

**T.C.
KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**



LİSANSÜSTÜ EŞİTİM ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TLR9 VE IRAK4 GENLERİNDEKİ SEKANS
VARYANTLARIN AKCİĞER KANSERİ RİSKİ İLE
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

TUĞÇE GÜL GÜNEY

KÜTAHYA-2023

**“TLR9 VE IRAK4 GENLERİNDEKİ SEKANS VARYANTLARIN
AKCİĞER KANSERİ RİSKİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ”**

TUĞÇE GÜL GÜNEY

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim

Yönetmeliği Uyarınca

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Cansu ÖZBAYER

“Bu çalışma, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-101 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.”

EYLÜL – 2023

ÖN SÖZ

Tez konusu seçiminde çalışmak istediğim konuyu, göz önünde bulunduran tez danışmanım ile birlikte fikir alışverişi yaparak karar verdik. Ana hattını belirledikten sonra gerekli olan bütçe için proje önerisinde bulunduk. Destek aldıktan sonra hızlıca çalışmalara koyulduk. Kontrol grubu ve hasta grubu için örneklerin toplanması ile geçen sürede bolca literatür araştırmasında bulundum. Özellikle literatürün güncel olmasını ve tezime ilgili daha öncesinde yapılan benzer araştırmaların olup olmadığına bakarak ilerledim. Olgu-vaka çalışması olan tezimde, deney aşamasında tüm yapılan işlemleri not alarak ilerlemenin ne kadar önemli olduğunu yazdıklarımı toparlamaya ve kontrol etmeye başladığımda daha da iyi anladım. Yaptığım her şeyi kaydetmenin internet ortamında ne kadar değerli olduğunu bilgisayarım bozulduğunda geç olsada anladım ve tekrar baştan yazmak zorunda kaldım. Bunun en zor aşama olduğunu sanmıştım oysa yanlışmışım. Tezi bitirmeye yakın olan aşama en zorlu olanmış. Emek ve özveri ile hazırladığım yüksek lisans tezimde yardımlarını esirgememiş ve teşvik etmiş tüm hocalarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZET

TLR9 VE IRAK4 GENLERİNDEKİ SEKANS VARYANTLARIN AKCİĞER KANSERİRİSKİ İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

Giriş: Akciğer kanseri en sık gözlenen kanser türü olup, erken teşhisi için biyobelirteçlerin varlığı kritik önem taşır.

Amaç: Çalışmamızda akciğer kanserinde biyobelirteç rolünde olabilecek TLR9 ile IRAK4 gen varyantlarının ve serum protein seviyelerinin akciğer kanseri ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Çalışmamızda toplam 90 gönüllüden (akciğer kanseri, NSCLC, n=45, kontrol birey, n=45) izole edilen genomik DNA'lar TLR9, IRAK4 gen promotörlerindeki genetik varyasyonlar için SANGER sekanslama yöntemi ile dizilenmiştir. TLR9 ve IRAK4 serum seviyeleri ELİSA yöntemi ile ticari kitler kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirilerek, 0.05'den küçük olan p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda TLR9 bölgesi için anlamlı belirlenen varyasyonlar arasında; akciğer kanserli hastalarda 1618. pozisyonda C/A değişimi, 1615. pozisyonda T aleli yerine insersiyon, 1620. pozisyon, 2506. pozisyon ve 2504. pozisyondaki delesyon belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise 9254. pozisyonda T aleli yerine delesyon ve 9261. pozisyonda G aleli yerine delesyon belirlenmiştir. IRAK4 bölgesi için, 32877.pozisyon ve 32937.pozisyondaki G/T değişimi, 32899. pozisyondaki T/A değişimi, 32845. pozisyonda T/C değişimi, 32781. pozisyonda T/G değişimi ve 32792. pozisyondaki C/T değişimi, rs1253567278 ve rs1265504993 sadece akciğer kanserli bireylerde belirlenmiştir. Kontrol bireylerde ise 32680. pozisyon, 32687.pozisyon ve 32692. pozisyondaki A yerine delesyon oluşumu, 33071. pozisyon ve 33073. pozisyondaki T/A değişimi ve 33075. pozisyonda insersiyon belirlenmiştir. Sadece IRAK4 serum seviyeleri kontrol bireylerde akciğer kanserli hastalara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamız TLR9 ve IRAK4 varyantlarının akciğer kanseri ile ilişkisini araştıran ve anlamlı belirlenen gen varyantlarının akciğer kanseri riski ile ilişkilendiren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, IRAK4, Sanger Sekans, TLR9



ABSTRACT

DETERMINING THE ASSOCIATION OF SEQUENCE VARIANTS IN TLR9 AND IRAK4 GENES WITH LUNG CANCER RISK

Introduction: Lung cancer is the most common type of cancer, and the presence of biomarkers is critical for early diagnosis.

Aim: Our study aimed to investigate the relationship between TLR9 and IRAK4 gene variants, which may play a role as biomarkers in lung cancer, and serum protein levels with lung cancer.

Materials (Patients) and Methods: In our study, genomic DNAs isolated from a total of 90 volunteers (lung cancer, NSCLC, n = 45, control individual, n = 45) were sequenced by the SANGER sequencing method for genetic variations in TLR9, IRAK4 gene promoters. TLR9 and IRAK4 serum levels were determined by ELISA method using commercial kits. The results were evaluated with appropriate statistical methods and a p value of less than 0.05 was considered significant.

Results: Among the variations identified as significant for the TLR9 region in our study; In patients with lung cancer, C/A change at position 1618, insertion instead of T allele at position 1615, deletion at position 1620, position 2506 and position 2504 were identified. In the control group, a deletion was detected instead of the T allele at position 9254 and a deletion instead of the G allele was detected at position 9261. For the IRAK4 region, G/T change at position 32877 and position 32937, T/A change at position 32899, T/C change at position 32845, T/G change at position 32781 and C/T change at position 32792, rs1253567278 and rs1265504993 was identified only in individuals with lung cancer. In control individuals, deletion formation at the A position at position 32680, position 32687 and position 32692, T/A change at position 33071 and 33073, and insertion at position 33075 were determined. Only IRAK4 serum levels were found to be significantly higher in control individuals than in lung cancer patients.

Conclusion: Our study is the first to investigate the relationship of TLR9 and IRAK4 variants with lung cancer and to associate significant gene variants with lung cancer risk.

Keywords: Lung Cancer, IRAK4, Sanger Sequence, TLR9



TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim boyunca bilgilerimi, deneyimini ve ileride değerli bilim insanlarıyla tanışmama vesile olan Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca etkili ders anlatımları, araştırmaya teşvik etmesi soru sormanınve anlamının değerini öğreten Sayın Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya

Yüksek lisans eğitimim sürecinde ders anlatımındaki özveri ve günlük hayattan betimlemelerle vurgu yaparken beni yüreklendiren ve hayata hazırlayan engin deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ'ye

Yüksek lisans eğitimimde danışmanlığımı üstlenen beni eğiten, yön gösteren, gece gündüz demeden yanımda duran, emeklerini esirgemeyen ve beni hep motive ederek ileriye teşvik eden, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum ve hayatımın geri kalanında da hep yer edecek olan güler yüzlü gönlü naif sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Cansu ÖZBAYER'e

Yüksek lisans eğitimimde tanıştığım bilgisini paylaşmaktan keyif alan, mesleğinin getirdiği sorumlulukları içten bir şekilde üstlenmesiyle her zaman takdir ettiğim, kötü günde bir telefonla danıştığım ve iyi günde sevinçlerimi paylaşmak istediğim sayın Doç. Dr. Fatih KAR'a ve saygıdeğer eşi Öğr. Üyesi Ezgi KAR'a

Gerçekleştirmiş olduğum tez çalışmasında deneylerimde yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Şebnem Emine PARSPUR'a, göğüs hastalıkları cerrahisi servisi ekibine, çalışmaya katılan tüm hasta ve yakınlarına,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim hayatını beraber paylaştığım değerli arkadaşım, bu serüvenimde yanımda olan, tüm duygularımı paylaşan ve bir nevi benle yaşayan, daima mutlu olmasını gönlümden geçirdiğim, sevdiğim ve saydığım tezdaşım, Sayın Aleyna ÇALIŞKAN'a

Son olarak kararlarımın arkasında duran ve beni cesaretlendiren en büyük varlığım ve desteğim biricik ailem iyi ki varsınız.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 KANSER.....	3
2.2 AKCİĞER KANSERİ.....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri.....	4
2.3 KANSERDE İNFLAMASYON VE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ.....	6
2.4 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ	8
2.4.1 Patojen Kalıplarını Tanıyan Reseptörler	8
2.5 TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER	9
2.5.1 TLR Lokalizasyonu.....	10
2.5.2 TLR Ligandları	10
2.5.3 TLR Yapısı.....	12
2.6 TLR9	13
2.6.1 TLR9 Sinyal Yolağı	14
2.7 IRAK	16
2.7.1 IRAK4	16

2.8 GEN POLİMORFİZMLERİNİN KANSER İLE İLİŞKİSİ.....	19
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1 GEREÇ.....	20
3.1.1. Evren ve Örneklem	20
3.1.2 Kullanılan malzemeler	21
3.1.3 Kullanılan cihazlar	22
3.2 YÖNTEM	23
3.2.1 DNA İzolasyonu	23
3.2.2 Amplifikasyon ve Genotipleme	24
3.2.2 Elisa Yöntemi İle Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	33
3.2.4 İstatiksel Analiz	35
4. BULGULAR	35
4.1 TLR9 GEN VARYANLARI.....	36
4.2 IRAK4 GEN VARYANLARI	37
4.3 TLR9 VE IRAK4 SERUM PROTEİN SEVİYELERİ	41
5.TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7. KAYNAKLAR	50
8.EKLER	56
8.1 ETİK KURUL İZİN BELGESİ.....	56
8.2 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	57
ÖZGEÇMİŞ	59
ADRES İLETİŞİM.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 İnsanlarda ve farelerde eksprese olan TLR'ler.....	10
Şekil 2.2 TLR9 Sinyal Yolağı.....	16
Şekil 3.1 TLR9 promotör gen sekansı bölümü.....	25
Şekil 3.2 IRAK4 ve TLR9 PCR şartları.....	27
Şekil 3.3 Kontrol grubu IRAK4 sekans dizileri hizalanmadan öncesi.....	29
Şekil 3.4 Kontrol grubu IRAK4 sekans dizileri hizalama sonrası.....	29
Şekil 3.5 NCBI veri tabanında BLAST yöntemleri.....	30
Şekil 3.6 BLASTn veri yükleme işlemi.....	31
Şekil 3.7 Hizalama için eşleşme yapılan genlerden IRAK4 geni seçilimi.....	32
Şekil 3.8 Kontrol grubu IRAK4 BLASTn sonuçları.....	33
Şekil 3.9 IRAK4 elisa kitindeki belirgin renk değişimi.....	34

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 TLR ligandları ve ligand kökenleri	12
Tablo 2.2 İnsan kanser hücrelerinde TLR ifadesi	18
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan PCR primer dizileri	26
Tablo 4.1 TLR9 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi	36
Tablo 4.2 IRAK4 varyantlarının kontrol ve hastadaki yüzdesi ve istatistiksel analizi.....	38
Tablo 4.3 TLR9 ve IRAK4 serum protein seviyeleri.....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ALR	: Melanom-2’de Bulunmayan AIM2 Benzeri Reseptörler
APC	: Antijen Sunan Hücreler
ATM	: Ataksi-Telanjiektazi Mutant
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Araştırma Aracı
CLR	: C-tipi lektin reseptörleri ve
CpG	: Sitidin Fosfat Guanozin
DAMP	: Hasarla İlişkili Moleküler Yapılar
DD	: Ölüm Alanı
ddNTP	: dideoksiribonükleozit trifosfat
del	: Delesyon
dNTP	: deoksiribonükleotid
dsRNA	: Çift Sarmallı RNA
ECM	: Hücre Dışı Matris
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	: Endoplazmik Retikulum
ELISA	: Enzime Bağlı
GWAS	: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HMGB1	: Yüksek Mobiliteli Grup Kutu Protein 1

IRAK	: Interlökin 1 Reseptör (IL-1R) İlişkili Kinaz
IRF	: Interferon Düzenleyici Faktörler
KD	: Katalitik Kinaz Alanı
K-ras	: Kirsten Sıçan Sarkomu Virüsü
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösin Açısından Zengin Tekrar Motifleri
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Kinazlar
MyD88	: Miyeloid Farklılaşma Faktörü-88
NF-κB	: Nükleer Faktör κB
NOD	: Nükleotid oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
ODN	: Oligodinükleotitlerdir (ODN)
PAMP	: Patojenle İlişkili Moleküler Yapılar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	: Patojen kalıplarını tanıyan reseptör
RLR	: Retinoik Asitle İndüklenebilir gen-I (RIG-I) benzeri reseptörler
SCLC	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
SsRNA	: Tek Zincirli RNA
TERT	: Telomeraz Ters Transkriptazı
TIR	: Toll/IL-1 reseptör
TLR	: Toll Like reseptör

UNC93B1 : UNC-93 homolog B1

μL : Mikrolitre

ng : Nanogram

ml : Mililitre



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında en sık görülen malignite akciğer kanseridir. Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere iki ana tipte sınıflandırılır. NSCLC, bildirilen akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini kapsar (Lai et al., 2019).

Tümör kaynaklı antijenleri tespit eden ve bağışıklık yanıtını başlatan TLR'ler immün sistemin temel molekülleri olarak görev yapmaktadır (Ito et al., 2002). Günümüzde spesifik ligandlara sahip 13 memeli TLR'si (TLR1–13) tanımlanmıştır. İnsanlarda 10 tanesi (TLR1 – TLR10) bulunur ve hücrel lokalizasyonlarına göre iki alt grupta sınıflandırılır. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 genellikle hücre yüzeyinde ifade edilir. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 ve TLR10'dan oluşan bir grup TLR, endoplazmik retikulum, endozomlar, lizozomlar ve endolizozomlar gibi hücre içi bölmelerde ifade edilirken, hücre yüzeyinde ifade edilen TLR'ler ise esas olarak glikolipitler, lipopeptitler ve bakteriler, parazitler ve mantarlar gibi çeşitli organizmaların mikrobiyal membran bileşenlerini algılar. Hücre içi TLR'ler ise nükleik asit bazlı patojenle ilişkili moleküler yapıları (pathogen associated molecular patterns, PAMP) tanır ve özellikle viral tanımda görev alırlar (Kawai & Akira, 2006; Takeda & Akira, 2001).

TLR9, viral ve bakteriyel DNA'yı tanıyan hücre içi bir TLR'dir (Barton et al., 2006). TLR9 memeli kökenli olanlar da dahil olmak üzere metillenmemiş CpG motiflerini içeren DNA dizilerini de tanır (Tian et al., 2007). CpG DNA, TLR9'a doğrudan bağlanır ve endoplazmik retikulumdan erken endozomlara ve daha sonraki lizozomal bölme TLR9 translokasyonunu indükler. TLR9 ile ilişkili hücre içi adaptör protein miyeloid farklılaşma faktörü-88 (MyD88), interleukin-1 reseptörü (IL-1R) ile ilişkili kinaz (IRAK) ailesi, mitojenle aktive olan kinazlar (MAPK) veya interferon düzenleyici faktörler (IRF'ler) gibi sinyal yolağında aşağıda yer alan proteinleri aktive eder (Lai et al., 2019). Böylece TLR9, MyD88 bağımlı yolak üzerinden DNA hasarına cevap, hücre çoğalması ve tümörigenez üzerinde yol oynar (Li et al., 2019).

Önceki çalışmalar, TLR9'un meme, yumurtalık, prostat, beyin, mide, renal hücreli karsinom ve özofagus tümörleri dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde yaygın olarak eksprese olduğunu göstermiştir (Krieg, 2008). TLR'lerin kanser gelişiminde farklı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Pinto et al., 2011; Wolska et al., 2009). TLR'ler kanserli hücelere karşı bağışıklık sistemini uyarabilir veya kronik inflamatuvar yanıtları artırarak karsinogenezi tetikleyebilirler (Pinto et al., 2011). B hücreleri yüksek seviyelerde TLR7 ve TLR9 ifade eder. Akciğer karsinomunun bir fare modelinde, B hücreleri üzerinde TLR9'un aktivasyonu ile TLR9 ligandı olan CpG, B hücrelerini bir B1 fenotipine doğru yönlendirir ve tümör gerilemesine neden olur (Pinto et al., 2011). TLR2, TLR4 ve TLR9 aktivasyonu sonucu üretilen anti-inflamatuvar veya pro-inflamatuvar sitokinlere bağlı olarak, hem hücre dışı matris proteinlerinin hem de immün baskılayıcı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımını indükleyerek akciğer tümörü ilerlemesini kolaylaştırabilir (Sawant et al., 2013). Akciğer karsinomunda, normal akciğer ile karşılaştırıldığında TLR2, TLR4, TLR7/8 ve TLR9'un aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Pinto et al., 2011).

IRAK ailesinin bir üyesi olan IRAK4, TLR9 için bir hücre içi aracıdır. Bazal durumda, IRAK4 ve nükleer faktör κ B (NF- κ B), henüz belirlenmemiş mekanizmalar aracılığıyla, muhtemelen TLR9 ile yukarı yönde Toll/IL-1 reseptör (TIR) ailesi üyeleri aracılığıyla etkinleştirilir. Kemoterapiye maruz kaldıktan sonra, hasarlı DNA, ataksi-telanjiektazi mutant (ATM) geni aracılığıyla NF- κ B'yi aktive edebilir ve önceden var olan TLR9'u devreye sokabilir, bu da NF- κ B ve IRAK4'ü aktive ederek, TLR9'un aktive olmasına ve daha fazla eksprese olmasına neden olur (Li et al., 2019). Özetle, TLR9 ve IRAK4, ilişkili kaskadın başlatılmasıyla immün düzenlenme, inflamasyon, hücre çoğalması ve hücre sağ kalımı ile yakından ilişkilidir.

