

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA CHD5 GENİNİN  
METİLENME ANALİZİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MERVE TANSARIKAYA**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. NUR BUYRU**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**


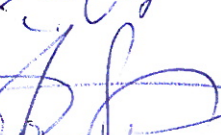
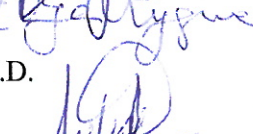


**İSTANBUL-2013**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Yüksek Lisans Programında Merve TANSARIKAYA tarafından hazırlanan Akciğer Kanseri Hastalarda CHD5 Geninin Metillenme Analizinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

07 / 01 / 2013

### Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Nur BUYRU İÜ CTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Turgut ULUTİN İÜ CTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU İÜ CTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER İ.Ü. İ.T. F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
5.Yrd. Doç. Dr. Jülide ALTINIŞIK Balıkesir Üniv. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D.	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Tansarıkaya (İmza)



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri her yönden gelişimime katkı sağlayan tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Nur Buyru'ya,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarını kullanma konusunda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Turgut Ulutin'e,

Moleküler Genetik Laboratuvarı'na geldiğim ilk günden beri hem bilimsel hem de teknik olarak sorduğum hiçbir soruyu cevapsız bırakmayan Dr. Onur Baykara'ya,

Zamanımızın çoğunu birlikte geçirdiğimiz, sevinçlerimizi ve üzüntülerimizi paylaştığımız MolGen ekibi'ne... Bugüne kadar edindiğim bilgi ve tecrübeyi kendi bilgi birikimlerinden bana sabırla aktaran MSc. Filiz Özdemir ve MSc. Seda Ekizoğlu'na, soğukkanlılığıyla en panik olduğum anlarda bile beni sakinleştiren, konuşmadan da anlayabildiğim bir arkadaşım olması dolayısıyla kendimi çok şanslı hissettiğim MSc. Didem Seven'e, çalışma düzeni ve temizlik konusunda rol model olarak gördüğüm, lab sonrası saatlerde de birlikte çalıştığımız BSc. Elif Yavuz'a, eğlenceli kişiliğiyle hep gülerken hatırlayacağım BSc. Esin Tuna'ya, paylaştığı karikatürleriyle ortama neşe katan BSc. Berk Üsekese'e, aramıza yeni katılmalarına rağmen bize hemen uyum sağlayan BSc. Soydan Doğan, BSc. Elif Baltacı ve Bsc. Halil İbrahim Saygı'ya, MolGen'den yolu geçmiş ve burada buldukları sürede bana yardımcı olmuş tüm stajyerlere,

MolGen ekibine dahil olmasa da lisans eğitiminden beri hem sınıf arkadaşım hem kız kardeşim diyebildiğim BSc. Ezgi Döşkaya'ya,

Tez projemin gerçekleşmesi için gereken dokuların sağlanmasında yardımcı olan Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Kamil Kaynak, Doç. Dr. Akif Turna ve Uzm. Dr. Ahmet Demirkaya'ya,

Kullanacağım tüm sevgi sözcüklerinin yetersiz kalacağı, attığım her adımda yanımda olup beni destekleyen, ne yapsam haklarını ödeyemeyeceğim canım aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 15488

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER .....	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	İX
ÖZET .....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Akciğer Kanseri: .....	3
2.1.1. Giriş.....	3
2.1.2. Etiyoloji:.....	3
2.1.2.1. Tütün kullanımı:.....	3
2.1.2.2. Hava kirliliği: .....	4
2.1.2.3. Mesleki faktörler: .....	4
2.1.2.4. Diyet ve Obezite:.....	4
2.1.2.5. Enfeksiyonlar: .....	5
2.1.3. Akciğer Kanserinin Yerleşim Yerleri: .....	6
2.1.4. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi:.....	6
2.1.5. Akciğer Kanserinde Evreleme: .....	8
2.2. Akciğer Kanserindeki Genetik ve Epigenetik Değişimler:.....	12
2.2.1. Genomik Kararsızlık, Kromozomal Bozukluklar ve Heterozigotluk Kaybı: ...	12
2.2.2. Telomeraz Etkinliği: .....	12
2.2.3. Akciğer Kanserinde Metastaz .....	13
2.2.4. Protoonkogenler ve Büyümenin Uyarılması:.....	13
2.2.5. Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyümenin Baskılanması:.....	15
2.2.6. DNA Metillenmesi:.....	17
2.2.7. Kromatin Yeniden Modelleyici Enzimlerden CHD Ailesi: .....	18

2.2.7.1. CHD5 Geni ve Genomik Yapısı: .....	21
2.2.7.2. CHD5 mRNA analizleri: .....	22
2.2.7.3. CHD5 Proteini ve İşlevi: .....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	24
3.1. GEREÇ .....	24
3.1.1. Materyal: .....	24
3.1.2. Kimyasal Maddeler: .....	24
3.1.3. Elektroforez Analizinde Kullanılan Standartlar: .....	24
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar: .....	25
3.1.5. Tampon ve Çözeltiler: .....	25
3.1.5.1. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları: .....	25
3.2. YÖNTEMLER .....	26
3.2.1. Dokudan DNA Eldesi: .....	26
3.2.2. DNA'nın Nicel Belirlenmesi: .....	27
3.2.3. Polimeraz Zincir Tepkimesinde Kullanılan Tampon, Çözelti ve Enzimler: .....	27
3.3. CHD5 Geninin Metillenme Analizi: .....	27
3.3.1. Bisülfid Modifikasyonu: .....	27
3.4. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi: .....	29
4. BULGULAR .....	30
4.1. CHD5 Geninin Metillenme Analizi: .....	34
5. TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR .....	42
ETİK KURUL KARARI .....	55
ÖZGEÇMİŞ .....	56

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: Evre Gruplandırması-Rami-Porta ve ark. (2011)'den.....	9
Tablo 2-2: Güncellenmiş T, N, M tanımlamaları- Rami-Porta ve ark. (2011)'den .....	10
Tablo 3-1: Metillenmiş ve metillenmemiş bölgeye özgü primerler-Mokarram ve ark. (2009)'dan.....	29
Tablo 3-2: Metillenmiş ve metillenmemiş primerler ile yapılan PZR koşulları.....	29
Tablo 4-1: Tüm akciğer kanserli hastaların tümör ve normal dokularıyla elde edilen bant yoğunluklarının sayısal olarak ifadesi .....	35
Tablo 4-2: Tüm akciğer kanserli hastaların tümör ve normal metillenme yüzdeleri.....	36
Tablo 4-3: Tüm akciğer kanserli hastaların metillenme durumuna göre dağılımı .....	37
Tablo 4-4: Hastaların yaşa göre metillenme artış oranları.....	37
Tablo 4-5: Hastaların evrelere göre metillenme artış oranları .....	38
Tablo 4-6: Hastaların cinsiyete göre metillenme artış oranları.....	38
Tablo 4-7: KHDAK hastalarının hücre tipi ve metillenme artış oranları .....	39
Tablo 4-8: Sigara kullanımı ve metillenme artış oranları .....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: CHD proteinlerinin yapısal motiflerinin karşılaştırılması-Thompson ve ark. (2003)'den.....	21
Şekil 2-2: CHD5 genomik yerleşimi (Genecards).....	22
Şekil 2-3: CHD5 proteinin 3 boyutlu yapısı (USCS Genome Bioinformatics).....	23
Şekil 4-1: Hastaların cinsiyet dağılımı.....	30
Şekil 4-2: Hastaların sigara kullanım oranı .....	31
Şekil 4-3: Hastaların histopatolojik sınıflandırılması .....	31
Şekil 4-4: Hastaların KHDAK hücre tiplerine göre dağılımı .....	32
Şekil 4-5: Hastaların şikayet dağılımı.....	33
Şekil 4-6: Hastaların evrelere göre dağılımı .....	34
Şekil 4-7: CHD5 geninin promotör bölgesinin metillenmesi .....	34

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**AK**, Atipik Karsinoid

**ATP**, Adenin Three Phosphate

**BCL2**, B-cell CLL/lymphoma 2

**BRK**, Brinker

**CDH13**, Cadherin 13

**CDK4**, Cyclin-Dependent Kinase-4; (Siklin Bağımlı Kinaz)

**CHD5**, Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 5; (Kromodomain Helikaz Bağlayıcı Protein 5)

**CGH**, Comparative Genomic Hybridization; (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)

**CMV**, Cucumber Mosaic Virus

**DAP kinase**, Death Associated Protein Kinase; (Ölüm İlişkili Kinaz)

**DNA**, Deoxyribo Nucleic Acid; (Deoksiribonükleik Asit)

**EGFR**, Epidermal Growth Factor Receptor; (Epidermal Büyüme Etmeni Almacı)

**ErbB-4**, v-erb-a Erythroblastic Leukemia Viral Oncogen Homologue-4; (v-erb-a Eritroblastik Lösemi Viral Onkogen Eşleniği-4)

**FGFR2**, Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (Fibroblast Büyüme Etmeni Almacı 2)

**FHIT**, Fragile Histidine Triad; (Kırılgan Histidin Üçlüsü)

**FISH**, Flouresan in situ Hybridization

**FUS1**, Fused in Sarcoma

**GSTP1**, Glutathione-S-Transferase P; (Glutatyon-S-Transferaz P)

**HPV**, Human Papilloma Virus

**IASLC**, International Assosication for the Study of Lung Cancer; (Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü)

**IGF-1**, Insuline Like Growth Factor-1; (İnsülin Benzeri Büyüme Etmeni)

**INO80**, INOsitol

**ISWI**, Imitation SWItch

**KHAK**, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri;

**KHDAK**, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri;

**LOH**, Loss of Heterozygosity; (Heterozigotluğun Kaybı)

**MYO18B, Myosin XVIIIIB**

**NKX2-1, NK2 homeobox 1**

**NO, Nitric oxide** (Nitrik oksit)

**NO<sub>2</sub>, Nitrogen dioxide;** (Nitrojen dioksit)

**NPRL2, Nitrogen Permease Regulator-Like 2**

**NuRD, Nucleosome Remodelling and Deacetylation**

**PDGF, Platelet Derived Growth Factor;** (Kan Pulcuğu Kökenli Büyüme Etmeni)

**PPP2R1B, Protein Phosphatase 2, Regulatory subunit a, Beta**

**PTEN, Phosphatase and Tensin homolog**

**p14, p14 protein;** (p14 proteini)

**p16, p16 protein;** (p16 proteini)

**p53, p53 protein;** (p53 proteini)

**RAR- $\beta$ , Retinoic Acid Receptor- $\beta$ ;** (Retinoik Asit Almacı Beta)

**RASSF1A, Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family member**

**RB, Retinoblastoma Protein;** (Retinoblastoma Proteini)

**SEMA3B, sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted,**  
(semaphorin) 3B

**SOX2, SRY (sex determining region Y)-box 2**

**SV40, Simian Virus 40**

**SWI/SNF, mating type SWItching/Sucrose Non Fermanting**

**TIMP, Tissue inhibitor of metallopeptidase**

**TK, Tipik Karsinoid**

**TSLC1, Tumor Suppressor in Lung Cancer 1;** (Akciğer Kanserinde Tümör Baskılayıcı gen 1)

**VEGFR, Vascular Endotelial Growth Factor Receptor;** (Vasküler Endotelial Büyüme Etmeni Reseptörü)

## ÖZET

**Tansarıkaya, M.** (2012). Akciğer Kanserli Hastalarda CHD5 Geninin Metillenme Analizinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

CHD5 geni 1p36.31 gen bölgesinde bulunur. İlk olarak nöroblastomlu hastalarda yapılan çalışmalarda 1p bölgesinin delesyona uğradığı ve bu bölgede tümör baskılayıcı genlerin bulunabileceği; daha sonra yapılan çalışmalarda CHD5'in bu tümör baskılayıcı genlerden biri olduğu saptanmıştır. CHD5 geni 42 ekson ve 1954 amino asitlik bir proteine sahip olup, kromodomain helikaz DNA bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir.

ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenleme enzimlerinin kromatin yapısının ve bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu saptanmıştır. Bu enzimler SWI/SNF, ISWI ve CHD aileleri gibi çeşitli gruplara ayrılır. CHD5 de CHD ailesinin bir üyesi olup, yapılan çalışmalarda CHD5 promotörünün pek çok kanser tipinde epigenetik olarak sessizleştirilmesiyle kanserde rol oynadığı ve tümör baskılayıcı bir gen olduğu ispatlanmıştır.

Çalışmada 50 akciğer kanserli hastanın tümör ve normal dokularında metillenmeye özgü PZR yöntemi ile CHD5 geninin promotör metillenme durumu incelenmiştir. İncelemeler sonucunda 50 hastanın 21'inde (%42)'inde promotör metillenmesinin arttığı görülmüştür. Bu artışın akciğer kanserli hastalarda CHD5 geninin sessizleşmesine neden olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak metillenme artışı ile yaş, evre, cinsiyet, sigara kullanımı ve histolojik tip arasında ilişki olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : CHD5, epigenetik, metillenme, akciğer, kanser

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 15488

## ABSTRACT

**Tansarikaya, M.** (2012). Investigation of Methylation Analysis for CHD5 Gene in Patients with Lung Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master of Science Thesis. İstanbul.

CHD5 gene has been first shown in the patients with neuroblastoma, located on 1p36.31 gene region. CHD5 gene is made up of 42 exons and codes a 1954 amino acid protein.

ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes have previously been implicated in maintaining and regulating chromatin structure. These enzymes are divided into several groups including the SWI/SNF, ISWI and CHD families. CHD5 is a member of CHD family and CHD5 has been shown as a tumor suppressor gene with epigenetic silencing of promoter region by recent studies.

50 lung cancer patients were involved in the study to analyse the CHD5 gene promoter region methylation status by methylation specific PCR. Methylation analysis showed that methylation of the promoter region has increased in 21 of 50 (42%) patients. We suggest that this increase may cause CHD5 gene silencing in lung cancer patients. There was no significant relationship between age, grade, sex, smoking status, histologic type and methylation increase.

**Key Words:** CHD5, epigenetics, methylation, lung, cancer

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 15488

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda birçok araştırma tümör oluşumunda yer alan değişiklikleri saptamaya odaklanmıştır. Tümör hücrelerinde görülen değişiklikler 1) Kendine yeterli büyüme sinyalleri 2) Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık 3) Apoptotik sinyallerden kaçma 4) Sınırsız kendini eşleme potansiyeli 5) Anjiyogenez 6) Doku invazyonu ve metastaz olarak sıralanmaktadır. Genomu doğrudan değiştiren gen mutasyonları veya dolaylı etkileyen DNA metillenmesi gibi epigenetik etmenler, histon proteinlerinin kovalan modifikasyonları bu değişikliklerin örnekleridir.

DNA metillenmesinin altında yatan yazılımsal sessizleştirme mekanizması genlerin promotör bölgelerinde bulunan CpG açısından zengin adacıklardaki sitozin nükleotidinin aşırı metillenmesine dayanmaktadır. Bu mekanizma kromatin yapısını baskılanmış bir duruma sokmak üzere histon deasetillenme mekanizması ile işbirliğine girer. İnsan genomunda GC açısından zengin DNA dizileri tüm genlerin yaklaşık %50'sinin promotör ve 1. eksonunda bulunur. DNA metillenmesi memeli hücrelerinde gen ifadesinin düzenlenmesinin altında yatan temel mekanizmalardan biridir. Çünkü DNA metillenmesi hücre döngüsü, büyümesi ve ölümünün düzenlenmesinde yer alan anahtar genlerin sessizleştirilmesinde yer alan ana mekanizmalardan biridir. Yukarıda belirtilen genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda ya onkogenler etkinleşmekte ya da tümör baskılayıcı genler etkinliğini kaybetmektedir.

Aşırı metillenmiş genler kanserin moleküler patogenezinde yer aldığı ve tümör oluşumundaki erken moleküler değişikliklerden biri olduğu için metillenmiş olan bu genlerin tanımlanması, kanserin tanımlanmasında ve izlenmesinde önemli bir hedef olmuştur. Ayrıca kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesinin aşırı metillenme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir

Akciğer kanseri vakalarının büyük çoğunluğunun sigara kullanımından kaynaklandığı kabul edilmesine rağmen, sigara kullananlarda akciğer kanserine yakalanma oranı %15 civarındadır. Bu durumda akciğer kanserinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasına devam edilmektedir.

Bir tümörün invazif fenotipe dönüştüğü süreçte pek çok değişiklik gerçekleşir. Bu değişiklikler, akciğer kanseriyle ilişkili olan kromozomal bölgelerde veya akciğer kanseriyle ilişkili genlerde görülür. Kromozomal değişikliklerin büyük bölümü genomik

melezleme ve heterozigotluk kaybı çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Akciğer kanserini etkileyen kromozom kolları 1p, 3p, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 13q, 17p, 19p, 22q ve Xq olup, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarının %80'inde 3p'de değişiklik olduğu literatürdeki pek çok çalışmada gösterilmiştir. KHDAK'de, 3p'deki değişikliklerin yanı sıra kromozom 9p, 5q ve 7p'nin kaybı şeklindeki değişiklikler de sık görülmektedir.

