T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARININ ETİYOLOJİSİNDE APOBEC GEN AİLESİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammet Ensar DOĞAN

KAYSERİ - 2015

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARININ ETİYOLOJİSİNDE APOBEC GEN AİLESİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammet Ensar DOĞAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Bu tez, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2014-5374 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ - 2015

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bana olan güven ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve Doç. Dr. Çetin SAATÇİ'ye,

Çalışmalarıma uygun hastaların teminindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Halit KARACA, Yrd. Doç. Dr. Ömer ÖNAL ve Uzm. Dr. Ayşe OCAK DURAN'a ve bu hastaların patolojik örneklerinin temininde katkılarından dolayı Prof. Dr. Özlem CANÖZ'e,

Tez çalışmam boyunca ve laboratuvar çalışmalarımda destekleri ile hep yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Yagut ERDEM, Uzm. Bio. Hilal AKALIN, Uzm. Bio. Yasin ADA ve Uzm. Kimyager Mehmet BOZ'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen aileme,

Bu süreçte ihmal ettiğim sevgili eşim İmran ve biricik kızım Melike'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **İ**
İÇİNDEKİLER ..... **İİ**
KISALTMALAR ..... **İV**
TABLO LİSTESİ ..... **Vİ**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **Vİİİ**
ÖZET ..... **X**
ABSTRACT ..... **Xİİİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. KANSER 3
2.2. AKCİĞER KANSERİ 4
2.2.1. Epidemiyoloji 4
2.2.2. Etiyoloji 6
2.2.3. Sınıflandırma 8
2.2.4. Evreleme 8
2.2.5. Tedavi 10
2.2.6. Akciğer adenokarsinomları 12
2.3. KANSER GENETİĞİ 13
2.3.1. Geçmişten günümüze kanser genetiği 13
2.3.2. Kanserlerde klonal gelişim 17
2.3.3. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler 18
2.3.4. Kanser oluşumunda genetik yolaklar 22
2.3.5. Tümör mikro çevresi 25
2.3.6. Kanserlerde mutasyon imzaları 26
2.4. APOBEC AİLESİ 29
2.4.1. AID (activation-induced cytidine deaminase) 31
2.4.2. APOBEC1 32
2.4.3. APOBEC2 33
2.4.4. APOBEC3 33
2.4.5. APOBEC4 35
3. HASTALAR VE YÖNTEM **36**
3.1. HASTA VE KONTROL GRUBU 36
3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI 37
3.2.1. Kullanılan cihaz ve aletler 37
3.2.2. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfitlenmiş DNA izolasyonu ve metilasyon çalışmasında kullanılan sarf malzemeler 38

3.2.3. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan RNA izolasyonu ve ekspresyon çalışmasında kullanılan sarf malzemeler 38
3.3. YÖNTEMLER 39
3.3.1. Ekspresyon çalışması 39
3.3.1.1. Real-Time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu / Kantitatif PCR) 39
3.3.1.2. Formalin ile fikse parafine gömülü doku kesitlerinden RNA izolasyonu41
3.3.1.3. cDNA sentezi 43
3.3.1.4. Preamplifikasyon 44
3.3.1.5. Ekspresyon analizi 45
3.3.2. Metilasyon çalışması 47
3.3.2.1. Bisülfit yöntemi ve pyrosekans ile kantitatif metilasyon analizi 47
3.3.2.2. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfitlenmiş DNA izolasyonu 49
3.3.2.3. Pyromark PCR işlemi 52
3.3.2.4. Pürifikasyon ve sekans işlemleri 53
3.4. VERİLERİN ANALİZİ 56
3.4.1. Rölatif kantitasyon 56
3.4.2. İstatistiksel analiz 56

4. BULGULAR 58

4.1. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI 60
4.1.1. APOBEC1 61
4.1.2. APOBEC2 62
4.1.3. APOBEC3A 63
4.1.4. APOBEC3B 64
4.1.5. APOBEC3C 66
4.2. METİLASYON ANALİZİ BULGULARI 68

5. TARTIŞMA 73

6. SONUÇLAR 80

KAYNAKLAR 81

KISALTMALAR

A1-4	APOBEC1-4
A3A-H	APOBEC3A-H
AID	Activation-induced deaminase
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ATS	American Thoracic Society (Amerikan Toraks Derneği)
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Cycle threshold / Eşik döngü
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ERS	European Respiratory Society (Avrupa Solunum Derneği)
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer (Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Birliği)
Ig	İmmünoglobulin
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KML	Kronik myeloid lösemi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NNK	Nikotin bağımlı nitrozamin ketonu [4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-bütanon]
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PPi	Pirofosfat
Real-Time PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kantitatif PCR)

RNA	Ribonükleik asit
RT-qPCR	Revers transkripsiyon - kantitatif PCR
TCGA	The Cancer Genome Atlas (Kanser Genom Atlası)
UDG	Urasil-DNA glikozilaz
Vif	Viral infektivite faktör

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. TNM sınıflandırmasının yedinci versiyonuna göre T, N, M faktörleri.....9
Tablo 2. Akciğer kanserlerinde yedinci TNM evreleme sistemi 10
Tablo 3. Bazı tümör baskılayıcı genler, fonksiyonları ve ilişkili kanserler.....22
Tablo 4. APOBEC ailesi üyeleri 30
Tablo 5. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı 43
Tablo 6. Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri.....44
Tablo 7. Pre-Amp PCR reaksiyon karışımı 44
Tablo 8. Preamplifikasyon için termal döngü koşulları 45
Tablo 9. Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer dizileri.....45
Tablo 10. LightCycler 480 Probes Master PCR karışımı.....46
Tablo 11. LightCycler 480 II yazılımında ayarlanan sıcaklık ve süreler 46
Tablo 12. Bisülfit dönüşümü ve PCR sonrası DNA dizi değişimleri 47
Tablo 13. Metilasyon çalışması için kullanılan amplifikasyon ve pyrosekans primerleri.....49
Tablo 14. Lizis termal döngü koşulları 49
Tablo 15. Bisülfit reaksiyonu bileşenleri.....50
Tablo 16. Bisülfit dönüşümü için termal döngü koşulları.....50
Tablo 17. Reaksiyon karışımı içeriği (Bisülfitlenmiş DNA hariç) 52
Tablo 18. PCR Master Mix için optimize PCR koşulları.....52
Tablo 19. DNA immobilizasyonu için gerekli karışımın içeriği 53
Tablo 20. *APOBEC1* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması 61
Tablo 21. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC1/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 62
Tablo 22. *APOBEC3A* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması.....63
Tablo 23. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3A/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 64
Tablo 24. *APOBEC3B* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması.....65
Tablo 25. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 66
Tablo 26. *APOBEC3C* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması 67

Tablo 27. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3C/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması 67
Tablo 28. *APOBEC3B* geni promotör ve intron 1'de analiz edilen diziler 68
Tablo 29. *APOBEC3B* promotör bölgesi tümör-normal doku metilasyon oranları karşılaştırması.....71

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dünya genelinde 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı 4
Şekil 2. Türkiye'de 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı . 5
Şekil 3. 2015 yılında Türkiye için öngörülen yeni akciğer kanseri vaka sayısı 6
Şekil 4. Knudson'ın iki vuruş hipotezi 14
Şekil 5. Kanserlerin temel özellikleri 17
Şekil 6. Primer tümör ve metastazların klonal gelişimi..... 18
Şekil 7. Tümör türlerine göre bazı onkogenlerin mutasyon sıklığı..... 20
Şekil 8. Kolon kanseri oluşumunda birçok genin katıldığı çok aşamalı süreç 23
Şekil 9. Basitleştirilmiş sinyal iletim yolağı ve genetik ya da epigenetik değişiklerin etkilediği noktalar 24
Şekil 10. Kanser gelişimi boyunca süren aktif mutasyonel süreçler..... 27
Şekil 11. Kanser genomlarında tespit edilen bazı mutasyon imzalarına ait örnekler 28
Şekil 12. Akciğer adenokarsinomu ve melonamada mutasyon imzalarının katkısı.... 29
Şekil 13. APOBEC genlerinin ve APOBEC proteinlerinin domain organizasyonunun şematik gösterimi..... 30
Şekil 14. Retroviral enfeksiyonlarda APOBEC3 ve Vif ilişkisi 34
Şekil 15. Çalışma planı..... 37
Şekil 16. Real-Time PCR'da hidroliz problarının çalışma prensibi 40
Şekil 17. Real-Time PCR'da amplifikasyon eğrisi ve fazlar..... 41
Şekil 18. Pyrosekans çalışma prensibi..... 48
Şekil 19. Pyromark Q24 vakum istasyonu işlemleri 55
Şekil 20. Hastaların cinsiyete göre dağılımı 58
Şekil 21. Hastaların evrelere göre dağılımı 59
Şekil 22. Hastaların TNM evrelemesindeki T faktörüne göre dağılımları..... 59
Şekil 23. Hastaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları..... 60
Şekil 24. Tümör dokularında *β-Actin* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri60
Şekil 25. Tümör dokularında *APOBEC1* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri 61
Şekil 26. Tümör dokularında *APOBEC2* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri 62

Şekil 27. Tümör dokularında *APOBEC3A* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri 63
Şekil 28. Tümör dokularında *APOBEC3B* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri 65
Şekil 29. Tümör dokularında *APOBEC3C* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri 66
Şekil 30. *APOBEC3B* promotör bölgesinde negatif ve pozitif kontrol DNA'larının pyrogram görüntüsü ve metilasyon yüzdeleri 69
Şekil 31. *APOBEC3B* intron bölgesinde negatif ve pozitif kontrol DNA'larının pyrogram görüntüsü ve metilasyon yüzdeleri 69
Şekil 32. *APOBEC3B* intron 1 metilasyon oranları. 70
Şekil 33. *APOBEC3B* promotör 1. CpG bölgesi tümör ve normal doku metilasyon oranları 71
Şekil 34. *APOBEC3B* promotör 2. CpG bölgesi tümör ve normal doku metilasyon oranları.. 72

AKCİĞER ADENOKARSİNOMLARININ ETİYOLOJİSİNDE APOBEC GEN AİLESİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Akciğer kanserleri dünya genelinde en sık görülen kanser türü olmakla birlikte kanser nedeniyle ölümlerin de başlıca sebepleridir. Akciğer kanserleri içinde adenokarsinomlar son yıllarda en sık görülen histolojik alt tip haline gelmiştir.

Kanser genomları son derece karmaşık yapıdadır ve binlerce mutasyon içerirler. Tüm bu karmaşıklığa rağmen kanser hücrelerindeki nükleotid değişimlerinin gözlemlenmesi karsinogenezdeki belirli mekanizmaların izinin sürülmesini sağlar. Her bir mutasyonel süreç kanser genomunda kendi karakteristik motifini bırakır, bunlara 'mutasyonel imzalar' adı verilmektedir.

Birer sitidin deaminazları olan APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) ailesi üyeleri kromozomal ve mitokondriyal DNA'da sitozin→timin (C→T) mutasyonları yapma yeteneğine sahiptir. Genom boyu kanser araştırmaları ile APOBEC'lerin sebep olduğu mutasyon imzaları çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak tespit edilmiştir. Bu kanser türlerinden biri olan akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisine APOBEC'lerin katkısını anlamak için akciğer adenokarsinomu tanılı 42 hastanın tümör ve komşu normal akciğer dokularında *APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B* ve *APOBEC3C* mRNA ekspresyonu revers transkripsiyon – kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca *APOBEC3B* geninin düzenlenmesinde DNA metilasyonun rolünü anlamak için aynı olguların tümör ve normal dokularında pyrosekans yöntemi ile kantitatif metilasyon analizi yapıldı.

APOBEC3B/β-Actin mRNA ekspresyon düzeyleri tümör dokularında (1.838±3.309) aynı hastaların normal akciğer dokularına (1.235±3.164) göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca *APOBEC1/β-Actin* ve *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyon seviyelerinin ileri evre akciğer adenokarsinomlarında erken evrelere göre arttığı gösterildi ($p<0.05$). *APOBEC3B* geninin promotöründe araştırılan dört adet CpG bölgesinden sadece birinde metilasyon oranları tümör dokularında (%11.60±4.20) normal dokulara göre (%13.0±4.81) anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$). Bu

metilasyon düzeyindeki düşme *APOBEC3B* ekspresyon düzeyindeki artma ile uyumlu bulunsa da, bunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi (r=0.076, p=0.65).

Sonuç olarak belirgin şekilde hücre çekirdeğinde eksprese olan ve endojen bir mutajenik ajan olarak düşünülen *APOBEC3B*'nin akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisinde ve tümör progresyonunda etkili olabileceği gösterildi. Bu çalışmanın desteklenmesi için protein düzeyinde çalışmalar yapılmalı; ayrıca yüksek çıktılı DNA dizileme (ekzom ya da tüm genom) yöntemleri ile aynı hastaların tümör dokularında APOBEC'lere özgü mutasyon motifleri gösterilmelidir.

Anahtar kelimeler: APOBEC, *APOBEC3B*, akciğer kanseri, mRNA ekspresyonu, kantitatif metilasyon analizi

THE INVESTIGATION OF ROLE OF APOBEC GENE FAMILY ON LUNG ADENOCARCINOMA ETIOLOGY

ABSTRACT

Lung cancer is the most common cancer and also leading cause of death due to cancer worldwide. In recent years, adenocarcinoma has become the most common histological subtype of lung cancers.

Cancer genomes are extremely complex and they contain thousands of mutations. In spite of all this complexity, monitoring of nucleotide changes in cancer cells allows the tracing of certain mechanisms in carcinogenesis. Each mutational process leaves a characteristic pattern in the cancer genome called 'mutational signatures'.

Members of the APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) family of cytidine deaminases are capable of creating cytosine to thymine (C→T) mutations in chromosomal and mitochondrial DNA. APOBEC family mutational signatures have been identified in various types of cancer, including lung adenocarcinoma, with genome-wide mutation analyses. In order to understand the contribution of APOBECs in the etiology of lung adenocarcinoma, *APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B* and *APOBEC3C* mRNA expression levels were compared in tumor and adjacent normal lung tissues from 42 lung adenocarcinoma patients. mRNA expression levels were determined using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay. In addition, DNA quantitative methylation analysis was performed by pyrosequencing method on the same patients' tumor and normal lung tissues to understand the role of DNA methylation in the regulation of *APOBEC3B* gene.

APOBEC3B/β-Actin mRNA levels were significantly higher in tumors (1.838±3.309) when compared to adjacent normal lung tissues (1.235±3.164, $p<0.05$). Furthermore, *APOBEC1/β-Actin* and *APOBEC3B/β-Actin* mRNA levels were significantly elevated in late-stage lung adenocarcinomas when compared to early-stage adenocarcinomas ($p<0.05$). Only one of the four CpG sites in the promoter region of the *APOBEC3B* methylation percentages were found significantly lower in tumors (11.60%±4.20) than in normal tissues (13.0%±4.81, $p<0.01$). Although this decrease in the methylation level

was consistent with the increase in expression level, there was no correlation found between them (r=0.076, p=0.65).

Consequently, in this study, *APOBEC3B*, which is obviously expressed in nucleus and considered as an endogenous mutagenic agent, was shown to be effective in the etiology of lung adenocarcinoma and tumor progression. Further studies needed to understand exact contribution of APOBECs in the etiology of lung adenocarcinoma including protein level studies and mutation pattern analyses with high throughput DNA sequencing on the same patients' samples.

Key words: APOBEC, *APOBEC3B*, lung cancer, mRNA expression, quantitative methylation analysis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, akciğer dokusunda bulunan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde 8.2 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Bunlar içinde 1.59 milyon ölüm ile akciğer kanserleri ilk sırayı almaktadır (1).

Akciğer kanserleri; küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin (KHDAK) ise 3 temel alt tipi vardır; a-) adenokarsinom, b-) skuamoz hücreli, c-) büyük hücreli. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) her 8 akciğer kanseri hastasından 1'inde görülürken, KHDAK 8 vakanın 7'sinde tespit edilmektedir (2).

Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin etiyolojisinde sigara kullanımı başta olmak üzere pasif içicilik, radon gazı, asbest maruziyeti, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, hava kirliliği gibi nedenler bulunmaktadır. Tüm kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserlerinin oluşumu için de özellikle proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde somatik mutasyonların meydana gelmesi gerekmektedir.

KHDAK'nde cerrahi en küratif tedavi seçeneğidir. Operasyon sonrası kemoterapi hastalara fayda sağlayabilmektedir. Kombine radyoterapi ve kemoterapi az sayıda hastada kür sağlarken önemli ölçüde palyasyon sağlamaktadır. Hedefe yönelik tedaviler ise umut vaat etmektedir.

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi için somatik mutasyonlar gereklidir. Kanser türlerinin çoğunda tümörlü dokuların genomu incelendiğinde binlerce mutasyona rastlanmaktadır (3-7). Bu gözlemlenen mutasyonlar DNA tamir

mekanizmalarından kaçan ya da yanlış onarımlar nedeniyle oluşan hataların sonucudur. Geleneksel olarak radyasyon ve kimyasal ajanlar kanserojenik mutagenezden sorumlu tutulurlar (8). Ancak hücrelerdeki enzimatik aktivite de DNA hasarına ve mutasyonlara sebep olabilir (9).

Hücre kültürü çalışmaları APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) proteinlerinin kromozomal ve mitokondriyal DNA'da C→T (sitozin→timin) mutasyonu yapabileceğini göstermiştir (10-12). Bu mutasyonlar özellikle DNA üzerindeki TC (Timin, Sitozin) bazlarının birlikte bulunduğu sitozin bazlarına yönelik oluşur. Bu şekilde mutasyon motiflerinin tüm genom boyunca incelenmesi DNA'ya başlangıçtaki zararın kaynağını anlamaya yardımcı olmaktadır. APOBEC'lerin sebep olduğu mutasyon motifleri birçok kanser türünde (meme, baş ve boyun, mesane, serviks, akciğer adenokarsinom ve akciğer skuamoz hücreli karsinom) tespit edilmiştir (13).

Bir çalışmada meme kanserlerinde APOBEC genlerinin ekspresyonu araştırılmış, APOBEC3B'nin ekspresyonu normal meme dokusuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ve APOBEC3B'nin meme kanserlerinde mutasyonların enzimatik kaynağı olabileceği öne sürülmüştür (14).

Akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisine APOBEC'lerin katkısını anlamak için akciğer adenokarsinomu tanılı 42 hastanın tümör ve komşu normal akciğer dokularında *APOBEC1*, *APOBEC2*, *APOBEC3A*, *APOBEC3B* ve *APOBEC3C* mRNA ekspresyonu revers transkripsiyon - kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca *APOBEC3B* geninin düzenlenmesinde DNA metilasyonun rolünü anlamak için aynı olguların tümör ve normal dokularında pyrosekans yöntemi ile kantitatif metilasyon analizi yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

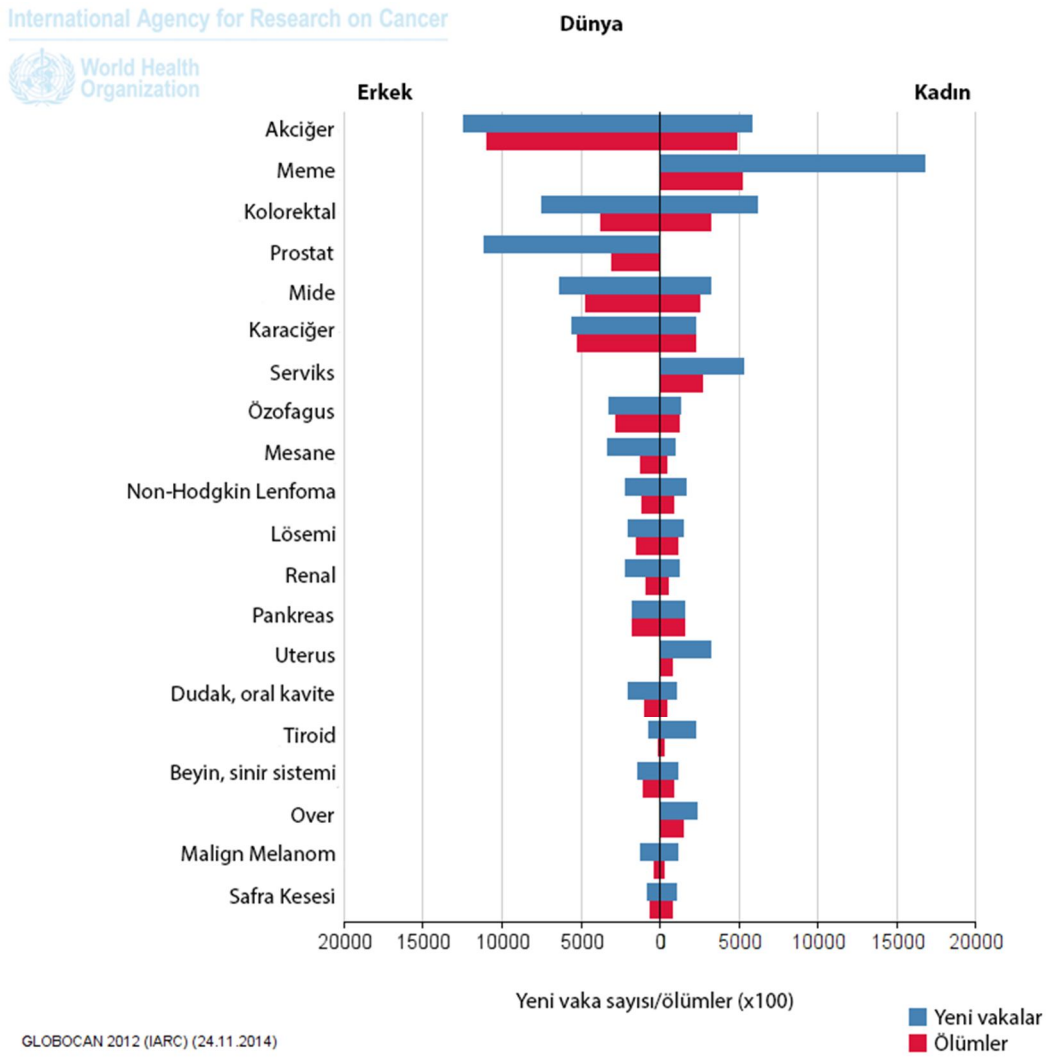
2.1. KANSER

Kanser terimi vücudumuzdaki birçok organı etkileyebilen geniş bir grup hastalığı kapsar. Kanserler DNA'da meydana gelen somatik mutasyonlar veya DNA dışındaki epigenetik değişimler nedeniyle hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşur. Bu hücreler kan ve lenf dolaşım sistemleri ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır, birçoğu köken aldığı organdan ya da hücreden adını alırlar (15).

Dünya genelinde ölümlerin en önde gelen sebeplerinden biri kanserlerdir. Dünya üzerinde kanser kayıtçılığı yapan toplam 184 ülke ve 28 kanser tipi için en yeni kanser tahminleri DSÖ tarafından kurulan GLOBOCAN 2012 sitesinde kullanıcıların hizmetine sunulmuştur. Bu verilere göre 2012 yılında dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış, 8.2 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Ayrıca 5 yıl içinde kanser tanısı alan ve hayatını devam ettiren toplam 32.6 milyon hasta bulunmaktadır (1).

En fazla ölüme sebep olan kanser türleri ise şunlardır (GLOBOCAN 2012) (Şekil 1)(1):

- Akciğer kanseri (1.59 milyon ölüm/yıl)
- Karaciğer kanseri (745.000 ölüm/yıl)
- Mide kanseri (723.000 ölüm/yıl)
- Kolorektal kanser (694.000 ölüm/yıl)
- Meme kanseri (521.000 ölüm/yıl)

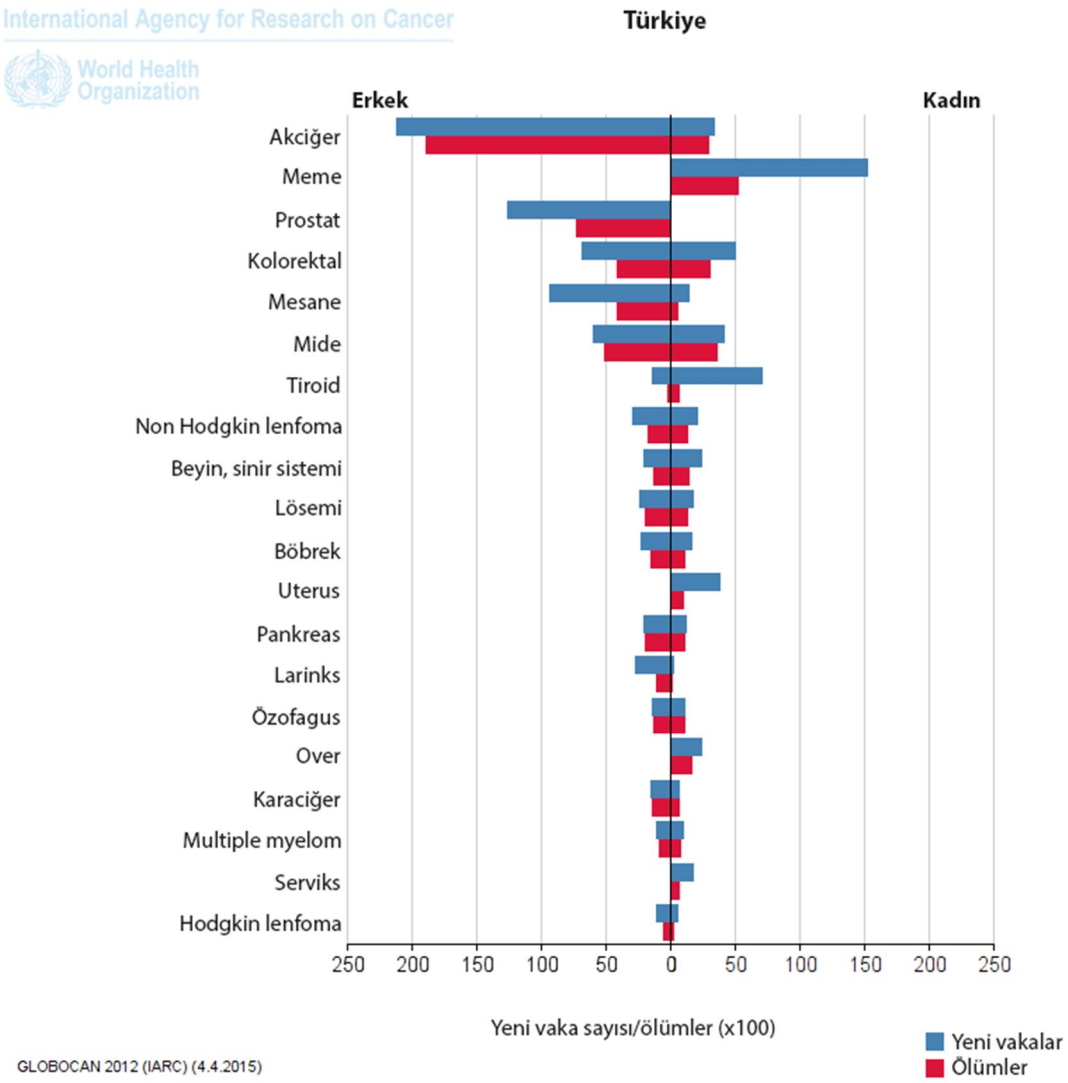


Şekil 1. Dünya genelinde 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı (16)

2.2. AKCİĞER KANSERİ

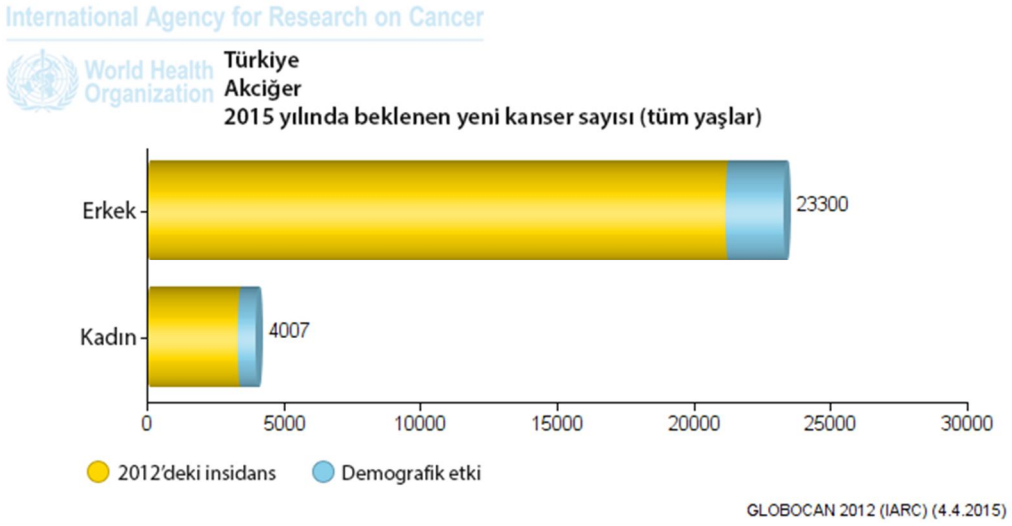
2.2.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri dünya genelinde en sık görülen kanser türüdür ve aynı zamanda kanser nedeniyle ölümlerin en sık sebebidir. 2012 yılında 1.8 milyon yeni akciğer kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir ve bu rakam toplam kanser vakası sayısının %12.9'unu oluşturmaktadır. Dünya genelinde erkeklerde hem en sık gözlenen (tüm kanserlerin %16.7'si) hem de en çok ölüme sebep olan kanser türü yine akciğer kanseridir. Kadınlarda ise üçüncü sıklıkta gözlenen ve meme kanserinden sonra en çok ölüme sebep olan kanser türüdür (1).



Şekil 2. Türkiye'de 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı (16)

Türkiye'de de tüm dünyada olduğu gibi akciğer kanseri önemli bir sağlık sorunudur. Tüm kanserler içinde en çok görülen (tüm kanserlerin %16.6'sı) ve en çok ölüme sebep olan (kanser nedeniyle ölümlerin %23.9'u) kanser türüdür (16). Ülkemizde akciğer kanseri erkeklerde en çok gözlenen kanser türü olurken kadınlarda 5. sırada yer almaktadır (Şekil 2). 2015 yılında ise erkeklerde 23.000'den, kadınlarda 4.000'den fazla yeni akciğer kanseri vakası beklenmektedir (Şekil 3) (16).