Bu çalışmada, tüm dünyada insidansı en yüksek ve kansere bağlı ölümlerin birinci sırasında yer alan akciğer kanserinin üzerinde rol oynayan genlerin rolünü belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla çalışmamıza TLR'lerden özellikle akciğer kanseri dokularındaki tümör hücrelerinde güçlü ifade edilen TLR9 genini ve TLR9 sinyalizasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan IL-1R ilişkili kinaz ailesine ait olan IRAK4 genini seçtik.

Bu doğrultuda çalışmamızda;

- TLR9 ve IRAK4 polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi ve akciğer kanseri arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
- Bu iki genin serum proteinlerinin belirlenmesi ve akciğer kanseri arasındaki ilişkisinin belirlenmesi,
- Gen polimorfizmleri ile serum protein seviyeleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi ve akciğer kanser riski ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 KANSER

Tıp literatürüne Yunanca'dan *onkos* kelimesi olarak geçen kanser, vücudun taşımak zorunda olduğu bir yük olarak ifade edilmiştir. Kanser tek bir hastalık değil, birçok hastalıktır. Bu hastalıkların hepsinin kanser olarak adlandırılmasının sebebi ise, ortak bir özelliktir: anormal hücre çoğalması (Mukherjee, 2010). Hücrenin anormal çoğalması ve apoptoz fonksiyonlarını kaybederek hücre ölümünün düzensiz dengesine yol açan kanser, tedavi edilemezse dokuları istila ederek ve uzak dokulara metastaz yaparak konağın ölümüne sebep olur (Ruddon, 2007; Saydam et al., 2011).

2.2 AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere 2 ana formda sınıflandırılmıştır (Duma et al., 2019). NSCLC, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturan türler arasında daha yaygın olanıdır (Langevin et al., 2015). Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli akciğer karsinom NSCLC'nin en sık görülen histolojik alt tipleridir ve bu hastalıkta tedavinin önemli bir belirleyici işareti olarak önem kazanmıştır (Villalobos & Wistuba, 2017). Adenokarsinom, NSCLC'nin en yaygın türüdür ve akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur. Skuamöz hücreli karsinomlar, akciğer kanserlerinin %25 ila %30'unu temsil eder; büyük hücreli kanserler, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturur (Duma et al., 2019).

NSCLC 'de tümörün kapsamını belirlemek için kanser tedavi seçeneklerine rehberlik edebilmek amacıyla TNM (Tumor-lymph nodes-metastasis,tümör-nodlar-metastaz) evreleme sistemi kullanılarak sınıflandırma yapılır (Collins et al., 2007; Duma et al., 2019).

TNM sisteminde T primer tümörün yani ana tümörün boyutu ve kapsamıyla ilgili özelliklerine, N tümöre yakın lenf düğümlerinin sayısına ve M kanserin vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığına dayanır. T, N ve M özellikleri daha sonra, bireyleri karşılaştırılabilir prognozlara sahip aşamalara göre sınıflandırmak amacıyla tümörün genel bir aşamasını (I-IV) sağlamak için kullanılır (Tsim et al., 2010).

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri erkeklerde prostat kanserinin ve kadınlarda meme kanserinin ardından ikinci sırada en sık tanısı konulan karsinomdur. Dünya çapında hem erkek hem de kadınlarda akciğer kanseri insidansı sigara içme alışkanlıklarıyla bağlantılı olarak artıp azalmaktadır (de Groot et al., 2018). Akciğer kanseri metastazı son derece malign bir belirtidir ve kötü prognoza sahiptir (Gu et al., 2018). Kanser ölümlerinden akciğer, meme, kolorektum ve prostat tüm kanser ölümlerinin %45'ini oluşturur ve dörtte biri akciğer kanserine bağlıdır (Siegel et al., 2018). Beş yıllık sağkalım oranı %5 olan akciğer kanseri en düşük sağ kalım oranlarından birine sahiptir (de Groot et al., 2018).

2.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Yaş ve cinsiyet

Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık 53'ü 55 ila 74 yaşları arasındaki bireylerde ve %37'si 75 yaşın üzerinde görülür. 40 yaşından genç hastalarda bu oran daha düşüktür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, akciğer kanserinin tanısının medyan yaşı her iki cinsiyet için 71 olup, teşhislerin ve ölümlerin yaklaşık %90'ı 55 yaşından büyük hastalarda meydana gelmektedir (de Groot et al., 2018; Duma et al., 2019).

Tarihsel olarak erkekler kadınlardan daha önce tütün kullanım alışkanlığına sahip olduğundan kadınlarda akciğer kanseri insidansında daha geç zirveye ulaşıldığı gözlenmiştir. Histolojik tiplerin görülme sıklığı cinsiyetler arasında farklılık gösterir. Örneğin kadınlarda NSCLC'de adenokarsinom insidansı erkeklere göre daha yüksektir. Sigara alışkanlığına sahip kadınlarda

daha sık görülen bazı genetik mutasyonlar, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonları, *CYP1A1* geninin aşırı ekspresyonu, glutatyon S-transferaz M1 enziminin mutasyonu, *p53* tümör baskılayıcı geninin mutasyonları ve X'e bağlı gastrin salgılayan peptid reseptörünün aşırı ekspresyonu dahil olmak üzere akciğer kanseri gelişimine yatkınlık sağlayabilir (de Groot et al., 2018).

Sigara

Sigara kullanımını, akciğer kanserinin gelişiminde en büyük risk faktörüdür ve akciğer kanserlerinin %90'ına kadarı sigara nedenlidir. Tütünün bağımlılık yapan bileşeni, asetilkolin agonisti olarak işlev gören ve sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanan ve dopamin, serotonin, norepinefrin, endorfinler ve gama-aminobutirik asit (GABA) dahil olmak üzere nörotransmitterlerin kan dolaşımına salınmasına neden olan doğal bir alkaloid olan nikotindir. Nikotinin kendisi kanserojen olmasa da, nikotinik reseptörleri yukarı regüle eder ve tütün bağımlılığını teşvik eden ve mevcut akciğer tümörlerinin ilerlemesi ile ilişkili olan gen ekspresyonunda değişikliklere neden olur (de Groot et al., 2018). Sigara içmek tüm histolojiler (özellikle küçük hücreli ve skuamöz hücreli karsinom) için ana risk faktörü olmaya devam etse de, akciğer kanseri olan tüm hastaların sigara içme öyküsü yoktur (Langevin et al., 2015). ABD'deki akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %10-15'ini hiç sigara içmeyen hastalar oluşturur. Sigara içenlerin sigara içmeyen eşlerinin akciğer kanseri gelişme riski %20-30yüksek olduğu belirtilmiştir. Pasif içici olarak dumana maruz kalma, çevresel partikül madde, mesleki maruziyetler, iç mekan hava kirliliği ve radon dahil olmak üzere çevresel risk faktörlerinin bu grubu etkilediği bildirilmiştir (de Groot et al., 2018).

Radon

Toprak ve kayadaki uranyumun bozunumuyla üretilen doğal olarak oluşan radon radyoaktif bir gazdır. 1950'li yıllarda yapılan araştırmalarda, madencilerde görülen akciğerleri yiyip bitiren hastalığın akciğer kanseri olduğu ve bunun sebebinin maruz kalınan radon olduğu tespit edilmiştir. Bazı evlerdeki radon seviyelerinin madenlerdeki radon seviyelerine yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu konutlardaki radon ve akciğer kanserine ilişkin epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına yol açmıştır (Vogeltanz-Holm & Schwartz, 2018)

Radon gazları temeldeki çatlaklardan ve diğer açıklıklardan evlere girerek özellikle bodrum katlarında birikmektedir (Turner et al., 2011). Suda çözünebildiği için kuyu suyu konutsal radon kaynağı olabilir ancak genel nüfusun radona maruz kalmasının kaynağı toprak gazlarıdır (Jobbágy et al., 2017).

Bugüne kadar yapılan mevcut çalışmaların, radonun akciğer kanserinin %10 ila %15'inden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Bu durum radonu sigara tüketiminden sonra akciğer kanserinin ikinci önde gelen risk faktörü haline getirir. Radon ile eş zamanlı sigara tüketimi akciğer kanseri riskini artırır (de Groot et al., 2018; Turner et al., 2011).

Asbest

Doğal olarak oluşan bir silikat minerali olan asbestin inşaat sektöründe kullanımı 19.yy'dan beri devam etmektedir (de Groot et al., 2018). Asbeste maruz kalan hastalarda akciğer kanseri riskinin sağlıklı bireylere göre on kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Gu et al., 2018).

Genetik faktörler

Bazı çalışmalar, akciğer kanseri için pozitif bir aile öyküsünü akciğer kanseri riskiyle ilişkilendirmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), 5p15 ve 15q25-26 kromozom bölgelerini akciğer kanseri riskinde artış ile ilişkilendirmiştir. 5p15, hücre ölümü için önemli bir mekanizmada rol oynayan telomeraz ters transkriptazı (TERT) kodlar ve neredeyse tüm akciğer kanserlerinde ekspres edilir. 15q25-26 kromozom lokusundaki mutasyonlar hem nikotin bağımlılığı hem de akciğer kanseri duyarlılığı ile pozitif olarak bağlantılıdır. Akciğer kanserinin patogeneze katkıda bulunan onkogenlere; mutasyona uğramış Kirsten sıçan sarkomu virüsü (*K-ras*) geni (NSCLC'nin%15-20'si, ağırlıklı olarak adenokarsinomlar) ve aşırı ekspres olan EGFR örnek verilebilir. Tümör baskılayıcı genler arasında p53 (SCLC'nin ~%90'ı; %50 NSCLC), Rb (~%90 SCLC; ~%20 NSCLC) ve p16 (%>50 NSCLC; %<1 SCLC) bulunur (de Groot et al., 2018; Minna et al., 2002).

2.3 KANSERDE İNFLAMASYON VE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

İnflamasyon, dokunun fiziksel travma veya patojen nedeniyle hasar gördüğünde verdiği tepkidir. Doku hasarı meydana geldiğinde; çok sayıda inflamatuvar hücre ve kompleks, istilacı patojene saldırmak, hücre dışı matrisi (ECM) yeniden oluşturmak ve sağlıklı hücrelerin

çoğalmasını ve hedef bölgeye aktarılmasına yardımcı olmak için işbirliği yapar. Normal şartlarda inflamasyon, kendi kendini sınırlayan bir süreçtir ve yaralı doku iyileştiğinde azalır. Eğer inflamasyon normal seyrinde azalmazsa, vücudun iyileşmek için kullandığı mekanizmalar, kanser gibi istenmeyen sonuçlara yol açabilir (Keibel et al., 2009). Bir bakıma tümör iyileşmeyen yaralar gibi davranır (Coussens & Werb, 2002).

Tümörlerin inflamatuvar hücrelerin üzerinde üç etkisi vardır. Birincisi, kanser hücreleri nötrofilleri ve makrofajları toplayan sitokinleri ekspres edebilir. Bu toplanan hücreler daha sonra ek inflamatuvar moleküller salgılayarak yanıtı güçlendirir. İkincisi, büyüyen tümör normal dokuya fiziksel olarak zarar verebilir ve böylece onarımı sağlayan moleküllerin salgılanmasına yol açabilir. Üçüncüsü, büyüyen tümörler kan ve lenfatik damarları sıkıştırarak oksijen ve besin tedarikini kesebilir. Ortaya çıkan hipoksi, yeni kan damarlarını ve makrofajları toplayan sitokinlerin ve anjiyojenik büyüme faktörlerinin üretimine yol açar (Munn, 2017).

İnflamatuvar hücreler de ürettikleri kemokinler ve sitokinler, neoplastik hücreler, fibroblastlar ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere tümör mikro ortamındaki tüm hücre tiplerinin büyümesini, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyerek tümör gelişimi üzerindeki etkilerini gösterebilir (Coussens & Werb, 2002). Kronik inflamasyon kanser gelişimini teşvik edebilir. Özetle tümör kaynaklı inflamasyon bir 'kartopu' etkisi yaratarak tümörün ilerlemesini sürdürebilir (Munn, 2017).

Kronik inflamasyon malign hastalık riskinin artmasıyla ilişkilidir (Crusz & Balkwill, 2015). Dünya çapında kanser vakalarının yaklaşık %18'i kronik inflamasyon ve enfeksiyonlardan kaynaklanmaktadır (Martín-Medina et al., 2022).

İnflamasyon ve kanser arasındaki bağlantı, 1863'te Rudolf Virchow tarafından kanserin kökeninin kronik iltihap bölgelerinde olduğu varsayımına dayanır. Deri iltihabı melanom ile, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları mide kanseri ile, mesane iltihabı mesane karsinomu ile, kronik pankreatit pankreas karsinomu ile, kronik viral hepatit C ve B enfeksiyonu karaciğer kanseri ile, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı kolorektal kanser ile, kronik HPV enfeksiyonu rahim ağzı kanseri ile ve akciğer kanseri ile akciğer iltihaplanması (sigara tüketiminden) ilişkilidir (Crusz & Balkwill, 2015; Keibel et al., 2009).

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri ve onunla ilişkili yapılar, kanserlerin çoğunda tespit edilir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi aracılarının bu yüksek prevalansının nedenlerinden biri, hücrelerdeki onkogenik değışikliklerin, malign öncesi ve malign hücrelerde inflamatuvar yolakların indüklenmesine yol açmasıdır (Crusz & Balkwill, 2015). Kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi, büyümesi ve gelişmesi için bağışıklıktan kaçması gerekir. Bunu, bağışıklık tepkisini düzenleyen bağışıklık hücrelerinin özelliklerini de kazanarak gerçekleştirirler (Alzahrani, 2020).

2.4 BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Konakçı enfeksiyonlara karşı, istilacı patojenleri ortadan kaldırmak için çeşitli bağışıklık yanıtları oluşturur. Patojenler üzerinde bulunan ve patojenin yaşam döngüsü için gerekli olan “patojenle ilişkili moleküler yapılar (PAMP’lar)” olarak bilinen korunmuş moleküler kalıpların konak tarafından tanınması yoluyla konak patojen etkileşimi başlar (Kumar et al., 2011).

Konak bağışıklık hücreleri, PAMP'ları saptayarak birincil engel görevi üstlenen doğuştan gelen bir bağışıklık yanıtını başlatır ardından daha uzun süreli ve geniş bir immünolojik hafızaya sahip olan adaptif bağışıklık tekisini ortaya çıkararak savunmayı sağlar (Kumagai et al., 2008; Kumar et al., 2011; Suzuki & Saito, 2006).

2.4.1 Patojen Kalıplarını Tanıyan Reseptörler

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminde PAMP’ları tanıyan reseptörler vardır ve bunlar “patojen kalıplarını tanıyan reseptör (pattern recognition receptor, PRR)” olarak adlandırılır (ÖZBAYER et al., 2014)

PRR'ler, patojenlerin, apoptotik konakçı hücrelerin ve hasarlı yaşlanan hücrelerin yüzeyindeki evrimleşmiş moleküler yapıları doğrudan tanıyabilen bir reseptör sınıfıdır. Ligandların tanınması ve bağlanması yoluyla, PRR'ler spesifik olmayan anti-enfektif, antitümör ve diğer immünoprotektif etkiler üretebilir. Omurgalıların doğuştan gelen bağışıklık sistemindeki PRR'ler, protein bölgesi homolojisine göre beş farklı tipte sınıflandırılabilir: Toll benzeri reseptörler, nükleotid oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörler (nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors, NLR'ler), retinoik asitle indüklenbilir gen-I (RIG-I) benzeri reseptörler (retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors RLR'ler), C-

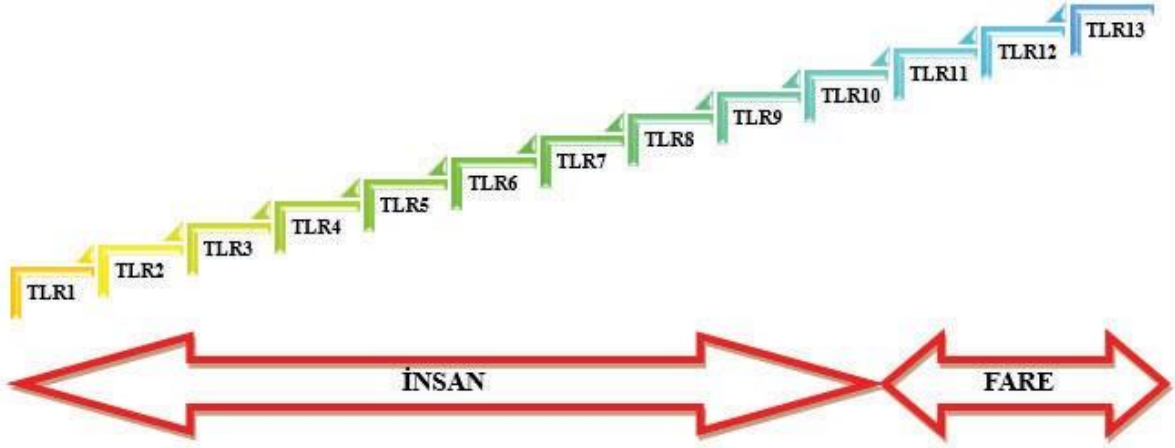
tipi lektin reseptörleri (C-type lectin receptors, CLR'ler) ve melanom-2'de bulunmayan (AIM2) benzeri reseptörler (absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors, ALR'ler) (Li & Wu, 2021).