Akciğer kanserini etkileyen genler arasında birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen bulunmaktadır. Ras proto-onkogenindeki kodon 12, 13 ve 61'deki mutasyonların çoğunlukla KHDAK ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ras geni mutasyonlarında, tütün kullanımı sonucu meydana gelen DNA hasarıyla ilişkili G→T dönüşümleri etkilidir. Myc ailesi proto-onkogenleri hücre büyüme ve çoğalmasından sorumludur. Gen çoğalması, myc ailesi proteinlerinin aşırı ifade edilmesinin en genel mekanizmasıdır. Myc aşırı ifadesi KHAK tümörlerinde %15-30 oranında görülürken, KHDAK'de %5-10 oranında görülmektedir.

p53'ün etkinliğini kaybetmesi, pek çok kanser türünde, özellikle KHDAK vakalarının %50'sinde gösterilmiştir. Yanlış anlamlı mutasyonlar, anlamsız mutasyonlar veya çerçeve kayması mutasyonlar p53'ün etkinliğini kaybetmesine neden olmaktadır. Rb ve p16INK4a genlerinin etkinliğini kaybetmesi de akciğer kanserine yol açan mekanizmalardandır. Rb, KHDAK'de fazla etkili olmazken (%15-30), p16INK4a %70 oranında etkilidir. Ayrıca pek çok tümör baskılayıcı genin mekanizmasının bozulması da akciğer kanserine yol açmaktadır.

1p36 gen bölgesinde meydana gelen delesyonların, genel olarak epitel kökenli, nöral ve hematopietik kanserlere neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CHD5 geninin 1p36.31 bölgesinde bulunan aday genlerden biri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla CHD5 tümör baskılayıcı geninin akciğer kanseri ile ilişkisini göstermek amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akciğer Kanseri:

#### 2.1.1. Giriş

Kanser gelişmiş ülkelerde en başta gelen ölüm sebebiyken, gelişmekte olan ülkelerde ikinci sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun artması ve yaşlanmanın yanı sıra kansere yol açan yaşam tarzı nedeniyle akciğer kanseri sıklığında bir artış görülmektedir (Jemal ve ark. 2011). 2012 yılında erkeklerde en sık tanısı konulan ikinci; ölüme neden olan birinci kanser akciğer kanseriyken; kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türü olup ölüme neden olma bakımından ilk sırada yer alır (Siegel ve ark. 2012).

#### 2.1.2. Etiyoloji:

##### 2.1.2.1. Tütün kullanımı:

Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında özellikle Asya'da akciğer kanseri için en önemli risk faktörü olan tütün kullanımındaki artış sonucunda akciğer kanserine bağlı ölümlerin artmaya devam edeceğini ön görmektedir (Parkin ve ark. 1994). Akciğer kanseri riski, sigara tüketim miktarı, günde içilen sigara sayısı, sigara içilen yıllar, derine çekme derecesi, sigaraların katran ve nikotin içeriği ile filtresiz sigara kullanımına bağlıdır (Harris ve ark. 2004). Puro ve pipo gibi tütün kullanımının diğer şekillerinin de artmış akciğer kanseri riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiş olup bu riskin sigara kullanımından daha zayıf olduğu bildirilmiştir (Shapiro ve ark. 2000).

Sigara dumanındaki oksitleyici ajanlar, serbest radikaller ve radikal olmayan oksidanlardan oluşur. Bunlar, sigara dumanının DNA, proteinler ve lipitler üzerine verdiği biyolojik zarardan sorumludur. Sigara dumanı partikül faz (katran) ve gaz faz olmak üzere ikiye ayrılır. Nikotin, polifenoller, aldehitler, nitrosaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar her iki fazda bulunan önemli bileşimlerdir. Gaz fazı yüksek derişimlerde oksiradikaller, nitrojen oksitler (serbest radikaller) ve özellikle nitrik oksit içerir. Bu fazdaki organik radikaller nitrik oksidin (NO) yavaş oksitlenmesi ile organik bileşenlere karşı daha tepkin olan nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>) dönüşür. Gaz fazındaki radikaller kısa ömürlü olmasına rağmen katran fazda oldukça kalıcıdır ve yüksek derişimlerde bulunur. Katranda bulunan radikaller suda eridiğinden akciğerlerin sıvı

yapısında uzun süre kalarak biyolojik hasar oluşturur. Hem gaz hem de katran fazındaki radikaller DNA hasarı oluşturabilir (Pryor, 2000). Sigara dumanında bulunan bu ve bunlara benzer yüzlerce madde akciğer kanserlerinin %85-90'ından sorumludur. Sigaraya bağlı akciğer kanserlerinde çoğunlukla skuamöz ve küçük hücreli karsinom görülürken son yıllarda adenokarsinomlarda artış görülmektedir. Bu durumun sigara içme tarzındaki ve sigara filtrelerinin düzenlenmesindeki farklılığa bağlı olduğu düşünülmektedir. Tüketilen sigara tipleri sigara dumanının daha derinlere, bronkoalveolar bileşime kadar taşınmasına olanak vermekte ve adenokarsinomların artmasına neden olduğu öne sürülmektedir (Thun ve ark. 1997).

#### **2.1.2.2. Hava kirliliği:**

Hava kirliliği küreselleşme ve endüstrileşme oranlarının artması nedeniyle tüm dünyayı ilgilendiren bir problem haline gelmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde duman içeriğindeki sülfür dioksit gibi risk oluşturan parçacıkların yüksek yoğunluklarda bulunması özellikle büyük şehirlerde zamanla hava kirliliğinin artmasına ve akciğer kanserinde artışa neden olmaktadır (Dela Cruz ve ark. 2011).

#### **2.1.2.3. Mesleki faktörler:**

Maden, petrol, kimyasal madde üreten tesis gibi birçok işyerinde kullanılan maddenin akciğer kanserine neden olduğu gösterilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Birimi arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eter, krom, nikel, radon, silika ve vinil kloridi kansere neden olan etmenler olarak tanımlamıştır. 2000'lerde dünya çapında erkeklerde görülen akciğer kanseri ölümlerinin %10'una, kadınlarda ise %5'ine asbest, arsenik, berilyum, kadmiyum, krom, nikel, silika ve mazot dumanı gibi karsinojenlerin neden olduğu öne sürülmektedir (Driscoll ve ark. 2005).

#### **2.1.2.4. Diyet ve Obezite:**

Diyet ya da diğer bir deyişle beslenme alışkanlığının tüm kanserlerin %30'undan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Willett ve ark. 1996). A, C ve E vitaminleri gibi antioksidanların, düşük serum derişimlerinin akciğer kanseri gelişimiyle ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Boone ve ark. 1990, Woodson ve ark. 1999). Vitamin A, hem hayvansal (retinol) hem de bitkisel (karotenoid) kökenli olup, sadece bitkisel kökenli olanın ( $\beta$ -karotenin), akciğer kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Buring ve Hennekens, 1995).

Meyve ve sebze ile zengin beslenmenin kanser sıklığını azalttığına dair çalışmalar yapılmış olup, meyve ve sebzelerin düşük miktarlarda alınması veya hiç alınmamasının akciğer kanseri riskini 3 kat arttırdığı gösterilmiştir (Fontham, 1990).

Kırmızı et, günlük gıdalar, doymuş yağlar ve lipitlerin akciğer kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (Swanson ve ark. 1997, Alavanja ve ark. 1996, De Stefani ve ark. 1997, Goodman ve ark. 1988). Nitrozodimetilamin ve nitrit içeren salam, tuzlu ve yanmış et ürünlerinin de akciğer kanserinde risk etmeni olduğu gösterilmiştir (Hecht, 1997, De Stefani ve ark. 1996).

#### **2.1.2.5. Enfeksiyonlar:**

Onkogenik virüs enfeksiyonlarının akciğer kanserine neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan son çalışmalarda skuamöz hücreli kanser dokularında Human Papillomavirus (HPV) DNA'sı bulunmuş olmasına rağmen ırksal ve bölgesel farklılıklar nedeniyle bu sonuçların güvenilir olmadığı anlaşılmıştır. Akciğer kanserinde Asyalı çalışma gruplarında özellikle sigara içmeyenlerde yüksek oranda HPV DNA'sı olduğu gösterilmiştir. Buna karşın Batı Avrupa'da yapılan çalışmalarda HPV'nin akciğer kanserinde etiyolojik bir rolü olduğu gösterilememiştir (Chen ve ark. 2004, Syrjanen 2002, Rezazadeh ve ark. 2009). Ayrıca HPV serotiplerinden 16 ve 18'in diğer serotiplere oranla akciğer kanseriyle daha fazla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Burkitt lenfoma ve nasofaringeal karsinomda rol oynayan Epstein-Barr virüsü, akciğer kanserinin nadir rastlanan şekli lenfoepitelyoma benzeri karsinom ile ilişkili olup, bu durum Asyalı hastalarda gösterilmişken Batı toplumunda böyle bir ilişkisi saptanmamıştır (Castro ve ark. 2001).

Akciğer kanseri etiyolojisinde etkili olan diğer virüsler arasında BK virüs, JC virüs, CMV, SV40 ve kızamık virüslerinin yer alabileceği bildirilmiştir (Brouchet ve ark. 2005, Galateau-Salle ve ark. 1998, Giuliani ve ark. 2007, Sion-Vardy ve ark. 2009).

Akut solunum enfeksiyonu nedenlerinden biri olan *Chlamydia pneumoniae*'nin, özellikle sigara dumanına maruz kalındığında akciğer kanseri nedeni olabileceği gösterilmiştir (Littman ve ark. 2005).

HIV virüsü ile enfekte olmuş kanser hastalarında prognozun, aynı evredeki HIV ile enfekte olmamış hastalardan daha kötü olduğu bildirilmiştir (Mitsuyasu ve ark. 2008).

### 2.1.3. Akciğer Kanserinin Yerleşim Yerleri:

Akciğer kanserleri bronş mukozasının bazal hücrelerinden köken alır ve ana bronşlardan itibaren hava yollarının her yerinde görülebilir. Hava yollarındaki yerleşimlerine göre üç kısma ayrılır.

1. **Hiler grup:** Akciğer kanserinde en sık görülen grup olup, ana bronş, ara bronş ve lob bronşlarından gelişir. Bronkoskopi, vakaların hemen hepsinde endobronşiyal lezyonu ortaya çıkartır ve tanı için biyopsi yapma imkanı verir. Gelişimlerinin başlangıcından itibaren çoğunlukla öksürük ve kanlı madde çıkmasına (ekspektorasyon) neden olur. Standart radyolojik incelemeler ile henüz tümörün görülmediği zamanlarda bile bu şikayetler bulunabilir.
2. **Segmenter grup:** Segment ve subsegment bronşlarından köken alır. Daha büyük bronşlardan köken alanlara göre bunlarda bronş tıkanmasına bağlı atelektaziler ve tıkanan yerin ilerisinde apse ve pnömani gibi ikincil enfeksiyonlar görülür. Çoğunlukla akut klinik bir tablo ile kendini gösteren bu ikincil enfeksiyonlar dikkati bakteriyel bir akciğer hastalığına çekerek akciğer kanserinin tanısını geciktirebilir.
3. **Periferik grup:** Periferik küçük bronş ve bronşiyollerden köken alır. Uzun bir gecikme dönemi (latent periyot) ile tanımlanabilir. Erkenden plevraya sıçrayarak plevrada sıvı birikmesi (plevra epanşmanı) ile kendilerini belli etmeleri diğer yerleşimli gruplara göre daha sıktır. Bazen çeşitli nedenlerle yapılan radyolojik muayenelerde tesadüfen teşhis edilir. Periferik tümörlerde bronkoskopinin tanı değeri kısıtlıdır. Endobronşiyal lavaj ve aspirasyon materyalinde habis hücre aranması tanıda yardımcı olabilir (Balcı, 1993).

### 2.1.4. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi:

Akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırması Dünya Sağlık Örgütü'nün ilk sınıflandırmasından (1967) sonra klinik, epidemiyolojik, histogenetik ve moleküler bazda yapılan çalışmalar sonucu geliştirilmiştir. Akciğer kanserlerinin sınıflandırılması ışık mikroskobu görüntülerine göre değerlendirilmekte olup Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) (yaklaşık %15) ve Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) (yaklaşık %85) olarak ikiye ayrılır. Primer tümörlerin %95'ini adenokarsinom, skuamöz

hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom, küçük hücreli karsinom ve bunların birleşimleri oluşturur.

**1. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK):** Tüm akciğer kanserleri arasında %85 oranında görülür ve 3 alt tipe ayrılır.

**a. Skuamöz hücreli karsinom:** Akciğer kanserleri arasında %25-40 oranında görülür (Spiro ve Porter, 2002). Genellikle merkeze yerleşmekle birlikte periferde de görülebilir (Tomashefski ve ark. 1990). Değişik derecelerde keratinleşme ve hücreler arasında bağlantılar bulunan epitel hücrelerin oluşturduğu habis bir tümördür. Papiller, berrak hücreli, küçük hücreli ve bazoloid tipler olmak üzere alt gruplara ayrılır. Skuamöz hücreli karsinomlar diğer tiplere göre daha geç metastaz yapar, genellikle yerel yayılım gösterir (Scarpatti ve ark. 2002).

**b. Adenokarsinom:** Tüm akciğer kanserleri arasında %25-40 oranında görülür. Glandüler farklılaşma veya müsin üretimi içeren epitel kökenli bir tümördür. Asiner, papiller, bronkoalveolar, müsin içeren solid tip veya bunların karışımı olmak üzere alt tipleri tanımlanmıştır. Son yıllarda adenokarsinom oranı yükselmiş olup, skuamöz hücreli karsinoma yaklaşmıştır. Sigara kullanımının tümörle ilişkisi diğer tiplere göre daha az olmakla birlikte, son yıllarda düşük katranlı sigaraların daha derin solunumu ile oluşan etkinin bu tip tümörlerin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Adenokarsinom sigara içmeyen kadınlarda daha sık görülür. Genellikle periferde yerleşen tümör diğer tiplere göre plevra ile göğüs duvarına daha sık invazyon yapar (Yousem ve ark. 2007) Adenokarsinomun alt tipleri, iyi diferansiye fütal, müsinöz (kolloid), taşlı yüzük hücreli ve berrak hücreli adenokarsinom olmak üzere alt gruplara ayrılır (Kerr, 2009).

**c. Büyük hücreli karsinom:** Akciğer kanserlerinin %9'unu oluşturur. Tümör hücresi belirgin çekirdekçik, iri bir çekirdek ve orta derecede sitoplazma içerir. Büyük hücreli karsinom; eleme

tanısı olup, skuamöz, adeno ve küçük hücreli karsinom özelliklerini taşımayan bir çeşit az farklılaşmış tümördür. Genellikle perifere yerleşmekle birlikte merkez yerleşimli de olabilir. Plevra, göğüs duvarı ve çevre yumuşak dokuya yayılım gösterebilir. Büyük hücreli karsinomun alt tipleri büyük hücreli nöroendokrin, bazoloid, lenfoepitelyoma benzeri, berrak hücreli, rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinomdur (Travis ve ark. 2004)

**d. Karsinoid tümör:** Tüm akciğer kanserlerinin %1-2'sini oluşturur. Mitoz sayısı ve nekroz kriterlerine göre atipik karsinoid (AK) ve tipik karsinoid (TK) olarak ikiye ayrılır. Beş yıllık sağ kalım TK'de %86, AK'de %52 oranındadır. Her iki tümör de sigara içmeyen, genç (20-40 yaş) hastalarda ortaya çıkar. Histolojik heterojenite bu tümörlerde görülmez (Travis ve ark. 1998).

## 2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri:

Küçük hücreli akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin %15'ini oluşturur. Vakaların %2-%3'ünde merkezi bir kitle belirir. Sıklıkla lenf nodu metastazı vardır. Histolojik olarak tümör hücreleri dar sitoplazma, 3 lenfositten daha küçük hücre boyutu ve belirgin olmayan bir çekirdekçik ile karakterizedir (Fan ve Schraeder, 2011).

### 2.1.5. Akciğer Kanseri Evreleme:

Akciğer kanseri tedavisindeki ilk adım hastaların doğru bir şekilde evrelemesinin yapılmasıdır. Evreleme çalışmaları yıllar içinde farklılıklar göstermiştir. Birincil olarak tümörün durumu (T), bölgesel lenf nodları (N) ve metastatik tutulumu (M) dayalı TNM evreleme sistemi 1946 yılından bu yana gelişerek güncellenmiştir. Daha önceki yıllarda kullanılan evreleme sistemlerindeki yetersizlikler nedeniyle Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü (IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer) "Akciğer Kanseri Evreleme Projesi" adı altında bir proje gerçekleştirmiştir. 2010 yılında yeni kabul edilen bu çalışma için 1999-2010 tarihleri arasında akciğer kanseri tanısı konulan "Hasta kayıtları", "Klinik çalışmalar", "Cerrahi seriler" ve "Hastane serileri" verileri kullanılmıştır. Çalışmaya alınan hastalar 20 ülke,

45 farklı kaynaktan en az ortalama 5 yıl takip edilmiş olan toplam 100,869 olguyu kapsamaktadır. 100,869 olgudan yeterli takip ve evre bilgisi olan 81,495 hasta çalışma için değerlendirmeye alınmış ve bu sınıflamaya göre 68,463 olgu KHDAK, 13,032 olgu ise KHAK olarak sınıflandırılmıştır. Bu hastaların %41'ine cerrahi, %11'ine radyoterapi, %23'üne bütünlük (kombine) tedaviler uygulanmıştır. Çalışma verileri ve istatistiksel analizler Amerika'da yer alan Kanser Araştırma ve Biyoistatistik Merkezi'nde yapılmıştır. Çalışma sonucunda yapılan tüm bu değişiklikler çerçevesinde şekillenen yeni evreleme sistemi tüm tanımlarıyla Tablo 2-1 ve Tablo 2-2'de verilmiştir.

**Tablo 2-1: Evre Gruplandırması-Rami-Porta ve ark. (2011)'den**

<b>Evre</b>	<b>T Kategorisi</b>	<b>N Kategorisi</b>	<b>M Kategorisi</b>
Bilinmeyen Karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Evre IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0

	T4	N1	M0
Evre IIIB	T4	N2	M0
	T yok	N3	M0
Evre IV	T yok	N yok	M1a
	T yok	N yok	M1b

**Tablo 2-2: Güncellenmiş T, N, M tanımlamaları- Rami-Porta ve ark. (2011)'den**

TNM bileşenleri ve kategorileri	Tanımlamalar
T: Primer Tümör	
Tx	Primer tümörün belirlenmemesi veya balgam ya da bronş lavajında habis hücrelerin tespit edilip, görüntüleme yöntemleri veya bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi.
T0	Primer tümör belirtisi yok. Genellikle yeniden tedavi uygulanacak hastalar için kullanılır.
Tis	Karsinoma in situ
T1	3 cm'den daha küçük tümör, akciğer veya visseral plevra ile çevrilidir, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale invazyon göstermeyen tümör.
T1a	2 cm veya daha küçük tümör
T1b	2 cm'den büyük ama 3 cm veya daha küçük tümör
T2	3 cm'den daha büyük ama 7 cm'den daha küçük veya T2 tümörleri 5 cm'den küçükse T2a olarak ifade edilir. <ul style="list-style-type: none"> <li>Ana bronşları kapsar, karinadan 2 cm veya daha fazla uzak</li> <li>Visseral plevrayı istila eder.</li> <li>Hiler bölgeye yayılan ancak bütün akciğeri kapsamayan atelektasis veya obstruktif zaturre ile ilişkili</li> </ul>

T2a	3 cm'den büyük ana 5 cm veya daha küçük tümör
T2b	5 cm'den büyük 7 cm'den küçük veya eşit tümör
T3	Tümör 7 cm'den büyük olup, göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diyafram, mediastinal plevra, pariyetal plevra, perikard gibi yapılardan herhangi birine doğrudan istila göstermesi veya karinaya 2 cm'den daha yakın ancak karinayı tutmayan ana bronştaki tümör veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan ya da aynı lobda tümör nodüllerine ayrılan tümör
T4	Tümör herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, vertebra korpusu ve karina gibi yapılardan herhangi birini istila etmesi veya habis plevral ya da perikardial sıvı ile birlikte olan tümör veya tümörle aynı lob içinde satellit tümör nodül veya nodülleri.
N: bölgesel lenf nodları	
Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodlarına gösterilebilir bir metastaz yok
N1	Aynı taraf peribronşial ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün doğrudan yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması.
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkorinal lenf bezlerine metastaz.
N3	Karşı taraf mediastinal, hiler, aynı veya karşı taraf supraklaviküler veya skalen lenf bezi metastazı.
M: uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var, bölgeler belirli
M1a	Karşı taraf lobunda ayrılmış tümör nodülleri, plevral nodüllü tümörler veya habis plevral (veya perikardial) akıntı
M1b	Uzak metastaz var

---

## **2.2. Akciğer Kanserindeki Genetik ve Epigenetik Değişimler:**

### **2.2.1. Genomik Kararsızlık, Kromozomal Bozukluklar ve Heterozigotluk Kaybı:**

Genomik kararsızlık kanserin ayırıcı özelliklerinden biridir. Kopya sayısındaki artış ve delesyonların haritalanması pek çok onkogen ve tümör baskılayıcı genin tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Akciğer kanserinde 3p, 4q, 9p ve 17p'de özgün allelik kayıp; 1q, 3q, 5p ve 17q'da allelik artış ve anöploidi şeklinde pek çok genetik değişikliğe rastlanmaktadır ( Fong ve ark. 1995; 1999, Sekido ve ark. 2003).

Akciğer kanseri patogeneğinde MYC, RAS, EGFR, NKX2-1, ERBB2, SOX2, BCL2, FGFR2, ve CRKL'nin etkinleşmesi ve RB1, CDNK2A, STK11, FHIT genlerinde etkinlik kaybı olmak üzere pek çok genetik değişikliğin de yer aldığı gösterilmiştir (Larsen ve Minna, 2011).

Tümörlerde meydana gelen genetik değişikliklerin tanımlanması tümör oluşum mekanizmasının anlaşılması için önemli bir hedef olmuştur. Kanser genomunun analizinde kullanılan sitogenetik karyotipleme, heterozigotluk kaybı ve mikrosatellit analizlerini içeren erken dönemdeki teknikler, Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH: Comparative Genomic Hybridization), metafaz yayma ya da floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi gelişen tekniklerle devam etmiştir. Bu teknikler kanser genomunda çoklu sayısal ve yapısal kromozomal değişikliklerin saptanmasına olanak sağlar (Massion ve ark. 2002, Jiang ve ark. 2004, Shibata ve ark. 2005, Zhu ve ark. 2007, Girard ve ark. 2009).

### **2.2.2. Telomeraz Etkinliği:**

İnsan telomerlerinde TTAGGG tekrar bölgesi 10-15 kb uzunluğundadır (Blasco, 2005). Her hücre bölünmesinde somatik hücreler telomerlerindeki nükleotidleri kaybeder. Sonuç olarak kromozom uçları kısalmır ve bu durum hücrenin yaşlanmasına ve sonunda ölmesine kadar giden bir süreci başlatır. Telomeraz, her DNA tıpkıyapım döngüsü sonucu meydana gelen kayıpları gidermek için kromozomun sonuna TTAGGG nükleotit tekrarlarını ekleyen enzimdir. Normal somatik hücrelerin telomeraz etkinliği olmayıp bu hücreler belli bir boyuta ulaştığında bölünmeyi durdurur. Ölümsüz hücreler telomeraz etkinliğine sahip olduğundan neredeyse bütün akciğer kanserlerinde çoğalmaya devam eder (Albanell ve ark. 1997). Telomeraz etkinleşmesi, akciğer kanseri patolojisi oluşumundaki erken basamaklardan biri olmamakla birlikte bronş epiteli ve bronş lavaj örneklerinde tespit edilebilen moleküler işaretlerden biridir (Xinarianos ve

ark. 2000). Çünkü bütün akciğer kanserlerinde telomerazın ifade edildiği gösterilmiş olup, ifade seviyeleri ile ilgili çalışmalar, prognoz ve lenf nodu metastazıyla ilişkilendirilmiştir (Hara ve ark. 2001).

### **2.2.3. Akciğer Kanserinde Metastaz**

Akciğer kanseri henüz kansere ait şikayetlerin başlamadığı zamanda bile yakın ve uzak metastaz yapabilmesi nedeniyle en erken metastaz yapan kanserler arasında yer alır. Bir kısım vakalarda metastazlara ait şikayet ve bulgular ilk odağa ait olanlardan daha önce ortaya çıkar. Akciğer kanserinin özellikle metastaz yaptığı yerler hiler ve mediastinal lenf bezleridir. Bunun yanında supraklavikular ve servikal lenf bezleri, kemikler, karaciğer, sürrenal böbrekler ve beyin de metastazların sık görüldüğü yerlerdir. Epidermoid kanserlerde pulmoner kan damarlarını, hiler ve mediastinal lenf bezlerini, göğüs duvarının yumuşak ve kemik kısımlarını istila ederek doğrudan yayılımları diğer tiplere oranla fazladır. Anaplastik kanserler ve adeno kanserlerin ise kan ve lenf yolları ile yayılma eğilimi daha fazladır. Bronşioalveolar kanserler ise bronşlar yoluyla yayılarak bronş içine yerleşebilir (Balcı, 1993).

### **2.2.4. Protoonkogenler ve Büyümenin Uyarılması:**

Kanser hücreleri hem büyüme etmenini hem de onun almaçlarını içeren ve kendi kendini uyaran yani otokrin büyüme döngüsüne sahip bir sistemdir (Alberts ve ark. 2008 p.881). Akciğer kanserli hücreler ya da bunlara yakın hücrelerde pek çok büyüme etmeni ve almaçlarının aşırı ifade edilmesiyle otokrin ya da parakrin büyüme döngüleri oluştuğu gösterilmiştir (Fong ve ark. 2003).

Epidermal büyüme etmeni almaç (EGFR) epiteliyal çoğalmayı ve farklılaşmayı düzenler (Sekido ve ark. 2003). Zar geçen bir protein olan 170 kDa'lık EGFR, hücre dışı ligand bağlayan bölge ile hücre içi tirozin kinaz etkinliği gösteren bir bölgeden oluşur (Yoshida ve ark. 2010). EGFR'nin aşırı ifade edilmesi sıklıkla KHDAK'lerinde, özellikle skuamöz hücreli karsinomlarda görülmekte olup, KHAK'lerinde nadiren rastlanır (Sekido ve ark. 2003). EGFR geninin hem 19. eksonundaki kayıplar hem de 21. eksonun 858. kodonundaki arjinin ile lösinin yer değiştirdiği nokta mutasyonları (L858R) en iyi bilinen EGFR mutasyonlarıdır (Murray ve ark. 2008, Rosell ve ark. 2009, Tanaka ve ark. 2010). EGFR mutasyonlarına adenokarsinomlarda, kadınlarda, hiç sigara içmeyenlerde ve Doğu Asya kökenlilerde daha sık rastlanır (Larsen ve Minna, 2011).

HER2/neu, ERBB ailesinin üyesi olup KHDAK'li hastaların %30'unda, özellikle adenokarsinomlarda fazla miktarda ifade edilir (Bunn ve ark. 2001). HER2/neu'nun KHDAK'li hastalarda aşırı ifade edilmesi kısa sağ kalım süresi ve çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Tsai ve ark. 1996).

İnsülin-benzeri büyüme etmeni-I alması (IGF-IR), IGF-I ve IGF-II için ana almaç olup, iki alfa ve iki beta alt ünitesinden oluşmuştur. IGF-IR'nin normal büyüme ve gelişme için önemli olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Werner ve ark. 1997). Akciğer kanserinde IGF-IR'in aşırı ifadesi, skuamöz hücrelerde diğer histolojik tiplere kıyasla daha çok görülür (Heist ve ark. 2012). Klinik çalışmalarda çeşitli rekombinant monoklonal antikörlerin tek başına veya kemoterapiyle IGF-IR etkinliğini durdurduğu gösterilmiş olup, bu ilaçların akciğer kanseri tedavisinde verimliliği araştırılmaktadır (Heist ve ark. 2012).

Platelet-kökenli büyüme etmeni alması (PDGFR), 4 izoformu olan (PDGFR-A, PDGFR-B, PDGFR-C, PDGFR-D) dimerik yapıda bir almaçtır. Özellikle PDGFR-B endotel ve stromal hücrelerini etkileyerek anjiyogenezi düzenler ve akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasına neden olur (Reinmuth ve ark. 2001, Crosby ve ark. 1999). Akciğer kanseri tedavisinde PDGFR'nin hedeflendiği, PDGFR inhibitörleri test edilmiştir. Ancak bu inhibitörlerin henüz genotipe veya skuamöz histolojiye özgün olmadığı bildirilmiş olup, tedavi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Heist ve ark. 2012).

Vasküler endotel büyüme etmeni alması (VEGFR) anjiyogenezi başlatan birincil uyarıcı etmendir (Ferrera, 2005). İşlevini bir veya daha fazla tirozin kinaz almasına (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) bağlanarak yerine getirir. VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücre göçü, farklılaşma ve sağ kalım için önemli olup, damar geçirgenliğini artırır. VEGFR-3 lenf anjiyogenezi ve lenfatik metastaz ile ilişkilidir. VEGF izoformlarının etkinliğini durduran rekombinant monoklonal antikörlerin akciğer kanseri tedavisinde etkileri araştırılmaktadır. (Ferrera 2005, Marconcini ve ark. 1999, Stacker ve ark. 2001).

Akciğer adenokarsinomlarının %20-30'unda, KHDAK'lerinin %15-20'sinde Ras ailesi protoonkogenlerinde nokta mutasyonları bulunduğu gösterilmiştir. Akciğer kanserinde mutasyonların %90'ı K-Ras'ta yerleşik olup, %80'i kodon 12'de geri kalanı kodon 13 ve kodon 61'de bulunur. H-Ras ve N-Ras mutasyonları nadiren bildirilmiştir

(Rodenhuis ve Slebos, 1992). K-Ras mutasyonlarının %70'i G→T dönüşümlerinden oluşur. Bu dönüşüm sonucunda glisin amino asidi, sistein veya valin amino asidi ile yer değiştirir (Greenblatt ve ark. 1996). Akciğer tümörlerinde K-Ras mutasyonlarının sık görülmesi tedavide hedef olarak seçilmesine neden olmuştur. Hücrede işlevini gösterebilmesi için Ras'ın farnesiltransferaz ve lipit modifikasyonunu düzenlemesi gerekmektedir (Adjei ve ark. 2003).

Sinyal ileti yolağının diğer bir üyesi Myc protoonkogen ailesi olup (Myc, Myc-N ve Myc-L) hücre çoğalmasının kontrolünün sağlanmasında işlev gösterir. Myc ifadesindeki normal olmayan değişimlere akciğer kanserinde sıkça rastlanır (Krystal ve ark. 1988). Myc geni mitokondriyal apoptoz yolağını etkinleştirerek hücreleri apoptoza yönlendirebilir (Meyer ve Penn, 2008). Myc geninin sıklıkla KHDAK'de, Myc-N ve Myc-L ise sıklıkla KHAK'de etkinleştiği gösterilmiştir (Fong ve ark. 1999, Broers ve ark. 1993).

#### **2.2.5. Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyümenin Baskılanması:**

p53; gamma ışınları, UV ışınları, karsinojenler ve kemoterapi nedeniyle oluşan DNA hasarını düzelterip genom bütünlüğünü sağlamakla görevlidir. p53, G1/S hücre döngüsü geçişi, G2/M DNA hasarı kontrol noktası ve apoptozu sağlayan genlerin ifade edilmesini etkinleştiren bir yazılım etmenidir. p53 geni 17p13'de yerleşik olup tümör baskılayıcı genler içerisinde en çok mutasyona uğrayan genidir. KHAK'lerin %75-100'ünde, KHDAK'lerin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonu saptanmıştır. Skuamöz hücreli (%51) ve büyük hücreli karsinomlarda (%54) p53 değişimlerine adenokarsinomlarda rastlanılandan (%39) daha sık karşılaşılmaktadır (Tammemagi ve ark. 1999). G→T dönüşümünü içeren pek çok p53 mutasyonu sigara kullanımı ile ilişkilendirilmektedir (Greenblatt ve ark. 1996). Yanlış anlamlı mutasyonlar p53 proteininin yarı ömrünü uzatmakta olup, artmış protein düzeyleri immünohistokimyasal yöntemlerle saptanabilir. Anlamsız mutasyonlar, küçük delesyonlar, insersiyonlar ya da kırılma hataları immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilememektedir (Casey ve ark. 1996). Moleküler veya immünohistokimyasal olarak belirlenebilen p53 mutasyonları pulmoner adenokarsinomlu hastalarda hastalığın belirlenmesi açısından ayırıcı bir işarettir (Mitsudomi ve ark. 2000). HDM2 onkogen ürünü ve p14<sup>ARF</sup> tümör baskılayıcı gen (TBG) proteini p53'ün diğer artı yöndeki düzenleyicileridir. HDM2, KHDAK'lerin %25'inde aşırı şekilde ifade edilerek p53'ün işlev göstermesini

engellemektedir. p14<sup>ARF</sup> ise p53'ün hücre içerisindeki etkinliğini engelleyerek hücre büyümesini kontrol eder. Akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalar bazı hastalarda p14<sup>ARF</sup>'ün ifadesinin kaybolduğunu göstermiştir (Eymin ve ark. 2002).

p16<sup>INK4a</sup>-siklin D1-siklin bağımlı kinaz-4 (SBK-CDK)-Retinoblastoma protein yolağı, hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişleri kontrol eder veya düzenler. p16<sup>INK4a</sup>, siklinler, CDK4 veya CDK6'nın etkinliğini baskılayarak RB işlevini düzenli bir şekilde yerine getirebilmesini sağlar. p16<sup>INK4a</sup> geni çoğunlukla KHDAK'lerinde, RB geni ise KHAK'lerinde mutasyona uğramıştır veya bu genlerin işlevi değişmiştir. p16<sup>INK4a</sup> geni RB genini fosforillenmeden koruyarak hücreleri G1 evresinde durdurur ve hücre döngüsünün devamını sağlar. p16<sup>INK4a</sup> 9p21'de yerleşiktir ve habis tümörlerde sıklıkla mutasyona uğramıştır. KHDAK'lerinin %30-70'inde p16<sup>INK4a</sup> geninde mutasyon (delesyon ve nokta mutasyonları) ve epigenetik değişimler (5' CpG adacıklarının aşırı metillenmesi) görülmektedir (Sekido ve ark. 1998). p16<sup>INK4a</sup> ve p14<sup>ARF</sup> aynı DNA bölgesinin alternatif şekillerde okunmasından kaynaklanan ve buna bağlı olarak bu bölgede gerçekleşen değişimler, p16<sup>INK4a</sup>'nın işlevini bozar ve p14<sup>ARF</sup>'nin p53'ü baskılamasını engeller (Belinsky ve ark. 1998).

RB geni 13q14'de yerleşik olup, çekirdekte büyümeyi baskılayan bir protein kodlar. Fosforillenmemiş haldeyken etkin olan RB, hücre döngüsünün G1/S evresi geçişlerinde E2F gibi önemli yazılım etmenlerine bağlanarak büyümeyi baskılar (Sekido ve ark. 1998). Fosforillendiği zaman CDK4/siklin D karmaşımının etkinleşmesiyle RB etkinliğini kaybederek E2F yazılım etmeninden ayrılır. E2F proteinleri DNA sentezi için gerekli genlerin yazılımını başlatan p53 dengelenmesine öncülük eden proteinlerdir (Johnson ve ark. 1993). KHDAK'lerin %60'ında KHAK'lerin %90'undan fazlasında Rb proteininin ifadesinde değişiklik görülür (Lee ve ark. 1999, Modi ve ark. 2000).

Siklin D1, RB'nin fosforillenmesine yol açarak tümör baskılama etkinliğini engeller. Ayrıca siklin D1'in aşırı ifade edilmesi, p16<sup>INK4a</sup> - siklin D1- CDK4- RB protein yolağının işleyişinin bozulmasına neden olan alternatif bir mekanizma olup, KHDAK'lerin %25-47'sinde görülen bu ifade artışı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Betticher ve ark. 1996, Caputi ve ark. 1997).

Akciğer tümörlerinin %96'sında ve preneoplastik akciğer lezyonlarının %78'inde kromozom 3p'de kopya sayı değişiklikleri görülmektedir. Heterozigotluk

kaybı (LOH), allel kaybı veya promotör bölge metillenmesi akciğer kanseri hücrelerinde sıklıkla ifade kaybına neden olur.

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %50'sinde 3p14.2'de yerleşik genlerden biri olan Frajil Histidin Triad (FHIT) geninin ifadesi kaybolmuştur. Bu ifade kaybının aşırı promotör metillenmesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Geradts ve ark. 2000, Zöchbauer ve ark. 2001). 3p bölgesindeki bir diğer tümör baskılayıcı gen 3p21.3'te yerleşik olan RASSF1A genidir. Hücre döngüsünü düzenleyen, mikrotübül dengelenmesini sağlayan ve apoptozu uyaran (Agathangelou ve ark. 2005) RASSF1A'nın KHAK'lerinin %90'ından fazlasında ve KHDAK'lerin %40-50'sinde epigenetik olarak düzenlendiği kanıtlanmıştır (Dammann ve ark. 2000).

RASSF1A'dan 100 kb uzaklıktaki, 3p21.3 bölgesinde yerleşik FUS1, SEMA3B, 101F6 ve NPRL2 genlerinin de akciğer kanserli hücrelerin büyümesini baskıladığı bildirilmiştir. Bu genler aşırı promotör metillenmesiyle etkinliğini yitirir veya haployetersizliğin neden olduğu bir mekanizma ile allellerinden birini kaybedebilir. Ayrıca 3p24'te yerleşik olan Retinod Asit Almacı (RAR $\beta$ ) retinoid aside bağlanır, hücre büyümesi ve farklılaşmasını sınırlandırarak tümör baskılama işlevini yerine getirir (Larsen ve Minna, 2011). Retinoid sinyal sistemi siklin D1 ifadesini baskılayarak, G1 evresinde hücre döngüsünü durdurur ve RB proteininin fosforillenmesini engeller (Boyle ve ark. 1999). TSLC1 11q23.2'de yerleşik olup KHDAK'lerinde heterozigotluk kaybı ve promotörün aşırı metillenmesi ile etkinliğini kaybettiği gösterilmiştir (Kuramochi ve ark. 2001).

Diğer kromozomlarda yerleşik PTEN, TGF $\beta$ RII ve PPP2R1B, MYO18B gibi tümör baskılayıcı genlerin de akciğer kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sekido ve ark. 2003).

### **2.2.6. DNA Metillenmesi:**

Gen ifadesinin düzenlenmesinde yer alan genin promotör bölgesinin aşırı metillenmesi ifade kaybına neden olur. DNA'nın metillenme değişiklikleri insan kanserlerinde sıklıkla rastlanan bir durumdur. Promotör bölgede bulunan 5' CpG adalarının aşırı metillenmesi genin yazılımsal olarak sessizleşmesine neden olur. Bu mekanizma ile RB, VHL ve p16 gibi TBG'ler etkinliğini kaybeder (Fong ve ark. 1999). KHDAK'lerinde p16'nın aşırı metillenmesi p16 ifadesinin baskılanmasına neden olup,

bu durum akciğer kanseri gelişiminin erken dönemlerinde meydana gelir (Belinsky ve ark. 1998). Akciğer kanserinde p16 dışında metillenme görülen genler ölüm ilişkili (DAP) kinaz, glutatyon S-transferaz (GSTP1), H-kaderin (CDH13), O6-metilguanin-DNA-metiltransferaz, retinoik asit alması beta-2 (RAR $\beta$ 2) ve metalloproteinazların doku baskılayıcısı (TIMP) gibi genlerdir (Toyooka ve ark. 2001). Ayrıca akciğer kanserinde aşırı metillenmenin görüldüğü diğer bölgesel yerleşim yerleri de bulunmuştur. Bunlar 3p, 4q34, 10q24 ve 17p13'te yerleşik durumda olup, henüz işlevleri tam olarak belirlenmemiştir (Kohno ve ark. 1998).

### **2.2.7. Kromatin Yeniden Modelleyici Enzimlerden CHD Ailesi:**

Kromatinin yeniden şekillenmesi olarak bilinen, kromatindeki yazılımla bağlantılı yapısal değişikliklerin ayrıntılı mekanizmaları, süreçle doğrudan ilgili bazı enzimlerin tanımlanmasıyla aydınlatılmıştır. Bunlar, nükleozomun çekirdek histonlarını asetilleyen enzimler, asetillenmeyi kaldıran ve DNA'daki yeni nükleozom şekillenmesinde ATP enerjisini kullanan diğer enzimleri kapsamaktadır.

Nükleozomun çekirdek histonlarının her birinin (H2A, H2B, H3, H4) iki farklı yapısal bölgesi vardır. Bunlar histon-histon etkileşmesinde ve nükleozom çevresine DNA'nın sarılmasında gerekli merkezi bölge ile yapılanmış birleşmiş nükleozom parçacığının dış kısmında bulunan lizince zengin amino uç bölgesidir. Lizin kalıntıları histon asetiltransferazlar (HATlar) tarafından asetillenir. Sitozolik (B tipi) HAT enzimleri, hücre çekirdeğine gönderilmeden önce yeni sentezlenmiş histonları asetiller.

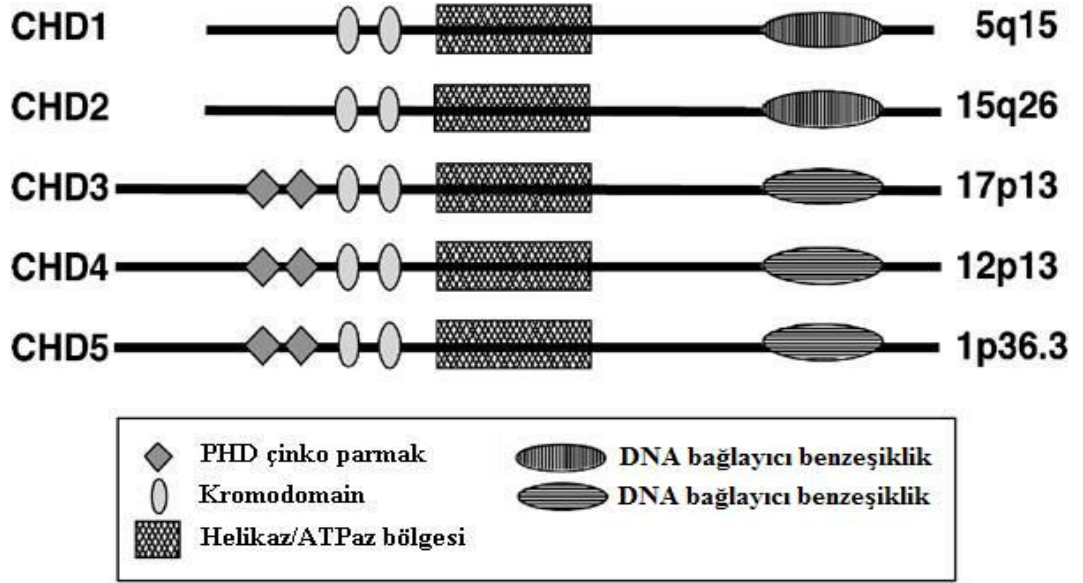
Yazılım için etkinleşen kromatinde, nükleozomal histonlar çekirdeğe ait HAT (A tipi) enzimiyle asetillenir. H3 ve H4 histonlarının amino-ucu bölgelerindeki Lys kalıntısının çoğunun asetillenmesi, nükleozomun DNA'ya olan ilgisini azaltabilir.

Kromatinin yeniden modellenmesi için, ATP hidrolizini kullanarak nükleozomların aktif şekilde hareketini ya da yer değiştirmesini sağlayan proteinler gereklidir. Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan SWI/SNF enzim karmaşımı, kromatinde aşırı duyarlı bölgeler oluşturan ve yazılım etmenlerinin bağlanmasını sağlayan en az 11 polipeptit içermektedir. NURF, SWI/SNF'nin etkinliğiyle çakışacak ve tamamlayacak şekilde kromatini yeniden modelleyen diğer bir enzim karmaşımıdır. Bu enzim karmaşımlarının kromatinin bir bölgesinin etkin yazılım için hazırlanmasında önemli rolleri vardır (Nelson ve ark. 2005, p.1100-1101).

Kromatin yeniden modelleme enzimleri evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olup, çevirim sonrası histon değişimlerini düzenleyenler ve nükleozom ile histon-DNA bağıını koparmak için ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiden faydalananlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Histon proteinlerinin asetillenme, metillenme, fosforillenme, ubikutinlenme gibi değişimleri kromatin yapısını ve nükleozomal ağ katlanışını etkiler (Khorasanizadeh, 2004). Buna karşın ATP hidroliziyle elde edilen enerjiden faydalanan çoklu alt birim karmaşımları, nükleozomları dağıtarak veya hareketlendirerek kromatin yapısını değiştirir. Tanımlanan her bir ATP-bağımlı kromatin yeniden modelleyici enzim, proteinlerin Snf2 süper ailesine ait bir alt birim içerir (Eisen ve ark. 1995). Evrimsel olarak korunmuş diğer bölgelerin varlığına bağılı olarak bu enzimler SWI/SNF (mating type SWitching/Sucose Non Fermenting), ISWI (Imitation SWitch), INO80 (INOsitol) ve CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding) aileleri olarak beş gruba ayrılır (Marfella ve Imbalzano, 2007).

Kromodomain helikaz DNA-bağılayıcı genler Swi/Snf proteinlerinin yeni bir sınıfını kodlamakta olup sadece bir Swi/Snf-benzeri helikaz-ATPaz bölgesinin yanı sıra bir DNA bağılayıcı ve kromatin yapısıyla gen yazılımını etkileyebilen bir kromodomain bölgesi olmak üzere farklı işlevsel bölgeler içerir. Kromodomain terimi Drosophila Polycomb geninin tanımlanması sırasında ortaya atılmış olup, Polycomb geninde N-uç bölgesi ve Drosophila Heterochromatin Protein 1 (HP1) proteininin N-uç bölgesi arasındaki yapısal benzerliği işaret eder (Paro ve Hogness, 1991). Hem HP1 hem de Polycomb geninin, kromatine dayalı bir mekanizma ile gen sessizleşmesine neden olduğu anlaşıldığı zaman bu durumu ifade etmek için Kromatin Yapılanma Düzenleyicisinin (Chromatin Organization Modifier) kısaltması olarak kromodomain terimi önerilmiştir. Polycomb ve HP1 kromodomainlerindeki mutasyonlar bu proteinlerin gen sessizleştirme etkinliğini ortadan kaldırır (Eissenberg, 2012). Kromodomain proteinlerinin üç sınıfı bulunmakta olup, bunlar N-uç kromodomain ve yapısal olarak benzer C-uç kromo gölge domain (chromo shadow domain) içeren proteinler, bir tek kromodomain içeren proteinler ve ardışık (tandem) kromodomain içeren proteinlerdir (Eissenberg, 2012). CHD ailesi proteinleri ardışık kromodomain içeren protein ailesi grubunda bulunmaktadır.

CHD gen ailesinin insanlarda bilinen 4 üyesi olup (Woodage ve ark. 1997), bunlardan ikisi kromatin yeniden modellenmesinden sorumlu çoklu protein karmaşımında yer alan proteinleri kodladığı gösterilmiştir. Nükleozom yeniden modelleme ve deasetillenme (NuRD: nucleosome remodelling and deacetylation) karmaşımı (*Drosophila*'da Mi2) yaklaşık 2000 kDa'lık bir karmaşım olup, en az 7 proteinden oluşur. Ancak anahtar görevindeki işlevsel protein CHD3 (Mi-2 $\alpha$ ) ve CHD4 (Mi-2 $\beta$ )'tür. CHD protein karmaşımlarının kromatin yapısını ve gen ifadesini ciddi şekilde etkileyebileceğine ve gelişmenin düzenlenmesinde, hücre döngüsü kontrolünde veya onkogenik mekanizmada rolü olabileceğine dair çok önemli kanıtlar bulunmuştur (Thompson ve ark. 2003). CHD1, ilk olarak 1993'te kromodomain ve SNF/SWI2-benzeri helikaz bölgesi içeren memeli DNA bağlayıcı proteini olarak tanımlanmıştır (Delmas ve ark. 1993). CHD2, CHD1'e olan yapısal benzerliğiyle keşfedilmiş olup henüz kendisine ait özgün rolü tanımlanmamıştır (Woodage ve ark. 1997). CHD3 ve CHD4 ilk olarak dermatomyositli hastalarda otoantijen olarak tanımlanmıştır (Ge ve ark. 1995, Zhang ve ark. 1998). Ayrıca CHD5, CHD6, CHD7, CHD8 ve CHD9 da CHD ailesinin diğer üyeleri olup, C-terminal bölgede BRK (Brashma ve Kismet), SANT-benzeri (switching-defective protein 3, adaptor 2, nuclear receptor co-repressor, transcription factor IIIB) domain, CR domainleri ve bir DNA-bağlayıcı domain gibi farklı işlevsel motifler içerir (Shur ve Benayahu, 2005, Schuster ve ark. 2002). CHD proteinlerinin yapısal motiflerinin karşılaştırılması Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



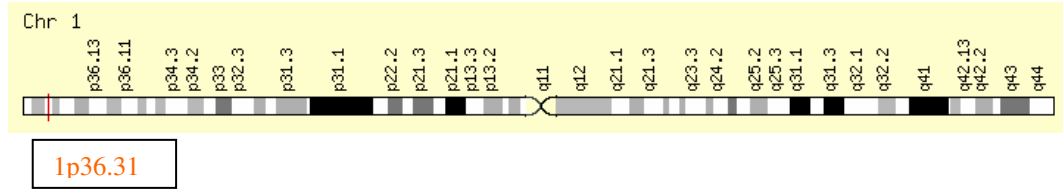
**Şekil 2-1: CHD proteinlerinin yapısal motiflerinin karşılaştırılması-Thompson ve ark. (2003)'den**

### 2.2.7.1. CHD5 Geni ve Genomik Yapısı:

CHD5 geni ilk olarak Schuster ve Stöger tarafından klonlanmış olup genin 37 eksona sahip olduğu ve 200 kb'lık bölgeye dağıldığı gösterilmiştir (Schuster ve Stöger, 2002). Daha sonra Thompson ve ark. yaptıkları cDNA dizileme çalışmalarında genin 42 eksonu olduğunu, ekson uzunluklarının 54 bç ile 3635 bç arasında değiştiğini göstermişlerdir. CHD5'in genomik yapısı incelendiğinde ekson 1'de başlangıç kodonu AUG'nin bulunduğu ve son eksonun ise bütün 3' UTR'yi içerdiği gösterilmiştir (Thompson ve ark. 2003). Genin yapısında bulunan 2 adet Plant Homeodomaini (PHD) ekson 3'te (bölge 345-387 ve 418-462), 2 adet kromodomain ekson 4 ve 5'te (bölge 508-545, 589-642), SNF2 domaini ekson 5, 6 ve 7'de (bölge 703-999), helikaz domaini ise ekson 7 ve 8'de (bölge 1037-1146) bulunmuştur (NCBI Conserved Domains)

CHD5'i kapsayan 200 kb'lık bölgenin %55.2 oranında GC içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. CHD5 genomik dizi analizleri ile CpG adası, yazılımsal başlangıç bölgesinin 630 bç öncesinde başlayıp, tüm ekson 1 boyunca devam edip intron 1'in 680 bç'nde sona ermektedir (Thompson ve ark. 2003). Ayrıca Thompson ve ark. CHD5 genini, genomik dizileme analizleriyle kromozom 1p36'da haritalamış olup bu bölgenin nöroblastoma ve diğer nöral kökenli tümörlerde sıklıkla delesyona uğradığı ve bu

bölgede bulunup delesyona uğrayan CHD5'in kanser oluşumunda payı olduğunu göstermişlerdir. CHD5'in genomik yerleşimi şekil 2-2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2-2: CHD5 genomik yerleşimi (1p36) (Genecards)**

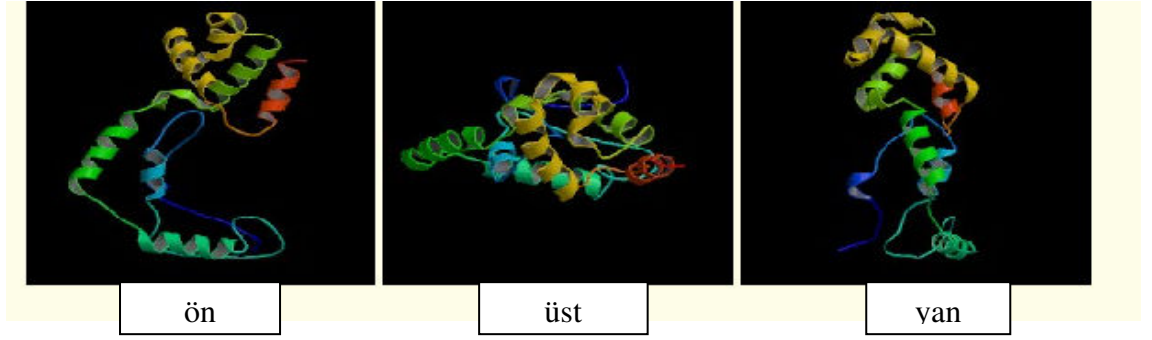
Mulero- Navarra ve Esteller, yaptıkları çalışmada, CHD1 ve CHD9 genleri dışında kalan CHD gen ailesi üyelerinin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının metillenme durumunu incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda sadece CHD5 geninin promotor bölgesinde bulunan CpG adacıklarının aşırı metillenmiş olduğunu saptamışlardır. (Mulero-Navarra ve Esteller 2008).

#### **2.2.7.2. CHD5 mRNA analizleri:**

CHD5 cDNA'sı 9646 bp'den oluşur. 5' UTR, açık okuma penceresi ve 3' UTR sırasıyla 100, 5865 ve 3681 bp'den oluşur. Transkribe olan dizi %60.1 oranında GC içeriğine sahiptir. Dizi içerisinde bazı bölgelerde GC içeriğinin %80'i geçtiği gösterilmiştir (Thompson ve ark. 2003).

#### **2.2.7.3. CHD5 Proteini ve İşlevi:**

Thompson ve ark. Chd5'in cDNA açık okuma penceresinden protein dizisini analiz etmiş ve CHD5 proteininin 1954 kalıntılı bir protein olduğunu göstermişlerdir. Chd5'in 5' kısmı 2 çinko parmak içeren Plant Homeodomain (PHD) sınıfından 2 çinko parmak (amino asit pozisyonu 345-390, 418-463) ve 2 kromodomain tarafından takip edilir. PHD çinko parmak motiflerinin kromatin ilişkili yazılımsal düzenlemede rolü olduğu düşünülmektedir. Proteinin merkez kısmı DEAH-kutu (box) tipi helikaz alanı ve SNF2 alanı içerir. DEAH ATP helikazlar ATP-bağımlı olup, nükleik asit bağlarının koparılmasında işlev gösterir. SNF2 enzimleri ise kromatin bağı koparmada, DNA tamirinde, rekombinasyonda ve yazılımsal düzenlemede gerekli proteinlerde işlev görür. (Thompson ve ark. 2003). CHD5 proteininin 3 boyutlu yapısı şekil 2-3'de gösterilmektedir.



**Şekil 2-3: CHD5 proteinin 3 boyutlu yapısı (USCS Genome Bioinformatics)**

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Materyal:

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'na çeşitli şikayetlerle başvurarak akciğer kanseri tanısı konmuş 50 hastanın tümör dokuları ve kontrol olarak da tümör dokularının yakınındaki normal dokular çalışmaya dahil edildi. Çalışmalar İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda Mayıs 2011-Ocak 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Bu dokulardan elde edilen DNA'lar bisüfit ile muamele edildikten sonra CHD5 genine özgü metillenme profilini incelemek amacıyla metillenmeye özgü PZR yapıldı.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler:

- Agaroz (Sigma-Almanya)
- Borik Asit (Merck-Almanya)
- Bromofenol Mavis (Sigma-Almanya)
- Etanol (Kimetsan-Türkiye)
- Etidyum Bromür (Sigma-Almanya)
- dATP (Fermentas-Litvanya)
- dGTP (Fermentas-Litvanya)
- dCTP (Fermentas-Litvanya)
- dTTP (Fermentas-Litvanya)
- Etilendinitrilotetraasetikasit (EDTA) (Merck-Almanya)
- Magnezyum Klorür (Fermentas-Litvanya)
- PZR tamponu (Magnezyumsuz) (Fermentas-Litvanya)
- Sodyum Hidroksit (Merck-Almanya)
- Trizma-Base (Tris) (Sigma-Almanya)
- Platinum Taq DNA Polimeraz enzimi (Invitrogen-Brezilya)

##### 3.1.3. Elektroforez Analizinde Kullanılan Standartlar:

- 100 bp'lik DNA Ladder Marker (Fermentas-Litvanya)
- (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000)

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar:

- Agaroz Yatay Elektroforez Tankı (E-C apparatus- A.B.D)
- Derin Dondurucu (-20 °C) (Arçelik-Türkiye)
- Distile Su Cihazı (Nüve-Türkiye)
- Etüv (Hybaid-İngiltere)
- Güç Kaynağı (E. C Apparatus-A.B.D)
- Hassas Terazî (Shimadzu- Libror EB-3200 HU-Japonya)
- Manyetik Karıştırıcı (Janke-Kunkel-Almanya)
- Nanodrop Spektrofotometre (ND-1000-A.B.D)
- Otoklav (Hirayama-Japonya)
- Otomatik pipetler (Eppendorf-Almanya)
- pH Metre (Mettler Toledo Mp 230-İsviçre)
- Soğutmalı ve Mini Santrifüj (Hettich-Almanya)
- Termal Döngü Cihazı (PCR) (Techne-İngiltere)
- Ultra derin dondurucu (-80°C-Sanyo-Japonya)
- UV kaynağı (Vilber- Lourmat-Fransa)
- Vorteks (Velp Scientifica-İtalya)

### 3.1.5. Tampon ve Çözeltiler:

#### 3.1.5.1. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları:

10X TEB (Tris-Borik Asit-EDTA tamponu (1lt):	5 M Tris HCl (pH: 7.4) 0.02 M EDTA (pH:8.0) 0.88 M Borik Asit
Etidyum Bromür	10 mg/ml
10x Yükleme Tamponu	4 gr sukroz 0.025 gr bromofenol mavisi
Kullanılan Jeller:	
%2'lik agaroz jel içeriği	0.6 gr agaroz 30 ml 0.5x TEB tamponu 1.5 µl Etidyum Bromür

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Dokudan DNA Eldesi:

Ameliyat sırasında hastanın tümörlü ve bu bölgeye komşu normal bölgelerinden alınan dokular kuru eppendorf tüplere alındı, 50 mg olacak şekilde tartıldıktan sonra, bistüri ile parçalandı ve elde edilen homojenttan High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche-Almanya) ile DNA eldesi yapıldı.

- Doku örneğinin üzerine 200 µl parçalama tamponu eklendi.
- 2 dakika bekletildi.
- Bistüri ile parçalanan örneklerin üzerine 40 µl proteinaz K eklendi ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alındı.
- 55°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra örneğin üzerine bağlama tamponu eklendi ve vortekslendi.
- 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örneğin üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve vortekslendi.
- Örnek filtreli tüpe alındı, 1 dakika 10.000 x g'de santrifüjlendi.
- Alt sıvı atıldı, üzerine 500 µl baskılayıcıları ortamdan uzaklaştıran tampon eklendi.
- 1 dakika 10.000 x g'de santrifüjlendi.
- Alt sıvı atıldı, üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
- 1 dakika 10.000 x g'de santrifüjlendi.
- Filtreli tüp yeni bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak üzerine önceden 70°C'a kadar ısıtılmış elüsyon tamponu eklendi.
- 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 1 dakika 10.000 g'de santrifüjlendi.

Elde edilen DNA örneklerinin Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazında miktar ve saflık tayinleri yapıldıktan sonra -20°C'de koruma altına alındı.

### 3.2.2. DNA'nın Nicel Belirlenmesi:

Dokudan izole edilen DNA'ların derişimleri spektrofotometrik ölçümler sonucu belirlendi. ND-1000 Nanodrop ile 260 nm dalga boyunda okunan OD değeri, sulandırma katsayısı ve DNA katsayısı ile çarpılarak derişim  $\mu\text{g/ml}$  cinsinden belirlendi. 260 nm / 280 nm değeri, izole edilen DNA'nın saflığının bir ölçüsü olup, normali 1.8'dir.

$$\text{DNA } (\mu\text{g / ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma Oranı} \times 50 \text{ (katsayı)}$$

### 3.2.3. Polimeraz Zincir Tepkimesinde Kullanılan Tampon, Çözelti ve Enzimler:

- 10 x PZR Tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)
- 25 mM  $\text{MgCl}_2$
- 12.5 mM dNTP
- 5 U/ $\mu\text{l}$  Taq DNA Polimeraz

Çalışma için IDT firmasında sentezletilen primerlerin 260 nm'deki OD değerleri ve  $15,3 \times \text{A} + 11,8 \times \text{G} + 9,3 \times \text{T} + 7,4 \times \text{C}$  denklemiyle hesaplanan sönüm katsayısı değerlerinden yararlanarak primerlerin ana stok derişimleri hesaplandı. Çalışma stoku ise her primerin derişimi 10 pmol/ $\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlandı.

Polimeraz Zincir Tepkimesinde kullanılan bütün primerler tekrar kullanılabilecek şekilde  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.3. CHD5 Geninin Metillenme Analizi:

Bu yöntem DNA'nın sodyum bisülfid ile değişimine dayanmaktadır. Genomik DNA elde edildikten sonra CHD5 geninin metillenme analizi için DNA örnekleri bisülfid ile muamele edildi. Böylece metillenmemiş tüm sitozinlerin urasile dönüşümü sağlandı. Daha sonra bu örnekler metillenmiş ve metillenmemiş bölgeye özgü olarak tasarlanmış primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünü %2'lik agaroz jelde UV ışık altında incelenerek birbiriyle karşılaştırıldı ve genotipleme yapıldı.

#### 3.3.1. Bisülfid Modifikasyonu:

İzole edilen DNA örneklerinin bisülfid modifikasyonları EZ DNA Methylation Gold Kit ile yapıldı.

- 20  $\mu\text{l}$  DNA örneęi üzerine 130  $\mu\text{l}$  CT Conversion Reagent eklendi.

- Örnekler termal döngü cihazında 95° C 10'  
64° C 150'  
+4° C
- Termal döngü cihazında gerçekleşen tepkime sonrasında Zymo-Spin IC Column, Collection tüpe yerleştirildi, örneklerin üzerine 600 µl M-Binding Buffer eklendi.
- 13800 rpm'de 30 sn santrifüjlenip alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
- 100 µl M-Wash Buffer eklendi ve 13800 rpm'de santrifüjlendikten sonra alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
- 200 µl M-Desulphonation Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 15-20 dk inkübe edildi. Daha sonra 13800 rpm'de 30 sn santrifüjlendi. Altteki sıvı uzaklaştırıldı.
- 200 µl M-Wash Buffer eklendi, 13800 rpm'de 30 sn santrifüjlendi, alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Örnekler 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. 10 µl M-Elution Buffer eklendi. 13800 rpm'de 30 sn santrifüjlendi.
- Örnekler kullanılana kadar -20° C'de saklandı.

Bisülfid modifikasyonu yapılan DNA örnekleri metillenmiş bölgeye özgü ve metillenmemiş bölgeye özgü primer çiftleri ile çoğaltılarak 120 V'ta 30 dakika boyunca %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışık altında incelenerek metillenmiş ve metillenmemiş örnekler belirlendi.

**Tablo 3-1: Metillenmiş ve metillenmemiş bölgeye özgü primerler-Mokarram ve ark. (2009)'dan**

Primer Adı	Dizi	Elde edilen ürün uzunluğu
Metillenmiş	MF- 5'-GAG CGt tCG GGt TTT GC -3' MR- 5'- CGa CCT CGa CGA aAA aAT aaC G -3'	125bç
Metillenmemiş	UF- 5'- GGG AGG AGt Gtt tGG GtT TTG tG -3' UR- 5'- Caa Caa aCa Aaa Caa CCT Caa CaA aAA aAT aaC a -3'	143 bç

**Tablo 3-2: Metillenmiş ve metillenmemiş primerler ile yapılan PZR koşulları**

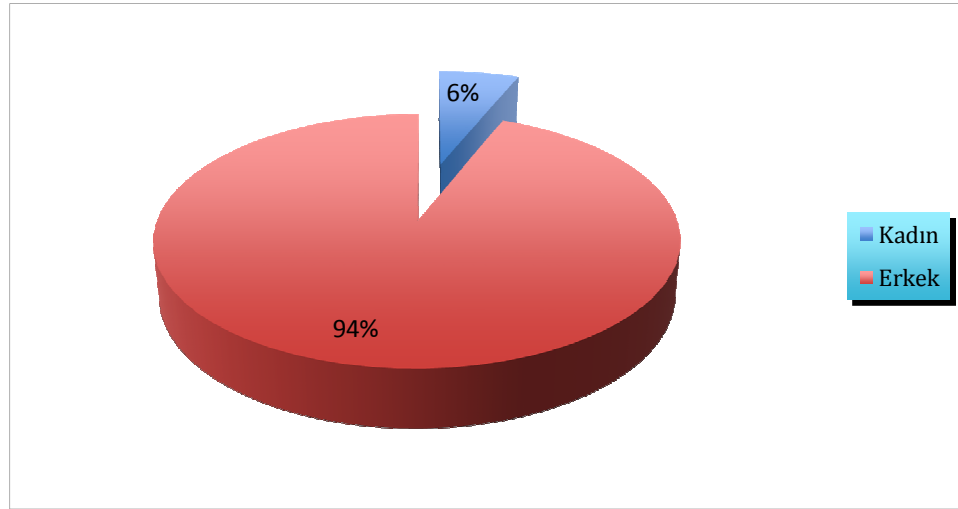
PZR koşulları			
		PZR tamponu	1x
95° C 10'		MgCl <sub>2</sub>	3 mM
95° C 30''	40 döngü	DMSO	%5 (v/v)
59° C 30''		dNTP	1,25 mM
72° C 45''		Primer ön	10 pmol
72° C 10'		Primer arka	10 pmol
+4° C		Taq Polimeraz	1U (5U/μl)
		dH <sub>2</sub> O	
		Kalıp DNA	100ng

#### 3.4. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi:

Elde edilen tüm sonuçlar lisanslı S.P.S.S 18 programı ile değerlendirildi ve istatistiksel hesaplamaları yapıldı.

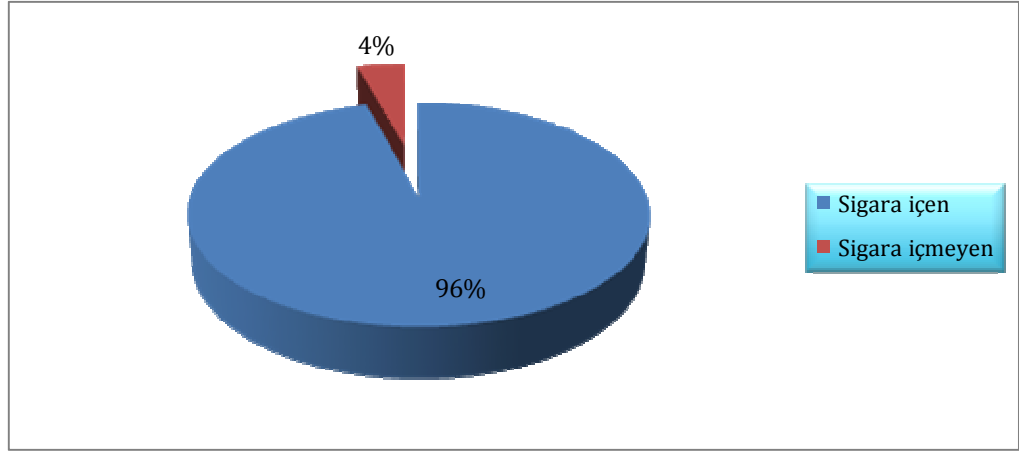
#### 4. BULGULAR

Çalışmada 50 akciğer kanserli hastadan elde edilen tümör dokuları ve kontrol olarak tümör dokusunun yakınından alınan normal dokular kullanıldı. Bu hastaların 50'sinin cinsiyet bilgilerine ve 48'inin yaş bilgisine, 44 hastanın ise evre bilgisine ulaşılabildi. Cinsiyeti bilinen 50 hastanın 47 tanesi erkek 3 tanesi ise kadındır. Hastaların cinsiyete göre dağılımının yüzde olarak ifadesi Şekil 4-1'de gösterilmektedir.



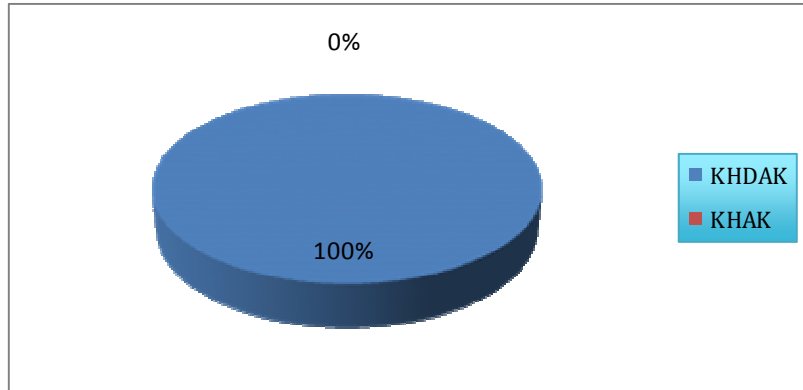
**Şekil 4-1: Hastaların cinsiyet dağılımı**

Elimizde klinik bilgisi bulunan 48 hastadan 46'sının, patoloji raporlarına göre, sigara kullanmakta olduğu 2'sinin ise hiç içmediği belirlenmiştir. Hastaların sigara kullanımına göre dağılımlarının yüzde olarak ifadesi Şekil 4-2'de gösterilmektedir.



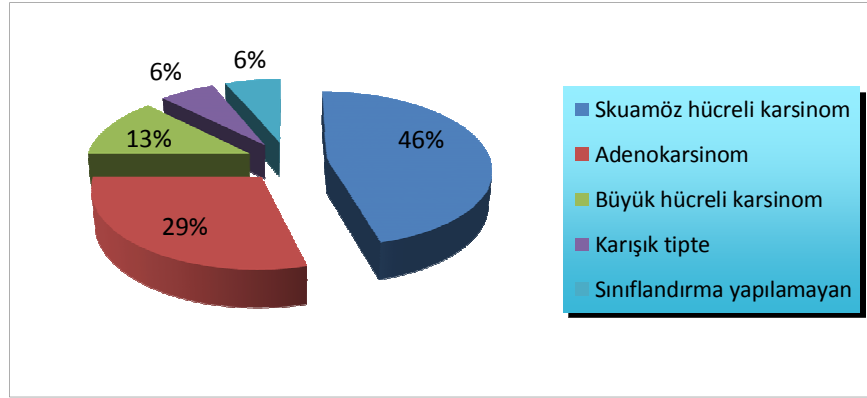
**Şekil 4-2: Hastaların sigara kullanım oranı**

Hastaların tümü Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) tanısı almıştır. Çalışılan hastalar arasında Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) tanısı alan hasta bulunmamaktadır. Bu durum Şekil 4-3'te gösterilmektedir.



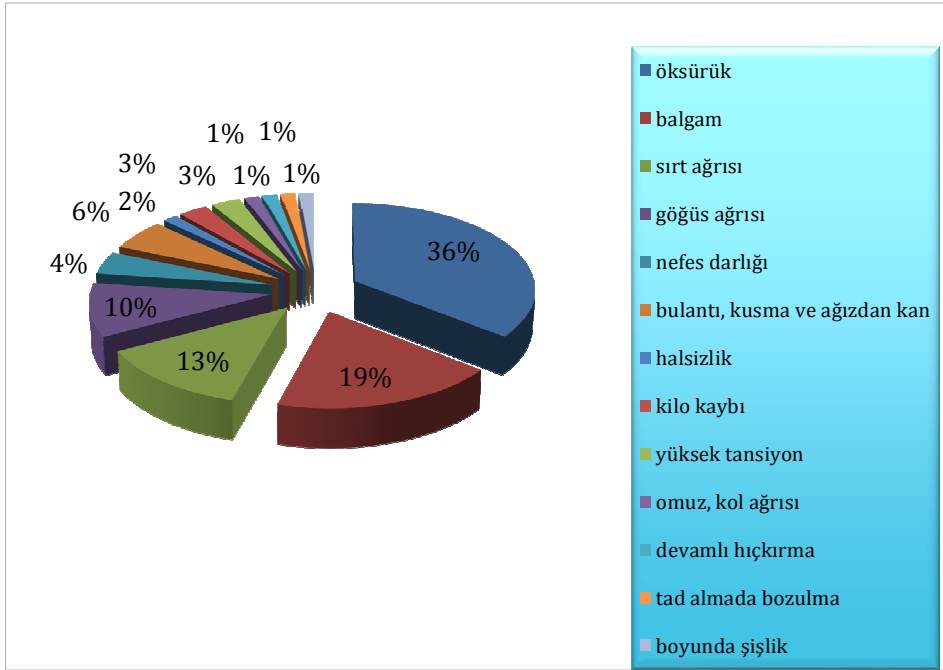
**Şekil 4-3: Hastaların histopatolojik sınıflandırılması**

KHDAK tanısı konmuş 48 hastanın 22'si skuamöz hücreli (epidermoid), 14'ü adeno hücreli, 6'sı büyük hücreli, 3'ü karışık tip olarak tanımlanırken, 3 hastanın histopatolojik sınıflandırması yapılamamıştır. Bu durum Şekil 4-4'te gösterilmektedir.



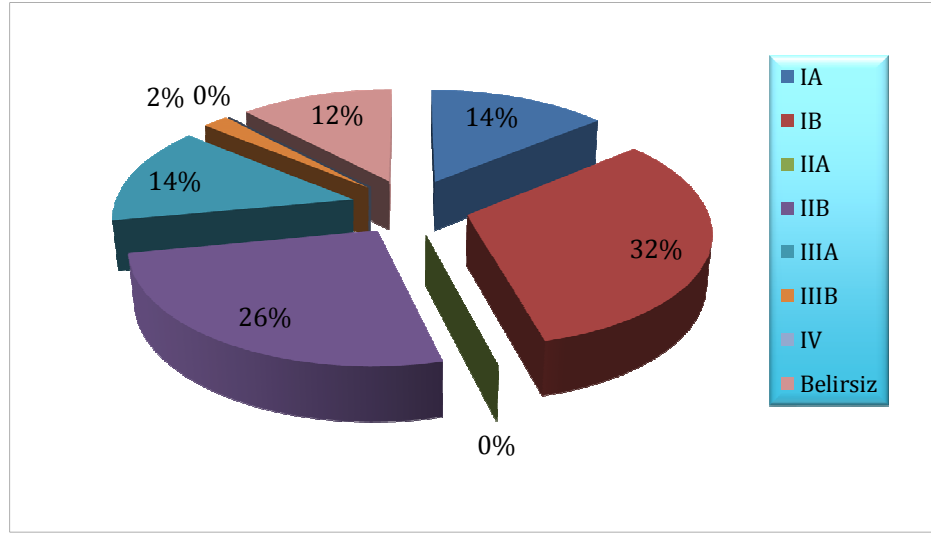
**Şekil 4-4: Hastaların KHDAK hücre tiplerine göre dağılımı**

Hastaların kliniğe başvurmalarına neden olan şikayetler; tek tek veya birlikte olmak üzere, 25 hastada öksürük, 13 hastada balgam çıkartmak, 9 hastada sırt ağrısı, 7'sinde göğüs ağrısı, 3 hastada nefes darlığı, 4 hastada bulantı, kusma ve ağızdan kan gelmesi, 1 hastada halsizlik, 2 hastada kilo kaybı, 2 hastada yüksek tansiyon, 1 hastada omuz ve kol ağrısı, 1 hastada devamlı hıçkırma, 1 hastada tad almada bozukluk ve 1 hastada boyunda şişme olarak kaydedilmiştir. Hastaların biri hiçbir şikayeti olmadan kontrol amaçlı kliniğe başvurmuş ve tetkikler sonucu akciğer kanseri tanısı almıştır. Hastaların şikayetlerinin yüzde olarak ifadesi Şekil 4-5'te gösterilmektedir.



**Şekil 4-5: Hastaların şikayet dağılımı**

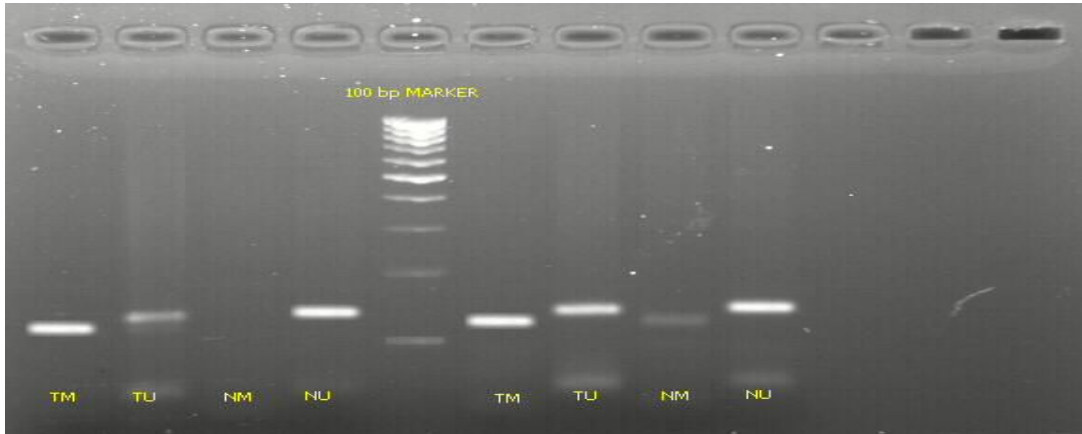
Hastaların Patoloji ABD'da yapılan detaylı incelemeleri sonucunda, 7 hastanın Evre IA, 16 hastanın Evre IB, 13 hastanın Evre IIB, 7 hastanın Evre IIIA, 1 hastanın Evre IIIB olduğu belirlenmiş, 6 hastanın ise değerlendirilmesi yapılamamıştır. Tüm hastalar içinde Evre IIA ve Evre IV olan hasta bulunmamaktadır. Hastaların evrelere göre dağılımının yüzde olarak ifadesi Şekil 4-6'da gösterilmektedir.



**Şekil 4-6: Hastaların evrelere göre dağılımı**

#### 4.1. CHD5 Geninin Metillenme Analizi:

CHD5 geninin promotör bölgesinin metillenme durumunu incelemek için metillenmeye özgü PZR yöntemi ile çoğaltılan örnekler, jel elektroforezinde yürütülüp UV ışık altında incelendi (Şekil 4-7). Daha sonra BioID programı kullanılarak jel üzerinde bant görüntüsü olan tümör ve kontrol örneklerinin metillenme yoğunlukları saptandı (Tablo 4-1).



**Şekil 4-7: CHD5 geninin promotör bölgesinin metillenmesi**

TM: Tümörlü dokudan metillenmiş DNA'ya özgü primerler ile elde edilen PZR ürünü (125 bp), TU: Tümörlü dokudan metillenmemiş DNA'ya özgü primerler ile elde edilen PZR ürünü (143 bp), NM: Normal dokudan metillenmiş DNA'ya özgü primerler ile elde edilen PZR ürünü, NU: Normal dokudan metillenmemiş DNA'ya özgü primerler ile elde edilen PZR ürünü, 5. boşluk 100 bp DNA belirteci (Fermantas, Litvanya)

**Tablo 4-1: Tüm akciğer kanserli hastaların tümör ve normal dokularıyla elde edilen bant yoğunluklarının sayısal olarak ifadesi**

<i>Hasta</i>					<i>Hasta</i>				
<i>No</i>	<i>Tümörlü Metile</i>	<i>Tümörlü Unmetile</i>	<i>Normal Metile</i>	<i>Normal Unmetile</i>	<i>No</i>	<i>Tümörlü Metile</i>	<i>Tümörlü Unmetile</i>	<i>Normal Metile</i>	<i>Normal Unmetile</i>
1	0	100	0	100	26	10023	86472	0	100
2	0	100	0	100	27	4373	43660	1721	38681
3	12248	89257	42545	95445	28	0	100	0	100
4	22540	100676	15118	99208	29	32203	47572	0	100
5	29615	56207	14823	51623	30	0	100	0	100
6	10196	60149	0	100	31	0	100	0	100
7	54267	118817	27470	105291	32	0	100	0	100
8	0	100	0	100	33	0	100	0	100
9	0	100	0	100	34	0	100	0	100
10	0	100	0	100	35	6605	48012	0	100
11	2564	62802	1534	59821	36	0	100	0	100
12	1800	59622	409	49980	37	0	100	0	100
13	0	100	0	100	38	1681	52361	0	100
14	0	100	0	100	39	0	100	0	100
15	9197	58739	0	100	40	0	100	0	100
16	0	100	0	100	41	0	100	0	100
17	2415	63723	0	100	42	0	100	0	100
18	5875	51667	7212	48813	43	0	100	1723	64597
19	0	100	0	100	44	5215	46126	0	100
20	0	100	0	100	45	1750	60437	0	100
21	0	100	0	100	46	1140	53115	0	100
22	0	100	0	100	47	2894	60192	0	100
23	0	100	0	100	48	2860	44269	2170	48647
24	2580	67159	1381	41916	49	1341	66306	0	100
25	8810	31781	0	100	50	0	100	0	100

Tablodan elde edilen değerlere göre 26 hastanın hem tümör hem de normal örneğinde hiç metillenme gözlenmemiştir. Bant yoğunluklarının değerlendirilmesi yapıldıktan sonra tümör dokularının normal dokulara göre metillenme oranlarındaki değişimi hesaplayabilmek için hem tümör dokusundan elde edilen örneklerin hem de normal dokudan elde edilen örneklerin, metillenmiş bölgeye özgü primerler ile yapılan

PZR ürünlerinin metillenme yüzdeleri hesaplandı. Tümörlü metile örneklerin bant yoğunluğu değerleri, tümörlü metile bant yoğunluğu ile tümörlü unmetile bant yoğunluğu değerlerinin toplamına oranlanıp elde edilen sayı 100 ile çarpılarak yüzde hesaplaması yapıldı. Daha sonra tümörlü örneklerin yüzde metile değerleri ile normal örneklerin yüzde metile değerleri her hasta için kendi arasında kıyaslandı. Tümör dokudaki metillenme yüzdesi normal dokudaki metillenme yüzdesine göre fazla ise metillenme artmış, tümör dokudaki metillenme yüzdesi normal dokudaki metillenme yüzdesine göre az ise metillenme azalmış, yüzde değerler arasında fark yok ise metillenme değişimi olmadığı kabul edildi. Tümörlü ve normal örneklerin yüzde metile değerleri Tablo 4-2’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-2: Tüm akciğer kanserli hastaların tümör ve normal metillenme yüzdeleri**

<i>Hasta no</i>	<i>Tümörlü Metile (%)</i>	<i>Normal Metile (%)</i>	<i>Hasta No</i>	<i>Tümörlü Metile (%)</i>	<i>Normal Metile (%)</i>
1	0	0	26	10,39	0
2	0	0	27	9,10	4,26
3	12,07	30,83	28	0	0
4	18,29	13,22	29	40,37	0
5	34,51	22,31	30	0	0
6	14,49	0	31	0	0
7	31,35	20,69	32	0	0
8	0	0	33	0	0
9	0	0	34	0	0
10	0	0	35	12,09	0
11	3,92	2,50	36	0	0
12	2,93	0,81	37	0	0
13	0	0	38	3,11	0
14	0	0	39	0	0
15	13,54	0	40	0	0
16	0	0	41	0	0
17	3,65	0	42	0	0
18	10,21	12,87	43	0	2,60
19	0	0	44	10,16	0
20	0	0	45	2,81	0
21	0	0	46	2,10	0
22	0	0	47	4,59	0
23	0	0	48	6,07	4,27
24	3,70	3,19	49	1,98	0
25	21,70	0	50	0	0

Bu hesaplamalara göre 50 hastanın 21’sinde (%42) metillenmede artış olduğu, 3’ünde (%6) metillenmede azalma olduğu, 26’sında (%52) ise değişme görülmediği tespit edilmiştir (Tablo 4-3).

**Tablo 4-3: Tüm akciğer kanserli hastaların metillenme durumuna göre dağılımı**

	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>
	<i>ARTAN</i>	<i>AZALAN</i>	<i>DEĞİŞMEYEN</i>
HASTA SAYISI	21	3	26
YÜZDE (%)	%42	%6	%52

İstatistiksel hesaplamalar sırasında SPSS 18 programıyla hastaların tümör ve normal dokularının metillenme artışları ile yaş, cinsiyet, evre, hücre tipi ve sigara kullanımı arasındaki ilişki Ki-kare bağımsızlık testi ve Fisher's exact testi kullanılarak incelenmiştir.

Metillenme artışlarıyla yaş arasındaki bağlantı incelenirken yaş sınırı 60 olarak alınmıştır. 2 hastanın yaş bilgisine ulaşılamamıştır. Buna göre 60 yaş altında olan 25 hastanın 12'sinde (%48) metillenme artmış, 2'sinde (%8) metillenme azalmış, 11 hastada (%44) ise metillenme değişimi olmadığı saptanmıştır. 60 yaş üzerinde olan 23 hastanın ise 9'unda (%39,1) metillenme artmış, 1'inde (%4,3) azalmış, 13 (%56,5) tanesinde ise değişim olmadığı saptanmıştır. Bu oranlara göre metillenme artışı ile yaş arasında bir ilişki saptanmamıştır (p=0,65). Hastaların yaşa göre metillenme durumları Tablo 4-4'te gösterilmektedir.

**Tablo 4-4: Hastaların yaşa göre metillenme artış oranları**

	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>p</i>
	<i>ARTAN</i>	<i>AZALAN</i>	<i>DEĞİŞMEYEN</i>	
≤60	12	2	11	
>60	9	1	13	0,65
TOPLAM	21	3	24	

Evresi bilinen 44 hastanın metillenme artışı incelendiğinde evre IIA ve IV'te bulunan hasta olmaması nedeniyle değerlendirmeye dahil edilmemiştir. Evre IIIB'de 1 hasta bulunması nedeniyle Evre IIIA ile beraber alınıp, Evre IA, IB, IIB'de bulunan hastalar ile kıyaslanmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucu metillenme değişimi ile hastaların evresi arasında bir ilişki saptanmamıştır (p=0,79). Hastaların evrelere göre metillenme artış oranları Tablo 4-5'te gösterilmektedir.

**Tablo 4-5: Hastaların evrelere göre metillenme artış oranları**

	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>p</i>
	<i>ARTAN</i>	<i>AZALAN</i>	<i>DEĞİŞMEYEN</i>	
IA	3	0	3	0,79
IB	7	1	9	
IIB	6	2	5	
IIIA ve IIIB	3	0	5	
TOPLAM	19	3	22	

Cinsiyeti bilinen 50 akciğer kanserli hastanın 47'si erkek (%94), 3'ü ise kadındır (%6). 47 erkek hastanın 20'sinde (%42,5) metillenmede artış olduğu, 3'ünde (%6,3) azalma olduğu, 24 hastada (%51) ise metillenmede değişim olmadığı saptanmıştır. 3 kadın hastanın 1'inde (%33,3) metillenmede artış olduğu, 2'sinde (%66,7) ise metillenmede değişim olmadığı görülmüştür. Bu oranlara göre de cinsiyet ve metillenme arasında ilişki saptanmamıştır ( $p=0,83$ ). (Tablo 4-6).

**Tablo 4-6: Hastaların cinsiyete göre metillenme artış oranları**

	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>METİLLENMESİ</i>	<i>p</i>
	<i>ARTAN</i>	<i>AZALAN</i>	<i>DEĞİŞMEYEN</i>	
KADIN	1	0	2	0,83
ERKEK	20	3	24	
TOPLAM	21	3	26	

Hücre tipi bilinen, KHDAK tanısı konmuş 48 hastanın 22'si skuamöz hücreli (epidermoid), 14'ü adeno hücreli, 6'sı büyük hücreli, 2'si karışık tip, 1'i mukoepidermoid olarak tanımlanmıştır. İstatistiksel açıdan sağlıklı hesaplama yapılabilmesi için mukoepidermoid karsinom karışık tip ile beraber değerlendirilmiştir. Hücre tipleri ve metillenme artışı arasındaki ilişki Tablo 4-7'de gösterilmiştir. Bu değerlendirmelere göre hücre tipi ve metillenme arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,16$ ).

**Tablo 4-7: KHDAK hastalarının hücre tipi ve metillenme artış oranları**

	<i>METİLLENMESİ</i> <i>ARTAN</i>	<i>METİLLENMESİ</i> <i>AZALAN</i>	<i>METİLLENMESİ</i> <i>DEĞİŞMEYEN</i>	<i>p</i>
Skvamöz	9	0	13	
Adeno ca.	8	1	5	
Büyük hüç.	2	0	4	<i>0,16</i>
Karışık tip	1	1	1	
TOPLAM	20	2	23	

Hastaların günde içtikleri sigara miktarından yola çıkılarak hesaplanan “paket-yılı” (= [günde içilen sigara miktarı / 20] x sigara içilen yıl) ile metillenme artışı arasındaki ilişki incelenmiştir. Sigara içmeyenler, 30 paket-yılı ve daha az içenler ve 30 paket-yılından çok içenler değerlendirilmiş olup, hastaların metillenme artışıyla sigara kullanımı arasında bir ilişki bulunamamıştır (p=0,43). Bu durum Tablo 4-8’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-8: Sigara kullanımı ve metillenme artış oranları**

	<i>METİLLENMESİ</i> <i>ARTAN</i>	<i>METİLLENMESİ</i> <i>AZALAN</i>	<i>METİLLENMESİ</i> <i>DEĞİŞMEYEN</i>	<i>p</i>
İçmeyen	2	-	-	
≤30	10	1	9	
>30	9	2	15	<i>0,43</i>
TOPLAM	21	3	24	

## 5. TARTIŞMA

İleri evre kanserlerin genomik analizlerinde 1p36 bölgesi boyunca delesyonlar bulunması sonucunda bu bölgede aday tümör baskılayıcı genlerin bulunabileceği öne sürülmüştür. İnsanda 1. kromozomun kısa kolundaki delesyonlar ilk olarak 1977 yılında nöroblastomlu hastalarda saptanmış olup nöral, epitel ve hematopoietik kökenli kanserlerde de bu bölgenin sıklıkla delesyona uğradığı gösterilmiştir. Ayrıca genom melezleme ve heterozigotluk kaybı çalışmaları sonucunda akciğer kanserinde kromozomal değişikliklerin 1p bölgesinde sık olduğu gösterilmiştir. Bu değişimler sonucu tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini kaybettiği ve bunun da tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Bagchi ve Mills 2008). Thompson ve ark. 2003 yılında, nöroblastomada delesyona uğramış 1p36.3 bölgesinde CHD5 geninin bulunduğunu göstermişlerdir. CHD5'in sıklıkla delesyonların meydana geldiği bu bölgede bulunması kanser ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu grup başta olmak üzere birçok araştırmacı tarafından CHD5 proteininin tümör oluşumundaki yeri araştırılmaya başlanmıştır. Thompson ve ark. bir dizi hücre hattında ve 137 primer nöroblastoma örneğinde CHD5'in ya hiç ifade edilmediğini ya da çok az ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu da CHD5'in özellikle nöral tümörlerin patogeneğinde yer alabileceğini göstermiştir.

Bagchi ve ark. hayvan deneyleri ile yaptıkları araştırmalar sonucunda CHD5 geni ifade kaybının tümör oluşumuna neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yaptıkları bu çalışma sonucunda fare CHD5 geninin p19Arf/p53 yolağı aracılığıyla çoğalma, yaşlanma ve apoptozu kontrol ettiğini saptamışlardır (Bagchi ve ark. 2007)

Daha sonraki yıllarda da CHD5'in kolon, over, serviks ve meme kanserinde rolü olabileceği bu kanserlerde de 1p36 delesyonlarının saptanması ile gündeme gelmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda da bu kanser türlerinde CHD5 ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir (Thompson ve ark. 2003, Fujita ve ark. 2008, Garcia ve ark. 2010, Wong ve ark. 2011). 1p36 bölgesinde meydana gelen delesyonlar CHD5 ifadesinin azalmasına veya kaybına neden olduğu gösterilmiş olmasına rağmen anormal CHD5 ifadesinin altında yatan düzenleyici mekanizma henüz aydınlatılmamıştır.

CHD5 geninde meydana gelen değişimleri saptamak için birçok araştırmacı tarafından mutasyon analizi çalışmaları yapılmış olup, CHD5 geninde somatik

mutasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri saptanmıştır. Ayrıca bu mutasyonların da gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Ng ve ark. 2008, Gorringe ve ark. 2008, Robbins ve ark. 2010, Lang ve ark. 2011, Wu ve ark. 2012).

Cai ve ark. CHD5 geninin ifadesi üzerindeki mikroRNA etkisini tespit etmek için bir dizi kolorektal kanserli hücre hattıyla analizler yapmış olup, miR-211 mikroRNA'sının onkogen gibi davranarak CHD5'in tümör baskılayıcı işlevini yerine getirmesini engellediği ve gen ifadesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. (Cai ve ark. 2012).

Tümör baskılayıcı genin etkinliğini kaybetmesine yol açarak karsinogeneze sebep olan değişiklerden bir tanesi de epigenetik sessizleştirme mekanizmalarından biri olan DNA metillenmesidir. Thompson ve ark.'nın 11 hücre hattını 5'-azacytidine ile muamele ettikten sonra bu hücre hatlarında CHD5 ifadesinin artması CHD5 geninin metillenme ile sessizleştiiğini göstermektedir. Daha sonraki çalışmalarda da birçok araştırmacı mide, kolorektal, larinks, glioma, meme kanserli hastalarda promotor bölge metillenmesine bağlı olarak CHD5 ifadesinin azaldığını göstermiştir. Bu araştırmaların sonucunda CHD5 geninin çeşitli kanserlerde %4-78 arasında metillenerek sessizleştiiğini gösterilmiştir (Thompson ve ark. 2003, Mulero-Navarra ve Esteller, 2008; Gorringe ve ark. 2008, Mokarram ve ark. 2009; Wang X ve ark. 2009, Wang J ve ark. 2011, Wu ve ark. 2012).

Literatürde CHD5 ile ilgili olarak akciğer kanserli hastalarla yapılan çalışmada metillenme oranı belirtilmemiş olmakla birlikte yapılan bir tek çalışmada metillenmeye bağlı olarak gen ifadesinin %86.7 oranında azaldığı gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2011). Yaptığımız çalışmada Zhao ve ark.'nın bildirdiği sonuçlar ile uyumlu olarak akciğer kanserinde CHD5 geninde örneklerimizde %42 oranında metillenme olduğunu gösterdik. Bu sonuçlar metillenme sonucu CHD5 geninin ifadesinin azalarak, akciğer kanserine neden olabileceğini destekler nitelikte olmuştur.

Hastaların tümörlü ve normal dokuları karşılaştırıldığında %42'sinde metillenme artışı olması akciğer kanser oluşumu ile CHD5 geninin metillenmesi arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu metillenmenin ifadeyi ne oranda etkilediği gen ifade analizinin yapılması ile saptanabilir. Ayrıca hasta sayısının artırılması veya aynı hasta grubunda daha farklı çalışma yöntemlerinin kullanılmasıyla daha etkili sonuçlar elde edilebilir.

## KAYNAKLAR

Adjei AA., Erlichmann C., Davis J.N., Cutler D.L., Sloan J.A., Marks R.S. ve ark. (2000). A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity. *Cancer Research*, 60, 1871-1877.

Agathangelou A., Cooper WN, Latif F. (2005). Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research*, 65(9), 3497–3508.

Alavanja MC., Brownson RC., Benichou J. (1996). Estimating the effect of dietary fat on the risk of lung cancer in non-smoking women. *Lung Cancer*, 14 (suppl 1), 63-74.

Albanell J., Lonardo F., Rusch V., Engelhardt M., Langenfeld J., Han W. ve ark. (1997). High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(21), 1609-1615.

Alberts ve ark. (2008) (5<sup>th</sup> ed) *Molecular Biology of the Cell*, p.881.

Bagchi A. ve Mills A.A. (2008). The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Research*, 68(8), 2551-2556.

Baghchi A., Papazoglu C., Wu Y., Capurso D., Brodt M., Francis D. ve ark. (2007). CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*, 128, 459-475.

Balcı K. (1993). *Göğüs Hastalıkları 3. Basım*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Belinsky S.A., Nikula K.J., Palmisano W.A., Michels R., Saccomanno G., Gabrielson E. ve ark. (1998). Aberrant methylation of p16<sup>INK4a</sup> is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11891-11896.

Betticher D.C., Heighway J., Hasleton P.S., Altermatt H.J., Ryder W.D., Cerny T., ve ark. (1996). Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 73(3), 294-300.

Blasco MA. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 6(8), 611-22.

Boone CW., Kelloff GJ., Malone WE. (1990). Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Research*, 50(1), 2-9.

Boyle J.O., Langenfeld J., Lonardo F., Sekula D., Reczek P., Rusch V., ve ark. (1999). Cyclin D1 proteolysis: a retinoid chemoprevention signal in normal, immortalized, and transformed human bronchial epithelial cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(4), 373-379.

Broers J.L., Viallet J., Jensen SM., Pass H, Travis W.D., Minna J.D. ve ark. (1993). Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 9(1), 33-43.

Brouchet L., Valmary S., Dahan M., Didier A, Galateau-Salle F., Brousset P. ve ark. (2005). Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *British Journal of Cancer*, 92(4), 743-746.

Bunn P.A. Jr., Helfrich B., Soriano A.F., Franklin W.A., Varella-Garcia M., Hirsch F.R. ve ark. (2001). Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by Trastuzumab and chemotherapeutic agents. *Clinical Cancer Research*, 7, 3239-3250.

Buring J.E. ve Hennekens C.H. (1995). Beta-carotene and cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 22, 226-230.

Cai C, Ashktorab H, Pang X, Zhao Y, Sha W, Liu Y ve ark. (2012). MicroRNA-211 expression promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo by targeting tumor suppressor CHD5. *Public Library of Science one*, 7(1), e29750

Caputi M., De Luca L., Papaccio G., D'Aponte A., Cavallotti I., Scala P., ve ark. (1997). Prognostic role of cyclin D1 in non-small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *European Journal of Histochemistry*, 41(2), 133-138.

Casey G., Lopez ME., Ramos JC., Plummer SJ., Arboleda MJ., Shaughnessy M., ve ark. (2000). DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Clinical Cancer Research*, 6(10), 4055-4063.

Castro C.Y., Ostrowski M.L., Barrios R., Green L.K., Popper H.H., Powell S. ve ark. (2001). Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Human Pathology*, 32(8), 863-872.

CHD5 genomik yerleşimi (Erişim tarihi 20.10.2012, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHD5>).

CHD5 protein yapısı (Erişim Tarihi 20.10.2012, [http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg\\_gene=uc001alz.2&hgg\\_prot=Q5TG85&hgg\\_chrom=chr1&hgg\\_start=6161846&hgg\\_end=6191808&hgg\\_type=knownGene&db=hg19&hgsid=309183507](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc001alz.2&hgg_prot=Q5TG85&hgg_chrom=chr1&hgg_start=6161846&hgg_end=6191808&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgsid=309183507)).

Chen Y.C., Chen J.H., Richard K., Chen P.Y., Christiani D.C. ve ark. (2004). Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer*, 101(6), 1428-1436.

Crosby J.R., Tappan K.A., Seifert R.A., Bowen-Pope D.F. (1999). Chimera analysis reveals that fibroblasts and endothelial cells require platelet-derived growth factor receptorbeta expression for participation in reactive connective tissue formation in adults but not during development. *The American Journal of Pathology*, 154(5), 1315-1321.

Dammann R., Li C., Yoon J.H., Chin P.L., Bates S., Pfeifer G.P. ve ark. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics*, 25, 315-319.

Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605-644.

Delmas V., Stokes DG., Perry RP. (1993). A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), 2414-2418.

De Stefani E., Deneo-Pellegrini H., Carzoglio J.C., Ronco A., Mendilaharsu M. (1996). Dietary nitrosodimethylamine and the risk of lung cancer: a case control study from Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5(9), 679-682.

De Stefani E., Fontham E.T., Chen V., Correa P., Deneo-Pellegrini H., Ronco A. ve ark. (1997). Fatty foods and the risk of lung cancer: a case control study from Uruguay. *International Journal of Cancer*, 71(5), 760-766.

Driscoll T., Nelson D.I., Steenland K., Leigh J., Concha-Barrientos M., Fingerhut M. ve ark. (2005). The global burden of disease due to occupational carcinogens. *American Journal of Industrial Medicine*, 48(6), 419-431.

Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2715-2723.

Eissenberg J.C. (2012). Structural biology of the chromodomain: form and function. *Gene*, 496(2), 69-78.

Eymin B., Gazzeri S., Brambilla C. ve Brambilla E. (2002). Mdm2 overexpression and p14<sup>ARF</sup> inactivation are two mutually exclusive events in human primary lung tumors. *Oncogene*, 21, 2750-2761.

Fan Z. ve Schraeder R. (2011). The changing pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 20, 637-653.

Ferrara N. (2005). VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 11-16.

Fong KM., Kida Y., Zimmerman P.V., Ikenaga M., Smith P.J. (1995). Loss of heterozygosity frequently affects chromosome 17q in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 55(19), 4268–4272.

Fong KM., Sekido Y., Gazdar AF., Minna JD. (2003). Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*, 58, 892-900.

Fong KM., Sekido Y., Minna JD. (1999). Molecular patho-genesis of lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 118(6), 1136–1152.

Fontham ET. (1990). Protective dietary factors and lung cancer. *International Journal of Epidemiology*, 19 (Suppl 1), 32-42.

Fujita T., Igarashi J., Okawa E.R., Gotoh T., Manne J., Kolla V. ve ark. (2008). CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 940-949.

Galateau-Salle F., Bidet P., Iwatsubo Y., Gennetay E., Renier A., Letourneux M. ve ark. (1998). Detection of SV40-like DNA sequences in pleural mesothelioma,

bronchopulmonary carcinoma and other pulmonary diseases. *Developments in Biological Standardization*, 94, 147-52.

Garcia I., Mayol G., Rodríguez E., Suñol M., Gershon T.R., Ríos J. (2010). Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma. *Molecular Cancer*, 9(277), 1-14.

Ge Q., Nilasena D.S., O'Brien C.A., Frank M.B., Targoff I.N. (1995). Molecular analysis of a major antigenic region of the 240-kD protein of Mi-2 autoantigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1730-1737.

Geradts J., Fong K.M., Zimmerman P.V. ve Minna J.D. (2000). Loss of Fhit expression in non-small cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features. *British Journal of Cancer*, 82, 1191-1197.

Girard N., Ostrovnaya I., Lau C., Park B., Ladanyi M., Finley D. ve ark. (2009). Genomic and mutatioanal profiling to assess clonal relationships between multiple non-small cell lung cancers. *Clinical Cancer Research*, 15(16), 5184-5190.

Giuliani L., Jaxmar T., Casadio C. ve ark. (2007). Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer*, 57(3), 273-281.

Godfried M.B., Veenstra M., Valent A., Sluis P., Voûte P.A., Versteeg R. ve ark. (2002). Lack of interstitial chromosome 1p deletions in clinically-detected neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 38(11), 1513-1519.

Goodman M.T., Kolonel L.N., Yoshizawa C.N. ve Hankin J.H. (1988). The effect of dietary cholesterol and fat on the risk of lung cancer in Hawaii. *American Journal of Epidemiology*, 128(6), 1241-1255.

Gorringe K.L., Choong D.Y.H., Williams L.H., Ramakrishna M., Sridhar A., Oju W. ve ark. (2008). *Neoplasia*, 10, 1253-1258.

Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. (1996). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* Sep 15;54(18):4855-78. *Oncogene*, 13(9), 1971-1981.

Hara H., Yamashita K., Shinada J., Yoshimura H., Kameya T. (2001). Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 34(2), 219-226.

Harris J.E., Thun M.J., Mondul A.M. ve Calle E.E. (2004). Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *BMJ*, 328 (7431), 72.

Hecht S.S. (1997). Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216(2), 181-191.

Heist R.S., Sequist L.V. ve Engelman J.A. (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(5), 924-933.

Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. ve Forman D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.

Jiang F., Yin Z., Caraway N.P., Li R. ve Katz R.L. (2004). Genomic profiles in stage I primary non-small cell lung cancer using comparative genomic hybridization analysis of cDNA microarrays. *Neoplasia*, 6(5), 623–635.

Johnson D.G., Schwarz J.K., Cress W.D. ve Nevins JR. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 365(6444), 349-352.

Kerr K.M. (2009). Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology*, 54(1), 12-27.

Kohno T., Kawanishi M., Inazawa J. ve Yokota J. (1998). Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Human Genetics*, 102(3), 258-264.

Khorasanizadeh S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116(2), 259-272.

Krystal G., Birrer M., Way J., Nau M., Sausville E., Thompson C. ve ark. (1988). Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small-cell lung cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 8(8), 3373–3381.

Kuramochi M., Fukuhara H., Nobukini T., Kanbe T., Maruyama T., Ghosh H.P. ve ark. (2001). TSLC1 is a tumor suppressor gene in human non-small lung cancer. *Nature Genetics*, 27, 427-430.

Lang J., Tobias E.S. ve MacKie R. (2011). Preliminary evidence for involvement of the tumour suppressor gene CHD5 in a family with cutaneous melanoma. *British Association of Dermatologists*, 164, 1010-1016.

Larsen J.E. ve Minna J.D. (2011). Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics in Chest Medicine*, 32, 703-740.

Littman A.J., Jackson L.A. ve Vaughan T.L. (2005). Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(4), 773-778.

Lee Y.C., Chang Y.L., Luh S.P., Lee J.M. ve Chen J.S. (1999). Significance of P53 and Rb protein expression in surgically treated non-small cell lung cancers. *The Annals of Thoracic Surgery*, 68(2), 343-347; discussion 348.

Marconcini L., Marchio S., Morbidelli L., Cartocci E., Albin A., Ziche M. ve ark. (1999). c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9671-9676.

Marfella C.G. ve Imbalzano A.N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation Research*, 618(1-2), 30-40.

Massion P.P., Kuo W.L., Stokoe D., Olshen A.B., Treseler P.A., Chin K. ve ark. (2002). Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Research*, 62(13), 3636-3640.

Meyer N. ve Penn L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews. Cancer*, 8(12), 976-990.

Mitsudomi T., Hamajima N., Ogawa M. ve Takahashi T. (2000). Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clinical Cancer Research*, 6(10), 4055-4063.

Mitsuyasu R.T. (2008). Non-AIDS-defining malignancies in HIV. *Topics in HIV Medicine*, 16(4), 117-121.

Modi S., Kubo A., Oie H., Coxon A.B., Rehmatulla A. ve Kaye F.J. (2000). Protein expression of the RB-related gene family and SV40 large T antigen in mesothelioma and lung cancer. *Oncogene*, 19(40), 4632-4639.

Mokarram P., Kumar K., Brim H., Naghibalhossaini F., Saberi-firoozi M., Nourai M. ve ark. (2009). Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. *Public Library of Science one*, 4(9).

Mulero-Navarro S. ve Esteller M. (2008). Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics*, 3:4, 210-215.

Murray S., Dahabreh I.J., Linardou H., Manoloukos M., Bafaloukos D. ve Kosmidis P. (2008). Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *Journal of Thoracic Oncology*, 3, 832-839.

NCBI Conserved Domains (Erişim Tarihi 20.10.2012, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP\\_056372.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=NP_056372.1)).

Nelson ve ark. 2005, *Lehninger Biochemistry*, p.1100-1101.

Ng D., Yang X.R., Tucker M.A. ve Goldstein A.M. (2008). Mutation screening of CHD5 in melanoma-prone families linked to 1p36 revealed no deleterious coding or splice site changes. *Biomed Central Research Notes*, 1, 86.

Parkin D.M., Pisani P., Lopez A.D. ve Masuyer E. (1994). At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *International Journal of Cancer*, 59 (4), 494-504.

Paro R. ve Hogness D.S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), 263-267.

Pryor W.A. (2000). Cigarette smoke damage to DNA and other biomolecules. in Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD (eds). *Lung Cancer Principles and practise*. Philadelphia, Lippincott William&Wilkins 2 nd Ed. 82.

Rami-Porta R., Bolejack V. ve Goldstraw P. (2011). The new tumor, node, and metastasis staging system. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32, 44-51.

Reinmuth N., Liu W., Jung Y.D., Ahmad S.A., Shaheen R.M., Fan F. ve ark. (2001). Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1239-1241.

Robbins C.M., Tembe W.A., Baker A., Sinari S., Moses T.Y., Beckstrom-Sternberg S. ve ark (2011). Copy number and targeted mutational analysis reveals novel somatic events in metastatic prostate tumors. *Genome Research*, 21(1), 47-55.

Rezazadeh A., Laber DA., Ghim SJ. ve ark. (2009). The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. *The American Journal of the Medical Sciences*, 338(1), 64-67.

Rodenhuis S. ve Slebos R.J. (1992). Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Research*, 52(9 Suppl), 2665-2669.

Rosell R., Moran T., Queralt C., Porta R., Cardenal F., Camps C. ve ark. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361, 958-967.

Scarpatetti M., Tsybrovskyy O. ve Popper H.H. (2002). Cytokeratin typing as an aid in the differential diagnosis of primary versus metastatic lung carcinomas, and comparison with normal lung. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 440(1), 70-76.

Schuster E.F. ve Stöger R. (2002). CHD5 defines a new subfamily of chromodomain- SWI2/SNF2-like helicases. *Mammalian Genome*, 13, 117-119.

Sekido Y., Fong K.M. ve Minna J.D. (1998). Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Chinese Journal of Biochemistry and Biophysics*, 1378, F21-59.

Sekido Y., Fong K.M. ve Minna J.D. (2003). Molecular genetics of lung cancer. *Annual Review of Medicine*, 54, 73-87.

Shapiro J.A., Jacobs E.J. ve Thun M.J. (2000). Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (4), 333-337.

Shibata T., Uryu S., Kokubu A., Hosoda F., Ohki M., Sakiyama T. ve ark. (2005). Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clinical Cancer Research*, 11(17), 6177–6185.

Shur I. ve Benayahu D. (2005). Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, 352(3), 646-655.

Siegel R., Naishadham D. ve Jemal A. (2012). Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62, 10-29.

Sion-Vardy N., Lasarov I., Delgado B., Gopas J., Benharroch D. ve Ariad S. (2009). Measles virus: evidence for association with lung cancer. *Experimental Lung Research*, 35(8), 701-712.

Stacker S.A., Caesar C., Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R. ve ark. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Medicine*, 7(2), 186-191.

Swanson C.A., Brown C.C., Sinha R., Kulldorff M., Brownson R.C. ve Alavanja M.C. (1997). Dietary fats and lung cancer risk among women: the Missouri Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control*, 8 (6), 883-893.

Syrjanen K.J. (2002). HPV infections and lung cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55 (12), 885-891.

Takeda O., Homma C., Maseki N., Sakurai M., Kanda N., Schwab M. ve ark. (1994). There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 10(1), 30-39

Tammemagi M.C., McLaughlin J.R. ve Bull S.B. (1999). Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8(7), 625-634.

Tanaka T., Matsuoka M., Sutani A., Gemma A., Maemondo M., Inoue A. ve ark. (2010). Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *International Journal of Cancer*, 126, 651-656.

Thompson P.M., Gotoh T., Kok M., White P.S. ve Brodeur G.M. (2003). CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene*, 22, 1002-1011.

Thun M.J., Lally C.A., Flannery J.T., Calle E.E, Flanders W.D, Heath C.W. Jr. (1997). Health, cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 1580.

Tomashefski J.F. Jr., Connors A.F. Jr., Rosenthal E.S. ve Hsiue I.L. (1990). Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 114(5), 468-474.

Toyooka S., Toyooka K.O., Maruyama R., Virmani A.K., Girard L., Miyajima K. ve ark. (2001). DNA methylation profiles of lung tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 61-67.

Travis M.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K. ve Harris C.C. (2004). World Health Organisation Classification of Tumours. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: *IARC press*.

Travis W.D., Rush W., Flieder D.B., Falk R., Fleming M.V., Gal A.A. ve Koss M.N. (1998). Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *The American Journal of Surgical Pathology*, 22(8), 934-944.

Tsai C-M., Chang K-T., Wu L-H., Chen J.Y., Gazdar A.F., Mitsudomi T. ve ark. (1996). Correlations between intrinsic chemoresistance and HER2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 56, 206-209.

Wang J., Chen H., Fu S., Xu Z.M., Sun K.L. ve Fu W.N. (2011). The involvement of CHD5 hypermethylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 47, 601-608.

Wang X., Lau K.K.K., So K.Y.L. ve Lam Y.W. (2009). CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Journal of Biomedical Science*, 16, 95.

Werner H., Le Roith D. (1997). The insulin-like growth factor-I receptor signaling pathways are important for tumorigenesis and inhibition of apoptosis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 8(1), 71-92.

Willett W.C. ve Trichopoulos D. (1996). Nutrition and cancer: a summary of the evidence. *Cancer Causes Control*, 7(1), 178-180.

Wong R.Y., Chan K.Y.L., Tsang T.P.T., Lee C.W., Cheung T.H., Yim S.F. ve ark. (2011). CHD5 downregulation associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 72, 203-207.

Woodage T., Basrai M.A., Baxevanis A.D., Hieter P. ve Collins F.S. (1997). Characterization of the CHD family of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11472-11477.

Woodson K., Tangrea J.A., Barrett B.J., Virtamo J., Taylor P.R., Albanes D. (1999). Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(20), 1738-1743.

Wu X., Zhu Z., Li W., Fu X., Su D., Fu L., ve ark. (2012). Chromodomain Helicase DNA binding protein 5 plays a tumor suppressor role in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14(3):R73.

Xinarianos G., Scott F.M., Liloglou T., Prime W., Turnbull L., Walshaw M. ve Field J.K. (2000). Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer*, 28(1), 37-42.

Yoshida T., Zhang G. ve Haura E.B. (2010). Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 80, 613-623.

Yousem S.A. ve Beasley M.B. (2007). Bronchioalveolar carcinoma: a review of current concepts and evolving issues. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 131(7), 1027-1032.

Zhao R., Yan Q., Lv J., Huang H., Zheng W., Zhang B. ve Ma W. (2011). CHD5, a tumor suppressor that is epigenetically silenced in lung cancer. *Lung Cancer*, 3978, 1-8.

Zhang Y., LeRoy G., Seelig H.P., Lane W.S. ve Reinberg D. (1998). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 95(2), 279-89.

Zhu H., Lam D.C.L., Han K.C., Tin V.P., Suen W.S., Wang E. ve ark. (2007). High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumor genes in lung cancer cell lines. *Cancer Letter*, 255(1-2), 303-314.

Zöchbauer-Müller S., Fong K.M., Maitra A., Lam S., Geradts J., Ashfaq R. ve ark. (2001). 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Research*, 61, 3581-3585.

## ETİK KURUL KARARI



Sayı : 16413  
Konu :

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI



İstanbul ...../ ..... / .....

Temel Tıp Bilimleri Bölümü  
Başkanlığına

09 Mayıs 2011

İLGİ: 13.04.2011 tarihli, 566 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Nur BUYRU'nun** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Merve TANSARIKAYA'nın** yürüttüğü "Akciğer Kanseri Hastalarda CHD5 Geninin Metillenme Analizinin Araştırılması" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** ilgi yazınız ve ekleri **03 Mayıs 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

Eki:  
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ  
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar  
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımın gün sayısının belirtilmesi rica olunur. Tel(0212)4143000

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	MERVE	<b>Soyadı</b>	TANSARIKAYA
<b>Doğ.Yeri</b>	ÜSKÜDAR	<b>Doğ.Tar.</b>	04.11.1987
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	22078800580
<b>Email</b>	merve.tansarikaya@gmail.com	<b>Tel</b>	05357760128

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Hacettepe Üniversitesi	2009
<b>Lise</b>	Fatin Rüştü Zorlu Lisesi (YDA)	2005

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	İyi	İyi	67	
<b>Almanca</b>	Orta	Zayıf	Orta		

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

**Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
MS Office	Iyi

**Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

İstanbul Teknik Üniversitesi 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi (28-31 Ağustos 2008)

İstanbul Teknik Üniversitesi 3. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi (17-20 Ağustos 2009)

12. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (27-30 Ekim 2011, Antalya) Poster Sunumu: "EGFR ve K-Ras Mutasyonlarının Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli Hastalarda Sigara Kullanımı ile İlişkisi"

Boğaziçi Üniversitesi 3. Evrim, Bilim ve Eğitim Sempozyumu (17-18 Aralık 2011)

Light Cycler 480 Eğitim Katılım Sertifikası (18 Eylül 2012)

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Kalıtsal kanserler, biyoluminesans, kitap okumak, müzik dinlemek