Şekil 3. 2015 yılında Türkiye için öngörülen yeni akciğer kanseri vaka sayısı (16)

Genellikle akciğer kanseri tanısı küratif tedavinin mümkün olmadığı ileri evrelerde konulmaktadır, bu nedenle akciğer kanseri diğer birçok kanser türüne göre daha yüksek mortalite oranına sahiptir. Hastaların sadece %16.8'i tanı koyulduktan sonra 5 yıl veya daha fazla hayatta kalmaktadır (17).

2.2.2. Etiyoloji

Akciğer kanseri oluşumunda sigara içimi en önemli risk faktörüdür. Sigara içilen yıl ve günlük içilen sigara miktarı ile doğru orantılı olarak bu risk artmaktadır (18, 19). Akciğer kanseri riski hiç sigara içmeyenlere (hayat boyunca 100 adetten daha az sigara içimi olarak tanımlanır) göre, günde 1-4 adet sigara içenlerde 5 kat (20), 8-12 adet içenlerde 12 kat, 25 adet ve daha fazla içenlerde en az 24 kat, 42 adet ve daha fazla sigara içenlerde 39 kat artmıştır (21). Sigarayı bırakanlarda ise zaman içinde kanser riski azalmaktadır (22).

Sigara dumanında 4.000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır ve bunlardan en az 60 tanesi kanserojen etki göstermektedir (23). Bunlar içinde en güçlü kanserojenler polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-nitrozaminler ve aromatik aminlerdir. Sekiz adet tütün-spesifik N-nitrozamin tanımlanmıştır. Bunlardan 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-bütanon (NNK: nikotin bağımlı nitrozamin ketonu) akciğer kanseriyle en fazla ilişkisi bilinendir ve deney hayvanlarında akciğer adenokarsinomu oluşturmak için kullanılır. NNK gibi tütün kanserojenleri DNA'ya bağlanabilirler ve DNA eklentileri

oluştururlar. Bunlar kanserojen kimyasalların kovalent olarak bağlandığı DNA parçalarıdır (24). DNA tamir mekanizmaları DNA eklentilerini kaldırabilirler ya da zarar görmüş DNA'ya sahip hücre apopitozise gider. Ancak DNA tamir mekanizmaları başarısız olursa DNA eklentileri kısa süre içinde mutasyonlara yol açarlar. NNK'lar sinyal iletim yolaklarını etkileyerek onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin arasındaki dengeyi bozabilirler ve hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açabilirler (25). Ayrıca NNK'lar *KRAS* onkogenini aktive edici mutasyonlarla da ilişkilidirler (26). Bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan benzo[a]piren metaboliti *TP53* tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara yol açmaktadır (27).

Akciğer kanseri sigara içenlerin hastalığı olarak bilinse de akciğer kanser vakalarının yaklaşık %25'i hiç sigara içmeyenlerde görülmektedir (28). Diğer taraftan sigara içenlerin ise sadece %20'sinde akciğer kanseri gelişmektedir (29). Bu durum sigara dışında diğer çevresel faktörlerin ve genetik yatkınlıkların akciğer kanseri gelişiminde etkisini vurgulamaktadır.

Her ne kadar sigara içmeyenlerde baskın bir etiyolojik ajan henüz bilinmese de pasif içicilik, genetik faktörler, radon maruziyeti, asbestoz, arsenik, hava kirliliği gibi çevresel faktörler ve geçirilmiş akciğer hastalıkları önemli risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir (30). Asbestoz ve sigara içimi sinerjistik etki göstermektedir (31). Asbest maruziyeti olan ve sigara içenlerde, asbest maruziyeti olup sigara içmeyenlere göre akciğer kanseri mortalitesi 19-26 kat artmıştır (32). Avrupa'da akciğer kanserlerinin yaklaşık %9'unun evlerdeki radon gazıyla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (33).

TP53 ve *EGFR* genlerindeki germline mutasyonlar akciğer kanseri için bireysel risk oluşturmaktadır fakat bu durum akciğer kanseri vakalarının çok küçük bir kısmında gösterilebilmiştir (34, 35). Yüksek çıktılı SNP (tek nükleotid polimorfizmi) genotipleme ile yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) bazı kromozomal lokuslar (15q25.1, 6p21.33, 5p15.33 ve 3q28) ile akciğer kanseri riski arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (36-38). Fakat bu lokuslarda belirlenen aday genlerin akciğer kanseri oluşumuna katkısı tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2.3. Sınıflandırma

Akciğer kanserleri klinik, histolojik ve genetik olarak geniş heterojen bir grup tümörü kapsar. Histolojik olarak akciğer kanseri küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'i KHDAK'dir (39).

KHDAK ana bronşlardan terminal alveollere kadar olan akciğerin epitelyal hücrelerinden kaynaklanır. KHDAK adenokarsinom, skuamoz (epidermoid) ve büyük hücreli olmak üzere üç ana histolojik gruba ayrılmaktadır (40). KHDAK içinde adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom oranı her biri için %30-%50 arasında değişmektedir, diğer histolojik tipler nadir olarak görülmektedir (41). Genellikle adenokarsinomlar distal hava yollarından kaynaklanırken skuamoz hücreli kanserler daha proksimalden köken alırlar ve adenokarsinomlara göre sigara içimi ve kronik inflamasyon ile daha çok ilişkilidirler. 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra skuamoz hücreli kanser oranı azalırken adenokarsinom oranı hızla artmıştır (42). Sigaralarda kullanılan filtrelerin bir kısım kanserojenlerin oranını azaltmasının bu durumda etkili olduğu düşünülmektedir (43).

2.2.4. Evreleme

Kanserlerde evreleme hastanın sağkalımı ve uygulanacak tedavilerin öngörülmesinde son derece önemlidir. Akciğer kanserlerinde güncel evreleme sistemi, primer tümör boyutu, organ yapılarına ve lenf nodlarına invazyon, uzak metastaz durumuna göre şekillenmektedir. TNM evrelemesine göre T primer tümör boyutunu, tümörün komşu organ ve yapılara invazyonunu, N lenf nodu tutulumunu, M ise uzak metastaz durumunu açıklamaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. TNM sınıflandırmasının yedinci versiyonuna göre T, N, M faktörleri (44)

T Primer Tümör	Tx		Balgam ya da bronkoalveloler lavaj sitolojisinde malign hücreler tespit ediliyor fakat görüntüleme yöntemleri ya da bronkoskopide tümör gösterilemiyor
	T0		Primer tümör kanıtı yok
	Tis		Karsinoma in situ
	T1		Tümör en büyük çapı ≤ 3 cm, akciğer ya da visseral plevra ile çevrili, lober bronşun daha proksimaline invazyon bulgusu yok (Bronşun yüzeyel duvarıyla sınırlı süperfisyal tümörler ana bronşa ulaşsa bile T1 olarak değerlendirilir)
		T1a	Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm
		T1b	2 cm < tümör en büyük çapı ≤ 3 cm
	T2		3 cm < tümör en büyük çapı ≤ 7 cm, karinaya 2 cm ve daha fazla uzaklıkta ana bronş tutulumu, visseral plevra invazyonu, hilusa uzanan fakat tüm akciğeri kapsamayan obstrüktif atelektazi ya da pnömoni
		T2a	3 cm < tümör en büyük çapı ≤ 5 cm
		T2b	5 cm < tümör en büyük çapı ≤ 7 cm
	T3		Tümör en büyük çapı > 7 cm, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diafragma, frenik sinir, mediastinal plevra, parietal perikard invazyonu, ana bronşun karinaya 2 cm den daha az yakınlıkta invazyonu (karina tutulumu yok), tüm akciğeri kapsayan total atelektazi ya da obstrüktif pnömoni, aynı lobta tümörden anatomik olarak ayrı tümör nodülleri varlığı
	T4		Her hangi bir boyuttaki tümörde mediasten, kalp, büyük damar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu, karina, aynı taraf farklı lobta tümör nodül ya da nodülleri varlığı
N Lenf Nodu	Nx		Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
	N0		Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
	N1		Aynı taraf hiler, peribronşial, interlober, lober, segmental, subsegmental lenf nodu tutulumu
	N2		Subkarinal ve ipsilateral mediastinal lenf nodu
	N3		Kontralateral mediastinal, ipsilateral ya da kontralateral skalen ve supraklaviküler lenf nodu
M Metastaz	Mx		Metastaz değerlendirilemedi
	M0		Metastaz kanıtı yok
	M1a		Malign plevral efüzyon, malign perikardiyal efüzyon, malign plevral yayılım, kontralateral akciğerde metastaz
	M1b		Uzak organ metastazı

Son olarak Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Birliği (IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer) TNM evrelemesinin 7. versiyonunu yayınlamıştır (Tablo 2) (44). 5 yıllık sağkalım oranları tümör evresine bağlı olarak belirgin ölçüde düşmektedir; evre I (%40-50), evre II (%25-35), evre III (%7-19), evre IV (%2) (44).

Tablo 2. Akciğer kanserlerinde yedinci TNM evreleme sistemi (44)

	Tümör	Lenf nodu	Metastaz
Okült karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a,b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1,2	N2	M0
	T3	N1,2	M0
	T4	N0,1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	Tüm T	N3	M0
Evre IV	Tüm T	Tüm N	M1a,b

2.2.5. Tedavi

KHAK'de tedavi hastalığın sınırlı (Evre I, II ve III'e tekabül eder) veya yaygın (Evre IV'e tekabül eder) olmasına göre değişmektedir. Sınırlı hastalıkta platin tabanlı kemoterapi ile torasik radyoterapi kombine edilir. Hastalığın beyine yayılma olasılığı yüksek olduğundan ayrıca beyine koruyucu amaçlı radyoterapi yapılır. Yaygın hastalık küratif bir tedavi seçeneği yoktur, kombine kemoterapi uygulanmaktadır. Bu tedavi seçeneklerine rağmen KHAK'de prognoz çok kötüdür ve sağkalım oranlarında çok az iyileşme vardır (45).

KHDAK'nde ise cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi temel tedavi seçenekleridir. Erken evre KHDAK'nde lokalize tümörün tamamen rezeksiyonu en iyi tedavi ve sağkalım seçeneğidir. Akciğer kanserlerinin belirgin bir erken belirtisinin olmaması nedeni ile hastalar genellikle ileri evrelerde tanı almakta ve tedavi seçenekleri azalmaktadır (46).

Evre I ve II hastalarda tümör küratif olarak çıkarılabilir ve tam tedavi (%25-30) sağlanabilir (47). Fakat yine de küratif rezeksiyon yapılan erken evre vakaların önemli bir kısmında (%30-55) tümör nükseder (48). Uygun evre IIIA hastalarında da cerrahi tedavinin bir parçasıdır ve adjuvan kemoterapi veya radyoterapi ile kombine edilir (49). Evre IIIB tümörler ise opere edilemez olarak kabul edilmektedirler. Bu hastalarda kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonu önerilmektedir (50). KHDAK tanısı alan hastaların yaklaşık yarısı evre IV kanserdir. Bu evrede hastalık tedavi edilemez olarak kabul edilir. Buradaki tedavi amacı sağkalımı uzatmak ve hastalıkla ilişkili semptomları kontrol altında tutmaktır. Tedavi seçenekleri sitotoksik kemoterapiler ve hedefe yönelik ajanları içermektedir. Radyoterapi ve cerrahi seçili bazı hastalarda palyasyon amacıyla uygulanabilir (51).

Postoperatif kemoterapi cerrahi olan hastalarda ek bir fayda sağlayabilmektedir. Radyoterapi ve kemoterapinin kombine edilmesi az sayıda hastada tedavi sağlasa da birçok vakada palyasyona yardımcı olur. İleri evre vakalarda kemoterapi ya da EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin sağkalıma az da olsa katkısı vardır (52). Kemoterapi ileri evre KHDAK'nde hastalıkla ilişkili semptomlarda kısa süreli bir iyileştirme yapmaktadır. Kemoterapinin hastalık ilişkili semptomlar ve yaşam kalitesi üzerine etkilerini değerlendiren birçok klinik araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar kemoterapi ile hastalık ilişkili semptomların genel yaşam kalitesini bozmadan kontrol altına alınabileceğini öne sürmüştür (53, 54).

Akciğer kanserlerinde mutasyonların belirlenmesi hedefe yönelik moleküler tedavilerin önünü açmıştır. Bu tedaviler sayesinde bir kısım metastatik akciğer kanseri hastasında sağkalımda artış sağlanmıştır (55). Özellikle *EGFR, MAPK, PI3K* sinyal yolaklarındaki genetik bozukluklar kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılık veya direncin altında yatan mekanizmaları açıklayabilir. *EGFR* mutasyonları tirozin kinaz inhibitörlerinden (erlotinib, gefitinib) alınacak cevabı öngörmede güçlü belirteçlerdir. Translokasyon sonucu olucu oluşan *ALK* ve *EML4* genlerinin füzyonu KHDAK'nin %3-7'sinde görülmektedir (56). Bu hastalarda EGFR'yi hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri etkisizdir ancak ALK inhibitörü olan "crizotinib"e yanıt vardır (57).

2.2.6. Akciğer adenokarsinomları

Adenokarsinomlar mukus ve benzeri maddeler salgılayan sekretuar hücrelerden kaynaklanırlar. Adenokarsinomlar tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF1) protein belirtecini eksprese etmeleri ile tanınırlar (58). Bu tip akciğer kanserleri temel olarak sigara içenlerde görülse de sigara içmeyen bireylerde en çok rastlanılan akciğer kanseri türüdür. Ayrıca adenokarsinomlar kadınlarda erkeklere göre daha sık rastlanmaktadır ve daha genç yaşta ortaya çıkabilmektedir (59).

Adenokarsinomlar histolojik olarak son derece heterojen bir gruptur. Güncel IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society) sınıflandırmasına göre akciğer adenokarsinomları histopatolojik olarak birçok gruba ayrılmıştır (60):

- **Preinvaziv lezyonlar**
    - Atipik adenomatöz hiperplazi
    - Adenokarsinoma in situ
        - Nonmüsinöz
        - Müsinöz
        - Miks müsinöz/nonmüsinöz
- **Minimal invaziv adenokarsinom**
    - Nonmüsinöz
    - Müsinöz
    - Miks müsinöz/nonmüsinöz
- **İnvaziv adenokarsinom**
    - Lepidik baskın
    - Asiner baskın
    - Papiller baskın
    - Mikropapiller baskın
    - Mukus üreten solid baskın
- **İnvaziv adenokarsinom varyantları**
    - İnvaziv müsinöz adenokarsinom
    - Kolloid
    - Fetal
    - Enterik

Adenokarsinomlarda *KRAS*, *EGFR* ve *ALK* mutasyonları görülebilmektedir ve bu genlerdeki mutasyonlar hedefe yönelik tedavilere yanıtı değiştirmektedir. Bu nedenle klinik pratikte bu genlerin mutasyon testlerinin yapılması standart hale gelmiştir (61, 62).

EGFR adenokarsinomların önemli bir kısmında hücre yüzeyinde eksprese olmaktadır. Başlangıç çalışmaları tirozin kinaz inhibitörleri olan gefitinib ve erlotinibin göreceli olarak küçük bir grup akciğer kanserinde etkili olduğunu göstermiştir (63). Sonraki çalışmalarla özellikle ekzon 19 delesyonu, ekzon 21 L858R ve ekzon 18 G719X gibi EGFR tirozin kinaz domaininde somatik mutasyonları olan hastalarda tirozin kinaz inhibitörlerine yüksek yanıt alındığı gösterilmiştir (64). Bunların aksine ekzon 20 T790M mutasyonu tirozin kinaz inhibitörlerine karşı kazanılmış dirençten sorumlu tutulmaktadır (65). Genellikle aktive edici *EGFR* mutasyonları sigara içimi öyküsü olmayan adenokarsinom hastalarında gözlenmektedir (66).

KRAS mutasyonları da akciğer adenokarsinomlarında sık gözlenmektedir ve yaklaşık vakaların %25'inde bulunmaktadır. Ancak bu mutasyonlar Asya toplumunda daha az gözlenirken sigara içenlerde daha sık gözlenmektedir (67). *KRAS* mutasyonu olan hastalarda prognoz daha kötüdür ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç görülmektedir (67). Diğer bir genetik bozukluk *ALK* ve *EML4* füzyonudur. Bu durum sigara içmeyen ya da az sigara içenlerdeki adenokarsinomlarda daha sık gözlenir. Bu hastalarda EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin faydasının olmadığı düşünülmektedir.

2.3. KANSER GENETİĞİ

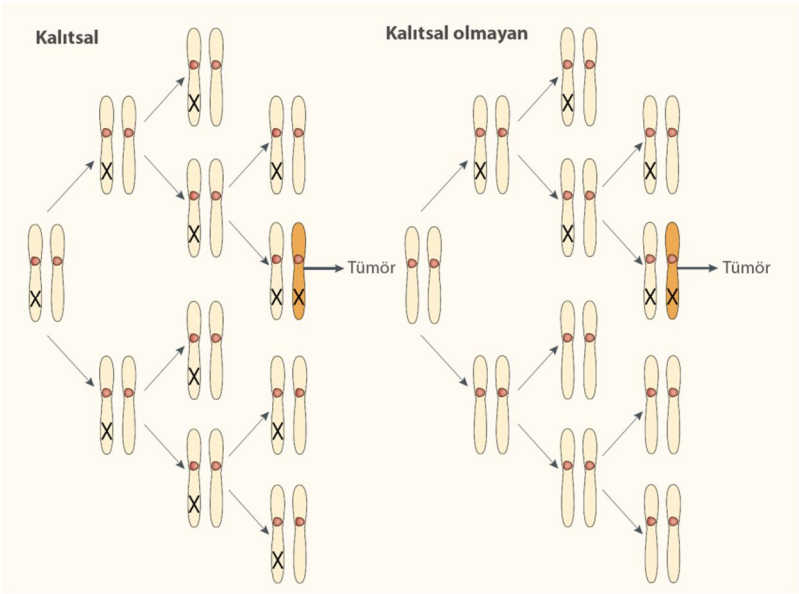
2.3.1. Geçmişten günümüze kanser genetiği

Kanserin genetik bir hastalık olduğu fikri ilk kez 1914 yılında Theodor Boveri tarafından ortaya konmuştur (68, 69). Boveri anormal mitozlarla malign tümörler arasında ilişki kurmuş ve kromozom anormalliklerinin kanserler için gerekli olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca hücre bölünmesini teşvik eden ve baskılayan kromozomlardan bahsetmiş, böylece onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin keşfinden yıllar önce önemli bir öngörüde bulunmuştur (70). Birkaç yıl sonra Ernest Tyzzer ilk kez "somatik mutasyon" terimini kullanmıştır (71).

1927 yılında Hermann J. Muller iyonize radyasyonun mutasyonlara sebep olarak kanserojen etki gösterdiğini keşfetmiştir (72). İyonize radyasyon üzerine çalışmalarını sürdüren Muller 1950'de tek bir hücrede meydana gelen çok sayıda mutasyonun kansere sebep olabileceğini ileri sürmüştür (73).

DNA'nın kalıtımın kaynağı olduğunun bulunması (74) ve DNA yapısının keşfi (75) ile birlikte kanserlerin temel sebebinin DNA'daki mutasyonlar olabileceği fikri güçlenmiştir. 1960'lı yıllardan sonra kanser hücresi kromozomlarının daha detaylı incelenmesi ile birlikte kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında 9. ve 22. kromozomlar arasında translokasyon ('Philadelphia kromozomu') tespit edilmiş böylece ilk defa bir kromozomal anomali kanserle ilişkili bulunmuştur (76, 77).

1971 yılında Alfred Knudson kanserin genetik temelini açıklamak için bir model ortaya koymuştur (78). Knudson retinoblastoma hastalarını incelemiş, her iki gözü de etkilenen vakalarda tümörün daha erken yaşta başladığını ve bu çocukların yakın akrabalarında da retinoblastomanın olduğunu görmüştür. Bunun üzerine bu kanserin oluşabilmesi için iki ayrı genetik kusurun gerçekleşmesi gerektiğini ortaya sürmüştür (Şekil 4). Knudson tek gözü etkilenen hastalarda bir gözdeki bir hücrede meydana gelen iki başarılı mutasyon olabileceğini öngörmüştür. Çünkü tek bir hücrede iki mutasyon oluşma olasılığı düşüktür, retinoblastoma nadirdir ve tipik olarak tek gözde gelişir. Çift taraflı vakalarda ise çocuk kanser için gerekli olan iki mutasyondan bir tanesini ailesinden almıştır ve bu yüzden tüm hücrelerinde başlangıç mutasyonu mevcuttur. Bu hastalarda kanser oluşması için tek mutasyon yeterlidir. Çünkü her bir göz milyonlarca hücreden oluşur ve her iki gözde de en az bir hücrede mutasyon gerçekleşme olasılığı yüksektir böylece iki taraflı ve erken yaşta tümör oluşur (78, 79).



Şekil 4. Knudson'ın iki vuruş hipotezi (79)

İlk onkogen 1970 yılında tavuk retrovirüslerinde keşfedilmiş ve *src* (adı "sarkom"dan gelmektedir) adı verilmiştir (80). 1976'da Dominique Stehelin, J. Michael Bishop, Harold E. Varmus ve Peter Vogt bu onkogenlerin insanlar da dahil olmak üzere birçok canlıda bulunan normal genlerin aktive olmuş hali olduğunu keşfettiler ve bunlara proto-onkogen adını verdiler (80, 81).

1982 yılına gelindiğinde T24 insan mesane karsinomu hücrelerinde *HRAS* geninin 12. kodonunda glisin amino asitinin valine dönüşümüne sebep olan guanin, timin (G→T) tek nükleotid değişimi gözlenmiş böylece ilk kez insanlarda kansere sebep olan DNA dizi değişikliği tespit edilmiştir (82, 83).

1986 yılında Stephen Friend ve arkadaşları retinoblastoma geninin komplementer DNA'sını (cDNA) izole ettiler ve tümörlerde en azından bir kısmının delesyona uğradığını gözlemlediler (84). Bunu takip eden çalışmalarla birlikte retinoblastoma (*RB1*) geni ilk tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (85-87).

Diğer taraftan 80'li yıllarda *RB1* geninin 5' tarafında normalde metillenmemiş olarak bulunan CpG adalarının retinoblastoma hastalarından alınan tümör dokularında hipermetile oldukları bulunmuştur (88). Sonraki çalışmalarla birlikte metilasyonun tümör baskılayıcı genleri inaktive ederek kanser oluşumuna katkı sağladığı gösterilmiştir (89, 90).

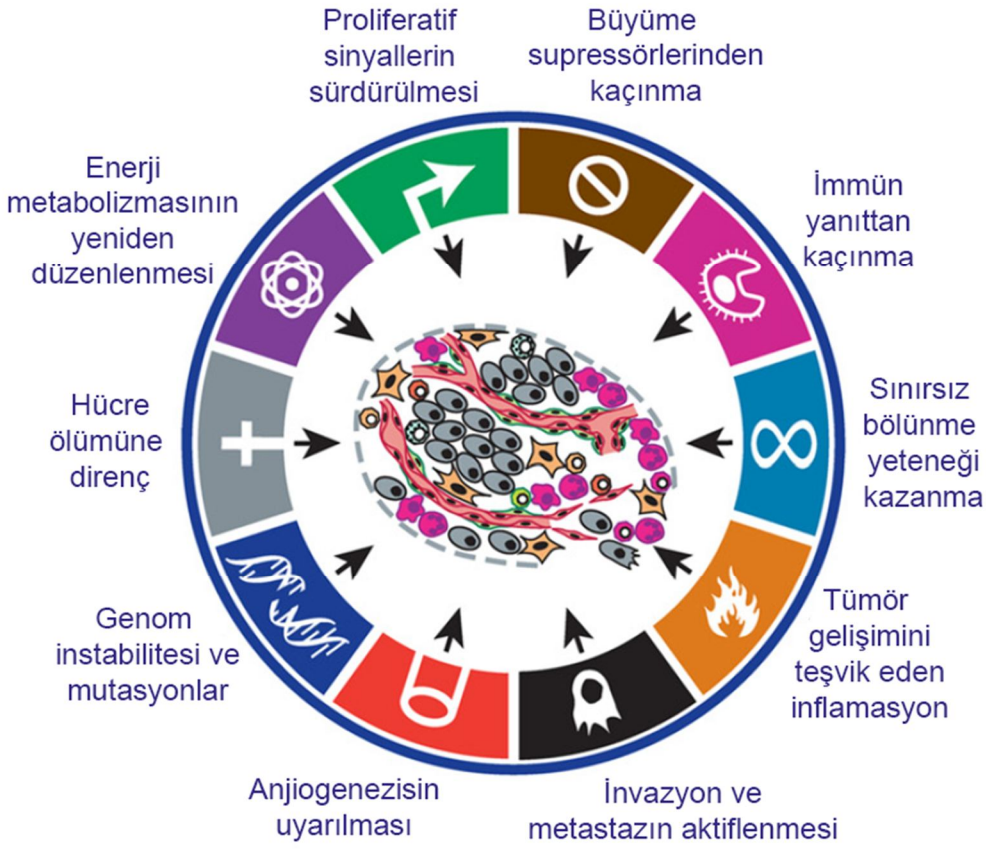
Epigenetik DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesi değişikliklerini oluşturan mekanizmaları kapsar. CpG adalarının metilasyonu da bu mekanizmaların başında gelir. Epigenetik mekanizmalar memelilerde normal gelişim ve dokuya özgü gen ekspresyon paternlerinin korunmasında elzemdir. Epigenetik süreçlerdeki kesintiler gen ifadesinde değişiklere ve hücrede malign dönüşüme yol açabilmektedir (91). Genetik ve epigenetik değişimler aynı madalyonun iki yüzü olarak değerlendirilebilir. Birbirleriyle sürekli etkileşim içindedirler. Epigenetik bir değişiklik DNA'da mutasyona sebep olabilirken, diğer taraftan DNA'da oluşan bir mutasyon epigenetik bozukluğa yol açabilmektedir (92).

Kanserlerde ilk somatik mutasyonun tespiti ile birlikte günümüze kadar uzanan moleküler kanser genetiği araştırmalarında yeni bir çağın kapıları aralanmıştır. Moleküler tekniklerdeki gelişmeler, özellikle yeni nesil dizileme teknolojilerinin

gelişimi ile birlikte çok sayıda kanser genomu dizilenebilmiş kapsamlı veri tabanları araştırmacıların kullanımına sunulmuştur. Kanserlerin altında yatan genetik nedenlerin aydınlatılması, kanserden korunmada ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde büyük katkılar sağlamıştır.

Douglas Hanahan ve Robert Weinberg günümüzde kabul gören kanserin temel özelliklerini on kategoride (Şekil 5) özetlemişlerdir (93). Bunlar:

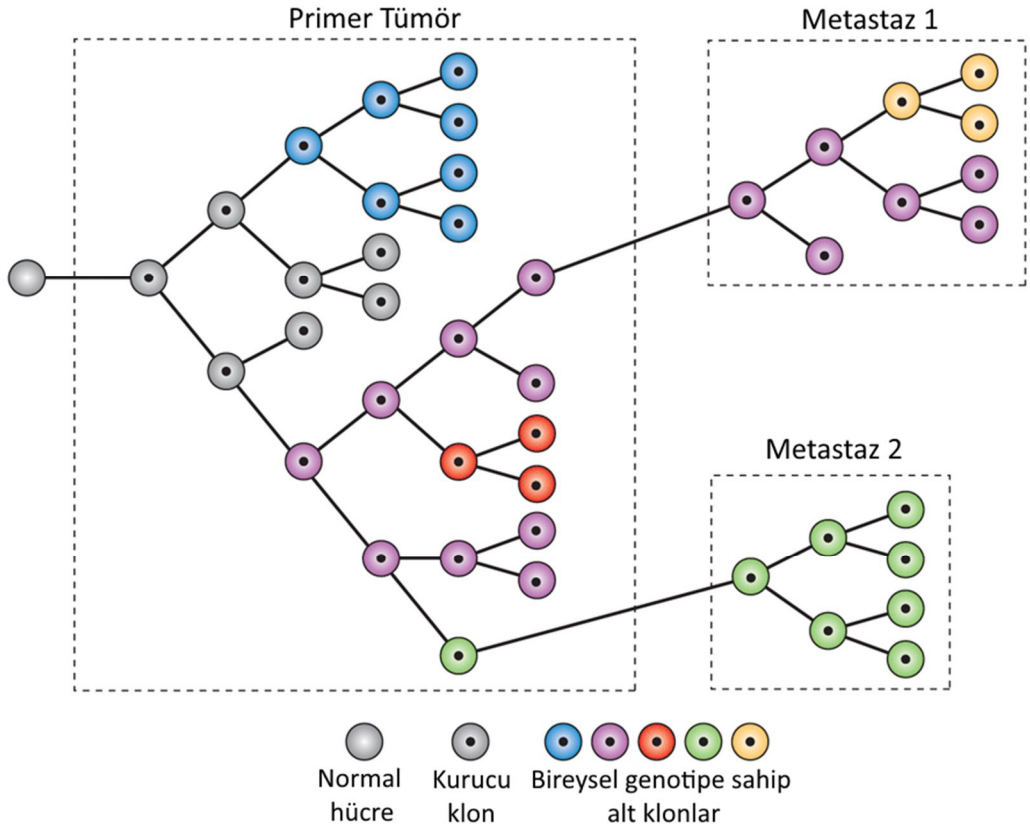
1. Proliferatif sinyallerin sürdürülmesi: *ör. KRAS* geninin aktivasyonu
2. Büyüme supressörlerinden kaçınma: *ör. RB1* veya *TP53* inaktivasyonu
3. Sınırsız bölünme yeteneği kazanma: *ör.* Telomerazın aktif hale gelmesi
4. Hücre ölümüne direnç: *ör.* İnsülin benzeri büyüme faktörü 1/2 (IGF 1/2) salınımı
5. Anjiogenezisin uyarılması: *ör.* VEGF indükleyicilerinin üretimi
6. Doku invazyonu ve metastaz: *ör.* E-cadherin aktivasyonu
7. Genom instabilitesi ve mutasyonlar: *ör.* Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, epigenetik değişiklikler
8. Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi: *ör.* Glukoz taşıyıcılarının, özellikle GLUT1'in upregülasyonu
9. İmmün yanıttan kaçınma: *ör.* TGF-β ve benzeri immünsupressörlerin salınımı
10. Tümör gelişimini teşvik eden inflamasyon: *ör.* İnflamatuar hücreler tarafından EGF, VEGF, FGF2 salınımı



Şekil 5. Kanserlerin temel özellikleri (93)

2.3.2. Kanserlerde klonal gelişim

Hayat boyunca hem normal hem de neoplastik hücrelerde somatik mutasyonlar meydana gelir. Bu mutasyonlar DNA replikasyonundaki hatalar, iç (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık sistemi durumu, metabolizmal etkenler) veya dış (sigara, enfeksiyonlar, kimyasallar, radyasyon) kaynaklı mutajenlere maruziyet nedeniyle oluşmaktadır (3).



Şekil 6. Primer tümör ve metastazların klonal gelişimi. Gri daireler normal hücreleri temsil etmektedir. Merkezdeki noktalar kurucu klondan başlayıp devam eden somatik mutasyonları göstermektedir. Farklı renkteki daireler başarılı mutasyonların biriktiği farklı alt klonları temsil etmektedir (94).

Büyük çoğunlukla kanser tek bir hücredeki mutasyonlar sonucu meydana gelir ve bu hücre hızla çoğalarak kendisine ait mutasyonları içeren bir klon oluşturur. İlerleyen zamanda klondaki bazı hücrelerde yeni mutasyonlar oluşabilir ve bunun sonucunda yeni hücreler daha hızlı bölünme yeteneği kazanabilir. Daha fazla mutasyona sahip alt klonların proliferatif yetenekleri agresif bir şekilde artar ve baskın hale gelirler (Şekil 6). Böylece bazı klonlar seleksiyona uğrarlar, bu duruma "klonal evrim" adı verilmektedir (95).

2.3.3. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

Hücre bölünmesini teşvik eden ve sınırlayan faktörler sıkı kontrol edilen bir denge içindedir. Normal zamanda hücrede bölünmeyi hızlandıran ve frenleyen faktörler uyum içinde çalışır ve bölünmeyi uygun hızda gerçekleştirirler. Ne zaman ki bu uyum bozulursa ve denge hücre bölünmesi lehine kayarsa kanser oluşumunun ilk adımı

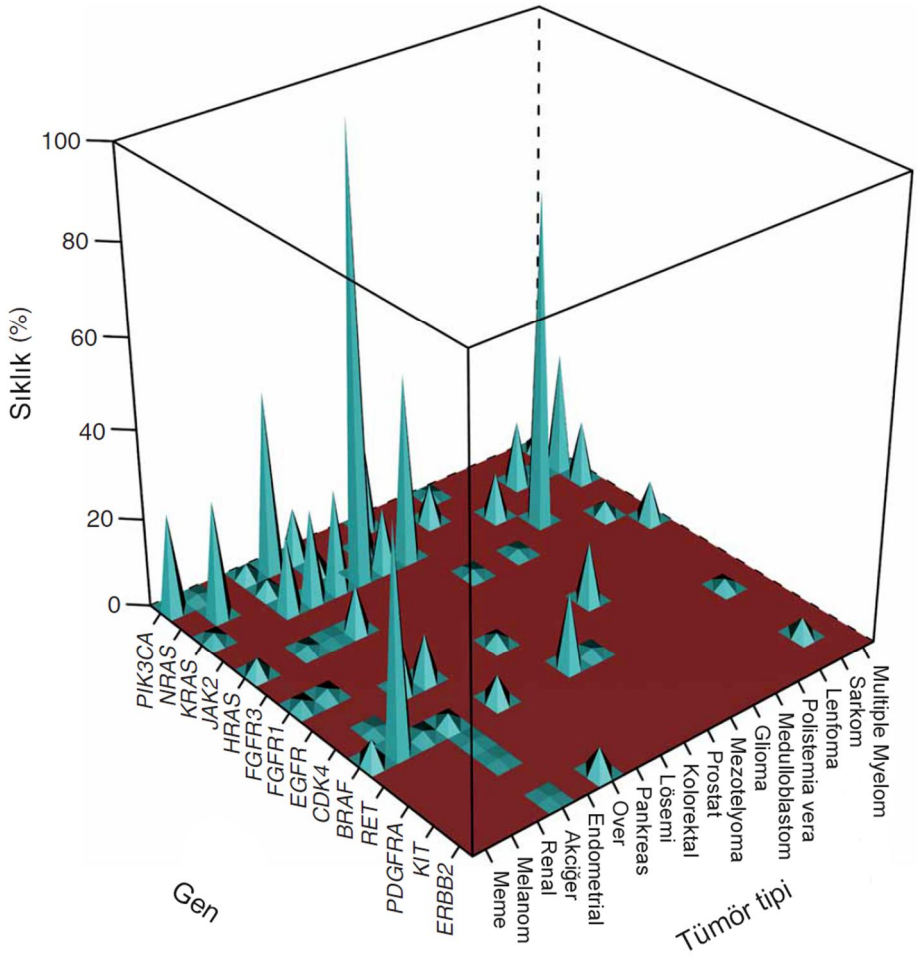
atılmış olur. İki grup gen bu döngüde önemli görev alırlar, bunlar: Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir.

Proto-onkogenler mutasyona uğradıklarında normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açan bir grup gendir (96, 97). Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar dominant karakterdedir ve mutasyona uğramış hallerine onkogen adı verilir. Bu genler normalde insan gelişimi, organ ve dokuların onarımında önemli süreçler olan hücre bölünmesi, hücre farklılaşmasında görev alırlar.

Onkogen aktivasyonunun altında yatan genetik mekanizmalar şunlardır:

- Hiperaktif gen ürününe sebep olan nokta mutasyonları, delesyonlar veya insersiyonlar
- Proto-onkogenin promotör bölgesinde artmış transkripsiyona yol açan nokta mutasyonları, delesyonlar veya insersiyonlar
- Proto-onkogenin ekstra kromozomal kopyalarının oluşmasına yol açan gen amplifikasyonu
- Proto-onkogenin farklı bir kromozom bölgesine taşınıp, orada transkripsiyonunun artmasına sebep olan translokasyonlar
- Proto-onkogenin ikinci bir genle birleşmesine yol açan ve böylece oluşan füzyon proteininin onkogenik aktiviteye sahip olmasına sebep olan translokasyonlar (98).

Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar o genin kodladığı proteinde yapısal değişiklerin ortaya çıkmasını sağlar böylece o proteinin aktivitesinde artışa neden olur. Bu mutasyonlar nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar gibi çok farklı türde olabilir (99). Örneğin, RAS ailesi proto-onkogenlerde (*HRAS, KRAS, NRAS*) nokta mutasyonları sıklıkla gözlenmektedir (100). Akciğer adenokarsinomlarının %30'unda, kolon kanserlerinin %50'sinde ve pankreas kanserlerinin %90'ında *KRAS* mutasyonları görülmektedir (101). Thomas ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada 17 farklı kanser türünde 1,000 tümör örneği incelemişler ve 14 onkogende en az bir mutasyon tespit etmişlerdir (Şekil 7) (102).



Şekil 7. Tümör türlerine göre bazı onkogenlerin mutasyon sıklığı (102)

Gen amplifikasyonu kromozomun bir kolunun kısıtlı bir bölgesinde kopya sayısı artışını ifade eder (103). Böylece gendeki kopya sayısı artışı, o genin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanır. Özellikle MYC, ERBB, RAS gen ailelerinde amplifikasyon çok sayıda kanser türünde kendisini göstermektedir (104). Meme ve over kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda *c-MYC* amplifikasyonu gözlenmektedir (105), *MYCN* amplifikasyonu ise nöroblastoma ile yakından ilişkilidir (106).

Translokasyonlar onkogen aktivasyonunu temel olarak iki şekilde gerçekleştirebilir. Bunlardan ilki, iki farklı genin birleşmesine yol açan translokasyonlardır. Bunun en güzel örneği 9. ve 22. kromozomlar arası translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomudur (77). 22. kromozomun kırık ucunda bulunan *BCR* geni, 9. kromozom parçasından gelen *ABL1* geni ile birleşir ve *BCR-ABL* füzyon geni oluşur. Sonuç olarak bu füzyon geninin ürünü yüksek tirozin kinaz aktivitesi gösterir ve hücre bölünmesini

teşvik eder (107). Diğer yol ise translokasyon sonucu farklı bir bölgeye yerleşen genin aktivitesinin artmasıdır. Bu durumun en iyi bilinen örneklerinden biri ise Burkitt lenfoma vakalarında gözlenen t(8;14)(q24;q32) translokasyonudur. Normalde 8. kromozomun q24 bölgesinde bulunan *c-MYC* geni translokasyon sonucu 14. kromozomun q32 bölgesine yerleşir ve burada bulunan immünoglobulin ağır zincir regülatör elemanlarının kontrolüne girer. Aktif olan bu regülatör elemanlar nedeniyle *c-MYC* aşırı eksprese olur (108, 109).

Tümör baskılayıcı genler genel olarak hücre büyümesi ve bölünmesini engelleyici görev yaparlar, bunun yanında gerekli durumlarda hücre ölümünü de teşvik ederler (110-112). Bu genler resesif karakterdedirler ve hücre bölünmesi üstündeki baskılarının kalkması için genellikle genin her iki kopyasında da fonksiyon kaybı olması gerekir. Tümör baskılayıcı genlerin ilk tanımlananı ve en iyi bilinen örneği *RB1* (retinoblastoma) genidir. Knudson'ın iki vuruş hipotezinde açıkladığı kansere yatkınlık, günümüzde hala çoğu tümör baskılayıcı gen için geçerliliğini korumaktadır. Bir tümör baskılayıcı genin bir alelinde meydana gelen germline mutasyon kansere yatkınlık oluşturur ve o kişide hayat boyunca diğer alelde meydana gelecek somatik mutasyon tümör gelişimini başlatır (78, 113). Günümüzde çok sayıda tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır, bazı örnekleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

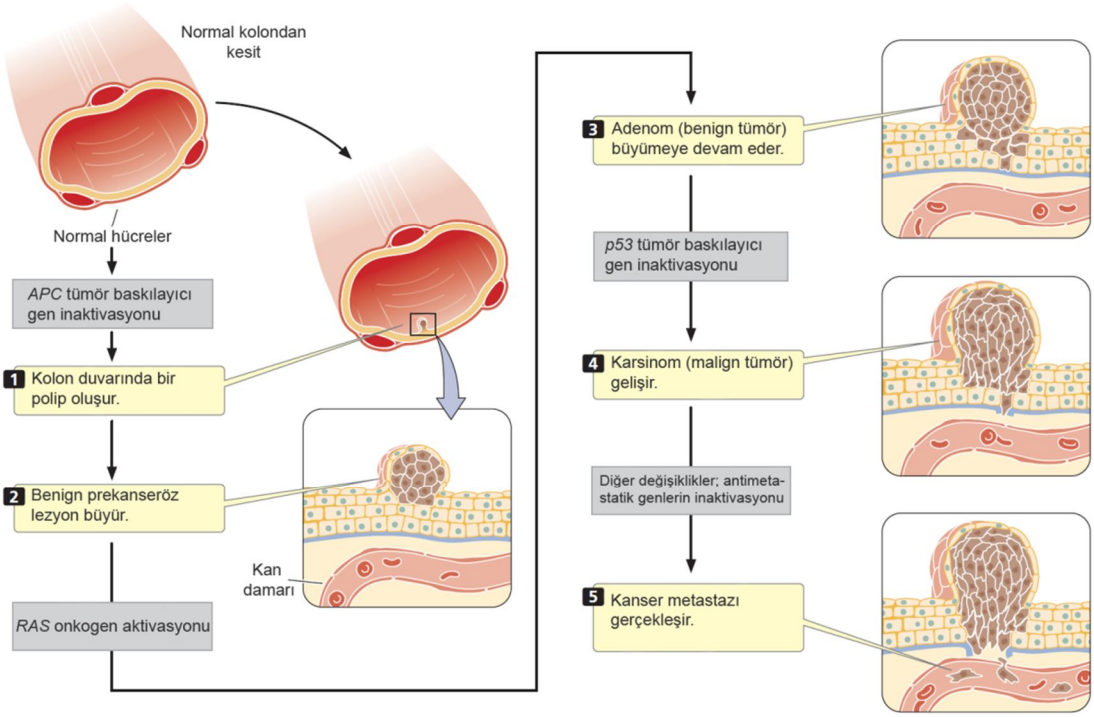
Tümör baskılayıcı genler '*gatekeeper*' (bekçi) ve '*caretaker*' (bakıcı) olmak üzere iki gruba ayrılabilir (113). Bekçi tipi tümör baskılayıcı genler (*TP53, APC, RB1*…) hücre döngüsü kontrol ederek ya da programlı hücre ölümünü destekleyerek tümör gelişimini önlerler. Bekçi genlerdeki fonksiyon kaybettiren mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesi ile sonuçlanmaktadır. Bakıcı tipi tümör baskılayıcı genler (*BRCA1, BRCA2, MLH1*...) ise DNA tamirinden sorumludurlar ve genomun bütünlüğünü korurlar. Bu genlerdeki fonksiyon kaybettiren mutasyonlar ise onkogenlerde ve bekçi tipi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikmesine sebep olur (114).

Tablo 3. Bazı tümör baskılayıcı genler, fonksiyonları ve ilişkili kanserler (113)

Tümör baskılayıcı gen	Gen fonksiyonu	Sporadik mutasyonla ilişkili tümörler	İlişkili kanser sendromları
RB1	Hücre döngüsünde transkripsiyonal düzenleyici	Retinoblastoma, Osteosarkom	Ailesel retinoblastoma
TP53	Transkripsiyonal düzenleyici, Apoptozis	Sarkomlar, Meme, beyin, akciğer tümörleri	Li-Fraumeni sendromu
NF1	Ras-GAP aktivitesi	Nörofibromlar, Sarkomlar, gliomlar	Nörofibromatozis tip 1
Wt1	Transkripsiyonal düzenleyici	Nefroblastoma	Wilms tümör
APC	β katenin aktivitesi düzenleyicisi	Kolon kanseri	Familyal adenomatöz polipozis
BRCA1	Transkripsiyonal düzenleyici, DNA tamiri	Meme ve over kanseri	Ailesel meme kanseri

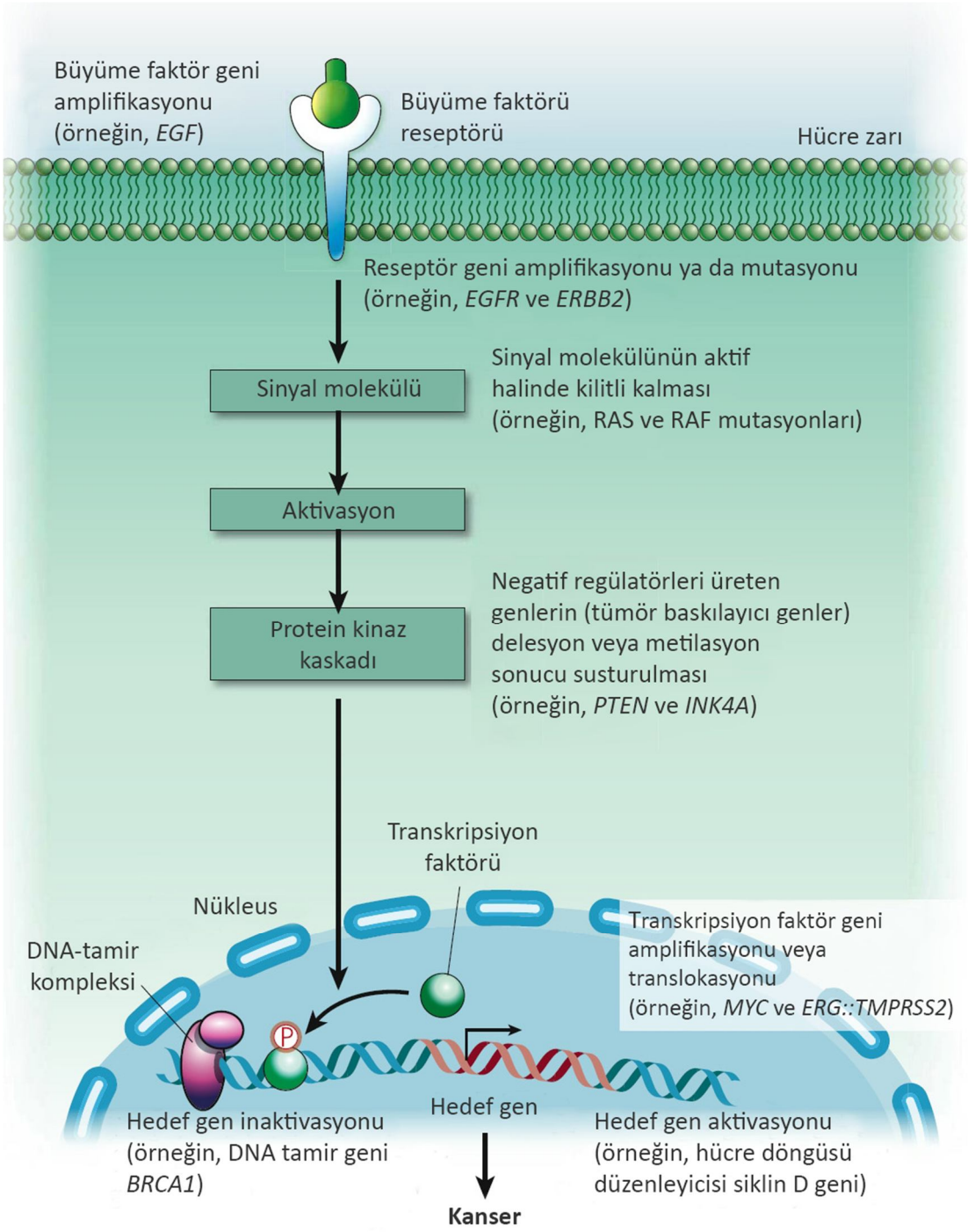
2.3.4. Kanser oluşumunda genetik yolaklar

Birçok kanser vakasında malign tümör sadece bir onkogenin aktif hale gelmesi ya da bir tümör baskılayıcı genin inaktivasyonundan ziyade farklı genlerdeki somatik mutasyonların birikimi sonucu gelişir. Bu nedenle kanserlerde genetik yolaklar hem çok çeşitli hem de karmaşıktır. Bu durum çoğu kanser türü için geçerlidir. Kolon kanseri başarılı genetik bozuklukların birikiminin kansere nasıl yol açtığını gösteren mükemmel bir örnektir (Şekil 8). *APC* geninde inaktivasyona yol açan mutasyonlar intestinal epitelde anormal dokuların gelişimine sebep olur. Anormal dokular displastik hücreler içerirler ve erken evre adenomların gelişimine yol açabilirler. Eğer bu adenomların birinde *KRAS* proto-onkogeninde aktive edici bir mutasyon meydana gelirse adenom erken evreyi geçer ve büyümeye devam eder. 18. kromozomun uzun kolunda yer alan bazı tümör baskılayıcı genlerde ve sonradan *TP53* geninde oluşan inaktive edici mutasyonlar, adenomun malign karsinoma dönüşmesine neden olur. Daha sonra başka tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyon sonucu metastaz gerçekleşir (115, 116).



Şekil 8. Kolon kanseri oluşumunda birçok genin katıldığı çok aşamalı süreç (116)

Hücreler bölünme kararını vermede ve normal hücre döngüsünü tamamlamada çok sayıda hücre içi ve dışı sinyalden etkilenirler. Dış sinyaller hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından başlatılır. Bu moleküller genellikle boyutları ve elektrik yükleri nedeniyle hücre membranından geçemezler ve bu nedenle etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bir molekül reseptöre bağlandığında bir dizi hücre içi reaksiyonu tetikler ve mesajın hücre çekirdeğine ya da hücre içerisinde başka bir yere iletilmesini sağlar. Hücre dışı bir sinyalin hücre içinde reaksiyonlara sebep olup, bunlara özel bir yanıtın alındığı sistemlere "sinyal iletim yolakları" adı verilmektedir ve genellikle bu yolaklardaki bir sorun kanserle sonuçlanmaktadır (117-119).



Şekil 9. Basitleştirilmiş sinyal iletim yolağı ve genetik ya da epigenetik değişiklerin etkilediği noktalar (120)

Sinyal iletim yolaklarındaki problem çok farklı noktalarda meydana gelebilir (120) (Şekil 9). Reseptör aktivasyonu, *EGF* (epidermal growth factor), *TGF-α* (transforming growth factor alpha) gibi büyüme faktör genlerinin amplifikasyonu sonucu artabilir. Diğer taraftan *EGFR* (epidermal growth factor receptor) ve *ERBB2* (erb-b2 receptor

tyrosine kinase 2) gibi reseptör genlerindeki amplifikasyonlar veya mutasyonlar reseptörün ekspresyonunu ya da protein yapısını değiştirerek, reseptör aktivasyonunu artırabilirler. Reseptöre büyüme faktörü bağlandığında reseptörde yapısal değişiklikler meydana gelir ve fosfat grupları eklenir. Bu fosfat grupları adaptör moleküllerin reseptöre bağlanmasına izin verir. Bu moleküller sayesinde inaktif RAS reseptörle bağlantı haline geçer ve aktif haline dönüşür. Aktif RAS, RAF molekülünü aktive eder ve sinyal iletimi protein kinazlarla devam eder. RAS ve RAF gibi sinyal moleküllerinin genlerindeki bir mutasyon, bu moleküllerin sürekli aktif halde kalmasına sebep olabilir ve böylece sinyal yolağının sürekli aktif halde kalmasına neden olur (121). Protein kinaz kaskadında sorunlar negatif regülatörler olan *PTEN* ve *INK4A* gibi tümör baskılayıcı genlerdeki epigenetik değişiklikler veya delesyonlar sonucu oluşabilir. Ayrıca transkripsiyon faktörlerini kodlayan olan *MYC* gibi genlerin amplifikasyonları veya translokasyonları hücre bölünmesini uyarır. Hücre çekirdeğinde DNA tamir geni *BRCA1* inaktivasyonu ya da siklin D aktivasyonu gibi hedef gen değişimleri de sinyal yolağını kesintiye uğratmaktadır (98). Tüm bunlar ele alındığında sinyal iletim yolaklarının her bir basamağının kanser oluşumu için önemli bir adım olduğu görülmektedir. Bu yolaklarda görev alan birçok gen onkogen ve tümör baskılayıcı genlerden oluşmaktadır.

2.3.5. Tümör mikro çevresi

Tümörler sadece homojen kanser hücrelerinden oluşmamaktadır. Lokal doku ortamına yakından baktığımızda malign hücrelerin tümör stroması ve farklı türde hücrelerle çevrelenmiş olduğunu görürüz. Buradaki hücreler birbirleriyle karmaşık ve sürekli bir etkileşim içindedirler. Bu mikro çevre kanser hücreleri dışında; fibroblastlar, endotelyal hücreler, perisitler, lökositler ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır (122).

Tümör mikro çevresinde bulunan fibroblastlar kanser ilişkili fibroblastlar olarak adlandırılırlar ve bu hücreler tümör stromasındaki en baskın türdür (123). Bu hücrelerin kanser hücreleriyle karıştırılıp çeşitli canlılara aktarıldığı çalışmalar, kanser ilişkili fibroblastların tümör başlangıcı, büyümesi ve metastatik yayılımında önemli rol aldığını göstermiştir (124-126).

Tümör mikro çevresi neoplastik dönüşümü, tümör büyümesini ve invazyonunu destekler, tümörü immün sisteme karşı korur, tedaviye direnc katkıda bulunur ve metastazların yayılması için uygun ortam hazırlar (127).

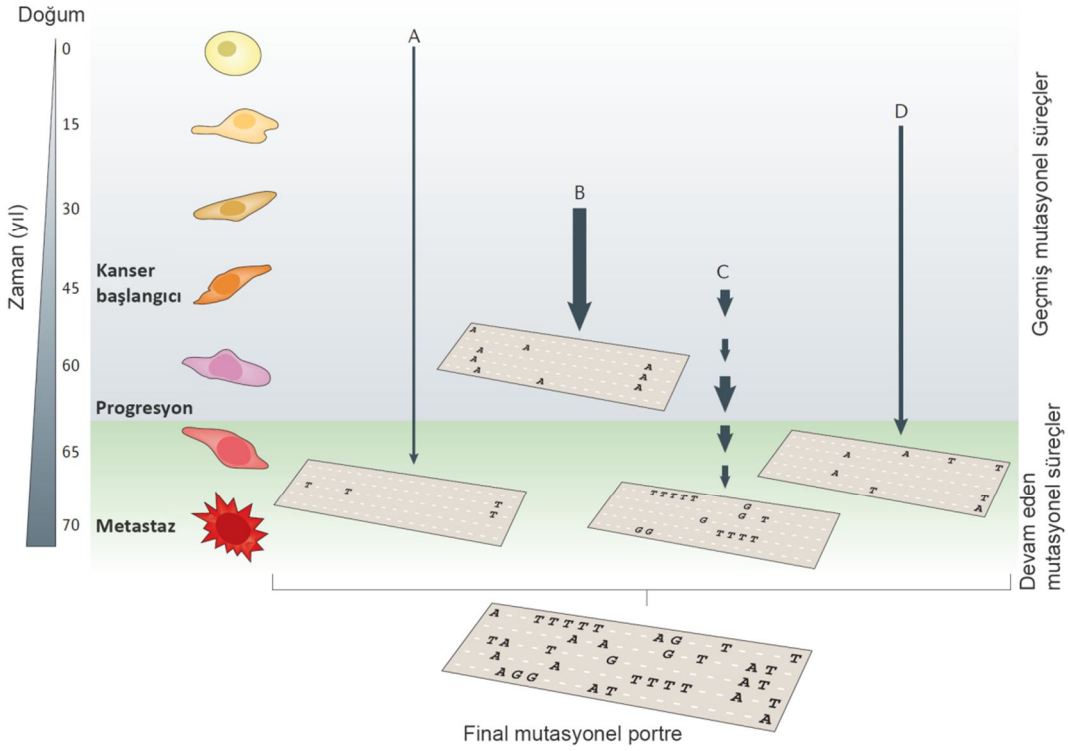
2.3.6. Kanserlerde mutasyon imzaları

Kanser genomlarında görülen mutasyonların büyük kısmı iki gruba ayrılabilir. Bunlar '*sürücü* (*driver*)'ve '*yolcu* (*passenger*)' mutasyonlardır. Sürücü mutasyonlar kanser oluşumuna doğrudan katılırlar. Onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri ve diğer kanser genlerinde görülen mutasyonlar bu gruba dahildir. Yolcu mutasyonlar ise tümör gelişim sürecinde rastgele oluşan ve kanser gelişimine katkısının olmadığı düşünülen mutasyonlardır (128, 129).

Her bir kanser hücresi, kanser oluşumuna katkısı olmayan binlerce *yolcu mutasyon* taşımaktadır. Fakat bu mutasyonlar o kanser hücresinin geçmişi hakkında bilgi veren zengin birer kaynaktır. Her bir mutasyonel süreç kanser genomunda kendi karakteristik motifini bırakır, bunlara 'mutasyonel imzalar' adı verilmektedir (5, 130). Bu DNA hasarı iç ve dış mutajen ajanlara maruziyet, bununla birlikte DNA tamir mekanizmaları ve replikatif süreçlerin aktive olması sonucu oluşur. Mutajenik süreçler ve tamir mekanizmalarının doğası ne olursa olsun, mutasyonların final kataloğu, her bir mutasyonel sürecin şiddeti ve mutajene maruz kalınan süre tarafından belirlenir. Kanser genomunda gözlenen tüm değişiklikler, yani hayat boyunca meydana gelen mutasyonel imzaların toplamı final "mutasyonel portreyi" oluşturur (Şekil 10) (131).

Sigara içiminin akciğer hücrelerinde (132), ultraviyole ışınların cilt hücrelerinde mutasyonlara yol açtığı (133) bilinse de birçok kanser türü için somatik mutasyonlara sebep olan mutasyonel süreçlerin altında yatan nedenler tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Akciğer kanserlerinde sigara ile ilişkili mutasyonlar genellikle G·C→T·A transversiyonlarıdır (132). Transversiyonlar pürin bazından pirimidine ya da pirimidinden pürine dönüşüm gibi farklı sınıflardaki nükleotidlerin değişimi sonucu oluşan mutasyonlardır. Cilt kanserlerinde ise ultraviyole (UV) ışınlara bağlı mutasyonlar baskın olarak C·G→T·A transisyonlarıdır (134). Transisyonlar pürin→pürin ya da pirimidin→pirimidin dönüşümü gibi aynı sınıftaki nükleotidlerin değişimi sonucu oluşan mutasyonlardır. Bu ve buna benzer nükleotid değişimleri tüm

kanser genomu boyunca incelenerek kanser türlerinde farklı mutasyonel imzalar tespit edilebilir.

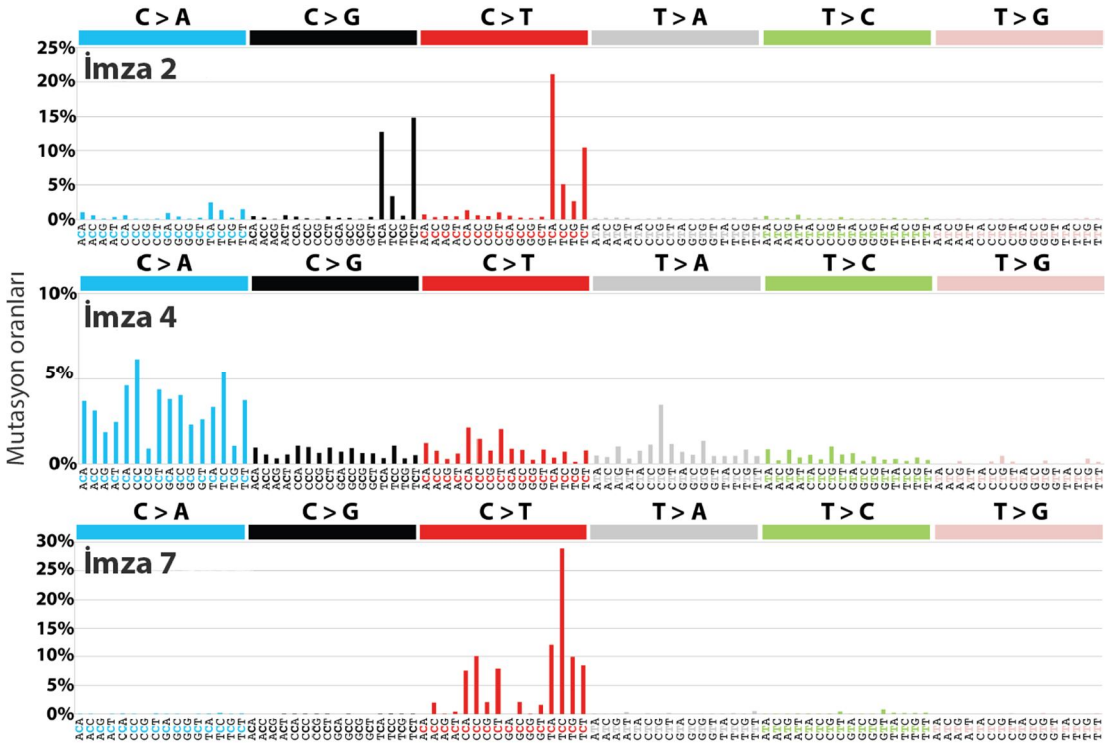


Şekil 10. Kanser gelişimi boyunca süren aktif mutasyonel süreçler (131). İmza A hayat boyu devam eden metillenmiş sitozinlerin deaminasyonunu temsil etmektedir. İmza B için sigara içimine bağlı mutasyonlar örnek gösterilebilir. İmza C, APOBEC'lerin indüklediği deaminasyonu göstermektedir. İmza D ise yolunda gitmeyen DNA tamir mekanizmasının sonucu oluşan değişikleri temsil etmektedir. Hayat boyunca devam eden tüm bu farklı mutasyonel süreçlerin (A-D) toplamı final mutasyonel portreyi oluşturur.

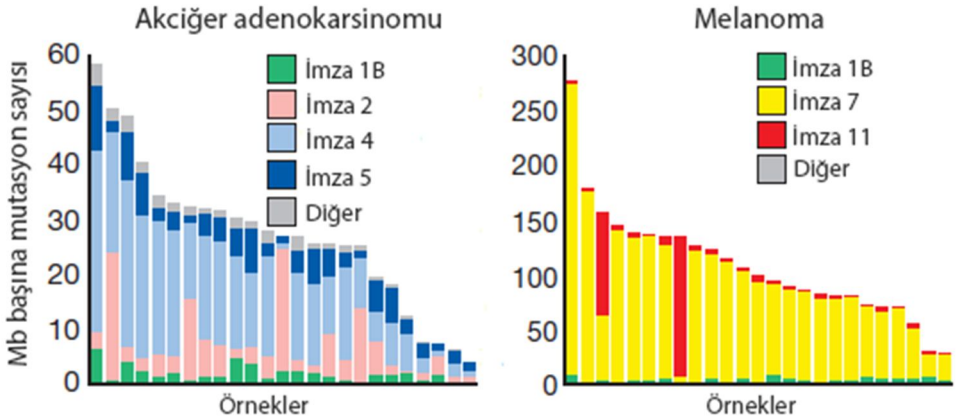
İlk insan genomunun dizilenmesinden bu yana, daha hızlı ve ucuz sekanslama yöntemlerine olan talep hızla artmıştır. Yeni nesil dizileme teknolojilerindeki gelişim ile birlikte tüm genom dizilemeleri bir günde yapılabilir hale gelmiştir (135). Bu teknolojiler ile kanser genomları incelendiğinde, her bir kanserin binlerce mutasyon taşıdığı gözlenmiş ve yeni nesil dizileme mutasyon imzalarını saptamada yeterli gücü sağlamıştır (136). Bu sayede geniş çaplı kanser genom araştırmaları yapılabilmiştir. Alexandrov ve ark. geliştirdikleri algoritmalarla Kanser Genom Atlası (The Cancer

Genome Atlas ‘TCGA’) verilerini kullanarak 30 farklı kanser türünde 7.000’den fazla kanser genomu incelemişler ve toplam 21 farklı mutasyonel imza belirlemişlerdir (Şekil 11 ve 12) (13). Bunlardan imza 1A ve 1B’nin yaşla, imza 2 ve 13’ün APOBEC’lerle, imza 3’ün BRCA1/2 mutasyonlarıyla, imza 4’ün sigara içimiyle, imza 7’nin ultraviyole ışıkla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (13).

Geçmişte meydana gelen mutasyonel süreçler, geçmişteki mutajenlere maruziyet hakkında bilgi verir ve mutasyon imzaları bunların temelini oluşturur. Bu bilgiler kanserden korunma ve halk sağlığı için önemli mesaj verirler, fakat bunlar kanser taramasında ve hedefe yönelik tedavi için sınırlı değere sahiptir. Aksine devam eden mutasyonel süreçler prognozu belirlemek, tedavi duyarlığını öngörmek ve hedefe yönelik tedavi için kullanılabilirler (131).



Şekil 11. Kanser genomlarında tespit edilen bazı mutasyon imzalarına ait örnekler (13). Burada yatay eksende mutasyona uğrayan bazın 3’ ve 5’ bitişiğindeki bazlarla birlikte olabilecek toplam 96 farklı kombinasyonu gösterilmiştir. Dikey çubuklar altı farklı mutasyon için farklı renklerde gösterilmiştir ve her bir spesifik mutasyonun oranını temsil etmektedir.

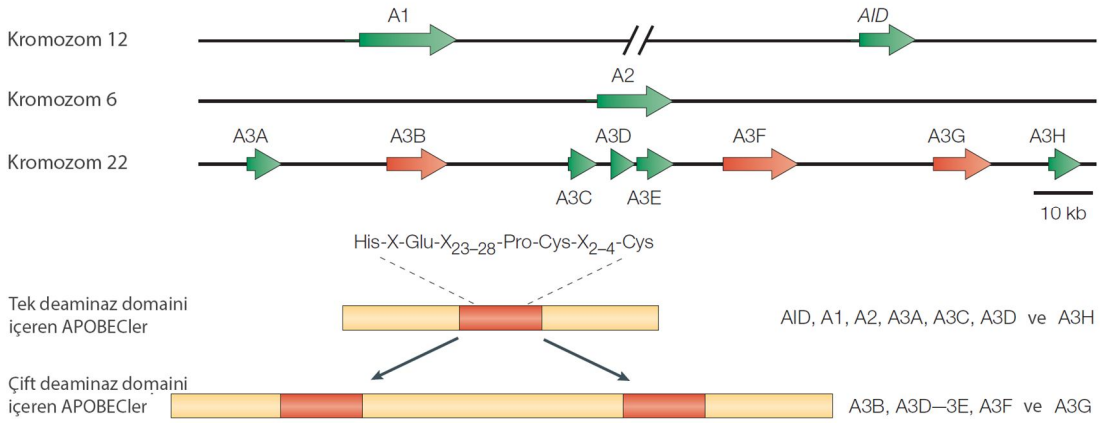


Şekil 12. Akciğer adenokarsinomu ve melonamada mutasyon imzalarının katkısı (13). Her bir çubuk ilgili kanser türünden seçilen örnekleri temsil etmekte ve dikey eksen o örnek için megabaz başına mutasyon sayısını göstermektedir. Sigara (imza 4) ve APOBEC'lerin (imza 2) sebep olduğu imzalar akciğer adenokarsinomlarında belirginken, ultraviyole ışığın neden olduğu imza 7 melanoma örneklerinde kendisini belirgin olarak göstermektedir.

2.4. APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) AİLESİ

APOBEC proteinleri birer sitidin deaminazlarıdır. İnsanlarda APOBEC ailesinin 11 üyesi bulunmaktadır. Bunlar; AID (activation-induced deaminase), APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D (APOBEC3DE), APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H ve APOBEC4 proteinleridir (Tablo 2) (137). APOBEC ailesi enzimleri hem DNA hem de RNA'da sitozin bazlarının deaminasyonunu katalizler, böylece sitozin bazları urasile dönüşür. Tamir mekanizmaları genellikle burada hata yaparlar ve urasil bazını kaldırıp yerine guanin veya timin bazını koyarlar. Sonuç olarak DNA ve RNA'da mutasyona yol açabilirler (138).

Bu ailenin ilk tanımlanan üyesi olan APOBEC1, apolipoprotein B (ApoB) pre-mRNA'sını düzenlenmesine katılan bir proteindir ve adını buradan almıştır (139). *ApoB* mRNA'sında meydana gelen tek nükleotid değişikliği insan karaciğer ve bağırsak hücrelerinde uzun ve kısa olmak üzere iki farklı ApoB proteininin üretilmesine sebep olduğu bulunmuştur. Bu durum *ApoB* mRNA'sının post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası, yani ana DNA molekülünden RNA molekülü elde edildikten sonra) modifikasyonu ile açıklanmıştır (140).



Şekil 13. APOBEC genlerinin ve APOBEC proteinlerinin domain organizasyonunun şematik gösterimi (141).

Tüm APOBEC proteinleri yapısal ve katalitik çinko bağımlı deaminaz omurgasını paylaşırlar. Bu katalitik bölge karakteristik H[AV]E-$x_{[24-36]}$-PCxxC (x herhangi bir amino asit) motifini taşır (Şekil 13) (142). Histidin (H), iki adet sistein (C) amino asidi ile çinko atomunu koordine ederek sitidinin bağlandığı bir cep şeklini oluşturur. Sitidin deaminasyonunun glutamat (proton vericisi olarak görev yapar) ve çinko atomu tarafından koordine edilen aktive olmuş bir su molekülünün pirimidin halkasının 4. pozisyonuna direkt nükleofilik saldırısı sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (143).

Tablo 4. APOBEC ailesi üyeleri (138, 144)

Adı	Genomik lokalizasyonu	Ekzon sayısı	Deaminaz domainleri	Deaminaz aktivitesi	Hücre içi dağılımı
AID	12p13	5	1	+	Sitoplazma > Nükleus
APOBEC1	12p13.1	5	1	+	Sitoplazma > Nükleus
APOBEC2	6p21	3	1	+ / -	Sitoplazma / Nükleus
APOBEC3A	22q13.1	5	1	+	Sitoplazma > Nükleus
APOBEC3B	22q13.1	8	2	+	Nükleus > Sitoplazma
APOBEC3C	22q13.1	4	1	+	Sitoplazma > Nükleus
APOBEC3DE	22q13.1	7	2	+	Sitoplazma
APOBEC3F	22q13.1	8	2	+	Sitoplazma
APOBEC3G	22q13.1	8	2	+	Sitoplazma
APOBEC3H	22q13.1	5	1	+	Sitoplazma
APOBEC4	1q25.3	2	1	-	Bilinmiyor

Bu enzimler doğal ve kazanılmış immün yanıtta merkezi görev alırlar. AID, B lenfositlerde eksprese olan immunoglobulin genlerinin değişken bölgelerinde urasil lezyonları oluşturur, sonra buradaki bazın değişimi sonucu mutasyon oluşur (somatik hipermutasyon). Böylece antikor çeşitliliği sağlanır (145). Ayrıca APOBEC3 proteinleri yeniden oluşmaya başlayan retrovirüs cDNA'sındaki sitozin rezidülerini deamine ederek virüsü inhibe ederler ve bu sayede retrovirüslere karşı doğal immün yanıtta önemli görev alırlar (141, 146).

APOBEC2 ve APOBEC4'ün enzimatik aktivitesi henüz tam olarak gösterilememiştir (147). APOBEC ailesi içinde sadece APOBEC3B kararlı olarak nükleer lokalizasyon gösterir (148). Bunun dışında AID, APOBEC1, APOBEC3A, APOBEC3C proteinleri hem sitoplazmada hem de hücre çekirdeğinde tespit edilmiştir (144).

2.4.1. AID (activation-induced cytidine deaminase)

AID ilk kez 1999 yılında ikincil antikor çeşitlendirme süreci için yeterli ve gerekli bir enzim olarak tanımlanmıştır (149). AID selektif olarak B lenfositlerin germinal merkezinde bir antijen stimülasyonuna cevap olarak eksprese olmaktadır.

AID, 198 amino asitten oluşmaktadır ve bu proteini kodlayan gen (*AIDCA*) kromozom 12p13 bölgesinde bulunmaktadır. *AIDCA* genindeki mutasyonlar yüksek serum IgM (immünoglobulin M) düzeyleri ve diğer immünoglobulin izotiplerinin (IgA, IgD, IgE, IgG) azalması ile karakterize tip 2 hiperimmünglobulin M (Hiper-IgM) sendromuna sebep olmaktadır (150). Diğer taraftan AID'in artmış ekspresyonu B hücreli lenfomalar ve bazı solid tümörlerle ilişkili bulunmuştur (151).

Her bir immünoglobulin birbirinin aynısı iki ağır ve iki hafif zincir olmak üzere toplam dört adet polipeptitten oluşur. Her bir zincir, bir "değişken" (variable: V) bölge, bir sabit (constant: C) bölge ve bu ikisi arasında "birleşme" (joining: J) bölgesini içerir. Ayrıca ağır zincir DNA'sı "çeşitlilik" (diversity: D) bölgesi içerir. Ağır zincirdeki sabit bölgenin yapısı antikor sınıfını (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) belirlerken, hafif zincirdeki değişken bölgeler ise antikor tipini (kappa: κ veya lambda: λ) belirler. Antikor zincirlerini kodlayan genlerin V, J ve D bölgeleri segmentlerden oluşmaktadır ve germline DNA her bir segmentin birçok versiyonunu içermektedir. V, J ve D segmentlerinin olası farklı kombinasyonları 15 milyondan fazla farklı zincir

üretilebilmesini sağlar. Ağır ve hafif zincirlerin farklı kombinasyonları da hesaba katılınca milyarlarca farklı antikor üretilebilmektedir. Primer antikor çeşitliliği bu şekilde 'somatik rekombinasyon' ile olmaktadır (152).

Sekonder antikor çeşitliliği somatik hipermutasyon, sınıf değişim rekombinasyonu (class switch recombination) ve gen konversiyonu ile olmaktadır. Somatik hipermutasyon ile immünoglobulin genlerinde mutasyonlar oluşur ve böylece belli antijenlere karşı afinitesi artmış antikorlar üretilir. Sınıf değişim rekombinasyonu ile aktive olmuş B lenfositlerinde IgM ekspresyonu azalırken diğer antikor sınıflarının ekspresyonunda artma olur. Gen konversiyonu ile antikor çeşitliliği insanlarda gözlenmemektedir (153). AID'in deaminaz aktivitesi sitozini urasile deamine eder ve uygun olmayan tamir sonucu DNA kırıkları oluşur böylece sınıf değişim rekombinasyonlarına yol açar. Yine aynı şekilde immünoglobulinlerin değişken bölgelerinde nokta mutasyonlarına sebep olarak somatik hipermutasyonlara yol açar (154). AID bu mekanizmalarla sekonder antikor çeşitliliğini sağlamada merkezi bir rol oynar (153, 155).

2.4.2. APOBEC1

APOBEC1 geni kromozom 12p13.1'de lokalize olup 236 amino asit uzunluğunda bir protein kodlar. Bu enzim ApoB pre-mRNA'sında 6666. pozisyondaki sitidini deamine ederek glutamin kodonunu (CAA) dur kodonuna (UAA) dönüştürür böylece ApoB'nin daha kısa bir formu (ApoB48) üretilir (139). ApoB48 ince bağırsakta şilomikronların hidrofilik yüzeyinin ana bileşenidir, şilomikronlar ise bağırsaktan emilen lipidlerin diğer dokulara taşınmasında görev yaparlar (156).

APOBEC1 (A1) sadece ApoB mRNA'sını hedef almamakta aynı zamanda *NF1 (neurofibromin 1)* mRNA'sını da etkilemektedir. Yine burada da benzer şekilde sitidin deaminasyonu sonucu dur kodunu oluşur (157). Diğer taraftan bu enzimin bakterilerde ve *in vitro* ortamda DNA'da mutasyona sebep olabildiği gösterilmiştir (9, 158). Transgenik hayvanlarda aşırı ekspresyonu ise hepatosellüler karsinom gelişimine sebep olmuştur (159). İnsan familyal adenomatöz polipozis koli için sık kullanılan bir hayvan modeli olan APC^{min} farelerde A1 eksikliği gastrointestinal sistemde polip ve tümörlerin sayısını azaltmıştır (160).

2.4.3. APOBEC2

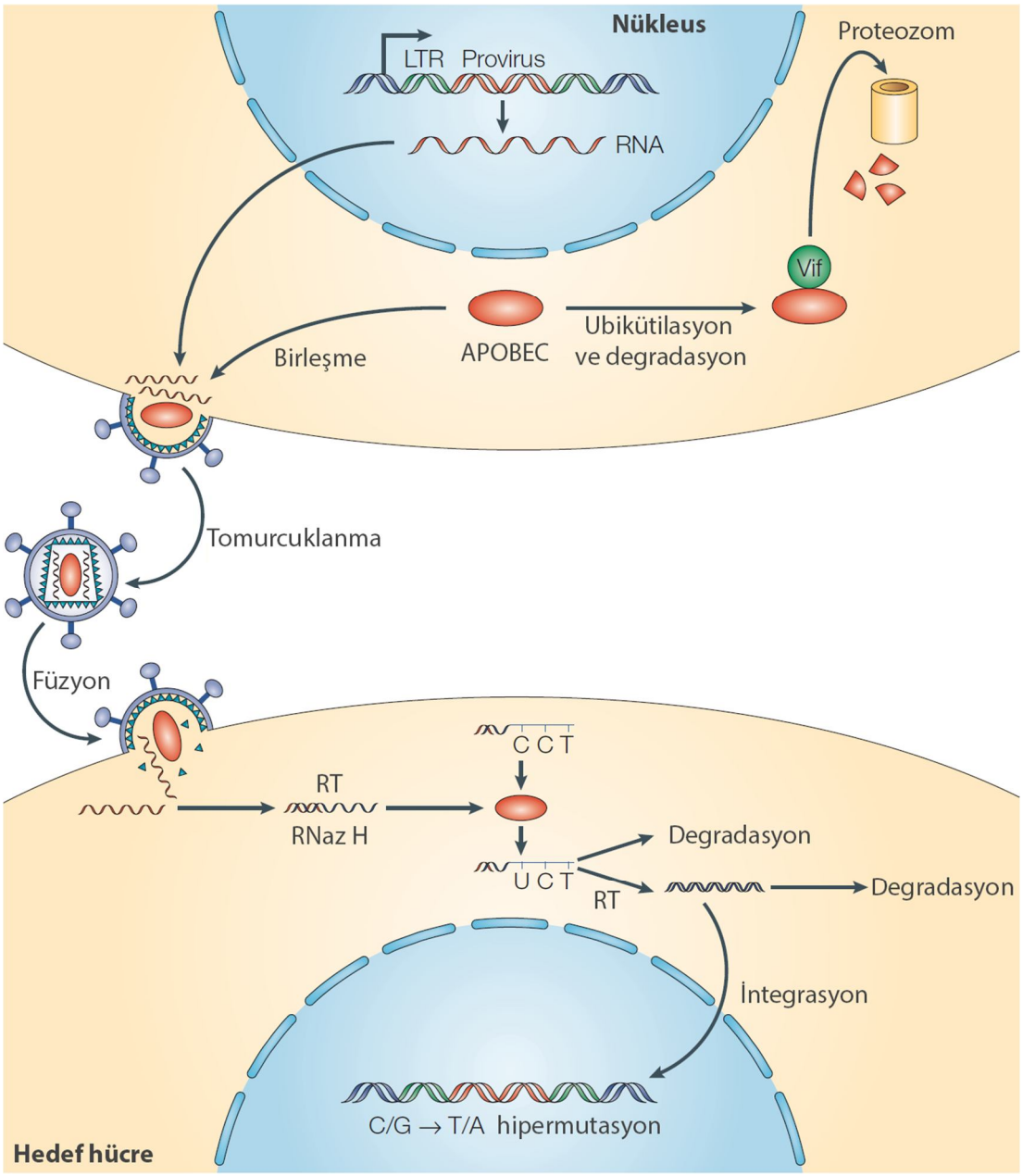
APOBEC2 (A2) proteini 224 amino asit uzunluğundadır ve kodlayan aynı isimli gen kromozom 6p21'de bulunmaktadır. İnsanlarda A2 belirgin olarak iskelet kası ve kalpte eksprese olmaktadır (161). Diğer APOBEC ailesi üyelerinin aksine bu proteinin fonksiyonu ve deaminaz aktivitesi çok az bilinmektedir.

A2'den yoksun transgenik farelerin sağlığında, üremelerinde, 1 yaşına kadar olan takiplerinde, kalp ve kas dokusu histolojik incelemelerinde belirgin bir soruna rastlanmamıştır (162). Ancak başka bir çalışmada A2 ekspresyonu yapay olarak artırılmış transgenik farelerde hepatosellüler karsinom ve akciğer kanseri oluşumu gözlenmiştir (163).

2.4.4. APOBEC3

APOBEC3 (A3) ailesi genleri 22. kromozomun uzun kolunda kümelenmişlerdir. İnsanlarda 7 farklı formu (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G, A3H) bulunmaktadır (138, 144). Bunlardan A3B, A3DE, A3F ve A3G iki adet deaminaz domaini içermesi ile diğerlerinden farklılık gösterirler (164). 2002 yılında A3G'nin insan immün yetmezlik virüs (HIV) enfeksiyonunu sınırlayıcı etkisinin keşfi ile bu proteinler dikkatleri üzerine çekmiştir (165).

A3G ve viral infektivite faktör (Vif) retrovirüs enfeksiyonlarında anahtar rol oynar. A3G virüsün çoğaldığı hücrede eksprese olur. Vif A3G'ye bağlanarak ubikütilasyon ve proteozomal degradasyon ile yıkımına sebep olur. Vif yokluğunda ya da protein Vif'den bir şekilde kaçtığında A3G virüs ile birlikte paketlenerek hedef hücreye gider. Hedef hücrede revers transkripsiyon ile yeni oluşmaya başlayan viral DNA'nın ilk zincirinde sitozin rezidülerini deamine eder ve başlıca G→A mutasyonlarına yol açar. Sonuç olarak viral genomun hücre genomuna entegrasyonu engellenmiş olur. Az sayıda viral genom DNA'ya entegre olabilir ancak onlar da hipermutasyon (kendiliğinden olan mutasyon oranının çok daha üstünde mutasyon olması) nedeniyle fonksiyonel değildir (Şekil 14) (141, 166, 167).



Şekil 14. Retroviral enfeksiyonlarda APOBEC3 ve Vif ilişkisi (141)

A3G sadece HIV değil aynı zamanda birçok farklı retrovirüse karşı antiviral etki gösterir (168, 169). Diğer A3 üyeleri de değişen düzeylerde anti-retroviral etkiye sahiptirler (168, 170). Ayrıca A3B, A3G ve A3F'nin hepatositlerde hepatit B virüs replikasyonunu engellediği bildirilmiştir (171). Diğer taraftan A3 proteinlerinin endojen retro-elementlerin sebep olduğu genomik instabiliteye karşı koruma sağladığı düşünülmektedir (172).

Geniş çaplı tümör sekans verileri analiz edildiğinde APOBEC'lerin DNA'ya etkilerini düşündüren, zincir spesifik sitozin mutasyonlarının genomda belirli bölgelerde kümelendiği gözlenmiştir ve bunlara "kataegis" (bir tür lokalize hipermutasyon) adı verilmiştir (130). Buradaki sitozin mutasyonlarının karakteristiğinin 'TC (timin, sitozin) spesifik APOBEC'ler' tarafından meydana gelen mutasyonlarla örtüştüğü görülmüştür. Bu APOBEC'ler A1, A3A, A3B, A3F, A3H olup deaminasyon için 5' tarafında timinin bulunduğu sitozinleri tercih ederler (173). Retroviral cDNA deaminasyonu ve rekombinant A3B üzerine yapılan çalışmalar 5' tarafında timinin yanı sıra 3' tarafında adenin, timin veya guanin bazının bulunduğu sitozinlerin tercih edildiğini göstermiştir (147, 174). Ancak C→T mutasyonları yaşlanmaya bağlı olarak metillenmiş CpG adalarında spontan deaminasyon sonucu oluşabilir (13). Bu sebeple APOBEC'lerin genom boyu etkileri araştırılırken TCW (W: adenin veya timin) motifleri kullanılmıştır (175). Kanser Genom Atlası (TCGA) tüm-ekzom sekans verilerini kullanarak yapılan iki çalışmada APOBEC mutasyonel imzaları birçok kanser türünde yaygın olarak gözlenmiştir ve APOBEC enzimlerinin katalizlediği sitozin deaminasyonunun kanser oluşumunda rol aldığını öne sürülmüştür (147, 175). İnterfaz hücrelerinde çekirdekte yer alması, meme ve over kanserlerinde sitozin mutasyonları ile korelasyon göstermesi nedeniyle A3B bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır (14, 147, 176).

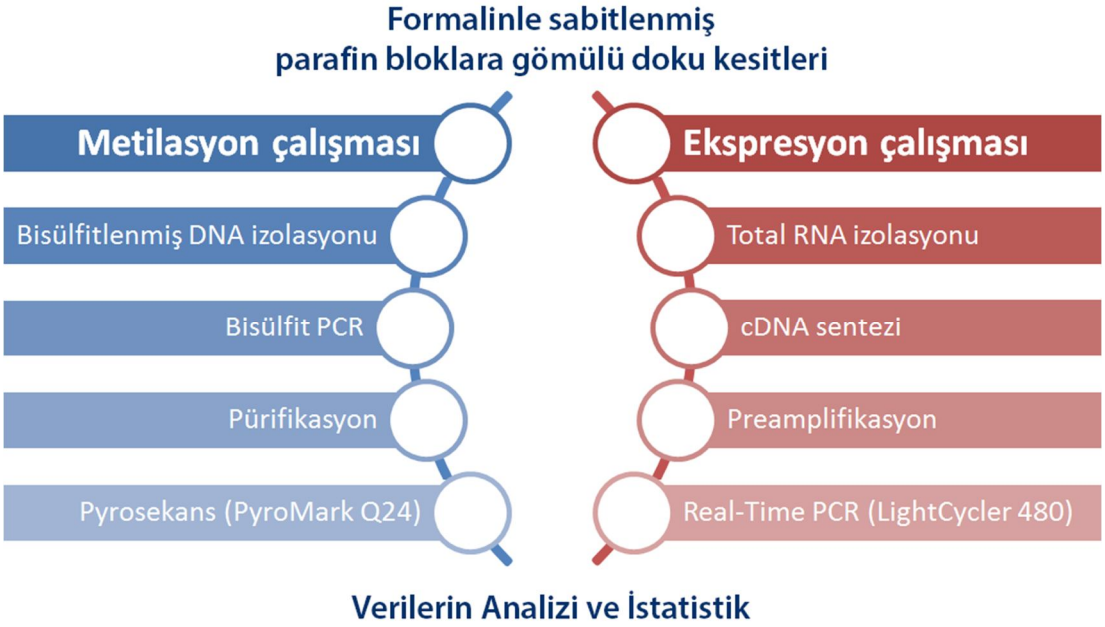
2.4.5. APOBEC4

APOBEC4'ü (A4) kodlayan gen 1. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. APOBEC ailesinin son tanımlanan üyesi olan A4 hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır (177). Diğer APOBEC üyeleriyle düşük düzeyde sekans benzerliği bulunmaktadır (178). A4 belirgin olarak testislerde eksprese olmakta ve bu nedenle spermatogenezle ilgili mRNA'ların düzenlenmesinde görev yapabileceği düşünülmektedir (177).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. HASTA VE KONTROL GRUBU

Çalışmaya dahil olan hastalar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Medikal Onkoloji Bilim Dalı ve Göğüs Cerrahisi AD tarafından takip edilen akciğer kanseri ön tanısı ile 2010-2014 yılları arasında opere olmuş, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD tarafından patolojik örneklerde adenokarsinom tanısı almış hastalardır. Çalışma öncesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurul onayı alınmıştır. Çalışmaya akciğer adenokarsinomu tanısı almış, hem tümör hem normal doku içeren parafin bloklarına ulaşılabilen 42 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak aynı hastaların tümör içermeyen doku blokları kullanılmıştır. Toplam 84 örnekten Tıbbi Pataloji AD'ndan 5'er mikron kalınlığında kesitler alınıp 2 ml'lik reaksiyon tüplerine (her bir örnek için 3 tüp) konulmuştur. Daha sonra bu doku kesitlerinden DNA ve RNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 15'te gösterilen çalışma planına göre işlemler yapılmıştır.



Şekil 15. Çalışma planı

3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.2.1. Kullanılan cihaz ve aletler

- Buzdolabı (+4 ºC Hotpoint Ariston)
- Derin Dondurucu (-20 ºC Beko)
- Derin Dondurucu (-80 ºC Sanyo)
- Mikropipet seti (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
- Mini Santrifüj/Vorteks (Combi–Spin FVL-2400N - Biosan)
- Vorteks (Heidolph Reax Top)
- Distile su cihazı (Millipore Direct-Q 3 with UV)
- Pyrosekans cihazı (PyroMark Q24 - QIAGEN)
- PCR cihazı (Thermal cycler) (Labcycler - SensoQuest GmbH)
- PCR cihazı (Thermal cycler) (T100™ Thermal Cycler - Bio-Rad)
- Real Time PCR cihazı (LightCycler 480 II - Roche Diagnostics GmbH)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Termomikser cihazı (Eppendorf ThermoMixer C)
- Termomikser cihazı (T-Shaker – EuroClone)

- Blok ısıtıcı (HLC)
- Plate snatrifüj cihazı (Centrifuge PerfectSpin P, Peqlab)
- Santrifüj cihazı (Micro 200R Hettich Zentrifugen)

3.2.2. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfitlenmiş DNA izolasyonu ve metilasyon çalışmasında kullanılan sarf malzemeler

- Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfitlenmiş DNA izolasyonu kiti
    - EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (Qiagen)
- *APOBEC3B* geninin promotör ve intron 1 bölgesine özgü primerler
    - Biomers.net GMBH
- PCR ile çoğaltılan bölgenin dizisinin çıkarılması için gerekli kit
    - PyroMark CpG Assay (Qiagen)
- Pyrosekans ile dizileme işlemi sırasında kullanılacak materyaller
    - PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen)
- Çıkarılan dizinin analizi için kullanılması gereken kontrol DNA'ları
    - EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen)

3.2.3. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan RNA izolasyonu ve ekspresyon çalışmasında kullanılan sarf malzemeler

- Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan RNA izolasyon kiti
    - High Pure FFPET RNA Isolation Kit (Roche)
- cDNA sentez kiti
    - Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
- İlgili genlere göre dizayn edilmiş primerler ve problar
    - RealTime ready Catalog Assays (Roche)
    - RealTime ready Designer Assays (Roche)
- Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Prob master miks
    - LightCycler 480 Probes Master (Roche)
- LightCycler 480 cihazı ile uyumlu plate
    - LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche)

3.3. YÖNTEMLER

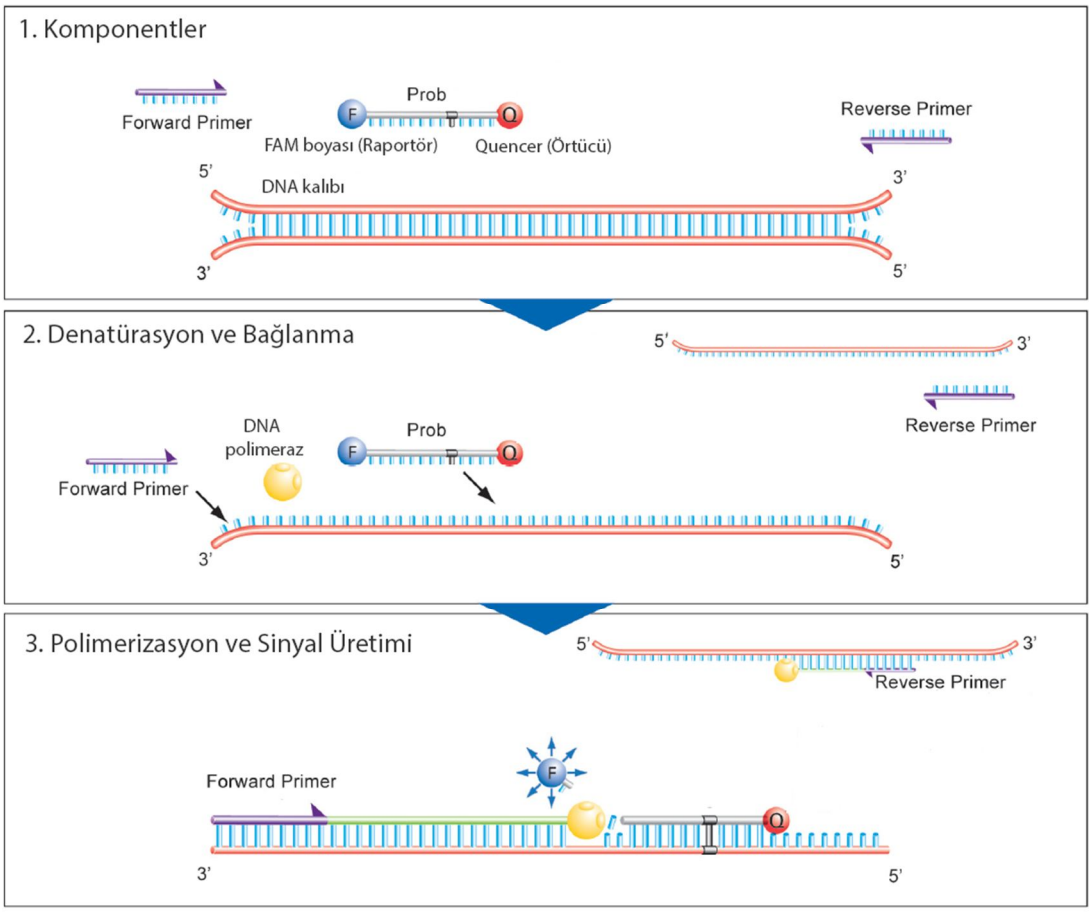
3.3.1. Ekspresyon çalışması

3.3.1.1. Real-Time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu / Kantitatif PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) oligonükleotid primerler kullanarak DNA'nın ilgilendiğimiz bölgesinin *in vitro* ortamda çok sayıda kopyasını oluşturmaya yarayan reaksiyonlar bütünüdür. PCR yöntemi denatürasyon (tek iplikli DNA dönüşümü), bağlanma (annealing – primerlerin DNA'ya bağlanması) ve uzama (DNA polimeraz sayesinde yeni DNA ipliğinin oluşması) aşamalarından oluşan tekrarlayan termal döngü temeline dayanmaktadır. Konvansiyonel PCR'da ürünler ancak PCR işlemi sonlandıktan sonra değerlendirilebilir. Real-Time PCR'da ise diziye spesifik ya da diziden bağımsız floresan problar ve boyalar kullanılarak PCR çoğaltımı gerçek zamanlı olarak gözlemlenir (179).

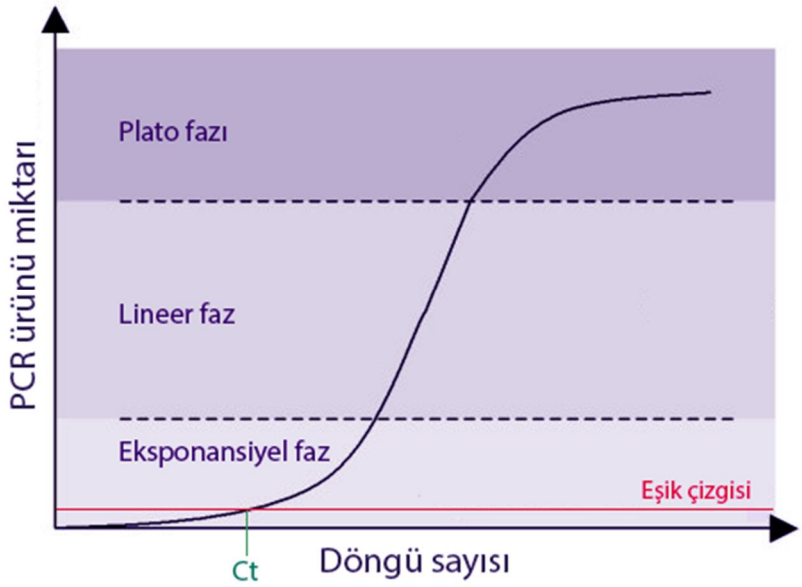
Real-Time PCR'da iki farklı çalışma prensibi vardır. Bunlardan ilki diziye özgü olmayan belirleme yöntemidir. Bu yöntemde "SYBR Green I" gibi DNA'nın çift iplikli haline bağlanan floresan boyalar kullanılır. Ortamda çift iplikli DNA miktarı arttıkça ışıma da doğru orantılı olarak artar. Diğer yöntemde ise diziye özgü problar kullanılır. Bu problar Real-Time PCR cihazları tarafından saptanabilecek florofor içerirler ve DNA'daki spesifik bölgesine bağlanırlar. Çok farklı şekillerde dizayn edilmiş problar bulunmaktadır. Bunlar; hidroliz (TaqMan) probları, moleküler beacon, hibridizasyon probları, LightUp prob, scorpion prob ve single problardır (180).

Çalışmamızda FAM ile etiketlenmiş, kilitli nükleik asit (LNA / locked nucleic acid) içeren hidroliz probları (Roche RealTime ready Catalog/Designer Assays) kullanılmıştır. Hidroliz problarının 5' ucunda bir raportör (R) florofor (ör. FAM), 3' ucunda ise floroforun yaydığı ışığı baskılayan (Quencer / Q) bir boya (ör. TAMRA) bulunur. Prob PCR'ın bağlanma aşamasında hedef dizisine bağlanır. Uzama aşamasında Taq DNA polimeraz proba ulaştığında 5' ekzonükleaz aktivitesi gösterir ve probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece baskılayıcı boyadan kurtulan raportör floroforun ışıması tespit edilir (Şekil 16). Her döngüde üretilen amplikon miktarına bağlı olarak cihaz tarafından tespit edilen sinyal şiddeti de artar (181).



Şekil 16. Real-Time PCR'da hidroliz problarının çalışma prensibi

PCR amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel, lineer ve plato fazı olmak üzere 3 safha gözlenir (Şekil 17). Eksponansiyel fazda reaksiyon verimi tamdır, ürünler geometrik olarak artar. Real-Time PCR'da değerlendirmeler bu fazda yapılır. Lineer fazda reaksiyon bileşenleri tükenmeye başlar ve reaksiyon yavaşlar. Plato fazında ise reaktifler artık tükenmiştir, ürün yapımı durur (182). Real-Time PCR'da pozitif reaksiyon floresan sinyallerinin birikimi ile saptanır. Ct (Cycle threshold / Eşik döngü) değeri bu floresan sinyallerin eşik seviyeyi aştığı döngü sayısıdır. Ct değeri ile hedef nükleik asit miktarı arasında ters orantı vardır. Düşük Ct değerleri örnekte daha yüksek miktardaki hedef nükleik asit varlığını ifade eder (179).



Şekil 17. Real-Time PCR'da amplifikasyon eğrisi ve fazlar

3.3.1.2. Formalin ile fikse parafine gömülü doku kesitlerinden RNA izolasyonu

Doku kesitlerinden RNA izolasyonu için High Pure FFPET RNA Isolation Kiti (Ref# 06650775001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

Deparafinizasyon

- Her bir örnek için 1.5 ml'lik reaksiyon tüpüne 5 µm kalınlıktaki yaklaşık 200 mm^2 alana sahip parafinli doku kesiti koyuldu.
- 800 µl ksilen eklenip kısa aralıklarla vortekslendi.
- 400 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 16000 x *g* hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 1000 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 16000 x *g* hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.

- Kalan etanol kalıntılarında kurtulmak için tüpler 55°C'de 10 dakika (gerekirse 20 dakika) kapağı açık bir şekilde bekletildi.

RNA izolasyonu

- Deparafinizasyon aşaması sonucunda elde edilen pellete aşağıdaki maddeler sırayla ya da üçünden bir karışım elde edilerek eklendi.
    - 100 µl RNA tissue lysis buffer
    - 16 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat)
    - 40 µl Proteinaz K
- Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 30 dakika 85°C'de inkübe edildi. Bu sırada 600 rpm'de çalkalandı.
- Kısa santrifüj yapıldı. 55°C'nin altına soğuyana kadar beklendi.
- 80 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 55°C'de 30 dakika bekletildi. Bu sırada 600 rpm'de çalkalandı.
- Karışımın içerisine;
    - 325 µl RNA binding buffer
    - 325 µl %100'lük etanol eklendi. Sırasıyla kısa vorteks ve kısa santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpüne filtre tüpü yerleştirildi. Hazırlanan karışım filtre tüpünün içine alındı (yaklaşık 900 µl).
- 30 sn 6000 x *g*'de santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü değiştirildi. 16000 x *g*'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü değiştirildi. 100 µl DNase working solution eklendi. 15°C – 25°C arasında 15 dakika bekletildi.
- 500 µl wash buffer 1 eklenip 6000 x *g*'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.

- 500 µl wash buffer 2 eklenip 6000 x *g*'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. (Bu aşama 2 defa yapıldı.)
- Hiçbir ekleme yapılmadan 16000 x *g*'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtre tüpü 1.5 ml'lik tüpe yerleştirildi.
- 30 µl RNA elution buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
- 6000 x *g*'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtre tüpü atıldı.
- RNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için NanoDrop 2000 spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. Kalitesi veya konsantrasyonu düşük örneklerden tekrar RNA izolasyonu yapıldı.
- RNA'lar -80 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.3.1.3. cDNA sentezi

-80 ^{o}C'de muhafaza edilen RNA'lar cDNA sentezinde kullanıldı. cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kiti (Ref# 05091284001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

- RNA'lar final konsantrasyonları 1 µg olacak şekilde Tablo 5'te gösterildiği gibi primer ve kalıp RNA karışımı PCR tüplerinde hazırlandı.

Tablo 5. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için)

Bileşenler	Hacim	Final konsantrasyon
RNA	Değişken	1 µg
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl	2 µl	60 µM
PCR seviyesi su	Değişken	Toplam hacim 11.4 µl olacak kadar
Toplam hacim	**11.4 µl**	

- Kalıp – primer karışım tüpleri denatürasyon için 65°C'de 10 dakika bekletildi, sonra tüpler hemen buz üzerine alınıp soğutuldu.
- Kalıp – primer karışımını içeren tüplere revers transkripsiyon için kalan bileşenler Tablo 6'daki miktarlarda eklendi.

Tablo 6. Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Final konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.	4 µl	1× (8 mM $MgCl_2$)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0.5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	2 µl	1 mM
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 µl	10 U
Toplam hacim	**8.6 µl**	
Final hacim	**20 µl**	

- Tüpler PCR cihazına konuldu ve 10 dakika 29°C'de, 60 dakika 48°C'de inkübe edildi.
- Devamında revers transkriptaz enzimini inhibe etmek için 5 dakika 85°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler derhal buz üzerine alındı ve -20°C'de saklandı.

3.3.1.4. Preamplifikasyon

Preamplifikasyon işlemi için RealTime ready cDNA Pre-Amp Master (Ref# 06720455001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

- Ekspresyon primerleri 1:10 oranında dilüe edildi.
- Tablo 7'ye göre Pre-Amp PCR reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 7. Pre-Amp PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Her bir örnek için hacim
RealTime ready cDNA Pre-Amp Master	5 µl
Dilüe edilmiş primerler	Her bir primer için 1.4 µl
cDNA	5 µl
PCR seviyesi su	Toplam hacim 25 µl olacak kadar
Toplam hacim	**25 µl**

- PCR cihazı kullanılarak Tablo 8'deki termal döngü koşulları uygulandı.

Tablo 8. Preamplifikasyon için termal döngü koşulları

	Süre	Sıcaklık
İlk denatürasyon	1 dk	95°C
Preamplifikasyon	15 sn	95°C
(13 döngü)	4 dk	60°C
Soğuma	∞	4°C

- Preamplifikasyon işlemi sonrası ürünler 1:40 oranında dilüe edilerek ekspresyon analizi için kullanıma hazır hale geldi.

3.3.1.5. Ekspresyon analizi

Ekspresyon çalışması LightCycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, İsviçre) cihazı ile yapıldı. Analizler LightCycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapıldı. Her örnek iki defa çalışıldı. Her bir çalışmada 2 adet negatif kontrol ve bir kalibratör kullanıldı.

Tablo 9. Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer dizileri

Gen	Assay ID	Primer dizisi (5'-3')
APOBEC1	14094	Forward: CTGCTCCATCACCTGGTTCT Reverse: CTAATAGCCTGGGAGCATTCC
APOBEC2	122787	Forward: GGAGAAGTTGGCAGACATCC Reverse: TGGCTGTACATGTCATTGCTG
APOBEC3A	131055	Forward: AAGGGACAAGCACATGGAAG Reverse: TGTGTGGATCCATCAAGTGTC
APOBEC3B	136042	Forward: CCCAAGTCTCCATCATGACC Reverse: ATCCCTGGCGGTACACAA
APOBEC3C	136039	Forward: CCCGCCTCTACTACTTCCAGT Reverse: TGTACACAAAGTTTTCCCAACAA
ACTB	143636	Forward: TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA Reverse: CGTGGATGCCACAGGACT

Çalışmada her bir gene özgü RealTime ready Catalog ve Designer Assays (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Almanya) primer-prob kitleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin dizileri Tablo 9'da verilmiştir.

- LightCycler 480 Probes Master kullanılarak Tablo 10'a göre Real-Time PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 10. LightCycler 480 Probes Master PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (1 reaksiyon)
LightCycler 480 Probes Master	10 µl
RealTime ready Assays	4 µl
PCR seviyesi su	1 µl
Toplam hacim	**15 µl**

- Hazırlanan karışım 96'lık LightCycler 480 Multiwell Plate'in her bir kuyucuğuna 15'er µl dağıtıldı.
- Preamplifikasyon sonrası 1:40 oranında dilüe edilen cDNA'lar her bir kuyucuğa 5'er µl eklendi.
- Multiwell Plate'in üzeri optik bantla sıkıca kapatıldı.
- Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra plate cihaza yüklendi.
- LightCycler 480 Software açılarak Tablo 11'deki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 11. LightCycler 480 II yazılımında ayarlanan sıcaklık ve süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış-azalış hızı (^{o}C/sn)
Preinkübasyon	1	95°C	10 dk	4.4
Amplifikasyon	45	95°C	10 sn	4.4
		60°C	30 sn	2.2
		72°C	1 sn	4.4
Soğuma	1	40°C	30 sn	2.2

3.3.2. Metilasyon çalışması

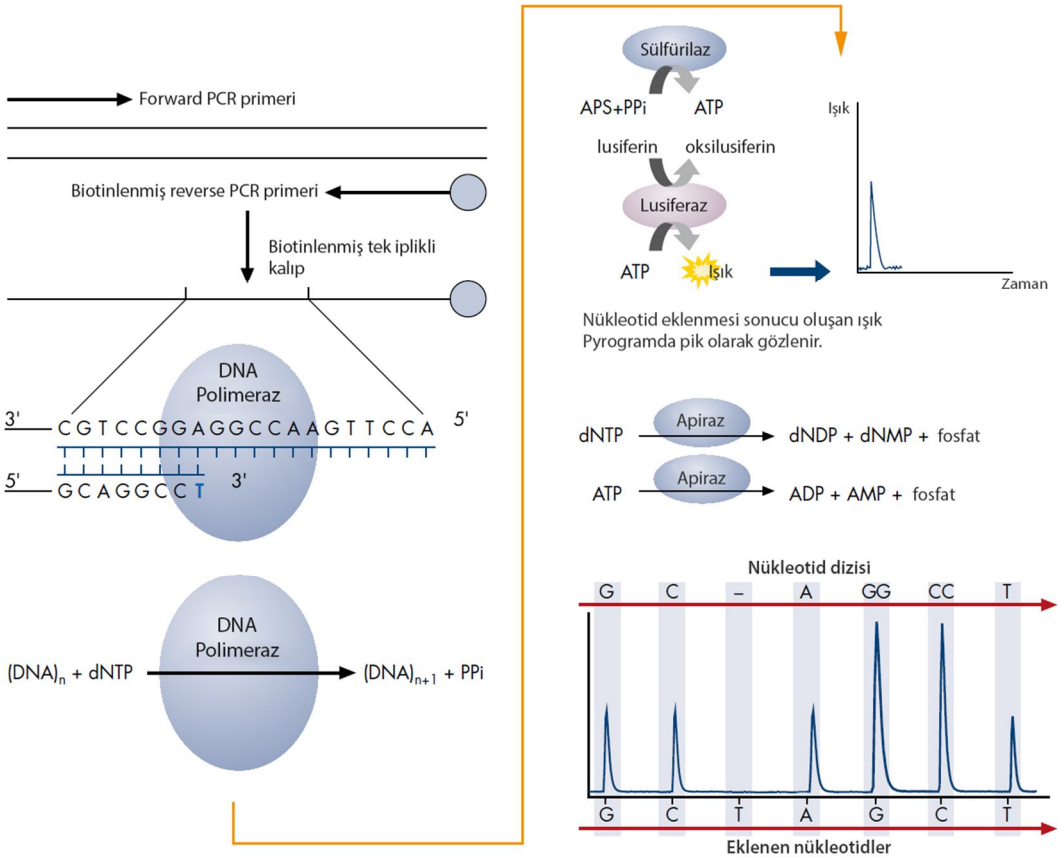
3.3.2.1. Bisülfit yöntemi ve pyrosekans ile kantitatif metilasyon analizi

DNA metilasyonu ökaryotlarda temel epigenetik mekanizmaların başında gelmektedir. Metilasyon özellikle CpG adalarındaki sitozin bazlarında meydana gelir. Genin regülatör bölgelerindeki hipermetilasyon genellikle o genin ifadesini azaltırken, hipometilasyon gen ifadesini artırmaktadır. Bisülfit yönteminde DNA sodyum bisülfitle muamele edilir. Bisülfitle muamele sonrası metillenmemiş sitozin rezidüleri urasile dönüşürken metillenmiş sitozinler etkilenmez. PCR işleminden sonra ise urasiller timine dönüşürler (Tablo 12). Böylece metillenmiş ve metillenmemiş sitozinler DNA dizi analizi ile ayırt edilebilirler (183).

Tablo 12. Bisülfit dönüşümü ve PCR sonrası DNA dizi değişimleri

	Orijinal dizi	Bisülfitle muamele sonrası	PCR amplifikasyonu sonrası
Metillenmemiş DNA	T-**C**-G-A-A-**C**-G-T-A	T-**U**-G-A-A-**U**-G-T-A	T-**T**-G-A-A-**T**-G-T-A
Metillenmiş DNA	T-**C**-G-A-A-**C**-G-T-A	T-**C**-G-A-A-**C**-G-T-A	T-**C**-G-A-A-**C**-G-T-A

Pyrosekans Sanger yönteminden farklı olarak sentez sırasında dizileme (sequencing by synthesis) prensibi ile çalışmaktadır. Bu yöntem DNA sentezi sırasında serbest kalan pirofosfatların (PPi) tespiti esasına dayanmaktadır. Dört farklı enzim (DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz, apiraz) ve iki farklı substrat (adenozin 5' fosfosülfat, lusiferin) pyrosekans reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP) ardışık olarak ortama gönderilirken kalıp zincirde uygun baz olduğunda DNA polimeraz ile sekans primerine eklenirler. Her bir birleşmede eklenen nükleotid miktarına eşit olarak PPi ortama salınır. ATP sülfürilaz ortamda adenozin 5' fosfosülfat varlığında salınan PPi'leri ATP'ye dönüştürür. Oluşan ATP yardımıyla lusiferaz enzimi ortamda bulunan lusiferini oksilusiferine dönüştürür. Bu dönüşüm ATP miktarıyla orantılı olarak görünür ışığın ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 18). Eşleşmeyen dNTP'ler apiraz yardımıyla yıkılır (184).



Şekil 18. Pyrosekans çalışma prensibi

Pyrosekans özellikle solid dokularda mutant aleli tespit etmede Sanger dizilemeye göre daha duyarlıdır (185). Standart metilasyon analiz metodları kalitatif veya yarı-kantitatif sonuçlar vermektedir. Sanger metodunda düşük düzeyde metilasyon durumunda pikler artefaktlardan ayırt edilememektedir. Pyrosekans yönteminde birbirini izleyen CpG adalarındaki metilasyon sıklıkları kantitatif olarak elde edilebilmektedir ve bu sonuçlar yüksek derecede tekrarlanabilir niteliktedir.

Pyrosekans metilasyon çalışmasında *APOBEC3B* geni için kullanılan primerler (Biomers.net GmbH - Ulm / Almanya) Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Metilasyon çalışması için kullanılan amplifikasyon ve pyrosekans primerleri

Promotör	
Forward	5'-GGGAGTTTGTTTTAGTTGGAGAAGTTG-3'
Reverse	5'-Biotin-ACAAATAAAAACCCTACTACTCCCCCTACC-3'
Sekans	5'-AGGTTTTGAATTTTTTTGGTTA-3'
İntron 1	
Forward	5'-GGATGATTTTATGGTGAGTAGATGT-3'
Reverse	5'-Biotin-ACCATATAAACCAAATTAATCTCAAACTC-3'
Sekans	5'-GTAATTTTAATATTTTGGGAGG-3'

3.3.2.2. Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfitlenmiş DNA izolasyonu

Doku kesitlerinden bisülfitlenmiş DNA izolasyonu için EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit (Cat. no. 59144, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

Formalin ile fikse parafine gömülü doku kesitlerinin lizisi

- Her bir örnek için 200 µl'lik reaksiyon tüpüne 5 µm kalınlıktaki yaklaşık 200 mm^2 alana sahip parafinli doku kesiti koyuldu ve üzerine 150 µl Deparafinizasyon Solüsyonu eklendi.
- Parafin çözülene kadar vortekslendi.
- 20 µl distile su, 15 µl Lysis Buffer FTB ve 5 µl proteinaz K eklendi.
- Örnekler vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı.
- Lizis ve çapraz bağların yıkımı için (decrosslinking) PCR cihazı kullanılarak Tablo 14'teki koşullar uygulandı.

Tablo 14. Lizis termal döngü koşulları

	Süre	**Sıcaklık**
Lizis	60 dk	56°C
Decrosslinking	60 dk	95°C

Bisülfit dönüşümü

- Yeterli miktarda Bisülfite Mix alikotu 800'er µl RNase-free water eklenerek Bisulfite Mix tamamen çözünene kadar vortekslendi.
- Lizis aşamasından sonra reaksiyon tüplerindeki örneklerin üzerindeki Deparafinizasyon Solüsyonu (yaklaşık 130 µl) uzaklaştırıldı.
- Tablo 15'teki reaktifler eklenerek bisülfit reaksiyonuna hazırlık yapıldı.

Tablo 15. Bisülfit reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon başı hacim
Lizis reaksiyonu ürünü	yaklaşık 40 µl
Çözünmüş Bisulfite Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Toplam hacim	**140 µl**

- Daha sonra Tablo 16'daki PCR programı kullanılarak DNA bisülfit dönüşümü gerçekleştirildi.

Tablo 16. Bisülfit dönüşümü için termal döngü koşulları

Basamak	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	25 dk	60°C
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	85 dk	60°C
Denatürasyon	5 dk	95°C
İnkübasyon	175 dk	60°C
Durdurma	∞	20°C

Bisülfit dönüşümü yapılmış DNA'ların saflaştırılması

- Bisülfit dönüşümü yapıldıktan sonra PCR tüpleri kısa santrifüj yapıldı ve reaksiyon yeni 1.5 ml'lik tüplere konuldu.

- Her bir örneğe 310 µl taze hazırlanmış 10 µg/ml carrier RNA içeren Buffer BL eklendi. Vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı.
- 250 µl saf etanol eklendi. 15 saniye vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı.
- Örnek sayısı kadar MinElute DNA spin kolonları yerleştirildi ve her bir tüpteki karışımın tamamı kolonlara aktarıldı.
- Kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar atıldı.
- Her bir kolona 500 µl Buffer BW (wash buffer) eklendi.
- Kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar atıldı.
- Her bir kolona 500 µl Buffer BD (desulfonation buffer) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar atıldı.
- Her bir kolona 500 µl Buffer BW (wash buffer) eklendi.
- Kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar atıldı.
- Tekrar her bir kolona 500 µl Buffer BW (wash buffer) eklendi.
- Kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar atıldı.
- Her bir kolona 250 µl saf etanol eklendi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Kalan sıvıların buharlaşması için kolonlar yeni 1.5 ml'lik reaksiyon tüplerine yerleştirildi ve 60°C'de 5 dakika kapakları açık şekilde inkübe edildi.
- Kolonlar tekrar yeni 1.5 ml'lik reaksiyon tüplerine yerleştirildi ve 15 µl Buffer EB (elution buffer) kolon membranının merkezine gelecek şekilde eklendi.
- Örnekler 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- DNA elüsyonu için 15000 x *g* hızında 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonlar atıldı.
- Saflaştırılmış ve bisülfitlenmiş DNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.2.3. Pyromark PCR işlemi

Bu aşamada PyroMark PCR Kit (Cat. no. 978703 Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. Ayrıca kontrol DNA'sı olarak Epitect PCR Control DNA Set (Cat. no. 59695, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uyguladı.

- Bisülfitlenmiş DNA'lar 50 ng/µl olacak şekilde dilüe edildi.
- Pyromark PCR kiti kullanılarak Tablo 17'deki reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 17. Reaksiyon karışımı içeriği (Bisülfitlenmiş DNA hariç)

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5 µl
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5 µl
Primer F	2.5 µl
Primer R	2.5 µl
Toplam hacim	**20 µl**

- Hazırlanan karışım her bir PCR tüpüne 20'şer µl dağıtıldı üzerlerine 5'er µl bisülfitlenmiş DNA'lar eklendi.
- PyroMark PCR Master Mix için optimize PCR koşulları Tablo 18'deki şekilde ayarlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 18. PCR Master Mix için optimize PCR koşulları

	Süre	Sıcaklık	
Başlangıç PCR aktivasyon basamağı	15 dk	95°C	
Denatürasyon	30 sn	94°C	45 döngü
Bağlanma	30 sn	56°C	
Uzama	30 sn	72°C	
Final uzama	10 dk	72°C	

3.3.2.4. Pürifikasyon ve sekans işlemleri

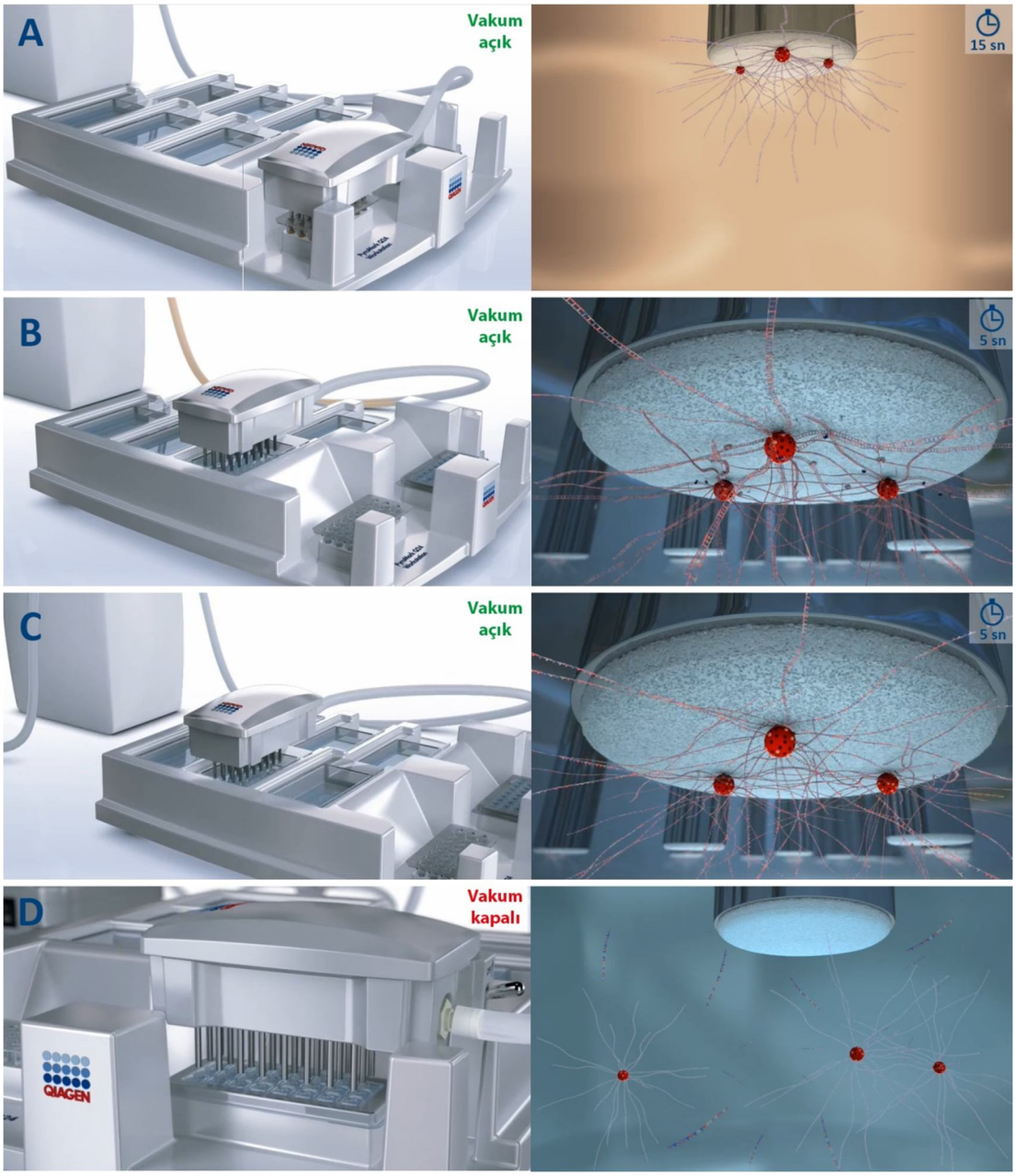
- PCR işlemi bittikten sonra ısı bloğu 80°C'ye ayarlandı ve Q24 plate holder'ı üzerine konuldu.
- 1x Wash Buffer hazırlandı [5ml PyroMark Wash Buffer (Cat. no. 979008, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) + 45 ml saf su]
- %70'lik etanol hazırlandı (35 ml etanol + 15 ml saf su)
- Streptavidin sepharose boncukları içeren şişe (Streptavidin Sepharose High Performance - GE Healthcare Life Sciences) homojen bir solüsyon haline gelene kadar yavaşça çalkalandı.
- DNA immobilizasyonu için Tablo 19'daki karışım hazırlandı.

Tablo 19. DNA immobilizasyonu için gerekli karışımın içeriği

Bileşenler	Her bir örnek için hacim
Streptavidin	2 µl
Binding Buffer	40 µl
Distile su	28 µl
Toplam hacim	**70 µl**

- Platedeki her kuyucuğa hazırlanan karışımdan 70'er µl dağıtıldı.
- Üzerlerine 10'ar µl PCR ürünü koyuldu.
- Plate üzeri seal ile sıkıca kaplandı.
- Plate termomiksere konuldu ve oda sıcaklığında 1400 rpm'de en az 10 dakika çalkalandı. Böylece biotinlenmiş PCR ürünlerinin streptavidin sepharose boncuklara bağlanması gerçekleşti.
- Vakum istasyonu açıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.
    - H_2O-1 ve H_2O-2 küvezleri su ile dolduruldu.
    - PyroMark Denatürasyon solüsyonu (Cat. no. 979007, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) ilgili küveze yarım çizgisinin biraz altına kadar dolduruldu.
    - 1x PyroMark Wash Buffer ilgili küveze yarım çizgisinin biraz üstüne gelecek şekilde dolduruldu.
    - İlgili küveze alkol daha sonra konuldu.

- Plate oda sıcaklığında beklemekte olan ikinci PyroMark Q24 plate holder'a konuldu.
- Sekans primerleri vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı.
- Her bir örnek için 22.5 µl PyroMark Annealing Buffer (Cat. no. 979009, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) ve 2.5 µl sekans primerinden oluşan karışımdan PyroMark Q24 plate'e 25 µl dağıtıldı.
- Vakum istasyonunda ilgili küveze yarım çizgisine kadar %70'lik etanol koyuldu.
- El ünitesi park pozisyonundayken vakum açıldı.
- PyroMark Q24 plate'i vakum istasyonunun sağındaki yerine koyuldu.
- Termomikserdeki plate vakum istasyonunun solundaki yerine koyuldu. Seal dikkatlice çıkarıldı ve platedeki karışım vakum istasyonunun el ünitesi ile 15 saniye vakumlandı. Buradaki amaç streptavidin sepharose boncuklara bağlanmış biotinlenmiş amplikonların el ünitesinin filtre problarında kalmasını sağlamaktır (Şekil 19A).
- El ünitesi içerisinde %70'lik etanol bulunan ilk küveze yerleştirildi. Sıvı akışı görüldükten sonra 5 saniye vakumlandı. Bu aşamada geriye kalan PCR artıkları ortamdan uzaklaştırılır (Şekil 19B).
- El ünitesi içerisinde denatürasyon solüsyonu bulunan ikinci küveze yerleştirildi. Sıvı akışı görüldükten sonra 5 saniye vakumlandı. Bu aşamada çift iplikli amplikonlar tek iplikli hale gelir. Biotinlenmiş reverse iplikler streptavidin boncukları sayesinde filtre problarında kalırken, forward iplikler ortamdan uzaklaştırılır (Şekil 19 C).
- El ünitesi içerisinde Wash Buffer bulunan üçüncü küveze yerleştirildi. Sıvı akışı görüldükten sonra 10 saniye vakumlandı. Bu aşamada geriye kalan biyotinlenmemiş iplikler ortamdan uzaklaştırılır.
- Filtre problarındaki sıvının tamamen gitmesi için el ünitesi 90 derece dik pozisyonda bir müddet bekletildi.
- Daha sonra vakum kapatıldı ve el ünitesi içerisinde sekans primerinin bulunduğu PyroMark Q24 plate'e yerleştirildi. 15 saniye hafif hareketlerle çalkalandı. Böylece streptavidin boncuklara bağlı tek iplikli DNA'nın sekans primeri ile buluşması sağlandı (Şekil 19 D).



Şekil 19. Pyromark Q24 vakum istasyonu işlemleri

- Daha önceden üzerinde Q24 plate holder bulunan 80°C'ye ayarladığımız ısı bloğu üzerine PyroMark Q24 plate'i yerleştirildi ve 2 dakika beklendi.
- Süre bitiminden sonra holder'la birlikte plate alındı ve oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakıldı.
- PyroMark Gold Q24 Reagents (Cat. no. 970802, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) içerisinde bulunan enzim ve substrat 620 µl pyro distile su ile çözüldü. Nükleotidler vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı.

- Pre-run çıktısına göre filtresiz pipet ucu kullanılarak enzim, substrat ve nükleotidler kartuştaki ilgili yerlerine koyuldu.
- Her bir çalışmada bisülfit dönüşümü yapılmış metillenmiş ve metillenmemiş 3 adet kontrol DNA kullanıldı.
- Kartuş ve plate PyroMark Q24 cihazındaki ilgili yerlerine yerleştirildi. İlgili "Run" dosyası seçildi ve çalışma başlatıldı.
- Her bir CpG bölgesi için sitozin-timin oranları elde edildi.

3.4. VERİLERİN ANALİZİ

3.4.1. Rölatif kantitasyon

Rölatif kantitasyon yönteminde hedef genin konsantrasyonu başka bir referans gene oranlanarak hesaplanır. Rölatif kantitasyon yöntemleri başlangıç örnek miktarından, cDNA sentez verimliliğinden ya da pipetleme hataları gibi faktörlerinden etkilenmez. Kullanılacak referans gen tüm hücrelerde eksprese olan, hücre canlılığı için gerekli, hücre içindeki değişimlerle ekspresyon düzeyi değişmeyen özellikte olmalıdır. Bu özellikteki genlere "House Keeping Genler" de denir. *GAPDH*, *ACTB* (*β-Actin)*, *HPRT* ve *TBP* referans genlere örnek olarak verilebilir. Rölatif kantitasyon yönteminde kullanılan kalibratör sayesinde prob birleşimindeki farklılıklar, FRET verimi ya da boya eksitasyon sabitleri gibi saptama farklılıkları düzeltilir.

Bu çalışmada 5 adet hedef gen (*APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C*) referans gen olarak *β-Actin* ile çalışıldı. Bütün hastalarda her gen ayrı ayrı çalışıldı. LightCycler 480 software programından Ct değerleri ve normalize değerler elde edildi.

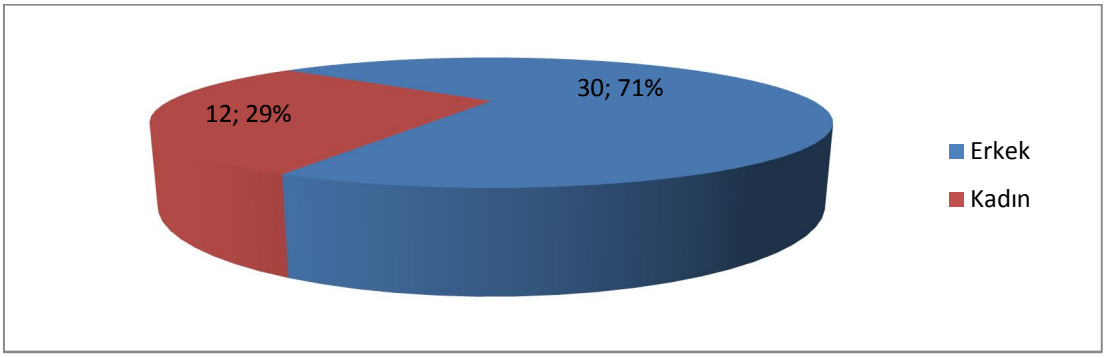
3.4.2. İstatistiksel analiz

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2013) yazılımı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde histogram, qq grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Eşleşmiş iki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımlı örneklem t-

testi kullanıldı. Bağımsız iki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Değişkenler arası ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama ve standart sapma değerleri verildi. $p<0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

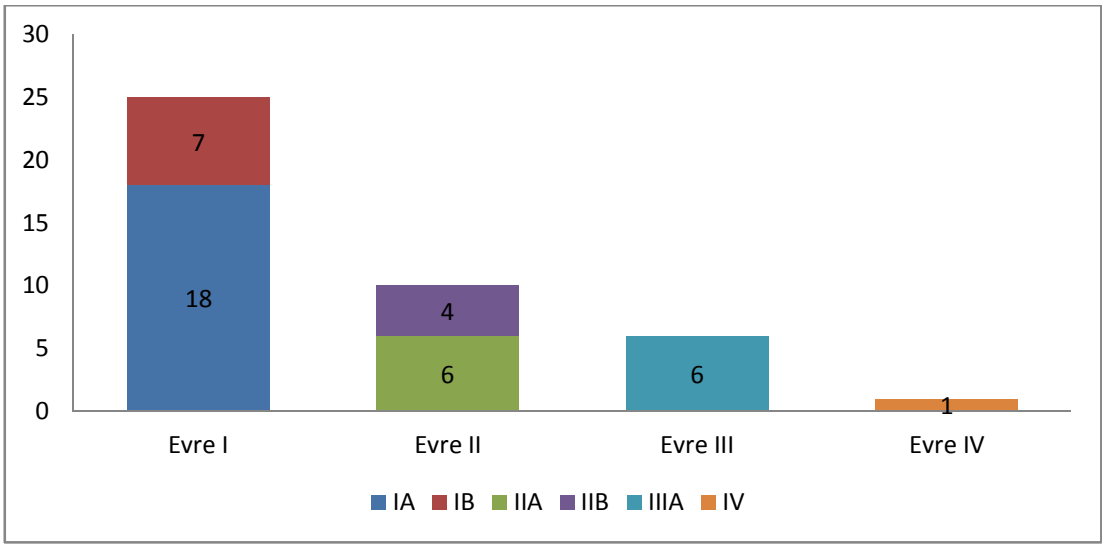
4. BULGULAR

2010-2014 yılları arası üniversitemizde akciğer adenokarsinomu ön tanısıyla opere olmuş ve Tıbbi Patoloji AD'nda adenokarsinomu tanısı alan 42 hastanın klinik bilgilerine, tümör ve normal doku bloklarına ulaşıldı. Çalışmaya dahil olan 42 olgunun yaş ortalaması 60.31±8.72 idi. Hastaların cinsiyetlerine göre dağlımı; erkek 30 (%71.4), kadın 12 (%28.6) şeklindeydi (Şekil 20).



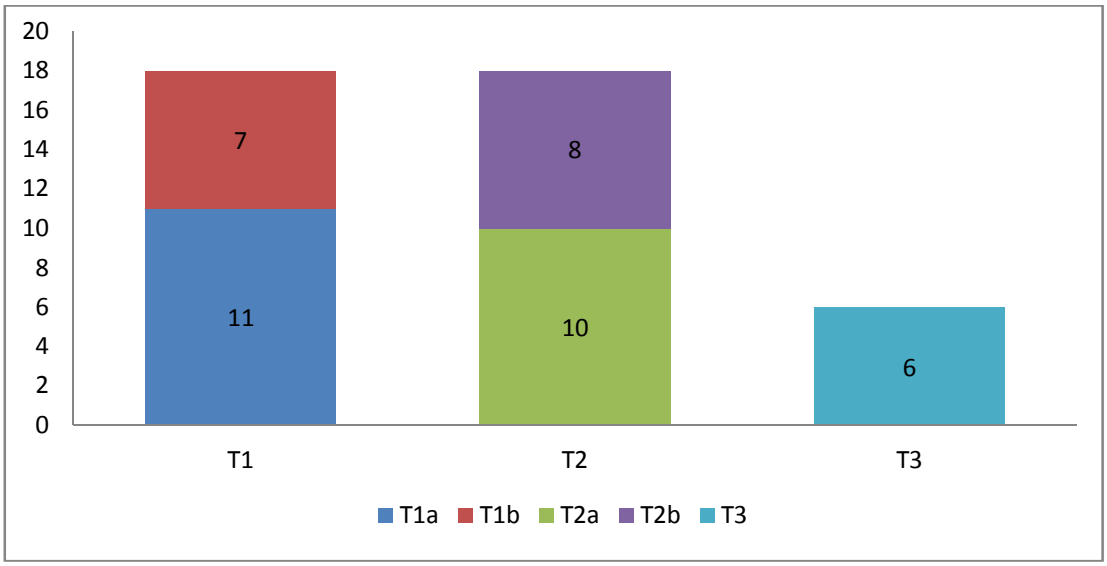
Şekil 20. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

Olguların TNM evrelemesi IASLC TNM 7. versiyonuna göre yapıldı. Buna göre dağılımları; Evre I: 25 (%59.5), Evre II: 10 (%23.8), Evre III: 6 (%14,3), Evre IV: 1 (%2,4) şeklindeydi (Şekil 21).



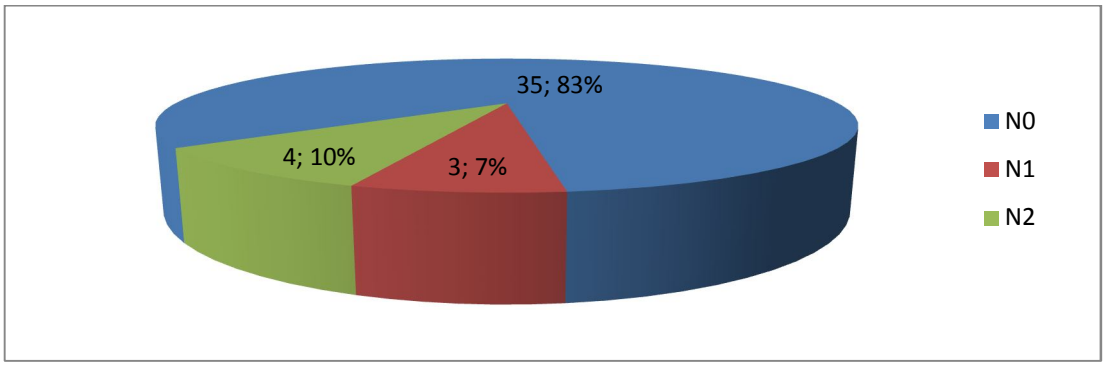
Şekil 21. Hastaların evrelere göre dağılımı

Olguların TNM evrelemesindeki T faktörüne (tümör boyutu, tümörün komşu organ ve yapılara invazyonuna) göre dağılımları; T1: 18 (%42.9), T2: 18 (%42.9), T3: 6 (%14,3) idi (Şekil 22).



Şekil 22. Hastaların TNM evrelemesindeki T faktörüne göre dağılımları

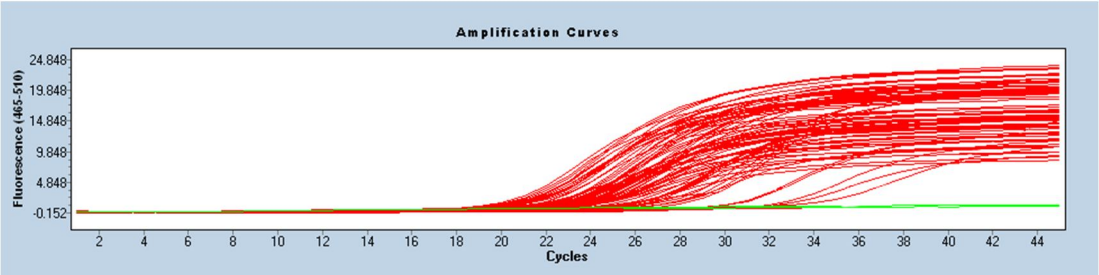
Vakaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları; N0: 35 (%83.3), N1: 3 (%7.1), N2: 4 (%9.5) şeklindeydi (Şekil 23).



Şekil 23. Hastaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları

4.1. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI

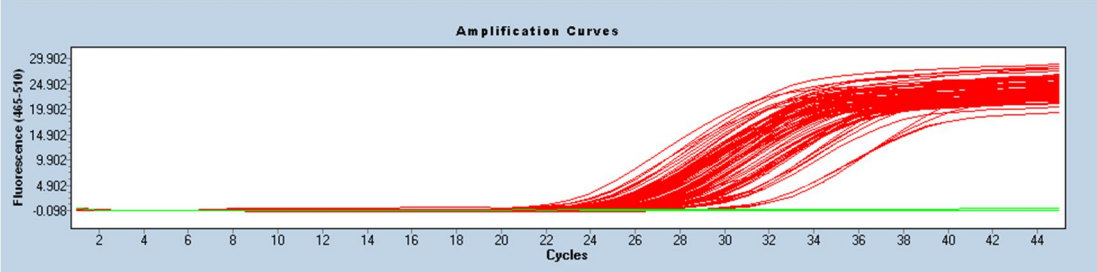
Çalışmada *APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C* hedef genleri, referans gen olarak *β-Actin* ile çalışıldı. LightCycler 480 software programından Ct değerleri elde edildi, yine aynı programla *β-Actin*'e göre rölatif kantitasyon yapıldı. Tümör dokularında *β-Actin* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Tümör dokularında *β-Actin* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

4.1.1. APOBEC1

Tümör dokularında *APOBEC1* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 25'te gösterilmiştir.



Şekil 25. Tümör dokularında *APOBEC1* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki *APOBEC1/β-Actin* mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden çıkarıldı. Hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı (p=0.32). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 20).

Tablo 20. *APOBEC1* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması

	n	Ortalama	Standart sapma	p değeri
APOBEC1 normal	40	1.773	2.463	0.32
APOBEC1 tümör	40	2.394	3.232	

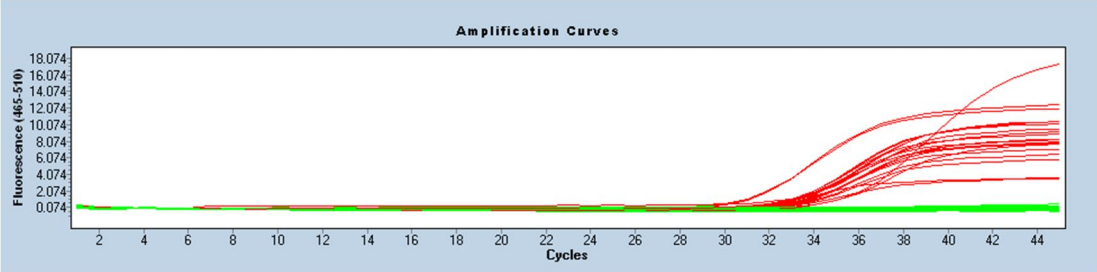
Olguların tümör dokularındaki *APOBEC1/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile cinsiyet, yaş, tümör durumu, lenf nodu tutulumu ve TNM evrelemesi bağımsız örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. İleri evrelerde (Evre III-IV) erken evrelere (Evre I-II) göre ve lenf nodu tutulumu olan olgularda lenf nodu tulumu olmayanlara göre anlamlı derecede ekspresyonun arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Diğer faktörler açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo21).

Tablo 21. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC1/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	n	*APOBEC1/β-Actin* mRNA ekspresyonu	p değeri
Cinsiyet			
Erkek	29	2.145±2.453	0.26
Kadın	12	3.447±4.797	
Yaş			
<60	19	2.119±2.894	0.47
≥60	22	2.878±3.647	
Tümör durumu			
T1-2	35	2.365±3.107	0.46
T3	6	3.468±4.507	
Lenf nodu tutulumu			
N0	34	2.043±2.729	**<0.05 (0.037)**
N1-2	7	4.875±4.895	
TNM evresi			
Evre I-II	34	1.979±2.475	**<0.05 (0.017)**
Evre III-IV	7	5.153±4.615	

4.1.2. APOBEC2

Tümör dokularında *APOBEC2* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 26'da gösterilmiştir.

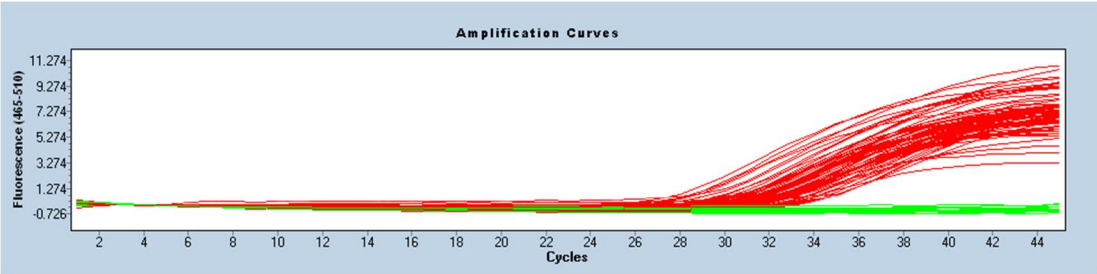


Şekil 26. Tümör dokularında *APOBEC2* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

APOBEC2 geni için vakaların büyük çoğunluğunda (hem tümör, hem normal dokularda), kalibratör olarak seçilen örnek de dahil olmak üzere Ct değerleri ile normalize değerler elde edilemedi. Bu sebeple istatistiksel analizler yapılamadı.

4.1.3. APOBEC3A

Tümör dokularında *APOBEC3A* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 27. Tümör dokularında APOBEC3A geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki *APOBEC3A/β-Actin* mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden çıkarıldı. Ekspresyon düzeyi hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre anlamlı olarak azalmış tespit edildi ($p<0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 22).

Tablo 22. *APOBEC3A* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması

	n	Ortalama	Standart sapma	p değeri
APOBEC3A normal	35	1.383	1.719	**<0.05 (0.046)**
APOBEC3A tümör	35	0.612	1.138	

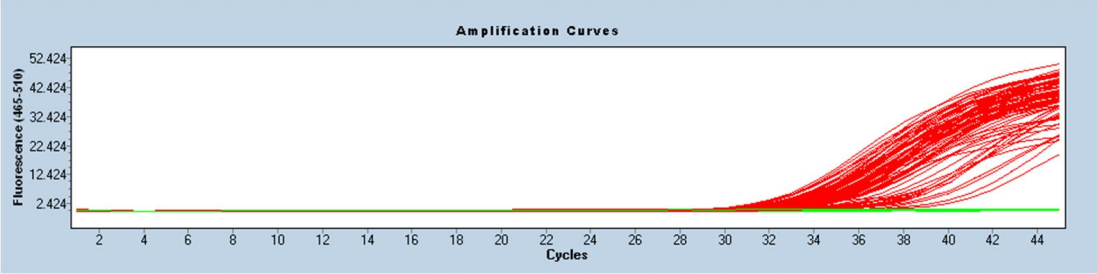
Olguların tümör dokularındaki *APOBEC3A/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile cinsiyet, yaş, tümör durumu, lenf nodu tutulumu ve TNM evrelemesi bağımsız örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. Bu faktörler açısından ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 23).

Tablo 23. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3A/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	n	*APOBEC3A/β-Actin* mRNA ekspresyonu	p değeri
Cinsiyet			
Erkek	25	0.734±1.326	0.36
Kadın	10	0.340±0.227	
Yaş			
<60	16	0.899±1.620	0.19
≥60	19	0.387±0.342	
Tümör durumu			
T1-2	31	0.640±1.205	0.79
T3	4	0.475±0.194	
Lenf nodu tutulumu			
N0	31	0.675±1.197	0.45
N1-2	4	0.209±0.119	
TNM evresi			
Evre I-II	31	0.652±1.202	0.66
Evre III-IV	4	0.380±0.222	

4.1.4. APOBEC3B

Tümör dokularında *APOBEC3B* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 28'de gösterilmiştir.



Şekil 28. Tümör dokularında *APOBEC3B* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden çıkarıldı. Ekspresyon düzeyi hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre anlamlı olarak artmış tespit edildi ($p<0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 24).

Tablo 24. *APOBEC3B* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması

	n	Ortalama	Standart sapma	p değeri
APOBEC3B normal	35	1.235	3.164	**<0.05 (0.018)**
APOBEC3B tümör	35	1.838	3.309	

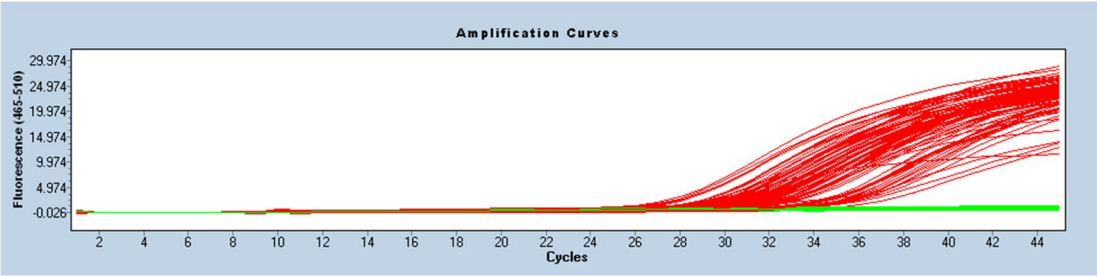
Olguların tümör dokularındaki *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile cinsiyet, yaş, tümör durumu, lenf nodu tutulumu ve TNM evrelemesi bağımsız örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. İleri evrelerde (Evre III-IV) erken evrelere (Evre I-II) göre anlamlı derecede ekspresyonun arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Diğer faktörler açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 25).

Tablo 25. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	n	*APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyonu	p değeri
Cinsiyet			
Erkek	26	1.321±1.118	
Kadın	12	1.504±1.825	0.71
Yaş			
<60	18	1.759±1.655	
≥60	20	1.037±0.936	0.10
Tümör durumu			
T1-2	32	1.241±1.148	
T3	6	2.112±2.168	0.15
Lenf nodu tutulumu			
N0	32	1.259±1.062	
N1-2	6	2.018±2.461	0.21
TNM evresi			
Evre I-II	32	1.155±1.083	**p<0.05**
Evre III-IV	6	2.569±2.082	**(0.017)**

4.1.5. APOBEC3C

Tümör dokularında *APOBEC3C* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 29'da gösterilmiştir.



Şekil 29. Tümör dokularında *APOBEC3C* geninin Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki *APOBEC3C/β-Actin* mRNA ekspresyon seviyeleri bağımlı örneklem t-testi karşılaştırıldı. Karşılıklı olarak eşleşmeyen (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnekler istatistiksel analizden çıkarıldı. Hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı (p=0.82). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 26).

Tablo 26. *APOBEC3C* geni normal-tümör doku ekspresyon karşılaştırması

	n	Ortalama	Standart sapma	p değeri
APOBEC3C normal	38	1.225	2.592	0.82
APOBEC3C tümör	38	1.132	0.665	

Tablo 27. Olguların klinikopatolojik özellikleriyle *APOBEC3C/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	n	*APOBEC3C/β-Actin* mRNA ekspresyonu	p değeri
Cinsiyet			
Erkek	28	1.369±1.239	
Kadın	12	1.231±0.712	0.72
Yaş			
<60	19	1.281±0.936	
≥60	21	1.370±1.251	0.80
Tümör durumu			
T1-2	34	1.381±1.169	
T3	6	1.024±0.529	0.47
Lenf nodu tutulumu			
N0	34	1.391±1.171	
N1-2	6	0.972±0.452	0.40
TNM evresi			
Evre I-II	34	1.334±1.159	
Evre III-IV	6	1.292±0.752	0.93

Olguların tümör dokularındaki *APOBEC3C/β-Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile cinsiyet, yaş, tümör durumu, lenf nodu tutulumu ve TNM evrelemesi bağımsız örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. Bu faktörler açısından ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 27).

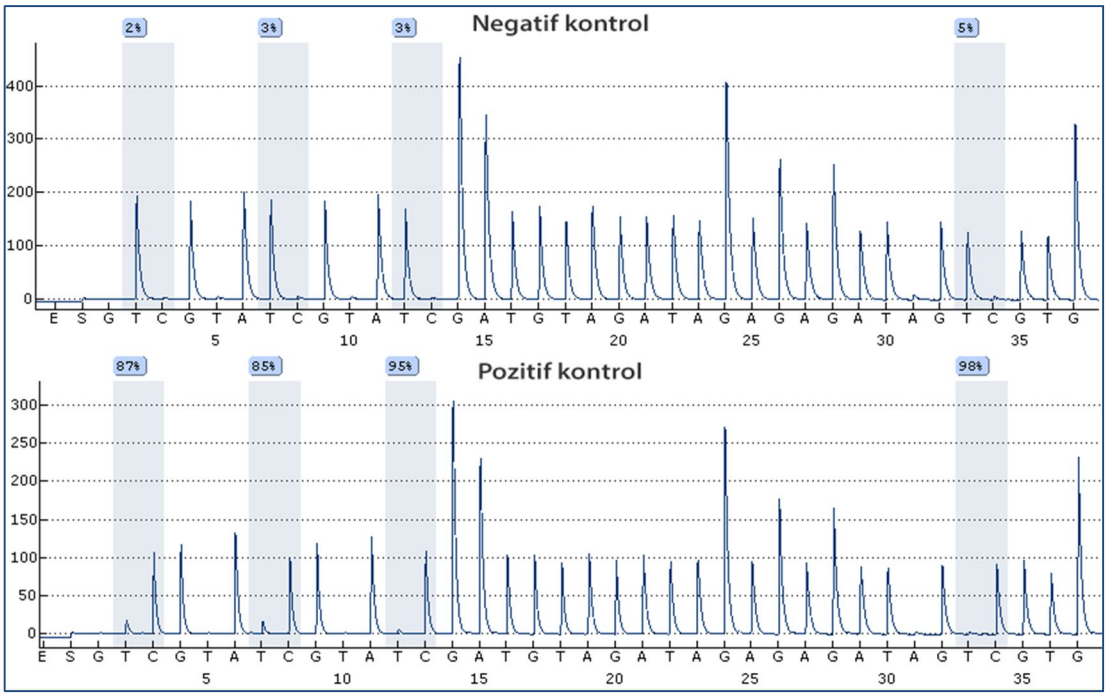
4.2. METİLASYON ANALİZİ BULGULARI

PyroMark Q24 cihazı (Qiagen) ve Pyromark Q24 2.0 (Qiagen) yazılımı ile 42 olgunun hem tümör hem normal akciğer dokularından elde edilen DNA'lardan kantitatif metilasyon analizi yapıldı. *APOBEC3B* geni promotör ve İntron 1'de analiz edilen DNA dizileri Tablo 28'de gösterilmiştir. Promotör'de 4 adet, İntron'da 3 adet CpG bölgesi değerlendirildi.

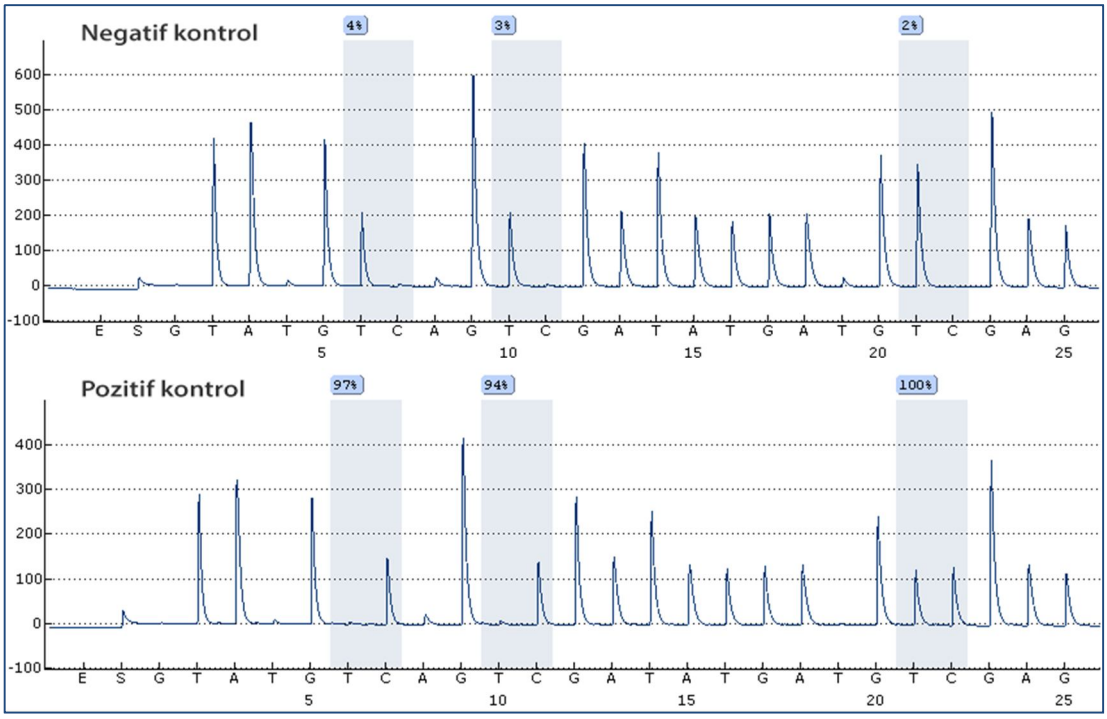
Tablo 28. *APOBEC3B* geni promotör ve intron 1'de analiz edilen diziler

Bölge	Sekans dizisi (5'-3')
Promotör	C/TGAC/TGAC/TGGGAATGTAGATAGGGAGGAGGATGC/TGTGGGTGGTAGGGGGAGTAGTAG
İntron 1	TTAAGGC/TGGGC/TGGATTATGAGGTC/TGGGAGTTTGAGATTAATTTGGTTTAT

Her çalışmada bisülfit dönüşümü yapılmış metillenmiş ve metillenmemiş DNA'lar sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol DNA'larına ait pyrogram görüntüleri Şekil 30 ve 31'de gösterilmiştir. Her bir CpG bölgesinden metilasyon oranı (sitozin yüzdesi) elde edildi.

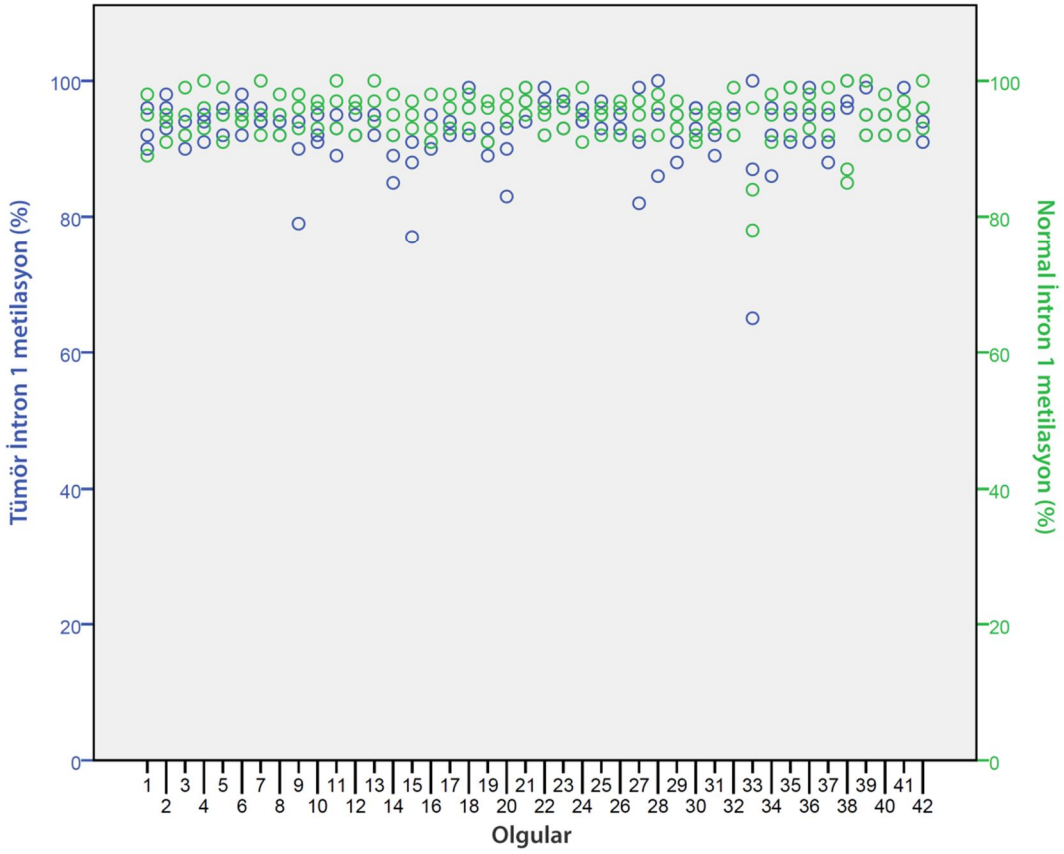


Şekil 30. *APOBEC3B* promotör bölgesinde negatif ve pozitif kontrol DNA'larının pyrogram görüntüsü ve metilasyon yüzdeleri



Şekil 31. *APOBEC3B* intron bölgesinde negatif ve pozitif kontrol DNA'larının pyrogram görüntüsü ve metilasyon yüzdeleri

APOBEC3B intron 1'de incelenen 3 CpG bölgesinde hem tümör hem de normal dokularda yüksek metilasyon oranları (hipermetile) tespit edildi (Şekil 32). Metilasyon yüzdeleri ortalaması tümör dokularında %93.0±4.64 (n=126), normal dokularda %94.85±3.34 (n=126) bulundu.

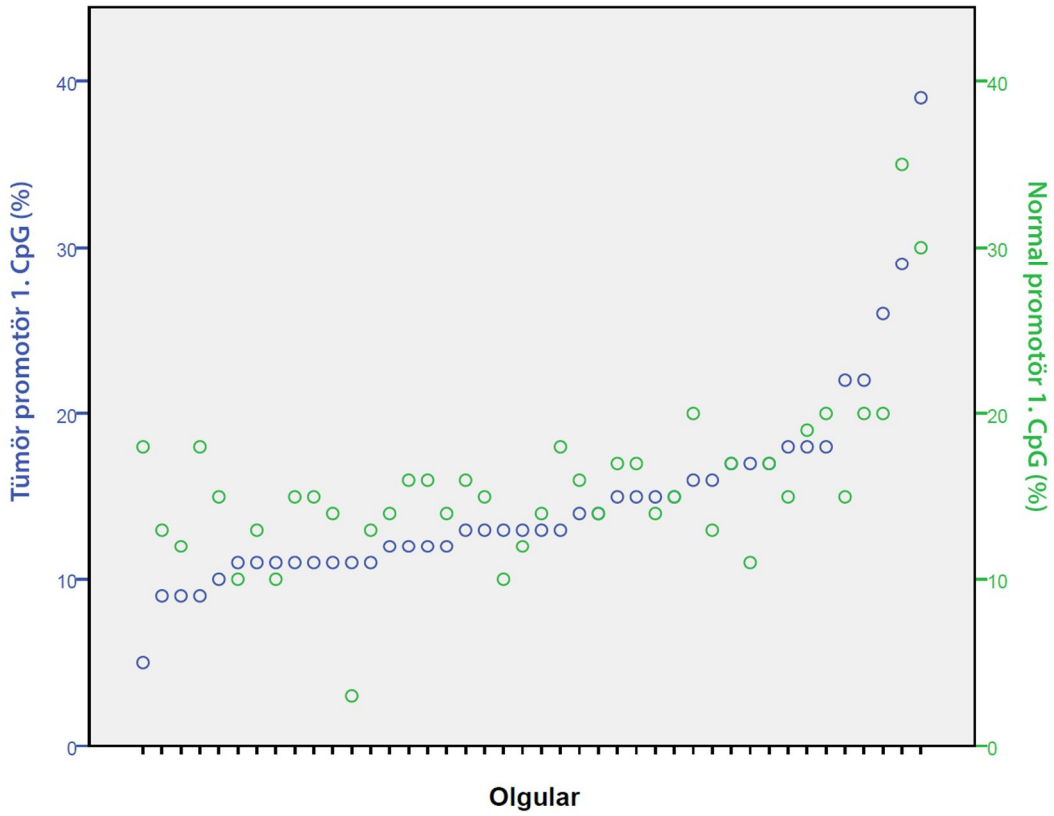


Şekil 32. *APOBEC3B* intron 1 metilasyon oranları. Mavi halkalar tümör, yeşil halkalar normal dokulardaki metilasyon yüzdelerini göstermektedir. Her bir hasta için 3 adet CpG bölgesi tümör ve normal dokularda gösterilmektedir.

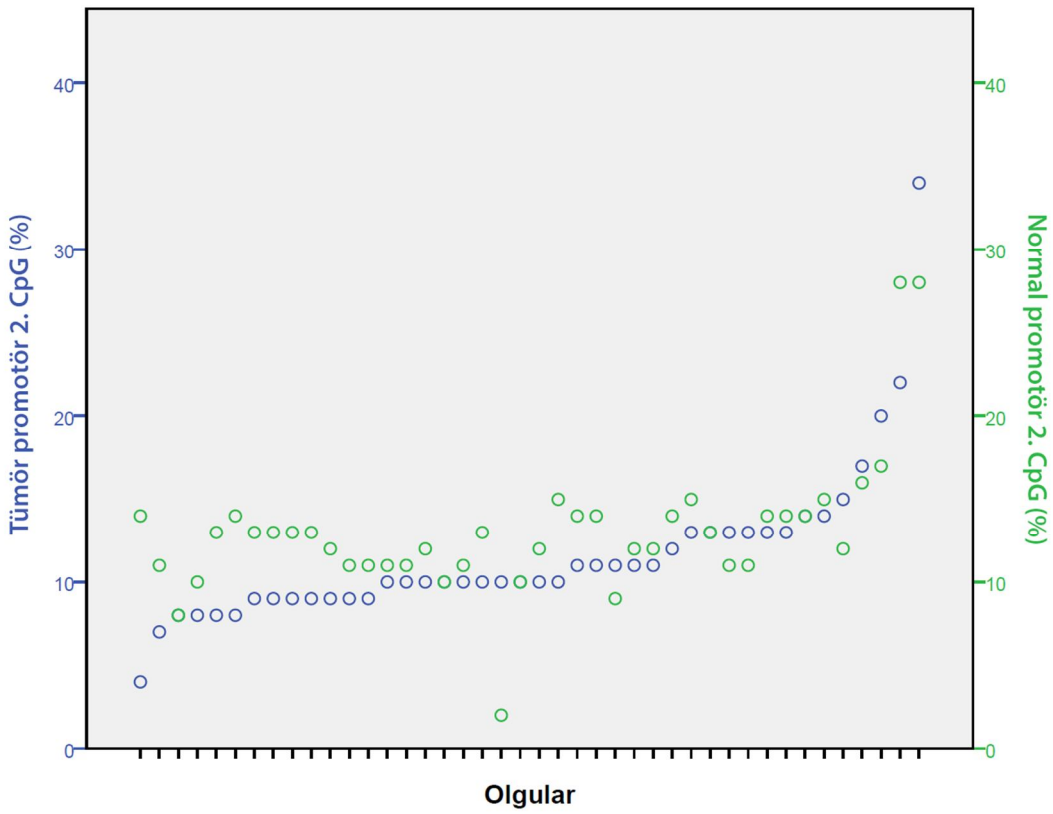
APOBEC3B promotör bölgesinde 4 adet CpG bölgesinin her birinin tümör ve normal dokularda metilasyon yüzdeleri bağımlı örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. Metilasyon oranı ikinci CpG bölgesinde tümör dokularında normal dokulara göre anlamlı düzeyde azalmış olarak bulundu ($p<0.01$). Dördüncü CpG bölgesinde ise tümör dokularında normal dokulara göre anlamlı düzeyde artmış olarak tespit edildi ($p<0.05$). Diğer iki bölgede tümörle normal doku arasında anlamlı bir metilasyon farkı bulunmadı ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 29). Birinci ve ikinci bölgenin dot plot grafikleri Şekil 33 ve 34'te gösterildi.

Tablo 29. *APOBEC3B* promotör bölgesi tümör-normal doku metilasyon oranları karşılaştırması

	n	Ortalama (%)	Standart sapma	p değeri
Promotör normal CpG 1	42	15.691	5.044	0.16
Promotör tümör CpG 1	42	14.738	5.951	
Promotör normal CpG 2	42	13.000	4.196	**<0.01 (0.007)**
Promotör tümör CpG 2	42	11.595	4.814	
Promotör normal CpG 3	42	16.500	5.062	0.81
Promotör tümör CpG 3	42	16.667	6.423	
Promotör normal CpG 4	42	26.381	7.596	**<0.05 (0.042)**
Promotör tümör CpG 4	42	28.429	7.958	



Şekil 33. ***APOBEC3B* promotör 1. CpG bölgesi tümör ve normal doku metilasyon oranları.** Mavi halkalar tümör, yeşil halkalar normal dokulardaki metilasyon yüzdelerini göstermektedir. Her bir hasta için veriler soldan sağa doğru tümör dokularının metilasyon yüzdelerine göre artan şekilde sıralanmıştır.



Şekil 34. ***APOBEC3B* promotör 2. CpG bölgesi tümör ve normal doku metilasyon oranları.** Mavi halkalar tümör, yeşil halkalar normal dokulardaki metilasyon yüzdelerini göstermektedir. Her bir hasta için veriler soldan sağa doğru tümör dokularının metilasyon yüzdelerine göre artan şekilde sıralanmıştır.

Son olarak tümör dokularında anlamlı olarak düşük düzeyde metilasyon tespit edilen promotör ikinci CpG bölgesinin metilasyonu ile yine tümör dokularında *APOBEC3B/β-Actin* mRNA ekspresyonu arasındaki ilişkiye Pearson korelasyon analizi ile bakıldı. İki grup arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı [$r(38)=0.076$, $p=0.65$].

5. TARTIŞMA

Yaşam boyunca hücrelerimiz DNA'da hasara yol açan çok çeşitli mutajenlere maruz kalmaktadır. Bu etkilerin büyük çoğunluğu DNA tamir mekanizmalarıyla engellenmektedir ya da hücreler ölüme terk edilmektedir (186). Tüm bu savunma mekanizmalarına rağmen bazı DNA hasarları tamir mekanizmalarından kurtulmaktadır. Devam eden mutasyonel süreçler nedeniyle bu somatik mutasyonlara her gün yenileri eklenmektedir. Bu süreçler kanser oluşumuna katkısı olan genlerde fonksiyon kaybettiren ya da kazandıran mutasyonlara yol açtıklarında tümör oluşumu başlar (131). Lokal tümörde meydana gelen ek mutasyonlar ise metastazlara ve ilaç dirençlerine neden olmaktadır. Bu dinamik süreçler nedeniyle kanser genomları son derece karmaşık yapıdadır ve binlerce mutasyon içerirler. Tüm bu karmaşıklığa rağmen kanser hücrelerindeki nükleotid değişimlerinin gözlemlenmesi karsinogenezdeki belirli mekanizmaların izinin sürülmesini sağlar (13).

Dış kaynaklı mutajenlerin en iyi bilinen örnekleri sigara ve ultraviyole ışıktır. Sigara dumanında bulunan NNK akciğer kanseriyle (187), UV ışık ise cilt kanseriyle yakından ilişkilidir (188). UV ışık pirimidin dimerlerinin (CC, CT, TC, TT) oluşumuna yol açar. Bu dimerler nükleotid ekzisyon tamirinin hedefidir. Ancak bu tamir mekanizmasındaki aksaklıklar sonucu C→T mutasyonları oluşur (188). Diğer taraftan DNA'da direkt hasara sebep olan endojen mutajenik ajanlardan guaninin oksidasyonu ve sitozinin hidrolitik deaminasyonu gibi bazı mekanizmalar iyi bilinse de bu ajanların birçoğu açığa kavuşturulamamıştır (189). Ancak son yıllardaki çalışmalar APOBEC'lerin özellikle de APOBEC3B'nin çeşitli kanser türlerinde mutasyonların endojen enzimatik kaynağı olabileceğini işaret etmektedir (5, 14, 147, 175).

APOBEC'lerle kanser arasındaki ilişki erken dönemde, transgenik farelerde aşırı eksprese olan APOBEC1 sonucu hepatosellüler kanser gelişiminin gözlenmesi ile kurulmuştur (159). AID ve APOBEC1'in *E. coli*'de eksprese olduklarında DNA'da mutasyona yol açtıklarının bulunmasıyla birlikte APOBEC'lerin antikor çeşitliliğini sağlamasının yanında tümör gelişimine de katkısının olabileceği fikri güçlenmiştir (190). Kısa süre sonra AID'in transgenik farelerde *MYC* mutasyonlarına yol açarak lenfomaya sebep olduğu gösterilmiştir (191). Sonraki yıllarda mide epitelinde *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun AID ekspresyonunu artırdığı ve bunun sonucu olarak *TP53* mutasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. Böylece *H. pylori* enfeksiyonlarının mide kanserine yol açma sebeplerinden birinin bu olabileceği bildirilmiştir (192). Array hibridizasyon çalışmaları birçok kanser türünde en az bir APOBEC3 üyesinin artmış ifadesini işaret etmektedir (9). Mayalarda yapılan genetik çalışmalar APOBEC3 enzimlerinin ökaryot genomik DNA'sında mutasyonlara yol açabileceği gösterilmiştir (193).

Tüm bu çalışmalar ve daha fazlası APOBEC'lerin kanser mutagenezindeki rolünü destekleseler de tam olarak açıklayamamışlardır (194). Fakat Burns ve ark.'nın 2013 yılındaki çalışmaları APOBEC ve kanser araştırmalarında dönüm noktası olmuştur. Bu çalışmayla birlikte ilk kez bir APOBEC ailesi üyesinin (APOBEC3B) bir kanser türüyle (meme kanseri) açık ve net ilişkisi ortaya konulmuştur (14). Meme kanseri olgularından alınan eşleşmiş tümör ve normal dokularda APOBEC ailesinin tüm üyelerinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış, sadece APOBEC3B'nin ekspresyonu tümör dokularında anlamlı derecede artmış bulunmuştur. Yine benzer şekilde tüm meme kanseri hücre hatlarının üçte ikisinde kontrol hücre hatlarına göre *APOBEC3B*'nin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca artmış *APOBEC3B* ekspresyonu yüksek düzeyde C→T ve genel mutasyon yükü ile ilişkili bulunmuştur. Diğer taraftan *APOBEC3B* mRNA'sı *knockdown* (ifadesi azaltıldığında) edildiğinde meme kanseri hücre hatlarında DNA deaminaz aktivitesinde azalma, *TP53* ve *c-MYC* genlerinde ise daha az C→T mutasyonu gözlenmiştir (14). Bu kapsamlı çalışmayla birlikte aslında antiviral bir enzim olarak bilinen (195) APOBEC3B dikkatleri üzerine çekmiştir. Ardından gelen TCGA verilerini kullanarak yapılan çalışmalarda APOBEC3B'nin sebep olduğu mutasyon imzalarının izini süren araştırmacılar bu mutasyon motiflerini

birçok kanser türünde (meme, mesane, serviks, akciğer adenokarsinomu, akciğer skuamoz hücreli karsinom, baş ve boyun kanserleri) tespit etmişlerdir (147, 175).

Tüm bu bilgiler ışığında *APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C* (A1, A2, A3A, A3B, A3C) mRNA ekspresyon düzeyleri akciğer adenokarsinomu tanılı hastaların tümör ve komşu normal akciğer dokularında karşılaştırıldı. Diğer kanser türlerindeki çalışmalarla uyumlu olarak A3B mRNA ekspresyon seviyelerinin akciğer adenokarsinomu tümör dokularında komşu normal dokulara göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0.05$).

Leonard ve ark. çalışmalarında seröz over kanserlerinde APOBEC'lerin etkisini araştırmışlar, tümör dokularında normal dokulara göre A3B mRNA ekspresyonun arttığını göstermişlerdir. Diğer taraftan A1, A3A, A3G, A3H, AID, A4 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark yokken, A3C, A3D, A3F ve A2 ekspresyon seviyelerinde tümör dokularında azalma tespit etmişler. Ayrıca A3B ekspresyonu ile mutasyon yükü arasında pozitif korelasyon elde etmişlerdir (176). Bir diğer çalışmada Jin ve ark. kondrosarkom tümör dokularında normal dokulara göre artmış A3B ekspresyonu tespit etmişler. Aynı zamanda A3B-*knockdown* kondrosarkom hücrelerinde transfekte edilmemiş hücrelere göre apoptozis oranı yüksek bulunmuştur (196). Sasaki ve arkadaşlarının yakın zamanlı çalışmalarında küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde A3B'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir (197). Bu çalışmalar ve bizim çalışmamız A3B'nin kanserler için endojen mutajen ajan olma hipotezini desteklemektedir.

Sasaki ve ark. ayrıca KHDAK'nde A3B ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik özelliklerini (yaş, cinsiyet, tümör durumu, lenf nodu metastazı, evre, sigara, EGFR ve KRAS mutasyon varlığı) karşılaştırmışlar, anlamlı bir farklılık bulamamışlardır (197). Ancak bizim çalışmamızda ileri evre akciğer adenokarsinomlarında (Evre III-IV) erken evrelere (Evre I-II) göre anlamlı derecede A3B mRNA ekspresyonun arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Çalışmamızda karşılaştırılan diğer parametreler (yaş, cinsiyet, tümör durumu, lenf nodu tutulumu) bakımından Sasaki ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu olarak A3B ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilemedi. Yine çalışmamızla uyumlu olarak Leonard ve ark. yüksek A3B ekspresyonunun ileri evre over tümörleriyle korelasyonunu göstermişlerdir (176).

Diğer bazı kanser türlerinde ise artmış A3B ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Walker ve ark. 463 multiple myelom hastasının örneklerinden tüm ekzom dizileme yapmış ve APOBEC'lere bağlı mutasyon imzalarının multiple myelomda kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (198). Başka bir yakın zamanlı çalışmada A3B mRNA ekspresyonu ile 1,491 meme kanseri vakasının hastalıksız, metastazsız ve genel sağ kalım süreleriyle arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve östrojen reseptörü pozitif meme kanserlerinde artmış A3B ekspresyonun kötü prognozla ilişkili olduğunu bulmuşlardır (199). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında A3B'nin kanser progresyonuna da katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Kanser hücrelerinin sağ kalımını, çoğalmasını ve yayılmasını sağlayan kazanılmış fonksiyonel yetenekleri bulunmaktadır. Bu yetenekler kanserlerin *"yetki verici karakteristikleri"* (*enabling characteristics*) olarak değerlendirilmektedir. Genom instabilitesi ve mutasyonlar ile tümörü destekleyen inflamasyon bu gruba girmektedir (93). A3B ise klasik tümör baskılayıcı gen ve onkogenler gibi davranmamaktadır; çünkü A3B kanser hücresinde genetik çeşitliliği sağlamaktadır böylece tümörün adaptif yeteneklerini artırmaktadır (200). A3B'yi diğer aile üyelerinden ayıran önemli bir özelliği ise belirgin olarak hücre çekirdeğinde lokalize olmasıdır (14, 148).

A3B'nin çeşitli mekanizmalarla DNA'da mutasyonlara yol açtığı gösterilmiştir. A3B tek iplikli DNA'da katalizör olarak suyun kullanıldığı bir süreçle sitozini urasile deamine eder (143). Bunu yaparken 5' tarafında timin olan sitozinleri (5'-T<u>C</u>) tercih ederler (10, 201). Urasil DNA için mutasyona yatkınlık oluşturur; çünkü DNA polimerazlar urasili timin gibi okuyarak karşısına iki hidrojen bağıyla adenin eklerler. Bu C→T mutasyon oluşum mekanizmalarından bir tanesidir. Normalde urasil-DNA glikozilaz (UDG) buradaki urasil bazını kaldırır ve apirimidinik bölge oluşur. Daha sonra apirimidinik endonükleazlar bu bölgeyi tanırlar ve bir çentik oluştururlar. Ekzonükleaz enzimi fosfat ve şekeri ayırır. Oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulur ve ligaz ile fosfodiester bağlantı sağlanır (202). Bu baz ekzisyon tamir süreci translezyon sentez polimerazları tarafından kesintiye uğrayabilir. Bu polimerazlar genellikle abazik (apirimidinik ya da apürinik) bölgenin karşısına adenin bazı (A-kuralı) eklerler. Böylece abazik bölgeye timin bazı gelir (C→T mutasyonu oluşur). REV1 DNA tamir proteini ise abazik bölgenin karşısına sitozin ekler. Bu durumda ise C→G mutasyonları oluşur (203). Eğer deaminasyon birbirine yakın karşılıklı iki zincirde de

gerçekleşirse, DNA'da çift zincir kırıkları oluşabilir (10). A3A ve A3B birkaç kilobaz büyüklüğündeki bölgelerde mutasyonların kümelendiği durumlara yol açabilirler. Bunlara mutasyon yağmurları (kataegis) adı verilmektedir ve bu bölgeler çift zincir kırıklarını tetiklemektedirler (10, 204).

APOBEC ailesinin ilk tanımlanan üyesi olan A1 (144), diğer birçok aile üyesi gibi DNA'da sitozin deaminasyonu yapabilmektedir (9). Daha önce belirttiğimiz gibi transgenik farelerde A1'in aşırı ekspresyonunun karaciğer ve kolon tümörlerinin indüklediği gösterilmiştir (159). Ancak günümüze kadar yeni yayınlanan bir çalışma dışında A1'in insanlarda kanserle ilişkisi net olarak ortaya konulamamıştır. Bu yeni çalışmada ise A1'in özofagus adenokarsinomlarında mRNA ekspresyonunun arttığı, somatik mutasyonları tetiklediği ve bu mutasyonların özofagus adenokarsinomlarında gözlenen mutasyon imzaları ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (205). Çalışmamızda ise A1 mRNA ekspresyon seviyelerinde akciğer adenokarsinomu tümör dokularında komşu normal akciğer dokularına göre anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Fakat tümör dokularında A1 mRNA ekspresyon seviyelerinin ileri evrelerde (Evre III-IV) erken evrelere (Evre I-II) göre ve lenf nodu tutulumu olan olgularda lenf nodu tutulumu olmayanlara göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Bu durum A1'in akciğer adenokarsinomlarında tümör başlangıcından ziyade, tümörün progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

A2 ve A4 dışındaki tüm APOBEC ailesi üyelerinin birçok farklı çalışmada sitozin deaminaz aktivitesi gösterilmiştir (195). Ancak Okuyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada A2 ekspresyonu artırılan 20 transgenik farenin 7'sinde akciğer tümörü gelişmiştir (163). Çalışmamızda A2 geninin tümör ve normal dokuların çoğunda ekspresyonu gözlenmedi. Elimizdeki verilerle A2'nin akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisine katkısının olmadığı düşünüldü.

A3A aşırı ekspresyonunun A3B'ye benzer şekilde mutasyon sıklığını artırarak ve çift zincir kırıkları yaparak DNA hasarına yol açabildiği gösterilmiştir (11, 206-208). Fakat bu çalışmalarda normalde A3A eksprese etmeyen hücreler kullanılmıştır. Bunların aksine Land ve arkadaşlarının çalışmasında myeloid seri hücrelerinde (bu hücreler endojen olarak A3A eksprese ederler) interferon-α yoluyla A3A ekspresyonu endojen olarak onlarca kat artırılmış fakat genotoksik etki gözlenmemiştir. Çünkü endojen

olarak artan A3A proteini sitoplazmada sınırlı kalmıştır (209). Patolojik örneklerden yapılan çalışmalarda meme ve over kanserlerinde tümör ve normal doku arasında A3A ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (14, 176). Bizim çalışmamızda ise A3A ekspresyon düzeyi hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre anlamlı olarak azalmış tespit edildi ($p<0.05$). Klinikopatolojik özelliklerle A3A ekspresyonu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilemedi.

APOBEC ailesinin daha az bilinen üyesi A3C de DNA'da sitozin deaminasyonu yapma yeteneğine sahiptir (195). A3A, A3B ve A3C hücre çekirdeğine girip burada retrovirüslere ve retrotranspozonlara sitidin deaminasyonu ile karşı koyabilmektedirler (210, 211). A3C'nin kanserlerle belirgin bir ilişkisi henüz gösterilememiştir. Meme ve over kanserlerinde tümör dokularında normal dokulara göre A3C ekspresyonu daha az bulunmuştur (14, 176). Çalışmamızda ise eşleşmiş tümör dokuları ile normal akciğer dokuları arasında anlamlı bir A3C ekspresyon farkı izlenmedi. Yine aynı şekilde A3C ekspresyonu ile klinikopatolojik faktörler arasında anlamlı bir ilişki kurulamadı.

APOBEC'lerin immün yanıtta ve tümör oluşumunda katkıları çok araştırılsa da APOBEC ailesi genlerin regülasyonu hakkında bilgimiz kısıtlıdır. DNA metilasyonu gen ifadelerinin düzenlenmesinde ve kanserlerde önemli rol oynamaktadır (212, 213). Bu nedenle çalışmamızın diğer bir aşamasında A3B promotör ve intron 1'den seçilen CpG adalarında tümör ve normal dokularda kantitatif metilasyon analizi yapıldı. A3B intron 1'de incelenen üç adet CpG bölgesinde hem tümör (%93.0±4.64) hem de normal dokularda (%94.85±3.34) hipermetilasyon tespit edildi. Bu CpG adasının akciğer adenokarsinomlarında A3B geninin ifadesinde etkili olmadığı düşünüldü.

A3B promotör bölgesinde incelenen her bir CpG noktasında metilasyon oranları tümör ve normal dokuda karşılaştırıldı. A3B ekspresyonunun tümör dokularında artması nedeniyle yine aynı dokularda metilasyon oranlarının düşük olması beklenmekteydi. Promotörde araştırılan dört adet CpG bölgesinden sadece ikincisinde metilasyon oranları tümör dokularında (%11.60±4.20) normal dokulara göre (%13.0±4.81) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$). Her ne kadar bu metilasyon düzeyindeki düşme A3B ekspresyon düzeyindeki artma ile uyumlu bulunsa da, bunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi ($r=0.076$,

p=0.65). Daha tutarlı sonuçlar elde etmek için promotördeki tüm CpG adaları daha fazla örnekle çalışılmalıdır.

Kanserlerde A3B ekspresyonunun nasıl arttığı sorusuna henüz net bir cevap verilememektedir. Gen amplifikasyonu, translokasyonlar, promotör mutasyonu gibi ihtimaller önceki çalışmalarla elenmişlerdir (214). Yeni çalışmalar bazı kanser türlerinde A3B ifadesinin artmasında virüsleri sorumlu tutmaktadır. Baş-boyun ve serviks kanserlerinin en önemli sebeplerinden olan HPV (human papilloma virüs) enfeksiyonları ile A3B ekspresyonu arasında bağlantı kurulmuştur (215-217). Transdüksiyon deneyleri viral E6 onkoproteininin A3B ekspresyonunu tetiklemek için yeterli olduğunu göstermiştir (215). Bu çalışmalar bazı kanser türlerinde artmış A3B ekspresyonunu kısmen açıklasa da virüslerle ilişkili olmayan birçok kanser türü için yeterli değildir.

6. SONUÇLAR

Akciğer adenokarsinomlarında sitozin deaminazları olan A1, A2, A3A, A3B, A3C mRNA ekspresyonunu ve A3B DNA metilasyonunu araştırdığımız bu çalışmada; A3B ekspresyonunun tümör dokularında aynı hastaların normal akciğer dokularına göre arttığı, A3A'nın azaldığı, A1 ve A3C'nin ise değişmediği tespit edildi. Ayrıca A1 ve A3B'nin ileri evre akciğer adenokarsinomlarında erken evrelere göre ekspresyonunun arttığı gösterildi. Diğer taraftan A3B geninin promotöründe incelenen dört adet CpG bölgesinin sadece birinde tümör dokularında normal dokulara göre daha düşük metilasyon oranları gözlendi. Ancak A3B ekspresyonu ile negatif yönlü korelasyon sağlanamadı.

Bu sonuçlar belirgin olarak hücre çekirdeğinde eksprese olan ve endojen bir mutajenik ajan olarak düşünülen A3B'nin akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisinde ve tümör progresyonunda etkili olabileceğini gösterdi. Ancak bu mRNA ekspresyon çalışmasının daha anlamlı olabilmesi için protein düzeyinde çalışmalar yapılmalı; ayrıca yüksek çıktılı DNA dizileme (ekzom ya da tüm genom) yöntemleri ile aynı hastaların tümör dokularında APOBEC'lere özgü mutasyon motifleri gösterilmelidir. Bunlara ek olarak transgenik hayvan modellerinde A3B aşırı ekspresyonu sağlanarak akciğer tümörü ve diğer kanser türlerinin gelişimi araştırılmalıdır.

A3B'nin birçok normal dokuda nadiren eksprese olması ve hücreler için esansiyel olmaması nedeniyle gelecekte A3B tedavi ve kanserlerden korunmada hedef haline gelebilir. Elbette bunun gerçeğe dönüşmesi için çok sayıda ve farklı kanser türlerinde temel, klinik ve translasyonel çalışma gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer, 2015. 136(5): p. E359-86.
2. NCI. Types of Lung Cancer. [cited 2014 09.05.2014]; Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/lung/page4.
3. Greenman C, Stephens P, Smith R, et al., Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature, 2007. 446(7132): p. 153-8.
4. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al., The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science, 2006. 314(5797): p. 268-74.
5. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al., Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. Cell, 2012. 149(5): p. 979-93.
6. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al., The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science, 2011. 333(6046): p. 1157-60.
7. Parsons DW, Li M, Zhang X, et al., The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. Science, 2011. 331(6016): p. 435-9.
8. Luch A, Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. Nat Rev Cancer, 2005. 5(2): p. 113-25.
9. Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS, RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. Mol Cell, 2002. 10(5): p. 1247-53.
10. Taylor BJ, Nik-Zainal S, Wu YL, et al., DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. Elife, 2013. 2: p. e00534.
11. Suspene R, Aynaud MM, Guetard D, et al., Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(12): p. 4858-63.
12. Shinohara M, Io K, Shindo K, et al., APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. Sci Rep, 2012. 2: p. 806.
13. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al., Signatures of mutational processes in human cancer. Nature, 2013. 500(7463): p. 415-21.

14. Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, et al., APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. Nature, 2013. 494(7437): p. 366-70.
15. Institute NNC. A to Z List of Cancers. [cited 2014 11.09.2014]; Available from: http://www.cancer.gov/cancertopics/types/alphalist.
16. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2013 09.09.2014]; Available from: http://globocan.iarc.fr.
17. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. 2014 03.04.2015; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011.
18. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, et al., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(23): p. 1672-94.
19. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM, American College of Chest P, Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 29S-55S.
20. Bjartveit K, Tverdal A, Health consequences of smoking 1-4 cigarettes per day: response to G F Cope (letter to journal). Tob Control, 2006. 15(1): p. 71-2.
21. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Turner MC, et al., Lung cancer and cardiovascular disease mortality associated with ambient air pollution and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationships. Environ Health Perspect, 2011. 119(11): p. 1616-21.
22. Peto R, Darby S, Deo H, et al., Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. BMJ, 2000. 321(7257): p. 323-9.
23. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K, The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. Chem Res Toxicol, 2001. 14(7): p. 767-90.
24. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA, Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. Clin Chest Med, 2011. 32(4): p. 605-44.
25. Akopyan G, Bonavida B, Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. Int J Oncol, 2006. 29(4): p. 745-52.

26. Belinsky SA, Devereux TR, Maronpot RR, Stoner GD, Anderson MW, Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. Cancer Res, 1989. 49(19): p. 5305-11.
27. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP, Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science, 1996. 274(5286): p. 430-2.
28. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer, 2010. 127(12): p. 2893-917.
29. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF, Lung cancer in never smokers--a different disease. Nat Rev Cancer, 2007. 7(10): p. 778-90.
30. Yang P, Lung cancer in never smokers. Semin Respir Crit Care Med, 2011. 32(1): p. 10-21.
31. Erren TC, Jacobsen M, Piekarski C, Synergy between asbestos and smoking on lung cancer risks. Epidemiology, 1999. 10(4): p. 405-11.
32. Frost G, Darnton A, Harding AH, The effect of smoking on the risk of lung cancer mortality for asbestos workers in Great Britain (1971-2005). Ann Occup Hyg, 2011. 55(3): p. 239-47.
33. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al., Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. BMJ, 2005. 330(7485): p. 223.
34. Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, et al., Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. Hum Genet, 2003. 113(3): p. 238-43.
35. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al., Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. Nat Genet, 2005. 37(12): p. 1315-6.
36. Amos CI, Wu X, Broderick P, et al., Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. Nat Genet, 2008. 40(5): p. 616-22.
37. Miki D, Kubo M, Takahashi A, et al., Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. Nat Genet, 2010. 42(10): p. 893-6.

38. Wang Y, Broderick P, Webb E, et al., Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. Nat Genet, 2008. 40(12): p. 1407-9.
39. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA, Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc, 2008. 83(5): p. 584-94.
40. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE, The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. J Thorac Dis, 2013. 5 Suppl 5: p. S463-78.
41. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC, The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2010. 28(36): p. 5311-20.
42. Gabrielson E, Worldwide trends in lung cancer pathology. Respirology, 2006. 11(5): p. 533-8.
43. Hoffmann D, Hoffmann I, The changing cigarette, 1950-1995. J Toxicol Environ Health, 1997. 50(4): p. 307-64.
44. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al., The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. J Thorac Oncol, 2007. 2(8): p. 706-14.
45. Lally BE, Urbanic JJ, Blackstock AW, Miller AA, Perry MC, Small cell lung cancer: have we made any progress over the last 25 years? Oncologist, 2007. 12(9): p. 1096-104.
46. Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest P, Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 149S-160S.
47. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, et al., Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 234S-242S.
48. Uramoto H, Tanaka F, Recurrence after surgery in patients with NSCLC. Transl Lung Cancer Res, 2014. 3(4): p. 242-9.
49. Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Jr., Stevens CW, American College of Chest P, Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-

based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 243S-265S.

50. Jett JR, Schild SE, Keith RL, Kesler KA, American College of Chest P, Treatment of non-small cell lung cancer, stage IIIB: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 266S-276S.
51. Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, et al., Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 277S-289S.
52. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative G, Chemotherapy for non-small cell lung cancer. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD002139.
53. Spiro SG, Rudd RM, Souhami RL, et al., Chemotherapy versus supportive care in advanced non-small cell lung cancer: improved survival without detriment to quality of life. Thorax, 2004. 59(10): p. 828-36.
54. Clegg A, Scott DA, Hewitson P, Sidhu M, Waugh N, Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. Thorax, 2002. 57(1): p. 20-8.
55. Pao W, Girard N, New driver mutations in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol, 2011. 12(2): p. 175-80.
56. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al., Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2010. 363(18): p. 1693-703.
57. Roberts PJ, Clinical use of crizotinib for the treatment of non-small cell lung cancer. Biologics, 2013. 7: p. 91-101.
58. Cooper WA, O'Toole S, Boyer M, Horvath L, Mahar A, What's new in non-small cell lung cancer for pathologists: the importance of accurate subtyping, EGFR mutations and ALK rearrangements. Pathology, 2011. 43(2): p. 103-15.
59. Sawa Y, Kato T, Masuda T, Hori M, Fujimura H, Studies on the syntheses of analgesics. VI. Synthesis of 1,2,3,4,5,6-hexahydro-1,5-methano-3-benzazocine derivatives. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1975. 23(9): p. 1932-7.
60. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al., International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol, 2011. 6(2): p. 244-85.

61. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al., American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. J Clin Oncol, 2011. 29(15): p. 2121-7.
62. Stella GM, Scabini R, Inghilleri S, et al., EGFR and KRAS mutational profiling in fresh non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. 139(8): p. 1327-35.
63. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA, Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2007. 25(5): p. 587-95.
64. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 2004. 350(21): p. 2129-39.
65. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al., Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med, 2005. 2(3): p. e73.
66. Kerr KM, Clinical relevance of the new IASLC/ERS/ATS adenocarcinoma classification. J Clin Pathol, 2013. 66(10): p. 832-8.
67. Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA, Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? J Clin Oncol, 2010. 28(31): p. 4769-77.
68. Boveri T, Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena, 1914.
69. Boveri M, The Origin of Malignant Tumors. Williams and Wilkins, Baltimore, 1929.
70. Balmain A, Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. Nat Rev Cancer, 2001. 1(1): p. 77-82.
71. Tyzzer EE, Tumor Immunity. J Cancer Res, 1916. 1: p. 125–156.
72. Muller HJ, Artificial Transmutation of the Gene. Science, 1927. 66(1699): p. 84-7.

73. Muller HJ, Radiation damage to the genetic material. Am Sci, 1950. 38(1): p. 33-59.
74. Avery OT, Macleod CM, McCarty M, Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. J Exp Med, 1944. 79(2): p. 137-58.
75. Watson JD, Crick FH, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 1953. 171(4356): p. 737-8.
76. Nowell PC, Citation Classic - a Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic-Leukemia. Current Contents/Life Sciences, 1985(8): p. 19-19.
77. Rowley JD, Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature, 1973. 243(5405): p. 290-3.
78. Knudson AG, Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(4): p. 820-3.
79. Knudson AG, Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat Rev Cancer, 2001. 1(2): p. 157-62.
80. Martin GS, The hunting of the Src. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(6): p. 467-75.
81. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK, DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature, 1976. 260(5547): p. 170-3.
82. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M, A Point Mutation Is Responsible for the Acquisition of Transforming Properties by the T24 Human Bladder-Carcinoma Oncogene. Nature, 1982. 300(5888): p. 149-152.
83. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, et al., Mechanism of Activation of a Human Oncogene. Nature, 1982. 300(5888): p. 143-149.
84. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al., A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature, 1986. 323(6089): p. 643-6.
85. Huang HJ, Yee JK, Shew JY, et al., Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. Science, 1988. 242(4885): p. 1563-6.

86. Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, et al., Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. Science, 1987. 236(4809): p. 1657-61.
87. Lee WH, Bookstein R, Lee EY, Studies on the human retinoblastoma susceptibility gene. J Cell Biochem, 1988. 38(3): p. 213-27.
88. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B, Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet, 1989. 83(2): p. 155-8.
89. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, et al., CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. Oncogene, 1993. 8(4): p. 1063-7.
90. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al., Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(21): p. 9700-4.
91. Sharma S, Kelly TK, Jones PA, Epigenetics in cancer. Carcinogenesis, 2010. 31(1): p. 27-36.
92. You JS, Jones PA, Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? Cancer Cell, 2012. 22(1): p. 9-20.
93. Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
94. Caldas C, Cancer sequencing unravels clonal evolution. Nat Biotechnol, 2012. 30(5): p. 408-10.
95. Nowell PC, The clonal evolution of tumor cell populations. Science, 1976. 194(4260): p. 23-8.
96. Adamson ED, Oncogenes in development. Development, 1987. 99(4): p. 449-71.
97. Weinstein IB, Joe AK, Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. Nat Clin Pract Oncol, 2006. 3(8): p. 448-57.
98. Chial H, Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. Nature Education, 2008. 1(1): p. 33.
99. Bishop JM, Molecular themes in oncogenesis. Cell, 1991. 64(2): p. 235-48.
100. Rodenhuis S, ras and human tumors. Semin Cancer Biol, 1992. 3(4): p. 241-7.

101. Minamoto T, Mai M, Ronai Z, K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review. Cancer Detect Prev, 2000. 24(1): p. 1-12.
102. Thomas RK, Baker AC, Debiasi RM, et al., High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. Nat Genet, 2007. 39(3): p. 347-51.
103. Albertson DG, Gene amplification in cancer. Trends Genet, 2006. 22(8): p. 447-55.
104. Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM, Mechanisms of oncogene activation, in Holland-Frei Cancer Medicine, D.W. Kufe, et al., Editors. 2003, BC Decker: Hamilton (ON).
105. Brison O, Gene amplification and tumor progression. Biochim Biophys Acta, 1993. 1155(1): p. 25-41.
106. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al., Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. Nature, 1983. 305(5931): p. 245-8.
107. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G, Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature, 1985. 315(6022): p. 758-61.
108. Boxer LM, Dang CV, Translocations involving c-myc and c-myc function. Oncogene, 2001. 20(40): p. 5595-610.
109. Mann G, Trebo MM, Haas OA, et al., Philadelphia chromosome-positive mature B-cell (Burkitt cell) leukaemia. Br J Haematol, 2002. 118(2): p. 559-62.
110. Knudson AG, Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 10914-21.
111. Weinberg R, Tumor suppressor genes. Neuron, 1993. 11(2): p. 191-6.
112. Weinberg RA, Tumor suppressor genes. Science, 1991. 254(5035): p. 1138-46.
113. Macleod K, Tumor suppressor genes. Curr Opin Genet Dev, 2000. 10(1): p. 81-93.
114. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF, Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 7 ed. 2007: Saunders.
115. Fearon ER, Vogelstein B, A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 1990. 61(5): p. 759-67.

116. Pierce BA, Genetics: A Conceptual Approach. 4th ed. 2010, New York: W. H. Freeman.
117. Davis RJ, The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem, 1993. 268(20): p. 14553-6.
118. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al., Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. Science, 1995. 267(5198): p. 682-5.
119. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Signal-Transduction Pathways: An Introduction to Information Metabolism, in Biochemistry. 2002, W.H.Freeman: New York.
120. Chin L, Gray JW, Translating insights from the cancer genome into clinical practice. Nature, 2008. 452(7187): p. 553-63.
121. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al., Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res, 2007. 67(6): p. 2643-8.
122. Pietras K, Ostman A, Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. Exp Cell Res, 2010. 316(8): p. 1324-31.
123. Kalluri R, Zeisberg M, Fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer, 2006. 6(5): p. 392-401.
124. Anderberg C, Li H, Fredriksson L, et al., Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. Cancer Res, 2009. 69(1): p. 369-78.
125. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al., Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature, 2007. 449(7162): p. 557-63.
126. Camps JL, Chang SM, Hsu TC, et al., Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(1): p. 75-9.
127. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, et al., Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. Cancer Res, 2012. 72(10): p. 2473-80.
128. Ledford H, Big science: The cancer genome challenge. Nature, 2010. 464(7291): p. 972-4.
129. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA, The cancer genome. Nature, 2009. 458(7239): p. 719-24.

130. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al., The life history of 21 breast cancers. Cell, 2012. 149(5): p. 994-1007.
131. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S, Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. Nat Rev Genet, 2014. 15(9): p. 585-98.
132. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, et al., Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene, 2002. 21(48): p. 7435-51.
133. de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH, UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. J Photochem Photobiol B, 2001. 63(1-3): p. 19-27.
134. Pfeifer GP, Besaratinia A, UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. Photochem Photobiol Sci, 2012. 11(1): p. 90-7.
135. Grada A, Weinbrecht K, Next-generation sequencing: methodology and application. J Invest Dermatol, 2013. 133(8): p. e11.
136. Jia P, Zhao Z, VarWalker: personalized mutation network analysis of putative cancer genes from next-generation sequencing data. PLoS Comput Biol, 2014. 10(2): p. e1003460.
137. Conticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS, Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. Mol Biol Evol, 2005. 22(2): p. 367-77.
138. Conticello SG, The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. Genome Biol, 2008. 9(6): p. 229.
139. Teng B, Burant CF, Davidson NO, Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. Science, 1993. 260(5115): p. 1816-9.
140. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, et al., A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell, 1987. 50(6): p. 831-40.
141. Harris RS, Liddament MT, Retroviral restriction by APOBEC proteins. Nat Rev Immunol, 2004. 4(11): p. 868-77.
142. Bransteitter R, Prochnow C, Chen XS, The current structural and functional understanding of APOBEC deaminases. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(19): p. 3137-47.

143. Samaranayake M, Bujnicki JM, Carpenter M, Bhagwat AS, Evaluation of molecular models for the affinity maturation of antibodies: roles of cytosine deamination by AID and DNA repair. Chem Rev, 2006. 106(2): p. 700-19.
144. Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM, Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. Semin Cell Dev Biol, 2012. 23(3): p. 258-68.
145. Di Noia JM, Neuberger MS, Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annu Rev Biochem, 2007. 76: p. 1-22.
146. Malim MH, APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. 364(1517): p. 675-87.
147. Burns MB, Temiz NA, Harris RS, Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. Nat Genet, 2013. 45(9): p. 977-83.
148. Lackey L, Demorest ZL, Land AM, et al., APOBEC3B and AID have similar nuclear import mechanisms. J Mol Biol, 2012. 419(5): p. 301-14.
149. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, et al., Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. J Biol Chem, 1999. 274(26): p. 18470-6.
150. Revy P, Muto T, Levy Y, et al., Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell, 2000. 102(5): p. 565-75.
151. Okazaki IM, Kotani A, Honjo T, Role of AID in tumorigenesis. Adv Immunol, 2007. 94: p. 245-73.
152. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., The Generation of Antibody Diversity, in Molecular Biology of the Cell. 2002, Garland Science: New York.
153. Delker RK, Fugmann SD, Papavasiliou FN, A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. Nat Immunol, 2009. 10(11): p. 1147-53.
154. Pavri R, Nussenzweig MC, AID targeting in antibody diversity. Adv Immunol, 2011. 110: p. 1-26.
155. Arakawa H, Saribasak H, Buerstedde JM, Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. PLoS Biol, 2004. 2(7): p. E179.

156. Lo CM, Nordskog BK, Nauli AM, et al., Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. 294(1): p. G344-52.
157. Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC, The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. Nucleic Acids Res, 1996. 24(3): p. 478-85.
158. Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS, In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1). J Biol Chem, 2003. 278(22): p. 19583-6.
159. Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, et al., Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(18): p. 8483-7.
160. Blanc V, Henderson JO, Newberry RD, et al., Deletion of the AU-rich RNA binding protein Apobec-1 reduces intestinal tumor burden in Apc(min) mice. Cancer Res, 2007. 67(18): p. 8565-73.
161. Liao W, Hong SH, Chan BH, et al., APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 260(2): p. 398-404.
162. Mikl MC, Watt IN, Lu M, et al., Mice deficient in APOBEC2 and APOBEC3. Mol Cell Biol, 2005. 25(16): p. 7270-7.
163. Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, et al., Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. Int J Cancer, 2012. 130(6): p. 1294-301.
164. Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC, Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. Trends Genet, 2003. 19(4): p. 207-16.
165. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH, Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature, 2002. 418(6898): p. 646-50.
166. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, et al., DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. Cell, 2003. 113(6): p. 803-9.

167. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ, Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. Science, 2003. 300(5622): p. 1112.
168. Hultquist JF, Lengyel JA, Refsland EW, et al., Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. J Virol, 2011. 85(21): p. 11220-34.
169. Zielonka J, Bravo IG, Marino D, et al., Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. J Virol, 2009. 83(15): p. 7547-59.
170. Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS, APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. Curr Biol, 2004. 14(15): p. 1385-91.
171. Bonvin M, Achermann F, Greeve I, et al., Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. Hepatology, 2006. 43(6): p. 1364-74.
172. Schumann GG, APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 3): p. 637-42.
173. Roberts SA, Sterling J, Thompson C, et al., Clustered mutations in yeast and in human cancers can arise from damaged long single-strand DNA regions. Mol Cell, 2012. 46(4): p. 424-35.
174. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, et al., Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. Curr Biol, 2004. 14(15): p. 1392-6.
175. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, et al., An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. Nat Genet, 2013. 45(9): p. 970-6.
176. Leonard B, Hart SN, Burns MB, et al., APOBEC3B upregulation and genomic mutation patterns in serous ovarian carcinoma. Cancer Res, 2013. 73(24): p. 7222-31.
177. Rogozin IB, Basu MK, Jordan IK, Pavlov YI, Koonin EV, APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. Cell Cycle, 2005. 4(9): p. 1281-5.

178. Conticello SG, Langlois MA, Yang Z, Neuberger MS, DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. Adv Immunol, 2007. 94: p. 37-73.
179. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, Real time quantitative PCR. Genome Res, 1996. 6(10): p. 986-94.
180. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al., The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med, 2006. 27(2-3): p. 95-125.
181. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): p. 7276-80.
182. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr., Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics, 2006. 7: p. 85.
183. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al., A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): p. 1827-31.
184. Ronaghi M, Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Res, 2001. 11(1): p. 3-11.
185. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al., Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. J Mol Diagn, 2005. 7(3): p. 413-21.
186. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H, DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. Mutat Res, 2002. 511(2): p. 145-78.
187. Hecht SS, Lung carcinogenesis by tobacco smoke. Int J Cancer, 2012. 131(12): p. 2724-32.
188. Cleaver JE, Crowley E, UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. Front Biosci, 2002. 7: p. d1024-43.
189. Barnes DE, Lindahl T, Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. Annu Rev Genet, 2004. 38: p. 445-76.
190. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS, AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. Nature, 2002. 418(6893): p. 99-103.

191. Okazaki IM, Hiai H, Kakazu N, et al., Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. J Exp Med, 2003. 197(9): p. 1173-81.
192. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, et al., Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Nat Med, 2007. 13(4): p. 470-6.
193. Schumacher AJ, Nissley DV, Harris RS, APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(28): p. 9854-9.
194. Bacolla A, Cooper DN, Vasquez KM, Mechanisms of base substitution mutagenesis in cancer genomes. Genes (Basel), 2014. 5(1): p. 108-46.
195. Refsland EW, Harris RS, The APOBEC3 family of retroelement restriction factors. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. 371: p. 1-27.
196. Jin Z, Han YX, Han XR, The role of APOBEC3B in chondrosarcoma. Oncol Rep, 2014. 32(5): p. 1867-72.
197. Sasaki H, Suzuki A, Tatematsu T, et al., gene overexpression in non-small-cell lung cancer. Biomed Rep, 2014. 2(3): p. 392-395.
198. Walker BA, Wardell CP, Murison A, et al., APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. Nat Commun, 2015. 6: p. 6997.
199. Sieuwerts AM, Willis S, Burns MB, et al., Elevated APOBEC3B correlates with poor outcomes for estrogen-receptor-positive breast cancers. Horm Cancer, 2014. 5(6): p. 405-13.
200. Harris RS, Molecular mechanism and clinical impact of APOBEC3B-catalyzed mutagenesis in breast cancer. Breast Cancer Res, 2015. 17: p. 8.
201. Kohli RM, Maul RW, Guminski AF, et al., Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. J Biol Chem, 2010. 285(52): p. 40956-64.
202. Krokan HE, Bjoras M, Base excision repair. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. 5(4): p. a012583.
203. Krokan HE, Saetrom P, Aas PA, et al., Error-free versus mutagenic processing of genomic uracil--relevance to cancer. DNA Repair (Amst), 2014. 19: p. 38-47.
204. Lada AG, Dhar A, Boissy RJ, et al., AID/APOBEC cytosine deaminase induces genome-wide kataegis. Biol Direct, 2012. 7: p. 47; discussion 47.

205. Saraconi G, Severi F, Sala C, Mattiuz G, Conticello SG, The RNA editing enzyme APOBEC1 induces somatic mutations and a compatible mutational signature is present in esophageal adenocarcinomas. Genome Biol, 2014. 15(7): p. 417.
206. Landry S, Narvaiza I, Linfesty DC, Weitzman MD, APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. EMBO Rep, 2011. 12(5): p. 444-50.
207. Aynaud MM, Suspene R, Vidalain PO, et al., Human Tribbles 3 protects nuclear DNA from cytidine deamination by APOBEC3A. J Biol Chem, 2012. 287(46): p. 39182-92.
208. Mussil B, Suspene R, Aynaud MM, et al., Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death. PLoS One, 2013. 8(8): p. e73641.
209. Land AM, Law EK, Carpenter MA, et al., Endogenous APOBEC3A DNA cytosine deaminase is cytoplasmic and nongenotoxic. J Biol Chem, 2013. 288(24): p. 17253-60.
210. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, et al., All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. Nucleic Acids Res, 2007. 35(9): p. 2955-64.
211. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS, APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. Nat Struct Mol Biol, 2010. 17(2): p. 222-9.
212. Jones PA, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet, 2012. 13(7): p. 484-92.
213. Baylin SB, DNA methylation and gene silencing in cancer. Nat Clin Pract Oncol, 2005. 2 Suppl 1: p. S4-11.
214. Burns MB, Leonard B, Harris RS, APOBEC3B: pathological consequences of an innate immune DNA mutator. Biomed J, 2015. 38(2): p. 102-10.
215. Vieira VC, Leonard B, White EA, et al., Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. MBio, 2014. 5(6).
216. Ohba K, Ichiyama K, Yajima M, et al., In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. PLoS One, 2014. 9(5): p. e97787.

217. Henderson S, Chakravarthy A, Su X, Boshoff C, Fenton TR, APOBEC-mediated cytosine deamination links PIK3CA helical domain mutations to human papillomavirus-driven tumor development. Cell Rep, 2014. 7(6): p. 1833-41.

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Muhammet Ensar DOĞAN'a ait **"Akciğer Adenokarsinomlarının Etiyolojisinde Apobec Gen Ailesinin Rolünün Araştırılması"** adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 23/07/2015

JÜRİ		**İmza**
Başkan	: Prof. Dr. Munis DÜNDAR (Danışman)	.....
Üye	: Prof. Dr. İlhan SEZGİN	.....
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL	.....