2.5 TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER

Toll geni, başlangıçta *Drosophila* embriyosunun dorsoventral polaritesini belirlemedeki rolüyle karakterize edilmiştir (Droemann et al., 2005). Sonraki yıllarda Toll reseptörünün mantar önleyici bir yanıtta görev aldığı belirtilmiştir (Kumagai et al., 2008). Bundan sonrasında doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde Toll reseptörünün rolü, sadece böceklerde değil, memelilerde de yoğun bir şekilde incelenmeye başlanmıştır (Konat, 2008).

TLR'ler, bakteriler, mantarlar ve virüsler dahil olduğu mikroorganizmalardan üretilen farklı PAMP'lara karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup transmembran proteindir ve insanlarda interlökin-1 reseptörünün homologudur (Alzahrani, 2020; Karapetyan et al., 2020). TLR'lerin ana görevi mikrobiyal enfeksiyondan konakçıyı korumaktır (Zuzanna Urban-Wojciuk et al., 2019).

Günümüzde spesifik ligandlara sahip 13 memeli TLR'si (TLR1–13) tanımlanmıştır ve insanlarda 10 tanesi (TLR1–10) eksprese olur (Kawai & Akira, 2009). TLR1 ila 9, hem insanlarda hem de farelerde korunur. TLR10 insanlarda ifade edilir, ancak farelerde ifade edilmez (murin TLR10 genindeki bir durdurma kodonu nedeniyle), oysa TLR11 farelerde ifade edilir, ancak insanlarda ifade edilmez (Kumar et al., 2011). TLR11, TLR12 ve TLR13 insan genlerinde bulunmamaktadır (Kawai & Akira, 2009).



Şekil 2.1 İnsanlarda ve farelerde eksprese olan TLR'ler

2.5.1 TLR Lokalizasyonu

TLR'ler endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenip, golgi kompleksinde olgunlaşır ve bunu takiben hücre yüzeyine veya hücre içindeki endozomlara taşınır (Karapetyan et al., 2020). TLR'lerin transfer süreci endoplazmik retikulumda yer alan TLR4 ilişkili protein (protein associated with TLR4, PRAT4A) tarafından düzenlenir (Kawasaki & Kawai, 2014). PRAT4A'dan yoksun hücrelerde, TLR2 ve TLR4'ün hücre yüzeyine ve TLR9'un endo-lizosomal bölmelere iletiminde sorun olduğu gösterilmiştir (Chaturvedi & Pierce, 2009). Hücre yüzeyi TLR'leri TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR10'u içerirken, hücre içi TLR'ler endozomda bulunur ve TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 ve TLR13'ü kapsar (Kawasaki & Kawai, 2014).

2.5.2 TLR Ligandları

TLR'lerin konumu, tanıdıkları ligandların kökeniyle ilgilidir (Boehme & Compton, 2004). Hücre yüzeyinde bulunan TLR'ler esas olarak lipitler, proteinler ve lipoprotein gibi mikrobiyal membran bileşenleri olan geniş PAMP ligandlarını tanır (Kawai & Akira, 2009; Kawasaki & Kawai, 2014).

TLR4, gram-negatif bakterilerden elde edilen lipopolisakariti (LPS); TLR5, hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilerden bakteriyel flagellini tanır (Hayashi et al., 2001).

TLR2, TLR1 veya TLR6 ile heterodimerler oluşturarak uyum içinde peptidoglikan, triaçil ve diasil lipopeptid, zimosan dahil olmak üzere çok çeşitli PAMP'ları tanır (Yu et al., 2010). TLR10 stop kodon eksikliği nedeniyle farede psödogendir, insanda ise TLR2 ile heterodimer oluşturarak *Listeria* kökenli ligandları tanır. TLR10 influenza A enfeksiyonunun algılanmasına duyarlıdır (Kawasaki & Kawai, 2014).

TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 dahil olmak üzere hücre içinde endozomda bulunan TLR'ler, konakçı ve yabancı nükleik asitleri birbirinden ayırt eder (Blasius & Beutler, 2010). TLR3 virüslerden çift sarmallı RNA'yı (dsRNA), TLR 7 ve 8 tek zincirli RNA'yı (ssRNA), TLR9, bakteriyel ve viral CpG DNA motiflerini tanır (Kawai & Akira, 2006). Tablo 2.5'te özetlenmiştir.

PAMP'ların yanında TLR tarafından hücre ölümü ve yaralanma sonucu salgılanan endojen hasarla ilişkili moleküler kalıplar (Damage-associated molecular patterns - DAMP'lar) tanınır. Isı şoku proteinleri, yüksek mobiliteli grup kutu protein 1 (HMGB1), mitokondriyal DNA ve diğer organeller, hücre dışı matris bileşenleri ve plazma zarı bileşenleri DAMP örnekleri arasında yer alır.

DAMP'ların tanınması doku hasarı ve aşırı inflamasyonu önler ancak aynı zamanda metabolik bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çok sayıda inflamatuvar hastalığın gelişmesine de yol açabilir (Alzahrani, 2020; Gong et al., 2020; Pandolfi et al., 2016). TLR2 ve TLR4; HMGB1, HSP70 ve Gp96 ısı şoku proteinleri tarafından aktive olur (Piccinini & Midwood, 2010). Hem DAMP'lar hem de PAMP'lar TLR sinyali yoluyla bağışıklık tepkilerini başlatır (Sato et al., 2009).

Tablo 2.1 TLR ligandları ve ligand kökenleri

TLR	LİGANDLAR	KÖKENLERİ
TLR1 (TLR1–TLR2)	Triasil lipopeptit	Bakteri
TLR2 (TLR1– TLR2, TLR2– TLR6)	Lipoteikoik asit	Bakteri
	Arabinomannan	Mikobakteri
	Peptidoglikan	Bakteri
	Zimozan	Mantarlar
	Lipoprotein	Mikoplazma
TLR3	dsRNA	Virüs
TLR4	Lipopolisakkaritler	Bakteri
	Isı şoku proteinleri	
TLR5	kamçı	Bakteri
TLR6 (TLR2– TLR6)	lipoteikoik asit	Bakteri
	Peptidoglikan	Bakteri
TLR7	ssRNA	Virüs
	imidazokinolin	Yapay olarak sentezlenmiş
TLR8	ssRNA	Virüs
TLR9	Metillenmemiş CpG DNA	Bakteri, Virüs
TLR10 (insan)	dsRNA	Virüs
TLR11 (fare)	Profilin ve ilgili proteinler	Toksoplazma gondi
TLR12 (fare)	Profilin ve ilgili proteinler	Toksoplazma gondi
TLR13 (fare)	23s ribozomal RNA	Bakteri

2.5.3 TLR Yapısı

TLR'ler hücre dışı, transmembran ve hücre içi sinyal alanlarına sahip olan tip I transmembran glikoproteinlerdir. Hücre dışı alan, lösin açısından zengin tekrar motifleri (LRR'ler) içerir ve her LRR modülü 20-43 amino asit uzunluğundadır. "L" nin lösin, izolösin, valin veya fenilalanin olduğu ve "N" nin asparajin, treonin, serin veya sistein olduğu yüksek oranda korunmuş bir "LxxLxLxxN" motifinden oluşurlar (Karapetyan et al., 2020; Werling et al., 2009).

Hücre dışı alanın kristal yapısı incelendiğinde "LxxLxLxxN" motiflerinin bir veya iki at nalı görünümüne benzer olduğu gösterilmiştir (Kumar et al., 2011). Bu motifler, PAMP ve DAMP ligandlarının bağlanmasından sorumludur (Werling et al., 2009).

Yaklaşık 150 amino asitten oluşan TLR hücre içi alanında, transmembran alanından sinyallerin alınıp iletilmesi için TIR bölgesi bulunur. Dizi homolojisi IL-1R süper ailesinin sinyal alanlarıyla benzer olduğu için TIR olarak adlandırılır (Karapetyan et al., 2020). Ligandların TLR

glikoproteinlerinin LRR alanlarındaki spesifik bağlanma bölgelerine bağlanmasıyla, plazma zarında monomer olarak bulunan TLR'lerin sinyalleşme için dimerizasyonu gerçekleşir (Behzadi et al., 2021; Gu et al., 2018).

2.6 TLR9

CD289 olarak da adlandırılan TLR9, insan kromozomu 3p21.3 lokalizasyonunda bulunan TLR9 geni tarafından kodlanır (Berghofer et al., 2005). TLR9 geninin iki ekzonu vardır ve bunlardan ikincisi ana kodlama alanıdır. TLR9 proteini 1.032 amino asit içerir ve 150 kDa uzunluğundadır (Alzahrani, 2020). TLR'ler arasında TLR9, en dar hücre ekspresyon profiline sahiptir. İnsanlarda, bu TLR ağırlıklı olarak plazmasitoid dendritik hücrelerde (pDC'ler), makrofajlarda, T ve B hücrelerinde, dalak, lenf nodu ve kemik iliğinin dahil olduğu bağışıklık hücresi bakımından zengin dokularda antijen sunan hücreler (APC) tarafından eksprese edilir (Chuang et al., 2020; Karapetyan et al., 2020).

TLR9 reseptörleri için primer ligandlar metillenmemiş sitidin fosfat guanozin (CpG) oligodinükleotidlerdir (ODN) (Karapetyan et al., 2020). Omurgalı ve bakteri DNA'sı farklı dizilere sahip olduğundan genomlarında bulunan CpG motiflerinin özellikleri de farklıdır. İlk olarak, CpG motifleri omurgalı genomuna kıyasla bakteri ve viral genomda daha yüksek oranda eksprese olur (Bezemer & Garssen, 2020). İkincisi, omurgalılarda bir CpG'den önce gelen en yaygın baz C'dir ve bir CpG'den sonra gelen en yaygın baz G'dir. Son olarak, bu motifler memeli DNA'sında saptanmaz çünkü çoğu CpG dizisi memelilerde metillenir ancak CpG dinükleotitleri bakteriyel DNA'da metillenmez. Bu nedenle, doğuştan gelen bağışıklık sistemi, metillenmemiş CpG'nin varlığını bir enfeksiyon kanıtı olarak yorumlar (Ashkar & Rosenthal, 2002; Kumagai et al., 2008).

TLR9 mesane kanseri, prostat kanseri, akut lenfoblastik lösemi (ALL), hepatoselüler karsinom (HCC), mide kanseri, rahim ağzı kanseri, Hodgkin lenfoma, meme kanseri, Burkitt's lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, endometriyal kanser, yemek borusu kanseri ve lenfoma dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde eksprese olur ve kanser patogeneğinde önemli rol oynar (Zhang et al., 2013).

2.6.1 TLR9 Sinyal Yolağı

TLR'ler, MyD88, TRIF, TIRAP/MAL veya TRAM gibi bir dizi TIR alanı içeren adaptor üyesi ile etkileşime girer. Buna göre TLR sinyali iki yöne ayrılır: MyD88'e bağlı ve TRIF'e bağlı yolak (MyD88'den bağımsız). MyD88, tüm TLR'ler tarafından kullanılır ve inflamatuvar sitokin genlerinin indüklenmesi için NF-κB ve MAPK'leri aktive eder (Kawasaki & Kawai, 2014).

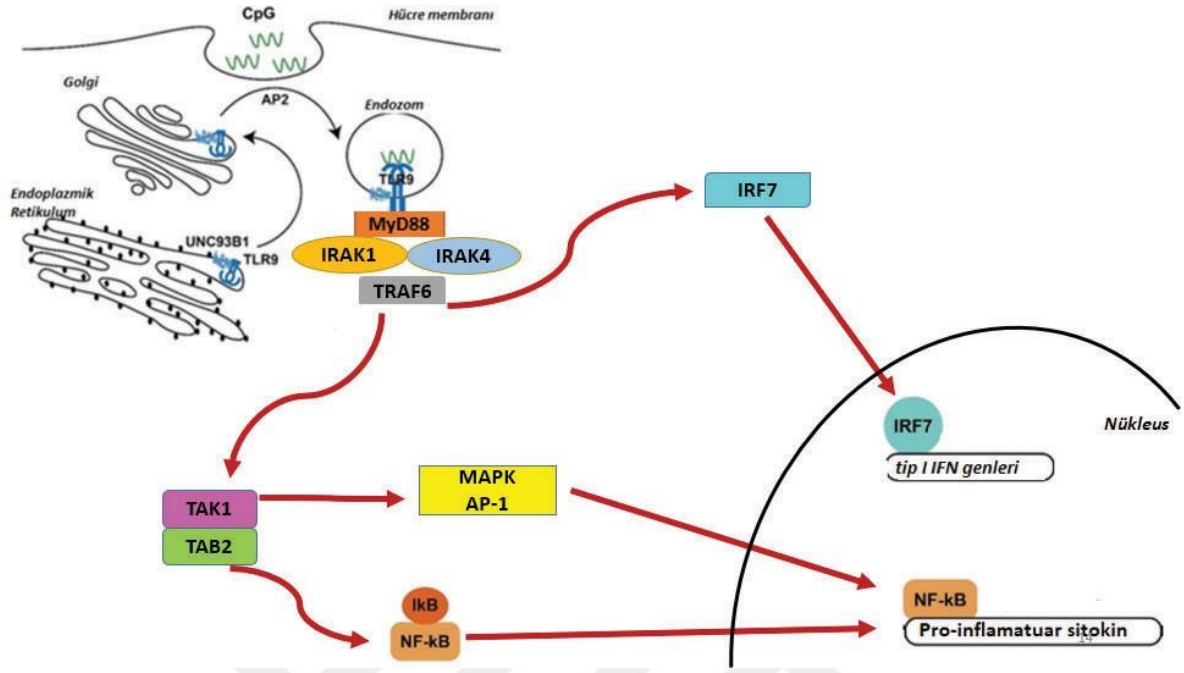
TLR9 endoplazmik retikulum membranına (dinlenme durumunda) lokalizedir ve ligand uyarılması sonucu endozomlara geçişi gerçekleşir (Zhang et al., 2013). TLR9'un hücre içi trafiği, multi transmembran bir protein olan UNC-93 homolog B1 (UNC93B1) ve spesifik adaptör proteinler (AP'ler) gibi yardımcı proteinler tarafından düzenlenir. UNC93B1, endoplazmik retikulumda TLR9 ile etkileşime girer ve Golgi aygıtından plazma zarına, kaplama proteini kompleksi II (COPII) vezikülleri yoluyla salgı yolunu izler. Hücre zarında, UNC93B1, klattrin içeren veziküller yoluyla TLR9'un endositozu için adaptör protein AP-2'yi alır. Endozomda TLR9, hücrelere endositoz yoluyla giren agonisti CpG-DNA ile etkileşime girer (Chuang et al., 2020). TLR9'un LRR'si, zar bölmesinin içinde bulunur ve sinyallerin iletilmesi sitozolik tarafta bulunan TIR alanlarındaki adaptör moleküllerle gerçekleşir (Kumagai et al., 2008). Bu üyeler arasında MyD88, TRIF, TIRAP/MAL veya TRAM bulunur. TRIF, TLR3 ve TLR4'e bağlanan ve tip I IFN ve sitokin genlerinin indüklenmesi için IRF3, NF-κB aktivasyonuna yol açan alternatif bir yolu destekler. TIRAP, farklı lipitlere bağlanarak hem hücre yüzeyi hem de endozomal TLR'lerle birleşen adaptördür. TRAM ise TRIF ve TLR4 arasında bağlantı kurmak için TLR3'e değil, seçici olarak TLR4'e bağlanır (Kawasaki & Kawai, 2014).

Bir TIR alanı ve bir ölüm alanı (DD) içeren TLR9 sinyalini bu bağdaştırıcılardan biri olan MyD88'in başlatması gerekir (Kumagai et al., 2008). Çünkü yapılan çalışmalarda, MyD88 nakavt farelerden alınan makrofaj ve dendritik hücreler, TLR9 ligandı CpG DNA'ya tamamen tepkisiz kalmış bunun sonucunda metillenmemiş CpG DNA'nın tanınmasının MyD88'e bağlı olduğu gösterilmiştir (Ashkar & Rosenthal, 2002; Kaisho & Akira, 2001).

MyD88 TLR9'a TIR bölgesinden bağlanır. MyD88 terminal bölgedeki karboksil (COOH) kısmından DD'si aracılığıyla sırasıyla, IRAK ailesinden IRAK1 ve IRAK4 ile etkileşime girer. IRAK4, kinaz aktivitesini yukarı regüle ederek IRAK1'i fosforile eder, bu da bir E3 ubiquitin ligaz olan TRAF6'nın alınmasına sebep olur TRAF6'nın aşağısında yer alan transforme edici büyüme faktörü- β ile ilişkili kinaz 1'i (TAK1'i) aktive eder (Chuang et al., 2020; Kumagai et al., 2008).

Yapılan bir çalışmada TAK1, hem TCR (T hücre reseptörü) hücre hem de BCR (B hücre reseptörü) sinyalleşmesinde NF- κ B aktivasyon sinyallerine aracılık eder. TAK1 eksikliği, *in vivo* olarak kusurlu T-hücresi gelişimi ve bozulmuş NF- κ B aktivasyonu ile sonuçlanmıştır. Böylelikle TAK1'in doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinde çok önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (Suzuki & Saito, 2006). TAK1, TAB2 (TAK1 bağlanma proteini 2) ile bir sinyal kompleksi oluşturur ve NF- κ B inhibitör protein [I κ B] kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. Böylece NF- κ B aktive olur (Alzahrani, 2020).

