



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE
RAS P21 PROTEİN AKTİVATÖR 2 (RASA2)
GENİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Havva Nur ERYILMAZ**

**Danışman
Prof. Dr. Çetin SAATÇI**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE
RAS P21 PROTEİN AKTİVATÖR 2 (RASA2)
GENİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Havva Nur ERYILMAZ**

**Danışman
Prof. Dr. Çetin SAATÇI**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2016-6733 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Havva Nur ERYILMAZ

İmza:.....

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Akciğer Tümörlerinde RAS P21 Protein Aktivatör 2 (RASA2) Geninin Rolünün Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Havva Nur ERYILMAZ

Danışman

Prof. Dr. Çetin SAATÇI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Munis DÜNDAR

KABUL ONAY

Porf. Dr. Çetin SAATÇİ danışmanlığında **Havva Nur ERYILMAZ** tarafından hazırlanan “**Akciğer Tümörlerinde RAS P21 Protein Aktivatör 2 (RASA2) Geninin Rolünün Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

03/08/2017

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Çetin SAATÇİ (ERÜ, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı).....

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (ERÜ, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı).....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hande KÜÇÜK KURTULGAN (Cumhuriyet Üni. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında yol gösteren ve büyük emekleri olan değerli hocam Prof. Dr. Çetin Saatçi'ye,

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Munis Dünder'a ve Prof. Dr. Yusuf Özkul'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Yagut Akbarova, Uzm. Dr. Muhammet E. Doğan, Dr. Ruslan Bayramova ve Uzm. Biyolog Keziban Bayromova'ya,

Laboratuvar tekniklerini öğreten, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan benimle üzümlü benimle gülen Uzm. Biyolog Yasin Ada'ya,

Hayatım boyunca yanımda olan beni koşulsuz ve şartsız destekleyen, bugünlere gelmemde karşılığını ödeyemeyeceğim emekleri olan, bana doğruluğu, dürüstlüğü öğreten anneme ve babama,

Bana her zaman destek olan, yanında güven ve huzur bulduğum en kötü anlarımda beni mutlu eden sevgili kardeşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Havva Nur ERYILMAZ

Kayseri, Ağustos 2017

AKCİĞER TÜMÖRLERİNDE RAS P21 PROTEİN AKTİVATÖR 2 (RASA2) GENİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Havva Nur ERYILMAZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2017

Danışman: Prof. Dr. Çetin SAATÇI

ÖZET

Dünya genelinde insan hayatını tehdit eden en önemli sebeplerden biri kanserdir. Kanser çeşitli faktörlerin genetik materyal üzerinde yaptığı değişiklik sonucu hücrenin proliferasyon ve diferansiyasyon kontrolünün kaybolduğu klonal bir hastalıktır. Dünya genelinde erkeklerde ölüme en çok sebep olan akciğer kanseridir ve kadınlarda da 3. sırada yer almaktadır. Akciğer kanserleri içinde adenokarsinomlar son yıllarda en çok görülen histolojik alt tiptir.

Genellikle kanser, hücre çoğalmasını kontrol altında tutan tümör süpressör genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Yine aynı şekilde insan tümörlerinin %30'unda Ras / Raf / MEK / ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur.

Rand Arafeh ve arkadaşları tarafından melonoma kanseri ile yapılan araştırmada RASA2'nin melonoma için tümör supresör gen olduğu bildirilmiştir. RASA2'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının RAS aktivasyonunu etkilediği ve melonoma hücresinin büyümesini ve göçünü arttırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda yapılan başka araştırmalarda Ras genlerinin mutasyona uğramış alelleri akciğer, kolon ve mesane kanseri hücre hatlarında tespit edilmiştir.

RASA2 tarafından kodlanan protein GTPaz aktive edici bir proteindir ve RASA2'de meydana gelen mutasyonlar RAS aktivasyonunu etkilemektedir. RASA2'nin akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisine katkısını anlamak için 36 hastanın tümör ve komşu normal dokuları mRNA ekspresyonu revers transkripsiyon - kantitatif polimeraz zincir

reaksiyonu (RT-qPZR) yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca *RASA2*'deki ekspresyon farklılığını anlamak için ekspresyon çalışması sonucundaki verilerin delta delta Ct'leri hesaplanarak kalibrasyona göre en fazla artış ve azalış gösteren 5'er örneğin hem tümörlü hemde normal dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Sanger sekans yöntemi ile *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12 ve 15. ekzonları dizilenerek normal ve tümörlü dokudaki baz değişimleri incelendi.

Çalışmaya dahil olan 36 olgunun yaş ortalaması 60.89 ± 8.815 idi. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı; erkek 26 (%72.22), kadın 10 (%27.78) şeklindeydi. Hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı ($p > 0.05$). Olguların tümör dokularındaki *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki ilişkiyi incelemek için pearson korelasyon analizi yapıldı. Negatif korelasyon gösterdiği için anlamlı derecede tümör boyutu büyüdükçe *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyonu azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Normal ve tümörlü dokularda incelediğimiz ekzonlarda değişim bulunamadı. Fakat intron kısımlarında iki farklı değişim (c.1484-64T>A, c.864-98A>G) tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *RASA2*, Akciğer, Ras, Tümör

INVESTIGATION OF ROLE OF RAS P21 ACTIVATOR (*RASA2*) GENE IN LUNG TUMOURS

Havva Nur ERYILMAZ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Medical Genetics

M.Sc. Thesis, August 2017

Supervisor: Prof. Dr. Cetin SAATCI

ABSTRACT

One of the leading factors threatening human life is cancer. Cancer is a clonal disease in which the loss of cellular proliferation and differentiation control occurred due to the various factors affecting genetic material. It is the lung cancer that is the most common cause of death in men all over the world and it is in the 3rd place between women. Among lung cancers, adenocarcinomas are the most common histologic subtype observed in recent years. Generally, cancer is the result of mutations in tumour suppressor genes that control cell proliferation. Likewise, 30% of human tumours have overactivation of Ras / Raf / MEK / ERK pathway. This rate is consistent with the frequency of RAS mutations in tumours.

In a study conducted by Rand Arafah et al. *RASA2* was reported to be a tumour suppressor gene for melanoma. It has been found that the loss of function mutations in *RASA2* affect RAS activation and increase melanoma cell growth and migration. In other conducted studies, mutated alleles of Ras genes were detected in the lung, colon and bladder cancer cell lines. The protein encoded by *RASA2* is a GTPase activating protein and mutations in *RASA2* affect RAS activation.

In order to investigate the contribution of *RASA2* to the aetiology of lung adenocarcinomas, the expression of *RASA2* gene were compared with mRNA expression reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method in tumour and adjacent normal tissues from 36 patients. In addition, to understand the expression difference in *RASA2*, the delta delta Ct of the data of the expression result was calculated and DNA isolation was performed from both tumour and normal tissues of five

samples showing the maximum increase and five samples showing maximum decrease of expression in comparison with calibrator. Normal and tumorous tissues were examined by sequencing 2., 10., 11., 12. and 15. exons of *RASA2* gene by Sanger sequence method.

The mean age of the 36 cases included in the study was 60.89 ± 8.815 . Distribution of patients according to gender; 26 (72.22%) were male and 10 (27.78%) were female. There was no statistically significant difference in expression of *RASA2* between tumour tissue and normal lung tissues ($p>0,05$). Pearson's correlation analysis was performed to examine the relationship between *RASA2* / β -*Actin* mRNA expression levels in tumour tissues and tumour status / size (T factor in TNM stage) variables. Statistically significant negative correlation was obtained between *RASA2* / β -*Actin* mRNA expression and tumour size ($p<0.05$), with decreasing expression, increase in tumour size was observed. No changes were found in the examined exons neither in normal nor in tumorous tissues. However, two different changes in the intronic regions (c.1484-64T>A, c.864-98A>G) were detected.

Keywords: *RASA2*, Lung, Ras, Tumour

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
TABLO LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KANSER.....	4
2.2. AKCİĞER KANSERİ.....	5
2.2.1. Epidemiyolojisi	5
2.2.2. Etiyolojisi	7
2.2.3. Sınıflandırma ve Evreleme.....	9
2.2.4. Akciğer Adenokarsinomları	11
2.3. AKCİĞER KANSERİNDE ROL OYNAYAN GENLER	12
2.3.1. <i>ALK</i> Mutasyonları	12
2.3.2. <i>BRAF</i> Mutasyonları.....	12
2.3.3. <i>EGFR</i> Mutasyonları	12
2.3.4. <i>HER2 (ERB2)</i> Mutasyonları.....	13

2.3.5. <i>K-RAS</i> Mutasyonları	13
2.3.6. <i>MET</i> Mutasyonları	14
2.3.7. <i>RET</i> Mutasyonları	14
2.3.8. <i>ROS1</i> Mutasyonları	14
2.4. KANSER GENETİĞİ	15
2.4.1. Kanser Genetiğinin Tarihsel Gelişimi.....	15
2.4.2. Kanserın Temel Özellikleri	16
2.4.2.1. Proliferatif Sinyali Sürdürme.....	17
2.4.2.2. Büyüme Supressörlerinden Kaçınma.....	18
2.4.2.3. Sınırsız Bölünme Yeteneği Kazanma.....	18
2.4.2.4. Hücre Ölümüne Direnç.....	19
2.4.2.5. Anjiyogenezisin Uyarılması.....	19
2.4.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz.....	20
2.4.2.7. Kanserın Diğer Ayırıcı Özellikleri.....	21
2.4.2.7.1. Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi.....	22
2.4.2.7.2. İmmün Yanıttan Kaçınma.....	22
2.4.2.7.3. Genom İnstabilitesi ve Mutasyonlar.....	22
2.4.2.7.4. Tümör Gelişimini Teşvik Eden İnflamasyonlar.....	23
2.5. TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN ve ONKOGENLER	24
2.6. RAS GEN AİLESİ ve TARİHİ.....	26
2.6.1. RAS'ın Moleküler Mekanizması	27
2.6.2. Ras / Raf / MEK / ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser.....	29
2.6.3. RAS Efektörleri.....	31
2.6.3.1. RAF1	31
2.6.3.2. PI-3 Kinaz	31
2.6.3.3. RalGDS	31
2.6.3.4. TIAM-1	31

2.6.3.5. AF-6, RIN1 ve RASSF.....	32
2.6.3.6. RASSF	32
2.7. RASA2 GENİ ve KANSERLE İLİŞKİSİ	32
3. GEREÇ 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 İle Fikse Parafine Gömülü Dokulardan RNA İzolasyonu ve Ekspresyon Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler.....	37
3.2.3. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Dokulardan DNA İzolasyon ve Dizi Analiz Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler.....	38
3.3. YÖNTEMLER	38
3.3.1. Ekspresyon Çalışması	38
3.3.1.1. Real-Time PZR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu / Kantitatif PZR).....	38
3.3.1.2. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Doku Kesitlerinden RNA İzolasyonu.....	41
3.3.1.2.1. Deparafinizasyon İşlemi.....	41
3.3.1.2.2. RNA İzolasyon İşlemi.....	41
3.3.1.3. cDNA Sentez İşlemi.....	42
3.3.1.4. Preamplifikasyon İşlemi.....	43
3.3.1.5. Real-Time PZR	44
3.3.2. Sanger Sekans Çalışması	45
3.3.2.1. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Doku Kesitlerinden gDNA İzolasyonu.....	46
3.3.2.1.1. Deparafinizasyon İşlemi.....	46
3.3.2.2. PZR İşlemi	49
3.3.2.3. PZR Pürifikasyon İşlemi.....	50

3.3.2.4. Sanger Sekans PZR İşlemi	51
3.3.2.5. Sekans Pürifikasyon İşlemi	51
3.3.2.6. Genetic Analyzer CihazınaYükleme ve Yürütme İşlemi.....	52
3.4. VERİLERİN ANALİZİ	53
3.4.1. Rölatif Kantitasyon	53
3.4.2. Sekans Analizi.....	53
3.4.3. İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR	55
4.1. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI.....	57
4.2. SANGER SEKANS ANALİZİ BULGULARI.....	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
6. KAYNAKÇA	68
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

2p	2. Kromozomun kısa(petit) kolu
ABL	Abelson Lekomia Virüs
AF-6	Afadin protein 6
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinazı
APC	Adenomatöz polipozise
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine / threonine kinase
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EML4	Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ETS	E26-transkripsiyon faktörü
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GTP	Guanosine triphosphate
HER2	Glutamyl-Trna (Gln) amidotransferase subunit HER2
HNPCC	Nonpolipozis kolon kanseri
H-Ras	Harvey virüsü Ras
IASLC / ATS / ERS	International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society
IGF	İnsülin büyüme faktörü

KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
K-ras	Kirsten Rat Sarcoma
MAP	Mitogen-activated protein kinases
MAPK	Mitogen- activated protein kinase
Mek= MAPKK	MAP kinaz kinaz
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MSH2	MutS homolog 2
MST1	Macrophage Stimulating 1
NNK	Nikotin bağımlı nitrozamin ketonu
NS	Noonan Sendromu
p53	Protein P53
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Raf= MAPKKK	MAP kinaz kinaz kinaz
RASA2	RAS P21 Protein Aktivatörü 2
RB	Retinoblastoma
RET	Ret proto-oncogene
RNA	Ribonükleik asit
ROS1	ROS Proto-Onkogen1, Reseptör Tirozin Kinaz
RSV	Rous Sarkoma Virüsü
TIAM-1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
TKİ	Tirozin kinaz inhibitörleri
TSG	Tümör süpressör gen

TSNA	Tütün spesifik N-nitrözaminler
TTF-1	Transcription Termination Factor 1

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: TNM sınıflandırılmasının yedinci versiyonuna göre T, N, M faktörleri.....	10
Tablo 2.2: Melanom için öncelikli olarak tanımlanan genlerin en az %20'sinde fonksiyon kaybı mutasyonu vardır.....	35
Tablo 3.1: cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için).....	43
Tablo 3.2: Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri.....	43
Tablo 3.3: Pre-Amp PZR reaksiyon karışımı.....	43
Tablo 3.4: Preamplifikasyon için termal döngü koşulları.....	44
Tablo 3.5: Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer dizileri.....	44
Tablo 3.6: LightCycler 480 Probes Master PZR karışımı.....	44
Tablo 3.7: Real-Time PZR thermal cycler döngüsü (LightCycler 480)	45
Tablo 3.8: Amplifikasyon ve sekans primerleri.....	49
Tablo 3.9: PZR reaksiyon karışımı.....	50
Tablo 3.10: Thermal cycler programı (GeneAmp® PZR System 9700 - Applied Biosystems).....	50
Tablo 3.11: PZR pürifikasyon termal cycler programı.....	50
Tablo 3.12: Forward primeri için sekans reaksiyonu.....	51
Tablo 3.13: Reverse primerleri için sekans reaksiyonu.....	51
Tablo 3.14: Sanger sekans PZR için termal cycler programı.....	51
Tablo 3.15: 3130 Genetic Analyzer sekans yürütme modülü.....	52
Tablo 4.1: RASA2 geni normal ve tümör doku ekspresyon karşılaştırması.....	59
Tablo 4.2: Tümör dokularındaki <i>RASA2</i> / β - <i>Actin</i> mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki Pearson korelasyon analizi.....	59
Tablo 4.3: Fazla artış ve azalış gösteren örneklerin $\Delta\Delta CT$ değerleri.....	60
Tablo 4.4: Dizilemede bulunan değişimler.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Dünya genelinde 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı.	5
Şekil 2.2: Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşā Göre Standardize Edilmiş Hızları.....	6
Şekil 2.3: Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşā Göre Standardize Edilmiş Hızları.	7
Şekil 2.4: Kanserlerin temel ve diğēr ayırıcı özellikleri.	17
Şekil 2.5: Anjiyogenez ve tümör invazyonu.	20
Şekil 2.6: Metastaz gelişim evreleri.	21
Şekil 2.7: Tümör mikroçevresi ve tümör büyümesindeki rolü.	24
Şekil 2.8: Ras ile ilgili 1969 ve 2014 yılları arasında yıllık olarak yayınlanan yayın sayısı.	27
Şekil 2. 9: Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri.	29
Şekil 2.10: MAPK ailesi ve sinyal iletimi.	30
Şekil 2.11: <i>RASA2</i> gen lokusu	32
Şekil 2.12: İlgili genlerin germline mutasyonlarını içeren RAS / MAPK kaskadı ve bozuklukları. ..	34
Şekil 2.13: İnsan <i>RASA2</i> proteininde korunmuş alanlar.	35
Şekil 3.1: Çalışma Planı.....	36
Şekil 3.2: Real-Time PZR’da hidroliz problemlerinin çalışma prensibi.	39
Şekil 3.3: Real-Time PZR’da amplifikasyon eğrisi ve fazlar.....	40
Şekil 3.4: Otomatik Dna Dizileme.....	46
Şekil 3.5: QIAamp DNA FFPE Tissue prosedürü.....	47
Şekil 4.1: Hastaların cinsiyete göre dağılımı.	55
Şekil 4.2: Hastaların evrelere göre dağılımı.	56
Şekil 4.3: Hastaların TNM evrelemesindeki T faktörüne göre dağılımları.	56
Şekil 4.4: Hastaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları.	57
Şekil 4.5: Tümör dokularında <i>β-Actin</i> geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.....	57
Şekil 4.6: Tümör dokularında <i>RASA2</i> geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.....	58
Şekil 4.7: Tümör dokularında <i>β-Actin</i> ve <i>RASA2</i> geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.	58

Şekil 4.8: Tümör dokularındaki <i>RASA2</i> / β - <i>Actin</i> mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki ilişki.	59
Şekil 4.9: Delta delta CT formülü.....	60
Şekil 4.10: c.1484-64T>A değişimi homozigot formu.....	61
Şekil 4.11: c.1484-64T>A değişimi heterozigot formu.....	61
Şekil 4.12: c.864-98A>G değişim homozigot formu.....	62

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser terimi vücudumuzda meydana gelen birçok organı etkileyebilen geniş bir grup hastalığı kapsar (2). Kanser, mikro ve makro çevredeki çeşitli faktörlerin genetik materyal üzerinde yaptığı değişiklikler sonucu hücrenin diferansiyasyon ve proliferasyon kontrolünün kaybolduğu klonal bir hastalık olup çok basamaklı bir süreç sonucunda gelişmektedir (1).

Dünya genelinde erkeklerde en sık gözlenen ve en çok ölüme neden olan kanser akciğer kanseridir. Akciğer kanseri erkeklerde tüm kanserlerin %16.7'sini oluşturmaktadır. Kadınlarda gözlenen kanser türünde ise 3. sırada gelmektedir ve kadınlarda meme kanserinden sonra en çok ölüme sebep olan kanser türüdür (3).

Histolojik olarak akciğer tümörleri küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılır. Bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i küçük hücreli dışıdır (26). KHDAK büyük hücreli, skuamoz (epidermoid) ve adenokarsinom olmak üzere üç ana histolojik gruba ayrılmaktadır (27). Adenokarsinoma çoğu ülkede akciğer kanserinin en sık görülen histolojik alt türüdür ve tüm akciğer kanserlerinin neredeyse yarısını oluşturmaktadır (30). Adenokarsinomlar sigara içmeyenlerde ve Asyalı kadınlarda daha sık görülür. Çoğunlukla periferik yolla ortaya çıkarlar ve histolojik açıdan glandüler diferansiyasyon veya müsin varlığı ile karakterizedirler (27).

Kanser genomları son derece karmaşık yapıdadır ve binlerce mutasyon içerirler. Akciğer kanserleride belirli bir gende oluşan mutasyona bağlı değildir. Şimdiye kadar *EGFR*, *BRAF*, *RET*, *MET*, *ERBB2*, *KRAS*, *ALK1*, *ROS1* genlerinde oluşan, mutasyonlar akciğer kanserlerine sebep olduğu bildirilmiştir (1). Genellikle tümör supresör genlerinde oluşan mutasyonlar kansere sebep olmaktadır. Tümör supresör genler, hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir, etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek,

gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler. Tümör süpressor genlerin (TSG) hücre üzerindeki etkileri genetik değişiklikler sonrasında ortadan kalkar. Resesif (çekinik) karakterli oldukları için her iki allelde de değişiklik (çift vuruş - two hit) olması durumunda TSG inaktive olur ve hücre üzerindeki fonksiyonu tamamen ortadan kalkar. İnaktivasyon sonrasında hücre üzerindeki kısıtlayıcı etkilerinin kaybolmasına bağlı olarak kanser gelişimi gözlenir (66).

RAS yolağı hem insan hem de deneysel olarak uyarılmış hayvan tümörlerinde en yaygın görülen onkojenik değişikliklerden biridir (51). RAS proteinleri, aktif GTP'ye bağlı ve inaktif GDP'ye bağlı formlar arasında döngü oluşturan ve hücre zarı içinde başlatılan sinyal transdüksiyonları için moleküler anahtarlar olarak işlev gören küçük G proteinlerdir (52). Ras proteinleri, kütlelerine (yaklaşık 21 kD) ve enzimatik aktivitelere bakılarak küçük GTPaz'lar olarak adlandırılmışlardır (55). GTPaz'lar; hücre çoğalmasını, hücre farklılaşmasını, hayatta kalmasını, hücre döngüsü ilerlemesi, büyüme, göç, hücre iskeleti değişiklikleri, apoptosis, yaşlanma ve gen ifadesini düzenleyen sinyal ağlarının temel bileşenleridir (52, 53).

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadırlar (74).

Rand Arafeh ve arkadaşları tarafından melonoma kanseri ile yapılan araştırmada *RASA2*'nin melonoma için tümör supresör gen olduğu bildirilmiştir. Melanom olan hastalarda *RASA2* geni ekspresyonu çalışılmış ve gen ekspresyonunun $\geq$ %30'dan fazlasının kaybolduğu görülmüştür. Ekspresyon kaybındaki artış hastaların sağ kalma oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. *RASA2*'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının RAS aktivasyonunu etkilediği ve melonoma hücrelerinin büyümesini ve göçünü arttırdığı bulunmuştur (72).

RASA2 tarafından kodlanan protein, GTPaz ile aktive edici proteinlerin GAP1 ailesinin üyesidir. Gen ürünü, normal RAS p21'in GTPaz aktivitesini uyarır, ancak onkojenik karşılığını uyarmaz. Protein, RAS işlevinin bir susturucusu olarak görev yaparak, RAS

proteinlerinin zayıf intrinsik GTPaz aktivitesini arttırır. Bu durum aktif olmayan GDP'ye bağlı RAS formuyla sonuçlanır. Bu da hücrel proliferasyon ve farklılaşmanın kontrol edilmesini sağlar (68).

Ras genlerinin mutasyona uğramış alelleri mesane, kolon ve akciğer kanseri hücre hatlarında tespit edilmiş ve Ras'ın onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları elde edilmiştir (78,79). İlk olarak akciğer kanseri örneklerinde de aktif Ras mutant alellerine rastlanması, Ras aktivasyonunun sadece hücre hatlarında in vitro oluşmadığının ilk kanıtı olmuştur (80,81).

RASA2 tarafından kodlanan protein GTPaz aktive edici bir proteindir ve *RASA2*'de meydana gelen mutasyonlar RAS aktivasyonunu etkilemektedir. *RASA2*'nin akciğer adenokarsinomlarının etiolojisine katkısını anlamak için 36 hastanın tümör ve komşu normal dokuları mRNA ekspresyonu revers transkripsiyon - kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPZR) yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca *RASA2*'deki ekspresyon farklılığını anlamak için ekspresyon çalışması sonucundaki verilerin delta delta Ct'leri hesaplanarak kalibrasyona göre en fazla artış ve azalış gösteren 5'er örneğin hem tümörlü hemde normal dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Sanger sekans yöntemi ile *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12. ve 15. ekzonları dizilenerek normal ve tümörlü dokudaki baz değişimleri incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

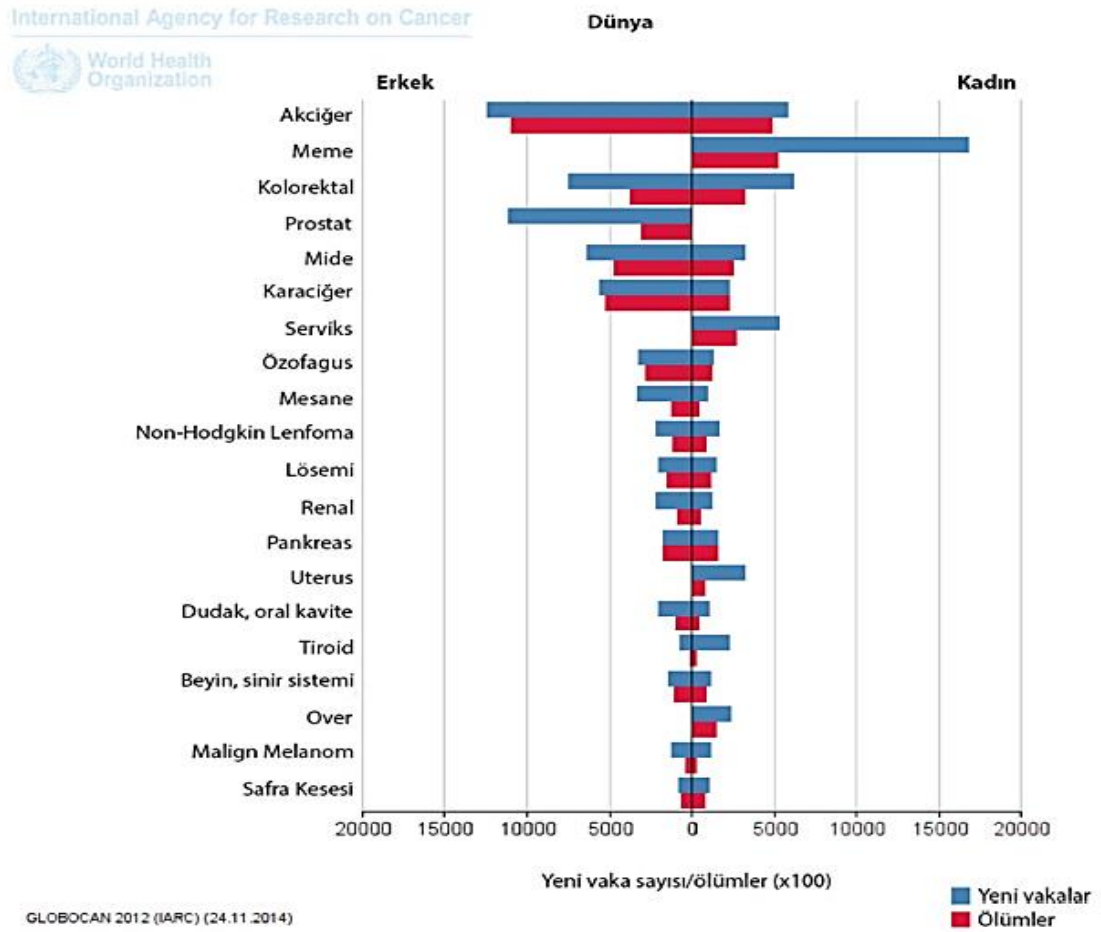
Kanser terimi vücudumuzda meydana gelen birçok organı etkileyebilen geniş bir grup hastalığı kapsar (2). Kanser, mikro ve makro çevredeki çeşitli faktörlerin genetik materyal üzerinde yaptığı değişiklikler sonucu hücrenin diferansiyasyon ve proliferasyon kontrolünün kaybolduğu klonal bir hastalık olup çok basamaklı bir süreç sonucunda gelişmektedir (1).

