938
133	PTCH1 probe 09616-L13843	9q22.33	 0,9881
139	TSC2 probe 01819-L13844	16p13.3	 1,0254
144	RB1 probe 02583-L13845	13q14.2	 1,9853
149	DLEU1 probe 01062-L00639	13q14.3	 0,8574
154	KIF1B probe 04681-L04462	1p36.23	 0,9662
160	CDKN2A probe 01524-L13846	9p21	 0,4267
166	MIR15A probe 04019-L03416	13q14.3	 1,0865
172	SMARCB1 probe 08295-L08109	22q11.23	 1,2091
179	BRCA2 probe 01599-L13847	13q13.1	 0,4221
185	TSC1 probe 02351-L04302	9q34	 1,1157
190	PTEN probe 06729-L06339	10q23.3	 1,1211
196	STK11 probe 03124-L13848	19p13.3	 0,9015
202	PTCH1 probe 03709-L03163	9q22.3	 0,9575
208	BRCA1 probe 00827-L00342	17q21.31	 0,8803
214	FHIT probe 02293-L13849	3p14.2	 0,7485
220	STK11 probe 03126-L03339	19p13.3	 1,0925
226	FKBP8 probe 12751-L13867	19p13.11	 0,9211
232	BRCA2 probe 01603-L13850	13q13.1	 0,9619
238	NF1 probe 02519-L01950	17q11.2	 0,9594
244	FAM123B probe 12752-L13868	Xq11.1	 0,8291
251	WT1 probe 02755-L13851	11p13	 0,7282
257	TSC1 probe 04108-L13904	9q34	 1,1214
264	FKBP8 probe 12754-L14091	19p13.11	 1,1240
269	BRCA1 probe 00830-L14092	17q21.31	 1,1395
275	TP53 probe 02378-L13853	17p13.1	 0,7861
283	APC probe 11990-L12817	5q22	 0,9256
292	TSC2 probe 03168-L02571	16p13.3	 0,8370
301	TP53 probe 02262-L01496	17p13.1	 0,8659
310	SMARCB1 probe 08280-L08094	22q11.23	 0,7173
319	TSC1 probe 04324-L03897	9q34	 1,0172
329	BRCA1 probe 02821-L02250	17q21.31	 0,8148
337	FHIT probe 02290-L01781	3p14.2	 0,9684
346	SMAD4 probe 05143-L04533	18q21.1	 0,9314
356	CDKN2A probe 01528-L06031	9p21	 0,4010
364	PTEN probe 03638-L02945	10q23.3	 1,1273
373	CAMTA1 probe 04695-L13854	1p36.31	 0,8140
382	APC probe 01550-L00993	5q22	 0,9778
391	VHL probe 01160-L00716	3p25.3	 1,1161
400	PTEN probe 03640-L02947	10q23.3	 1,0227
409	CDKN2B probe 03814-L03851	9p21	 1,1541
418	VHL probe 01161-L00717	3p25.3	 0,9749

Tablo 11. Hastalardan birine ait 9p ve 17q delesyon bölgeleri











427	SMAD4 probe 07800-L07555	18q21.1	 0,3964
436	RB1 probe 01798-L01361	13q14.2	 1,0162
445	NF1 probe 04074-L03710	17q11.2	 0,4851
454	TP53 probe 08785-L01159	17p13.1	 0,8697
463	FAM123B probe 12760-L13876	Xq11.1	 0,9624
472	PRDM16 probe 04703-L04081	1p36.32	 0,8441
481	WT1 probe 02757-L14090	11p13	 0,7645
490	CHD5 probe 09114-L09174	1p36.31	 0,7556

Tablo 11' e göre 9q ve 17q bölgelerindeki delesyon açıkça görülmektedir. Bu hastada 13q bölgesine ait duplikasyon da dikkat çekmektedir.

Tablo 12. Hastalardan birine ait 16p, 13q, 9q,10q delesyon bölgeleri.

Length	SALSA MLPA	Chr#po	SONUÇ
92	D-fragments	-	 1,2594
127	DVL1 probe 12057-L04066	1p36.33	 1,1381
133	PTCH1 probe 09616-L13843	9q22.33	 0,9580
139	TSC2 probe 01819-L13844	16p13.3	 0,4504
144	RB1 probe 02583-L13845	13q14.2	 1,1862
149	DLEU1 probe 01062-L00639	13q14.3	 0,8032
154	KIF1B probe 04681-L04462	1p36.23	 0,7147
160	CDKN2A probe 01524-L13846	9p21	 1,0334
166	MIR15A probe 04019-L03416	13q14.3	 0,8138
172	SMARCB1 probe 08295-	22q11.23	 0,8032
179	BRCA2 probe 01599-L13847	13q13.1	 0,4805
185	TSC1 probe 02351-L04302	9q34	 0,4827
190	PTEN probe 06729-L06339	10q23.3	 0,2995
196	STK11 probe 03124-L13848	19p13.3	 0,7955
202	PTCH1 probe 03709-L03163	9q22.3	 0,9298
208	BRCA1 probe 00827-L00342	17q21.31	 0,8758
214	FHIT probe 02293-L13849	3p14.2	 0,9253
220	STK11 probe 03126-L03339	19p13.3	 1,1013
226	FKBP8 probe 12751-L13867	19p13.11	 1,2622
232	BRCA2 probe 01603-L13850	13q13.1	 0,7523
238	NF1 probe 02519-L01950	17q11.2	 1,1013
244	FAM123B probe 12752-	Xq11.1	 1,0060
251	WT1 probe 02755-L13851	11p13	 2,0663
257	TSC1 probe 04108-L13904	9q34	 1,0349
264	FKBP8 probe 12754-L14091	19p13.11	 1,1520
269	BRCA1 probe 00830-L14092	17q21.31	 1,0541
275	TP53 probe 02378-L13853	17p13.1	 1,0224
283	APC probe 11990-L12817	5q22	 0,7893
292	TSC2 probe 03168-L02571	16p13.3	 0,8297
301	TP53 probe 02262-L01496	17p13.1	 1,0524
310	SMARCB1 probe 08280-	22q11.23	 0,7523
319	TSC1 probe 04324-L03897	9q34	 1,1699
329	BRCA1 probe 02821-L02250	17q21.31	 1,0418
337	FHIT probe 02290-L01781	3p14.2	 0,8202
346	SMAD4 probe 05143-L04533	18q21.1	 0,8202
356	CDKN2A probe 01528-	9p21	 0,82024
364	PTEN probe 03638-L02945	10q23.3	 0,7101
373	CAMTA1 probe 04695-	1p36.31	 1,0066
382	APC probe 01550-L00993	5q22	 0,8276
391	VHL probe 01160-L00716	3p25.3	 0,8202
400	PTEN probe 03640-L02947	10q23.3	 0,8515

Tablo 12. Hastalardan birine ait 16p, 13q, 9q,10q delesyon bölgeleri(devamı).

409	CDKN2B probe 03814-L03851	9p21	 0,7101
418	VHL probe 01161-L00717	3p25.3	 0,8202
427	SMAD4 probe 07800-L07555	18q21.1	 0,7754
436	RB1 probe 01798-L01361	13q14.2	 1,1207
445	NF1 probe 04074-L03710	17q11.2	 0,7287
454	TP53 probe 08785-L01159	17p13.1	 0,8067
463	FAM123B probe 12760-L13876	Xq11.1	 1,0517
472	PRDM16 probe 04703-L04081	1p36.32	 0,7754
481	WT1 probe 02757-L14090	11p13	 0,8202
490	CHD5 probe 09114-L09174	1p36.31	 0,8067












Tablo 12' ye göre 16p, 13q, 9q,10q delesyon bölgeleri görülmektedir. Bu hastada 11p bölgesindeki duplikasyon dikkat çekmektedir.

İncelenen hasta grubu içerisinde, 15 hastada 17q bölgesinde ve 22 hastada 9q bölgesinde amplifikasyon saptanmıştır. Bu bölgelere yönelik incelenen prob bölgeleri Tablo 13' te verilmiştir. Bu tabloda amplifikasyon görülen bölgeler kırmızı renk ile gösterilmiştir. Bu alanların diğer kontrollerin pik alanlarına göre karşılaştırıldığında oranın 1,8' in üstünde olması amplifikasyon yönünde değerlendirilmektedir.

Tablo 13. Hastalardan birine ait 9q ve 17q amplifikasyon bölgeleri.

Length	SALSA MLPA	Chr#pos	SONUÇ
92	D-fragments	-	0,7914
118	DHFR probe S0428-L14095	5q14.1	1,1915
124	AURKA probe S0429-L14094	20q13.31	0,8199
130	AR probe 01690-L00423	Xq12	0,9599
136	PDGFRA probe 10247-L10719	4q12	1,1915
142	CDK4 probe 03173-L02512	12q14	1,1915
148	ERBB2 probe 00675-L00572	17q12	0,9697
153	MYC probe 00580-L13856	8q24.12	0,9342
160	ABL1 probe 12502-L13552	9q34.1	0,7448
166	ALK probe 08324-L08193	2p23.2	1,1915
172	CCND2 probe 03177-L02516	12p13.3	0,7899
178	FGFR1 probe 04184-L03583	8p11.2	0,8384
186	MDM4 probe 03185-L03594	1q32.1	0,7502
190	AURKB probe 12749-L13865	17p13.1	1,1915
196	MET probe 10314-L10828	7q31	0,9064
202	SMO probe 12750-L13866	7q32.1	0,7856
208	MET probe 10320-L10834	7q31	1,1915
214	BRAF probe 04260-L14063	7q34	1,1514
220	EGFR probe 06408-L05383	7p11.2	1,1915
226	BRAF probe 08780-SP0039-L08904	V600E	1,0369
232	RET probe 05508-L13858	10q11.2	0,7483
238	MYC probe 00672-L00169	8q24.12	1,1915
244	DHFR probe 12753-L13869	5q14.1	1,2665
250	BRAF probe 10507-L11060	7q34	1,2309
256	TOP2A probe 01055-L00628	17q21.2	2,2069
265	CCND1 probe 05401-L04807	11q13	0,9634
273	CDK4 probe 03174-L12434	12q14	1,2100
283	MDM2 probe 07179-L06788	12q14.3	1,0858
292	CCND1 probe 00583-L00148	11q13	0,7137
301	KDR probe 12755-L14064	3q12	1,2844
310	ABL1 probe 12516-L13566	9q34.1	1,8780
321	AR probe 12604-L14065	Xq12	1,2100
328	MDM4 probe 03186-L02525	1q32.1	0,9014
337	ERBB2 probe 00717-L00390	17q12	1,0122
346	KIT probe 12756-L14066	4q12	0,7121
355	CCND2 probe 00498-L00084	12p13.3	0,8074
364	RET probe 05502-L04925	10q11.2	0,8511
371	MYCN probe 02572-L09025	2p24.3	1,1509
382	FGFR1 probe 01046-L01837	8p11.2	0,7047
391	PDGFRA probe 12762-L13878	4q12	1,0703

Tablo 13. Hastalardan birine ait 9q ve 17q amplifikasyon bölgeleri (devamı).

400	SMO probe 12757-L13873	7q32.1	 0,8926
409	MDM2 probe 07180-L06789	12q.14.3	 1,0342
418	ALK probe 08323-L08192	2p23.2	 1,0342
427	EGFR probe 02063-L03283	7p11.2	 0,8926
436	MYCN probe 03327-L02466	2p24.3	 0,7854
445	KDR probe 12758-L13874	4q12	 0,8926
454	AURKB probe 12759-L13875	17p13.1	 1,0881
463	CCND1 probe 05402-L04808	11q13	 0,7925
472	KIT probe 12761- L13877	4q12	 ,2880
481	TOP2A probe 01056-L14067	17q21.2	 0,7925
488	AURKA probe 10236-L14068	20q13.2	 0,8926

Çevre akciğer dokusu ve tümöral dokudan elde edilen DNA' lar ayrı ayrı MLPA yöntemi ile incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. Akciğer kanserli tümöral dokudan ve çevre akciğer dokularından elde edilen MLPA sonuçları.

Kromozomal Bölge	Tümöral Doku				Çevre Doku			
	Sayı	Delesyon (%)	Sayı	Amplifikasyon (%)	Sayı	Delesyon (%)	Sayı	Amplifikasyon (%)
1p	20	66,6	18	60
3p	11	36,6	10	33,3
5q	3	10	6	20	5	16,6	5	16,6
9p	11	36,6	20	66,6
9q	11	36,6	25	83,3	3	10	23	76,6
10q	17	56,6	13	43,3	13	43,3	13	43,3
11p	5	16,6	6	20
13q	22	73,3	7	23,3
16p	5	16,6	11	36,6
17p	4	13,3	5	16,6	4	13,3	2	6,6
17q	7	21	23	76,6	7	23,3	19	63,3
18q	5	16,6	6	20
19p	6	20	5	16,6
22q	23	76,6	20	66,6
Xq	4	13,3	8	26,6	4	13,3	5	16,6

Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde, akciğer kanserli tümöral dokularda en sık 22q, 13q, 1p ve 10q delesyonları; 9q ve 17q amplifikasyonları görülmüştür. Tümör çevresi akciğer dokularından yapılan çalışmalarda ise, tümöral dokulara benzer sıklıkta sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 15. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının Grade' lere göre dağılımları.

	1p	3p	5q	9p	9q	10q
Grade	0	0	0	0	0	0
1	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)
Grade	7	3	0	4	7	10
2	(%39)	(%37)	(%0)	(%57)	(%64)	(%53)
Grade	11	5	2	3	4	9
3	(%61)	(%63)	(%100)	(%43)	(%36)	(%47)

	11p	13q	16p	17p	17q	18q
Grade	0	0	0	0	0	0
1	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)
Grade	2	9	3	1	3	4
2	(%50)	(%47)	(%60)	(%50)	(%50)	(%80)
Grade	2	10	2	1	3	1
3	(%50)	(%53)	(%40)	(%50)	(%50)	(%10)

	19p	22q	Xq
Grade 1	0	1	0
	(%0)	(%4)	(%0)
Grade 2	1	10	2
	(%33)	(%48)	(%67)
Grade 3	2	10	1
	(%67)	(%48)	(%33)

Tablo 16. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının Grade' lere göre dağılımları.

	5q	9q	10q	17p	17q	Xq
Grade	0	0	0	0	0	0
1	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)	(%0)
Grade	0	1	0	0	2	0
2	(%0)	(%10)	(%0)	(%0)	(%18)	(%0)
Grade	4	9	3	2	9	3
3	(%100)	(%90)	(%100)	(%100)	(%82)	(%100)

Tablo 17. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının T1, T2, T3 ve T4' lü olgulara göre dağılımları.

	1p	3p	5q	9p	9q	10q
T1	1 (%6)	2 (%22)	0 (%0)	2 (%29)	2 (%18)	1 (%5)
T2	11 (%60)	5 (%56)	1 (%50)	3 (%43)	7 (%64)	12 (%63)
T3	5 (%28)	1 (%11)	0 (%0)	1 (%14)	2 (%18)	5 (%27)
T4	1 (%6)	1 (%11)	1 (%50)	1 (%14)	0 (%0)	1 (%5)

	11p	13q	16p	17p	17q	18q
T1	1 (%25)	1 (%5)	1 (%20)	1 (%50)	2 (%40)	1 (%17)
T2	3 (%75)	12 (%64)	2 (%40)	1 (%50)	1 (%20)	4 (%66)
T3	0 (%0)	4 (%21)	2 (%40)	0 (%0)	1 (%20)	1 (%17)
T4	0 (%0)	2 (%10)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%20)	0 (%0)

	19p	22q	Xq
T1	1 (%34)	4 (%19)	2 (%50)
T2	2 (%66)	13 (%62)	2 (%50)
T3	0 (%0)	4 (%19)	0 (%0)
T4	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Tablo 18. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının T1, T2, T3 ve T4' lü olgulara göre dağılımları.

	5q	9q	10q	17p	17q	Xq
T1	1 (%14)	1 (%4)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%5)	1 (%10)
T2	5 (%72)	16 (%61)	8 (%73)	2 (%67)	16 (%73)	6 (%60)
T3	1 (%14)	7 (%27)	3 (%27)	1 (%33)	5 (%22)	2 (%20)
T4	0 (%0)	2 (%8)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%10)

Tablo 19. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının N0, N1 ve N2' li olgulara göre dağılımları.

	1p	3p	5q	9p	9q	10q
N0	5 (%29)	2 (%22)	0 (%0)	2 (%29)	6 (%54)	3 (%15)
N1	9 (%53)	5 (%56)	0 (%0)	5 (%71)	5 (%46)	14 (%73)
N2	3 (%18)	2 (%22)	2 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%12)

	11p	13q	16p	17p	17q	18q
N0	1 (%25)	2 (%11)	4 (%80)	1 (%50)	2 (%34)	0 (%0)
N1	2 (%50)	15 (%78)	1 (%20)	1 (%50)	4 (%66)	4 (%80)
N2	1 (%25)	2 (%11)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%20)

Tablo 19. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının N0, N1 ve N2' li olgulara göre dağılımları (devamı).

	19p	22q	Xq
N0	2 (%50)	10 (%48)	1 (%34)
N1	2 (%50)	10 (%48)	2 (%66)
N2	0 (%0)	1 (%4)	0 (%0)

Tablo 20. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının N0, N1 ve N2' li olgulara göre dağılımları.

	5q	9q	10q	17p	17q	Xq
N0	4 (%67)	8 (%30)	6 (%54)	2 (%50)	13 (%59)	5 (%22)
N1	2 (%33)	18 (%66)	5 (%46)	1 (%25)	9 (%41)	8 (%35)
N2	0 (%0)	1 (%4)	0 (%0)	1 (%25)	0 (%0)	10 (%43)

Tablo 21. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının M0, M1 ve M2' li olgulara göre dağılımları.

	1p	3p	5q	9p	9q	10q
M0	16 (%100)	9 (%100)	2 (%100)	7 (%100)	11 (%100)	20 (%100)
M1	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
M2	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Tablo 21. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen delesyon sonuçlarının M0, M1 ve M2' li olgulara göre dağılımları (devamı).

	11p	13q	16p	17p	17q	18q
M0	4 (%100)	19 (%100)	5 (%100)	2 (%100)	6 (%100)	5 (%100)
M1	0 (%0)	0(%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
M2	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

	19p	22q	Xq
M0	4 (%100)	22 (%100)	3 (%100)
M1	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
M2	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Tablo 22. Akciğer kanserli tümöral dokulardan elde edilen amplifikasyon sonuçlarının M0, M1 ve M2' li olgulara göre dağılımları.

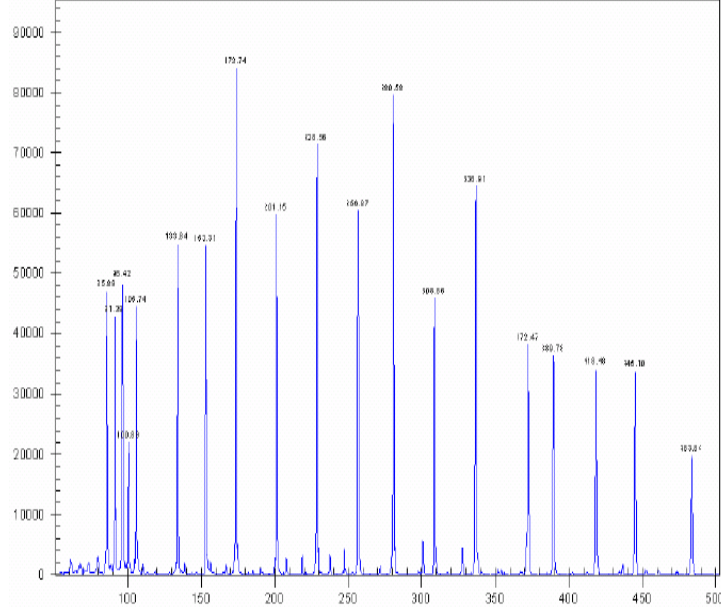
	5q	9q	10q	17p	17q	Xq
M0	7 (%100)	26 (%100)	11 (%100)	4 (%100)	22 (%100)	9 (%100)
M1	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
M2	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

Yukarıdaki tablolarda tümör dokularından elde edilen sonuçlar olguların grade ve TNM sınıflamalarına göre dağılımlarını göstermektedir. Bu sonuçlar örnek sayısının az olmasından dolayı istatistiksel açıdan değerlendirilemedi. Fakat T2 ve N1' li olgularda delesyon sıklığındaki artış dikkati çekmektedir.

4.3. Metilasyona Duyarlı *HhaI* Endonükleaz Kesim Sonuçları

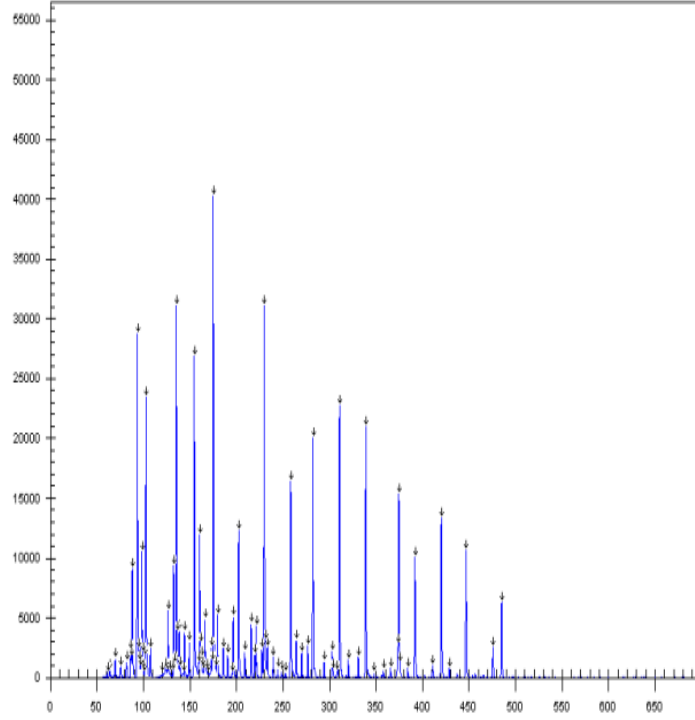
Çalışmaya dahil edilen olgulara, *HhaI* metilasyon spesifik enzimi ile muamele edildikten sonra, pik görüntüleri elde edildi. Çalışılan tümöral ve sağlıklı akciğer

doku örneklerinin dördünde (%6,6) incelenen tüm prob bölgelerinde normal metilasyon profilleri saptandı. Normal metilasyon profiline sahip hastalardan elde edilen pik görüntüleri Şekil 13’ de gösterilmiştir.



Şekil 13. Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü.

Bu çalışmamızda, metilasyon spesifik MLPA tümör baskılayıcı gen bölgelerinin incelendiği olguların sekizinde (%13,3) hem tümöral hem de histopatolojik olarak sağlam görülen akciğer doku örneklerinde metilasyon varlığı saptandı. Bu grupta incelenen hastalarda, hem tümöral hem de çevre dokusunda aynı gen mutasyonunun varlığı dikkat çekti. Bu genlerden ATM’ ye ait pik görüntüsü Şekil 14’ te verilmiştir.



Şekil 14. ATM genine ait metilasyon spesifik MLPA görüntüsü.

Çalışmamızdaki diğer metilasyon sonuçları, tümöral bölgelerde metilasyonu bulunan fakat çevre dokularda metilasyon bulunmayan altı (%10), tümöral dokularda metilasyonu bulunmayıp, çevre dokularında metilasyon bulunan ondört (%23,3) olgu şeklinde saptanmıştır.

Çalışılan gen bölgelerinde, hem tümöral hem de çevre dokuların tamamında en fazla sıklıkta saptanan ATM genidir. Bu gen bölgesindeki metillenme, tüm çalışmada 27 (%45), tümöral dokularda 11 (%36,7), ve çevre dokularda 16 (%53,3) bulunmuştur.

Çalışmadaki genlerin metilasyon sıklıkları tümöral doku ve çevre akciğer dokularındaki sıklıkları Tablo 23' te verilmiştir.

Tablo 23. Çevre ve tümöral dokularda saptanan metilasyon sıklıkları.

Prob Bölgesi	Tümöral Dokularda Saptanan Metilasyon Oranı		Çevre Dokularda Saptanan Metilasyon Oranı (%)	
	Sayı	%	Sayı	%
<i>ATM</i>	11	36,7	16	53,3
<i>TP53</i>	3	10	6	20
<i>KLLN</i>	1	3,3
<i>MGMT</i>	2	6,6	3	10
<i>PAX5</i>	1	3,3
<i>CDH13</i>	4	13,3	5	16,6
<i>WT1</i>	1	3,3
<i>BRCA2</i>	1	3,3	1	3,3
<i>VHL</i>	1	3,3	3	10
<i>RBI</i>	1	3,3	3	10
<i>CDH12</i>	1	3,3
<i>ESRI</i>	1	3,3
<i>BRCA1</i>	1	3,3
<i>GSTP1</i>	2	6,6
<i>MSH6</i>	1	3,3

Tablo 23 incelendiğinde, akciğer kanserli tümöral dokularda ve çevre akciğer dokularında birbirlerine yakın oranlarda en sık *CDH13*, *MGMT* ve *BRCA2* prob bölgelerinde metilasyon görülmüştür. Tüm çalışma gruplarında en fazla metilasyon görülen prob bölgesi *ATM*' dir. *TP53* prob bölgesindeki metilasyon sıklığı ise iki çalışma grubunda, tümöral dokularda çevre dokulardaki metilasyona göre iki kat daha fazladır. Bunlara ek olarak tümöral ve çevre dokularında *VHL* ve *RBI* prob bölgelerinde metilasyon saptandı. *KLLN*, *PAX5* ve *WT1* prob bölgelerindeki metilasyonlar sadece tümöral dokularda saptanmıştır. *CDH12*, *ESRI*, *BRCA1*, *GSTP1* ve *MSH6* prob bölgelerindeki metilasyon ise sadece çevre dokularda saptanmıştır.

Olgularda saptanan metilasyon oranlarının TNM sınıflamasına göre daha sağlıklı bir biçimde karşılaştırabilmek için, T, N ve M' nin her biri ayrı ayrı metilasyon oranları ile değerlendirilmiştir.

Tablo 24. TNM sınıflamasına göre tümöral dokulardaki metilasyon sıklıkları.

Tümör Dokularında		
	Metilasyon Saptanan	Toplam Olgu
	Toplam Prob Bölge Sayısı	Sayısı
T1	7	2
T2	13	19
T3	5	8
T4	1	1
N0	15	11
N1	10	16
N2	1	3
M0	26	30

Tablodaki oranlara göre tümöral dokularda, T2 (%50) olgularda, T1 (%27) , T3 (%19) ve T4 (%4) olgulara oranla belirgin bir şekilde daha sık metilasyon saptanmıştır. N0 (%58) olgulardaki metilasyon ise, N1 (%38) ve N2 (%4) olgulardan daha fazladır. Metastaz yönünden değerlendirilen olguların tümü M0 olarak raporlanmış ve 26 prob bölgesinde metilasyon saptanmıştır.

Tablo 25. TNM sınıflamasına göre çevre dokularda saptanan metilasyon sıklıkları.

Çevre Dokularda		
Metilasyon Saptanan		Toplam Olgu Sayısı
Toplam Prob Bölge Sayısı		
T1	2	2
T2	31	19
T3	11	8
T4	0	1
N0	17	11
N1	21	16
N2	2	3
M0	44	30

Çevre dokularda, tümöral dokulara benzer şekilde, T2 (%70) olgularında T1 (%5) ve T3' e (%25) göre daha fazla sıklıkta metilasyon saptanmış ve tümöral olgulardan farklı olarak T4 bölgesinde her hangi bir metilasyona rastlanmamıştır. Yine çevre dokularda, N1 (%70) olgularda saptanan metilasyon N0 (%57) ve N2 (%7) olgulara göre daha fazladır. Çevre dokularda da metastaz yönünden değerlendirilen örneklerin hepsi M0 olarak raporlanmış ve bu olgularda 44 prob bölgesinde metilasyona rastlanmıştır. Kanseri doku ve çevre dokuların geneline bakılacak olursa, çevre dokulardaki metilasyon oranı tümöral dokulardakilerden daha fazla sıklıktadır.

Çalışmaya dahil edilen olguların gradeleri Grade 1 (İyi diferansiye), Grade 2 (Orta derecede diferansiye) ve Grade 3 (Az diferansiye) olarak gruplandırıldı. Araştırılan prob bölgelerindeki metilasyon sıklıkları ile olguların evreleri Tablo 22' de verilmiştir. Az diferansiye olarak isimlendirilen (Grade 2) olguların sıklıkları çalışmamızda daha fazla sıklıkta saptandı.

Tablo 26. Evrelere göre saptanan metilasyon sıklıkları.

		Tümör dokularında saptanan metilasyon sıklığı	Çevre dokularda saptanan metilasyon sıklığı
ATM	1	0	1
	2	3	3
	3	9	12
TP53	1	0	0
	2	1	2
	3	3	3
KLLN	1	0	0
	2	0	0
	3	1	0
MGMT	1	0	0
	2	1	1
	3	1	2
PAX5	1	0	0
	2	0	0
	3	1	0
CDH13	1	1	0
	2	0	0
	3	3	5
WT1	1	0	0
	2	0	0
	3	1	0
BRCA2	1	0	0
	2	1	0
	3	0	1
VHL	1	0	0
	2	1	0
	3	0	3
RB1	1	0	0
	2	0	1
	3	2	2
CDH12	1	0	0
	2	0	0
	3	0	1
ESRI	1	0	0
	2	0	0
	3	0	1
BRCA1	1	0	0
	2	0	0
	3	0	1
GSTP1	1	0	0
	2	0	1
	3	0	1
MSH6	1	0	0
	2	0	0
	3	0	1

5. TARTIŞMA

Kanserin günümüzde hala en önemli sağlık problemlerinin başında gelmesinden, mortalite ve sıklığının yüksek olmasından dolayı, üzerindeki çalışmalar yoğun bir şekilde sürmektedir. Kanseri etyolojisinin aydınlatılması, erken tanı ve tedaviye yönelik araştırmalar bu konuda oldukça önemlidir. Kanseri temelinin kökeninde genetik değişikliklerinde yattığının kabul görmesinden beri bu çalışmalar genetik alt yapı üzerinde de yoğunlaşmıştır. Akciğer kanserinin genetik etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik bugüne kadar yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar farklı teknikler ve farklı dokularla literatürde yerini almıştır. Bu çalışmalarla birlikte akciğer kanserine ilişkin birçok gen tanımlanmış ve hala da tanımlanmaya devam etmektedir (Tepeli E. 2007, Uludağ A. 2007).

5.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Elde Etme Protokollerinin Karşılaştırılması

Genel olarak DNA tabanlı genetik çalışmada, en çok zorlanılan, zaman alan ve tekrarlanması gereken basamak DNA izolasyon basamağıdır. Yaptığımız MLPA çalışmada, kullanmış olduğumuz DNA kaynağı parafine gömülü akciğerli dokulardır. Bu dokulardan DNA izolasyonunun gerçekleştirilebilmesi ve parafinsiz bir şekilde kaliteli DNA elde edilebilmesi için, öncelikle parafini dokudan uzaklaştırmak gerekir. Bu tarz kaynak kullanılan ve literatürde de belirtilen yöntemler mevcuttur. Fakat çoğu çalışmada DNA izolasyonu sırasında kullanılan kimyasallar belirtilmez. Biz çalışmamıza başlamadan önce, hem zaman kaybını önlemek hem de kit sarfından kaçınmak için, parafin dokulardan DNA izolasyon protokollerini karşılatırdık ve en sık kullanılan yöntemleri kendi içinde değerlendirdik. Tepeli (2007) yılında yaptığı bir çalışmada parafine gömülü dokulardan DNA elde etmiştir. Bu çalışmanın ayrıntısına baktığımızda onun birkaç yöntemi denediğini ve o yöntemlerin içinden en uygun olanı bulduğunu tespit ettik. Tepeli bu çalışmada, parafine gömülü dokulardan DNA eldesinde öncelikle parafin kesitleri 50µl proteinaz K digestion tamponunda 55°C' de 24 saat inkübasyona bırakma yöntemini denemiştir. Bu yöntem sonucunda istenen miktarda DNA elde edememiştir. Tepeli, dokuları sadece proteinaz K solüsyonunda beklettikten sonra DNA eldesi denemiş ve bu kez hiç DNA elde edememiştir. Tepeli'nin diğer bir denemesi de, parafin dokuları ksilol deparafinizasyonu ve proteinaz K

solüsyonunda bekleterek DNA izolasyon denemesidir. Bu yöntem sonucunda yeterli kalitede DNA izolasyonu gerçekleştirmiştir. Buna benzer bir yöntemi Tanaka ve arkadaşları da kullanmış ve verimli sonuçlar elde etmişlerdir (Tanaka ve ark., 2005).

Akça ve arkadaşları KHDAK' lerinde yaptıkları bir çalışmada, parafine gömülü dokulardan yine ksilen ve devamında proteinaz K yöntemini kullanmışlardır (Akça ve ark., 2013). Biz bu literatür verilerini dikkate alarak MLPA çalışmamızda DNA izolasyonu için, ksilen ile deparafinizasyon ve sonrasında proteinaz K ile inkübasyon metodunu uyguladık. Elde edilen DNA miktarı ve görüntüleri bizi DNA izolasyonu için geri döndürmeyecek derecede yeterliydi.

Elde edilen DNA miktarı literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında, doku tipine göre değişkenlik gösterdiğini doğrular. Akciğer dokusu diğer dokulara göre hava boşlukları nedeniyle farklı bir hücresel dizilime sahiptir. Bundan dolayı diğer dokulara nazaran DNA eldesi daha az olmaktadır. Hele hele parafin bloklara gömülü haldeyse, çalışanın işini biraz daha zorlaştırmaktadır. Çünkü parafin akciğerdeki bu hava boşluklarına gömülmekte ve oradan uzaklaştırılması zor olmaktadır. Zaten yapısal olarak DNA miktarının az olduğu böyle bir dokuya, bir de parafin eklenmişse, bunun için DNA izolasyonu daha dikkatli yapılmalıdır.

Biz çalışmamızda Omega biotek, E.Z.N.A FFPE DNA ksilen ekstraksiyon metodu ile, parafine gömülü doku örneklerinden, DNA izolasyonu gerçekleştirdik. Yöntem kısmında belirtildiği şekilde işlemler ilerledi. Burada kullanılan ksilen alkol ile uzaklaştırıldı. Bu işlemler sonucunda yeterli miktarda ve kaliteli DNA' lar elde edildi. DNA' nın kalitesi ve miktarı, agaroz jeldeki görüntüler ve MLPA' nın kendi içinde dizayn ettiği sentetik problemlerle karar verildi. Agaroz jel elektroforezinde bazı DNA' larda smear görüntüsünün alınma sebebinin, formalinin DNA' da kırıklar oluşturabildiğinden kaynaklandığına karar verildi.

5.2. Amplifikasyon ve Delesyon Durumlarının Değerlendirilmesi

MLPA yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmada kromozom 1p, 1q, 2p, 3p, 4q, 5q, 7p, 7q, 8p, 8q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 12p, 12q, 13q, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20q, 22q ve Xq bölgelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu değişimler içinde, tümöral dokulardaki özellikle 1p, 10q, 13q ve 22q başta olmak üzere 3p, 9p ve 9q bölgelerinde saptanan delesyonlar ve yine 9q, 17q bölgelerindeki amplifikasyonlar dikkat çekicidir.

Bugüne kadar akciğer kanserlerindeki genetik değişiklikler birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bu çalışmalar farklı teknikler ve farklı gen bölgeleri ile yapılmıştır.

Dacic S ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada, akciğer adenokarsinomlu 20 hastaya ait parafin dokularından izole ettikleri DNA örneklerinde, 1p, 3p, 5q, 9p, 9q, 10q, 17p ve 22q bölgelerinde mikrosatellit markerlar kullanarak değişimleri incelemişler ve özellikle 3p bölgesinde heterozigozite kaybı bulmuşlardır.

Yan ve ark. (2005) yılında Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH) yöntemi kullanarak akciğer tümör dokularında genomik değişiklikleri incelemişler ve %56,4 oranıyla 3p, %53,8 ile 5q ve %51,3 oranıyla 13q bölgelerinde delesyon saptamışlardır.

Çalışmamızda 22q delesyonu en yüksek oranda saptanan delesyondur (%76,6). 22q11.23 bölgesinde lokalize olan *SMARCB1* geni bulunmaktadır. Bu gen bölgesine yönelik olan problr kullanılarak yapılan bu çalışmada sıklığı en fazla bulunan delesyon olmasına rağmen, literatür de akciğer kanserli vakalarda 22q değişimlerini inceleyen çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu kromozom bölgesine ait çalışmalara astrositoma (beyin kanserleri) ve konjenital kalp yetmezliği ile ilgili araştırmalarda rastlanmaktadır (Hartmann C ve ark., 2004). Bu genin KHDAK' lerindeki rolü henüz bilinmemektedir. Bu bölge ile ilgili çalışma karşımıza çıkmadığı için diğer literatür bilgileriyle karşılaştırılamamıştır. Yine çalışmamızda 22q bölgesi delesyonları, sağlıklı çevre akciğer dokularında da ikinci sıklıkta (%66,6) karşımıza çıkmaktadır. Elde ettiğimiz verilerin bundan sonra yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.

13q delesyonu çalışmamızda akciğer kanserli tümöral dokular arasında, ikinci sıklıkta elde ettiğimiz veriler arasındadır (%73,3). Yine sağlıklı çevre dokularında da %23,3 oranıyla tespit edilmiştir. Özellikle prostat ve meme kanserleriyle ilgili yapılan çalışmalarda araştırılan bölge olmasına rağmen, son yıllarda araştırma sayısında artış dikkati çekmektedir. 13q14.2 kromozom bölgesinde *RBI* geni, 13q14.3 bölgesinde *DLEU1* geni, 13q12.3 bölgesinde ise *BRCA2* geni bulunmaktadır. *RBI* ve *BRCA2* geni kanserin genomik araştırmalarında kullanılan en sık genlerden biridirler. *RBI* gen bölgesindeki delesyon hemen hemen tüm kanser türlerinde sık karşılaşılan delesyonlardan biridir. Kwong F ve arkadaşlarının (2003) yılında yaptığı bir çalışma sonucuna göre 13q14.3 bölgesine ait allel kaybını %16,7

gibi bir oranla beklenenden daha az sayıda bulmuşlardır (Kwong F ve ark., 2002). Bu çalışmanın tam aksi olarak Reissman, *RBI* geninin KHDAK' lerinde inaktif olduğunu göstermiştir (Reissmann PT ve ark., 1993).

Diane A ve arkadaşlarının (2014) yılında meme, prostat ve akciğer kanserlerindeki içine alan bir çalışma sonucuna göre, *BRCA2* geninde delesyonlar ortaya konmuştur.

DLEU1 genine ait çalışmalar literatürde mevcuttur fakat akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş bir çalışma mevcut değildir. Bu gene ait metilasyon araştırmaları daha sıktır ve metilasyon araştırmaları sırasında da özellikle lösemi çalışmalarında delesyonuna rastlanmıştır (Garding A ve ark., 2013).

1p delesyonu çalışmamızda %66,6 oranıyla üçüncü en sık bulduğumuz delesyondur ve sağlıklı çevre dokularında da bu oran %60 gibi bir oranla o grupta sık gözlenen delesyonlar arasındadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda akciğer kanserlerinde 1p delesyonları belirgin bir şekilde araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız prob bölgeleri, 1p36.33 kromozom bölgesinde *DVLI*, 1p36.23 kromozom bölgesinde *KIF1B*, 1p36.31 kromozom bölgesinde *CAMTA1*, 1p36.32 kromozom bölgesinde *PRDM16* ve 1p36.31 kromozom bölgesinde ise *CHD5* genlerini içermektedir. Bu genler değişik kanser türlerinde araştırılmıştır. 1p36 delesyon sendromu olarak bilinen durum özellikle kanser araştırmalarında önemli bir yer edinmiştir. İnsanlarda sık görülen sendromlar arasındadır. Karakteristik olarak kardiomyopati ile birlikte. Bu sebepten dolayı özellikle kardiovasküler hastalıkların genetik tabanlı araştırmalarında öne çıkmaktadır. Kardiomyopatilerde *PRDM16* gen bölgesinin araştırılması literatürde mevcuttur (Arndt ve ark., 2013).

1p36 kromozom bölgesinin değişik yerlerinde lokalize olan *KIF1B* geni hepatosellüler karsinoma, *CAMTA1* geni nöroblastoma gibi hastalıklarda çalışılmış ve delesyon durumları gözlemlenmiştir (Tong ve ark. 2014, Henrich ve ark. 2007).

CHD5 geni 1p36.31 kromozomal bölgeye yerleşmiş ve Chromodomain helicase DNA binding protein 5 olarak adlandırılan tümör süpresör regülatör genlerdendir. Zhao ve ark. (2011) yılında MLPA yöntemi kullanarak akciğer kanserli olgularda yaptıkları çalışmada bu gene ait delesyonları saptamışlardır. Bazı vakalarda ise bu gene ait duplikasyonlarda saptamışlardır.

Biz 1p delesyon sonuçlarımızı benzer literatür çalışmaları olmadığı için istatistiksel olarak karşılaştıramadık. Bu çalışmamız bu yüzden literatüre ışık tutacak ve yeni geliştirilecek çalışmalar için kaynak olacaktır.

PTEN geni kromozom 10q23.3 bölgesine yerleşmiş squamoz hücreli karninoma ve endometrial karsinoma gibi kanser türlerinde heterozigosite kaybı ile karakterize bir gen dir. *PTEN* ürünleri lipit fosfataz metabolizmasında görev alır. Marsit ve ark. (2005) yılında KHDAK' lerinde yaptıkları bir çalışmada %19 oranında bu gen ürünü proteinin kaybını gözlemlemişlerdir. Biz çalışmamızda %56,6 olan yüksek bir oranda 10q delesyonu saptadık.

PTEN genindeki mutasyonların *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS* ve *TP53* mutasyonları ile ilişkisinin KHDAK' lerinde gösterildiği bir çalışmada %4,5 oranında *PTEN* mutasyonu saptadılar. Bu çalışmada, *PTEN* mutasyonlarının sadece *EGFR* mutasyonları ile birlikteliğini gösterdiler. *KRAS*, *ERBB2* ve *TP53* mutasyonları arasında bir ilişki kuramadılar (Jin ve ark., 2010). Bizim çalışma problemlerimiz içinde bu genler yer almadığı için bu karşılaştırmayı yapamadık. Bizim çalışmamızda tümöral dokularda %56,6 sıklığıyla *PTEN* delesyonu saptadığımız olgularda, *BRCA2* ve *SMARCB1* delesyonları da gözlemlendi. Sağlıklı çevre dokularında da bu gen % 43,3 olarak saptandı. Akciğer kanserleriyle ilgili yapılacak olan bu tarz çalışmalar da, bizim bulduğumuz delesyonlar ve diğer gen bölgeleriyle olan durumları göz önünde bulundurulması açısından önem taşımaktadır.

CDKN2A ve *CDKN2B* gen bölgeleri kromozom 9p21 bölgesine yerleşmiştir. Cyclin- dependent kinase inhibitörü olan proteinleri kodlayan tümör süpressör genlerdendir. Kardiovasküler hastalıklar başta olmak üzere heterozigosite kaybını araştıran, literatürde birçok çalışma mevcuttur. FISH gibi kromozom analiz yöntemleriyle gösterilen bu çalışmalar dışında, MLPA gibi PCR tabanlı yöntemlerin kullanıldığı çalışma çok az sayıdadır. Malignant melonomalarda da bu tarz çalışmalar yapılmış ve 9p21 kromozomal bölgelerde delesyonu saptanmıştır (Horst BA ve ark., 2013).

Biz çalışmamızda 9p21 delesyonunu tümöral dokularda, %36,6, sağlıklı çevre dokularında %66,6 oranında bulduk. Literatür taramalarında, 9p21 delesyonu ve *CDKN2A/2B* genlerinin ürün kaybının biyolojik önemi tam olarak ortaya konulamamıştır. Majör tümör süpressör genlerden olan bu genlerin, sağlıklı çevre

dokularında tümöral dokulardan fazla sayıda delesyonunun görülmesi bu çerçevede net açıklanamamış ve benzer yayınlarla da karşılaştırılmamıştır.

Çalışmamızda 9q delesyonunu, tümöral dokularda %36, çevre dokularında %10 olarak bulduk. Bu gene ait amplifikasyon da sık oranda karşımıza çıkmıştır. 9q22.33 *PTCH*, 9q34 ise *TSC1* genlerinin bulunduğu kromozomal bölgelerdir. *TSC1* geni Tuberous sclerosis hastalığından sorumludur ve bu hastalık mental retardasyon başta olmak üzere birçok organda multiple hamartomlarla seyreder. Özellikle akciğerde görülen bu lezyonlar adenokarsinomlara dönüşme konusunda ısrarcıdır. Tepeli E. (2007) yılında yaptığı bir çalışmada 9q delesyon oranını %16 olarak saptamıştır. Bu ve benzer yayınlar ile karşılaştırdığımızda bizim oranlarımızda anlam teşkil etmektedir. 9q bölgesi özellikle akciğer kanserlerinde birden fazla tümör baskılayıcı gen bulundurabilir. Çalışmamız bu açıdan literatüre destek sağlamıştır ve ileriki çalışmalarda da bu tarz çalışmalar destek olabilir ve yeni genlerin keşfine ışık tutabilir.

Bu delesyonlar dışında çalışmamızda, 3p (%36,6), 5q (%10), 11p (% 16,6), 16p (%16,6), 17p (%13,3), 17q (%21), 18q (%16,6), 19q (%20) ve Xq (%13,3) delesyonları saptanmıştır. Bu sonuçların yanında, sağlıklı çevre dokularında da 5q (%16,6), 11p (%20), 16p (%36,6), 17q (%23,3) ve 18q (%20) delesyonları, tümöral dokulardan daha fazla sıklıkta tespit edilmiştir. Bu durum tümör gelişimine yatkın dokularda da delesyonların görülebileceği yönünde açıklanabilir. Sayısal olarak az olduğu için bu delesyonlarla ilgili karşılaştırma yapılamamıştır. Bu sonuçlarımız ileriki benzer çalışmalara ışık tutabilirliği açısından önemlidir.

Tüm delesyonlar göz önüne alındığında, Grade 3 olgularda ve T2 olgularda diğerlerine oranla daha sık sayıda delesyon saptanmıştır. N0, N1 ve N2' li olgular delesyon saptanabilirliği açısından hemen hemen birbirine yakındır. Tüm çalışmamızda M0 olguları yer aldığı için metastatik durumları karşılaştırılmamıştır. Bu delesyonlar en sık adenokarsinomlu olgularda bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda tümör süpressör genlerin amplifikasyon durumu da incelenmiştir. Tümöral dokularda, 9q bölgesindeki amplifikasyon %83,3 olup en yüksek oranda bulunmuştur. Bunu %76,6 oranıyla 17q amplifikasyonu izler. Çevre dokularında da benzer şekilde %76,6 oranıyla 9q amplifikasyonu ve %63,3 oranıyla 17q amplifikasyonu bulunmuştur. Bazı akciğer kanserli olgularla yapılan

çalışmalarda 9q34.1 kromozom bölgesinde lokalize olan *ABL1* tümör süpressör geninde %70 gibi yüksek bir oranla aşırı ekspresyon gözlemlenmiştir (Bueno ve ark., 2008). Bu çalışma microRNA araştırmaları olduğundan ve yöntemin farklı olduğundan dolayı istatistiksel karşılaştırma yapılamamıştır.

ERBB2 geni ise 17q12 bölgesinde lokalize olan tümör süpressör genlerden biridir. Kristiansen ve ark. (2001) yılında akciğer kanserleriyle yaptıkları bir çalışma da *ERBB2* gen ürününde %37,4 gibi bir oranla ekspresyon artışı saptamışlardır.

5.3. Metilasyon Profillerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamız ME002B probmix kullanılarak yapılan metilasyon profil taramalarını içermektedir. Hem akciğere ait tümöral dokuları hem de aynı hasta da akciğere ait sağlıklı çevre dokuları çalışma grubu olarak ele alınmıştır. Epigenetik değişimlerin tümör baskılayıcı genler üzerinde incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Bu epigenetik değişimler içerisinde metilasyon en önemli çalışma grupları arasındadır.

Akciğer kanserleriyle ilişkisi olan olan tümör süpressör genlerdeki metilasyon değişimlerinin araştırıldığı çalışmalarda, farklı doku, farklı teknik ve farklı genler incelenmiştir.

MLPA tekniği gerek dünya gerekse ülkemiz için sık kullanılan bir tekniktir. Kit üretme ile uğraşan firmalar sürekli yeni araştırma kitleri ortaya çıkarmaktadır. Bu yeni kitlerle yeni gen bölgeleri araştırılmakta ve araştırma problemleriyle ilişkilendirilmektedir. Biz bu çalışmamız da ME002 probmikleriyle araştırma yaptık.

Metilasyon profilleri için araştırma probemikslerimiz, *BRCA1-2*, *ATM*, *TP53*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX5-6*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *CHFR*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARB* ve *CD44* gen bölgelerini içermektedir.

ATM geni 11q22.3 kromozom bölgesine lokalize bir genidir. Ataxia telangiectasia (*ATM*) geni kanser biyolojisinde önemli rol oynayan, fosforilasyon mekanizması aracılığı ile *TP53* genini aktive eden bir genidir. Diğer önemli görevlerinden biri ise, ionize radyasyon sebebiyle oluşan DNA hasarı sebebiyle, DNA tamir genlerinden biri olan *BRCA1*' i fosforile etmesidir. Bu gendeki metilasyon değişimlerinin yapıldığı birçok kanser türü vardır fakat akciğer

kanserlerinde bu sınırlı sayıdadır. Uludağ A.'nın 2007 yılında MLPA yöntemi kullanarak yaptığı bir çalışmada KHDAK'lerinde *ATM* genine ait metilasyon oranı tümöral akciğer dokularında %7, çevre akciğer dokularında %4 olarak bulunmuştur. Biz çalışmamızda tümörlü akciğer dokularında %36,7 ve akciğer çevre dokularında %53,3 oranıyla en sık oranda *ATM* metillenmesi saptadık.

Çalışmamızda ikinci sıklıkla metilasyon saptadığımız gen *CDH13* (cadherin 13, H-cadherin) genidir. Bu gen 16q23.3 kromozom bölgesinde yerleşiktir. Bu genin hücre tanıma ve adhezyonunda görev almasının yanında vasküler yeniden düzenlemede de görevleri vardır. Biz çalışmamızda akciğer tümörlü dokularda %13,3 ve akciğer çevre dokularında %16,6 oranında *CDH13* metilasyonu saptadık. Bu oranla ilgili literatürde değişik sonuçlar mevcuttur. Uludağ A bu oranı akciğer tümör dokularında %7, akciğer çevre dokularında %15 olarak bulmuştur (Uludağ A., 2007). Bu çalışmaya bizim bulgularımıza, çevre dokularda *CDH13* metilasyonunun fazla olmasından dolayı benzerlik gösterir. Maruyama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada KHDAK'lerinde bu oran %27 olarak göze çarpar (Maruyama ve ark., 2004).

17p13.1 kromozom bölgesinde lokalize olan *TP53* (protein 53) geni DNA zarar gördüğünde DNA tamir genlerini harekete geçirir ve tamir edilemeyecek durumdaysa apoptozu (programlanmış hücre ölümü) uyarır. Hücre döngüsünü düzenleyen ana genlerden biridir.

TP53 genine ait metilasyonlar literatürde sıklıkla karşılaşılmamıştır. Fakat bunun yanında *CDKN2A* ile olan ilişkisi araştırılmış ve *CDKN2A* metillenmesi ile *TP53* mutasyonu arasında ilişki kurulmuştur. Bastide ve arkadaşlarının akciğer kanserlerinde (2009) yılında yaptığı bir çalışmada *CDKN2A* geninin metillendiği örneklerde sıklıkla *TP53* geninde mutasyon tespit edilmiştir. Biz çalışmamızda *TP53* geninde, tümörlü akciğer dokularında %10, çevre akciğer dokularında %20 oranıyla tespit ettik. 9p21.3 kromozom bölgesine yerleşmiş olan *CDKN2A* genine ait ne tümöral dokularda nede çevre dokularında bir metilasyon saptanmadı. *CDKN2A*, p53 proteininin degradasyonundan sorumlu siklin bağımlı kinazdır. Biz bu çalışmamızda, *CDKN2A* genine ait delesyonlar bildirdik. *TP53* geninde metillenme olan hastalarda (2 hasta), *CDKN2A* geninde delesyon mevcuttu. Sayının fazla olmamasıyla birlikte bu

durum bize, *CDKN2A* mutasyona uğradığında, *TP53* geninin metillenmeden kaçamadığını göstermektedir.

Kontic ve arkadaşlarının (2012) yılında yaptığı bir çalışma, kısaca KHDAK'lerinde *CDH13* ve *MGMT* arasındaki ilişkiyi araştırır. Bu çalışma sırasında bu iki gene ek olarak, *RASSF1A*, *ESR1* ve *DAPK* genleri de araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, tümörlü akciğer hücrelerinde *CDH13* ve *MGMT* metilasyonunu bir arada bulmuşlardır. Sağlıklı kontrol grubunda ise, *CDH13*, *DAPK* ve *RASSF1A* genlerinde bir arada metilasyon saptandı. İki grupta *ESR1* geni ile *MGMT* arasında herhangi bir ilişki gösteren metilasyon saptanmadı.

MGMT geni 10q26.23 kromozom bölgesine lokalize bir gendir. Bu gen proteini alkilleyici ajanların sitotoksik özelliklerini engelleyerek, DNA onarımında görev yapar. CpG adacıkları metillendiğinde ise, bu aktivitesini yerine getiremez. Biz çalışmamızda, 10q bölgesine ait, tümöral dokularda %6,6, çevre dokularında %10 oranında metillenme tespit ettik. Bir hasta'nın çevre dokusunda ise *MGMT* ve *CDH13* genlerinin birlikte metillendiğini gördük.

CDH12, *ESR1*, *BRCA1*, *GSTP1* ve *MSH6* genleri de metilasyon tespit ettiğimiz bölgeler içindedir. Bu gen bölgelerinde metilasyon sırasıyla %3,3, %3,3, %3,3, %6,6 ve %3,3 olarak sadece akciğer çevre dokularında tespit edildi. Bu genlere ait metilasyon tümöral dokularda tespit edilemedi.

KLLN, *PAX5*, *WT1* genlerindeki metilasyon sadece tümöral dokularda tespit edildi ve hepsinin görülme oranı %3,3 olarak hesaplandı. Endometrial kanserli olgularda yapılan çalışmalarda, *KLLN* genine ait, %9,8 sıklığıyla metillenme bildirilmiştir (Mahdi H ve ark., 2014). Bu genlere ait çevre dokularda metilasyon görülmedi. Oranı az olmakla birlikte, bu durum bize akciğer kanserlerinde bu genlerin metillenmesinin anlam ifade ettiğini göstermektedir.

BRCA2 geni 13q13.1 kromozom bölgesinde lokalize bir gendir. Genellikle literatür taramalarında, meme kanserleriyle alakalı çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Biz çalışmamızda, tümöral dokularda ve çevre dokularında %3,3 oranıyla bu gende metilasyon hesapladık. Bu durum hem sayısının az hem de eşit olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı değildir.

VHL ve *RBI* genleri, sırasıyla 3p25.3 ve 13q14.2 kromozom bölgelerinde lokalizedir. İki gende de tümöral dokularda %3,3, çevre dokularında %10 oranında

metilasyon saptandı. Bu genlere ait akciğer kanserlerini içeren literatür bilgisine rastlanmadı. Tümöral dokularda daha az oranda tespit edilmesi bize tümör gelişimiyle ilgili ilişki göstermemektedir.

5.4. MLPA' nın Avantajları ve Dezavantajları

MLPA yöntemi PCR tabanlı, uygulaması kolay, tek bir reaksiyonda en az 40 genomik DNA sekansının kopya sayısını belirleyen avantajlı bir methoddur. Çalışmalar sırasında 20 ng DNA yeterli olmaktadır. Bundan dolayı kısıtlı DNA' lar ile yapılacak çalışmalara olanak sağlar. DNA çalışmaları için kitler üreten birçok firma vardır. Bu firmalar çoğu zaman çalışmalar için çok yüksek DNA miktarları istemektedirler. MLPA bu bakımdan özellikle kısıtlı doku veya miktarı az numuneler için büyük kolaylık sağlar.

Yöntemin hassasiyeti probun bağlanma bölgesine göre 2-3 baz oynayabilmektedir. Buda çoğu çalışma yöntemine nazaran tolere edilebilir bir durumdur.

Sadece bir termal cycler ve bir sekans için elektroforez cihazı çalışma için yeterlidir. Bu cihazlar zaten birçok genetik laboratuvarında bulunan ana cihazlardır.

Birçok uygulama neredeyse aynı protokol içerisinde yapılabilmektedir. Oldukça net ve kolay uygulanan bu protokollerle, örnek sayısına bağlı olarak sonuçlara 24 saatte ulaşılmaktadır. Bu süre incelenen bölgelerin çokluğu göz önüne alındığında, diğer tekniklere göre oldukça kısadır.

Kullanılan tüm kimyasalların sıvı ve uygulama için sabit olmaları, kullanımlarının kolay ve kalite kontrollerinin rahat yapılabilmesini sağlar.

Yöntemin zaman dışında diğer önemli avantajlarından biri, yaptığı işi düşünecek olursak, toplam maliyetin oldukça düşük olmasıdır.

MLPA tekniğinin dezavantajlarından biri, sonuçların örnek kalitesi ile direkt ilişkili olmasıdır. Kullanılan DNA kaynağı sonuçları etkilemektedir. Kan ve dokudan elde edilen DNA' lar ile aynı çalışmalar yapıldığında, sonuçlar arasında farklılıklar gözlenmektedir. Kaldiki bizim çalışmamızda kullandığımız çevre dokuları ve tümör dokuları arasında bile pik görüntüleri açısından farklılıklar vardı. Burada en önemli problemlerden biri DNA miktarı düşük örneklerde, sonlara doğru meydana gelen pik düşmeleridir. Bu durumda yapılacak şey, DNA izolasyon basamağına geri dönmek ve yeniden DNA eldesini gerçekleştirmektir.

Yöntemin diğler dezavantajlarından biri, tüm triploidleri ve dengeli translokasyonları tarayamamasıdır. Bu teknikle mozaik durumlarda ayırt edilememektedir. Bu durum özellikle kanser çalışmalarında ve prenatal tanılarda dezavantaj oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Amacımızın parafine gömülü KHDAK tanısı almış tümör dokularında ve tümör içermeyen akciğer çevre dokularında MLPA tekniği kullanarak genetik değişikliklerin incelenmesi olan bu çalışmada, parafine gömülü 30 tümör ve 30 çevre dokusu MLPA yöntemiyle incelenmiş ve elde edilen bulgular hastaların patolojik ve demografik özellikleriyle karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar aynı zamanda literatür bilgileriyle de karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır.

Parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu sırasında karşılaşılması muhtemel olan ve literatürde de belirtilmiş problemlere değinilmiş, o problemlerle en az karşılaşılan ya da karşılaşılmadan DNA izolasyonun gerçekleştiği yöntem kullanılmıştır. Bu durum başarılı bir MLPA çalışması için, DNA eldesinin önemini vurgulamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız MLPA yöntemi yaklaşık 10 yıldır dünya ve ülkemiz için önemli bir teknik haline gelmiştir. Her geçen gün yeni probmixler geliştirilerek, incelenen gen bölgeleri geliştirilmiş ve sayısı artırılmıştır. MLPA, multiplex gen dozaj analizi yapabilen, PCR temeline dayanan, tek reaksiyonda 40' tan fazla gen bölgesi inceleyebilen, kolay bir yöntemdir. Yöntemin bu özelliklerinden dolayı, çalışmamızda da kısa sürede daha çok gen bölgesi incelenebilmiştir.

MLPA yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmada delesyon ve amplifikasyon için, kromozom 1p, 1q, 2p, 3p, 4q, 5q, 7p, 7q, 8p, 8q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 12p, 12q, 13q, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20q, 22q ve Xq bölgelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu değişimler içinde, tümöral dokulardaki özellikle 1p, 10q, 13q ve 22q başta olmak üzere 3p, 9p ve 9q bölgelerinde saptanan delesyonlar ve yine 9q, 17q bölgelerindeki amplifikasyonlar dikkat çekicidir.

Bazı prob bölgelerinde saptanan delesyon oranlarının literatürde verilen oranlarla, farklılık göstermesinin sebebi, yöntemin farklı olması, hasta sayısının farklı olması, çalışılan hasta gruplarının klinik ve demografik özelliklerinin farklı olmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır. Bunlar haricinde sonuçlar diğer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızın ikinci araştırma kısmı olan metilasyona spesifik MLPA (MS-MLPA) yöntemidir. Bu yöntemle, *BRCA1-2*, *ATM*, *TP53*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX5-6*,

CDH13, TP73, WT1, VHL, GSTP1, ESRI, RB1, MSH6, THBS1, CADM1, STK11, PYCARD, CHFR, CDKN2A, GATA5, RARB ve *CD44* gen bölgelerindeki metilasyon profilleri araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda, en sık metillenen bölgeler *ATM* ve *CDH13* genleridir. Bunun haricinde, *BRCA2, TP53, KLLN, MGMT, PAX5, WT1, VHL, ESRI, RB1* ve *MSH6* genlerindedede metilasyon saptanmıştır. Probmikler içinde olan diğer bölgelerde metilasyon saptanmamıştır.

Bu bulgular, KHDAK' lerinde tümör baskılayıcı genlerin, fonksiyon kayıplarında, delesyon ve amplifikasyonlarının yanı sıra hipermetilasyon mekanizmalarının da etkili olduğunu göstermiştir.

Metilasyona spesifik MLPA yöntemi kullanılan bu çalışmamız, Türkiye' de ve hatta dünya da metilasyon analizlerini inceleyen sayılı çalışmalar arasında yerini almıştır. Bu yüzden bulgularımız, bir temel niteliğinde olup, yeni geliştirilecek probmikler ve yöntemler için kaynak olma özelliğindedir.

Çalışma verilerimizde saptanan frekans değerleri, MLPA ve MS-MLPA yöntemi ile incelenen fazla sayıda çalışma olmamasından dolayı, karşılaştırma yapılırken farklı yöntemlerle de karşılaştırılmıştır.

Tümöral dokular ile çevre dokuları arasında metilasyon sıklıkları birlikte değerlendirildiğinde hemen hemen birbirine yakın değerler ortaya çıkmıştır. Hatta bazı metillenme bölgeleri sadece çevre dokularında saptanmış, tümöral dokularda saptanmamıştır. Bu olay şu soruyu akla getirmektedir: Tümör baskılayıcı gen hipermetilasyonu, tümör gelişimine yatkın hücrelerde erken gelişen bir olay mı?

KHDAK ve KHAK' lerinde MLPA ve MS-MLPA yöntemi ile genetik araştırma literatürde çok azdır. Bu yüzden çalışmamız, ileride yapılacak benzer çalışmalar için kaynak özelliğindedir. Çalışmamız sayesinde elde edilen sonuçlar diğer tarama yöntemleriyle de karşılaştırılabilecek ve yeni sonuçlar ortaya atılabilecektir.

Sonuç olarak bir reaksiyonda, çok fazla sayıda genin amplifikasyon, delesyon ve metilasyon profillerini aynı anda inceleyebilen MLPA ve MS-MLPA yönteminin akciğer kanserlerinin bu araştırmalara yönelik profillerinin taranmasında, kullanılabilir, hızlı ve ucuz sonuç verebilen önemli bir moleküler teknik olduğu ve diğer kanserlerin genetik taramalarında da kullanılabilir olduğu düşüncesindeyiz.

Bu sonuçlar doğrultusunda, MLPA yönteminin hızla kullanılmaya başlandığı bu dönemde, diğer delesyon, amplifikasyon ve metilasyon tarama yöntemleriyle

karşılaştırılarak, en kısa sürede sensitive ve spesivitesinin belirlenmesi ve akciğer kanserinin erken tanısında rol oynayan markerlere özgü kit dizaynlarının yapılıp, rutin kullanıma geçilmesi gereklidir.

7. KAYNAKLAR

- Akbulut H, Akbulut KG. Büyüme Faktörleri, ANTİPAŞ, Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, Ankara, 1997; 39- 48.
- Akbulut H, Akbulut KG. Karsinogenez, ANTİPAŞ. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, Ankara, 2001; 23-38.
- Akça H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, Bağcı G, Yokota J. Utility of serum DNA pyrosequencing for the detection of *EGFR* mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Genetics*, 2013; 206: 3, 73- 80 .
- Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer; ACCP Evidencebased clinical practice guidelines. *Chest*, 2007; 132: 29-55.
- Alberts B, Bray D, Lewis J. The molecular biology of the cell. Third ed. New York&London: Garland Publishing Inc., 1994)
- Arndt AN, Schafer S, Drenckhahn JD, Sabeh MK, Plovie ER, Caliebe A, Klopocki E, Musso G, Werdich AA, Kalwa H, Heinig M, Padera RF, Wassilew K, Bluhm J, Harnack C, Martitz J, Barton PJ, Greutmann M, Berger F, Hubner N, Siebert R, Kramer HH, Cook SA, MacRae CA, Klaassen S. Fine mapping of the 1p36 deletion syndrome identifies mutation of PRDM16 as a cause of cardiomyopathy. *AJHG*, 2013; 93, 1:67- 77.
- Bastide K, Guilly MN, Bernaudin JF, Joubert C, Lectard B, Levalois C, Malfoy B, Chevillard S. Molecular analysis of the Ink4a/Rb1-Arf/Tp53 pathways in radon induced rat lung tumors. *Lung Cancer*, 2009; 63, 3:348- 353.
- Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 2000; 103:311-20.
- Bowman RV, Yang IA, Semler ABT, Fong KM. Invited review series; lung cancer, *Respirology*, 2006; 11: 355-365.
- Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M, Santos J, Calin GA, Ciqudosa JC, Croce CM, Fernandez Piqueras J, Malumbres M. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances *ABL1* and *BCR-ABL1* oncogene expression. *Cancer cell*, 2008; 13, 6: 496- 506.
- Caporale D, Swenson E. Two different BRCA2 mutations found in a multigenerational family with a history of breast, prostate and lung cancers *Dove Press Journal. Advances in Genomics and Genetics*, 2014;4: 87-94.
- Cooper M. The cell, A molecular approach Washington: ASM Pres, 1997.
- Cox G, Jones JL, Andi A. A biological staging model for operbl non-small cell lung cancer, 2001; *Thorax*, 56: 561- 566.
- Dacic S, Ionesc DN, Finkelstein S, Yousem ASPatterns of allelic loss of synchronous adenocarcinomas of the lung, *Am. J. Surg.* 2005; *Pathol.* 29, 7:897-902.

- Davidson BJ, Ionescu DN, Finkelstein S, Yousem AS. Patterns of allelic loss of synchronous adenocarcinomas of the lung, *Am. J. Surg. Pathol.* 2005; 29, 7:897- 902.
- Ehrlich M. Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation, *Curr top Microbiol Immunol*, 2006; 310:251- 274.
- Etseller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer, *Cancer Res*, 2001; 61, 8: 3225- 3229.
- Fernandes AM, Hamburger AW, Gerwin BI. Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells, *Cancer Letters*, 1999;142: 55- 63.
- Field JK. Selection and validation of new lung cancer markers for the molecular-pathological assessment of individuals with a high risk of developing lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*, 1999; Marcel Dekker Inc., New York, 287- 302.
- Fong KM, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine*, 2002; 23: 83-101.
- Fong KW, Sekide Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999; 118:1136- 1152.
- Franks LM, Teich NM. *Cellular and molecular biology of cancer*. Third ed.: Oxford Uni. Pres, 1998.
- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M. Cancer and genomics, *Nature*, 2001; 6822, 850, 2.
- Garding A, Bhattacharya N, Claus R, Ruppel M, Tschuch C, Filarsky K, Idler I, Zucknick M, Caudron-Herger M, Oakes C, Fleig V, Keklikoglou I, Allegra D, Serra L, Thakurela S, Tiwari V, Weichenhan D, Benner A, Radlwimmer B, Zentgraf H, Wiemann S, Rippe K, Plass C, Döhner H, Lichter P, Stilgenbauer S, Mertens D. Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in Leukemia is linked to the in cis downregulation of a gene cluster that targets NF- κ B, 2014; *Plos Genetics* 10. 1371.
- Gelehrler TD, Collins FS, Ginsburg D. *Principles of Medical Genetic*. Second ed., 1998.
- Gemill RM, Drakbin HA. Chromosome 3p loss in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds. *Biology of lung cancer*. Marcel Dekker Inc., 1998; New York, 465- 501.
- Geoffey MC, Hausman ER. *Hücre: Moleküler Yaklaşım* (Çev.: Sakızlı M, Atabey N.) İzmir: İzmir Tıp Kitabevi, 2006.
- Göksel T, Akkoçlu A. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. *Respiration*. 2002; 69: 2017-10.

- Groeger AM, Odocha O, Mueller MR. Racial variation in lung cancer. *Anticancer Research*, 2001; 17: 2843- 2848.
- Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi Eskişehir: Kaan Kitabevi, 2003.
- Hartmann C, Astrid N, Mueller W, Holtcamp N, Simon M, Andreas VD. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytomas, 2004; *Int. J. Cancer*: 108:839- 844.
- Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 2000; 91:964- 971.
- Hastürk S. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi. In: Hastürk S, Yüksel M. Akciğer Kanseri, 2000; İstanbul, 1-27.
- Henrich KO, Claas A, Praml C, Benner A, Mollenhauer J, Poustka A, Schwab M, Westermann F. Allelic variants of *CAMTA1* and *FLJ10737* within a commonly deleted region at 1p36 in neuroblastoma, *European Journal of Cancer*, 2007; 43, 3: 607- 616.
- Hesketh RE. The Onkogene and Tumor Suppressor in Development and cancer. *Nature Rev. Cancer* 2002; 2 : 910.
- Horst BA, Terrano D, Fang Y, Silvers DN, Busam KJ. 9p21 gene locus in Spitz nevi of older individuals: absence of cytogenetic and immunohistochemical findings associated with malignancy, *Human Pathology*, 2013; 44, 12: 2822- 2828.
- Hussain SP, Haris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogeneous carcinogens, 2002; *Mutation Research*, 311-322.
- Jacobson DR. Ras mutations in lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E. Lung tumors fundamental biology and clinical management, 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 139- 156 .
- Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, Cha SI, Yoon GS, Kim CH, Jung TH, Park JY. *PTEN* mutations and relationship to *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, and *TP53* mutations in non- small cell lung cancers, *Lung Cancers*, 2010; 69, 3: 279- 283.
- Kanser bildirimlerinin değerlendirilmesi 1995-1996. TC Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı yayınları. Yayın no: 618, Ankara 1997.
- Karlıkaya C. Akciğer Kanseri Ders Notları, 2005.
- Kontic M, Stojic J, Jovanovic D, Bunjevacki V, Ognjavonic S, Kuriger J, Puumala S, Nelson HH. Aberrant promoter methylation characteristics of primary non- small- cell lung carcinoma, 2012; 13, 4:297- 203.
- Köktürk N, Kırıçoğlu CE, Öztürk C. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum* 2003; 5: 127- 138.

- Kraunz KS, Nelson HH, Lemos M, Godleski JJ, Wienceke JK, Kelsey KT. Homozygous deletion of p16 and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, 2006; 118:1364- 1369.
- Kreuzer M, Heinrich J, Kreienbrock L, Rosairo AS, Gerken M, Wichmann HE. Risk factors for lung cancer among nonsmoking women. *Int J Cancer* 2002; 100: 706- 13.
- Kristiansen G, Yu Y, Petersen S, Kaufmann O, Schlüns K, Dietel M, Petersen I. Overexpression of c-ERBB2 protein correlates with disease- stage and chromosomal gain at the c-ERBB2 locus in non- small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 2001; 37, 9:1089- 1095.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji, 2003, (çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-295.
- Kwong FM, Wong SP, Lung ML. Genetic alterations detected on chromosomes 13 and 14 in Chinese non small cell lung carcinomas, *Cancer Letters*, 2003; 192:189- 198.
- Lecture GFF. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors, *Chest*, 1999; 109:14- 19.
- Lei W, Mayotte JE, Levitt ML. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in nonsmall cell lung cancer cells, *Anticancer Research*, 1998; 19: 221- 228.
- Levin WJ, Casey G, Ramos JC. Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in nonsmall cell lung cancer, 1994; *Chest*, 106: 372- 376.
- Mabry M. Activating oncogenes in lung cancer. In Kane MA., Bunn PA., eds. *Biology of lung cancer*, 1998, Marcel Dekker Inc., New York, 391- 412.
- Mahdi H, Mester JL, Nizialek E, Michener C. Germline SDHBICID variation and KLLN promoter methylation in endometrial cancer patients with Cowden and Cowden-like syndrome, 2014; *Gynecologic Oncology*, 133,1:78.
- Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wienke JK, Kelsey KT. *PTEN* expression in non- small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration, *Human Pathology*, 2005; 36, 7:768- 776.
- Maruyama R, Sugi K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar AF. American Cancer Society, 2004; 100, 7: 1472- 1477.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson&Thompson Tıbbi Genetik: Güneş Kitabevi, 2005.

- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum, *Cancer Res*, 2000; 60:5954- 5958.
- Perez- Soler R, Mendelson J. Growth factor receptors as a target for therapy. In: Roth JA., Cox JD., Hong WK. Lung cancer. 2nd ed, 1998; Blackwell Science INC, 309 -341.
- Raymond E., Faivre S., Armand JP. 2000, Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy, *Drugs*, 60: 15- 23.
- Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non small cell lung cancer, 1993; *Oncogen*, 8:1913- 1919.
- Roth JA. Molecular events in lung cancer, *Lung Cancer*, 1994; 10:3-15.
- Safar AM, Spencer H, Su X, Coffey M, Cooney CA. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system, *Clin Cancer Res*, 2005; 11, 12: 4400-4405.
- Safar AM, Spencer H, Su X, Cooney CA, Shwaiki A, Fan CY. Promoter hypermethylation for molecular nodal staging in non small cell lung cancer, *Arch Pathol Lab Met*, 2007; 131: 936- 941.
- Sasaki K, Kawauchi S. Molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *J orthop Sci* 2003; 8: 457- 459.
- Sato K, Morishita Y, Shu Y, Wang D, Tanaka R, Minami Y, Lijima T, Noguchi M. Anthracotic index and DNA methylation status of sputum contents can be used for identifying the population at risk of lung carcinoma, *Cancer Cytopathology*, 2004; 102, 6:348- 354.
- Savaş İ, Akkoçlu A, Göksel T, Yılmaz U. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanser tanı ve tedavi rehberi. *Türk Toraks Dergisi* 2006; 7: 1- 37.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Research*, 2002; 30- 57.
- Sclafani RA, Schaurer IE, Langan TA. Alterations in cell cycle control in lung cancer. In: Kane MA., Bunn PA., eds. *Biology of lung cancer*, 1998; Marcel Dekker Inc., New York, 295- 315.
- Siedfrieg SM. Biology and chemoprevention of lung cancer, *Chest*, 1999; 113,1:40-45.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA), *J. Med. Genet.*, 2003; 40:907- 912.

- Sozzi G. Deletions of the short arm of chromosome 3 and the FHIT gene in lung cancer. In: Brambilla E, eds. Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York, Marcel Dekker Inc., 1999; 157-171.
- Spiro SG, Porter JC. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166: 1166-96.
- Spivack SD, Fasco MJ, Walker WE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer, Crit. Rev. Toxicology, 1999; 27:319-365.
- Takanami I, Imamura T, Hashizume T. Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF- β 1 in pulmonary adenocarcinoma. Path Res Pract, 1996; 192:1113- 1120.
- Takanami I, Tanaka F, Hashizume T. Roles of transforming growth factor- β 1 and its type I and II receptors in development of a pulmonary adenocarcinoma: results of an immunohistochemical study, J. Surg. Oncol., 1997; 64:262- 267.
- Tanaka R, Wang D, Morishita Y, Inadome Y, Minami Y, Lijima T, Fukai S, Goya T, Noguchi M. Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma, American Cancer Society, 2005; 103, 3:608- 615.
- Taşdemir Ş. Türk Toplumlarında Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hastalarında, Epidermal Growth Faktör Reseptör Genindeki En sık Mutasyonların Araştırılması, mRNA Ekspresyon ve Protein Düzeyinin Belirlenmesi. 2010, Erciyes Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık tezi, 98 sayfa, Kayseri, (Prof. Dr. Yusuf Özkul)
- Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung, Cancer Research, 1990; 50, 7077- 7080 p.
- TC Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, Kanser Bildirimlerinin Değerlendirilmesi 1993-1994. Yayın no: 582, 1997, Ankara.
- Tchia MM, Holmes MD, McLennan G. The molecular biology of lung cancer, Med. J. Australia, 1991; 154: 501- 503.
- Tepeli E. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri ile İlişkili Genlerin Delesyon ve/ veya Amplifikasyonlarının Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemiyle İncelenmesi. 2007, Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 114 sayfa, Eskişehir, (Doç. Dr. Hamza Müslümanoğlu)
- Tong VH, C Thomas, Bock, Thirumalaisamy P. Genetic insights on host and hepatitis B virus in liver diseases, Mutation Research/ Reviews in Mutation Research, Velevan. 2014; 762:65- 75.
- Tsou JA, Shen LY, Siegmund KD, Long TI, Laird TW, Senewiratne CK, Koss M., Pass HI, Hagen JA, Laird Offiringa IA. Distinct DNA methylation profiles in malignant

mesothelioma, lung adenocarcinoma and non tumor lung. Lung Cancer, Volume 47, Issue 2, 2005, 193-204.

Uludağ A. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri ile İlişkilendirilmiş Tümör Supressör Genlerin Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi ile Metilasyon Paternlerinin İncelenmesi. 2007, Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 94 sayfa, Eskişehir, (Prof. Dr. Sevilhan Artan)

Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. Curr Opin Oncol 2000;12: 68-73.

Wei Q, Spitz MR. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer A review, Cancer and Metastasis, Reviews,1997; 16: 295- 307.

William SK, Cummings MR. Genetik Kavramlar (Çev.: Öner C.) Ankara: Palme Yayıncılık, 2000.

William SK, Cummings MR. Genetik Kavramlar (çev: Öner C.) Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.

Yan WS, Song LY, Wei WD, Li A, Liang QW, Liu JH, Fang Y. Chromosomal imbalance in primary lung squamous cell carcinoma and their relationship with smoking, Ai Zheng, 2005; 24, 1:47-52.

Yegnasuramian S, Kowalsky J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantodosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG. Hypermethylation of CpG islands primeri and metastatic human prostate cancer, Cancer Res., 2004; 64, 6:1975- 1986.

Yurdakul AS, Çalışır HC, Demirağ F. Akciğer kanserinin histopatolojik tiplerinin dağılımı (2216 olgunun analizi). Türk Toraks Dergisi 2002; 3: 59- 65.

Zhao R, Qitao Y, Jingye LV, Haili H, Wenling Z, Bao Z, Wenli. *CHD5*, a tumor suppressor that is epigenetically silenced in lung cancer, Lung Cancer, 2011; 76, 3:324-331.

TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı, Erişim: www.kanser.gov.tr. Erişim Tarihi: 19.12.2014.

www.mlpa.com, Erişim tarihi: 25.10.2014.

TC Sağlık Bakanlığı 2009 Yılı Türkiye Kanser İnsidansı, Birleşik Veri Tabanı, 2009. Erişim: www.kanser.gov.tr. Erişim Tarihi: 21.09.2014.

8. EKLER

Ek-1

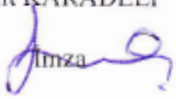

SPIRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	✓	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	✓	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	✓	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	✓	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	✓	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	✓	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	✓	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	✓	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	✓	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman"	✓	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	✓	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	✓	

Tarih:05 /02 / 2015 Öğrenci Adı ve Soyadı, Ümit KARADELİ İmza	Tarih:05/02/ 2015 Danışmanın Adı ve Soyadı, Ahmet ULUDAĞ İmza
---	---

Ek- 2

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM KONTROL
LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Kapak sayfası düzeni	✓ UYGUN	✓ UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Onay sayfası düzeni	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	✓ UYGUN	✓ UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Teşekkür sayfası	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Türkçe özet	✓ UYGUN	✓ UYGUN
İngilizce özet	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Şekiller dizini	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tablolar dizini	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırılması	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Yöntem ve Gereç	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Bulgular	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tartışma	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Sonuç ve Öneriler	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Kaynaklar	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tez planı	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	✓ UYGUN	✓ UYGUN
Tarih:05 /02 / 2015 Öğrenci Adı ve Soyadı, Ümit KARADELİ 		Tarih: 05/02/ 2015 Danışmanın Adı ve Soyadı, Ahmet ULUDAĞ 

Ek- 3

Etik Kurul Onay Formu



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-366
Konu : Başvuru İncelemesi

11/12/2013

Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ULUDAĞ

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Tekniği Kullanılarak Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseriyle İlişkili Bazı Genlerin İncelenmesi" başlıklı EK-2013-222 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 11/12/2013 tarih ve 23-10 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Emine COŞAR
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Karar Tarihi : 11.12.2013 15:00
Karar No : 2013-23

Karar-10) EK-2013-222 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje araştırmacılarından Ümit KARADELİ'nin sunumunun dinlenmesinin ve raporların hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." kararı verilmiştir.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÜMİT	Soyadı	KARADELİ
Doğum Yeri	DEVREK	Doğum Tarihi	18.08.1984
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	43058025434
E-mail	umit_umitk@hotmail.com	Tel	05303038004

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2015
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyolog	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2008-

A-Ulusal Yayınları/Bildirileri/Diğer:

- Urfalı M, Sılan F, Özdemir Ö, Uludağ A, Kankaya D, **Karadeli Ü**, Coşar E, Güneş F, Topaloğlu N. Çanakkale Populasyonunda beta-globulin gen profilleri. I. Hematolojik genetik sempozyumu, 2-4 Aralık 2013 İzmir, Bildiri özet Kitabı, s85.
- Sılan F., Uludağ A., Kankaya D. G., Güneş F., Uysal A., Yalçın-tepe S., **Karadeli U.**, Ozdemir O. Çanakkale populasyonunda Beta-Talesemi mutasyon

profilleri ve sıklığı. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 252, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

- Kiraz A, Tekin S Z, Vural A, **Karadeli Ü**, Ünver A. Çocuklarda Dışkıda Adenovirüs ve Rotavirüslerin Araştırılması. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. PP-82, İstanbul, 2014

B-Katıldığı Ulusal Kongreler:

- 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, 19-23 Aralık 2012, Bursa.
- EKMUD Çanakkale Enfeksiyon Akademisi, 21- 23 Mart 2014, Çanakkale

C-Sertifikalar:

- Kan Merkezi uygulamaları için jel santrifügasyon yöntemi sertifikası
- Tüberküloz otomatik identifikasyon ve antibiyogram cihazı kullanım sertifikası
- Aferez trombosit ve eritrosit cihaz uygulama sertifikası
- Bakteri, maya otomatik identifikasyon ve antibiyogram cihazı kullanım sertifikası
- Floresans, immunblotting gibi yöntemlerle antikor arama uygulama sertifikası
- ELISA cihazı kullanım sertifikası
- Tüberküloz PCR cihazı uygulama sertifikası