Pro-inflamatuvar sitokin ekspresyonunu indüklemeye ek olarak, TLR9 aktivasyonu, tip I IFN'lerin üretimi ile sonuçlanır. IRF-7, tip I IFN genlerinin ekspresyonunu düzenleyen pDC'lerde eksprese edilen bir transkripsiyon faktörüdür. IRF-7, tip I IFN'nin transkripsiyonunu indüklemek için çekirdeğe yer değiştirdiği MyD88, IRAK1, IRAK4 ve TRAF6 kompleksi ile birleşir (Chuang et al., 2020).



Şekil 2.2 TLR Sinyal Yolağı (Alzahrani, 2020; Chuang et al., 2020)

2.7 IRAK

IRAK'lar TLR ve IL-1R sinyalleşme süreçlerinin temel araçlarıdır. İnsan genomunda dört IRAK (IRAK1, IRAK2, IRAK3 veya IRAKM ve IRAK4) geni bulunur. Tüm IRAK proteinlerinde, dimerizasyon ve MyD88 etkileşimi için önemli olan bir N-terminal ölüm alanı, bir prolin/serin/treonin bakımından zengin alan ve bir kinaz ve/veya psödokinaz alanı bulunur. IRAK'lar serin/treonin protein kinazlar olarak sınıflandırılmasına rağmen, sadece IRAK1 ve IRAK4 kinaz aktivitesi sergiler. IRAK2 ve IRAKM, kinaz aktivitesinden yoksundur ve düzenleyici olarak çalışır (Picard et al., 2007; Rhyasen & Starczynowski, 2015).

2.7.1 IRAK4

IRAK ailesinin dördüncü üyesi olan IRAK4, diğer üyelerden daha önce 2002 yılında tanımlanan, IL-1R ve TLR sinyali arasındaki kesişme noktasında bulunan bir kinazdır (Mullard, 2020; Picard et al., 2007). TLR sinyal yolunda kritik bir rol oynayan ve sinyal iletimi için kinaz aktivitesi gerektiren *Drosophila* Pelle proteini ile IRAK4 en yüksek homolojiyi paylaşır.

Hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklıkta rol alması gereken, *Drosophila*'dan memelilere evrimsel olarak korunmuş moleküllerdir (Suzuki & Saito, 2006; Wang et al., 2009). Tüm IRAK'larda olduğu gibi, IRAK4 de iki yapısal alan içerir: DD içeren proteinlerin moleküler tanınmasına aracılık eden bir ölüm alanı (DD) ve bir katalitik kinaz alanı (KD) (Picard et al., 2007).

MyD88'e bağlı TIR sinyalinde, IRAK4 ölüm etki alanı etkileşimleri yoluyla protein adaptörü MyD88 ile birleşir. MyD88, IRAK1, TRAF6 ve IRAK4'ten oluşan bir sitoplazmik sinyal kompleksi oluşturulur. Bu IRAK4'ün varlığının TIR sinyalizasyonu için vazgeçilmez olduğunu gösterir. Aynı zamanda reseptörlerin bağlanması ile aktive edilen ilk reseptör-protein kinazdır ve aşağı akış sinyal molekülleri ile etkileşime girer (Rhyasen & Starczynowski, 2015; Wang et al., 2009).

TIR-MyD88-IRAK4'e bağımlı yolların öneminin gösterimi farelerde deneysel çalışmaların yapılmasına dayanmaktadır; IRAK4'ün hedeflenen bir şekilde silinmesi sonucu, sitokin tepkilerinde ve IL-1R ve TLR'ler tarafından indüklenen aşağı akış sinyal yollarında ciddi kusurları ortaya çıkarmıştır. İnsanlarda yapılan çalışmalar sonucu gen delesyonu/mutasyonları nedeniyle IRAK4 eksikliği olan hastalarda *Streptococcus pneumoniae* gibi Gram-pozitif piyojenik bakterilerin neden olduğu tekrarlayan enfeksiyonlar gözlenmiştir (Rhyasen & Starczynowski, 2015; Wang et al., 2009). IRAK4 proteinlerinden yoksun insanlar dar bir patojen aralığına sahiptir. Sadece bebeklik ve erken çocukluk döneminde hayati bir önem taşırken bu hastalar ergenliğe yaklaştıkça, enfeksiyonlara duyarlılık giderek daha nadir hale gelir (von Bernuth et al., 2012).

2.8 TLR VE KANSER

Bağışıklık sisteminde rol oynayan TLR'ler sadece bağışıklık hücrelerinde değil aynı zamanda tümör hücrelerinde veya mikroçevresinde eksprese olup, tümör hücrelerine karşı bağışıklık tepkisinde önemli roller üstlenirler (Gu et al., 2018; Martín-Medina et al., 2022; Sato et al., 2009).

Tablo 2.2 İnsan kanser hücrelerinde TLR ifadesi

Kanser Türü	TLR
Akciğer Kanseri	TLR2, TLR4, TLR9, TLR3
Prostat Kanseri	TLR4, TLR9
Meme Kanseri	TLR2, TLR3, TLR9, TLR4
Hepatoselüler Karsinom	TLR2, TLR3, TLR9, TLR4, TLR6
Mide Kanseri	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
Kolorektal Kanseri	TLR2, TLR3, TLR5, TLR4, TLR9
Pankreas Kanseri	TLR7, TLR8
Yumurtalık Kanseri	TLR5, TLR2, TLR3, TLR4
Özafagus Kanseri	TLR3, TLR4, TLR7, TLR9

Kanserin oluşumu ve gelişimi için tümör dokusuna oksijen ve besin sağlanması amacıyla kılcak damarın büyümesi için gerekli olan anjiyogenez sürecinde bazı TLR'ler rol alır. Özellikle TLR4 ve 9'un tümör anjiyogenezini ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Gu et al., 2018).

Çeşitli kanserlerde artmış TLR ligandları olan PAMP ve DAMP üretimi görülmüştür (Alzahrani, 2020). DAMP'lar sağlıklı hücrelerin sitozol ve çekirdeğiyle sınırlıdır ancak kanser hücrelerinde aşırı ekspresyona edilebilir ve hücre içi lokalizasyonları değişebilir. En iyi karakterize edilen DAMP'lardan biri olan, HMGB1 normalde çekirdekte olması gerekirken sitoplazmada aşırı ekspresyona edilir. HMGB1 bağışıklık hücreleri üzerindeki TLR'ler tarafından tanınır. Sonraki TLR sinyalleri anti-tümör bağışıklık tepkisini bozar ve kanserin ilerlemesine yol açar. HMGB1'in meme kanseri, kolon kanseri, melanom, pankreas kanseri ve prostat kanserinde güçlü bir şekilde ifade edildiği gösterilmiştir; güçlü ifade edilen HMGB1, bağışıklık hücrelerinde ekspresyona edilen TLR2, TLR4 ve TLR9'u aktive eder ve kanser progresyonunu ve metastazını indükleyebilir (Jouhi et al., 2014; Sato et al., 2009).

DAMP'lara benzer şekilde TLR'lerin lokalizasyonu kanser hücrelerinde bozulabilir. TLR2, TLR4 ve TLR5 normalde plazma membranında lokalizedir ancak kolorektal kanser hücrelerinin sitoplazmasında da bulunabilir (Rolfo et al., 2023).

TLR'lerin aktivasyonu sonucu 2 yönde etki gerçekleşebilir. Hem pro-tümör tepkiler, kanser hücresi proliferasyonu, hayatta kalması ve metastazı gözlenebilir hem de tam tersi tümör büyümesi ve çoğalmasını baskılayan ve kanser hücresi apoptozunu uyaran anti-tümör tepkiler gözlenebilir (Alzahrani, 2020).

Yapılan çalışmalarda TLR3 ve TLR5, doğrudan anti-tümör etkileri ortaya çıkarırken, TLR4,7/8 ve 9'un tümör hücreleri üzerinde uyarıldığında birincil olarak pro-tümör özellikleri gösterdiği ortaya konulmuştur. Ancak bir TLR'nin belirli bir tümör tipine bağlanması hücre ölümünü indükleyebilirken, aynı TLR'nin farklı bir tümör üzerinde uyarılmasının sağkalımı teşvik edebileceğini, proliferasyonu indükleyebileceğini vurgulamak önemlidir (Kaczanowska et al., 2013).

Örneğin yukarıdaki çalışmanın tersine TLR 2, 4 ve 7/8'in uyarılması, immünsüpresif sitokinlerin üretimi, artmış hücre proliferasyonu ve apoptoza karşı direnç yoluyla tümör ilerlemesine yol açabilir. Öte yandan, TLR 2, 3, 4, 5, 7/8 ve 9'un uyarılmasının, genellikle kemoterapi veya immünoterapi ile kombine edildiğinde, farklı yollardan tümör inhibisyonuna yol açabildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Z. Urban-Wojciuk et al., 2019).

2.8 GEN POLİMORFİZMLERİNİN KANSER İLE İLİŞKİSİ

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), bir popülasyonda %1 veya daha yüksek sıklıkta bulunan gen varyantlarıdır. SNP'ler, belirli bir gendeki konuma bağlı olarak farklı etkilere sahip olabilir: promotör özellikleri etkileyebilir, amino asit dizisini değiştirebilir, protein ifadesini etkileyebilir ve hatta gen ifadesini tamamen susturabilir. TLR genlerindeki polimorfizmler, pro-inflamatuar veya anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengeyi değiştirerek enfeksiyon, kronik inflamasyon ve kanser riskini modüle edebilir (Kutikhin, 2011).

Yapılan çalışmaların çoğunda TLR9 geni üzerinde, rs352140(C/T), rs5743836 (T/C) ve rs187084(C/T) (sırasıyla 2848C/T, 1237T/C ve 1486C/T olarak da bilinir) dahil olmak üzere üç yaygın tek nükleotid polimorfizmine (SNP) odaklanılmıştır. Önceki araştırmalar, rs352140 TT genotipinin, mRNA düzeyinde daha yüksek bir TLR9 ekspresyonuna neden olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle rs352140 doğuştan gelen bağışıklık tepkisini, kronik inflamasyonu ve

ardından karsinom oluşumunu etkileyebilir. rs5743836 polimorfizminin C aleli, bir IL6 yanıt veren ara eleman üretir. Bu alelin mevcudiyeti, CpG'ye yönelik hücrel tepkilerin şiddetlenmesine yani TLR9 tetiklenmesinin ardından daha yüksek bir NF-κB bağlanma afinitesi sergilenmesine neden olur. Bunun da NF-κB 'nin transkripsiyonunun artmasına, daha fazla proinflamatuvar mediatör salınımı ve üretimine neden olduğu görülmüştür. Bu polimorfizm inflamasyonun indüklenmesiyle beraber tümörjenezde de önemli bir rol oynar (Zhang et al., 2013).

IRAK'lar TLR genlerinin ilgili olduğu polimorfizmler ile ilişkili olabilir çünkü TLR yoluyla sinyal iletiminde anahtar bir rol oynarlar. Çalışmamız için yapılan literatür taramasında TLR sinyal yolunda görev alan IRAK4 gen polimorfizmleri ile kanser arasındaki ilişkinin önemi belirsizliğini korumaktadır (Kutikhin, 2011).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇ

Çalışmamız için gerekli etik kurul onayı Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 11.11.2021 tarihinde, 2021/15-31 karar no ile verilmiştir. Bu çalışmanın gerçekleşmesi için bir proje önerisi hazırlanmıştır. BAP Komisyonu tarafından 'TLR9 ve IRAK4 Genlerindeki Sekans Varyantların Akciğer Kanseri Riski ile İlişkinin Belirlenmesi' adlı proje önerimiz 21.04.2022 tarihinde TYL-2022-101 proje numarası ile desteklenmesi uygun görülmüştür.

3.1.1. Evren ve Örneklem

Çalışmamızda G.Power 3.1 aracılığıyla güç analizi yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı gruplar arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak göstermek için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanılarak 0.6 etki büyüklüğü, 0.05 anlamlılık düzeyi (%95 güven düzeyi) ve her bir grupta 45'er örneklem büyüklüğü (toplam=90) ile çalışıldığında testin gücü 0.80 olarak hesaplanmıştır.

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve akciğer kanseri (NSCLC I-II-III-IV evreler) tanısı alan 45 hasta ile çeşitli şikayetler ile Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve akciğer kanseri tanısı almayan 45 kontrol bireyden periferik kan örnekleri EDTA içerikli tüpler içerisine alınarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmanın içeriğiyle ilgili olarak tüm hastalara bilgi verilerek hastalardan imzalı onam formu alınmış, bilgilendirilmiş ayrıntılı onam formlarını imzalamayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamıza dahil edilme kriterleri;

- NSCLC grubuna katılan hastalar; 25-75 yaş arası, akciğer kanseri tanısı alan kadın ve erkek bireyler
- Kontrol grubumuzda; 25-75 yaş arası herhangi bir kanser tanısı almayan kadın ve erkek bireyler bulunur.

Çalışmamızda dışlama kriterleri;

- NSCLC grubumuz; 25 yaşından küçük ve 75 yaşından büyük, akciğer kanseri (NSCLC) tanısı olmayan bireyler
- Kontrol grubumuz; 25 yaşından küçük ve 75 yaşından büyük, kanser tanısı olan bireyler

3.1.2 Kullanılan malzemeler

- Steril laboratuvar eldiveni
- EDTA'lı mor kapaklı kan alma tüpü
- Santrifüj tüpleri (1,5-2 ml)
- Kandan genomik DNA izolasyon kiti (EURX, GeneMATRIX Quick Blood DNA Purification Kit)
- PCR master mix (dNTPs, Taq DNA polimeraz, yükleme tamponu ve MgCl₂ içermeli)
- TBE buffer (agaroz jel elektroforezine uygun, 10X)
- DNA jel boyası (etidyum bromid yerine kullanılmak üzere toksik olmayan, 20.000x)

- DNA jel boyası (etidyum bromid yerine kullanılmak üzere toksik olmayan, 20.000x)
- 8 li strip vial (0.2mL, PCR tüp)
- PCR grade nükleaz free su
- High purify agaroz
- Red Safe jel boyası
- Marker (50 bp)
- Human TLR9 ELISA kit, 96 well (CLOUD-CLONE CORP.)
- Human IRAK4 ELISA kit, 96 well (CLOUD-CLONE CORP.)
- TLR9 -DNA SEKANS ANALİZİ, PCR ->Sanger -Tek okuma, 500-600 baz
- IRAK4-DNA SEKANS ANALİZİ, PCR ->Sanger -Tek okuma, 500-600 baz
- Steril mikropipet ucu (0,5 - 10 µl)
- Steril mikropipet ucu (10 - 100 µl)
- Steril mikropipet ucu (100 – 1000 µl)

3.1.3 Kullanılan cihazlar

- Vorteks
- Buzdolabı (Bosch)
- Derin dondurucu (Bosch)
- PCR (Polimerase Chain Reaction) cihazı (Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, California, USA)
- Elektroforez cihazı (Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply)
- NanoDrop
- Santrifüj
- Plate okuyucu spektrofotometre

- Otomatik pipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Etüv
- Mikro dalga fırın (Samsung)
- Sekans cihazı
- Hassas terazi (Weightlab WL-603)

3.2 YÖNTEM

3.2.1 DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere toplanmış kan örneklerinden DNA izolasyonu için, ticari DNA kiti olan EURX, GeneMATRIX Series (Katalog No: E3565-01, Lot No: F7190221) kullanıldı.

İzolasyon Protokolü

1. 30 µl aktivasyon Buffer QB spin kolonlara eklenerek membranlar aktive edildi.
2. 200 µl kan örneği farklı bir eppendorf tüpüne eklendi.
3. 2 µl RNaseA eklendi ve 5 dk vortexle inkübasyon yapıldı. Bütün örneklere standart bir süre hepsine aynı derecede uygulandı.
4. 10 µl proteinaz K ilave edildi.
5. 200 µl Sol QB buffer eklendi ve vortex yapıldı ardından 10 dk 70°C'de inkübe edildi.
6. 200 µl %96 etanol eklendi ve vortex yapıldı ve 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
7. Lizat spin kolona aktarıldı ve eppendorf içindeki Buffer QB'ye aktarılıp 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
8. Alttaki toplama tüpü başlatıldı.
9. 500 µl Wash QBX1 buffer eklendi ve 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
10. Alttaki toplama tüpü boşaltıldı.

11. 500µl Wash QBX2 buffer eklendi ve 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
12. Alttaki toplama tüpü boşaltıldı.
13. 1dk santrifüj edildikten sonra alkolün uçması için kapak açık bekletildi.
14. 100 µl elüsyon buffer eklendi. Oda ısısında 2 dk inkübe edildi ve 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edildi.
15. Toplama tüpünden ayrıştırılan DNA'ların saflık analizi aşamasına geçildi.

DNA miktarı ve saflık analizi

DNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 NanoDrop ile ölçüldü. Çalışmamız kapsamındaki tüm DNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerlerinin (A260/A280) oranı ölçüldü ve $1,7 \leq A260/A280 \leq 2,0$ şartı sağlandıktan sonra, DNA stok konsantrasyonu 50 ng/µL olacak şekilde elüsyon solüsyonu ile dilüe edilerek ve genotipleme aşamasına kadar -20 C°'de saklandı.

3.2.2 Amplifikasyon ve Genotipleme

Çalışmamız kapsamında araştırılması planlanan TLR9 ve IRAK4 genlerinde ortalama 500 bazlık dizileme bölgesinin seçimi için NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ve Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) veri tabanları kullanılmıştır. Genotipleme için öncelikle TLR9 ve IRAK4 gen promotör bölgeleri için 20-23bp uzunluğunda ve SNP içermeyen diziler baz alınarak forward ve reverse primer tasarımı yapılacaktır.