Karsinogenezde, hücrenin diferansiyasyon ve proliferasyonunda rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar merkezi rol oynamaktadır. Temel olarak tümör baskılayıcı genler ve onkogenler olarak sınıflandırılan bu genlerden, tümör baskılayıcı genlerin kanser oluşumunda etkili olabilmesi için her iki alelinde işlevini kaybetmiş olması gerekirken, onkogenlerde, alellerden yalnızca birinde meydana gelen mutasyon kanser oluşumunda etkilidir (1). 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır ve birçok kanser türü köken aldığı organdan ya da hücreden adını alır (2).

Dünya genelinde insan hayatını tehdit eden en önemli sebeplerden biri kanserdir. Dünya üzerinde kanser kayıtlılığı yapan toplam 184 ülke ve 28 kanser tipi için en iyi kanser tahminleri Dünya Sağlık Örgütü (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. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19.3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56.8) gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64.9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir (3, 9).

En fazla ölüme sebep olan kanser türleri ise şunlardır (GLOBOCAN 2012) (Şekil 2.1)(3).

- 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 2.1:Dünya genelinde 2012 yılında kanser türlerine göre yeni vaka ve ölüm insidansı (4).

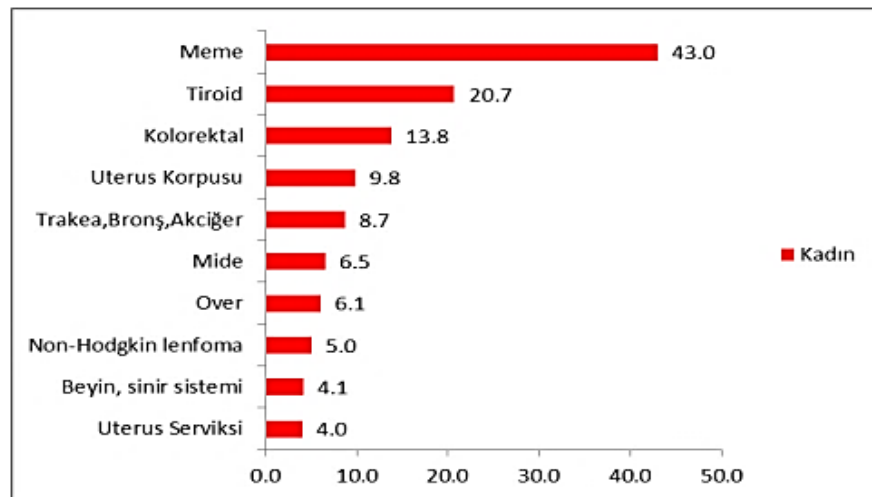
2.2. AKCİĞER KANSERİ

2.2.1. Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlangıcında nadir görülen bir hastalık iken, 1950 yılından itibaren sıklığı belirgin olarak artmıştır (5). Bu artışta risk faktörlerinin yanı sıra, hem epidemiyolojik verilerin elde edilebilirliğinin artması, hem de ortalama yaşam süresinin artmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Kadınlarda akciğer kanseri insidansı 1960

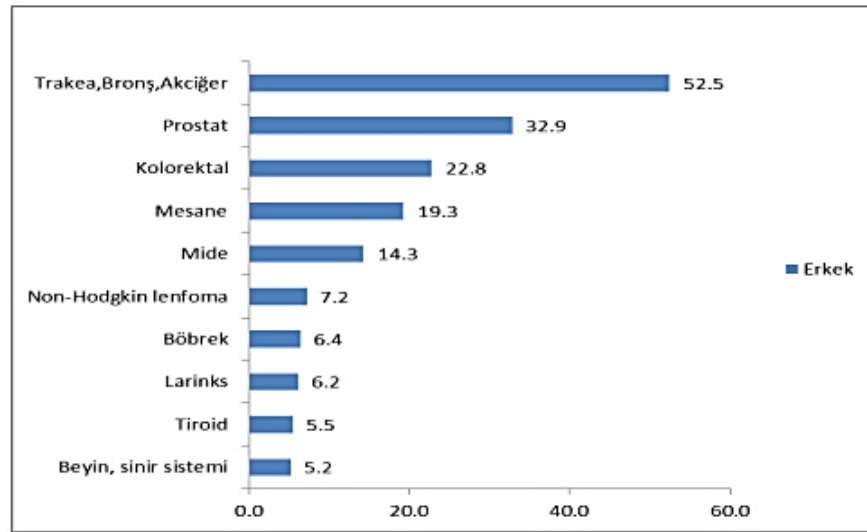
yılında 6/100000 iken, 1990 yılında bu oran $>40/100000$ olarak bildirilmiştir (6). 2000 yılında, dünyada tanı konulan akciğer kanserli olgu sayısının 1.2 milyon olduğu ve akciğer kanserli olguların tüm kanserli olguların % 12.3'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir (7). 2012 yılında 1.8 milyon yeni akciğer kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakam toplam kanser vakasının %12.9'unu oluşturmaktadır. Dünya genelinde erkeklerde en sık gözlenen ve en çok ölüme neden olan kanser akciğer kanseridir. Akciğer kanseri erkeklerde tüm kanserlerin %16.7'sini oluşturmaktadır. Kadınlarda gözlenen kanser türünde ise 3. sırada gelmektedir ve kadınlarda meme kanserinden sonra en çok ölüme sebep olan kanser türüdür (3).

Akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli bir sağlık problemidir. Ülkemizde akciğer kanseri erkeklerde (Şekil 2.2) en çok görülen kanser türü olurken kadınlarda (Şekil 2.3) ise 5. sırayı almaktadır.



Şekil 2.2: Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014)(Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

2017 ABD kanser istatistiklerinin yaptığı araştırmaya göre 2017 yılında ABD de teşhis edilecek yeni kanser sayısının 1.688.780 olacağını ve bunun günde 4600'den fazla yeni kanser teşhisine neden olacağı tahmin edilmektedir. Ülkemiz için yeni kanser sayısı ise 160 bin civarındadır (8,44).



Şekil 2.3: Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014)(Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

2.2.2. Etiyolojisi

Akciğer kanseri oluşumunda en önemli etken sigara içimidir. Günlük içilen sigara ve sigara içilen yıl ile kanser riski doğru orantılı şekilde artmaktadır (10,11). Akciğer kanseri riski hiç sigara içmeyenlere (hayat boyunca 100 adetten daha az sigara içimi olarak tanımlanır) göre, günde 1-4 adet sigara içen kişilerde 5 kat, 8-12 adet sigara içenlerde 12 kat, 25 adet ve üzeri sigara içenlerde en az 24 kat, 42 adet ve üzeri sigara içenlerde ise 39 kat artmıştır (12). 2017 yılı ABD kanser istatistiklerine bakıldığında akciğer kanseri sıklığındaki düşüş erkeklerde, kadınlarda olduğunun neredeyse iki katıdır. Bunun nedeni kadınların günümüze daha yakın yıllarda yoğun bir şekilde sigara içmeye başlaması ve sigarayı daha yavaş bırakma eğilimleri olabilir (8).

Sigara dumanında 4.000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır ve bunlardan en az 60 tanesi kanserojen etki göstermektedir (13). Bunlar içinde en güçlü kanserojenler polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-nitrozaminler ve aromatik aminlerdir (17).

Akciğer kanseriyle asıl ilişkili ajanlar tütün işlenmesi ve içimi sırasında oluşan tütün spesifik N-nitrozaminlerdir (TSNA). Hayvan modellerinde adenokarsinomu indükleyen nikotin bağımlı nitrozamin ketonuda (NNK, 4-(metilnitrozamin)-1(3-piridil)-1-bütan) içeren sekiz farklı TSNA tanımlanmıştır (15, 16). Bunlardan 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-bütanon (NNK: nikotin bağımlı nitrozamin ketonu) akciğer kanseriyle en fazla

ilişkisi bilinendir (14). Sigara dumanındaki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), NNK gibi tütün karsinojenleri kansere sebep olan kimyasalların DNA'ya kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan DNA katımlarına neden olurlar. Tamir mekanizmaları bu DNA katımlarını ayırabilir veya zarar görmüş hücreyi apoptozise götürebilir. DNA tamir mekanizmaları başarısız olursa DNA eklentileri kısa sürede mutasyonlara yol açabilir. NNK'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin arasındaki dengeyi bozabilir ve kontrolsüz hücre çoğalması ve tümörögenез ile sonuçlanabilir. NNK'lar *K-ras* onkogen aktivasyonu ile sonuçlanan DNA mutasyonları ile ilişkilidir. Akciğer adenokarsinomlarının %24'ünde *K-ras* onkogen aktivasyonu saptanmıştır. Sigarayı bırakanlarda görülen adenokarsinomlarda bile görülen *K-ras* onkogen aktivasyonu sigaranın bırakılmasıyla bu tip mutasyonların kaçınılmaz şekilde geri dönmediğini göstermektedir (17).

Akciğer kanseri vakalarının %25'i hiç sigara içmeyenlerde görülmektedir ve sigara içenlerin ise sadece %20'sinde akciğer kanseri görülmektedir (24,25). Bu durum akciğer kanserinin meydana gelmesinde sigara dışında diğer etkenlerinde olduğunu göstermektedir.

Pasif içicilik de akciğer kanseri için bir risktir. EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) çalışmasında sigara içmemiş ve sigarayı bırakmış olan hastalarda akciğer kanseri gelişmesinde pasif sigara içiminin %16-24 oranında rol oynadığı, hava kirliliğinin %5-7 oranında olduğu belirtilmiştir (18). Sigara içen annelerin bebeklerinden alınan idrar örneklerinde adenokarsinom ile ilişkilendirilen bir madde olan 4-nitrozamin, 4-1 bütanon seviyelerinin yüksek bulunması nedeniyle, pasif sigara dumanı ile karşılaşmanın kanser riskini artırdığı düşünülmektedir (19). Radon maruziyeti, asbestoz, arsenik gibi çevresel faktörler ve geçirilmiş akciğer hastalıklarında önemli risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (20).

Akciğer kanserinde bu faktörlerin yanında genetik faktörlerde önemli bir etkene sahiptir. Sellers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akciğer kanserinde otozomal kodominant bir kalıtımla belirlenen gen lokusu delesyonundan söz edilmiştir. Buna göre bu gen lokusunda delesyon olan kişilerde 50 yaşına kadar %69'a varan kanser riski söz konusudur (21). Uzun süreli karsinojenlere maruz kalmak genetik yapıda hasar oluşturur ve hücre çoğalmasını kontrol eden genlerde değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler; DNA düzeyinde mutasyon, delesyon ve insersiyonlar ile RNA düzeyinde kanser ilişkili

genlerdeki ekspresyonlardan oluşmaktadır (22). Mutasyonlar onkogenik genlerde (*K-ras*, siklinler gibi) veya tümör baskılayıcı genlerde (*p53*, Retinablastom, *p16* gibi) geliştiği zaman tümör gelişimi için adım atılmış olur (23).

2.2.3. Sınıflandırma ve Evreleme

Akciğer kanserleri klinik, genetik ve histolojik olarak heterojen bir grup tümörü kapsar. Histolojik olarak akciğer tümörleri küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılır. Bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i küçük hücreli dışıdır (26). KHDAK ana bronşlardan başlayıp terminal alveollere kadar olan akciğerin epitelyal hücrelerinden kaynaklanır. KHDAK büyük hücreli, skuamoz (epidermoid) ve adenokarsinom olmak üzere üç ana histolojik gruba ayrılmaktadır (27). KHDAK içinde adenokarsinom ve skuamoz hücreli karsinom oranı her biri için %30-%50 arasında değişmektedir (28). Büyük hücreli karsinomlar, kısmen nekrotik tümörlerdir, veziküler çekirdekler ve belirgin nükleotide sahip çokgen poliagon hücrelerinin yaprak ve yuvalarından oluşur. Büyük hücreli akciğer kanserleri tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %3'ünü temsil eder (27). Küçük hücreli akciğer tümörünün patolojik özellikleri ilk kez 1926'da Barnard tarafından kabul edilmiştir (29). Küçük hücreli akciğer kanserleri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %12-14'ünü oluşturan oldukça agresif nöroendokrin malignitedir. Tanı konduğunda hastaların büyük çoğunluğunda metastatik hastalık vardır, bu nedenle cerrahi rezeksiyon nadiren bir seçenektir. Sağkalım oranları, hastalıkların sadece %5-8'inde tanıdan sonra 5 yıl hayatta kalmaya devam etmektedir (27).

Akciğerin diğer nöroendokrin tümörleri için kesin bir preneoplastik lezyon saptanmamıştır. Bununla birlikte, KHAK de bitişik bronşiyal epitelin morfolojik olarak normal olsada genetik değişiklikler gösterebileceği saptanmıştır (27).

Akciğer kanserlerinde evreleme çok önemlidir. Gerek ilaç kullanımı gerekse hasta sağkalımı açısından büyük önem arz eder. Akciğer kanserlerinde güncel evreleme sistemi, primer tümör boyutu, uzak metastaz durumuna, lenf nodlarına invazyon ve organ yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. TNM evrelemesine göre T primer tümör boyutunu, N lenf nodu tutulumunu, M ise uzak metastaz durumunu göstermektedir (Tablo 2.1) (32).

Tablo 2.1:TNM sınıflandırılmasının yedinci versiyonuna göre T, N, M faktörleri (32)

T (PRİMER TÜMÖR)		
Tx	Balgam veya bronş lavajında habis hücrelerin varlığı görülür ancak görüntüleme veya bronkoskopi ile tümör görüntülenemez.	
T0	Primer tümör bulgusu yok.	
Tis	Karsinoma in situ.	
T1	Akciğer veya visseral plevra ile çevrili en büyük boyutta tümör ≤ 3 cm,lober bronşun henüz proksimaline invazyon bulgusu yoktur (Bronşun yüzeyel duvarıyla sınırlı süperfisiyal tümörler ana bronşa ulaşsa bile T1 olarak değerlendirilir).	
	T1a	Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm
	T2b	$2\text{ cm} \leq$ tümör en büyük çapı ≤ 3
T2	$3\text{cm} <$ tümör en büyük çapı $\leq 7\text{cm}$, Karina bölgesine ≥ 2 cm uzaktaki ana bronş tutulumu, visseral plevra invazyonu, akciğer hilusuna kadar uzanan, ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoniyle ilişkilidir.	
	T2a	$3\text{ cm} <$ tümör en büyük çapı $\leq 5\text{cm}$
	T2b	$5\text{ cm} <$ tümör en büyük çapı $\leq 7\text{cm}$
T3	Tümör > 7 cm veya aşağısında, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil),frenik sistem diafragma, mediastinal plavra, perietal perikard invazyonu, ana bronşun karinaya 2 cm den az yakınlıkta invazyonu (karina tutulumu yok), tüm akciğeri kapsayan total atelektazi veya obstrüktif pnömonisi veya aynı lobdaki tümörden anatopik olarak farklı tümör nodülleri varlığı.	
T4	Her hangi bir boyuttaki tümörde mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, omur gövdesi, karina, aynı taraf farklı lobda tümör nodül yada nodüller varlığı.	
N (LENF NODU)		
Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez.	
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.	
N1	İpsilateral hiler lenf nodlarında metastaz, peribronşiyal, interlober, segmental, lober, subsegmental lenf nodu tutulumu.	
N2	İpsilateral mediastinal ve subkarinal lenf nodlarında metastaz.	
N3	Karşılıklı mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalaen veya supraklaviküler lenf nodunda metastaz.	
M (METASTAZ)		
Mx	Metastaz değerlendirilemez.	
M0	Uzak Metastaz kanıtı yok.	
M1	Uzak Metastaz.	
	M1a	Kontralateral akciğerde metastaz, malign plevral yayılım, malign perikardiyalefüzyon,malign plevral efüzyon.
	M1b	Uzak organ metastazı.

2.2.4. Akciğer Adenokarsinomları

Adenokarsinoma çoğu ülkede akciğer kanserinin en sık görülen histolojik alt türüdür ve tüm akciğer kanserlerinin neredeyse yarısını oluşturmaktadır (30). Adenokarsinomlar sigara içmeyenlerde ve Asyalı kadınlarda daha sık görülür. Çoğunlukla periferik yolla ortaya çıkarlar ve histolojik açıdan glandüler diferansiyasyon veya müsin varlığı ile karakterizedirler (27).

2011'de IASLC / ATS / ERS (International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society) sınıflandırılmasında;

I. Preinvazif Lezyonlar

- Atipik Adenomatöz Hiperplazi,
- Adenokarsinoma İn Situ,
- Müsinöz Olmayan ve / veya Müsinöz,

II. Minimal İnvaziv Adenokarsinoma

- Müsinöz Olmayan ve / veya Müsinöz,

III. İnvaziv Adenokarsinoma

- Lepidik Baskın Adenokarsinoma,
- Asiner Baskın Adenokarsinom,
- Mikropapiller predominant Adenokarsinoma,
- Solid predominant Adenokarsinoma,

IV. Varyantları

- İnvaziv Müsinöz Adenokarsinoma,
- Kolloid Adenokarsinoması,
- Fetal Adenokarsinom,
- Enterik Adenokarsinom,

Olmak üzere dört adenokarsinom tanımlanmaktadır (30).

İnvaziv müsinöz adenokarsinomalar, *K-RAS* mutasyonları, Transcription Termination Factor 1 (*TTF-1*) ekspresyonu eksikliği ve sık multisentriklik ile bu tümörlerin kuvvetli birleşmesinden dolayı, müsinöz olmayan adenokarsinomlardan farklı olarak invaziv adenokarsinom varyantı olarak sınıflandırılmıştır (31).

2.3. AKCİĞER KANSERİNDE ROL OYNAYAN GENLER

2.3.1. *ALK* Mutasyonları

ALK (Anaplastik Lenfoma Kinazı)'nın yer aldığı 2p23 bölgesini içeren kromozomal yeniden düzenlemeler KHDAK'da %3-5 oranında gözlenmektedir. Bu kromozomal yeniden düzenlemeler sonucu meydana gelen çeşitli füzyon genleri tanımlanmasına rağmen, en sık gözlenen değişiklik *EML4-ALK* füzyonudur. Bu füzyon, 2p'deki bir inversiyon sonucu oluşmaktadır. *ALK* aktivitesinin artışına sebep olan bu mutasyonlar, *ALK* inhibitörlerine iyi yanıt belirteci olarak kabul edilmektedir. Füzyonun saptanması için yoğun olarak FISH yöntemi kullanılmaktadır (1).

2.3.2. *BRAF* Mutasyonları

Bir proto-onkogen olan *BRAF*, serin / treonin protein kinazlarının raf / mil ailesine ait bir proteini kodlar. Bu protein, hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve salgılanmasını etkileyen MAP kinaz / ERK sinyal yolunu düzenleyen bir rol oynar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar non-hodgkin lenfoma, kolorektal kanser, malign melanom, tiroid karsinoması, KHDAK ve akciğer adenokarsinoması da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerle ilişkilendirilir (38).

KHDAK'da *BRAF* V600 mutasyonları %3-5 arasında rapor edilmektedir. Bu mutasyonların %50'si ekzon 15'de yer alan V600E mutasyonudur. Bunun dışında en çok gözlenen *BRAF* mutasyonları; kinaz domainindeki G469A, L596R ve G loop aktivasyon domainindeki G465V, G468A mutasyonlarıdır. V600E mutasyonu sigara içmeyen kadın hastalarda daha sık görülür (1).

2.3.3. *EGFR* Mutasyonları

Bir proto-onkogen olan *EGFR* (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü) tarafından kodlanan protein, protein kinaz süper ailesinin bir üyesi olan transmembran glikoproteindir. Bu protein epidermal büyüme faktörü ailesinin üyeleri için bir reseptördür. *EGFR*, epidermal büyüme faktörüne bağlanan bir hücre yüzeyi proteindir. Proteinin bir liganda bağlanması, reseptör dimerizasyonunu ve tirozin otofosforilasyonunu indükler ve hücre proliferasyonuna yol açar. Bu gendeki mutasyonlar akciğer kanseri ile ilişkilidir (34).

EGFR mutasyonu saptanan bireyler gefinitib gibi tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) ile tedaviye yanıt vermektedir. Çalışmalar, *EGFR* mutasyonu varlığının gefinitib tedavisine yanıt için bağımsız bir belirteç olduğunu göstermektedir (1).

EGFR mutasyonunu saptamak için kullanılan en yaygın yöntem ekzon 18-21'in dizi analizidir. Bunun yanında FISH ile *EGFR* amplifikasyonlarının saptanmasında uygulanan yöntemler arasındadır (1).

2.3.4. *HER2 (ERB2)* Mutasyonları

Bir proto-onkogen olan *HER2* geni, reseptör tirozin kinazların epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptör ailesinin bir üyesini kodlar. Bu proteinin kendi ligand bağlanma domaini yoktur ve bu nedenle büyüme faktörlerine bağlanamaz. Bunun yanında heterodimer oluşturmak ve ligand bağlanmasını stabilize etmek için EGF reseptör ailesi üyelerine sıkıca bağlanır (33).

EGFR, *ALK* ve *K-RAS* mutasyonları görülmeyen hastalarda, *HER2* mutasyonu görülme oranı %6'dır. Adenokarsinomlarda, sigara içmeyenlerde ve kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır. Geniş akciğer kanseri ilaç panellerinin olması sebebiyle de, *HER2* mutasyon testinin adenokarsinomlar için rutin klinik genotiplemeye alınması önerilmektedir (1).

Bu genin amplifikasyonu ve / veya genin fazla ifade edilmesi, göğüs ve yumurtalık tümörleri de dahil olmak üzere çok sayıda kansere neden olduğu bildirilmiştir (33).

2.3.5. *K-RAS* Mutasyonları

K-RAS, bir proto-onkogen olup RAS-RAF-MEK-ERK sinyal yolunda önemli rolleri olan üç RAS ailesi proteinlerinden birisini kodlar (35). Memeli Ras gen ailesinin bir üyesi olan *K-RAS* geni, Kirsten Rat Sarkoma (Ki- veya *K-ras*) viralonkogen homologudur. Küçük GTPaz süper familya üyesi olan bir proteini kodlar (36).

Onkojenik aktivasyonun en sık gözlemlendiği *K-RAS* (12p12.1) genine ait mutasyonlar kanserlerin %17-25'inde gözlenmektedir. *K-RAS* mutasyonlarının çoğu 12, 13 ve 61. kodonlarda meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlardır. Bunların yanında 59, 63 ve 146. Kodon mutasyonları da onkojenik aktivasyonla sonlanmaktadır. Bu mutasyonlar, proteinin GTP'ye sürekli bağlı kalmasına yol açarak sinyal iletimindeki kontrolün bozulmasına yol açmakta ve sürekli aktivasyon sonucu MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yolağının sürekli uyarılması ile hücre çoğalmasını tetiklemektedir (1).

KHDAK olgularının %40'ında *K-RAS* geninin aktivasyon artışına yol açan mutasyonlar saptanmaktadır (1).

K-RAS mutasyonlarının saptanması için; dizi analizi, alel-spesifik PZR ve real-time PZR yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (1).