TLR9 için rs751383938 (52,222,100) ile rs1559437476 (52,222,620) bölgeleri;
IRAK4 için rs774138507 (43,786,360) ile rs 1942259003 (43,786,908) bölgeleri arasında tarama yapılmıştır.

-Bağlanmış primerler taq DNA polimeraz ile uzatılır.

Çalışmada kullanılan Master mix bileşenleri;

-Taq polimeraz

-dNTP

-Uygun tampon çözelti

Çalışmada kullanılan primerler;

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler, BM Lab. tarafından, senetzlenip Tablo 3.1’ de verilmiştir. TLR9 ve IRAK4 gen promotör bölgeleri için 20-23bp uzunluğunda ve SNP içermeyen diziler baz alınarak forward ve reverse primer tasarımı yapılmıştır. Bu primerler öncelikle dilüe edilir. Bunun için 18 µL nükleaz free su üzerine 2 µL primer pipetaj yapılarak eklenir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan PCR primer dizileri

GEN ADI	PRİMERLER
IRAK4-F	AAGTGAAAGGGGTGGGGTTC
IRAK4-R	TCCACCCTACATACAGCCCA
TLR9-F	CGAAACAGTCCCAGGAGAGG
TLR9-R	CTGAGCCCAACTGCAATCTC

Hazırlık aşamasında ilk önce her iki gen içinde hasta ve kontrol gruplarının karışmaması için ayrı ayrı etiketleme yapıldı. PCR bileşenleri toplamda 25 µL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanır. PCR bileşenlerini içeren bir karışım tüpü etiketlendi. Bu karışım tüpünün içine sırasıyla nükleaz free (10,5 µL), master mix (12,5 µL) ve primerler (toplamda 1 µL) eklendi. Etiketlenen hasta ve kontrol grupları tüplerinin içine 1 µL DNA’ları eklenir ve geri kalan miktarı karışım tüpünden uygun miktarda her gruba dağıtıldı. PCR koşulları her iki gen içinde ayarlanıp termal döngü cihazına tüpler yerleştirildi ve reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler elektroforez uygulanmak üzere 4°C’ye kaldırıldı.

<i>IRAK4 PCR Koşulları</i>		<i>TLR9 PCR Koşulları</i>	
94°C	30 saniye	94°C	30 saniye
94°C	30 saniye	94°C	30 saniye
62 °C	1 dakika	63 °C	1 dakika
68°C	1 dakika	68°C	1 dakika
68 °C	5 dakika	68 °C	5 dakika
4°C	Beklemede	4°C	Beklemede

Şekil 3.2 IRAK4 ve TLR9 PCR şartları

Agaroz jel elektroforezi hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi

%2'lik (w/v) agaroz jel hazırlığı için; 2 gram agaroz hassas terazide tartılıp ve 100 ml 1x TBE tamponu ile birlikte 250 ml'lik bir erleninde karıştırılmıştır. Ardından mikrodalga cihazına alınarak 1-2 dk bekletilip tamamen çözünmesi sağlanarak şeffaf bir görünüm elde edildikten sonra soğumaya bırakılır. Sonrasında 5 µL RedSafe eklenerek homojen bir şekilde dağılması sağlandıktan sonra agaroz aktarma kabına dökülür ve ardından jel taraklar sabitlendi. Dökme işlemi tek bir noktadan yapılır ve hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edildi. Yapılan karışımın katılmış jel formu için yarım saat beklenir. Elektroforez tankı içerisine 1X TBE tamponu uygun miktarda dolduruldu. Hazırlanmış agaroz jeli tarakları çıkarılarak tamponun içinde tamamen kalacak şekilde yerleştirildi. Marker (3 µL DNA ladder) ve tüm örnekler (2 µL) jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. PCR ürünleri elektriksel potansiyel fark uygulanarak 80 V 400 mA 30 dakikada yürütüldü. Elektroforez sonrası, UV bant altında görüntülenip görüntüler kaydedildi.

Sanger Sekanslama

Sanger sekanslama yöntemi 1977 yılında Frederick Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği DNA dizi analizinde en sık kullanılan yöntemdir. Enzime bağlı bir sekanslama işlemine dayanan bu yöntem; DNA sentezini sağlamak için DNA polimeraz enzimlerinden birisi kullanılır. Dizi analizi yapılırken 4 reaksiyon karışımı hazırlanır ve bu karışımlarda; kalıp DNA dizisi, dNTP'ler, ddNTP'ler (dideoksiribonükleozit trifosfat) ve primerin olması gerekir. Sekanslamadan önce DNA tek zincir haline getirilir. Bu yöntemin temeli DNA polimerazın

ddNTP'lerin yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanabilmesine dayanır. DNA polimeraz, DNA sentezlemek için serbest bir 3'-OH grubuna ihtiyaç duyar. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Diziyi sonlandıran bu ddNTP'ler farklı renkteki floresan boya ile işaretlenir. Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur.

Çalışmamızda PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HigHPrep PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uygun saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle dizileme kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılmıştır. Yaklaşık 500 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri bu yöntemle dizilenmiştir.

Genotip Analizinin Değerlendirilmesi

Sekans sonuçlarının değerlendirilmesi için MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılmıştır. MEGA 11 moleküler evrimin istatistiksel analizini yönetmek ve filogenetik ağaçlar oluşturmak için tasarlanmış bir programdır. Programın kullanım arasında çoklu ve yerel dizi hizalanması, veri analizlerinin kaydedilmesini sağlayacak ortam, genetik kod tablo bölümünde kod tablosunun istatistiksel analizinin yapılması, varyans hesaplamaları, seçim testlerinin uygulanması, çoklu ağaç görüntülenmesi bulunur. Çalışmamız kapsamında hasta ve kontrol grubunun sekanslarının hizalanması için bu programı kullandık. Hasta ve kontrol grubu ayrı ayrı her iki gende ele alınarak hizalamaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 arasında MEGA 11 programından elde edilen görüntüler sunulmuştur. IRAK4 bölgesi için kontrol grubunda hizalanma öncesi ve sonrasındaki fark gösterilmiştir. MEGA11 ile baz değişimleri kontrol gruplarının kendi içinde ve hasta gruplarının kendi içinde karşılaştırılır.

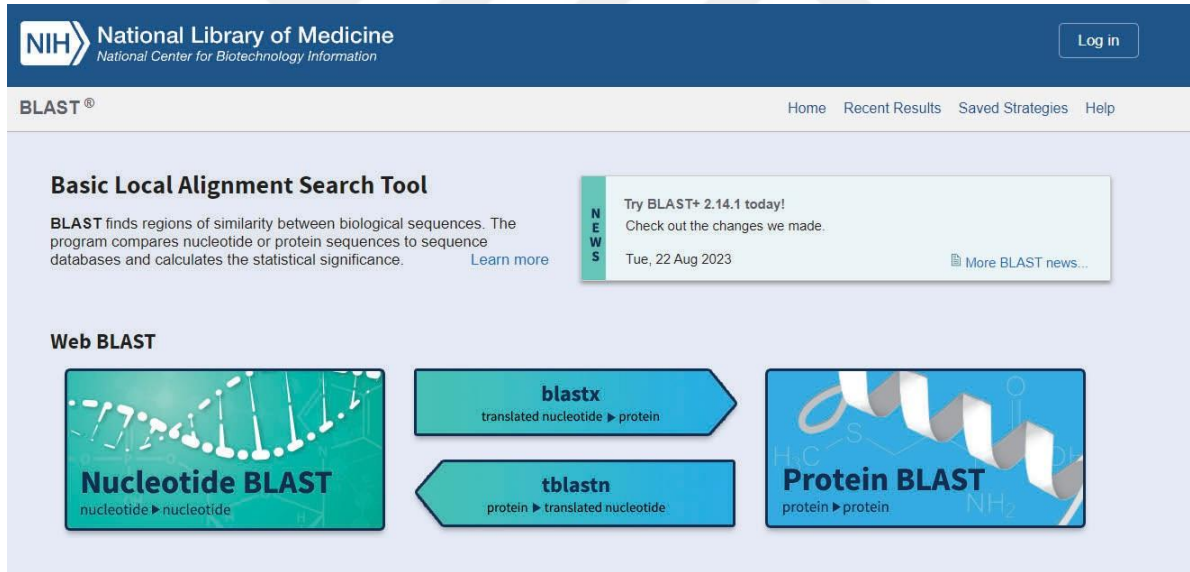
MEGA 11 programı ile beraber NCBI veri tabanında bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı beraber kullanılmıştır. Kullanılan dizilere bağlı olarak farklı amaçlar için kullanılan BLAST programları mevcuttur. Bu programlar Şekil 3.5’te özetlenmiştir.

-BLASTn, nükleotit sorgu dizisi homolog dizilerin bulunması için başka bir nükleotit veri tabanı ile karşılaştırılır.

-BLASTx, nükleotit sorgu dizisi homolog dizi bölgelerinin bulunması için aminoasitlerden oluşan bir veritabanı ile karşılaştırılır.

-tBLASTn, bir aminoasit bir nükleotit dizisinden oluşan bir veritabanı ile orjinal dizideki bölgelere homolog bölgeleri bulmak için karşılaştırılır.

-BLASTp ise aminoasitlerden oluşan bir sorgu dizisi homolog dizilerin bulunması amacıyla istenilen bir aminoait veritabanı ile karşılaştırılır.



Şekil 3.5 NCBI veri tabanında BLAST yöntemleri

Çalışmamız kapsamında BLASTn yöntemi seçilerek tüm nükleotid dizileri, her bir genin kontrol ve hasta grupları ayrılmak üzere, bir metin halinde hazırlanıp programa yüklenmiştir. Şekil 3.6’da IRAK4 bölgesi için kontrol gruplarında BLASTn sonuçları gösterilmiştir.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Standard

BLASTn programs search nucleob

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file K:IRAK4.txt [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.) rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

[New](#) Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#)
For more info see What are taxonomic nt databases? [Download](#)

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism [Optional](#) exclude [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Sequences from type material

Entrez Query [Optional](#) [?](#) [YouTube](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)
Choose a BLAST algorithm [?](#)

Yüklemeden sonra BLAST işlemi gerçekleşir.

BLAST [?](#)

Nükleotit dizileri FASTA formatında tek tek veya dosya halinde yüklenir.

Şekil 3.6 BLASTn veri yükleme işlemi

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-F8J5T8XK013

Home Recent Results Saved Strategies Help

< Edit Search Save Search Search Summary v How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID **F8J5T8XK013** Search expires on 09-04 16:50 pm Download All v

Program **BLASTN** Citation v

Database **nt** See details v

Query ID **ic|Query_241095**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **18274**

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity to E value to Query Coverage to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download v Select columns v Show 100 ?

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), RefSeqGene (LRG_75) on chromosom	Homo sapiens	783	20901	73%	0.0			
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens 12 BAC RP11-210N13 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequ...	Homo sapiens	783	20901	73%	0.0			
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) gene, complete cds	Homo sapiens	783	20901	73%	0.0	99.06%	33033	AY188092.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4284	NM_016123.4
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X6, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4999	XM_054372179.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X5, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4489	XM_054372178.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X4, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4882	XM_054372177.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X3, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4470	XM_054372176.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X2, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	5266	XM_054372175.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X1, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4910	XM_054372174.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X6, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4998	XM_005268944.5
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X5, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4487	XM_017019390.3
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), transcript variant X4, mR...	Homo sapiens	676	17878	62%	0.0	99.46%	4880	XM_005268945.5

İlişkili bulunan genlerin arasından IRAK4 seçimi yapılır.

Şekil 3.7 Hizalama için eşleşme yapılan genlerden IRAK4 geni seçimi

Bu işlemden sonra son aşama değerlendirilen IRAK4 bölgesi için kontrol grubunda yer alan 45 bireyin nükleotit dizileri Şekil 3.8’de hizalanmıştır. Burada bireylerin nükleotit dizileri arasındaki aynı pozisyonlardaki benzer değişimler bulgu olarak sunulmak üzere not alınmıştır.

homo sapiens interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), RefSeqGene (LRG_75) on chromosome 12

NCBI Reference Sequence: NG_008852.1



Şekil 3.8 Kontrol grubu IRAK4 BLASTn sonuçları

Yukarıda gösterilen örnek IRAK4 bölgesinin kontrol grubunda yapılmıştır. Aynı işlem TLR9 akciğer kanserli hastalarda ve kontrol bireylerde ve IRAK4 akciğer kanserli hasta grubunda da yapılmıştır. MEGA 11 ve BLASTn programları kullanılarak TLR9 ve IRAK4 genlerindeki varyantlar belirlenmiştir. Bu varyantların NCBI üzerinde tanımlı yada yeni belirlenen varyantlar olmasına bağlı olarak akciğer kanseri ile ilişkili olup olmadığına bakılmıştır.

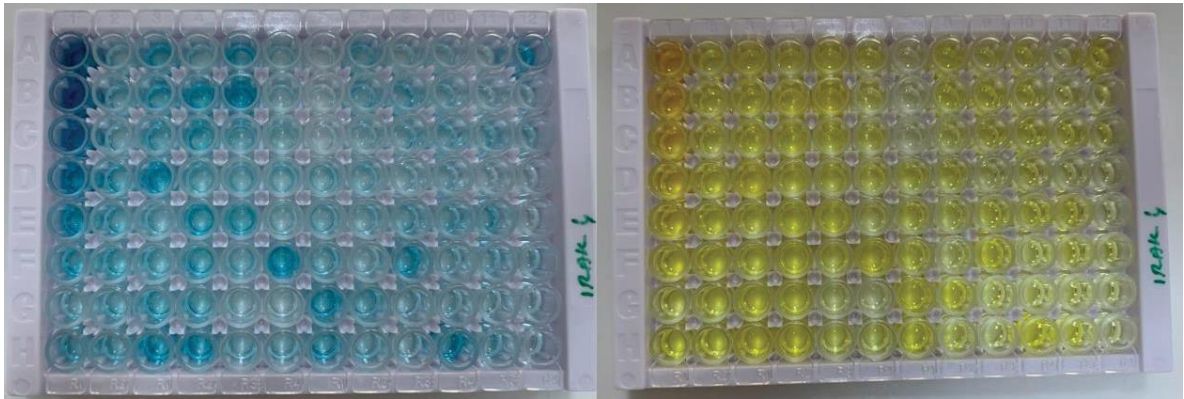
3.2.2 Elisa Yöntemi İle Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda izole edilen serum örneklerinden TLR9 ve IRAK4 seviyelerinin belirlenmesi için Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile İnsan Elisa Kitleri kullanılmıştır.

TLR9 ve IRAK4 Elisa Kit Protokolü

Her iki kit protokolü içinde;

1. Öncelikle standart, kör ve numune için kuyucuklar belirlendi. Ardından her kuyucuğa dilüsyonların her birinden 100µL eklenip plaka kapatıcı ile kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Her kuyunun sıvısı çıkarılıp, yıkanmadan 100µL Detection Reagent A solüsyonu eklenerek plaka kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Aspire edip her kuyucuk 350µL Wash Solution (Yıkama Solüsyonu) ile 3 defa tamamen yıkandı. Son yıkamadan sonra plaka ters çevrilerek iyice kurulandı.
4. Tekrardan bu kez kuyucuklara 100µL hazırlanmış Detection Reagent B solüsyonu eklenerek plaka kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Aspirasyon/yıkama işleminin tekrarı adım 3'te olduğu gibi yapıldı.
6. Her bir kuyucuğa 90µL Substrat Solüsyonu eklendi ardından sıvıların mavi renge döndüğü görüldü. Bu işlem 37°C'de 30 dakikayı geçmeyecek şekilde ışıktan koruyarak yapıldı.
7. Son olarak her bir kuyucuğa 50µL Stop Solüsyonu eklenerek sıvının içerisindeki renk değişiminin iyice karışmasını sağladıktan sonra son halinin sarı olduğu gözlemlendi. Ardından plaka okuyucu spektrofotometre yardımıyla 450 nm'de ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.9 IRAK4 elisa kitindeki belirgin renk değişimi

3.2.4 İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için IBM SPSS(Statistical Package for Social Sciences) Statistics 29 programından yararlanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde; sayısal (niceliksel) veriler için ortalama, standart sapma, en büyük-en küçük değer gibi tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. Kategorik (niteliksel) veriler için frekans (sıklık) ve yüzde değerlerinin yer aldığı frekans tablolarından yararlanılmıştır. Kategorik değişkenlerin birbirine göre değişimini incelemek için çapraz tablolar ile ki-kare testleri kullanılmıştır. Ki-kare testlerinden Pearson ki-kare ile Fisher Exact testi değerleri yorumlanmıştır. Phi ve Cramer V ilişki katsayıları ile kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin derecesi hesaplanmıştır. Sayısal değişkenlerin gruplar arasındaki farklılığını göstermek için öncelikle Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile normal dağılıma uygunluk, Levene testi ile varyans homojenliği varsayımları test edilmiştir. Normal dağılıma sahip verilerde bağımsız iki örneklem t-testi (Independent- Samples T Test) yapılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan verilerde Mann-Whitney U testi yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda NSCLC ile kontrol grubu arasında gen varyasyonları yüzde (%) değerleri ve istatistik sonuçları verilmiştir.

Çalışmamızda immün modülasyonda ve inflamatuvar yolda önemli görevleri olan TLR9 ve IRAK4 promotör gen bölgeleri akciğer kanser riski ile ilişkili olarak değerlendirilmiş ve serum protein seviyeleri ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, istatistiksel anlamlılıkları belirtilerek tablo olarak bu bölümde sunulmuştur.

Çalışmamıza NSCLC tanısı almış 45 gönüllü birey ile herhangi bir patolojiye sahip olmayan 45 gönüllü birey dahil edilmiştir. NSCLC grubundaki gönüllülerin 6'sı kadın (%13,3) 39'u erkek (%86,6) bireylerden; kontrol grubundaki gönüllülerin 8'i kadın (%17,8) 37'si erkek (%82,2) bireylerden oluşmaktadır.

4.1 TLR9 GEN VARYAN TLARI

TLR9 geni promotör bölgede belirlenen varyasyon farklılıkları hasta ve kontrol bireyler için karşılaştırmış olup veriler Tablo 4.1’ de sunulmuştur.

Çalışmamızda TLR9 bölgesi için NCBI üzerinde herhangi bir erişim numarasına (accession number) sahip tanımlanmış olan varyasyon bulunmamıştır. Diğer varyasyonlar için herhangi bir erişim numarası tanımlanmamış olup bu bölgeler pozisyonlarındaki baz değişimleri ile ifade edilmiştir.

Tablo 4.1 TLR9 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi

TLR9 Varyasyonları	Kontrol	Hasta	İstatistik
1620.pozisyon (delesyon)	0 (%0)	10 (%77,8)	$\chi^2 = 11\ 256$ $p = 0,01$
(G aleli)	45 (%100)	35 (%22,2)	
2506.pozisyon (delesyon)	0 (%0)	23 (%51,1)	$\chi^2 = 30\ 896$ $p < 0,001$
(delesyon)	45 (%100)	22 (%48,9)	
2504.pozisyon (delesyon)	0 (%0)	9 (%20)	$\chi^2 = 10\ 000$ $p = 0,002$
(delesyon)	45 (%100)	36 (%80)	
1618. pozisyon (A aleli)	0 (%0)	8 (%17,8)	$\chi^2 = 8\ 780$ $p = 0,003$
(C aleli)	45 (%100)	37 (%82,2)	
1615.pozisyon(insersiyon)	0 (%0)	7 (%15,6)	$\chi^2 = 7\ 590$ $p = 0,006$
(T aleli)	45 (%100)	38 (%84,4)	
9254. pozisyon (delesyon)	19 (%42,2)	0 (%0)	$\chi^2 = 24\ 085$ $p < 0,001$
(T aleli)	26 (%57,8)	45 (%100)	
9261. pozisyon (delesyon)	13 (%28,9)	0 (%0)	$\chi^2 = 15\ 195$ $p < 0,001$
(G aleli)	32 (%71,1)	45 (%100)	

Akciğer kanserli bireylerde, 1618. pozisyonda C/A değişimi 8 hastada (%17,8) belirlenirken, 7 hastada (%15,6) 1615. pozisyonda T aleli yerine insersiyon belirlendi ($p = 0,003$ ve $p = 0,006$). Benzer şekilde 1620. pozisyon, 2506. pozisyon ve 2504. pozisyondaki delesyon kontrol bireylerde bulunmazken; 1620. pozisyon için 10 (%77,8) hasta, 2506. pozisyon için 23 (%51,1) hasta, 2504. pozisyon için 9 (%20) hasta bu delesyona sahipti (sırasıyla $p = 0,01$, $p < 0,001$ ve $p = 0,002$).

Kontrol grubunda ise 19 (%42,2) bireyde 9254. pozisyonda T aleli yerine delesyon ve 13 (%28,9) bireyde 9261. pozisyonda G aleli yerine delesyon belirlenmiş olup bu delesyonlar hastalarda bulunmamaktaydı ($p < 0,001$).

4.2 IRAK4 GEN VARYANLARI

IRAK4 geni promotör bölgede belirlenen varyasyon farklılıkları hasta ve kontrol bireyler için karşılaştırmış olup veriler Tablo 4.2’de sunulmuştur.

IRAK4 bölgesi için varyasyon farklılığı belirlediğimiz bölgeler içinde rs1253567278 ve rs1265504993 varyantları NCBI üzerinde tanımlıydı. Diğer varyasyonlar için herhangi bir erişim numarası (accession number) tanımlanmamış olup bu bölgeler pozisyonlarındaki baz değişimleri ile ifade edilmiştir.

NCBI üzerinde tanımlı olan rs1253567278 polimorfizminde A/G değişimi 45 NSCLC hastanın 14’ünde (%31,1) belirlenirken kontrol bireylerin hiçbiri bu varyasyona sahip değildi ($p < 0,001$). rs1265504993 polimorfizminde ise T aleli yerine delesyon belirlenmiştir. Bu varyasyon 45 NSCLC hastanın 15’inde (%33,3) belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Akciğer kanserli bireylerde, 32877. pozisyon ve 32937.pozisyondaki G/T değişimi, 32899. pozisyondaki T/A değişimi 45 NSCLC hastanın 8’inde (%17,8) belirlenirken kontrol bireyler bu varyasyona sahip değildi ($p = 0,03$). 32.845. pozisyonda T/C değişimi 45 NSCLC hastanın 11’inde (%24,4) belirlenirken kontrol bireylerde bu değişim belirlenmemiştir ($p < 0,001$). 32781. pozisyondaki T/G değişimi 45 NSCLC hastanın 7’sinde (%17,8) belirlenirken, 32792. pozisyondaki C/T değişimi 45 NSCLC hastanın 9’unda (%20) belirlenmiştir ($p = 0,03$ ve $p = 0,02$).

Kontrol bireylerde ise 32680. pozisyon, 32687.pozisyon ve 32692. pozisyondaki A yerine delesyon oluşumu belirlenirken akciğer kanserli bireylerin hiçbiri bu varyasyona sahip değildi

($p < 0,001$). 32680. pozisyon için 23 (%51,1) kontrol, 32687.pozisyon için 37 (%82,2) kontrol ve 32692. pozisyon için 5 (%11,1) kontrol bu delesyona sahipti ($p < 0,001$).

Benzer şekilde 33071. pozisyon ve 33073. pozisyondaki T/A değişimi akciğer kanserli bireylerde bulunmazken; 33071. pozisyon ve 33073. pozisyon için 5 (%11,1) kontrolde bu değişim belirlendi ($p = 0,021$). Kontrol grubunda 11 (%24,4) bireyde 33075. pozisyonda insersiyon belirlenmiştir , bu insersiyonlar hastada bulunmamaktadır ($p < 0,001$).

Tablo 4.2 IRAK4 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi

IRAK4 Varyasyonları	Kontrol	Hasta	P değeri
32768- 3769- 32770. pozisyonlarında (AAG alelleri)	0 (%0)	4 (%8,9)	$\chi^2 = 4 186$ $p = 0,41$
(CTT alelleri)	45 (%100)	41 (%91,1)	
32773. pozisyon (G aleli)	0 (% 0)	7 (%15,6)	$\chi^2 = 7 590$ $p = 0,06$
(A aleli)	45 (%100)	38 (%84,4)	
32781. pozisyon (G aleli)	0 (%0)	7 (%17,8)	$\chi^2 = 8780$ $p = 0,03$
(T aleli)	45 (%100)	38 (%82,2)	
32784. pozisyon rs1253567278 (G aleli)	0 (%0)	14 (%31,1)	$\chi^2 = 16 579$ $p < 0,001$
(A aleli)	45 (%100)	31 (%68,9)	
32788. pozisyon rs1592268468 (C aleli)	0 (% 0)	6 (% 13,3)	$\chi^2 = 6 429$ $p = 0,11$
(G aleli)	45 (%100)	39 (% 86,7)	
32792. pozisyon (T aleli)	0 (%0)	9 (%20)	$\chi^2 = 10 000$ $p = 0,02$
(C aleli)	45 (% 100)	36 (%80)	
32811. pozisyon rs1942248030 (A aleli)	0 (% 0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5 294$ $p = 0,21$
(C aleli)	45 (% 100)	40 (%88,9)	
32818. pozisyon rs1372373984 (G aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6 429$ $p = 0,11$
(A aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	
32845. pozisyon (C aleli)	0 (%0)	11 (%24,4)	$\chi^2 = 12 532$ $p < 0,001$
(T aleli)	45 (%100)	34 (%75,6)	
32862. pozisyon rs1167135816 (G aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6 429$ $p = 0,11$
(C aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	

Tablo 4.2 (Devam) IRAK4 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi

32856. pozisyon rs1167135816, rs886049388 (T aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6,429$ $p = 0,11$
(C aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	
33868. pozisyon rs1942252582, rs1565690130 (A aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6,429$ $p = 0,11$
(C aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	
330871. pozisyon rs1565690140 (A aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6,429$ $p = 0,11$
(G aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	
32877. pozisyon (T aleli)	0 (%0)	8 (%17,8)	$\chi^2 = 8,780$ $p = 0,03$
(G aleli)	45 (%100)	37 (%82,2)	
32880. pozisyon (G aleli)	0 (%0)	6 (%13,3)	$\chi^2 = 6,429$ $p = 0,11$
(T aleli)	45 (%100)	39 (%86,7)	
32882-32883. pozisyonları rs159226875 (AA alelleri)	0 (%0)	7 (%17,8)	$\chi^2 = 7,590$ $p = 0,06$
(TT alelleri)	45 (%100)	38 (%82,2)	
32889. pozisyon (C aleli)	0 (%0)	7 (%17,8)	$\chi^2 = 6,429$ $p = 0,11$
(A aleli)	45 (%100)	38 (%82,2)	
32897.pozisyon (A aleli)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5,294$ $p = 0,21$
(T aleli)	45 (%100)	40 (%88,9)	
32899.pozisyon (A aleli)	0 (%0)	8 (%17,8)	$\chi^2 = 8,780$ $p = 0,03$
(T aleli)	45 (%100)	37 (%82,2)	
32925.pozisyon rs899116917 (A aleli)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5,294$ $p = 0,21$
(T aleli)	45 (%100)	40 (%88,9)	

Tablo 4.2 (Devam) IRAK4 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi

32934.pozisyon (T aleli)	0 (%0)	7 (%17,8)	$\chi^2 = 7.590$ $p = 0,06$
(A aleli)	45 (%100)	38 (%82,2)	
32935.pozisyon (T aleli)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5.294$ $p = 0,21$
(G aleli)	45 (%100)	40 (%88,9)	
32937.pozisyon (T aleli)	0 (%0)	8 (%17,8)	$\chi^2 = 8.780$ $p = 0,03$
(G aleli)	45 (%100)	37 (%82,2)	
32940.pozisyon (C aleli)	0 (%0)	7 (%17,8)	$\chi^2 = 7.590$ $p = 0,06$
(A aleli)	45 (%100)	38 (%82,2)	
32969.pozisyon (T aleli)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5.294$ $p = 0,21$
(G aleli)	45 (%100)	40 (%88,9)	
32946.pozisyon rs1942258003 (A aleli)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5.294$ $p = 0,21$
(T aleli)	45 (%100)	40 (%88,9)	
32989-32990.pozisyon (TT alelleri)	0 (%0)	5 (%11,1)	$\chi^2 = 5.294$ $p = 0,21$
(AG alelleri)	45 (%100)	40 (%88,9)	
33033. pozisyon rs1265504993 (delesyon)	0 (%0)	15 (%33,3)	$\chi^2 = 18.000$ $p < 0,001$
(T aleli)	45 (%100)	30 (%66,7)	
32680. pozisyon (delesyon)	23 (%51,1)	0 (%0)	$\chi^2 = 30.896$ $p < 0,001$
(A aleli)	22 (%48,9)	45 (%100)	

Tablo 4.2 (Devam) IRAK4 varyantlarının kontrol ve hastadaki dağılımı ve istatistiksel analizi

32687. pozisyon (delesyon)	37 (%82,2)	0 (%0)	$\chi^2 = 62\ 830$ $p < 0,001$
(A aleli)	8 (%17,8)	45 (%100)	
32692. pozisyon (delesyon)	5 (%11,1)	0 (%0)	$\chi^2 = 72\ 000$ $p < 0,001$
(A aleli)	40 (%88,9)	45 (%100)	
33075. pozisyon (insersiyon) (A aleli)	11 (%24,4)	0 (%0)	$\chi^2 = 12\ 535$ $p < 0,001$
	34 (%75,6)	45 (%100)	
33071. pozisyon (A aleli)	5 (%11,1)	0 (%0)	$\chi^2 = 5\ 294$ $p = 0,021$
(T aleli)	40 (%88,9)	45 (%100)	
33073. pozisyon (A aleli)	5 (%11,1)	0 (%0)	$\chi^2 = 5\ 294$ $p = 0,021$
(T aleli)	40 (%88,9)	45 (%100)	

4.3 TLR9 VE IRAK4 SERUM PROTEİN SEVİYELERİ

Çalışmamızda IRAK4 ve TLR9 serum protein seviyeleri belirlenmiş ve akciğer kanseri riski için değerlendirilmiş olup bulgularımız Tablo 4.3’de sunulmuştur.

Kontrol ve akciğer kanserli hastaların serum TLR9 seviyeleri karşılaştırıldığında hasta ve kontrol bireyler arasında fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

IRAK4 serum seviyeleri ise kontrol bireylerde akciğer kanserli hastalara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p = 0,004$).

Tablo 4.3 TLR9 ve IRAK4 serum protein seviyeleri

Protein	Kontrol (n=45)	Akciğer Kanseri (n=45)	İstatistik
TLR9 (ng/ml)	0,952 ± 0,858	0,610 ± 0,430	$p = 0,066$
IRAK4 (ng/ml)	8,393 ± 4,439	6,146 ± 3.152	$p = 0,004$

Çalışmamız kapsamında belirlediğimiz tüm varyasyonlar ile serum protein seviyeleri değerlendirilmiş olup yalnızca akciğer kanserli hastalarda IRAK4 32880. pozisyonundaki bölgede bulunan T/G polimorfizmi ile IRAK4 serum seviyesi arasında fark bulunmuştur ($p=0,004$). Bu varyasyona sahip olmayan akciğer kanseri hastalarında IRAK4 serum seviyesi yüksek çıkmıştır. Diğer IRAK4 varyasyonları ile IRAK4 seviyesi ve TLR9 varyasyonları ile TLR9 seviyesi arasında fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

5.TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında TLR9 ve IRAK4 gen varyantlarının akciğer kanseri arasındaki ilişki araştırılmış olup TLR9 ve IRAK4 genleri üzerindeki gen varyasyonları ile TLR9 ve IRAK4 serum seviyelerinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler bu bölümde tartışılacaktır.

Literatür değerlendirmesi sonucunda araştırmamız kapsamında belirlediğimiz varyasyonlar ile kanser veya akciğer kanseri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle TLR9 ve IRAK4 gen varyasyonları ile kanser ve inflamatuvar süreçler ile ilgili literatür bilgisi değerlendirilmiştir.

TLR9 ve TLR2 gen polimorfizmlerinin rahim ağzı kanseri ile ilişkisinin değerlendirildiği bir meta analiz çalışmasında TLR9 1486 C/T ve G2848A varyasyonlarının rahim ağzı kanseri riski üzerinde ırka özgü etkilerinin olduğu bulunmuştur. TLR9 1486 C/T polimorfizmi, beyaz ırkta rahim ağzı kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilirken, Asyalı ve Karma bireylerde rahim ağzı kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. TLR9 G2848A polimorfizmi ise beyaz ırkta rahim ağzı kanseri riski ilişkili bulunurken Asyalı ve Karma bireylerde anlamlı korelasyon belirlenmemiştir (Yang et al., 2020).

Wan ve arkadaşlarının yaptığı meta-analiz çalışmasında; TLR9 rs187084 polimorfizminin, beyaz ırkta artan rahim ağzı kanser riskiyle ilişkili olduğu ve TLR9 rs5743836 polimorfizminin ise sindirim sistemi kanserlerinin gelişimine karşı koruyucu rol oynadığını gösterilmiştir (Wan et al., 2014).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı 43 farklı çalışmayı temel alan geniş çaplı meta-analiz çalışmasında yaklaşık olarak 14.000 hasta verisi değerlendirilmiş ve TLR9 gen varyantların TLR9 mRNA'sı üzerine etkili olabileceği belirlenmiştir. Bu varyantların çeşitliliğinin artması ile vücuttaki akut inflamasyonun kronik inflamasyona dönüşebileceği ve sonucunda rahim ağzı kanser riskini artıran patojen lezyonların ve kötü huylu tümör oluşumuna neden olabileceği rapor edilmiştir (Zhang et al., 2013).

Yapılan başka bir çalışmada TLR 9 gen varyantlarından TLR9 rs187084 ve rs352140, direkt olarak rahim ağzı kanseri ile ilişkilendirilmiş olup bağdaştırılmıştır bu sonuç başka çalışmalarla desteklenmiş ve diğer kanser çeşitleri ile bağdaştırılmıştır (Roszak et al., 2012). Tian ve arkadaşlarının yaptığı meta analiz çalışmasında TLR9 geninin rs187084 varyantında C allellerinde dominant ve heterozigot modeller rahim ağzı kanseri ile ilişkilendirilirken TLR9 geninin bir başka varyantı olan rs352140 varyantında servikal kanser arasında ilişki bulunmamış ve bu çalışmanın sonucunda servikal kanser riski ile TLR9 genini direkt olarak ilişkilendirmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu rapor edilmiştir (Tian et al., 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle rs352140 varyasyonuna sahip bireylerin doğuştan gelen bağışıklık reaksiyonlarının ve inflamatuvar süreçlerin etkilenebileceği, bununla birlikte bu varyasyonun lenfoma çeşitlerinin oluşumuna direkt olarak sebep olabileceği bildirilmiştir. Lenfoma oluşumlarının TLR9 varyantları ile direkt olarak ilişkili olduğunu gösteren çalışmalardan birinin genotipleri incelemiş ve bunun sonucunda TLR9 varyantlarının hastalarda inflamasyon ve bağışıklık süreçlerinde önemli ölçüde etkili olduğunu, TLR9 varyantlarının bağışıklık sisteminin davranışlarını doğrudan etkilediğini, patojen yani hastalık yapıcı hücrelerin proliferasyonunu desteklediğini, hücrel enfeksiyonlara sebep olduğunu ve bununla birlikte Hodgkin's Lenfoma hastalığına neden olduğu belirtilmiştir (Mollaki et al., 2009). Lenfoma kanser çeşitleri ile ilgili çalışmalar demografik olarak Asya ülkelerinde yapılmış ve çoğunluklu olarak Kafkas bireyler çalışmalara dahil edilmiş olup, in vitro model çalışmalarda Burkitt lenfomaya sahip bireylerde sağlıklı hücrelerin ölümlerine sebebiyet verdiği ve spesifik inhibitörlerin TLR9 varyantlarında baskılandığı gözlemlenmiştir (Noack et al., 2012). TLR polimorfizmlerinin endometriyal kanser ile ilişkisini inceleyen bir vaka kontrol çalışmasında, vakaların ve

kontrol grubundaki hastaların genotipleri ve haplotipleri karşılaştırılmış ve endometriyal kansere sahip bireylerde TLR9 rs187084 varyantı gözlemlenmiştir (Ashton et al., 2010). Kafkaslar üzerinde yapılan bir başka vaka kontrol çalışmasında meme kanseri ve TLR9 geni arasındaki ilişki araştırılmış, çalışma sonucunda TLR9 geninin ve bununla beraber başka varyantların meme kanseri ile direkt olarak ilişkili olmadığı bununla birlikte TLR9 varyantlarının immünolojik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Etokebe et al., 2009).