2.3.6. *MET* Mutasyonları

MET bir proto-onkogen olup, proteinlerin reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesini ve proto-onkogen *MET*'nin bir ürününü kodlar. Kodlanmış preproteine proteolitik olarak işlenir ve olgun reseptörü oluşturmak için disülfür bağları vasıtasıyla bağlanan alfa ve beta alt birimleri üretilir. Beta alt biriminin daha fazla işlenmesi, akciğer fibrozunu azalttığı gösterilen M10 peptidinin oluşumuyla sonuçlanır. Ligandının, hepatosit büyüme faktörü bağlanması, hücre hayatta kalma, embriyogenez ve hücre migrasyonu ve istilada rolü olan reseptörün dimerizasyonu ve aktivasyonunu indükler. Bu genin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, aynı zamanda çoklu insan kanserleriyle ilişkilidir (37).

KHDAK'de hastaların %1-7'sinde *MET* amplifikasyonu görülmekte ve bu hastaların prognozu daha kötü olmaktadır. *MET* geninin mutasyonu ise KHDAK'de %3-5'inde görülmektedir (1).

2.3.7. *RET* Mutasyonları

Bir proto-onkogen olan *RET* geni Cadherin ailesinin üyesidir. *RET* hücre büyümesi ve farklılaşması için sinyaller gönderen hücre yüzeyi molekülü olan reseptör kinaz proteinlerinden birini kodlar (39).

RET füzyonları KHDAK'da %1-2 arasında görülmektedir. Bunlardan *KIF5B-RET* füzyon geni 10p11.22-q11.21 perisentrik inversiyonundan kaynaklanmaktadır. *RET* füzyon mutasyonlarının sıklığı sigara içmemiş, diğer tetikleyici mutasyonları taşımayan adenokarsinom popülasyonunda artmaktadır (1).

2.3.8. *ROS1* Mutasyonları

Bu proto-onkogen çeşitli tümör hücre dizilerinde yüksek oranda eksprese edilmiştir. *ROS1* (ROS Proto-Onkogen1, Reseptör Tirozin Kinaz) geni tirozin kinaz insülin reseptör genlerinin yedi alt grubuna dahildir. Bu gen tirozin kinaz aktivitesine sahip tip 1'e ait bir zar proteinini kodlar. Bu protein hücre farklılaşması ve büyüme faktörü reseptörü olarak işlev görebilir (40).

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %2'sinde *ROS1* füzyon mutasyonu görülmektedir. *ROS1* füzyonları, az ya da hiç sigara içmeyen, genç hastalarla ve adenokarsinomlarla ilişkilendirilmiştir. *ROS1* füzyonu taşıyan hastalar, *ALK* füzyon mutasyonlarına benzer klinik özelliklerine sahiptir (1).

2.4. KANSER GENETİĞİ

2.4.1. Kanser Genetiğinin Tarihsel Gelişimi

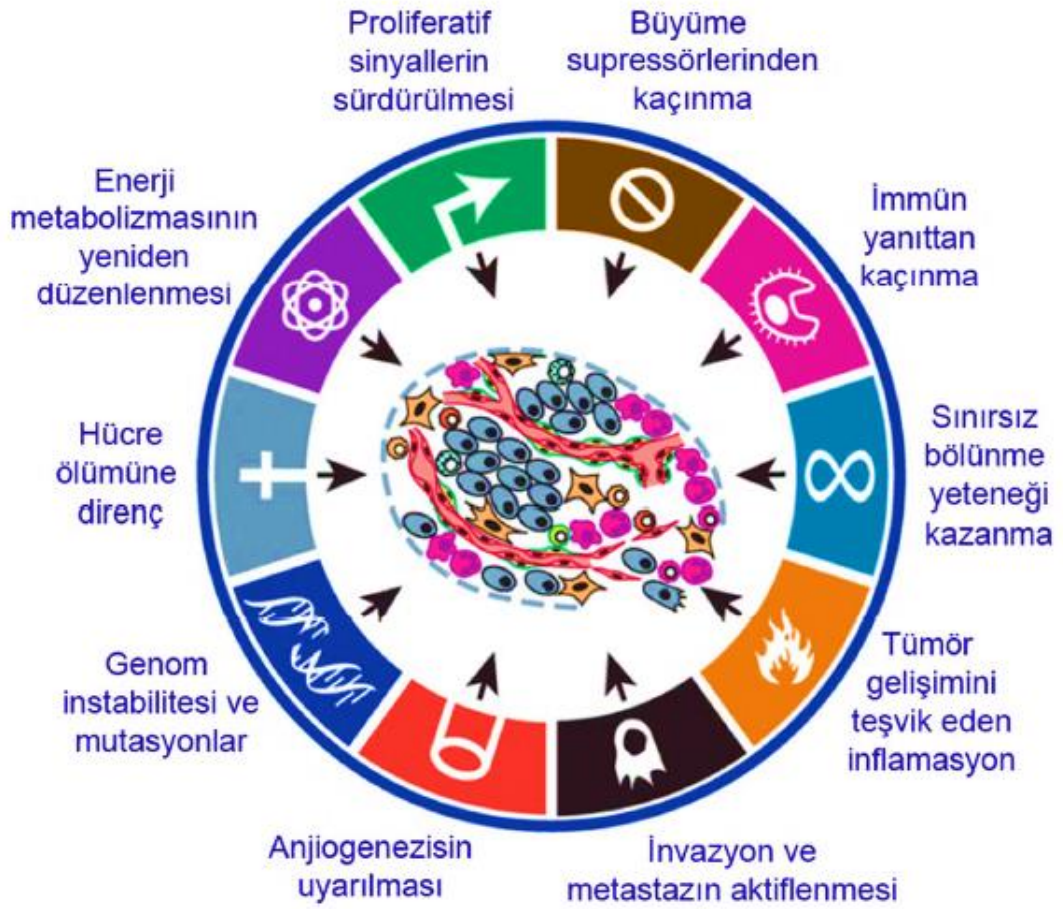
Kanser (cancer) terimi, tıbbın babası olarak bilinen Yunan fizikçi Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hippocrates carcinos ve carcinoma terimlerini ülser oluşturan ve ülser oluşturmayan tümörler için kullanmıştır (42). Eski yunanlar kanserin vücuttaki fazla sıvıya bağlı olduğunu düşünürlerken, 18 ve 19. yüzyıllarda doktorlar parazitlerin kansere neden olduğunu düşünmekteydi (43). Kanserın yıllara göre tarihsel gelişimi;

- 1902-1914 yılları arası Thedor Boveri kromozomların kalıtımın bir parçası olduğunu ve kromozomal sapmaların kansere sebep olduğunu öne sürmüştür.
- 1960 yılında Philadelphia kromozomu keşfedildi ve 9-22 kromozomları arasındaki translokasyonun onkogen Abelson Lekomia Virüs (ABL) aktivasyonuna yol açtığı bulunmuştur.
- 1971'de Kundson çift vuruş hipotezini önermiştir.
- 1976'da Retrovirüslerin transforme edici genleri ile ilişkili hücrel proto onkogenlerinin keşfi.
- 1979'da Tümör DNA'sında aktive edilmiş onkogenler kansere bağlı genetik olayın ilk gösterimi. Doğrudan tümörlerden türetilen DNA'nın, normal hücrelere yüksek molekül ağırlıklı bir kompleks olarak verildiğinde "normal" hücrelerin kanserli hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir. Aynı zamanda viral proteinlerle kompleks içinde olan p53'ün tanımlanması da 1979 yılında olmuştur.
- 1983'de İlk tümör supresör geni Retinoblastoma (*RB*)'yi haritalamak için heterozigotluk kaybı analizi kullanıldı.
- 1984'te Trypanosoma brucei'nin telomerik dizisinin tanımlanması.
- 1986'da İlk tümör supresör geni olan Retinoblastoma (*RB*)'nin klonlanması ve tanımlanması.

- 1989'de *TP53*'ün bir onkogen'den ziyade (veya buna ek olarak) bir insan tümör baskılayıcı gen olduğunu gösterdi. Sonraki araştırmalar, *TP53*'ün insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gen olduğunu gösterdi.
- 1991'de Ailesel adenomatöz polipozise (*APC*) neden olan genin klonlanması. Bu gen daha sonra bir 'gatekeeper(bekçi)' olarak davranır. *APC* mutasyonlar sporadik kolon kanserlerinde de görülür.
- 1993'de İnsan tümörlerinde mikrosatellit kararsızlığının keşfi ve kalıtsal nonpolipozis kolon kanserinden (HNPCC) sorumlu ilk gen olan bir uyumsuzluk onarım geninin (*MSH2*) tanımlanması.
- 1994'de İlk ailesel meme kanseri duyarlılık geninin tanımlanması (*BRCA1*). (*BRCA1* ve bu genle bağıntılı olan *BRCA2* genlerinin mutasyonları ailesel göğüs kanserine neden olur, ancak bazı diğer yüksek duyarlılık genlerinin aksine, yaygın fenotipik kanserlerde mutasyon geçirmezler.)
- 1997-1998 yılları arasında telomerazın (HTEERT) klonlanması ve telomeraz ekspresyonunun insan hücrelerinin ömrünü uzatabileceğinin gösterilmesi.
- 2001'de İnsan genomunun ilk taslak dizisi yayınlandı (41).

2.4.2. Kanserın Temel Özellikleri

Douglas Hanahan ve Robert Weinberg günümüzde kabul gören kanserin temel özelliklerini 8 kategoride özetlemişlerdir. Kanserın bu belirgin özellikleri, proliferatif sinyal vermeyi sürdürme, büyüme süpressörlerinden kaçınma, hücre ölümüne direnme, sınırsız bölünme yeteneğİ kazanma, anjiyogenesizin uyarılması, doku invazyonu ve metastazı aktive etme, enerji metabolizmasını yeniden düzenlenmesi ve immün yanıttan kaçınmayı içerir (Şekil 2.4) (59).



Şekil 2.4: Kanserin temel ve diğer ayırıcı özellikleri (73)

2.4.2.1. Proliferatif Sinyali Sürdürme

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürebilme yeteneğidir. Normal dokular, hücre büyümesi ve bölünme döngüsüne giriş ve ilerlemeyi öğreten büyüme destekleyici sinyallerin üretilmesini ve serbest bırakılmasını dikkatli bir şekilde kontrol eder ve böylece hücre sayısının bir homeostazını ve dolayısıyla normal doku mimarisinin ve fonksiyonunun korunmasını sağlar. Kanser hücreleri, bu sinyallerden kurtulmak suretiyle kendi kaderlerinin efendisi olurlar. Etkinleştirme sinyalleri büyük oranda hücre içi reseptörleri bağlayan, tipik olarak hücre içi tirozin kinaz alanları içeren büyüme faktörleri tarafından taşınır. İkincisi, hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi ve hücre büyümesini (yani, hücre boyutunda artışı) düzenleyen dallı intraselüler sinyal yolları vasıtasıyla sinyal yaymaya devam eder (60).

Büyüme faktörünün bağımsızlığı, bu reseptörlerin akış yönünde çalışan sinyal yollarının bileşenlerinin yapıcı olarak aktivasyonundan kaynaklanabileceğinden, ligand aracılı

reseptör aktivasyonu ile bu yolları uyarma gereği ortadan kalkmaktadır. Bir dizi farklı downstream sinyalleme yolunun bir ligand uyarımlı reseptörden yayıldığı göz önüne alındığında, bu downstream yollarının birinin veya başka birinin, örneğin Ras sinyal transdüktörüne tepki veren birinin aktive edilmesi, iletilen düzenleyici talimatların bir alt kümesini aktive edilmiş bir reseptör ile tekrar ortaya çıkarabilir (60).

2.4.2.2. Büyüme Supressörlerinden Kaçınma

Pozitif hareket eden büyüme uyarıcı sinyaller uyandıran ve sürdüren özelliklerinin yanında kanser hücreleri aynı zamanda hücre çoğalmasını olumsuz şekilde kontrol eden güçlü programlardan kaçınmak zorundadır. Bu programların birçoğu tümör baskılayıcı genlerin etkilerine bağlıdır. Hücrenin büyümesini ve çoğalmasını çeşitli yollarla etkileyen çok sayıda tümör süpressör geni hayvan ve insan kanserinin karakteristik inaktivasyonu ile keşfedilmiştir. İki önemli tümör süpressör gen *TP53* ve *RB* (retinoblastomayla ilgili)'dir (60).

Normal hücreler, sessiz bir durumdan aktif proliferatif bir duruma geçmeden önce mitojenik büyüme sinyalleri (GS) ister. Bu sinyaller, sinyalleme moleküllerinin ayırıcı sınıflarını bağlayan transmembran reseptörler vasıtasıyla hücre içine iletilir. Bilindiği kadarıyla böyle uyarıcı sinyaller yoksa normal hücre tipleri çoğalamaz. Kanser kataloğundaki kanserojenlerin birçoğu, normal büyüme sinyallerini bir şekilde taklit ederek hareket eder (61).

Tümör hücrelerinin kendi büyüme sinyallerinin çoğunu üretmesi, dolayısıyla normal doku mikro çevresinden uyarılmaya olan bağımlılıklarını azaltmasıdır. Tümör hücrelerinin dışarıdan türeyen sinyallere bağımlılığından kurtuluşu; normalde bir doku içindeki çeşitli hücre tiplerinin doğru şekilde davranmasını sağlamak için çalışan kritik derecede önemli bir homeostatik mekanizmayı bozar (61).

2.4.2.3. Sınırsız Bölünme Yeteneği Kazanma

2000 yılına gelindiğinde, makroskopik tümörler oluşturmak için kanser hücrelerinin sınırsız replikatif potansiyel gerektirdiği genel olarak kabul edildi. Bu yeteneği, yalnızca sınırlı sayıda hücre büyüme ve bölünme döngüsünden geçebilen vücuttaki çoğu normal hücre periyotlarından belirgin bir şekilde farklıdır. Prensipte olarak, ortaya çıkan düzensiz çoğalma programı, makroskopik tümörleri teşkil eden muazzam hücre popülasyonlarının oluşmasını sağlamak için yeterlidir. Bununla birlikte, son otuz yılda yapılan araştırmalar, hücre-hücre sinyalleşmesinin bozulmasının kendi başına tümör büyümesini sağlamadığını

göstermektedir. Birçok ve belki de bütün memeli hücresi çoğalmasını sınırlandıran, hücreye özgü kişisel bir program taşır. Bu program hücre-hücre sinyal yollarından bağımsız olarak çalışıyor gibi görünmektedir (60, 61).

2.4.2.4. Hücre Ölümüne Direnç

Tümör hücresi popülasyonlarının sayı olarak genişleme kabiliyeti yalnızca hücre çoğalması oranı ile değil aynı zamanda hücre yıpranma oranı ile de belirlenir. Programlanmış hücre ölümü (apoptozis) bu yıpranmanın önemli bir kaynağıdır. Kanıtlar esas olarak fare modelleri ve kültür hücrelerindeki çalışmaların yanı sıra, insan karsinogenezindeki biyopsi evrelerinin tanımlayıcı analizlerinden, apoptozise karşı kazanılan direncin çoğu ve belki de tüm kanser türlerinin bir işareti olduğu görülmektedir (60, 61).

Apoptotik makineler geniş ölçüde sensör ve efektör olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Sensörler, bir hücrenin yaşayıp öleceğini etkileyen normalite veya anormallik koşulları için hücre dışı ve hücre içi ortamın izlenmesinden sorumludur. Bu sinyaller, apoptotik ölüm efektörleri olarak işlev gören ikinci bileşen sınıfını düzenler. Bu ligand / reseptör çiftlerine örnek olarak insülin benzeri büyüme faktörü 1/2 (IGF 1/2) salınımı verilebilir (60, 61). Hücre içi sensörler hücre hasarını saptar ve DNA hasarı, hayatta kalma faktörü yetersizliği veya hipoksi gibi anormalliklerin saptanması durumunda apoptozisi aktif eder (61).

Apoptozun efektörleri ise kaspazlar olarak adlandırılan bir dizi hücre içi proteaz içerir (60) .

2.4.2.5. Anjiyogenezin Uyarılması

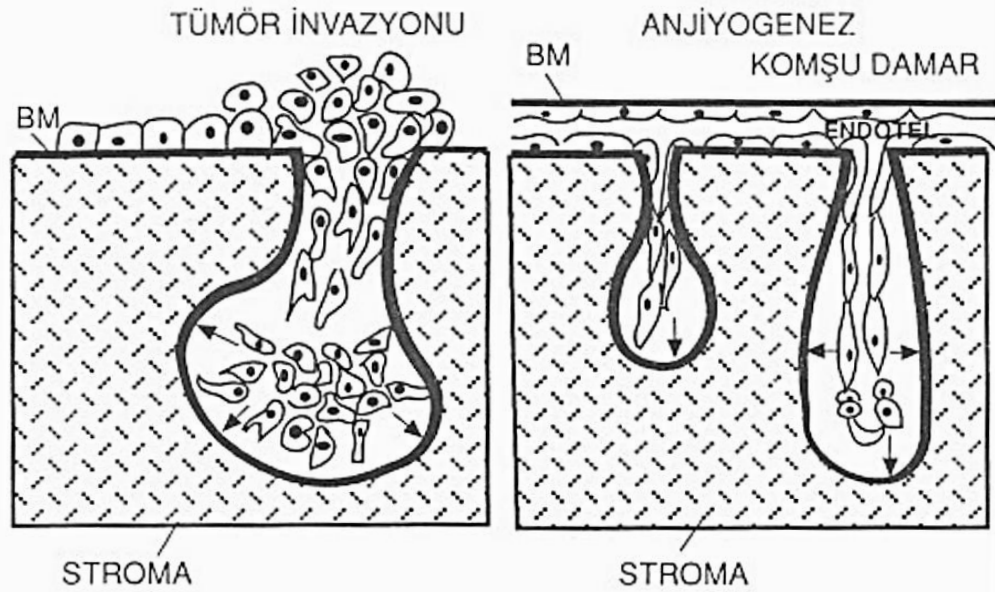
Tümör hücreleri kanserli hücrelerin büyümesi için gerekli olan besinleri alabilmek için tümör hücreleri tarafından salgılanan maddeler ile anjiyogenezi uyarmaktadır. Tümör dokusunun büyümesi, invazyonu ve metastazı için gerekli olan oksijen, besin maddeleri ve büyüme faktörlerinin sağlanması, metabolik atıkların ve karbondioksitin boşaltılması için damar oluşumuna ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.5) (60, 62).

Embriyogenez sırasında, vaskülatürün gelişimi, mevcut damarlardan yeni damarların filizlenmesine (anjiyogenez) ek olarak yeni endotel hücrelerinin doğumunu ve bunların tüplere yerleştirilmesini (vaskülogenez) içerir. Bu morfogenezin ardından normal vaskülatür büyük ölçüde sessiz kalır. Yetişkinlerde, yara iyileşmesi ve kadın üreme

döngüsü gibi fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak anjiyogenez açılır, ancak geçici olarak açılır. Buna karşılık, tümör ilerlemesi sırasında, bir anjiyojenik anahtar hemen hemen her zaman aktive edilir ve açık kalır (60).

Hızla büyüyen tümörler, tümör kitlesi 1-2 mm³'lük hacime ulaştıklarında besin ve oksijen desteği için anjiyogenezi uyarırlar. Yeni damar oluşumu gerçekleşmediğinde etraf dokudan difüzyon ile beslenen tümör dokusu, en fazla 0.5-1 cm³'lük hacime kadar büyüyebilirler. Daha fazla büyüebilmeleri için anjiyogenez gereklidir. Yeni damar yapılarının oluşumu genel olarak dört basamakta gerçekleşmektedir;

- I. Bazal membranın ve ekstra-sellüler matriksin proteazlar tarafından yıkılması,
- II. Anjiyogenik uyarıya doğru endotel hücrelerinin göçü,
- III. Endotel hücrelerin proliferasyonu,
- IV. Kapiller tüp formasyonu ve endotel hücrelerin olgunlaşması (62).



Şekil 2.5:Anjiyogenez ve tümör invazyonu (Cancer: Principles and Practice of Oncology, 1997'den)

2.4.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz

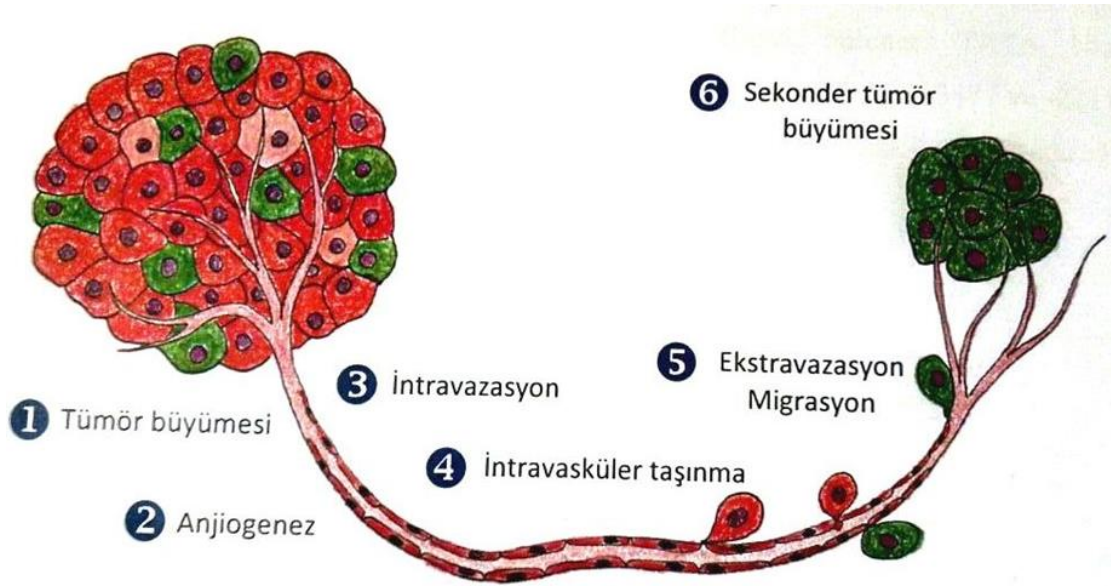
Metastaz, primer tümörlerden dolaşıma katılan hücrelerin sekonder bölgelere ulaşması ve bu bölgelerde proliferasyonu sonucu oluşur (Şekil 2.6) (75). Metastazı insan kanserleri ölümlerinin %90 sebebidir (61). İnsan ve hayvan çalışmalarında tümörlerden milyarlarca hücrelerin dolaşıma katıldığı ancak bunlardan çok azının metastaz oluşturduğu

bilinmektedir. Tümör hücreleri dolaşım içinde iken mekanik etki, apoptozis, doğal ve adaptif immün sistem aracılığı ile yok edilirler (75).

Metastatik süreçte ilk aşama, tümör hücrelerinin adezyon kaybı ve invazyonudur. Dolaşımda, tümör hücreleri homotipik ve heterotipik adezyon ile kümelenme eğilimi gösterirler. Tümör hücrelerinin endotele adezyonu vasküler bazal membrana geçişi ve dokunun proteolitik destrüksiyonu ile doku adezyon molekülleri ile uzak bölgelere yerleşimi gerçekleşir (75).

Metastaz çok adımlı bir süreçtir ve birçok genin işbirliği içinde olduğu bir olaydır. Metastatik onkogenlerin ve metastaz süpressör genlerin bu çok basamaklı süreçte rol oynadığı bilinmektedir. Metastaz aktive eden genler ve metastaz süpressör genler metastaz sürecinde koordineli olarak eksprese edilirler (75).

Metastaz kapasitesi sadece kanser hücrelerine ait intristik bir özellik değildir. Ve aynı zamanda tümör mikro çevresine de bağlıdır (75).



Şekil 2.6: Metastaz gelişim evreleri (75).

2.4.2.7. Kanserın Diğer Ayırıcı Özellikleri

Kanser hücrelerinin diğer ayırıcı özellikleri, kanser gelişiminde işlevsel olarak önemli olduğu düşünülmüştür ve dolayısıyla temel özelliklere eklenebilir (60).

2.4.2.7.1. Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi

Her hücrenin enerjisi, glikozu ATP'ye dönüştürerek anaerobik veya aerobik enerji üretimi yoluyla elde edilir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde glikoz taşıyıcıları yukarı doğru (upstream) düzenlenir ve aerobik glikoliz tercih edilir. Bu taşıyıcılar, hücre proliferasyonunda kullanılan yeni nükleozidler veya aminoasitler üretmek için kullanılabilir (60).

Çoğu normal dokuda çalışan ve ilgili hücrelerin fizyolojik işlemlerini yürüten metabolik programı değiştirerek, sürekli hücre büyümesini ve çoğalmasını desteklemek için hücresel enerji metabolizmasında büyük yeniden programlamayı içerir (60).

2.4.2.7.2. İmmün Yanıttan Kaçınma

Kanser hücreleri tarafından saldırı ve bağışıklık sisteminin elimine edilmesi ile aktif olarak kaçınılmasıdır. Bu yeteneği hem bağışıklık sisteminin hem tümör gelişimini ve ilerlemesini antagonize eden ve geliştiren ikili rollerini vurgular. Bu yeteneklerin her ikisi de insan kanserinin birçok formunun gelişimini ve ilerlemesini kolaylaştıracağını kanıtlayabilir niteliktedir ve bu nedenle ortaya çıkan kanser işaretleri olarak düşünülebilir (60).

2.4.2.7.3. Genom İnstabilitesi ve Mutasyonlar

Yukarıda sayılan birçok özelliğin kazanılmasında mevcut kanıtlara bakıldığında zaman, çoğunun doğrudan veya dolaylı olarak kanser hücrelerinin genomundaki değişiklikler yoluyla edinildiğini göstermektedir (60, 61). Genomdaki değişikliklere tümör süpressör genlerin inaktivasyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar sebep olarak gösterilebilir (60).

Bunların yanında DNA bakım ve onarımını sağlayan enzimler vardır. Bunlar genomda meydana gelen hasarları onarırlar, genom bütünlüğünü korurlar ve DNA dizi bilgilerinin bozulmadan kalmasını sağlamaya çalışırlar. Bu onarım mekanizmalarının çalışma prensibi;

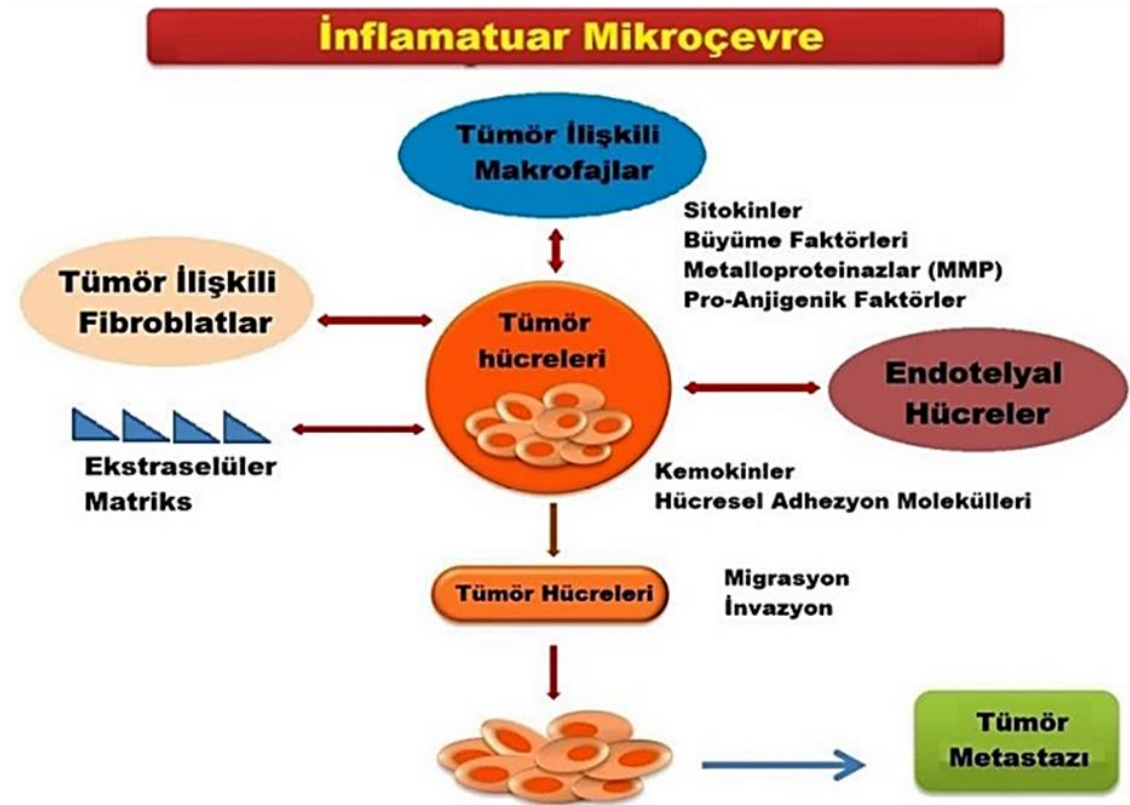
- I. DNA hasarının tespit edilmesi ve onarım mekanizmasının harekete geçirilmesi,
- II. Hasar görmüş DNA'nın doğrudan onarılması,
- III. Mutajenik moleküllerin DNA'ya zarar vermeden önce inaktif hale getirilmesi ya da kesilmesi şeklindedir (60, 61).

Bu sistemler, mutasyonların nadir görülen olaylar olduklarını, hatta tümör hücresi genomlarında mevcut olduğu bilinen çoklu mutasyonların bir insan ömründe görülme ihtimalinin çok düşük olduğunu gösterir. Fakat bütün bu onarım mekanizmalarına rağmen kanserler insan popülasyonunda büyük oranda görülür. Bunun sebebi bu sistemlerin spesifik bölgelerinde meydana gelen arızalardır. Bu duruma örnek olarak bir tümör süpressör gen olan *p53*'de meydana gelen hasarlar verilebilir. *P53* tümör süpressör geni DNA onarım mekanizmalarını aktive eder ve DNA hasarı çok olduğu durumlarda hücreyi apoptoza yönlendirmekle sorumludur. *P53*'de meydana gelen hasar mutasyon sıklığının artmasına sebep olur. Gerçektende *p53* DNA hasar sinyali yolağının işleyişinin, tümü olmasada çoğu insan kanserinde kaybolduğu açıktır (60, 61).

2.4.2.7.4. Tümör Gelişimini Teşvik Eden İnflamasyonlar

Tümör mikroçevresi; fibroblastlar, miyofibroblastlar, miyoepitelyal hücreler, makrofajlar, endotelyal hücreler, lökositler ve ekstrasellüler matriks ile tümör hücrelerinden kaynaklanan çözünebilir faktörlerden oluşmaktadır. Tümörü çevreleyen bu inflamatuvar mikroçevrenin, invazyon ve metastatik hücrelerin göçü için gerekli olan bazal membranın kırılmasını desteklediği bilinmektedir (Şekil 2.7). Tümör hücrelerinin aynı zamanda, immün sistemden kaçışı kolaylaştıran ve metastazın oluşumu ile gelişimine yardımcı olan sitokin ve kemokinleri üretim kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir (63).

Tümör mikroçevresindeki stromal hücrelerden kaynaklanan bazı proinflamatuvar sitokinlerin birtakım sinyal yolları üzerinden etki göstererek tümör hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiş ancak moleküler mekanizmalar tam anlamıyla aydınlatılmış değildir (63).



Şekil 2.7: Tümör mikroçevresi ve tümör büyümesindeki rolü (63).

2.5. TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN ve ONKOGENLER

Kanser, hücre proliferasyonunu düzenleyen genlerin işlevinin bozulmasından kaynaklanır. Kanser genleri araştırılmasında iki düzenleyici gen keşfedilmiştir bunlar tümör süpressör gen ve onkogenler olarak adlandırılır (64).

Hayvan kanserlerine neden olan retrovirüsler, büyümeyi teşvik eden ve sinyalleri kodlayan onkogenleri içerir. Bu retrovirüsler nadiren insan kanserine neden olur, ancak onkogenlerin incelenmesi ve birçok insan kanseri geninin tanımlanmasına izin verir. Bu genler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sitoplazmik proteinler ve nükleer proteinleri kodlar (64).

Onkogen diye adlandırılan genler tümör oluşumunda temel bir rol oynamaktadır (65). Normal şartlarda, genetik değişimlerin gözlenmediği durumlarda bu yapılara proto-onkogenler adı verilir. Fonksiyonel değişikliğe neden olan mutasyonların gözlenmesi durumunda ise onkogen olarak adlandırılırlar ve aşırı hücre çoğalmasına neden olurlar. Onkogenler dominant karakterde hareket etme eğilimindedirler. Bu nedenle, anne ve

babadan gelen allellerden sadece bir tanesinde dahi mutasyon oluşması hücrenin aşırı çoğalması ve buna bağlı olarak kanser gelişmesi için yeterlidir (67).

Onkogenler, proto-onkogenler farklı yollarla aktive olabilirler. Bu aktivasyon; yapısal olarak değişikliğe uğramamış fonksiyonel bir proteinin kantitatif (nicel) olarak artmış üretimi ile meydana gelebilir. Diğer aktivasyon mekanizması ise protein üretiminde artışın görülmediği kalitatif (nitel) değişikliklerdir. Bu mekanizmada; bir mutasyon sonucunda modifiye bir proteinin üretilmesi veya kromozomal bir değişiklik sonucunda meydana gelen kimerik bir gen tarafından üretilen yeni bir protein etken olabilir. Bu değişiklikler dominant karakterde olup bir genin sadece tek allelinde gözlenir (67).

Onkogenlerde değişikliğe sebep olan etkenler;

- Nokta mutasyon,
- Amplifikasyon artışı (overekspresyon),
- Gen aktivasyonu,
- Gen füzyonu (yeni kimerik gen) olarak sıralanabilir.

Tümör oluşumunu önleyen genler de vardır. Bunlar tümör inhibitör ya da supresör genlerdir. Benzetme yapacak olursak, onkogenler gaz pedalı ise tümör supresör genler frenidir (65).

TSG'leri onkogenlerden ayıran en önemli özelliklerden birisi çekinik karakterli hareket etmeleri olup bu özellikleri bazı klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olur. Onkogenler ise tek bir mutasyon sonrasında kansere neden oldukları için yaşam içerisinde somatik hücrelerde meydana gelen değişiklikler neticesinde hastalık gözlenir ve üreme hücreleri ile sonraki nesillere aktarılmazlar. TSG'lerin inaktivasyonu için gerekli olan iki değişiklik yaşam içerisinde arka arkaya kazanılabildiği gibi bir tanesi nesiller boyu aktarılacak bu kişilerde kanser predispozisyonuna ve ailesel kanser sendromlarının gözlenmesine neden olabilirler (66).

TSG'ler içerisinde yer alan bazı genetik yapılar ve bunların etkileri klasik çift vuruş hipotezi ile açıklanamamaktadır. Özellikle; retinoblastomaya neden olan *RB* geni ile *NF1* ve *PTCH1* genleri farklı mekanizmalar ile kanser gelişimine neden olabilmektedir (66).

Günümüzde; kanser gelişiminde rol olan TSG'lerin inaktivasyonuna neden olan farklı mekanizmalar ortaya konmuştur (66).

Bunlar;

- Nokta mutasyon,
- Heterozigosite kaybı (LOH),
- Metilasyon artışıdır (66).

2.6. RAS GEN AİLESİ ve TARİHİ

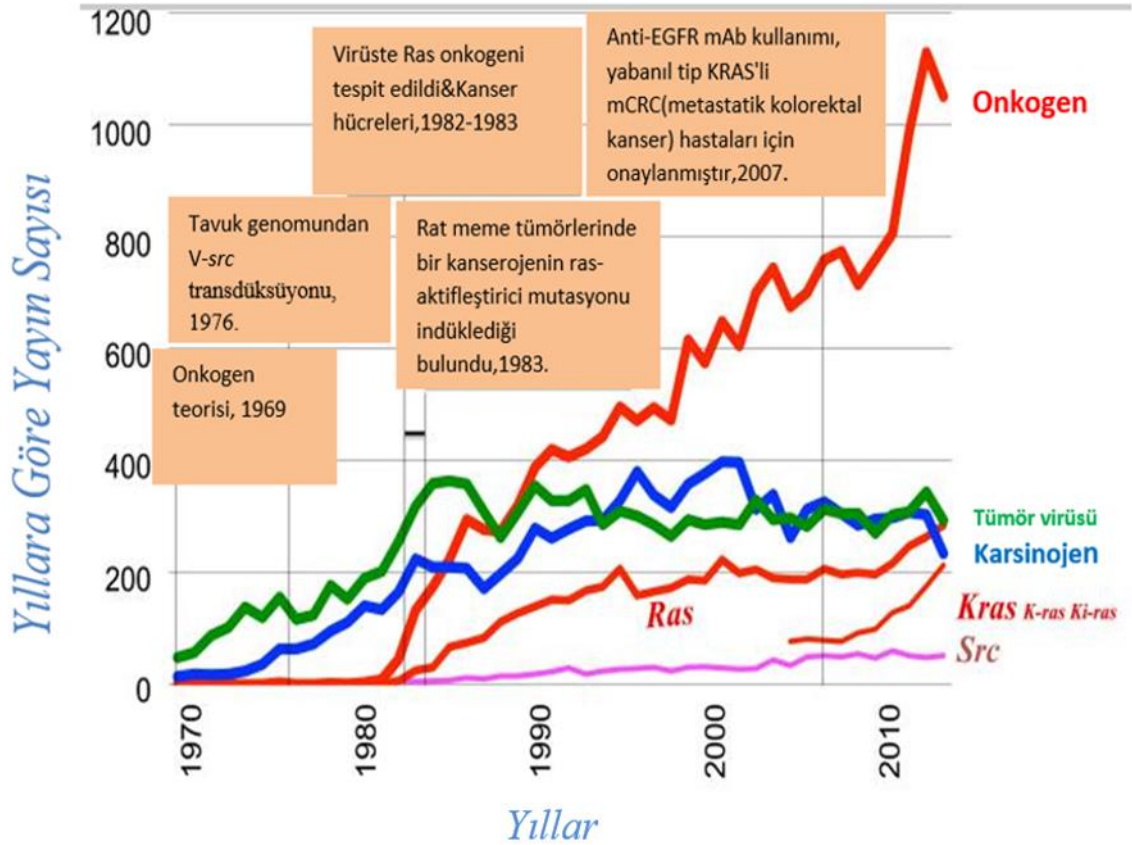
Sarkoma virüsü, 1916 yılında Peyton Rous tarafından bulunmuştur. Bu virüs araştırmacının adı ile Rous Sarkoma Virüsü (RSV) olarak adlandırılmıştır. Peyton Rous tarafından yapılan araştırmada tavuklardan elde edilen tümör ekstrelerinin sağlıklı tavuklardaki çeşitli dokulara enjekte edildiklerinde kanser oluşumuna yol açtıkları gösterilmiştir. 1970 ve 1980’lerde yapılan araştırmalar sıçan kaynaklı Harvey ve Kirsten kemirgen sarkoma retrovirüslerinin Ras (rat sarkoma virüsü) olarak adlandırılan ortak bazı genlerin aktivasyonu sonucunda kanser patojenezine yol açtıklarını göstermiştir. Bu çalışmaları takiben, bazı viral genlerin homologlarının fare ve insan hücrelerinde de bulunduğu anlaşılmış ve homologlar *H-Ras* (Harvey virüsü Ras) ve *K-ras* (Kirsten virüsü Ras) olarak adlandırılmışlardır (45).

Ras’ın kökeni retrovirüs araştırmalarına dayansada, 1982’de insan kanserlerinde mutasyonel olarak aktive edilmiş RAS genlerinin keşfedilmesi, Ras protein yapısını, biyokimyasını ve biyolojisini anlamak için yoğun bir araştırma gayreti uyandırdı. Nihai hedef, anti-Ras ilaçlarını kanser tedavisi için geliştirirken, Ras’tan elde edilen bulgular üç geniş bilim alanının temelini attı. Bunlardan birincisi, kanserin kökenleri üzerine moleküler seviyeye yönelik çalışmalara odaklanmışlardır ve kanserde mutasyona uğrayan genlerin keşfedilmesidir. İkincisi, Ras’ın sinyal iletimini kolaylaştırdığı biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılması, normal bir hücrenin ekstrasellüler sinyallere nasıl tepki verdiğini anlatan birçok temel kavramı ortaya koymuştur. Üçüncü olarak, Ras proteinleri, aynı zamanda, tüm önemli hücresel prosesleri düzenleyen ve biyolojide küçük GTP bağlayıcı proteinlerin çok yönlü rolünü sağlayan küçük GTPaz’ların büyük bir süperfamilyanın üyesi olduğu bulunmuştur (50).

Bu çalışmalardan kısa süre sonra Ras genlerinin mutasyona uğramış alelleri akciğer, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında tespit edilmiş ve Ras’ın onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları elde edilmiştir (46, 47). İlk olarak akciğer kanseri örneklerinde de aktif

Ras mutant alellerine rastlanması, Ras aktivasyonunun sadece hücre hatlarında in vitro oluşmadığının ilk kanıtı olmuştur (48, 49).

İnsan kanseri araştırmasında "Ras" keşfinin etkisini gösteren zaman çizelgesi ve onkojen tarihiyle ilgili önemli olaylar, 1969 ve 2014 yılları arasında yıllık olarak yayınlanan yayın sayıları şekil 2.8'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (56).



Şekil 2.8: "İnsan + karsinogenez" ve "onkojen", "tümör virüsü", "kanserojen", "ras" ve "Kras / K-ras / ki-ras" veya "src" anahtar kelimeleriyle 1969 ve 2014 yılları arasında yıllık olarak yayınlanan yayın sayısı tablolastırılmıştır. Kras / K-ras / ki-ras için olan sayılar Kras, K-ras veya ki-ras için ayrı olarak sayılmıştır, ancak örtüşen yayınlar sadece bir kez sayılmıştır. Sayılar İnsan Genom İsimlendirme Komitesinde (HGNC) güncellenmiş 2005 de tablo haline getirilmiştir KRAS2 (c-Ki-ras 2) için gen sembolü KRAS. Yayın Sayıları Temmuz 2015'te PubMed veritabanına (NCBI, NIH) dayanılarak sayılmıştır (56).

2.6.1. RAS'ın Moleküler Mekanizması

RAS yolağı hem insan hem de deneysel olarak uyarılmış hayvan tümörlerinde en yaygın görülen onkojenik değişikliklerden biridir (51). RAS proteinleri, aktif GTP'ye bağlı ve inaktif GDP'ye bağlı formlar arasında döngü oluşturan ve hücre zarı içinde başlatılan sinyal transdüksiyonları için moleküler anahtarlar olarak işlev gören küçük G

proteinlerdir (52). Ras proteinleri, kütlelerine (yaklaşık 21 kD) ve enzimatik aktivitelerine bakılarak küçük GTPaz'lar olarak adlandırılmışlardır (55).

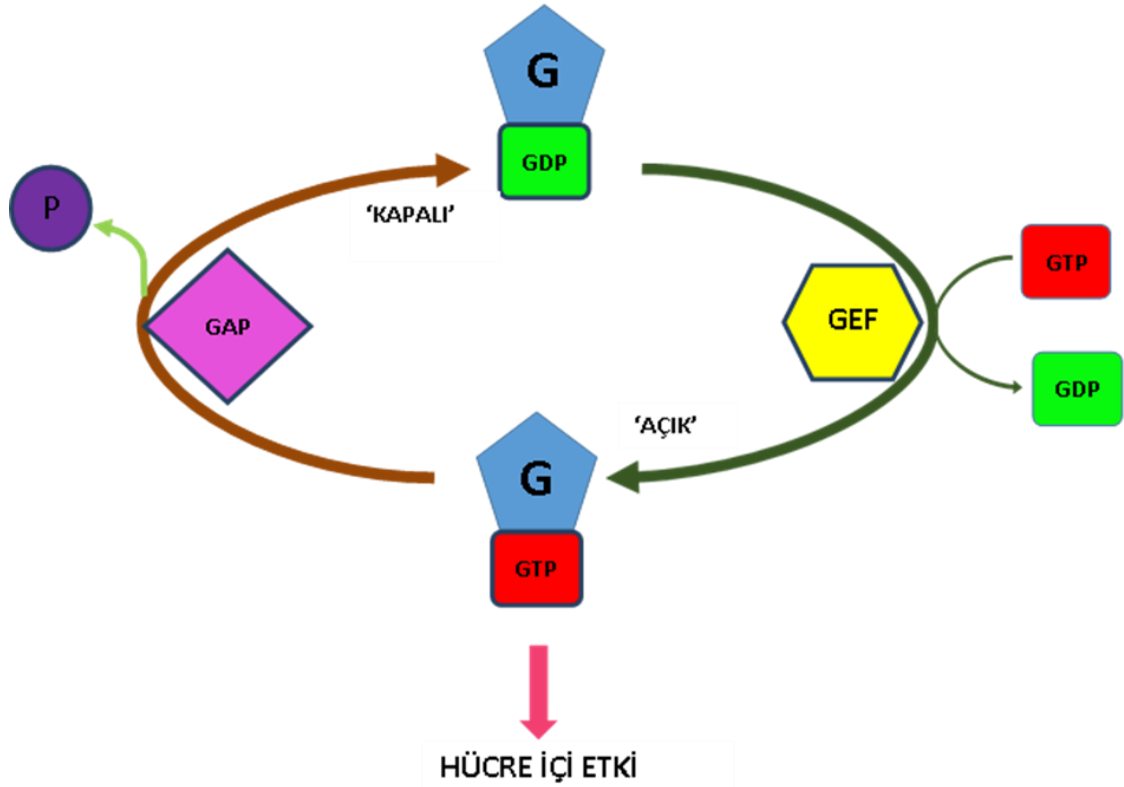
Sitosolde sentezlenen RAS proteinleri, farklı membran reseptörleri ile etkileşimde bulunan plazma membranının iç yaprağına aktarılır. Ras protein ailesinden olan küçük GTPaz'lar; hücre çoğalmasını, hücre farklılaşmasını ve hayatta kalmasını, hücre döngüsü ilerlemesi, büyüme, göç, hücre iskeleti değişiklikleri, apoptozis, yaşlanma ve gen ifadesini düzenleyen sinyal ağlarının temel bileşenleridir (52, 53). İnsan tümörlerinde sıkça bulunan *H-ras*, *N-ras* veya *K-ras* genlerinin kanserojen mutasyonları, bu sinyal yollarının normal sonucunu dengelemekte ve böylece tümör gelişimine yol açmaktadır (53).

Tüm Ras ailesi proteinleri guanin nükleotidlerini bağlamak ve hidroliz etmek için ortak moleküler yapı ve ortak bir yeteneğe sahiptirler. Ras proteinleri aktif (GTP bağlı) ve inaktif GDP (bağlı) formları arasında sürekli gidip gelirler. Proteinlerin (GAP)negatif işlevsel etkileşim ve (GEF) pozitif etkileşimden sorumlu hücrel düzenleyicileridir. Bu proteinlerin ikili davranış özellikleri, hücre dışı sinyallerin hücrelere transdüksiyonuyla ilgili geniş bir sinyalleme süreç yelpazesinde moleküler anahtarlar olarak işlev görmelerini sağlar (Şekil 2.9) (54).

Ras'ın aktivasyon mekanizması;

- I. Ras ailesi proteinleri GTP bağlı veya GDP bağlı formları ile, iki konformasyon arasında gidip gelerek hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değişmesine ve fosforilenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklerler.
- II. Ras'ın bağlanan GTP'yi hidrolizinden sonra, proteine bağlı kalan GDP'nin uzaklaştırılması için Guanin Değişim Faktörlerine (GEF; Guanine Exchange Factor) ihtiyaç vardır. GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaşarak, Ras'ın hücre içi derişimi daha fazla olan GTP'yi bağlayabilmesine olanak tanırırlar.
- III. Bağlanan GTP Ras'ın içsel GTPaz aktivitesi ile ve bunun yanı sıra, Ras'a bağlanan GTPaz Aktive edici Proteinler'in (GAP) etkisi ile hidrolize uğrar.
- IV. Ras'ın GTP bağlı konformasyonu, bu proteinin bağlandığı sinyal iletiminin daha alt basamağında bulunan moleküllerin (efektörlerin) de konformasyonel

değişiklik geçirmelerine ve fosforillenerek sinyal iletimine katılmalarına yol açar (55).



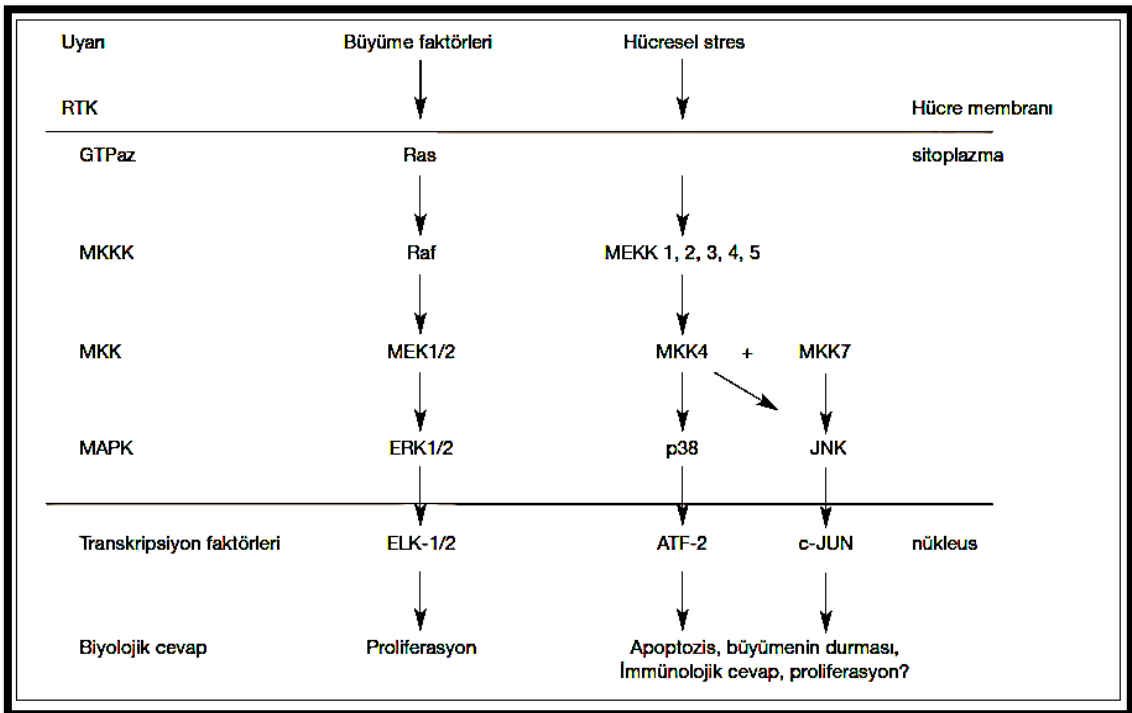
Şekil 2. 9: Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri. Şemada mavi renk ile işaretlenmiş G-proteinler GTP (kırmızı) bağlı oldukları durumda etkindirler ve bu hallerde hücre içi etkileri ortaya çıkar. Şekilde eflatun ile gösterilmekte olan GAP'lar GTP-bağlı Ras ailesi G-proteinleri ile etkileşerek GTP hidrolizini tetiklerler ve gamma fosfatın (mor yuvarlak) uzaklaşarak GTP'nin GDP'ye (yeşil) dönüşümünü sağlarlar. Bu hallerde, GDP-bağlı G-protein etkisini kaybeder ve sinyal iletim sistemi "kapalı" konuma gelir. Şemada sarı renkli altıgen ile gösterilen GEF'ler ise G-proteine bağlı kalmış olan GDP'nin uzaklaşarak yerine GTP bağlanmasını sağlayarak sistemi yeniden etkin konuma getirirler ve sinyal iletiminin yeniden "açık" hale gelmesini sağlarlar (55).

2.6.2. Ras / Raf / MEK / ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras / Raf / MEK / ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır (74).

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiasyon faktörleri ve tümör promoter maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler

(Şekil 2.10). Ras ve Raf protoonkogendir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnesilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif



Şekil 2.10: MAPK ailesi ve sinyal iletimi. ATF: “Activating transcription factor”, ERK: “Extracellular signal regulated kinase”, GTP: “Guanosine triphosphate”, JNK: “c-Jun N-terminal kinase”, MAPK: “Mitogen-activated protein kinase”, MEK: “Mitogen extracellular signal regulating kinase”, MEKK: “MAPK / ERK kinase kinase”, MKK: “MAPK kinase”, MKKK: “MAPK kinase kinase”, p38: “p38 kinase”, RTK: “Receptor tyrosine kinase” (74).

düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (74).

2.6.3. RAS Efektörleri

2.6.3.1. RAF1

Ras efektörü olarak tanımlanan ilk proteindir (55). Kinazlar, üç serin / treonin kinazdan oluşur, Ras-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sinyalleme kaskadının bir parçasıdır ve MEK'yi (MAPK / ERK) fosforile eder (76).

Memelilerde A-Raf, B-Raf ve Raf-1 olarak adlandırılmış üç tane Raf izoformu vardır. Aktif haldeki GTP-Ras, bir serin / treonin kinaz olan Raf1'in fosforillenmesine yol açar ve MAPK / ERK (MEK) ile başlayarak ERK 1/2 ile devam eden ve E26-transkripsiyon faktörünün (ETS) aktivasyonuna yol açan sinyal yolağının fosforillenme şelalesi ile aktive olmasını tetikler. Kontrolsüz olarak aktif hale gelen Raf-MEK-ERK sinyal iletiminin kemirgen hücre hatlarının onkogenik transformasyonu için yeterli olduğu ve benzer bir bozulmanın insanda kanserleşmeye yol açtığı gösterilmiştir (55).

2.6.3.2. PI-3 Kinaz

Raf1 örneğinde olduğu gibi, PI3-K aktivitesinin de Ras'a bağlı onkogenik transformasyon için gerekli olduğu tanımlanmıştır. Aynı zamanda Ras'ın apoptozu engelleyici etkilerinin de PI3-K proteininin AKT (ser / tir kinaz) / Protein Kinaz B ve bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB proteinleri üzerinden çalışan kontrollü hücre ölümü (anoikis) karşıtı rolü ile açıklanmaktadır (55).

2.6.3.3. RalGDS

Önce maya ikili-hibrid deneyleri, bunun ardından da yapılan bağışık-çökeltme deneyleri ile, Ras benzeri (Raslike) bir GTPaz olan Ral'ın aktivasyonuna yol açan bir nükleotid değişim faktörü (RalGEF) olan RalGDS proteininde Ras'ın efektörleri arasında olduğu ortaya konulmuştur. Buna ek olarak, bu proteinin homologları Rgl ve Rlf'nin de Ras efektörleri olduğu ve her üç proteinin de (RalGDS, Rgl ve Rlf) Ral üzerinde nükleotid değişim etkilerinin olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, Ral'ın insülin ve epidermal büyüme faktörü (EGF) varlığındaki aktivasyonu, dominant-negatif Ras proteinleri tarafından inhibe edilmiş ve bu sonuç Ral-RalGDS yolağının Ras'ın altında çalıştığını kanıtlamıştır (55).

2.6.3.4. TIAM-1

TIAM-1 proteininin de bir Ras efektörü olduğu Lambert ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. TIAM-1 geni delesyona uğratılmış fareler Ras yolağının aktivasyonu ile

oluşan deri kanseri türüne dayanıklı hale gelmiş, bu sonuç da bahsedilen deri kanserlerinin Ras aktivasyonu ile ortaya çıkabilmesi için TIAM-1 proteinine ihtiyaç olduğunu, dolayısı ile TIAM-1'in Ras yolağının bir parçası olarak görev yaptığını ortaya çıkarmıştır (55).

2.6.3.5. AF-6, RIN1 ve RASSF

AF-6, RIN1 ve RASSF proteinleri Ras efektörleri oldukları gösterilmiş olmakla beraber, yukarıdakilere kıyasla işlevleri ile ilgili daha az bilimsel veriye erişilmiş faktörlerdir. Bu efektörlerden AF-6, mikrotübül ve aktin bağlayıcı protein motifleri taşımaktadır ve hücre iskeleti ile etkileşerek hücrenin polaritesini belirlemektedir (55).

2.6.3.6. RASSF

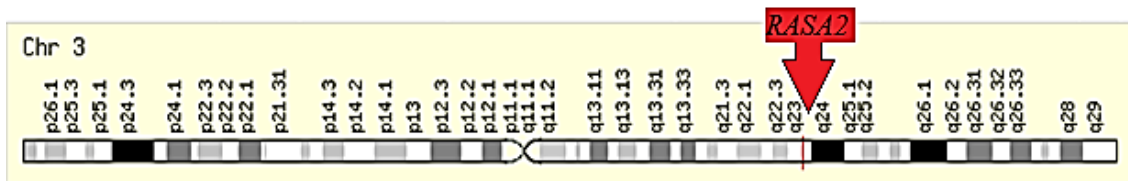
RASSF proteinlerinin ise memelilerde *MST1* ve *MST2* ile etkileşerek siklin-E (cyclin-E) aktivitesini engellediği ve hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (55).

RAS proteinleri ve GTPaz'ların hücre farklılaşması, büyümesi, hücre içi protein taşınması gibi birçok hücrel işlevi vardır (55).

Ras proteinlerini aktive eden bazı mutasyonların GTP hidrolizini engelleyerek anormal Ras-GTP formlarının hücre içerisinde birikmesine yol açtığı ve bu yolla kontrol dışı hücre çoğalmasını tetiklediği bilinmektedir. Ras genlerinde aktivasyona yol açan bu tür mutasyonlar insanlarda tüm kanserlerin %30'unda görülmekte ve Ras ailesi genlerinde oluşan mutasyonların sıradışı proliferasyon ve tümörleşmedeki önemli rolüne dikkat çekmektedir (55).

2.7. RASA2 GENİ ve KANSERLE İLİŞKİSİ

RASA2 (RAS P21 Protein Aktivatörü 2) geni 24 ekzonlu 5614 bp büyüklüğünde 3q23 bölgesine yerleşmiş 849 aminoasitten oluşan bir gendir (ENST00000286364.7) (Şekil 2.11) (58). *RASA2* ayrıca GAP1M olarakta bilinir (68).



Şekil 2.11: *RASA2* gen lokusu

Bu gen tarafından kodlanan protein, GTPaz ile aktive edici proteinlerin GAP1 ailesinin üyesidir. Gen ürünü, normal RAS p21'in GTPaz aktivitesini uyarır, ancak onkojenik karşılığını uyarmaz. Protein, RAS işlevinin bir bastırıcısı olarak görev yaparak, RAS proteinlerinin zayıf intrinsik GTPaz aktivitesini arttırır. Bu durum aktif olmayan GDP'ye bağlı RAS formuyla sonuçlanır. Bu da hücrel proliferasyon ve farklılaşmanın kontrol edilmesini sağlar (68).

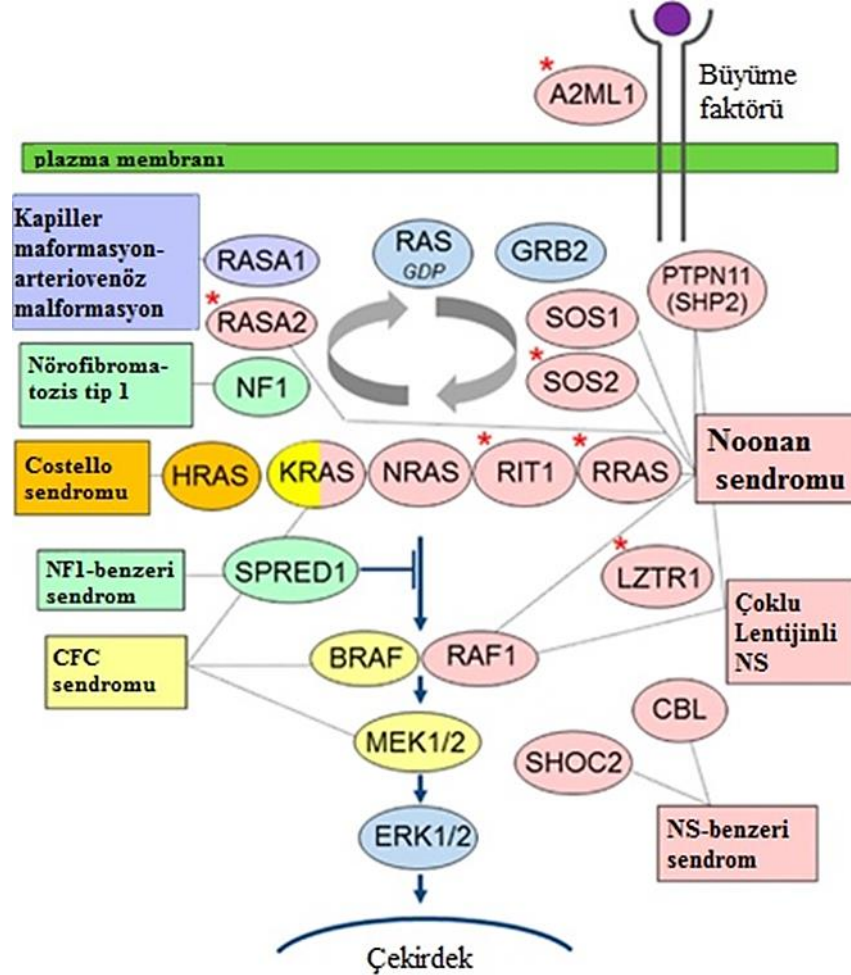
RASA2 Ras-siklik AMP yolağının önleyici regülatörüdür. İnositol tetrakisfosfatı (IP4) bağlar (58). Inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisfosfat (IP4), ikinci bir haberci olarak işlev gördüğü ileri sürülen, her yerde bulunan bir inositol fosfattır (69). İnositol fosfatlar, çok sayıda hücrel fonksiyonda yer alan önemli sinyal molekülleridir. İnositol 1, 3, 4, 5-tetrakisfosfat (IP4), uyarılmış hücrelerde Ins (1, 4, 5) P3'ten IP3 3-kinaz (Itpkb) ile üretilir. IP4, hücre içi kalsiyumu harekete geçirmek için IP3 ile birlikte hareket eder. Bunlara ek olarak IP4, T hücresi prekürsör gelişimi ve tepki verme ve antijenlere timosit reaktivitesinde rol oynar (71).

RASA2 ile ilişkili hastalıklar Noonan Sendromu 1 ve nörofibromatoz, Tip 2'yi içerir. İlgili yolları arasında RET sinyalizasyon ve bağışıklık sistemi vardır (58).

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NS'lu (Noonan sendromu) üç bireyde *RASA2* varyantları tanımlanmıştır (57). Mutasyona uğramış *RASA2*, *MAP2K1* veya *RIT1* allellerinin heterolog hücrelerde ekspresyonu, NS patogenezinde rol oynayan RAS-ERK yol aktivasyonunu artırmıştır (Şekil 2.12). İki hastada birden fazla hastalığa bağlı varyant görülmüştür. Dahası, başlangıçta NS'ye sahip olduğu düşünülen bir kişinin tanısı, bu hastada saptanan bir *NF1* missens mutasyonuna dayanılarak nörofibromatoz tip 1'e revize edilmiştir. Bir başka hastada, protein stabilitesinin azalmasına ve RAS-ERK aktivasyonunu baskılama yeteneğinin bozulmasına neden olan bir *NF1* mutasyonu saptanmıştır. Bununla birlikte, bu hastanın NS benzeri bir fenotip göstermeye devam ettiği görülmüştür (70).

Rand Arafeh ve arkadaşları tarafından Melonoma kanseri ile yapılan araştırmada *RASA2* nin melonoma için tümör supresör gen olduğu bildirilmiştir. Melanom olan hastalarda *RASA2* geni ekspresyonu çalışılmış ve gen ekspresyonun $\geq 30\%$ 'dan fazlasının kaybolduğu görülmüştür. Ekspresyon kaybındaki artış hastaların sağ kalma oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. *RASA2*'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının RAS

aktivasyonunu etkilediği ve melonoma hücresinin büyümesini ve göçünü arttırdığı bulunmuştur. Bu bulgular, *RASA2* inaktivasyonunun bir melonoma tetikleyicisi olduğunu tanımlıyor ve kanserde RasGAP'ların önemini vurguluyor (72).

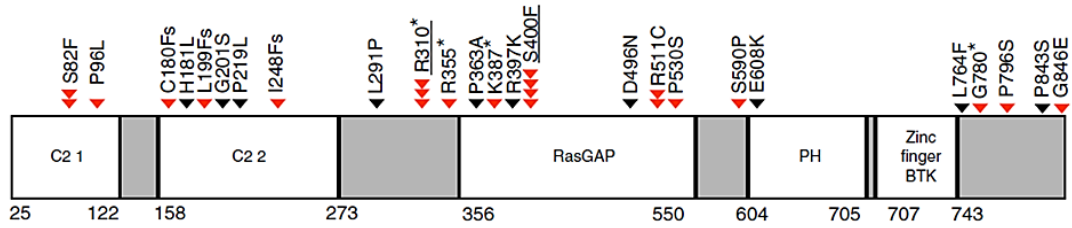


Şekil 2.12: İlgili genlerin germline mutasyonlarını içeren RAS / MAPK kaskadı ve bozuklukları. MAPK, mitojenle aktive protein kinaz; NF1, nörofibromatoz tip 1; NS, Noonan sendromu. 2013'ten beri rapor edilen olası genleri gösterir (57).

Bu çalışma sonucunda melanom için öncelikli genler nonsinonim mutasyon frekansına göre sıralanmıştır (Tablo 2.2). Daha sonra nonsense ve çerçeve kayması mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar tüm genom mutasyonlarının %20'sini kapsamaktadır. Bu da tümör süpressör gen için önerilen bir eşik değeri oluşturmaktadır. Tablo 2.2'de *RASA2* geninin %5.4'ünde mutasyona uğradığı ve mutasyonların %27'si fonksiyon kaybına yol açan değişiklikler olduğu görülmektedir. *RASA2* geninde oluşan mutasyonel değişiklikler şekil 2.13'de gösterilmiştir (72).

Tablo 2.2: Melanom için öncelikli olarak tanımlanan genlerin en az %20'sinde fonksiyon kaybı mutasyonu vardır (72).

GEN	Mutasyona uğramış tümör yüzdesi	Fonksiyon kaybına neden olan mutasyonların yüzdesi
<i>TP53</i>	17.1	33.3
<i>NF1</i>	14.4	42.0
<i>ARID2</i>	12.6	53.0
<i>CDKN2A</i>	12.4	57.6
<i>PTEN</i>	8.8	44.4
<i>SETD2</i>	5.4	32.4
<i>RASA2</i>	5.4	27.3

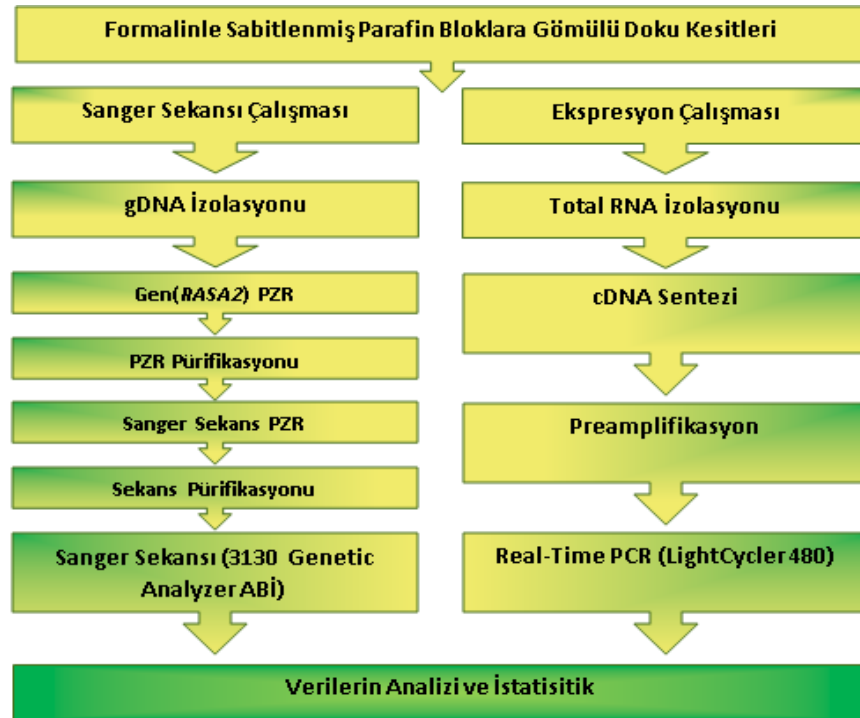


Şekil 2.13: İnsan *RASA2* proteininde korunmuş alanlar bloklar halinde gösterilmiştir. C2 alanı ilk tekrarlama (C2 1), C2 alanı ikinci tekrar (C22), RAS GTPaz aktive edici alan (RasGAP), Pleckstrin homology domain (PH) ve Bruton'un tirozin kinaz sisteini zengin motifi (BTK). Somatik değişiklikler ok uçları ve amino asit değişiklikleri ile temsil edilmektedir. Kırmızı üçgenler zararlı değişiklikleri temsil eder. Altı çizili değişiklikler işlevsel olarak değerlendirilmiştir (72).

3. GEREÇ 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 ulaşabilen 40 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak aynı hastaların tümör içermeyen doku blokları kullanılmıştır. Toplam 80 örnekten Tıbbi Patoloji AD'dan 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 3.1'de gösterilen çalışma planına göre işlemler yapılmıştır.



Şekil 3.1: Çalışma Planı.

3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

- Buzdolabı (+4 °C Hotpoint Ariston)
- Derin Dondurucu (-20 °C Beko)
- Derin Dondurucu (-80 °C 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)
- 3130 Genetic Analyzer Cihazı (Applied Biosystems - HITACHI)
- Distile su cihazı (Millipore Direct-Q 3 with UV)
- PZR cihazı (Thermal cycler) (GeneAmp® PZR System 9700 - Applied Biosystems)
- PZR cihazı (Thermal cycler) (T100™ Thermal Cycler - Bio-Rad)
- Real Time PZR 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 santrifüj cihazı (Centrifuge PerfectSpin P, Peqlab)
- Santrifüj cihazı (Micro 200R Hettich Zentrifugen)

3.2.2. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Dokulardan RNA İzolasyonu ve Ekspresyon Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan RNA izolasyon kiti
 - High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche)
- cDNA sentez kiti
 - Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
- İlgili genlere göre dizayn edilmiş primerler ve probalar
 - 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)

3.2.3. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Dokulardan DNA İzolasyon ve Dizi Analiz Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- Formalin ile fikse parafine gömülü dokulardan bisülfittenmiş DNA izolasyonukiti
 - QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)
- RASA2 geninin 2'inci, 10'uncu, 11'inci, 12'inci, 15'inci ekzon bölgelerini sentezleyen primerler
 - Sentromer DNA Teknolojileri
- PZR'da kullanılan malzemeler
 - Master mix (GML)
 - Taq Polimeraz (GML)
 - Distile Su (GML)
 - Enhancer (GML)
- Pürifikasyon için kullanılacak malzemeler
 - ExoSAP (GML)
 - Sephadex + Sephadex Column (GML)
- Sanger Sekans ile dizileme öncesi kullanılacak kimyasal malzemeler
 - BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- 3130 Genetic Analyzer cihazı ile uyumlu plate
 - MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)
 - Plate Septa 96-Well (Applied Biosystems)

3.3. YÖNTEMLER

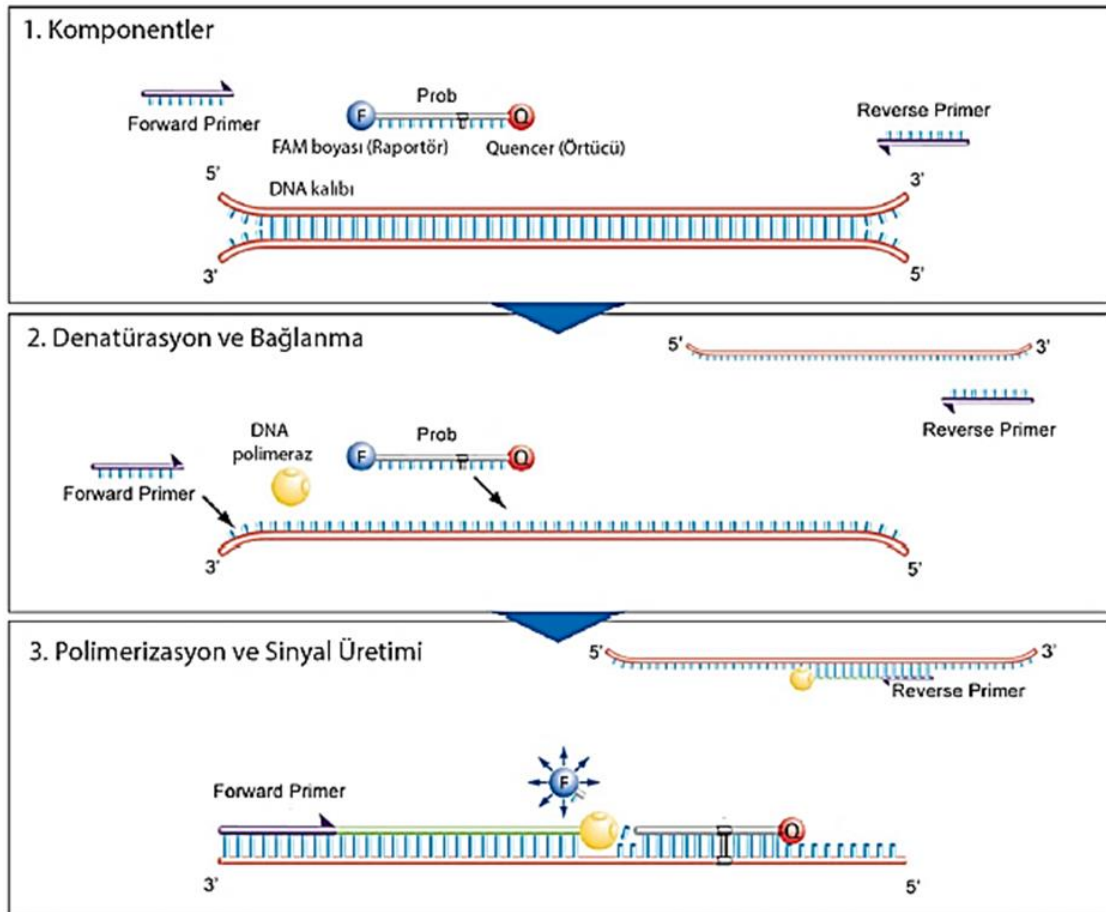
3.3.1. Ekspresyon Çalışması

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

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) oligonükleotid primerler kullanarak DNA'nın ilgilendiğimiz bölgesinin in vitro ortamda çok sayıda kopyasını oluşturmaya yarayan reaksiyonlar bütünüdür. PZR 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 PZR'da ürünler ancak PZR işlemi sonlandıktan

sonra değerlendirilebilir. Real-Time PZR’da ise diziye spesifik ya da diziden bağımsız floresan probler ve boyalar kullanılarak PZR çoğaltımı gerçek zamanlı olarak gözlemlenir (73).

Real-Time PZR’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 probler kullanılır. Bu probler Real-Time PZR cihazları tarafından saptanabilecek florofor içerirler ve DNA’daki spesifik bölgesine bağlanırlar. Çok farklı şekillerde tasarlanmış probler bulunmaktadır. Bunlar; hidroliz (TaqMan) probları, moleküler beacon, hibridizasyon probları, LightUp prob, scorpion prob ve single problardır (73).

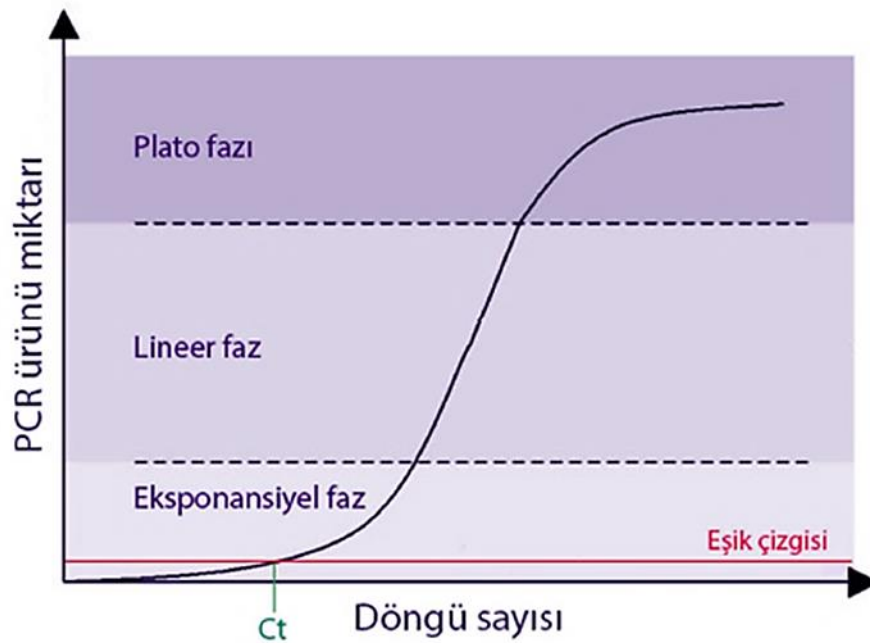


Şekil 3.2: Real-Time PZR’da hidroliz problarının çalışma prensibi.

Çalışmamızda FAM ile etiketlenmiş, kilitli nükleik asit (LNA / locked nucleic acid) içeren hidroliz probları (Roche RealTime ready Catalog / Designer Assays)

kullanılmıştır. Hidroliz problemlerinin 5' ucunda bir raportör (R) florofor (ör. FAM), 3' ucunda ise floroforun yaydığı ışığı baskılayan (Quencer / Q) bir boya (ör. TAMRA) bulunur. Prob PZR'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 ışınması tespit edilir (Şekil 3.2). Her döngüde üretilen amplikon miktarına bağlı olarak cihaz tarafından tespit edilen sinyal şiddeti de artar (73).

PZR amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel, lineer ve plato fazı olmak üzere 3 safha gözlenir (Şekil 3.3). Eksponansiyel fazda reaksiyon verimi tamdır, ürünler geometrik olarak artar. Real-Time PZR'da değerlendirmeler bu fazda yapılır. Lineer fazda reaksiyon bileşenleri tükenmeye başlar ve reaksiyon yavaşlar. Plato fazında ise reaktifler artık tükenmiştir, ürün yapımı durur. Real-Time PZR'da pozitif reaksiyon floresan sinyallerinin birikimi ile saptanır. Ct (Cycle threshold / Eşik döngüsü) 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 (73).



Şekil 3.3: Real-Time PZR'da amplifikasyon eğrisi ve fazlar.

3.3.1.2. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Doku Kesitlerinden RNA İzolasyonu

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

3.3.1.2.1. Deparafinizasyon İşlemi

- 1) Her bir örnek için 1.5 ml'lik reaksiyon tüpüne 5 µm kalınlıktaki yaklaşık 200 mm² alana sahip parafinli doku kesiti koyuldu.
- 2) 800 µl ksilen eklenip kısa aralıklarla vortekslendi
- 3) 400 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 4) 16000 x g hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 5) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 6) 1000 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 7) 16000 x g hızında 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 8) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 9) Kalan etanol kalıntılarında kurtulmak için tüpler 55°C'de 10 dakika (gerekirse 20 dakika) kapağı açık bir şekilde bekletildi.

3.3.1.2.2. RNA İzolasyon İşlemi

- 1) Deparafinizasyon aşaması sonucunda elde edilen pellete aşağıdaki maddeler sırayla ya da üçünden bir karışım elde edilerek eklendi.
 - a. 100 µl RNA tissue lysis buffer
 - b. 16 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat)
 - c. 40 µl Proteinaz K
- 2) Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 3) 30 dakika 85°C'de inkübe edildi. Bu sırada 600 rpm'de çalkalandı.
- 4) Kısa santrifüj yapıldı. 55°C'nin altına soğuyana kadar beklendi.
- 5) 80 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi. Kısa santrifüj yapıldı.
- 6) 55°C'de 30 dakika bekletildi. Bu sırada 600 rpm'de çalkalandı.
- 7) Karışımın içerisine;
 - a. 325 µl RNA binding buffer
 - b. 325 µl %100'lük etanol eklendi. Sırasıyla kısa vorteks ve kısa santrifüj yapıldı.

- 8) Toplama tüpüne filtre tüpü yerleştirildi. Hazırlanan karışım filtre tüpünün içine alındı (yaklaşık 900 µl).
- 9) 30 sn 6000 x g'de santrifüj yapıldı.
- 10) Toplama tüpü değiştirildi. 16000 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 11) Toplama tüpü değiştirildi. 100 µl DNase working solution eklendi. 15°C – 25°C arasında 15 dakika bekletildi.
- 12) 500 µl wash buffer 1 eklenip 6000 x g'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 13) 500 µl wash buffer 2 eklenip 6000 x g'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. (Bu aşama 2 defa yapıldı.)
- 14) Hiçbir ekleme yapılmadan 16000 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
- 15) Filtre tüpü 1.5 ml'lik tüpe yerleştirildi.
- 16) 30 µl RNA elution buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
- 17) 6000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtre tüpü atıldı.
- 18) 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.
- 19) RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

3.3.1.3. cDNA Sentez İşlemi

-80°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 3.1'de gösterildiği gibi primer ve kalıp RNA karışımı PZR tüplerinde hazırlandı.
- 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 3.2'deki miktarlarda eklendi.
- Tüpler PZR cihazına konuldu ve 10 dakika 29°C'de, 60 dakika 48°C'de inkübe edildi.

Tablo 3.1: cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için).

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

Tablo 3.2: Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	Hacim (1X)	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	

- 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 İşlemi

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 3.3: Pre-Amp PZR reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Hacim (1X)
RealTime ready cDNA Pre-Amp Master	5 µl
Dilüe edilmiş primerler	Her bir primer için 1.4 µl
cDNA	5 µl
PZR seviyesi su	Toplam hacim 25 µl olacak kadar
Toplam hacim	25 µl

- Tablo 3.3'e göre Pre-Amp PZR reaksiyon karışımı hazırlandı.
- Termal Cycler cihazı kullanılarak tablo 3.4'deki termal döngü koşulları uygulandı.

Tablo 3.4: Preamplifikasyon için termal döngü koşulları.

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

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

3.3.1.5. Real-Time PZR

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 3.5: Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer dizileri.

Gen	Assay ID	Primer Dizisi
<i>RASA2</i>	123254	Forward:GATAAACTTGTTTCCTTTTGCCACT
		Reverse:GCCAGGGAATTTCTCTAAAA
<i>ACTB</i>	143636	Forward: TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA
		Reverse: CGTGGATGCCACAGGACT

Çalışmada her bir gene özgü RealTime ready Catalog ve Designer Assays (RocheDiagnostic GmbH, Mannheim, Almanya) primer-prob kitleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin dizileri tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.6: LightCycler 480 Probes Master PZR karışımı.

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

- LightCycler 480 Probes Master kullanılarak tablo 3.6'ya göre Real-Time PZR karışımı hazırlandı.
- 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 3.7'deki programa göre çalışma başlatıldı.

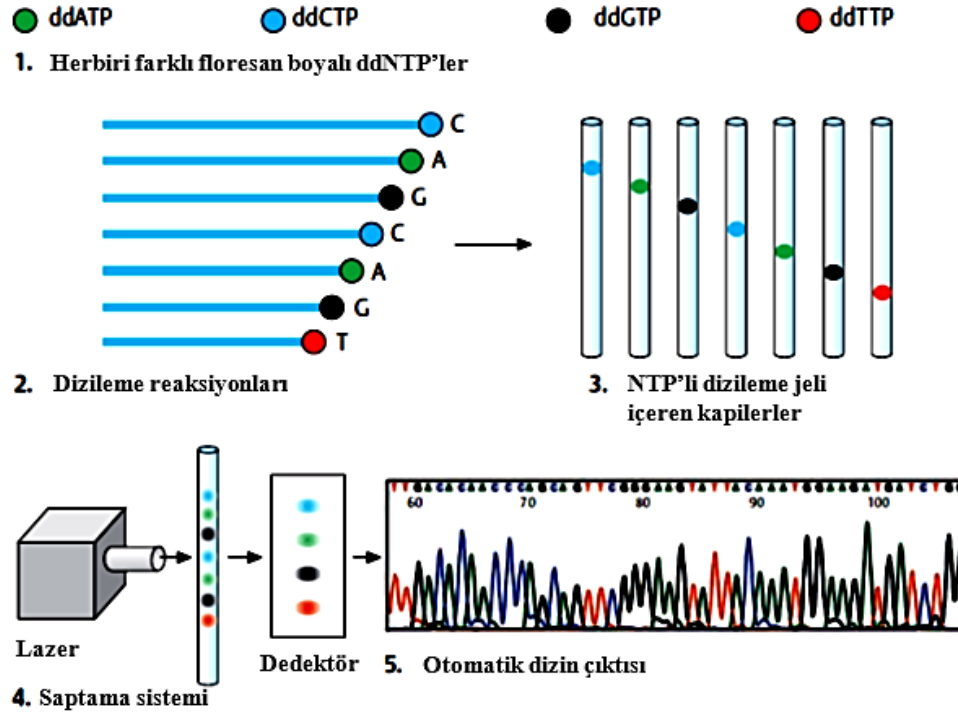
Tablo 3.7: Real-Time PZR termal cycluser döngüsü (LightCycler 480).

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık / artış-azalış hızı (°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	4 °C	30 sn	2.2

3.3.2. Sanger Sekans Çalışması

Sanger dizi analizinin günümüzde uygulanan şekli PZR sürecine normal nükleotidlerin yanı sıra bunların analoglarının da kullanılması ile rastlantısal olarak DNA zincir uzamasının inhibisyonu prensibine dayanır. Bu reaksiyonda kullanılan analoglar dideoksi nükleotid trifosfatlardır (ddNTP). 2', 3'dideoksi nükleotid trifosfatların (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) dNTP'lerden farklı deoksiriboz'un 3' karbonunda hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Bu nedenle normal dNTP ile yarışan ddNTP son baz olarak eklendiğinde zincirin uzaması engellenmiş olur. PZR sonucunda farklı uzunlukta DNA ürünleri ortaya çıkar. Reaksiyon ürünü otomatize olmuş DNA analiz cihazlarında lazer dedektörüne sahip bir kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilir. Farklı ddNTP moleküllerinin oluşturduğu farklı renkteki floresan sinyal PZR sürecinde sentezlenen ürünün boyunun işlevi olarak dedektörden geçerken algılanır ve kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar elektroferogram olarak adlandırılan bir grafik şeklinde bilgisayar ekranına aktarılır. Bu şekilde her bir

reaksiyonda yaklaşık 1000 bp uzunluğunda DNA bölgesinin dizi analizi gerçekleştirilebilir (82).



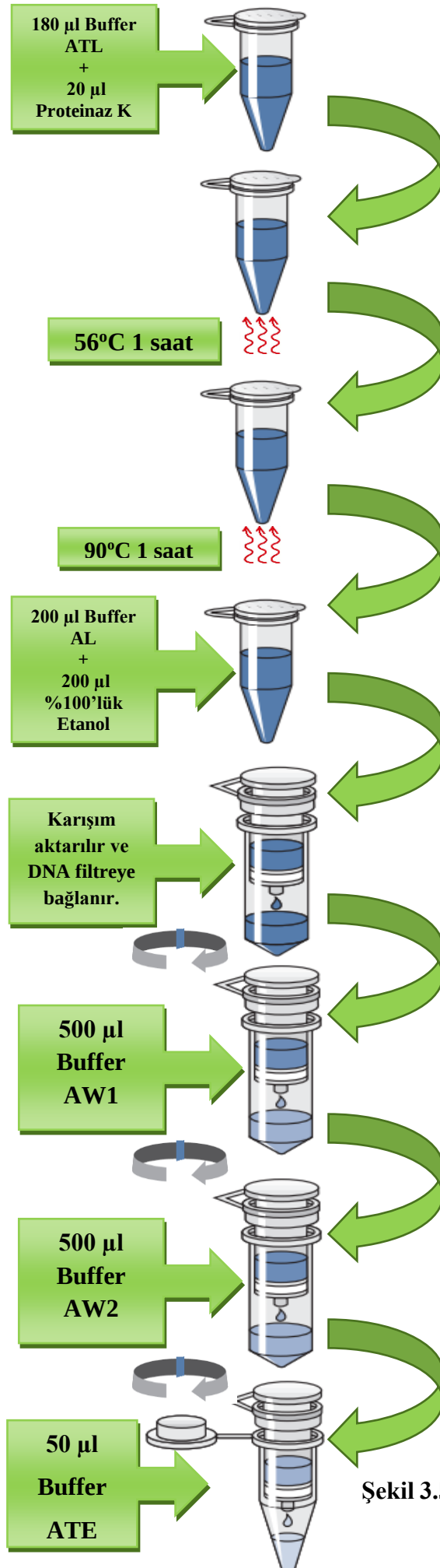
Şekil 3.4: Otomatik Dna Dizileme. 1: Dideoksi nükleotid trifosfatlar, 2: Reaksiyon ürünü, 3: Jelli kapillerler, 4: Dedektör sistemi, 5: Elektroferogram kaydı (77).

3.3.2.1. Formalin İle Fikse Parafine Gömülü Doku Kesitlerinden gDNA İzolasyonu

Doku kesitlerinden gDNA izolasyonu için QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) (Cat. No. 56404 Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı. Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı (Şekil 3.5).

3.3.2.1.1. Deparafinizasyon İşlemi

- 1) Her bir örnek için 2 ml'lik reaksiyon tüpüne 5 µm kalınlıktaki yaklaşık 200 mm² alana sahip parafinli doku kesiti koyuldu.
- 2) 1500 µl ksilen eklenip kısa aralıklarla vortekslendi.
- 3) Oda sıcaklığında (15–25°C) 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- 4) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 5) 1000 µl ksilen eklenip kısa aralıklarla vortekslendi.
- 6) Oda sıcaklığında (15–25°C) 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.



Şekil 3.5: QIAamp DNA FFPE Tissue prosedürü.

- 7) 1500 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 8) Oda sıcaklığında (15–25°C) 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- 9) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 10) 1000 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 11) Oda sıcaklığında (15–25°C) 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- 12) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 13) 750 µl %100'lük etanol eklenip kısa vorteks yapıldı.
- 14) Oda sıcaklığında (15–25°C) 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- 15) Pellet dağıtılmadan süpernatant atıldı.
- 16) Kalan etanol kalıntılarından kurtulmak için tüpler 37°C'de 10 dakika (gerekirse 20 dakika) kapağı açık bir şekilde bekletildi.

3.3.2.1.2. DNA İzolasyon İşlemi

- 1) Deparafinizasyon aşaması sonucunda elde edilen pellete 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklenerek kısa vorteks ve spin yapıldı.
- 2) 56°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı (veya numune tamamen eriyene kadar).
- 3) Sonra tüplerin kapakları parafinlenerek 90°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- 4) Kapaktaki oluşan damlaları indirmek için kısa bir santrifüj (spin) yapıldı.
- 5) Örneklerin üzerine 200 µl Buffer AL eklenerek vorteksleme ile iyice karıştırıldı sonra üzerine 200 µl %100'lük etanol eklenerek vorteksleme ile iyice karıştırıldı.
- 6) Kapaktaki oluşan damlaları indirmek için kısa bir santrifüj yapıldı.
- 7) Hazırlanan karışım QIAamp MinElute column tüpünün içine alındı (yaklaşık 600 µl). Tüpün ağzı kapatılarak 8000 rpm de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra toplama tüpü atılarak kolonlu tüp yeni toplama tüpünün içine konuldu.
- 8) QIAamp MinElutecolumn tüpün üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenip tüpün ağzı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra toplama tüpü atılarak QIAamp MinElute column yeni toplama tüpünün içine konuldu.
- 9) QIAamp MinElute column tüpün üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenip tüpün ağzı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra toplama tüpü atılarak QIAamp MinElutecolumn yeni toplama tüpünün içine konuldu.
- 10) Sonra 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılarak membran tamamen kurutuldu.
- 11) QIAamp MinElute column tüp 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- 12) 50 µl Buffer ATE eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

- 13) 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. QIAamp MinElute column tüpü atıldı.
- 14) DNA 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 DNA izolasyonu yapıldı.
- 15) DNA'lar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.3.2.2. PZR İşlemi

-80°C 'de muhafaza edilen gDNA'lar *RASA2* geninin çoğaltılmasında kullanıldı. *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12 ve 15. ekzonlarının amplifikasyonu için PZR miksleri (GML) ve *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12 ve 15. ekzonlarını sentezleyen primerler (sentromer-DNA Teknolojileri, İsitinye / İstanbul) kullanıldı (Tablo 3.8). Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

- PZR işlemi için GML PZR master mixleri kullanarak tablo 3.9'daki reaksiyon karışımları hazırlandı.
- Her bir çift primer için farklı hazırlanan karışımlar PZR tüplerine 14.75'er µl dağıtılarak üzerlerine 1.5'er µl gDNA eklendi.
- Amplifikasyon için optimize PZR koşulları tablo 3.10'da verilen termal cycler programı ayarlandı ve PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: Amplifikasyon ve sekans primerleri.

Oligo No	Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'
70111A4322-10	<i>RASA2_seq_2_F</i>	CAT TAA TAT GTT CTT TCA GAT TGA AGT
70111A4322-1	<i>RASA2_seq_2_R</i>	TTC TCA GCA CAA CTC TGC ACT
70111A4322-2	<i>RASA2_seq_10_F</i>	TGT AAT ATC TAT GCT TTT TGT TTC CTG
70111A4322-3	<i>RASA2_seq_10_R</i>	CTG TTC AAT CAC TAG CCT GTA AAA
70111A4322-4	<i>RASA2_seq_11_F</i>	AAG GAT ATG ATT TAA CAC GAA ACG
70111A4322-5	<i>RASA2_seq_11_R</i>	AAG GTA GGT GAA TAC TGT TTG ATA GC
70111A4322-6	<i>RASA2_seq_12_F</i>	GCA AGC TTT TAA ATA AAT GGT AAA AAT
70111A4322-7	<i>RASA2_seq_12_R</i>	TTC TAA GTA GTC TGA CAA AAT GAA AAT
70111A4322-9	<i>RASA2_seq_15_F</i>	TCT TCT TGC AGG TGA GGA AAG
70111A4322-8	<i>RASA2_seq_15_R</i>	CCC CTT TGT ACT CAT CAC CA

Tablo 3.9: PZR reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Hacim (1X)
GML PZR Mix	7.5 µl
GML Taq. Pol. (5U/µL)	0.25 µl
RASA2- 2, 10, 11, 12 ve 15. Forward Primerler (0,5µM)	1.5 µl
RASA2- 2, 10, 11, 12 ve 15. Reverse Primerler (0,5µM)	1.5 µl
GML Enhancing Buffer	3 µl
GML Distilled Water	1 µl
Toplam Hacim	14.75 µl

Tablo 3.10: Termal cycler programı (GeneAmp® PZR System 9700 - Applied Biosystems).

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Aktifleştirme	1	95 °C	10 dk
Amplifikasyon	45	95 °C	40 sn
		55 °C	1 dk
		72 °C	50 sn
Final uzatma	1	72 °C	7 dk
Sonlanma	1	4 °C	∞

- Amplifikasyonu belirlemek için %2'lik agaroz jelde 120 voltta 45 dk. yürütüldü ve yaklaşık 700 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi.

3.3.2.3. PZR Pürifikasyon İşlemi

- Her bir çift Primer için PZR tüpleri hazırlandı.
- Hazırlanan PZR tüplerine 2'şer µl GML ExoSAP enzimi eklendi.
- Amplifiye olmuş PZR ürünlerinden her bir tüpe 5 µl eklendi.
- Kısa bir vorteks yapıldı ardından kısa bir santrifüj yapıldı.
- Son hacim 7 µl olacak şekilde tablo 3.11'deki termal cycler programı uygulanarak pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.11: PZR pürifikasyon termal cycler programı.

	Sıcaklık	Süre
Enzim inkübasyonu	37 °C	30 dk
Enzim inaktivasyonu	80 °C	15 dk
Sonlanma	4 °C	∞

3.3.2.4. Sanger Sekans PZR İşlemi

- Sekanslama reaksiyon karışımı (Tablo 3.12 ve Tablo 3.13) ve her PZR ürünü için iki tüp hazırlandı (Forward ve Reverse).

Tablo 3.12: Forward primeri için sekans reaksiyonu.

Bileşenler	Hacim (1X)
BigDye Terminator Mix	2 µl
Sequencing Buffer	2 µl
Sequencing Forward Primer	2 µl
GML Distilled Water	2 µl
Toplam	8 µl

Tablo 3.13: Reverse primerleri için sekans reaksiyonu.

Bileşenler	Hacim (1X)
BigDye Terminator Mix	2 µl
Sequencing Buffer	2 µl
Sequencing Reverse Primer	2 µl
Distilled Water	2 µl
Toplam	8 µl

- Hazırlanan PZR tüplerine 8'er µl sekansla reaksiyon karışımlarından dağıtıldı.
- Üzerlerine pürifikasyon olmuş PZR ürünlerinden 2'şer µl eklendi.
- Kısa bir vorteks yapıldı ardından kısa bir santrifüj yapıldı.
- Son hacim 10 µl olacak şekilde tablo 3.14'deki termal cycler programı uygulanarak sanger sekans PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.14: Sanger sekans PZR için termal cycler programı.

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Aktifleştirme	1	96 °C	1 dk
Amplifikasyon	25	96 °C	10 sn
		50 °C	1 sn
		60 °C	4 dk
Sonlanma	1	4 °C	∞

3.3.2.5. Sekans Pürifikasyon İşlemi

- 1 gr toz Sefadeks 14 ml distile suda çözündürülerek 30 dk boyunca iyice çalkalandı ve vortekslendi.

- Sefadesk kolonların içerisine 750 µl dağıtıldı.
- 5200 rpm’de 3 dk santrifüj edildi. Oluşan kristalimsi yapının çatlamaması için dikkatli bir şekilde santrifüjden alınarak kolonlu tüp yeni toplama tüpünün içerisine yerleştirildi.
- Son hacim 10µl olan sanger sekans PZR ürünlerini bu kristalimsi yapının en uç noktasına dikkatli bir şekilde konuldu.
- 5200 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldı. Kolonlu tüp uzaklaştırılarak toplama tüpünün içindeki pürifiye olmuş ürünü MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) aktarıldı. Üzeri 96-Well Plate Septa (Applied Biosystems) ile kapatıldı.

3.3.2.6. Genetic Analyzer Cihazına Yükleme ve Yürütme İşlemi

- Pürifiye olmuş ürünü MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) aktarıldı ve üzeri 96-Well Plate Septa (Applied Biosystems) ile kapatıldı. Plate santrifüjü ile kısa süreli spin yapıldı.
- 3130 Genetic Analyzer Cihazın (Applied Biosystems-HITACHI) Data Collection açıldı.
- Plate Managerden yeni bir plate oluşturuldu.
- Plate oluşturduktan sonra örneklerimizin ismi kaydedildi ve çalışmanın nereye kaydedileceği yeri ve uygun instrument protokolu seçildi.
- Cihazın tray düğmesine basıldı. Tray geldikten sonra cihazın kapağı açılıp örneklerin olduğu plate tray’e yerleştirilerek kapak kapatıldı.
- Plate View’den oluşturduğumuz plate seçerek çalışma başlatıldı.
- Tablo 3.15’deki modülü kullanarak yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.15: 3130 Genetic Analyzer sekans yürütme modülü

Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers with Data Collection Software v1.1, v2.0, v3.0 or v3.1	
Madde	Ayarlar
Polimer	POP7TM
Running Buffer	Applied Biosystems 3XXX/3XXXxl Running Buffer with EDTA
Kapiler array	36 cm.
Yürütme dosyası	RapidSeq36_ POP7_1
Mobility	KB_3XXX_POP7_BDTv3.mob
Basecaller	KB.bcp

- SeqScape® Software 3 (Applied Biosystems) programı kullanılarak sekans analizi yapıldı.

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 hedef gen olarak *RASA2*, referans gen olarak *ACTB* ile çalışıldı. Bütün hastalarda her gen ayrı ayrı çalışıldı. LightCycler 480 software programından Ct değerleri ve normalize değerler elde edildi.

Elde edilen CT değerlerini kullanarak 36 hastanın normal ve tümörlü dokuları arasındaki ekspresyon artış ve azalış miktarlarını belirlemek için delta delta CT hesaplama yöntemi uygulandı.

3.4.2. Sekans Analizi

Delta delta CT’leri hesaplanan örnekler kalibrasyona göre en fazla artış ve azalış gösteren 5’er örneğin hem tümörlü hemde normal dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Yapılan DNA’lar yöntemdeki *RASA2* geni için belirlenen ekzonlar sekanslandı. Sekanslanan veriler SeqScape® Software 3 (SeqScape® Software 3 V3.0 For Windows 7, Build Id: FC4, Applied Biosystems © 2012) programı kullanarak *RASA2* geni için NCBI tarafından belirlenen referans gen (NG_042187.1 RefSeq Gene) ile karşılaştırılarak değişimler tespit edildi.

3.4.3. 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. Verilerin dağılımı normal olmadığı için normal ve tümörlü doku arasındaki *RASA2* ekspresyon istatistik analizi için nonparametrik test olan Wilcoxon signed ranks testi uygulandı. 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.

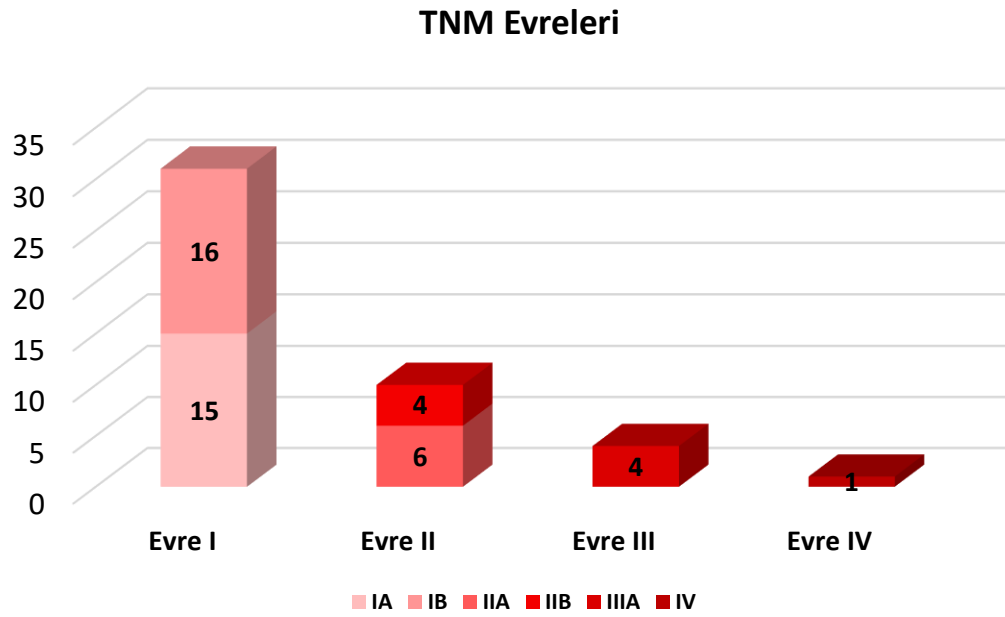
4. BULGULAR

2010-2014 yılları arası üniversitemizde akciğer adenokarsinomu ön tanısıyla opere olmuş ve Tıbbi Patoloji AD’nda adenokarsinomu tanısı alan 36 hastanın klinik bilgilerine, tümör ve normal doku bloklarına ulaşıldı. Çalışmaya dahil olan 36 olgunun yaş ortalaması 60.89 ± 8.815 idi. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı; erkek 26 (%72.22), kadın 10 (%27.78) şeklindeydi (Şekil 4.1). Karşılıklı olarak eşleşmeyen 4 (aynı hastanın tümör dokusunda Ct değerleri elde edilmiş fakat normal dokuda elde edilememiş ya da tam tersi durumlarda) örnek istatistiksel analizden çıkarıldı.



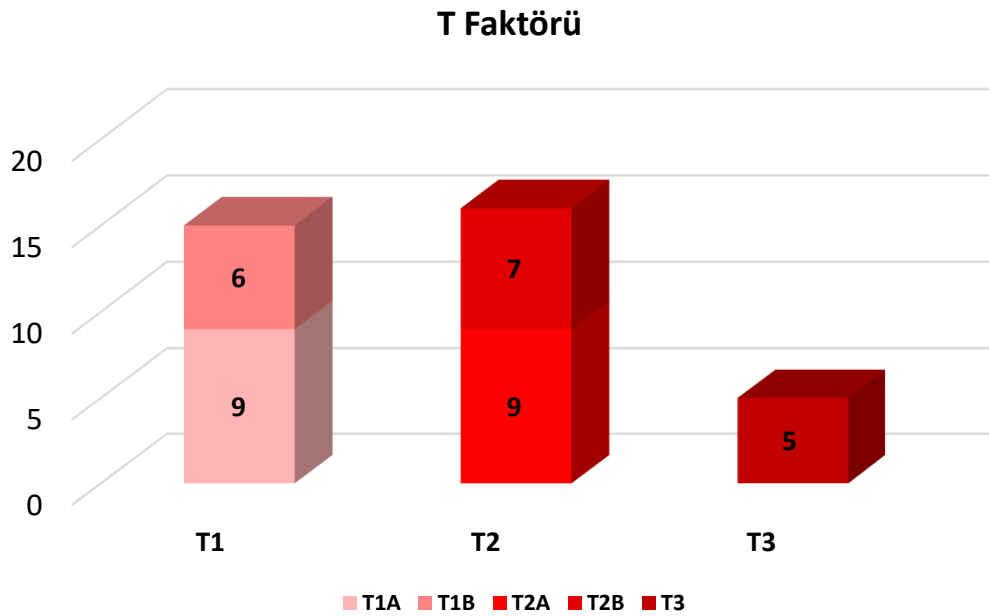
Şekil 4.1: Hastaların cinsiyete göre dağılımı.

Olguların TNM evrelemesi IASLC TNM 7. versiyonuna göre yapıldı. Buna göre dağılımları; Evre I: 31 (%58.4), Evre II: 10 (%27.8), Evre III: 4 (%11.1), Evre IV: 1 (%2.8) şeklindeydi (Şekil 4.2).



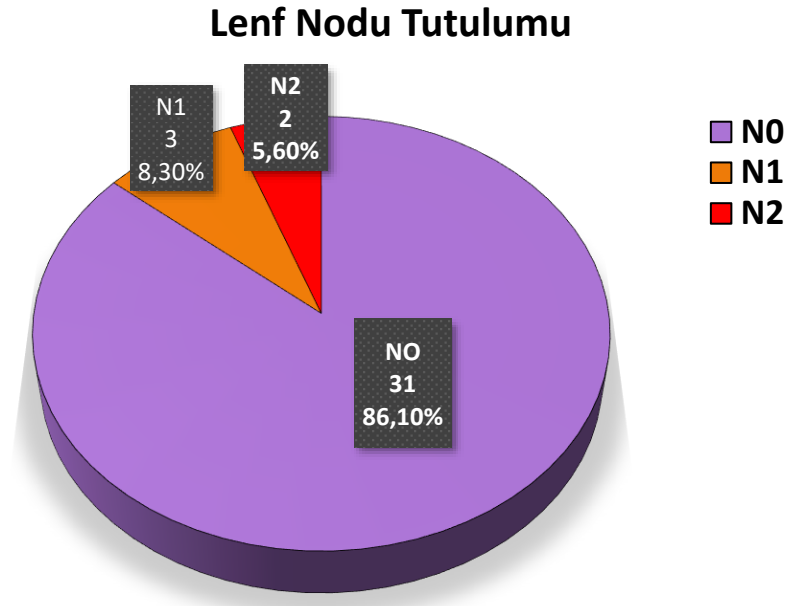
Şekil 4.2: Hastaların evrelere göre dağılımı.

Olguların TNM evrelemesindeki T faktörüne (tümör boyutu, tümörün komşu organ ve yapılara invazyonuna) göre dağılımları; T1: 15 (%41.7), T2: 16 (%44.4), T3: 5 (%13.9) şeklindeydi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Hastaların TNM evrelemesindeki T faktörüne göre dağılımları.

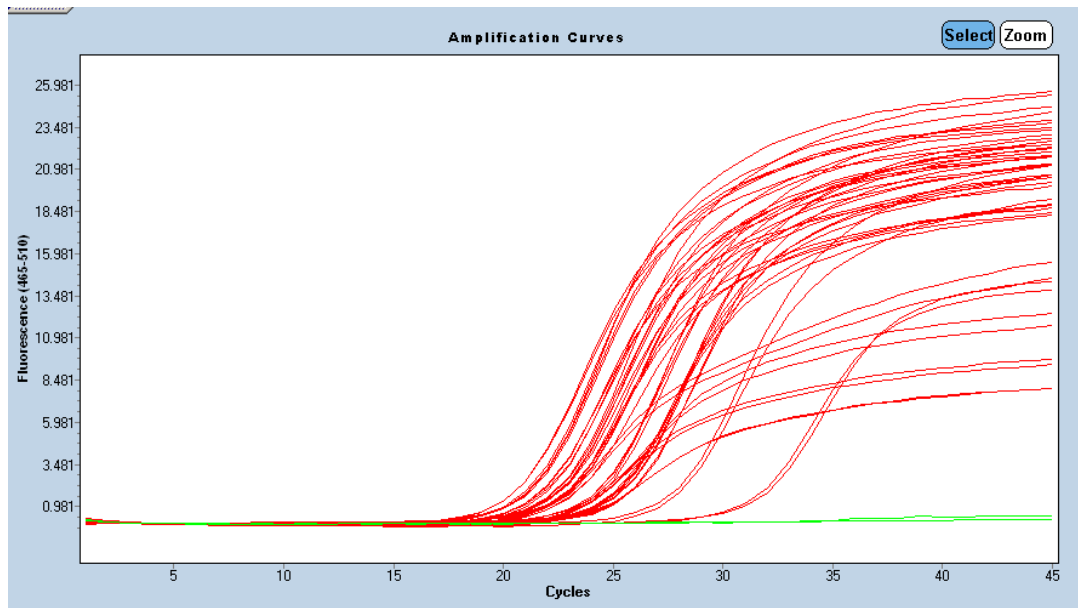
Vakaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları; N0: 31 (%86.1), N1: 3 (%8.3), N2: 2 (%5.6) şeklindeydi (Şekil 4.4).



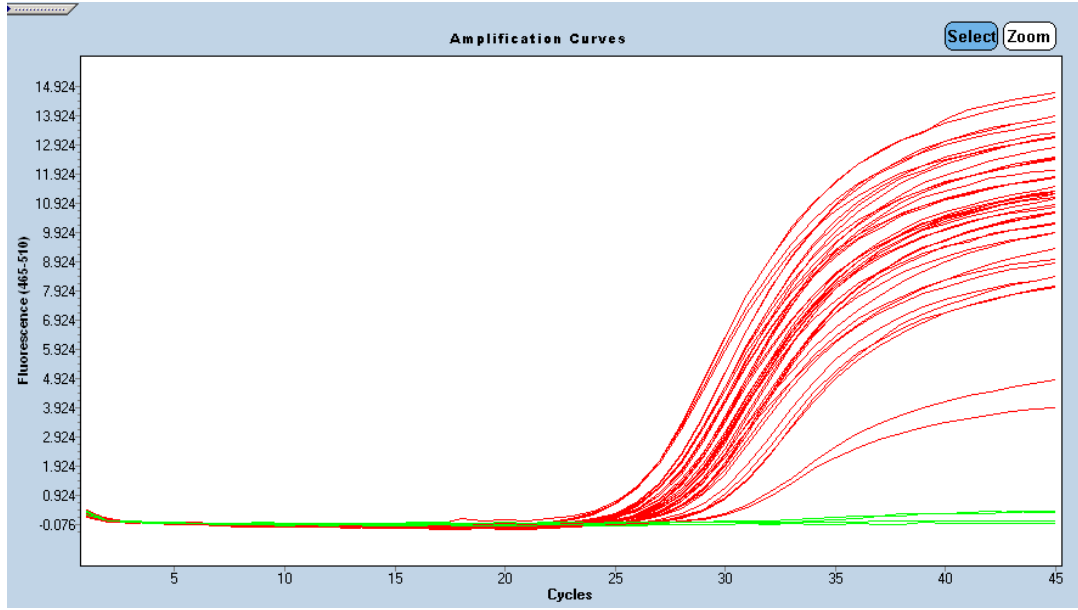
Şekil 4.4: Hastaların lenf nodu tutulumuna göre dağılımları.

4.1. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI

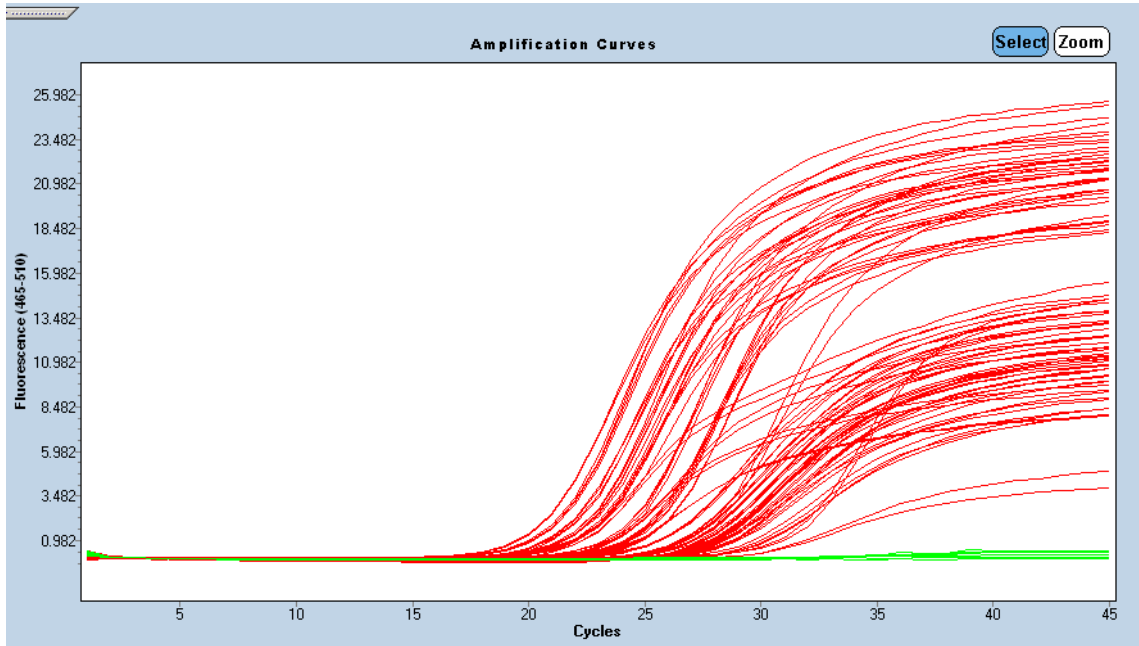
Çalışmada *RASA2* hedef geni, referans gen olarak β -Actin (*ACTB*) ile çalışıldı. LightCycler 480 software programından Ct değerleri elde edildi, yine aynı programla β -Actin'e göre rölatif kantitasyon yapıldı. Tümör dokularında β -Actin geninin (Şekil 4.5), *RASA2* geninin (Şekil 4.6) ve hem referans hemde hedef genin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Tümör dokularında β -Actin geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4.6: Tümör dokularında *RASA2* geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4.7: Tümör dokularında β -Actin ve *RASA2* geninin Real-Time PZR amplifikasyon eğrileri.

Olguların eşleşmiş normal ve tümör dokularındaki *RASA2* / β -Actin mRNA ekspresyon seviyeleri nonparametrik test olan Wilcoxon signed ranks testi uygulanarak karşılaştırıldı. Hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı ($p > 0.05$). Sonuçlar ortalama, standart sapma ve p değeri ile gösterildi (Tablo 4.1).

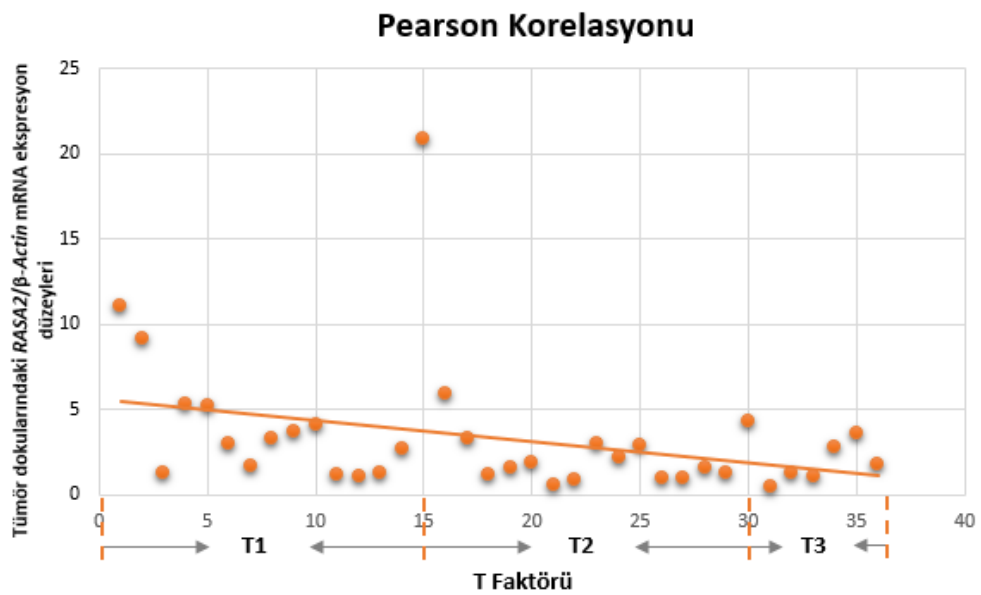
Tablo 4.1: *RASA2* geni normal ve tümör doku ekspresyon karşılaştırması.

	n	Ortalama	Standart Sapma (SEM)	p değeri
<i>RASA2</i> normal	36	2,113363	0,3149599	0,271 (p>0,05)
<i>RASA2</i> tümör	36	3,299353	0,6326615	

Olguların tümör dokularındaki *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki ilişkiyi incelemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Negatif korelasyon gösterdiği için anlamlı derecede tümör boyutu büyüdükçe *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyonu azaldığı tespit edildi (p<0.05) (Tablo 4.2, Şekil 4.8).

Tablo 4.2: Tümör dokularındaki *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki Pearson korelasyon analizi.

		T Faktörü	Tümör dokularındaki <i>RASA2</i> / β - <i>Actin</i> mRNA ekspresyon düzeyleri
T Faktörü	Pearson Korelasyonu	1	-0,338
	p değeri		0,044 (p<0,05)
	n	36	36
Tümör dokularındaki <i>RASA2</i> / β - <i>Actin</i> mRNA ekspresyon düzeyleri	Pearson Korelasyonu	-0,338	1
	p değeri	0,044 (p<0,05)	
	n	36	36

**Şekil 4.8:** Tümör dokularındaki *RASA2*/ β -*Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki ilişki.

4.2. SANGER SEKANS ANALİZİ BULGULARI

Ekspresyon çalışması sonrasında delta delta CT'leri (Şekil 4.9) hesaplandı ve kalibrasyona göre %55,55'inde (20/36) ortalaması $0,6049 \pm 0,2324$ ekspresyonun azaldığı ve %44,44'ünde (16/36) ortalaması $3,1897 \pm 2,3294$ ekspresyonun arttığı gözlemlendi. Kalibrasyona göre en fazla artış ve azalış gösteren 5'er örneğin (Tablo 4.3) hem tümörlü hemde normal dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Yapılan DNA'lar sanger sekans yöntemi ile *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12 ve 15. ekzon primerleri ile PZR yapılarak 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems-HITACHI) cihazında yürütüldü ve SeqScape® Software 3 (SeqScape® Software 3 V3.0 For Windows 7, Build Id: FC4, Applied Biosystems © 2012) yazılımını kullanarak *RASA2* geni için NCBI tarafından belirlenen referans gen (NG_042187.1 RefSeqGene) ile karşılaştırıldı. Değişimler tespit edilerek normal ve tümörlü dokudaki baz değişimleri incelendi.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(RASA2_{Normal} - ACTB_{Normal}) - \Delta Ct(RASA2_{Tümör} - ACTB_{Tümör})$$

Şekil 4.9: Delta delta CT formülü.

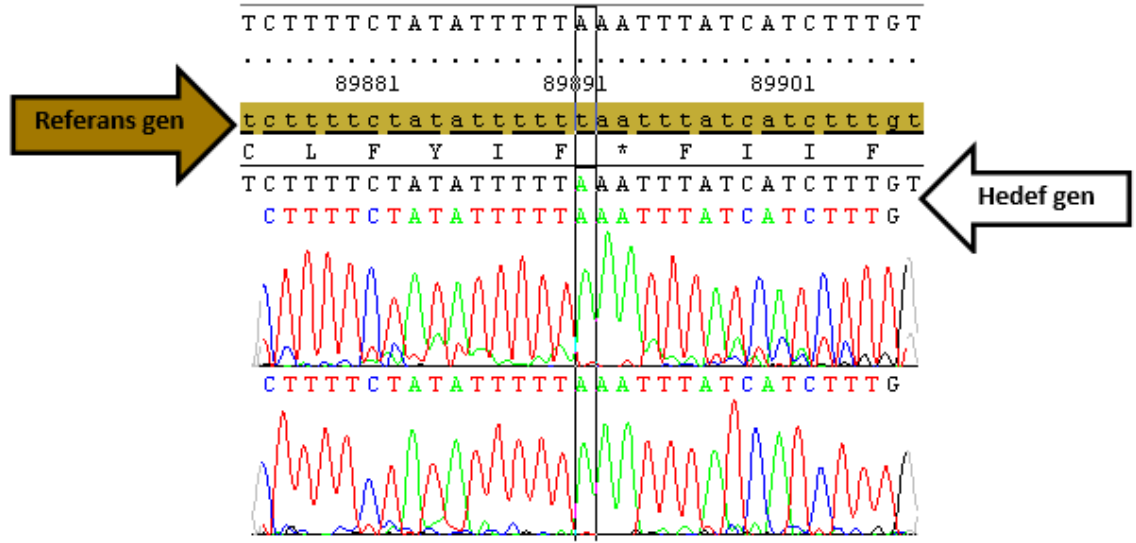
Tablo 4.3: Fazla artış ve azalış gösteren örneklerin $\Delta\Delta Ct$ değerleri.

Delta delta CT	Örnekler	Delta delta CT	Örnekler
0,133725542	20	0,94657903	Kontrol
0,271333672	29	3,444467439	10
0,273323233	42	3,779905063	28
0,289876443	36	3,818128823	7
0,398585187	39	5,268559857	1
0,94657903	Kontrol	10,80983922	2

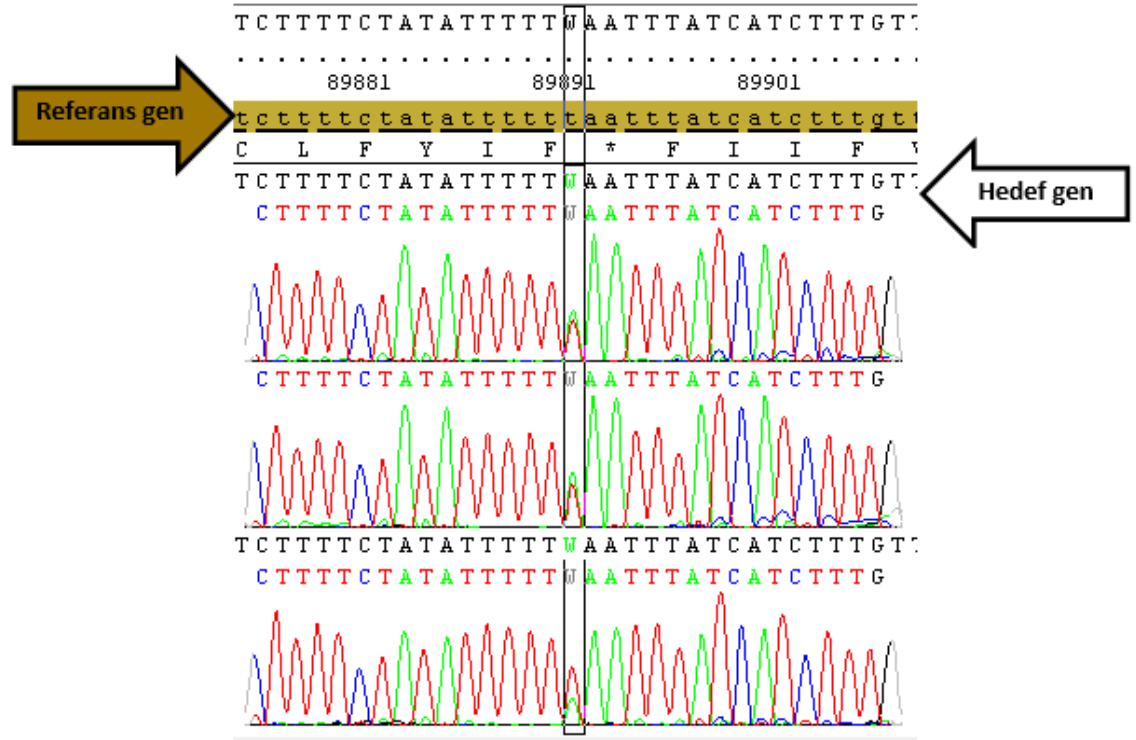
Sonuç olarak normal ve tümörlü dokularda incelediğimiz ekzonlarda değişim bulunamadı. Fakat intron kısımlarında iki farklı değişim tespit edildi (Tablo 4.4).

c.1484-64T>A değişimi tümörlü ve normal dokularda hem homozigot hem heterozigot formda tespit edildi. Bu değişim daha önceden tespit edilmiş olup literatürlerde yer almaktadır (Şekil 4.10, Şekil 4.11).

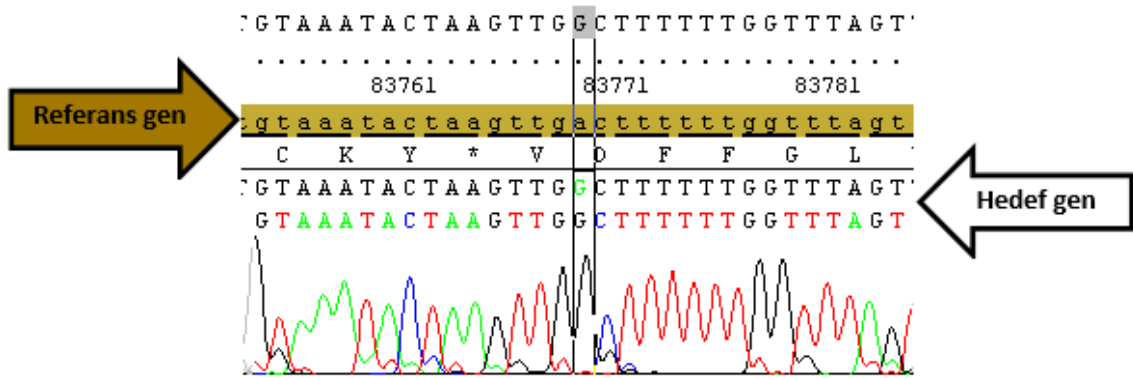
c.864-98A>G değişim homozigot formunda bulundu. Bulunan bu değişim kalibrasyona göre en fazla artış gösteren beş örneğin bir örneğin tümörlü dokusunda tespit edildi ve normal dokusunda bir değişim tespit edilmedi. Bu değişim daha önceden tespit edilmemiş olup literatürlerde yer almamaktadır (Şekil 4.12).



Şekil 4.10: c.1484-64T>A değişimi homozigot formu



Şekil 4.11: c.1484-64T>A değişimi heterozigot formu



Şekil 4.12: c.864-98A>G değişim homozigot formu

Tablo 4.4: Dizilemede bulunan değişimler.

BÖLGE	DEĞİŞİM	ZİGOSİTESİ	VARYASYON TİPİ	SNP numarası	Görülme sıklığı
14. İntron	NM_006506.3: c.1484-64T>A	Heterozigot	İntronik	rs3732869	A=0.1729/866 (1000 Genomes) A=0.1399/4073 (TOPMED)
9. İntron	NM_006506.3: c.864-98A>G	Homozigot	İntronik	Yok	Bildirilmemiş

Tespit edilen değişimler ensemble sitesinden *RASA2* genine ait ENST00000286364.7 transkribe göre adlandırıldı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlangıcında nadir görülen bir hastalık iken, 1950 yılından itibaren sıklığı belirgin olarak artmıştır (5). 2000 yılında, dünyada tanı koyulan akciğer kanserli olgu sayısının 1.2 milyon olduğu ve akciğer kanserli olguların tüm kanserli olguların % 12.3'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir (7). 2012 yılında 1.8 milyon yeni akciğer kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakam toplam kanser vakasının %12.9'unu oluşturmaktadır (3). 2017 ABD kanser istatistiklerinin yaptığı araştırmaya göre 2017 yılında ABD de teşhis edilecek yeni kanser sayısının 1.688.780 olacağını ve bunun günde 4600'den fazla yeni kanser teşhisine neden olacağı tahmin edilmektedir. Ülkemiz için yeni kanser sayısı ise 160 bin civarındadır (8, 44).

Akciğer kanseri oluşumunda en önemli etken sigara içimidir. Günlük içilen sigara ve sigara içilen yıl ile kanser riski doğru orantılı şekilde artmaktadır (10, 11). Sigara dumanında 4.000'den fazla kimyasal madde bulunmaktadır ve bunlardan en az 60 tanesi kanserojen etki göstermektedir (13). Bunlar içinde en güçlü kanserojenler polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-nitrozaminler ve aromatik aminlerdir. Sigara dumanındaki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), NNK gibi tütün karsinojenleri kansere sebep olan kimyasalların DNA'ya kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan DNA katımlarına neden olurlar. Tamir mekanizmaları bu DNA katımlarını ayırabilir veya zarar görmüş hücreyi apoptozise götürebilir. DNA tamir mekanizmaları başarısız olursa DNA eklentileri kısa sürede mutasyonlara yol açabilir. NNK'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin arasındaki dengeyi bozabilir ve kontrolsüz hücre çoğalması ve tümörögenез ile sonuçlanabilir (17).

Akciğer kanserinde bir çok faktörlerin yanında genetik faktörlerde önemli bir etkene sahiptir. Uzun süreli karsinojenlere maruz kalmak genetik yapıda hasar oluşturur ve hücre çoğalmasını kontrol eden genlerde değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler; DNA düzeyinde mutasyon, delesyon ve insersiyonlar ile RNA düzeyinde kanser ilişkili genler-

deki ekspresyonlardan oluşmaktadır (22). Mutasyonlar onkogenik genlerde (*K-ras*, siklinler gibi) veya tümör baskılayıcı genlerde (*p53*, Retinablastom, *p16* gibi) geliştiği zaman tümör gelişimi için adım atılmış olur (23). Sigara dumanında bulunan N-nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar buna örnek gösterilebilir.

RAS yolağı hem insan hem de deneysel olarak uyarılmış hayvan tümörlerinde en yaygın görülen onkogenik değişikliklerden biridir (51). RAS proteinleri, aktif GTP'ye bağlı ve inaktif GDP'ye bağlı formlar arasında döngü oluşturan ve hücre zarı içinde başlatılan sinyal transdüksiyonları için moleküler anahtarlar olarak işlev gören küçük G proteinlerdir (52). Ras proteinleri, kütlelerine (yaklaşık 21 kD) ve enzimatik aktivitelerine bakılarak küçük GTPaz'lar olarak adlandırılmışlardır (55). GTPaz'lar; hücre çoğalmasını, hücre farklılaşmasını, hayatta kalmasını, hücre döngüsü ilerlemesi, büyüme, göç, hücre iskeleti değişiklikleri, apoptosis, yaşlanma ve gen ifadesini düzenleyen sinyal ağlarının temel bileşenleridir (52, 53).

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras / Raf / MEK / ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadırlar (74).

Rand Arafeh ve arkadaşları tarafından melanoma kanseri ile yapılan araştırmada *RASA2*'nin melanoma için tümör supresör gen olduğu bildirilmiştir. Melanom olan hastalarda *RASA2* geni ekspresyonu çalışılmış ve gen ekspresyonunun $\geq$ %30'dan fazlasının kaybolduğu görülmüştür. Ekspresyon kaybındaki artış hastaların sağ kalma oranının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. *RASA2*'deki fonksiyon kaybı mutasyonlarının RAS aktivasyonunu etkilediği ve melanoma hücrelerinin büyümesini ve göçünü arttırdığı bulunmuştur (72).

Bu çalışmada 501 melanom ekzomunun analizinde, RasGAP kodlayan *RASA2*'yi, melanomların %5'inde mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı gen olarak ortaya koymuşlardır (72).

CytoScan High-Definition dizisini (Affymetrix) kullanılarak 22 numunenin kopya sayısının dizi profili çıkarılmıştır. Üç fokal delesyonla karşılaşılmıştır (% 13.6). Bu verilerle uyumlu olarak, TCGA melanoma kohortunun kopya sayısı varyasyonu (CNV) verileri, vakaların %11.7'sinde *RASA2* lokusunun delesyona uğradığını göstermektedir.

Dahası, araştırılan melanoma örneklerinin %1'inde *RASA2*'nin null olduğu ve TCGA verilerinde tüm homozigot delesyonlu genlerin %10'unda *RASA2* bulunduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu nedenle, *RASA2* melanomda potansiyel bir tümör supresör gendir (72).

RASA2'nin melanomda bir tümör supresör olup olmadığını test etmek için, tümörigenik olmayan fare NIH3T3 hücrelerindeki *RASA2* ekspresyonunu short hairpin (shRNA) yapısını kullanarak azaltıldı ve normal hücrelerin tümörigenik hücelere dönüştüğü görüldü. Sonuçta *RASA2* ekspresyon düşüklüğü RAS aktivasyonu ile sonuçlandı (72).

Yine melanomlarla yapılan çalışmada, proliferasyon ve koloni oluşturma kabiliyeti üzerine *RASA2* mutasyonlarının etkilerini incelemek için in vitro hücre büyümesi araştırılmıştır. Düşük serum içerisine konulan yabancı tip (YT) *RASA2* klonları mutant *RASA2* klonlarından daha hızlı büyüdüğü görülmüştür. Ayrıca, mutant *RASA2*'yi ifade eden hücrelerin yabancı tip *RASA2*'ye kıyasla önemli ölçüde daha fazla koloni oluşturduğu anchorage-independent hücre büyümesindeki bu farkı gözlemlemişlerdir ($p < 0.005$ t testi). *RASA2*'nin tümör baskılayıcı rolü ile uyumlu olarak, YT *RASA2*'nin *RASA2* mutasyonlarını (C084 ve 76T) barındıran melanom hücrelerinde aşırı ekspresyonu hücre çoğalmasının azalmasına neden olmuştur (72).

RAS aktivasyonu hücre göçünü artırdığını bilinmesi üzere mutasyona uğramış *RASA2*'nin aynı etkiye sahip olup olmadığı incelenmiştir. Serumsuz ortamda 108T, 55T veya 501Mel' den toplanmış klonlar ekildikten sonra, YT *RASA2* ekspresyonu, hücre göçünün azalmasına neden olurken, mutant *RASA2* ifadesi migrasyonu baskılamayı başaramamıştır ($p < 0.0001$ t testi) (72).

İnsan melanomalarında *RASA2* protein ekspresyonunun ne ölçüde kaybolduğunu doğrulamak ve bu kaybın prognostik potansiyelini değerlendirmek için Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) evre III melanoma üzerinde *RASA2* immünohistokimyasını incelemiştir. *RASA2* ekspresyonunun olguların %33'ünde (27/81) negatif, melanomların %67'sinde (54/81) pozitif olduğu bulunmuştur. Kaplan-Meier grafiği ve log-rank testleri, *RASA2* ekspresyonundaki (IHC tarafından negatif) kaybın, daha kötü sağkalım ile anlamlı olarak ilişkili olduğunu gösterdi; HR = 0.42 (0.23-0.78), Log rank $p = 0.0043$. Bu sonuçlar, melanoma progresyonundaki *RASA2* kaybının rolünü daha da vurgulamakta ve prognostik önemi olduğunu göstermektedir (72).

Bu çalışma, melanomaların *RASA2* geninde bozulmuş *RASA2* aktivitesine ve RAS sinyalleme sisteminin yapıcı aktivasyonuna yol açan somatik mutasyonlara sahip olduğunu göstermektedir (72).

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NS'lu (Noonan sendromu) üç bireyde *RASA2* varyantları tanımlanmıştır (57). Mutasyona uğramış *RASA2*, *MAP2K1* veya *RIT1* allellerinin heterolog hücrelerde ekspresyonu, NS patogeneğinde rol oynayan RAS-ERK yol aktivasyonunu artırmıştır. İki hastada birden fazla hastalığa bağlı varyant görülmüştür. Dahası, başlangıçta NS'ye sahip olduğu düşünülen bir kişinin tanısı, bu hastada saptanan bir *NF1* missens mutasyonuna dayanılarak nörofibromatoz tip 1'e revize edilmiştir. Bir başka hastada, protein stabilitesinin azalmasına ve RAS-ERK aktivasyonunu baskılama yeteneğinin bozulmasına neden olan bir *NF1* mutasyonu saptanmıştır. Bununla birlikte, bu hastanın NS benzeri bir fenotip göstermeye devam ettiği görülmüştür (70).

RASA2 tarafından kodlanan protein, GTPaz ile aktive edici proteinlerin GAP1 ailesinin üyesidir. Gen ürünü, normal RAS p21'in GTPaz aktivitesini uyarır, ancak onkogenik karşılığını uyarmaz. Protein, RAS işlevinin bir bastırıcısı olarak görev yaparak, RAS proteinlerinin zayıf intrinsik GTPaz aktivitesini artırır. Bu durum aktif olmayan GDP'ye bağlı RAS formuyla sonuçlanır. Bu da hücresel proliferasyon ve farklılaşmanın kontrol edilmesini sağlar (68).

Ras genlerinin mutasyona uğramış alelleri mesane, kolon ve akciğer kanseri hücre hatlarında tespit edilmiş ve Ras'ın onkogenik aktivitesine dair ilk ipuçları elde edilmiştir (78, 79). İlk olarak akciğer kanseri örneklerinde de aktif Ras mutant alellerine rastlanması, Ras aktivasyonunun sadece hücre hatlarında in vitro oluşmadığının ilk kanıtı olmuştur (80, 81).

RASA2 tarafından kodlanan protein GTPaz aktive edici bir proteindir ve *RASA2*'de meydana gelen mutasyonlar RAS aktivasyonunu etkilemektedir. *RASA2*'nin akciğer adenokarsinomlarının etiyolojisine katkısını anlamak için 36 hastanın tümör ve komşu normal dokuları mRNA ekspresyonu revers transkripsiyon - kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca *RASA2*'deki ekspresyon farklılığını anlamak için ekspresyon çalışması sonucundaki verilerin delta delta Ct'leri hesaplandı ve kalibrasyona göre %55,55'inde (20/36) ekspresyonun azaldığı ve

%44,44'ünde (16/36) ekspresyonun arttığı gözlemlendi. Kalibrasyona göre en fazla artış ve azalış gösteren 5'er örneğin hem tümörlü hemde normal dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Sanger sekans yöntemi ile *RASA2* geninin 2, 10, 11, 12 ve 15. ekzonları dizilenerek normal ve tümörlü dokudaki baz değişimleri incelendi.

Çalışmaya dahil olan 36 olgunun yaş ortalaması 60.89 ± 8.815 idi. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı; erkek 26 (%72.22), kadın 10 (%27.78) şeklindeydi. Hastaların tümör dokularında normal akciğer dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı ($p > 0.05$). Olguların tümör dokularındaki *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyon düzeyleri ile tümör durumu / boyutu (TNM evrelemesindeki T faktörü) değişkenleri arasındaki ilişkiyi incelemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Negatif korelasyon gösterdiği için anlamlı derecede tümör boyutu büyüdükçe *RASA2* / β -*Actin* mRNA ekspresyonu azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Normal ve tümörlü dokularda incelediğimiz ekzonlarda değişim bulunamadı. Fakat intron kısımlarında iki farklı değişim (c.1484-64T>A, c.864-98A>G) tespit edildi.

Sonuç olarak; 36 hastanın normal ve tümörlü dokularında *RASA2* geninin istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmadı.

Fakat tümörlü dokuların ekspresyon düzeyleri ile tümör boyutu arasındaki ilişkiyi incelediğimizde tümör boyutu büyüdükçe *RASA2* ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edildi ve buda *RASA2* geninin adenokarsinomlarda da bir tümör supresör gibi görev aldığını düşündürüyor.

İleriki çalışmalarda metastaz yapmış adenokarsimonlu dokuların sayısı arttırılarak ya da adenokarsinomlu hücre hatlarından ekspresyon analizi ve daha sonrasında dizi analizi yapılarak çalışılabilir.

Kendi çalışmamızda ekzonları melanoma kanseri çalışmasındaki hot spot bölgeleri olan ekzonlara (2,10,11,12,15) göre seçmiştik fakat akciğer dokularında farklı ekzonlar hot spot bölgeleri olabilir. Bu sebeple diğer ekzonlarla da yeni bir çalışma yapılabilir.

6. KAYNAKÇA

- 1) Tükün A, Akay G G, Kanser Genetiği, Tıbbi Genetik ve Klinik uygulamaları (1), 1, Dünder M, Mgrup Matbaacılık, Kayseri, 2016: syf 271-291
- 2) WEB_1. (2016). Institute NNC. A to Z List of Cancers. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/alphabetical> (22.04.2017).
- 3) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int JCancer 2015; 136: 5: 359-386
- 4) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase 2013; 11
- 5) Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, et al. Smoking and lung cancer: An overview. Cancer Research 1984; 44: 5940- 5958
- 6) Rivera MP, Stover DE. Gender and lung cancer. Clin Chest Med 2004; 25: 391-400
- 7) Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT. Lung cancer. Radiol Clin North Am 2007; 45: 21- 43
- 8) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics 2017. Cancer J Clin 2017; 67: 1: 7-30
- 9) WEB_2. (2013). Türkiye sağlık bakanlığı istatistik kurumu <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html> (12.03.2017)
- 10) 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: 1672-1694

- 11) 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: 29 -55
- 12) Pope CA, 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. EHP 2011; 119: 11:1616-1621.
- 13) 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: 7:767-790.
- 14) Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. Clin Chest Med 2011; 32: 4: 605-644.
- 15) Smith CJ, Perfetti TA, Rumple MA, et al. "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. Food Chem Toxicol 2000; 38: 371-383
- 16) Smith CJ, Perfetti TA, Mullens MA, et al. "IARC group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. Food Chem Toxicol 2000; 38:825-848
- 17) Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. Int J Oncol 2006; 29:745-752
- 18) Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in nonsmokers in different European countries:a prospective study. Environ Health 2007; 6: 7
- 19) Lackman GM, Salzberger U, Tollner U, et al. Metabolites of tobacco- specific carcinogen in urine from newborns. J Natl Cancer Inst 1999 ; 91: 459-465
- 20) Yang P. Lung cancer in never smokers. Semin Respir Crit Care Med 2011; 32: 1: 10-21
- 21) Sellers TA, Bailey Wilson JE, Elston RC, et al. Evidence for Mendelian Inheritance in the pathogenesis of lung cancer. J Natl Cancer Inst 1990; 82:1272
- 22) Fleischhacker M, Beinert T, PossingerK. Molecular genetic characteristics of lung cancer useful as 'real' tumor markers? Lung Cancer 1999; 25: 7-24
- 23) Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, et al. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2001; 34: 53-58
- 24) Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127: 12: 2893-2917

- 25) Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 10: 778-790
- 26) Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lungcancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 5: 584-594
- 27) Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE, The pivotal role of pathology in thmanagement of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5: 5: 463-478
- 28) Langer CJ, Besse B, Gualberto A, et al. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 36: 5311-5320
- 29) Barnard W. The nature of the 'oat-celled sarcoma' of the mediastinum. *J Pathol* 1926; 29: 241–244.
- 30) 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: 244-285.
- 31) Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2011; 32: 669-692
- 32) 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: 706-714
- 33) WEB_4. (2017). ERBB2 GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2> (11.03.2017).
- 34) WEB_5. (2017). EGFR GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=egfr> (11.03.2017).
- 35) WEB_6. (2017). KRAS PharmGKB <https://www.pharmgkb.org/gene/PA30196?tabType=tabVip> (11.03.2017).
- 36) WEB_7. (2017). KRAS GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=kras> (11.03.2017).
- 37) WEB_8. (2017). MET NCBI GENE. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=4233 (11.03.2017).
- 38) WEB_9. (2017). BRAF GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=braf> (11.03.2017).

- 39) WEB_10. (2017). RET GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ret> (11.03.2017).
- 40) WEB_11. (2017). ROS1 GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ros1> (11.03.2017).
- 41) Boveri T, Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena
Fischer G. (Edt), University of California, 1914
- 42) WEB_12. (2017). Kanser Nedir, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html> (19.03.2017).
- 43) WEB_13. (2017). Genetik Testler Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. <http://kanser.gov.tr/kanser/klinik-arastirmalar/58-genetik-testler.html> (19.03.2017)
- 44) WEB_14. (2017) Cancer Facts & Figures 2016. <http://old.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf> (19.03.2017)
- 45) DeFeo D, Gonda MA, Young HA, et al. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78: 3328-3332
- 46) Parada LF, Tabin CJ, Shih C, et al. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature 1982; 297: 474-478
- 47) Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, et al. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey- MSV transforming genes Nature 1982; 298: 343-347
- 48) Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, et al. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Science 1984; 223: 661-664
- 49) Nakano H, Yamamoto F, Neville C, et al. Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 71-75
- 50) Cox AD, Der CJ. Ras history. Small GTPases 2010; 1: 1: 2-27
- 51) Miller MS, Miller LD. RAS Mutations and Oncogenesis: Not all RAS Mutations are Created Equally, Front Genet. 2011; 2: 100

- 52) Fang B. RAS signaling and anti-RAS therapy: lessons learned from genetically engineered mouse models, human cancer cells, and patient-related studies, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016; 48: 1: 27-38.
- 53) Santos E, Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases, *Genes Cancer* 2011; 2: 3: 344-358
- 54) Santos E, Castellano E, Santos E. Functional Specificity of Ras Isoforms, So Similar but So Different, *Genes Cancer* 2011; 2: 3: 216–231
- 55) Telkoparan P, Tazebay UH. Ras Family of Proteins: Cellular Function, Molecular Control, and its Role in Oncogenesis, *Turk J Biochem* 2011; 36: 4: 367-373
- 56) Tsuchida N, Murugan AK, Grieco M. Kirsten Ras oncogene: Significance of its discovery in human cancer research, *Oncotarget* 2016; 7: 29: 46717-46733
- 57) Aoki Y, Niihori T, Inoue S, et al. Recent advances in RASopathies, *Journal of Human Genetics* 2016; 61: 33-39
- 58) WEB_15. (2017). RASA2 GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=rasa2> (23.04.2017)
- 59) VanDyke D, Kyriacopoulos P, Yassini B et al. Nanoparticle Based Combination Treatments For Targeting Multiple Hallmarks Of Cancer, *Int J Nano Stud Technol*. 2016; 4: 1-18.
- 60) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 5: 646-674.
- 61) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer, *Cell* 2000; 100: 1: 57-70
- 62) Demirer E, Ayten Ö, Taş D. Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatments, *J Clin Anal Med* 2014; 5: 1: 75-79
- 63) Sağlam Ö. Mda-Mb-231 Kanseri Hücrelerinin Çoğalmasında Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi ve miRNA İlişkisi, Doktora Tezi, T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir 2014; 8-9
- 64) Yarbrow JW. Oncogenes and cancer suppressor genes, *Seminars in Oncology Nursing* 1992; 8: 1: 30-39
- 65) WEB_16. (2017). Onkogenler ve Kanseri, Oncompass <http://www.oncompass.com.tr/knowledge-base/onkogenler-ve-kanser> (08.05.2017)

- 66) WEB_17. (2017). Tümör Supressor Genler (TSG), Genetiks İstanbul.
<http://www.kansergenetigi.com/tr/kanser-ve-genetik-tumor-supressor-genler>
 (08.05.2017)
- 67) WEB_18. (2017). Onkogenler, Genetiks İstanbul.
<http://www.kansergenetigi.com/tr/kanser-ve-genetik-onkogenler> (08.05.2017)
- 68) WEB_19. (2017). RASA2 NCBI GENE.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=5922 (09.05.2017)
- 69) Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, et al. Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting, Curr Biol. 1997;7: 12: 1007-10010
- 70) Chen PC, Yin J, Yu HW. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome, Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111: 31:11473-11478
- 71) Abel K, Anderson RA, Makaslar SB. Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism, J. Cell Sci. 2001; 114: 2207-2208.
- 72) Arafeh R, Qutob N, Emmanue R, et al, Recurrent inactivating RASA2 mutations in melanoma, Nat Genet. 2015; 47: 12: 1408-1410
- 73) Doğan ME. Akciğer Adenokarsinomlarının Etiyolojisinde Apobec Gen Ailesinin Rolünün Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri 2015.
- 74) Doğan AL, G   D. Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser, Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 34-42
- 75) Kemal Deniz K. Mide Kanserlerinde BRMS1 Gen Ekspresyonu Ve Prognostik Faktörler İle İlişkisi, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri 2015
- 76) WEB_20. (2017). RAF1 GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAF1> (18.04.2017)
- 77) Passerge E, Lüleci G ( .Edt), Sakızlı M ( .Edt), Alper   ( .Edt), Renkli Genetik Atlası Türkçe 3. Baskı Nobel Kitap Evleri 2009; 65
- 78) Parada LF, Tabin CJ, Shih C, et al. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene, Nature 1982; 297: 474-478.

- 79) Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, et al. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes, *Nature* 1982; 298: 343-347.
- 80) Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, et al. Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient, *Science* 1984; 223: 661-664.
- 81) Nakano H, Yamamoto F, Neville C, et al. Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogenes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 71-75.
- 82) Yakıcıer MC, Ekmekci CG, Yazarbaş K, et al. *Kanser Genetiği, Tıbbi Genetik ve Klinik uygulamaları* (1), 1, Dünder M, Mgrup Matbaacılık, Kayseri, 2016: syf 449-450

KLINİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KA EK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akciğer Tümörlerinde RAS p21 protein activator 2 (RASA2) Geninin Rolünün Araştırılması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Doç.Dr. Çetin Saatçı		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı/Kayseri		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVAN/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma		☒		
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:


Bahri YANCAR
 Fakülte Şefi

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011-EKAEK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akciğer Tümörlerinde RAS p21 protein activator 2 (RASA2) Geninin Rolünün Araştırılması					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SİGORTA	☐					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐					
	İLAN	☐					
	YILLIK BİLDİRİM	☐					
	SONUÇ RAPORU	☐					
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
DİĞER	☐						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016/243	Tarih : 01.04.2016					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Serkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

RASA2

ORIGINALITY REPORT

26%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1 docplayer.biz.tr 1138 words — 6%
Internet

2 www.kansergenetigi.com 387 words — 2%
Internet

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Havva Nur ERYILMAZ

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 28 Temmuz 1991, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 534 373 70 42

email: h.nur_eryilmaz@yahoo.com.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi 2. Kat Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 38039 Melikgazi / KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	ERÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Hakkı Altop Lisesi, İldem / KAYSERİ	2009

YABANCI DİL

İngilizce