Hold ve arkadaşlarının, TLR9 varyantlarının malignan düzeyde gastrik değişikliklere sebep olduğunu belirledikleri çalışmalarından sonra mide kanseri ve TLR9 varyantlarının karsinomaya sebep olup olmadığını araştırmışlar ve ancak TLR9 geni ve mide kanseri arasında anlamlı bir ilişki bildirmemişlerdir (Hold et al., 2009).

TLR gen polimorfizmleri ve HPV enfeksiyonlarının değerlendirildiği geniş çaplı bir meta analiz çalışmasında TLR9 geni polimorfizmlerine sahip olan bireylerin TLR 2, TLR3 ve TLR4 varyasyonlarına göre daha fazla servikal kanseri riskine sahip olduğu rapor edilmiştir (Jin et al., 2017). Bu çalışmayı Çin de yapılan vaka – kontrol çalışması desteklemiş olup servikal kansere sahip olan Çinli kadınlarda TLR9 2848 GA varyasyonunun fazla olduğu fakat HPV16 ile bu varyasyon arasında bir korelasyon bulunmadığı belirtilmiş olup TLR9 polimorfizmleri servikal kanser ile ilişkilendirilmiştir (Lai et al., 2013).

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan vaka kontrol çalışmalarında periferik kan örnekleri alınıp TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR9 varyantları ile Epstein Barr virüsüne bağlı gastrit kanser riski arasındaki ilişki araştırılmış olup çalışma sonucunda TLR9'un rs187084 ve rs352140 varyantlarında hem genotip hem de allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlemlenmemiştir (Liu et al., 2015).

Yapılan bir başka vaka kontrol çalışmasında, TLR2, TLR4 ve TLR9 varyantlarının gastrik kanser üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırılmış ve çalışma sonucunda TLR9 rs352140 varyantına sahip bireyler ile *Helicobacter pylori* enfeksiyonu arasında bir ilişki belirlenmezken TLR9 rs352140 TT genotipi kronik gastrite sahip bireylerde daha yüksek oranlarda belirlenmiştir (Eed et al., 2020).

Akciğer kanseri hücrelerindeki TLR'ler hücre zarında veya sitoplazmada bulunur. Örneğin, TLR5'in akciğer kanseri hücrelerinin zarında, TLR4, 8 ve 9'un hücrelerin sitoplazmasında,

TLR7'nin ise çekirdek çevresinde eksprese olduğu belirlenmiştir (Gu et al., 2018). Zhang ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada, TLR4 ve TLR9'un akciğer kanseri hücrelerinde normal akciğer dokularındaki ifadesine kıyasla daha güçlü ifade edildiği gösterilmiştir (Zhang et al., 2009).

Samara ve ark.'ları yaptıkları çalışma endozomal TLR'lerin aktivasyonunun akciğer kanseri gelişiminde anahtar bir rol oynayabileceğini bildiren ilk çalışmadır. Bu çalışmanın bulguları, TLR 3, 7 ve 9'un kontrollere kıyasla NSCLC hastalarında aşırı eksprese olduğunu göstermiştir (Samara et al., 2012).

Yapılan bir başka akciğer kanseri çalışmasında NSCLC hastalarının metastaz görülme durumuna göre TLR9 ekspresyon seviyesinin değiştiği bildirilmiştir. TLR9'un metastazi olmayan NSCLC hastalarında metastazi olanlara kıyasla daha düşük eksprese edildiği ve bu nedenle akciğer kanseri ilerlemesi ve metastazi için TLR9'un potansiyel biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (Hoden et al., 2022).

Literatür verileri doğrultusunda TLR9'un farklı kanser türlerinin gelişiminde etkili olduğu görülmüş olup TLR9 varyantlarının kanser gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda TLR9 bölgesi için NCBI üzerinde tanımlı varyasyon bulunamamıştır. Erişim numarasına sahip olmayan aşağıdaki varyasyonlar ise sekans analizi sonucunda alel değişikliği belirlenen ve henüz tanımlanmamış varyasyonlar olup çalışmamız kapsamında ilk kez değerlendirilmiştir.

TLR9 bölgesinde 1620. pozisyon için 10 (%77,8) hasta, 2506. pozisyon için 23 (%51,1) hasta ve 2504. pozisyon için 9 (%20) hastanın G aleli yerine delesyona sahip olması kontrol grubu bireylerde hiç delesyonun bulunmaması akciğer kanseri riskine karşılık atasal alelin koruyuculuk kattığını ifade edebilir.

1618.pozisyonda C aleli yerine A gelmesi 45 NSCLC hastanın 8'inde (%17,8) belirlenirken, 7 hastada (%15,6) 1615. pozisyonda T aleli yerine insersiyon belirlendi ($p = 0,003$ ve $p = 0,006$). Bu durum akciğer kanseri riski ile değerlendirilebilir.

Kontrol grubunda ise 9254. Pozisyonda T aleli yerine delesyon 19 (%42,2) bireyde ve 13 (%28,9) bireyde 9261. pozisyonda G aleli yerine delesyon belirlenmiş olup bu

delesyonlar hastalarda bulunmaktaydı ($p < 0,001$). Bu durumda akciğer kanseri riskine karşı olan koruyuculuk olarak düşünülebilir. Belirlenen tüm TLR9 varyantları için kontrol ve akciğer kanserli hastalarda anlamlı fark belirlenmiştir. Bu varyantlar ile akciğer kanser riski arasında ilişki belirlenmemiş olmakla birlikte bu çalışmada akciğer kanseri ile ilişkili olabileceği öngörüşünde bulunmaktayız. Daha büyük popülasyon ve farklı inflamatuvar patolojiler dahilinde çalışılmasıyla anlamlı verilerin elde edilmesi mümkün olabilir.

Çalışmamız sonucunda kontrol ve akciğer kanserli hastaların serum TLR9 seviyeleri karşılaştırıldığında hasta ve kontrol bireyler arasında fark bulunmamıştır. TLR9 varyasyonları ile TLR9 serum seviyesi arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

Çalışmamız dahilinde akciğer kanseri ile ilişkisini araştırdığımız bir diğer gen IRAK4 olup IRAK4 geni immün düzenleme, inflamasyon, hücre çoğalması ve hücre sağ kalımı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir.

Araştırmamız kapsamında belirlediğimiz IRAK4 varyasyonları ile kanser veya akciğer kanseri ile ilgili çalışmaya rastlanmamış olmakla birlikte pankreas kanser hücrelerinde TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada IRAK4 ve TLR4 varyantlarının pankreatik duktal adenokarsinoma ile ilişkili olduğu ve IRAK4'ün kanser hücre çoğalması ve gelişmesi ile ilişkili olabileceği göstermiştir (Topcu et al., 2022).

Pankreatik adenokarsinoma üzerinde yapılmış çalışmada, IRAK4'ün inhibisyonunun NF- κ B aktivitesinin azalmasını böylece pankreatik hücrelerden salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin azalmasını ve sonuç olarak tümör oluşumlarının azalabileceği öne sürülmüştür (Zhang et al., 2017). Kronik inflamasyonların kanser hücrelerinin oluşumunu tetiklediği ve oluşumlarının artmasına sebep olduğu bilinmektedir. IRAK4, MyD88'e bağlı tüm NF- κ B aktivasyonlarında ve TLR 7, TLR8 ve TLR9'un indüklenmelerinde önemli rol oynar. Sonuç olarak IRAK4 regülasyonunun bozulması kanser hücrelerinin oluşumunu, tümör hücrelerinin gelişimine sebep olabileceği belirtilmektedir (Jain et al., 2014).

Melanom hücrelerinde fosforile IRAK4 ekspresyon düzeyi yüksektir (Srivastava et al., 2012).

Melanom hastalarında IRAK4, IRAK2 ve IRAK1'in aktivasyonları ile proinflamatuvar sitokinlerin proliferasyonu gerçekleşir ve inflamatuvar sinyaller düzenlenir (Kawagoe et al., 2008). IRAK4 'ün anormal derecede aktivasyonu inflamatuvar kemokin ve sitokin yolaklarının değişimini ve bununla birlikte B ve T hücrelerinin daha güçlü otoimmün cevaplarının oluşmasına yol açar (Flannery & Bowie, 2010).

Literatür verileri doğrultusunda IRAK4'ün farklı kanser türlerinin gelişiminde rol oynayabileceği görülmüş olup IRAK4 varyantlarının kanser gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da belirlenen 34 IRAK4 varyantından, 14'ünün kontrol bireylerinde ve akciğer kanserli hastalarda anlamlı fark belirlediği görülmüş olup bulgularımız literatür verileri ile uyumludur.

IRAK4 bölgesi için varyasyon farklılığı belirlediğimiz bölgeler içinde rs1253567278 ve rs1265504993 varyantları NCBI üzerinde tanımlıydı. Akciğer kanserli bireylerde rs1253567278 polimorfizminde A/G değişimi 45 NSCLC hastanın 14'ünde (%31,1) ve rs1265504993 polimorfizminde T aleli yerine delesyon belirlenmesi, 15'inde (%33,3) belirlenmiştir. Kontrol bireylerin hiçbiri bu 2 varyasyona sahip değildi ($p < 0,001$). Bu 2 varyasyon akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilebilir.

Benzer şekilde 32877.pozisyon ve 32937.pozisyonundaki G alelinin T aleline değişimi, 32899.pozisyonundaki T alelinin A aleline değişimi 45 NSCLC hastanın 8'inde (%17,8) belirlenirken kontrol grubu bireyler bu varyasyona sahip değildi. Akciğer kanseri riski ile değerlendirilebilir.

32845. pozisyonda T alelinin C aleline değişimi 45 NSCLC hastanın 11'inde (%24,4) belirlenirken kontrol bireylerde bu değişim belirlenmemiştir. T aleline sahip olmanın akciğer kanseri riskine karşı koruyuculuğu olduğunu düşündürmektedir.

32781. pozisyonda T alelinin G aleline değişimi 45 NSCLC hastanın 7'sinde (%17,8) belirlenirken, kontrol bireylerde bu değişim bulunmaz ve T aleline sahip olmanın akciğer kanseri riskine karşı koruyuculuğu olduğu düşünülmektedir.

32792. pozisyonda C alelinin T aleline değişimi 45 NSCLC hastanın 9'unda (%20) belirlenirken bu varyasyona kontrol bireyler sahip değildir. Bu nedenle akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilebilir.

Kontrol bireylerde ise 32680. pozisyon, 32687.pozisyon ve 32692. pozisyonundaki A yerine delesyon oluşumu belirlenirken akciğer kanserli bireylerin hiçbiri bu varyasyona sahip değildi. 32680. pozisyon için 23 (%51,1) kontrol, 32687. pozisyon için 37 (%82,2) kontrol ve 32692. pozisyon için 5 (%11,1) kontrol bu delesyona sahipti. Hasta bireylerde A alelinin bulunması akciğer kanseri riski ilişkili olabilir.

Benzer şekilde 33071. pozisyon ve 33073. pozisyonundaki T/A değişimi akciğer kanserli bireylerde bulunmazken; 33071. pozisyon ve 33073. pozisyon için 5 (%11,1) kontrolde bu değişim belirlendi. A alelinin saptanması kontrol bireyler için akciğer kanserine karşı bir koruyuculuk sağlayabilir.

Kontrol grubunda 11 (%24,4) bireyde 33075. pozisyonda insersiyon belirlenmiştir ,bu insersiyonlar hastada bulunmamaktadır. Kontrol bireyler için insersiyonun akciğer kanseri riskine karşı bir koruyuculuk etkisi gösterebildiğini düşündürmektedir.

IRAK4 serum seviyeleri ise kontrol bireylerde akciğer kanserli hastalara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p = 0,004$). Çalışmamız kapsamında belirlediğimiz tüm varyasyonlar ile serum protein seviyeleri değerlendirilmiş olup yalnızca akciğer kanserli hastalarda IRAK4 32880. pozisyonundaki bölgede bulunan T/G polimorfizmi ile IRAK4 serum seviyesi arasında fark bulunmuştur ($p = 0,004$). Bu varyasyonun belirlenmediği akciğer kanserli hastalarda IRAK4seviyesi anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Diğer IRAK4 varyasyonları ile IRAK4 seviyesi arasında fark bulunmamıştır ($p < 0,05$). IRAK4 seviyelerinin akciğer kanseri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ancak bu doğrultuda daha kapsamlı araştırmalar yapılmasıyla anlamlı veriler elde edilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri son yıllarda en ölümcül malignite olarak tanımlandı. Akciğer kanserinin 2 ana formundan biri olan NSCLC, moleküler ve genomik yollardaki çeşitli değişiklikler nedeniyle karmaşık bir malignite olarak kabul edilir.

Hayatta kalma şansını artırmak için erken teşhis çok önemlidir; ancak, NCSCLC için yüksek düzeyde duyarlı ve etkili bir biyobelirteç doğrulanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda akciğer kanseri taramasında kullanılabilmesi açısından spesifik ve erken olabilecek potansiyel biyobelirteç olabilecek TLR9 geni ve TLR9 sinyal yolağında yer alan, IRAK4 genini araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda belirlenen IRAK4 ve TLR9 varyantları çoğunlukla NCBI üzerinde tanımlı olmayan pozisyonlarına bağlı bazı değişimleri ile ifade ettiğimiz yeni tanımlanan varyantlardır. TLR9 varyantlarının tümü yeni tanımlanan varyantlar olup, bu varyantların tümü istatistiksel olarak anlamlı dağılım göstermiştir.

IRAK4 varyantlarından belirlenen akciğer kanserli hastaların sahip olduğu 2 varyasyon, rs1253567278 ve rs1265504993, NCBI üzerinde tanımlanmıştır. Değerlendirilen diğer varyasyonlar NSCLC hastalarında; 32877. pozisyon ve 32937. pozisyondaki G/T değişimi, 32899. pozisyondaki T/A değişimi, 32781. pozisyondaki T/G değişimi, 32792. pozisyondaki C/T değişimi ve 32845. pozisyonda T/C değişimi saptanmıştır. Kontrol bireylerde ise 32680. pozisyon, 32687. pozisyon ve 32692. pozisyondaki A yerine delesyon oluşumu, 33071. pozisyon ve 33073. pozisyondaki T/A değişimi, 33075. pozisyonda insersiyon belirlenmiştir, hastaların hiçbiri bu varyasyona sahip değildir.

Çalışmamızda belirlenen varyantlar ile daha öncesinde akciğer kanser riski arasında ilişki belirlenmemiş olmakla birlikte değerlendirmelerimize göre bu varyantlar akciğer kanser riski ile ilişkili olabilir. Serum seviyelerinin iki gende belirlenmesi sonucu; IRAK4 serum seviyeleri kontrol bireylerde akciğer kanserli hastalara göre anlamlı oranda yüksek bulunurken, TLR9 serum seviyeleri ile iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar akciğer kanseri ile TLR9 ve IRAK4 gen varyantlarının ilişkisinin araştırılacağı ilk çalışma olması nedeni ile literatüre önemli bir veri sağlayacağını öngörmekteyiz. İleride bu genlerle ilgili daha geniş popülasyonlara uyarlanabilen çalışmaların yapılması bu genlerin birçok hastalık üzerindeki etkisini ve hastalık riski taşıyan bireylerin belirlenmesinde önemli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Alzahrani, B. (2020). The biology of toll-like receptor 9 and its role in cancer. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 30(5).
- Ashkar, A. A., & Rosenthal, K. L. (2002). Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med*, 2(6), 545-556. <https://doi.org/10.2174/1566524023362159>
- Ashton, K. A., Proietto, A., Otton, G., Symonds, I., McEvoy, M., Attia, J., & Scott, R. J. (2010). Toll-like receptor (TLR) and nucleosome-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *BMC Cancer*, 10, 382. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-382>
- Barton, G. M., Kagan, J. C., & Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature immunology*, 7(1), 49-56.
- Behzadi, P., Garcia-Perdomo, H. A., & Karpinski, T. M. (2021). Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res*, 2021, 9914854. <https://doi.org/10.1155/2021/9914854>
- Berghofer, B., Frommer, T., Konig, I. R., Ziegler, A., Chakraborty, T., Bein, G., & Hackstein, H. (2005). Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy*, 35(9), 1147-1154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02325.x>
- Bezemer, G. F. G., & Garssen, J. (2020). TLR9 and COVID-19: A Multidisciplinary Theory of a Multifaceted Therapeutic Target. *Front Pharmacol*, 11, 601685. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.601685>
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-315.
- Boehme, K. W., & Compton, T. (2004). Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology*, 78(15), 7867-7873.
- Chaturvedi, A., & Pierce, S. K. (2009). How location governs Toll-like receptor signaling. *Traffic*, 10(6), 621-628.
- Chuang, Y. C., Tseng, J. C., Huang, L. R., Huang, C. M., Huang, C. F., & Chuang, T. H. (2020). Adjuvant Effect of Toll-Like Receptor 9 Activation on Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade. *Front Immunol*, 11, 1075. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01075>
- Collins, L. G., Haines, C., Perkel, R., & Enck, R. E. (2007). Lung cancer: diagnosis and management. *American family physician*, 75(1), 56-63.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- Crusz, S. M., & Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: advances and new agents. *NatRev Clin Oncol*, 12(10), 584-596. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105>
- de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., & Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational lung cancer research*, 7(3), 220.
- Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A. J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., & Goldmann, T. (2005). Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respiratory research*, 6, 1-10.

- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*,
- Eed, E. M., Hawash, Y. A., Khalifa, A. S., Alsharif, K. F., Alghamdi, S. A., Almalki, A. A., Almeahmadi, M. M., Ismail, K. A., Taha, A. A., & Saber, T. (2020). Association of toll-like receptors 2, 4, 9 and 10 genes polymorphisms and Helicobacter pylori-related gastric diseases in Saudi patients. *Indian journal of medical microbiology*, 38(1), 94-100.
- Etokebe, G. E., Knežević, J., Petričević, B., Pavelić, J., Vrbanec, D., & Dembić, Z. (2009). Single-nucleotide polymorphisms in genes encoding toll-like receptor-2,-3,-4, and-9 in case-control study with breast cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(6),729-734.
- Flannery, S., & Bowie, A. G. (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochemical pharmacology*, 80(12), 1981-1991.
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 95-112.
- Gu, J., Liu, Y., Xie, B., Ye, P., Huang, J., & Lu, Z. (2018). Roles of toll-like receptors: From inflammation to lung cancer progression. *Biomedical reports*, 8(2), 126-132.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Hoden, B., DeRubeis, D., Martinez-Moczygemba, M., Ramos, K. S., & Zhang, D. (2022). Understanding the role of Toll-like receptors in lung cancer immunity and immunotherapy. *Front Immunol*, 13, 1033483.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1033483>
- Hold, G. L., Rabkin, C. S., Gammon, M. D., Berry, S. H., Smith, M. G., Lissowska, J., Risch, H. A., Chow, W.-H., Mowat, N. A. G., & Vaughan, T. L. (2009). CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 18(2), 117.
- Ito, T., Amakawa, R., & Fukuhara, S. (2002). Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Human immunology*, 63(12), 1120- 1125.
- Jain, A., Kaczanowska, S., & Davila, E. (2014). IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol*, 5, 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00553>
- Jin, Y., Qiu, S., Shao, N., & Zheng, J. (2017). Association of toll-like receptor gene polymorphisms and its interaction with HPV infection in determining the susceptibility of cervical cancer in Chinese Han population. *Mamm Genome*, 28(5-6), 213-219. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9691-x>

- Jobbágy, V., Altitzoglou, T., Malo, P., Tanner, V., & Hult, M. (2017). A brief overview on radon measurements in drinking water. *Journal of environmental radioactivity*, 173, 18-24.
- Jouhi, L., Renkonen, S., Atula, T., Makitie, A., Haglund, C., & Hagstrom, J. (2014). Different Toll-Like Receptor Expression Patterns in Progression toward Cancer. *Front Immunol*, 5, 638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00638>
- Kaczanowska, S., Joseph, A. M., & Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 93(6), 847-863. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012501>
- Kaisho, T., & Akira, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol*, 22(2), 78-83. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(00\)01811-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01811-1)
- Karapetyan, L., Luke, J. J., & Davar, D. (2020). Toll-like receptor 9 agonists in cancer. *OncoTargets and therapy*, 10039-10060.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature immunology*, 9(6), 684-691.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 816-825. Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, 21(4), 317-337.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461.
- Keibel, A., Singh, V., & Sharma, M. C. (2009). Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des*, 15(17), 1949-1955. <https://doi.org/10.2174/138161209788453167>
- Konat, G. W. (2008). Signaling by toll-like receptors.
- Krieg, A. M. (2008). Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*, 27(2), 161-167.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced drug delivery reviews*, 60(7), 795-804.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
- Kutikhin, A. G. (2011). Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Human immunology*, 72(11), 1095-1116.
- Lai, Y. H., Liu, H. Y., Huang, C. Y., Chau, Y. P., & Wu, S. (2019). Mitochondrial-DNA-associated TLR9 signalling is a potential serological biomarker for non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 41(2), 999-1006.
- Lai, Z. Z., Ni, Z., Pan, X. L., & Song, L. (2013). Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer. *J Int Med Res*, 41(4), 1027-1036. <https://doi.org/10.1177/0300060513483398>
- Langevin, S. M., Kratzke, R. A., & Kelsey, K. T. (2015). Epigenetics of lung cancer. *Translational Research*, 165(1), 74-90.

- Li, D., & Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 291.
- Li, Q., Chen, Y., Zhang, D., Grossman, J., Li, L., Khurana, N., Jiang, H., Grierson, P. M., Herndon, J., & DeNardo, D. G. (2019). IRAK4 mediates colitis-induced tumorigenesis and chemoresistance in colorectal cancer. *JCI insight*, 4(19).
- Liu, S., Wang, X., Shi, Y., Han, L., Zhao, Z., Zhao, C., & Luo, B. (2015). Toll-like receptor genepolymorphisms and susceptibility to Epstein–Barr virus-associated and-negative gastric carcinoma in Northern China. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 21(2), 95.
- Martín-Medina, A., Cerón-Pisa, N., Martínez-Font, E., Shafiek, H., Obrador-Hevia, A., Sauleda, J., & Iglesias, A. (2022). TLR/WNT: a novel relationship in immunomodulation of lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6539.
- Minna, J. D., Roth, J. A., & Gazdar, A. F. (2002). Focus on lung cancer. *Cancer cell*, 1(1), 49- 52.
- Mollaki, V., Georgiadis, T., Tassidou, A., Ioannou, M., Daniil, Z., Koutsokera, A., Papatheanassiou, A. A., Zintzaras, E., & Vassilopoulos, G. (2009). Polymorphisms and haplotypes in TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's lymphoma: a candidate-gene association study. *J Hum Genet*, 54(11), 655-659. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.90>
- Mukherjee, S. (2010). *The emperor of all maladies: a biography of cancer*. Simon and Schuster.
- Mullard, A. (2020). IRAK4 degrader to take on innate immunity. *Nat Biotechnol*, 38(11), 1221-1223. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0724-8>
- Munn, L. L. (2017). Cancer and inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 9(2), e1370.
- Noack, J., Jordi, M., Zauner, L., Alessi, D., Burch, A., Tinguely, M., Hersberger, M., Bernasconi, M., & Nadal, D. (2012). TLR9 agonists induced cell death in Burkitt's lymphoma cells is variable and influenced by TLR9 polymorphism. *Cell Death Dis*, 3(6), e323. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.60>
- ÖZBAYER, C., KURT, H., & Yangi, B. (2014). Genetic variants of TLR4 and TLR4 signal pathway and its association with insulin resistance and diabetes risk. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(2).
- Pandolfi, F., Altamura, S., Frosali, S., & Conti, P. (2016). Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. *Clinical therapeutics*, 38(5), 1017-1028.
- Picard, C., von Bernuth, H., Ku, C. L., Yang, K., Puel, A., & Casanova, J. L. (2007). Inherited human IRAK-4 deficiency: an update. *Immunol Res*, 38(1-3), 347-352. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0006-2>
- Piccinini, A., & Midwood, K. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation*, 2010.
- Pinto, A., Morello, S., & Sorrentino, R. (2011). Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60, 1211-1220.
- Rhyasen, G., & Starczynowski, D. (2015). IRAK signalling in cancer. *British journal of cancer*, 112(2), 232-237.
- Rolfo, C., Giovannetti, E., Martinez, P., McCue, S., & Naing, A. (2023). Applications and clinical trial landscape using Toll-like receptor agonists to reduce the toll of cancer.

- NPJ Precis Oncol*, 7(1), 26. <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00364-1>
- Roszak, A., Lianeri, M., Sowińska, A., & Jagodziński, P. P. (2012). Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Molecular biology reports*, 39, 8425-8430.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford University Press.
- Samara, K. D., Antoniou, K. M., Karagiannis, K., Margaritopoulos, G., Lasithiotaki, I., Koutala, E., & Siafakas, N. M. (2012). Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *International journal of oncology*, 40(5), 1397-1404.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., & Hoon, D. S. (2009). Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer microenvironment*, 2, 205-214.
- Sawant, A., Schafer, C. C., Jin, T. H., Zmijewski, J., Tse, H. M., Roth, J., Sun, Z., Siegal, G. P., Thannickal, V. J., & Grant, S. C. (2013). Enhancement of antitumor immunity in lung cancer by targeting myeloid-derived suppressor cell pathways. *Cancer research*, 73(22), 6609-6620.
- Saydam, F., Değirmenci, İ., & Güneş, H. V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(1), 7-30.
- Srivastava, R., Geng, D., Liu, Y., Zheng, L., Li, Z., Joseph, M. A., McKenna, C., Bansal, N., Ochoa, A., & Davila, E. (2012). Augmentation of therapeutic responses in melanoma by inhibition of IRAK-1,-4. *Cancer Res*, 72(23), 6209-6216. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0337>
- Suzuki, N., & Saito, T. (2006). IRAK-4—a shared NF-κB activator in innate and acquired immunity. *Trends in immunology*, 27(12), 566-572.
- Takeda, K., & Akira, S. (2001). Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells*, 6(9), 733-742.
- Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., & Sirois, C. (2007). Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology*, 8(5), 487-496.
- Tian, S., Zhang, L., Yang, T., Wei, X., Zhang, L., Yu, Y., Li, Y., Cao, D., & Yang, X. (2018). The associations between toll-like receptor 9 gene polymorphisms and cervical cancer susceptibility. *Mediators of inflammation*, 2018.
- Topcu, K. S. B., Korucu, E. N., Menevse, E., Kocak, N., & Duran, T. (2022). Investigation of the effects of the toll-like receptor 4 pathway on immune checkpoint vista in pancreatic cancer. *Investigational New Drugs*, 40(3), 519-528.
- Tsim, S., O'dowd, C., Milroy, R., & Davidson, S. (2010). Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Respiratory medicine*, 104(12), 1767-1774.
- Turner, M. C., Krewski, D., Chen, Y., Pope III, C. A., Gapstur, S., & Thun, M. J. (2011). Radon and lung cancer in the American Cancer Society cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 20(3), 438-448.
- Urban-Wojciuk, Z., Khan, M. M., Oyler, B. L., Fahraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Nita-Lazar, A., Hupp, T. R., & Goodlett, D. R. (2019). The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection. *Front Immunol*, 10, 2388. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02388>

- Urban-Wojciuk, Z., Khan, M. M., Oyler, B. L., Fåhraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Nita-Lazar, A., Hupp, T. R., & Goodlett, D. R. (2019). The role of TLRs in anti-cancer immunity and tumor rejection. *Frontiers in immunology*, *10*, 2388.
- Villalobos, P., & Wistuba, I. I. (2017). Lung cancer biomarkers. *Hematology/Oncology Clinics*, *31*(1), 13-29.
- Vogeltanz-Holm, N., & Schwartz, G. G. (2018). Radon and lung cancer: What does the public really know? *Journal of environmental radioactivity*, *192*, 26-31.
- von Bernuth, H., Picard, C., Puel, A., & Casanova, J. L. (2012). Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*, *42*(12), 3126-3135. <https://doi.org/10.1002/eji.201242683>
- Wan, G.-X., Cao, Y.-W., Li, W.-Q., Li, Y.-C., Zhang, W.-J., & Li, F. (2014). Associations between TLR9 polymorphisms and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis of 25,685 subjects. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(19), 8279-8285.
- Wang, Z., Wesche, H., Stevens, T., Walker, N., & Yeh, W. C. (2009). IRAK-4 inhibitors for inflammation. *Curr Top Med Chem*, *9*(8), 724-737. <https://doi.org/10.2174/156802609789044407>
- Werling, D., Jann, O. C., Offord, V., Glass, E. J., & Coffey, T. J. (2009). Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol*, *30*(3), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.001>
- Wolska, A., Lech-Marañda, E., & Robak, T. (2009). Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *14*(2), 248-272.
- Yang, S., Liu, L., Xu, D., & Li, X. (2020). The Relationship of the TLR9 and TLR2 Genetic Polymorphisms with Cervical Cancer Risk: a Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Pathol Oncol Res*, *26*(1), 307-315. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0465-x>
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of cellular and molecular medicine*, *14*(11), 2592-2603.
- Zhang, D., Li, L., Jiang, H., Knolhoff, B. L., Lockhart, A. C., Wang-Gillam, A., DeNardo, D. G., Ruzinova, M. B., & Lim, K. H. (2017). Constitutive IRAK4 Activation Underlies Poor Prognosis and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, *23*(7), 1748-1759. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1121>
- Zhang, L., Qin, H., Guan, X., Zhang, K., & Liu, Z. (2013). The TLR9 gene polymorphisms and the risk of cancer: evidence from a meta-analysis. *PloS one*, *8*(8), e71785.
- Zhang, Y.-B., He, F.-L., Fang, M., Hua, T.-F., Hu, B.-D., Zhang, Z.-H., Cao, Q., & Liu, R.-Y. (2009). Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Molecular biology reports*, *36*, 1475-1481.

8.EKLER

8.1 ETİK KURUL İZİN BELGESİ

T.C
KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		TLR9 ve IRAK4 Genlerindeki Sekans Varyantların Akciğer Kanseri Riski ile İlişkisinin Belirlenmesi
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	KURUL ADRESİ	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Evliya Çelebi Yerleşkesi Tavşanlı Yolu 10. Km KÜTAHYA
	TELEFON	(0 274) 260 00 43 / 1115
	FAKS	(0 274) 265 22 85
	E-POSTA	_____
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Cansu ÖZBAYER
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji AD.
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	KSBÜ Temel Tıp Bilimleri Bölümü
	YARDIMCI ARAŞTIRMACI VE BÖLÜMÜ	Doç.Dr Ümran ERBAY- Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr.Öğr.Üyesi Şebnem Emine PARSPUR-: Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr.Öğr.Üyesi Özlem ARIK- Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyoistatistik Anabilim Dalı, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tuğçe Gül GÜNEY-: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	-Olgu-kontrol -Kan idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji, ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar - Gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olan genetik materyalle yapılacak çalışmalar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2021/15-31	Tarih: 11.11.2021
	Başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.	

KARAR FORMU

Prof.Dr. Duygu PERÇİN
RENDERS Etik Kurul
Başkanı

Tarih: 15.11.2021

8.2 GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Araştırma Projesinin Adı: TLR9 ve IRAK4 Genlerindeki Sekans Varyantların Akciğer Kanseri Riski ile İlişkisinin Belirlenmesi

Sorumlu Araştırmacının Adı: Doç.Dr. Cansu ÖZBAYER

Diğer Araştırmacıların Adı: Dr.Öğr. Üyesi Şebnem Emine PARSPUR

Doç.Dr Ümran ERBAY

Dr.Öğr.Üyesi Özlem ARIK

Tuğçe Gül GÜNEY

Destekleyici (varsa):

“TLR9 ve IRAK4 Genlerindeki Sekans Varyantların Akciğer Kanseri Riski ile İlişkisinin Belirlenmesi” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde akciğer kanseri hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında siz bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma Kütahya Sağlık Bilimler Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Ana bilim Dalında, Dr.Öğr. Üyesi Şebnem Emine PARSPUR ve Doç.Dr Ümran ERBAY sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu başlık altında aşağıdaki bilgiler yer almalıdır:

Çalışmanın amacı akciğer kanserinin erken tanısı veya potansiyel tedavi hedefi olabilecek mekanizmaların belirlenmesidir. Bu amaçla çalışmamızda inflamasyon ve diğer kanser ilişkili mekanizmalarda rol oynayan TLR9 ve IRAK4 genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya 90 kontrol 90 hasta birey katılacaktır.

Bu çalışmaya katılmamı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve siz çalışmaya dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?

Hastalığınız nedeni ile yapılan rutin tetkik ve tedavi işlemleriniz sırasında sizden alınan kan örneğinden TLR9 ve IRAK4 genleri ve bu genlerin proteinleri araştırılacaktır. Kan örneği dışında herhangi bir örnek alınmayacak olup herhangi bir riski bulunmamaktadır. Araştırma süresi bir yıl olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

Sadece kan örneği alınacak olup herhangi bir riski ve rahatsızlığı yoktur.

Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir?

Çalışmamız primer olarak toplumsal bir alanı hedeflememekle birlikte araştırma verilerimiz ile elde edilecek sonuçlar ile hastalığın erken teşhisi ve olası terapötik hedeflerin bulunması akciğer kanseri ile ilgili toplumsal fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Cansu ÖZBAYER
GÖREVI : Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Doç.Dr.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Ana bilim dalında, Dr. Dr.Öğr. Üyesi Şebnem Emine PARSPUR ve Doç.Dr Ümran ERBAY tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.Şebnem Emine PARSPUR ile iletişim kurabileceğimi ve Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda çalıştığını biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih: