

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LARİNKS KANSERİNDE KRAS-3'UTR-LCS6 VARYANTI
(RS61764370) İLE IL-6/JAK2/STAT3 SİNYAL YOLAĞI
ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Muhammed Burak KAPLAN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tülin ÇORA

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LARİNK KANSERİNDE KRAS-3'UTR-LCS6 VARYANTI
(RS61764370) İLE IL-6/JAK2/STAT3 SİNYAL YOLAĞI
ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Muhammed Burak KAPLAN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
22212031 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Tez danışmanlığımı üstlenen ve çalışmalarım süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yardımseverliği ve anlayışıyla her daim kolaylaştırıcı rol oynayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya;

Doktora eğitimim süresince her zaman desteğini gördüğüm, tıbbi genetik eğitimimden akademik gelişimime, tez projeme kadar her konuda fazlasıyla katkısı olan, çalışma ve öğrenme tutkusuyla ilham veren ve her daim baba şefkatiyle yaklaşan değerli hocam Prof. Dr. Hasan ACAR'a;

Eleştirel düşüncüyü, farklı açıdan bakmayı öğreten, öğrenme ve öğretme aşkıyla yanıp tutuşan hocam Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a;

Her zaman destek ve olumlu katkılarını sunan Dr. Öğr. Ü. Ebru MARZİOĞLU ÖZDEMİR, Dr. Öğr. Ü. Özkan BAĞCI ve Dr. Öğr. Gör. Süleyman NERGİZ'e;

Tez çalışmamda deneyleri gerçekleştirmemde desteklerini esirgemeyen, memleketinden uzak, bilim yolunda yıllarını geçiren Yemenli kardeşim Ali AZZAWRİ'ye; Real-time qPZR çalışmalarımdaya desteğini sunan M. Emin SARI'ya; bölümümüz eski ve yeni asistan ve yl/doktora öğrencilerine; ders ve çalışma arkadaşlarıma; bölümümüz tüm çalışanlarına;

İyi günümde benden fazla sevinen, kötü günümde benden fazla üzülen, her zaman şefkatiyle yaklaşan, hayat okulunda ilk öğretmenim, annem Em. Öğr. Naime KAPLAN'a; çocukluktan erişkinliğe her daim arkamda varlığını hissettiğim, bana güç veren, düzen ve disiplinli çalışmayı kendisinden öğrendiğim, babam Av. Maksut KAPLAN'a; zor dönemlerimde hep yanımda olan, desteklerini hep hissettiğim sevgili kardeşlerim Av. Beyza Nur KAPLAN ALTINDAĞ ve Dr. M. Berk KAPLAN'a;

Ve yıllardır benimle beraber sevinip benimle beraber üzülen, bana her zaman güvenen, doktoramı tamamlamam konusunda en büyük destekçim sevgili eşim Betül SAYGILI KAPLAN'a;

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
ZUSAMMENFASSUNG	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.1.1. Kanser ve Tarihçesi	1
1.1.2. Dünyada ve Ülkemizde Kanser	3
1.1.3. Kanserın Başlıca Nedenleri	7
1.1.4. Kanser ve Metastaz.....	9
1.1.5. Metastaz Sinyal Yolakları.....	11
1.2. Larinks.....	16
1.2.1. Larinks Kanseri.....	17
1.3. <i>KRAS</i> Geni.....	18
1.3.1. <i>KRAS</i> Gen Mutasyonları.....	20
1.3.2. <i>KRAS</i> -3'UTR-LCS6 Varyantı (rs61764370)	21
1.4. miRNA Let-7.....	22
1.5. Hipotez ve Çalışmanın Amacı.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1. Hücre Kültürü.....	25
2.2. <i>KRAS</i> Geninin HEp-2 Hücrelerine Transfeksiyonu	25
2.2.1. <i>KRAS</i> Plazmid Konstraktlarının Oluşturulması	26
2.2.2. Konstraktların 2A Hücrelerine Aktarılması.....	27
2.2.3. Konstraktların 2A Hücreleri Aracılığıyla HEp2 Hücrelerine Transfeksiyonu	28
2.2.4. Konstrakt İçeren HEp2 Hücrelerinin İsimlendirilmesi.....	29
2.3. Gen Ekspresyon Analizi.....	29
2.3.1. RNA İzolasyonu	30
2.3.2. RNA Miktarı ve Kalitesi.....	30
2.3.3. cDNA Eldesi	31
2.3.4. Primer Dizaynı ve Sulandırılması.....	32
2.3.5. Referans Gen Seçimi	32
2.3.6. Seri Sulandırma ve Primer Etkinliğinin Hesaplanması	33

2.3.7. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR/qPZR).....	34
2.3.8. Protein İzolasyonu	35
2.3.9. ELISA Analizi	36
2.4. İstatistiksel Analizler.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. Hücre Kültürü.....	38
3.2. <i>KRAS</i> Konstraktlarının Oluşturulması	38
3.3. Konstraktların HEp2 Hücrelerine Transfeksiyonu.....	39
3.4. UM-SCC-17A Hücre Hattı Bulguları	41
3.5. Hedef Genlerin Ekspresyon Analizleri	42
3.5.1. Real-Time qPZR Analizi	42
3.5.2. ELISA Analizi	49
4. TARTIŞMA.....	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
6. KAYNAKLAR.....	65
7. EKLER	70
EK-A: Etik Kurul Kararı	70
EK-B: <i>KRAS</i> Gen Dizisi	71
8. TURNİTİN RAPORU	73
9. ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

#	Numara
ACTB	β -aktin
AKT	AKT serin/treonin kinaz 1
B2M	β -2-mikroglobulin
BBK	Baş-boyun kanserleri
bp	Base pair, baz çifti
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence, kodlanan bölge
CO ₂	Karbon dioksit
Cq	Cycle of quantification
Ct	Cycle of threshold
ddH ₂ O	Double distilled water, bidistile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
gDNA	Genomik DNA
GFP	Green fluorescent protein
gp130	Glikoprotein 130 kDa
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
HEp2	Human Epidermoid carcinoma-2
HPRT1	Hypoksantin fosforiboziltransferaz 1
HPV	Human papilloma virus
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-6R	IL-6 reseptörü

İGE	İnsani Gelişme Endeksi
JAK2	Janus Kinaz 2
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCS6	let-7 complementary site 6
LCSs	let-7 complementary sites
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
mRNA	Mesajcı RNA
NF- κ B	Nüklear Faktör Kappa B
nM	Nanomolar
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate-buffered saline
pMol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
rpm	Rate per minute, dakikada dönme sayısı
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
RT	Revers transkripsiyon
RT-qPZR/qPZR	Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
sIL-6R	Soluble IL-6 reseptörü
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TH	Tümör hücreleri
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
UTR	Untranslated region, kodlanmayan bölge
UVR	Ultraviyole radyasyon

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Larinks Kanserinde KRAS-3'UTR-LCS6 Varyantı (rs61764370) ile IL-6/JAK2/STAT3 Sinyal Yolağı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Muhammed Burak KAPLAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2023

Baş-Boyun Kanseri (BBK) dünya genelinde en sık görülen 7. kanser türüdür. BBK'lar arasında ikinci sırada yer alan larinks kanseri, tüm kanser ölümlerinin %1,57'sinden sorumludur. Larinks kanserinde birçok farklı gende mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlilerinde biri *KRAS* gen mutasyonlarıdır. Bir onkogen olan *KRAS* geninin 3'UTR bölgesinde miRNA let-7'nin bağlanma bölgesi olan LCS6 (let-7 complementary site 6)'daki T>G nükleotid değişikliğinin (rs61764370), klinik çalışmalarda birçok kanserde; kanser gelişimini, tedaviye dirençliliği ve metastazı arttırdığı, bunun yanında hastalarda yaşam süresini (survival) azalttığı yönünde bulgular elde edilmiştir. Önceki projemizde, bu varyantın metastatik etkisi *in vitro* ve *in vivo* (xenograft fare deneyleri) deneyler ile araştırılmıştır. LCS6 varyantının larinks kanserinde tümör gelişimi ve metastazı arttırdığı, ancak bu etkiyi RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR yolakları üzerinden yapmadığı saptanmıştır. LCS6 varyantının bu etkisini hangi hücre içi yolak üzerinden gerçekleştirdiği halen bilinmemektedir.

Bu çalışmada ise larinks kanserinde, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının, bir diğer kanser metastaz yolağı olan IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine etkisi araştırıldı. Bunun için öncelikle KRAS-CDS-G12V mutasyonu ve KRAS-3'UTR-LCS6 varyantını içeren *KRAS* genleri, lentiviral yöntemle HEp2 hücrelerine transfekte edildi. Daha sonra bu hücrelerde IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı genleri RT-qPCR ile mRNA düzeyinde ve ELISA analizi ile protein düzeyinde ekspresyon analiz edildi. Elde edilen bulgulara göre; LCS6 varyantının *NF-κB*, *IL-6*, *STAT3* ekspresyonunu azalttığı, *JAK2* ve *AKT* ekspresyonunu ise değiştirmedeği tespit edildi. IL-6 proteini açısından ise LCS6 varyantı, total hücre proteininde IL-6 seviyesini azaltırken, hücre kültürü süpernatantında IL-6 seviyesini arttırdığı gözlemlendi. Bu durum, IL-6'nın pleiotropik etkisiyle uyumludur.

Sonuç olarak, LCS6 varyantının, metastatik etkisini oluştururken IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağını baskıladığı, PI3K/AKT/mTOR yolağını ise etkilemediği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı; KRAS-3'UTR-LCS6 varyantı; larinks kanseri; metastaz; rs61764370.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the Relationship Between KRAS-3'UTR-LCS6 Variant (rs61764370) and IL-6/JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Laryngeal Carcinoma

Muhammed Burak KAPLAN
Department of Medical Genetics

PhD THESIS / KONYA-2023

Head and neck cancer (HNC) is the seventh most common cancer worldwide. Laryngeal carcinoma, which is the second most common type of HNC, causes 1.57% of all cancer deaths. Numerous mutations have been identified in various genes in laryngeal carcinoma, and one of the most important ones is *KRAS* gene mutations. The T>G nucleotide change (rs61764370) in the let-7 complementary site 6 (LCS6) of the 3' untranslated region (UTR) of the *KRAS* gene, which is an oncogene, has been identified as a critical mutation in many cancers. It has been shown in clinical studies to promote cancer development, treatment resistance, and metastasis, while also reducing patient survival.

In our previous project, the metastatic effect of this variant has been investigated through *in vitro* and *in vivo* (xenograft mouse models) experiments. It has been found that the LCS6 variant increases tumor development and metastasis in laryngeal carcinoma, but this effect is not mediated through the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways. The intracellular pathway through which the LCS6 variant exerts its metastatic effect is still unknown.

In this study, the effect of the KRAS-3'UTR-LCS6 variant on the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway, another cancer metastasis pathway, was investigated in laryngeal carcinoma. For this purpose, *KRAS* genes containing the KRAS-CDS-G12V mutation and the KRAS-3'UTR-LCS6 variant were transfected into HEp2 cells using lentiviral methods. Then, expression analyses of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway genes were performed at the mRNA level using RT-qPCR and at the protein level using ELISA analysis in these transfected cells. According to the results, the LCS6 variant was found to decrease the expression of *NF-κB*, *IL-6*, and *STAT3*, but did not affect the expression of *JAK2* and *AKT*. In terms of IL-6 protein, while the LCS6 variant decreased the level of IL-6 in total cell protein, it increased the level of IL-6 in the cell culture supernatant. This is also consistent with the pleiotropic effect of IL-6.

In conclusion, it was found that the LCS6 variant suppressed the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway while creating its metastatic effect, but did not affect the PI3K/AKT/mTOR pathway.

Keywords: IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway; KRAS-3'UTR-LCS6 variant; laryngeal carcinoma; metastasis; rs61764370.

ZUSAMMENFASSUNG

REPUBLIK DER TÜRKEI
SELÇUK UNIVERSITÄT
HEALTH-SCIENCES-INSTITUT

Untersuchung der Beziehung zwischen der KRAS-3'UTR-LCS6-Variante (rs61764370) und dem IL-6/JAK2/STAT3-Signalweg beim Kehlkopfkrebs

Muhammed Burak KAPLAN
Abteilung für Medizinische Genetik

DOKTORARBEIT / KONYA-2023

Kopf-Hals-Karzinome (HNC) sind weltweit die siebthäufigste Krebsart. Das Kehlkopfkrebs, das zu den häufigsten HNC-Typen zählt, ist für 1,57% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Im Kehlkopfkrebs wurden Mutationen in verschiedenen Genen identifiziert, wobei eine der wichtigsten Mutationen im *KRAS*-Gen auftritt. Die T>G-Nukleotidveränderung (rs61764370) in der let-7-komplementären Bindungsstelle 6 (LCS6) im 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR) des *KRAS*-Gens, das ein Onkogen ist, wurde in klinischen Studien mit einer erhöhten Krebsentwicklung, Resistenz gegenüber Behandlungen und Metastasierung sowie einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten in Verbindung gebracht.

In unserer vorherigen Studie wurde der metastatische Effekt dieser Variante *in vitro* und *in vivo* (Xenograft-Mausmodelle) untersucht. Es wurde festgestellt, dass die LCS6-Variante die Tumorentwicklung und Metastasierung im Kehlkopfkrebs erhöht, jedoch nicht über die RAF/MEK/ERK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege vermittelt wird. Der intrazelluläre Signalweg, über den die LCS6-Variante ihren metastatischen Effekt erzeugt, ist noch unbekannt.

In dieser Studie wurde der Einfluss der KRAS-3'UTR-LCS6-Variante auf den IL-6/JAK2/STAT3-Signalweg, einen weiteren metastatischen Signalweg bei Krebs, im Kehlkopfkrebs untersucht. Dazu wurden zunächst *KRAS*-Gene, die die KRAS-CDS-G12V-Mutation und die KRAS-3'UTR-LCS6-Variante enthalten, mithilfe von lentiviralen Methoden in HEP2-Zellen transfiziert. Anschließend wurde die Expression der Gene des IL-6/JAK2/STAT3-Signalwegs auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf Proteinebene mittels ELISA-Analyse in den transfizierten Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die LCS6-Variante die Expression von *NF-κB*, *IL-6* und *STAT3* verringerte, während sie die Expression von *JAK2* und *AKT* nicht beeinflusste. Hinsichtlich des IL-6-Proteins wurde festgestellt, dass die LCS6-Variante den IL-6-Spiegel im gesamten Zellprotein verringerte, jedoch im Zellkulturüberstand erhöhte. Dies steht im Einklang mit der pleiotropen Wirkung von IL-6.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die LCS6-Variante den IL-6/JAK2/STAT3-Signalweg unterdrückt, während sie ihre metastatische Wirkung entfaltet, jedoch den PI3K/AKT/mTOR-Weg nicht beeinflusst hat.

Schlüsselwörter: IL-6/JAK2/STAT3-Signalweg; Kehlkopfkrebs; KRAS-3'UTR-LCS6-Variante; Metastasen; rs61764370.

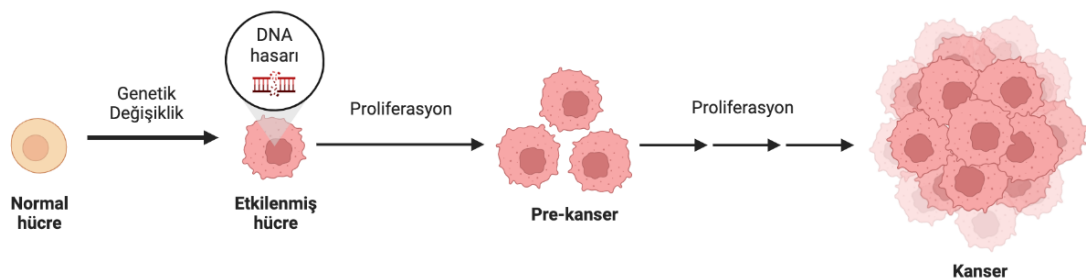
1. GİRİŞ

En yaygın anlamıyla kontrolsüz hücre bölünmesini ifade eden kanser, binlerce yıldır insanlığın en önemli sağlık problemlerinden biri olagelmıştır (Hajdu 2011). Ancak geçmiş yüzyıllarda bulaşıcı hastalıkların ciddi sayıda genç ölümlere sebep olması dolayısıyla bunun gölgesinde kalmıştır (Wild ve ark 2020). Özellikle son yüzyılda bulaşıcı hastalıklarla mücadelenin belli bir seviyeye gelmesinin yanı sıra beklenen yaşam süresinin belirgin bir şekilde uzaması (World Health Organization 2020) ve karsinogen maruziyetinin artması neticesinde kanser, halk sağlığı nezdinde daha büyük bir problem haline gelmiştir. Günümüzde kanser, ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarının ardından ikinci sırada gelmektedir (Siegel ve ark 2021). Ferlay ve ark (2021) yaptığı çalışmada, 2020 yılında, tüm dünyada 19,3 milyon yeni kanser vakası görüldüğü ve 10 milyon kanser kaynaklı ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Bu rakamların 2040 yılında 28 milyon yeni kanser vakası ve 16 milyon kanser kaynaklı ölüme ulaşacağı öngörülmektedir. Yine aynı çalışmada, bir bireyin 75 yaşına kadar kanserle karşılaşma riski %20 ve kanser nedeniyle hayatını kaybetme olasılığı ise %10 olarak hesaplanmıştır (Ferlay ve ark 2021).

1.1. Kanser

1.1.1. Kanser ve Tarihçesi

Kanser, hücredeki DNA hasarı sonucunda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması ile giden genetik bir hastalıktır (Şekil 1.1). Yaygın anlayışın aksine kanser tek bir hastalık değildir. Ortaya çıktığı organ ve doku tipine göre farklılık gösteren 200'den fazla kanser türü mevcuttur (Committee 2022).



Şekil 1.1. Kanser gelişimi (BioRender.com aracılığıyla oluşturulmuştur).

Etimolojik olarak Grekçe yengeç anlamına gelen *karkinos* kelimesinden türeyen **kanser** kelimesinin izini Antik Yunanlı hekim Hipokrat (MÖ 460-370)'a

kadar sürmek mümkündür. Hipokrat, kısıkaçlarıyla tuttuğunu sıkıca kavrayan yengeç ile bazı tümörler arasındaki benzerliğe dikkat çekmiş ve ülser oluşturmayan ve ülser oluşturan tümörler için sırasıyla *karkínos* ve *karkínoma* terimlerini kullanmıştır. Daha sonra Romalı hekim Celsus (MÖ 25-MS 50) bu kelimeyi Latince yine yengeç anlamına gelen *cancer* sözcüğüyle ifade etmiştir (Hajdu 2011, American Cancer Society 2018).

Kanser kelimesini ilk kullanan kişi Hipokrat olmasına rağmen hastalığın bilinirliği çok daha eski dönemlere dayanmaktadır. Örneğin Antik Mısır'daki mumyalarda ve MÖ 1600 yıllarına tarihlenen eski el yazmalarında insan kemik kanserine dair kanıtlar bulunmuştur (Sudhakar 2009). Dünyanın kaydedilen en eski meme kanseri vakası ise MÖ 3000'lerde yine Antik Mısır'a dayanmaktadır (Breasted 1930).

Antik Mısır'dan Antik Yunan'a, oradan Roma'ya, Roma'dan da Razi (860-932) ve İbni Sina (980-1037) gibi bilim insanları aracılığıyla İslam coğrafyasına yayılan tıbbi bilgi daha sonra bir duraksama yaşamış ve kanserin tanınması açısından Rönesans dönemine kadar bilimsel anlamda ciddi gelişmeler kaydedilememiştir. Ancak Rönesans'la birlikte bilimsel yöntemin kullanıma girmesi ve akabinde bunun insan vücudu ve hastalıklarının anlaşılmasında kullanılmaya başlanması bir dizi gelişmenin de önünü açmıştır.

1761'de Giovanni Morgagni hastalıkları araştırmak için otopsiler yaparak bir anlamda bilimsel onkolojinin temellerini attı. Aynı dönemlerde İskoçyalı cerrah John Hunter (1728-1793) bazı kanserlerde ameliyatla tedavinin mümkün olabileceğini öne sürdü ve bununla ilgili birtakım önerilerde bulundu. Takip eden dönemlerde anesteziye gelişmeler kanser cerrahisinin de hız kazanmasını sağladı (American Cancer Society 2018).

19. yüzyılda mikroskobun keşfi ile kanser patolojisinin temelleri atıldı. Bu gelişme iyi huylu ve kötü huylu tümörlerin ayrımını daha kolay hale getirdi (Hajdu 2012). 1838 yılında tıp tarihi açısından çok önemli bir gelişme yaşandı. Berlin Patoloji Enstitüsünde doktor olan Theodor Schwann (1810-1882), hayvan ve insan dokularının hücre adı verilen mikroskobik yapılardan oluştuğunu ifade eden hücre teorisini ortaya attı (Schwann 1838). Bunu bir dizi kanser mikroskobisi çalışması takip etti.

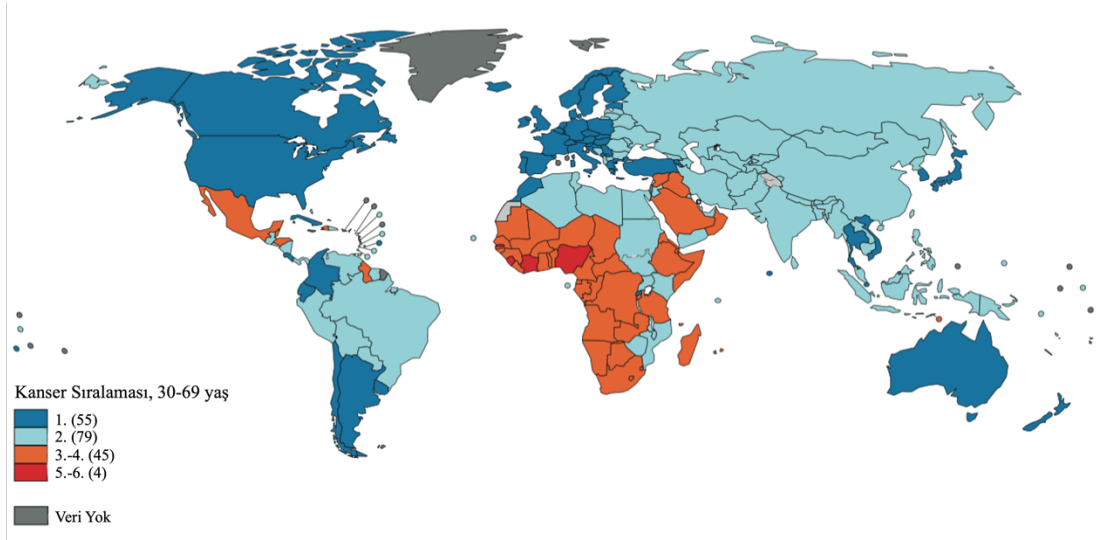
20. yüzyılın başlarında karsinogenlerin tanımlanması, ilk kez laboratuvar hayvanlarında kanser oluşturulması (Yamagiwa 1915), tümör dokusunun *in vitro* olarak üretilmesi (Carrel ve Burrows 1910), radyasyonun kansere neden olduğunun gösterilmesi (Marie 1910) ve mikroorganizmaların da kanser etkeni olabileceği gibi bilgiler kanser çalışmalarına ciddi bir ivme kazandırdı (Hajdu ve Darvishian 2013). 20. yüzyılın ikinci yarısında ise onkojen ve tümör süpresör genlerin keşfi, radyolojik görüntüleme yöntemleri ve laboratuvar testlerindeki gelişmeler ile cerrahi ve medikal kanser tedavilerindeki ilerlemeler bu ivmeyi daha da hızlandırdı (Hajdu ve Vadmal 2013).

Günümüzde kanser hakkında önceki dönemlere kıyasla çok daha fazla bilgiye sahibiz. Bu bilgiler eşliğinde kanser insidansının düşürülmesi, kanser nedenli ölümlerin azaltılması ve en nihayetinde kanserin eradike edilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir.

1.1.2. Dünyada ve Ülkemizde Kanser

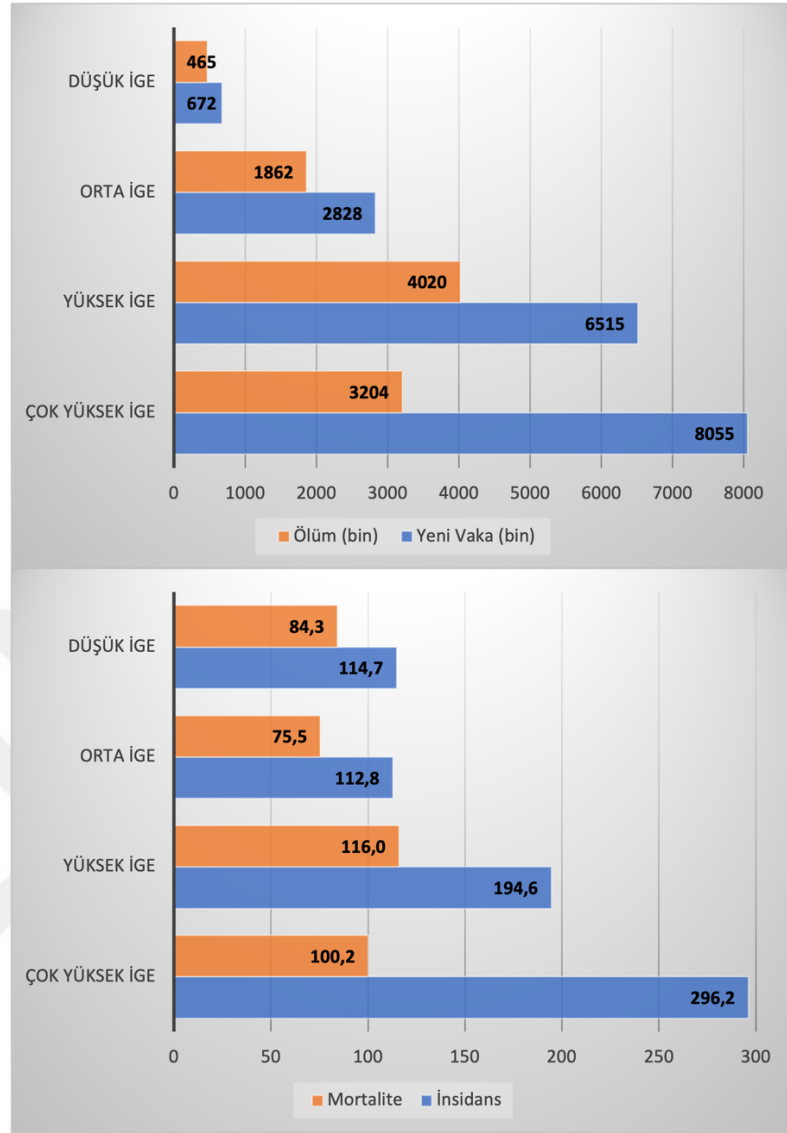
Kanser tarih boyunca insanlığı etkilemiş bir hastalıktır. Ancak yakın zamana kadar kanserin küresel etkilerini ölçebilecek verilerden yoksunduk. Son birkaç on yılda sağlık istatistiklerinin daha düzenli tutulması ve bunların dijital ortamda kayda alınması, kanser konusunda da kapsamlı analizler yapmaya olanak sağlamıştır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre kanser, tüm dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Yaklaşık her 6 ölümden biri kanser kaynaklıdır. 183 ülkenin 134'ünde (%73) erken ölümlerin (30-69 yaş arası ölümler) ilk ve ikinci önde gelen nedenidir. Diğer 45 ülkede (%25) ise üçüncü ve dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.2) (Wild ve ark 2020).



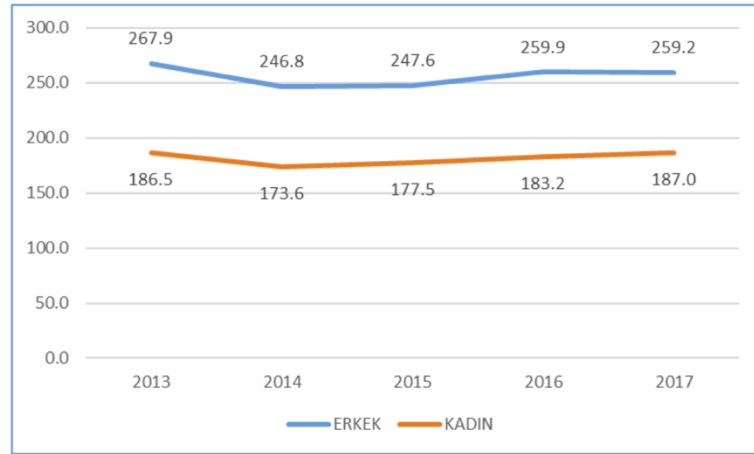
Şekil 1.2. Küresel kanser haritası (Rakamlar sıralamayı, parantez içindeki değerler ülke sayısını gösterir.) (Wild ve ark 2020).

Kanser insidans ve mortalitesi ülkeden ülkeye ve kanser tipine göre değişiklik göstermektedir. İnsani Gelişme Endeksi (İGE) yükseldikçe o ülkede kanser görülme sıklığı artarken kanserin öldürücülüğü azalmaktadır (Şekil 1.3) (Wild ve ark 2020). Diğer yandan dünya genelinde tüm kanserler ele alındığında kanser mortalitesi gün geçtikçe azalmaktadır (Committee 2022).



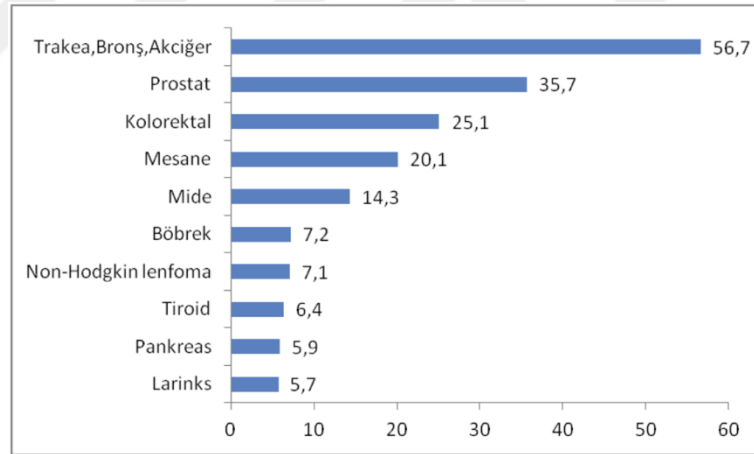
Şekil 1.3. 2018 yılında, insani gelişmişlik endeksine (İGE) göre toplam yeni kanser yükü ve kanser ölümleri (üst) ve yaşa göre standardize edilmiş 100 000 kişi başına insidans ve mortalite (alt) (Wild ve ark 2020).

Kanser dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de ölüm nedenleri arasında ikinci sırada gelmektedir. Kanser sıklığı ise erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir. Sağlık Bakanlığı'nın yayınlanmış en güncel verilerine göre 2017 yılında yaşa göre standardize edilmiş kanser insidansı, erkeklerde yüz binde 259,2 iken kadınlarda bu rakam 187,0'dır. Toplum ortalaması alındığında bu değer yüz binde 223,1'e tekabül etmektedir. 2017 yılı içerisinde Türkiye'de toplam 180 288 kişi kanser tanısı almıştır. 2013-2017 arası veriler incelendiğinde, kanser insidans ve mortalitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişme görülmemektedir (Şekil 1.4) (TCSBHSK 2021).

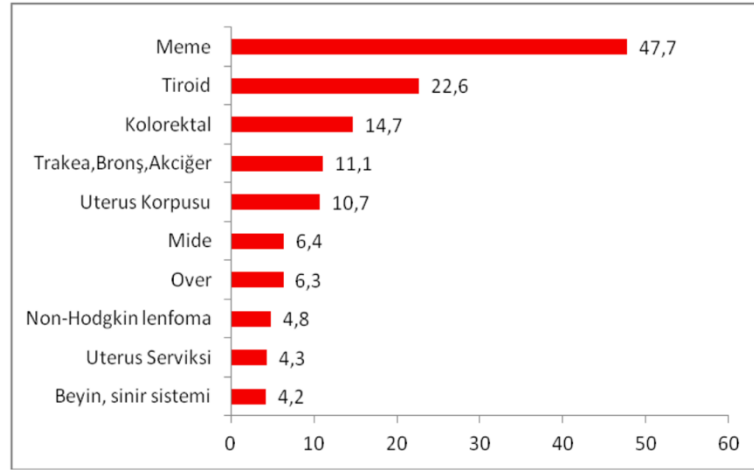


Şekil 1.4. Türkiye’de 2013-2017 yılları arasında görülen tüm kanser vakalarının cinsiyete göre dağılımı (yaşa göre standardize edilmiş, 100 000 kişide) (TCSBHSK 2021).

Ülkemizde görülen kanser türleri de cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Erkeklerde en sık görülen kanserler sırasıyla akciğer kanseri, prostat kanseri ve kolorektal kanserler iken kadınlarda bu sıralama meme kanseri, tiroid kanseri ve kolorektal kanserler olarak değişmektedir (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6) (TCSBHSK 2021).



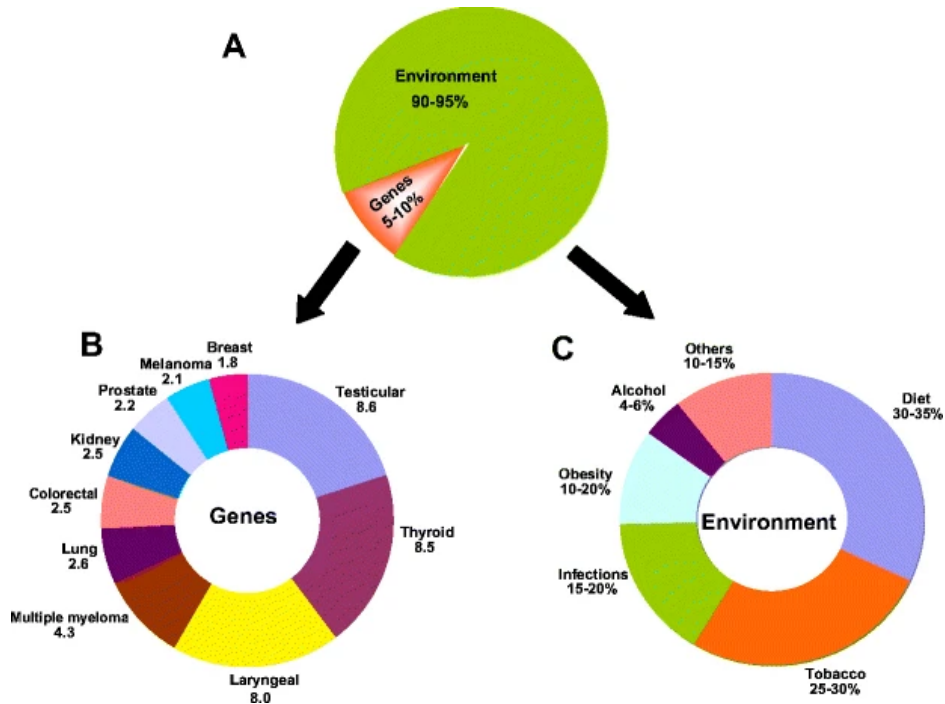
Şekil 1.5. Türkiye’de 2017 yılında erkeklerde en sık görülen 10 kanser insidansı (Yaşa göre standardize edilmiş, 100 000 kişide) (TCSBHSK 2021).



Şekil 1.6. Türkiye’de 2017 yılında kadınlarda en sık görülen 10 kanser insidansı (Yaşa göre standardize edilmiş, 100 000 kişide) (TCSBHSK 2021).

1.1.3. Kanserın Başlıca Nedenleri

Kanser hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Kanser gelişiminde genetik yapının etkisi %5-10 dolaylarında bulunurken çevrenin etkisi %90-95’i bulmaktadır (Şekil 1.7) (Anand ve ark 2008). Bu çevresel etmenler arasında birçok nedeni saymak mümkündür. Bunlar kanser tipine göre çeşitlilik göstermektedir. Her 10 kanserden dördünün önlenebilir nedenlerden kaynaklanıyor olması (Committee 2022), bu risk faktörlerinin bilinmesini daha da önemli kılmaktadır. Burada en sık görülen kanser nedenlerine kısaca değineceğiz.



Şekil 1.7. Kanserde risk faktörleri (Anand ve ark 2008).

Sigara ve diğ er tütün ürünleri kanser etmenlerinin en başında gelir. Sigara, i erdiğı 70’i aşkın karsinojenle (Hecht ve Szabo 2014) sadece akciğ r kanserinin en sık nedeni olmakla kalmaz aynı zamanda 17 farklı kanser türüyle de direkt ilişkilidir. Larinks kanseri de sigarayla ilişkili kanserlerden birisidir ve larinks kanserinin en sık nedeni %70-95 ile sigara kullanımıdır (Hashibe ve ark 2007, Aup rin 2020).

Obezite ve sedanter yaşam kanserle direkt ilişkilidir. Obezite gerek hormonal dengeyi bozarak gerekse hiperlipidemi, hiperglisemi gibi tablolara yol a arak kanser oluşumunu tetiklemektedir. Aynı zamanda IGF/insulin/AKT sinyal yolağı, leptin/JAK2/STAT3 yolağı ve diğ er inflamatuvar kaskadları olumsuz etkilemesi obezite ile kanseri ilişkilendirmiştir. Bunun tam aksine fiziksel aktivitenin ise birçok kanser türünde riski azalttığı bilinmektedir (Wild ve ark 2020).

Enfeksiyöz ajanlar özellikle düşük ve orta gelir seviyeli ülkeler için önemli bir kanser nedenidir. Biri bakteri (*H. pylori*), yedisi virüs (HPV, HIV, HBV, HCV, EBV, KSHV, HTLV-1) ve     makroparazit (*Schistosoma*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) olmak üzere 11 enfeksiyöz ajanın insanlar için karsinojen olduğı bilinmektedir (Wild ve ark 2020).

Alkol, kendisi karsinojen olmamakla birlikte kokarsinojen bir kimyasaldır. Etanolün yıkımıyla oluşan asetaldehit ve serbest radikaller kanser oluşumuyla ilişkili görülmektedir. Kronik alkol tüketimi i lerinde larinks kanserinin de olduğı 10’dan fazla kanserle ilişkili bulunmuştur (Anand ve ark 2008, Wild ve ark 2020).

Ultraviyole radyasyon (UVR), direkt ya da serbest radikaller oluşturarak dolaylı yoldan DNA hasarı oluşurmaktadır. Bu DNA hasarları da hayati bölgelerde olması ve hücre onarım kapasitesini aşması durumunda kansere neden olabilmektedir. Ana kaynağı güneş ışığı olan UVR, bazal hücreli karsinom ve melanoma gibi cilt kanserlerinin en sık nedenidir (Goding Sauer ve ark 2019, Wild ve ark 2020).

Diyet, kanser gelişiminde büyük bir öneme sahiptir. Özellikle gastrointestinal sistem kanserlerinden büyük ölçüde diyet sorumlu tutulmaktadır. Gıdalara konulan katkı maddeleri ve işlemden geçirilirken a ıġa çıkan karsinojenler ve sebze/meyveden fakir beslenme bunda etken olarak görülmektedir. Ayrıca diyet, kanser sağkalımıyla da ilişkili bulunmuştur (Wild ve ark 2020).

Karsinojenler, kanserle ilişkili çok sayıda ajandan oluşan geniş bir gruptur. Bugüne kadar International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından 122 ajan insanlar için kesin karsinojen (grup 1) olarak tanımlanırken, 412 ajan da muhtemel ya da olası karsinojen (grup 2A ve 2B) olarak tanımlanmıştır (IARC 2022). Bu karsinojenlere maruziyet, kanser oluşumunu direkt ya da dolaylı yollardan tetiklemektedir.

Meslek-kanser ilişkisi ise çok eski yıllardan beri bilinmektedir (Hajdu 2011). Bugüne kadar çok sayıda mesleki ajan ve mesleki maruziyet durumu insanlar için karsinojenik olarak tanımlanmıştır. Ve bu etmenlerin pek çoğundan kaçınmanın mümkün olduğu bilinmektedir (Wild ve ark 2020).

Çevresel etmenler başlıca hava, su, toprak ve gıdalardaki kirlilikleri içerir. Çoğu insan göreceli olarak düşük düzeylerde olsa da adet olarak çok fazla diyebileceğimiz çevresel karsinojenlere maruz kalır. Bu karsinojenlerin çokluğu kanser yükünü önemli ölçüde arttırmaktadır. Hava kirliliği çevresel etmenler arasında en önemli olanlardandır. 2017 yılında dünya genelinde sadece hava kirliliği nedeniyle yaşamını yitiren akciğer kanseri vakalarının 350 167 olduğu tahmin edilmektedir (Wild ve ark 2020).

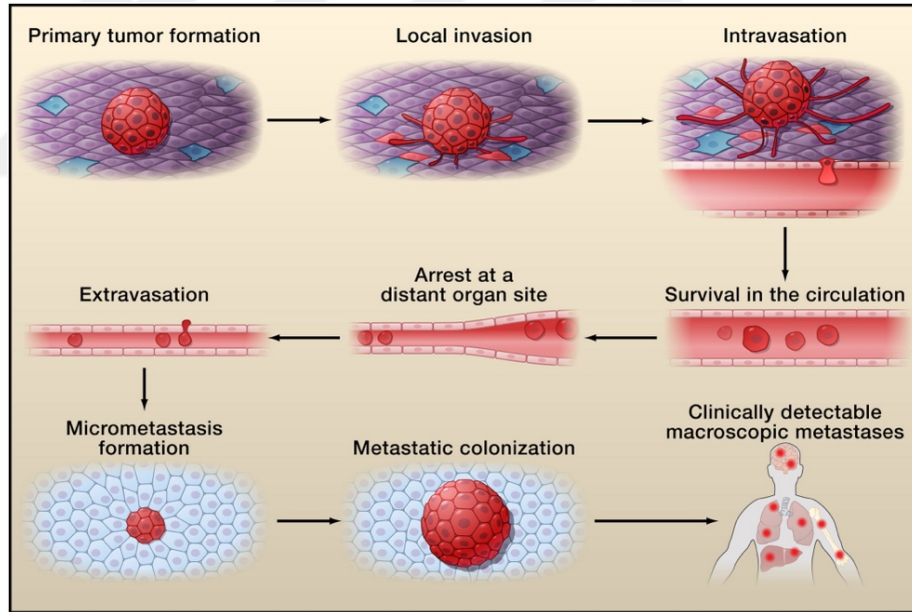
1.1.4. Kanser ve Metastaz

Grekçe ‘bir sonraki’ anlamına gelen *meta* sözcüğü ile ‘yer değiştirme’ anlamına gelen *stasis* sözcüklerinin birleşiminden oluşan **metastaz** sözcüğü, ilk kez 1829'da bir Fransız jinekolog Joseph Recamier (1774-1852) tarafından kullanıldı. Recamier 1800'lerde yaptığı çalışmayla, kanserlerin büyüme ve yayılmasını çıplak gözle izleyerek, kan damarlarına invazyonunu tanımlamayı başarmıştır (Hajdu 2012).

Günümüzde ise metastaz sözcüğü kanserin, orijin aldığı bölgenin dışında farklı bir doku veya organa yayılması anlamında kullanılır ve çoğu kanserde kansere bağlı ölümlerin ana nedenidir (Committee 2022).

Metastaz birçok moleküler mekanizmanın rol aldığı, çok kompleks bir süreçtir (Ha ve ark 2013, Alizadeh ve ark 2014). Metastaz oluşum süreci ‘invazyon-metastaz kaskadı’ olarak adlandırılan 7 aşama ile açıklanabilir (Şekil 1.8) (Valastyan ve Weinberg 2011).

- i. Lokal invazyon; primer tümör hücreleri (TH) ekstraselüler matriks yoluyla etrafa invaze olur.
- ii. İntravazasyon; TH kan ve lenf damarlarına geçer.
- iii. Dolaşımda sağkalım; TH'nin çok az bir kısmı dolaşımda hayatta kalarak metastaz oluşturabilir.
- iv. Uzak organda durma; dolaşımdaki TH belirli dokulara afinite gösterir ve o dokularda kalırlar.
- v. Ekstravazasyon; dolaşımdaki TH damar endotelini aşarak ilgili organa ulaşır.
- vi. Mikrometastaz oluşumu; TH bu yabancı organda mikrometastazlar oluşturarak hayatta kalır.
- vii. Metastatik kolonizasyon; TH metastatik bölgede proliferatif programını yeniden başlatır ve klinik olarak saptanabilir makroskobik metastaz oluşturur.

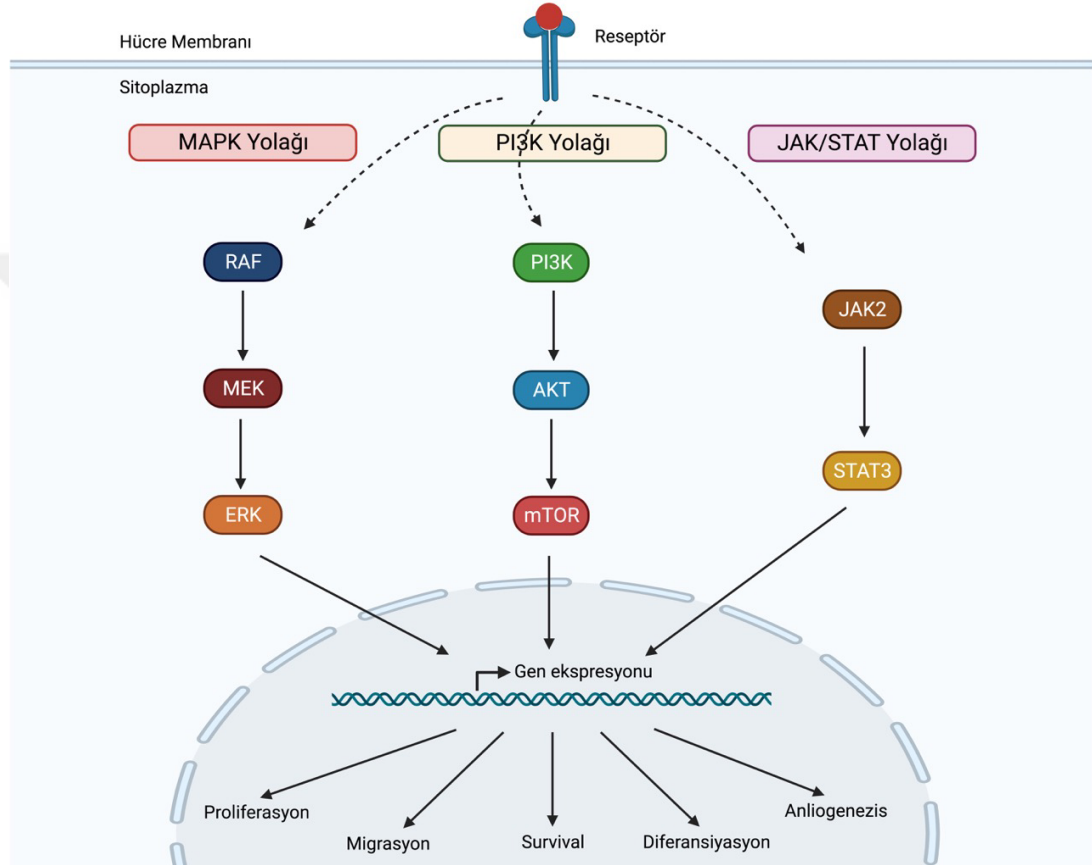


Şekil 1.8. Metastaz oluşum aşamaları (Valastyan ve Weinberg 2011).

Kanser hastalarının yaklaşık %50'sinde mikroskobik metastazlar görülür ve bu metastazlar, kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle, metastaz mekanizmalarının aydınlatılması son derece önemlidir. Ancak buna rağmen metastaz hakkındaki bilgimiz halen oldukça sınırlıdır (Chaffer ve Weinberg 2011, Alizadeh ve ark 2014).

1.1.5. Metastaz Sinyal Yolakları

Metastaz oluşumu yüzlerce genin ve onlarca yolağın dahil olduğu karmaşık bir süreçtir. Bu karmaşık sürecin aşamalarını geçmek için farklı moleküler yolaklar büyük önem taşır. Bu yolaklarda en önemlileri RAF/MEK/ERK yolağı, PI3K/AKT/mTOR yolağı ve IL-6/JAK2/STAT3 yolağıdır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Ana metastaz yolakları (BioRender.com aracılığıyla oluşturulmuştur).

RAF/MEK/ERK sinyal yolağı

MAPK sinyal yolağı olarak da bilinen bu yolak hem normal hücrelerde hem de birçok kanser hücresinde, hücre proliferasyonu için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerini içermektedir. Sitokinler tarafından uyarılan RAS proteini RAF'a bağlanarak onu aktive eder. RAF da MEK ve ERK üzerinden gen transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlar.

Birçok hücresel süreci düzenleyen MAPK'lar, hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, sağkalım ve apoptoz dahil bir dizi işlevde etkindir. Tümör hücrelerinde ise MAPK yolağı genellikle düzensizdir. Tümör hücrelerinde MAPK yolağı aktive

olarak tümör gelişimi, ilerlemesi ve metastaz gelişimine katkıda bulunur (Mendelsohn ve ark 2014).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

PI3K yolağı hücrel metabolizmanın ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde, protein biyosentezinde ve apoptozun önlenmesinde önemli rol oynayan bir hücre içi sinyal yolağıdır. Bu yolak birçok hücrel uyaran tarafından aktive edilebilir ve hücre dışı sinyallerin etkisiyle transkripsiyon, translasyon, proliferasyon, büyüme ve hayatta kalma, apoptoz gibi temel hücrel fonksiyonları düzenler. Bu yolağın aktivasyonu tümör hücresinin büyümesi ve hayatta kalmasının ana belirleyicisidir.

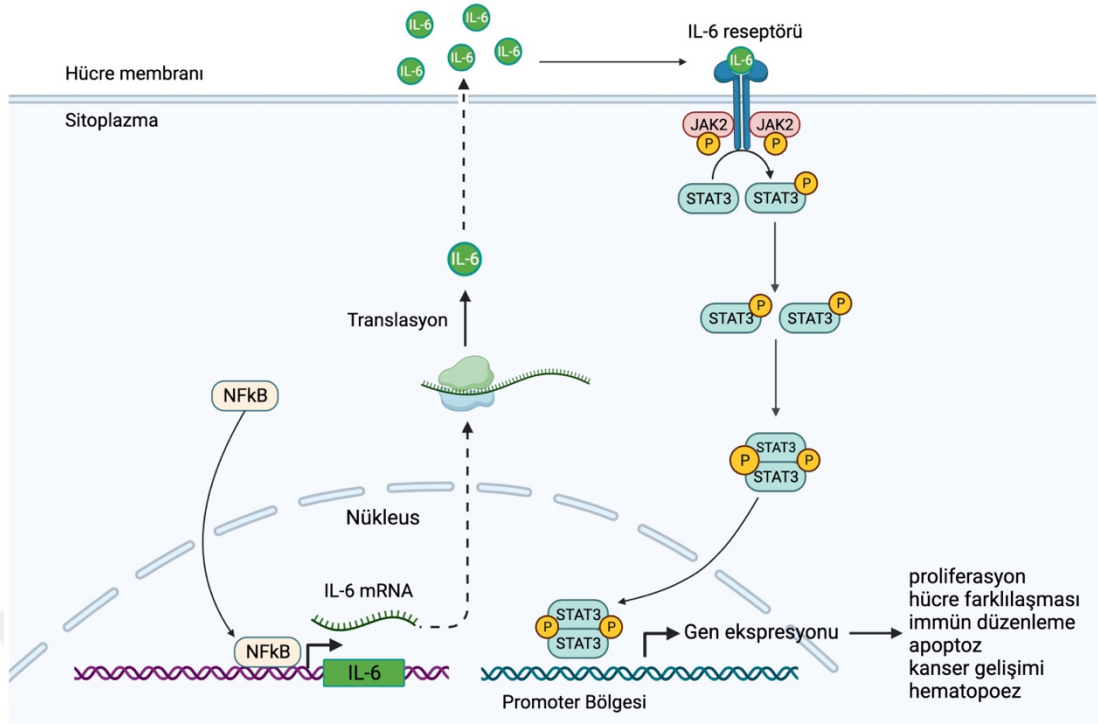
Heterodimerik bir protein kompleksi olan PI3K (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat kinaz), RAS proteinleri ve reseptör tirozin kinazlar ile aktive olur ve PIP2'yi PIP3'e dönüştürür. PIP3 de AKT'yi fosforiller. Aktive olan AKT ise mTOR'u aktive eder (Alizadeh ve ark 2014).

Bu yolak sıklıkla kanserde bozulur ve tümör hücrelerinin patogeneğinde büyük önem taşır.

IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı

Bir sitokin-reseptör yolağı olan IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı, kontrolsüz hücre büyümesi ve kanserle yakından ilişkilidir. Bir sitokin olan IL-6'nın reseptörüne bağlanmasıyla aktive olan bu yolak, birçok vücut fonksiyonunda ve hücre farklılaşması, immün düzenleme, apoptoz, kanser gelişimi, hematopoez gibi bazı önemli biyolojik süreçlerde görev alır.

NF-κB tarafından uyarılarak transkripte olan interlökin-6 (IL-6) (Libermann ve Baltimore 1990) mRNA'sı çekirdek zarını aşarak sitoplazmaya gelir. Burada ribozomlar aracılığıyla translasyona uğrayarak protein dönüştürülür. Proteine dönüştürülen IL-6, hücre membranını geçer ve yolak şu basamakları izler; (1) ligand (IL-6) reseptöre bağlanır, (2) JAK2 fosforile olur, (3) STAT3 fosforile olur, (4) STAT3 dimerize olur, (5) dimerize STAT3 nükleusa geçerek DNA'ya bağlanır ve (6) gen ekspresyonu ger çekleşir (Şekil 1.10) (Mengie Ayele ve ark 2022).



Şekil 1.10. IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağının şematik gösterimi (BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).

NF-κB

Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB); hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı, inflamasyon, yaşlanma ve immün yanıt gibi farklı hücresel süreçlerde rol oynayan birçok genin ekspresyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir. Hızlı etkili bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB, tüm hücre tiplerinde bulunur. Sitoplazma içinde inaktif halde iken aktive olunca çekirdeğe geçerek TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin üretimini kontrol eder (Gerondakis ve ark 2006, Hoffmann ve Baltimore 2006).

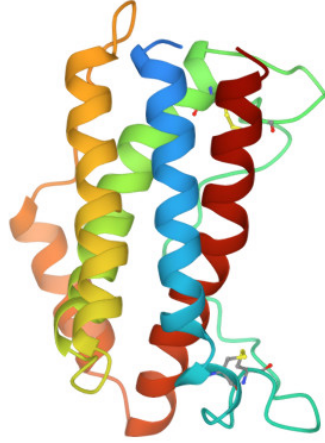
IL-6

Sitokinler, hücreler arası sinyal iletimini gerçekleştiren düzenleyici moleküllerdir. Belirli bir uyaran sonrasında üretilerek hücre dışına salınır ve dolaşımda kaldıkları kısa süre boyunca etki gösterirler (Gandhi ve ark 2016).

Çok farklı fonksiyonları olan pleiotropik bir sitokin olan interlökin-6 (IL-6), hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar etki gösterir. İmmün yanıt, inflamasyon, onkogeneze, hematopoez gibi birçok alanda düzenleyici etki gösterir. Ayrıca IL-6'nın metastaz dahil, kanser gelişiminin hemen her evresiyle ilişkili olduğu da bilinmektedir

(Kabel 2014, Kumari ve ark 2016). IL-6, kanserde hem tümörü uyarıcı hem de inhibe edici etki göstermektedir (Knüpfer ve Preiß 2007).

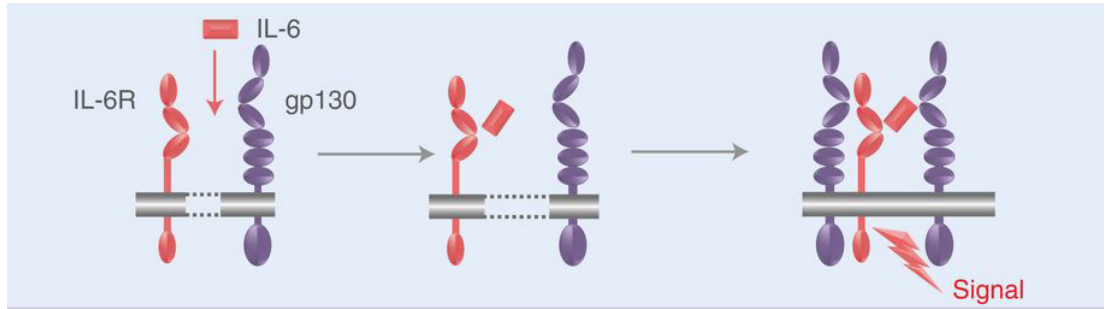
IL-6, ilk kez 1986 yılında tanımlanan (Hirano ve ark 1986), 20 kDa ağırlığında, 185 aminoasit içeren, dörtlü alfa heliks yapısında, küçük bir polipeptittir (Şekil 1.11). İnsan *IL-6* geni, 7. kromozom üzerinde yerleşmiş, yaklaşık 5 kilobaz uzunluğunda, 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır (Song ve Kellum 2005).



Şekil 1.11. IL-6 proteininin üç boyutlu yapısı (PDB ID: 1IL6) (Protein Data Bank 2023).

IL-6 proteini içerdiği disülfid bağları sayesinde yapısal stabilizasyon sağlar. Hücre membranında yerleşen IL-6 reseptörüne (IL-6R) veya çözünür şekildeki soluble IL-6 reseptörüne (sIL-6R) bağlanarak etki gösterir.

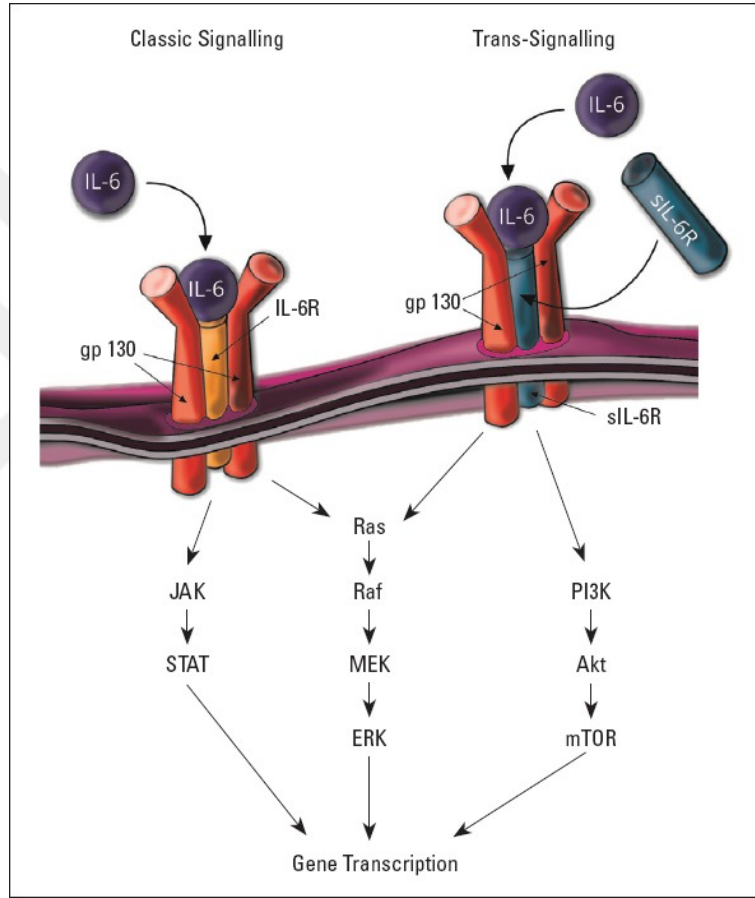
Reseptörüne (IL-6R) bağlanan IL-6, tüm insan hücrelerinde eksprese edilen bir protein olan glikoprotein 130 kDa (gp130) ile bir kompleks oluşturarak gp130'un dimerizasyonunu indükler ve hücre içine sinyal iletimi gerçekleştirir (Şekil 1.12) (Rose-John 2018).



Şekil 1.12. IL-6 reseptör kompleksinin moleküler kuruluşu (Rose-John 2018).

JAK2

IL-6 reseptör kompleksi hücre içi sinyal iletimini, hücre membranında lokalize olan Janus Kinaz (JAK) proteinleri aracılığıyla JAK2/STAT3 yolağını aktive ederek gerçekleştirir. *JAK*, 4 üyeden (*JAK1*, 2, 3 ve tirozin kinaz 2) oluşan bir gen ailesidir. Bu yolakta *STAT* molekülü *JAK* enzimi tarafından fosforilize edilerek dimerleşir. Ardından dimerleşen *STAT* molekülleri hücre çekirdeğine ulaşır ve çekirdekte ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler (Şekil 1.13) (Song ve Kellum 2005).



Şekil 1.13. IL-6 sinyal yolağı (Segiet ve ark 2019).

STAT3

STAT3 geni, *STAT* (signal transducer and activator of transcription) genleri olarak bilinen ve 7 genden (*STAT 1*, 2, 3, 4, 5a, 5b ve 6) oluşan ailenin bir üyesidir. *STAT3* bunların içerisinde en aktif olanıdır ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli rol oynar. *STAT* proteinleri aktive edildiğinde hücre çekirdeğine geçer ve DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu uyarır (Mendelsohn ve ark 2014).

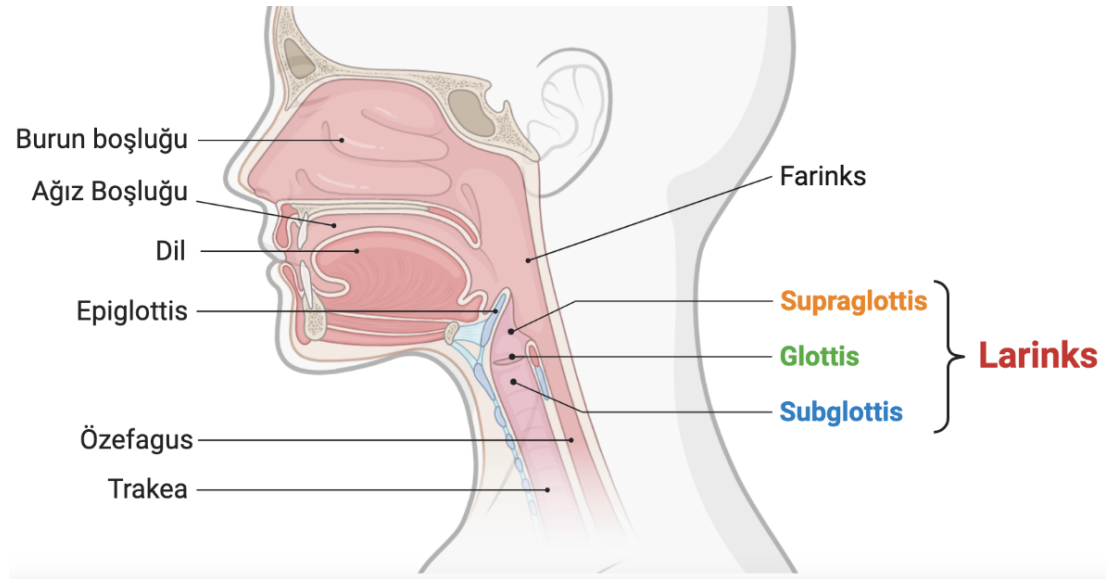
STAT3 proteini, gen aktivitesini düzenleyerek hücre proliferasyonu, migrasyonu, apoptoz, immün sistem hücrelerinin olgunlaşması gibi birçok hücre fonksiyonunda görev alır. STAT3'ün onkojenik etkisi bilinmekle birlikte, bunun aksine görece az sayıda çalışmada, STAT3'ün tümör süpresör etkisinden de bahsedilmektedir (Zhang ve Lai 2014).

1.2. Larinks

Larinks (gırtlak); boyun bölgesinde, üst solunum yolu ile sindirim yolunun ikiye ayrıldığı yerde bulunan; nefes alma, yutkunma ve konuşmada önemli görevler üstlenen; kıkırdak, ligament, kas ve membranlardan oluşan; içinde ses tellerini barındıran hayati bir organdır.

Larinks, anatomik olarak boynun ön orta bölümünde, farinks (yutak) ile trakea arasında yer alır ve ses tellerinin konumuna göre yukarıdan aşağıya doğru 3 bölüme ayrılarak incelenir (Şekil 1.14):

- Supraglottik bölge, farinksin bitiminden ses tellerinin üstüne kadar olan kısımdır.
- Glottik bölge, ses tellerinin bulunduğu orta kısımdır.
- Subglottik bölge, ses tellerinin altından trakeaya kadar uzanan kısımdır.



Şekil 1.14. Larinks anatomisi (BioRender.com aracılığıyla oluşturulmuştur).

Larinks bulunduğu konum itibariyle çok hayati fonksiyonlar üstlenir. Başlıca fonksiyonları şunlardır:

- Alt solunum yollarının korunması (Proteksiyon)
- Solunum (Respirasyon)
- Sesin üretimi (Fonasyon)
- Konuşma
- Yutmaya yardım etme
- Öksürüğe ve balgamın dışarı atılmasına (ekspektorasyon) yardım etme.

1.2.1. Larinks Kanseri

Baş-Boyun Kanserleri (BBK) dudak, oral kavite, nazofarinks, orofarinks, hipofarinks ve larinks bölgelerini içeren kanser grubudur. Bunlar arasında oral kavite kanserlerinden sonra en sık görülen kanser türü larinks kanseridir. 2017 yılında 890 000 yeni vaka ile en sık görülen 7. kanser türü olan BBK insidansı giderek artmaktadır (Sung ve ark 2021). Aynı yıl larinks kanseri insidansı ise 211 000 olarak tespit edilmiştir (Aupérin 2020). Mortalite açısından bakıldığında ise BBK 507 000 ölümle tüm kanser ölümlerinin %6,3'ünü oluştururken, larinks kanseri 126 000 ile tüm kanser ölümleri %1,57'sine sebep olmaktadır (Tablo 1.1) (Aupérin 2020).

Tablo 1.1. 2017'de dünya genelinde BBK için insidans ve mortalite tahminleri (Aupérin 2020).

	Dudak ve Oral Kavite Kanserleri	Nazofarinks Kanseri	Diğer Farinks Kanserleri	Larinks Kanseri
Mortalite				
Ölüm sayısı x10 ³	194	70	117	126
ASDR Erkek	3,31	1,32	2,17	2,80
ASDR Kadın	1,61	0,44	0,79	0,49
ASDR Tümü	2,42	0,86	1,45	1,57
İnsidans				
Yeni vaka sayısı x10 ³	390	110	179	211
ASIR Erkek	6,24	2,05	3,34	4,63
ASIR Kadın	3,60	0,69	1,13	0,77
ASIR Tümü	4,84	1,35	2,19	2,59

ASDR, yaşa göre standardize edilmiş 100 000'de ölüm oranı; ASIR, yaşa göre standardize edilmiş 100 000'de insidans oranı.

Larinks kanserinin en önemli nedeni sigara kullanımıdır. Tüm vakaların %70-95'inin sigarayla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bunun dışında başlıca nedenleri arasında alkol tüketimi, HPV enfeksiyonu, mesleki karsinojenlere maruziyet (boya, asbest, benzin dumanı gibi), kötü ağız hijyeni, sebze ve meyveden fakir beslenme gösterilmektedir (Hashibe ve ark 2007, Bhattacharyya ve ark 2015, Aupérin 2020).

Larinks kanserlerinin büyük çoğunluğunu (~%90) epitel hücrelerinden gelişen skuamöz hücreli karsinom oluşturur. Bununla birlikte, nadiren adnokarsinomlar, sarkomlar, lenfoma ve nöroendokrin tümörler görülebilir (Koroulakis ve Agarwal 2022). Larinks kanserinin görülme sıklığı erkeklerde kadınlara oranla 6 kat daha fazladır (Aupérin 2020).

Larinksin anatomik bölgeleri dikkate alındığında kanserlerin %98'i supraglottik ve glottik bölgede oluşmaktadır. Larinks kanserlerinin ancak %2'si subglottik bölgede gelişmektedir. Glottik kanserler ise supraglottik kanserlerden yaklaşık 3 kat daha sık görülmektedir (Koroulakis ve Agarwal 2022).

Larinks kanserinin en sık belirtisi uzun süren ve nedeni açıklanamayan ses kısıklığıdır. Kanser ilerledikçe buna geçmeyen boğaz ağrısı, nefes darlığı, yutma güçlüğü, boyunda kitle, kulak ağrısı, öksürük, ağza kan gelmesi, kilo kaybı gibi bulgular eklenir (Steuer ve ark 2017).

Larinks kanseri hızlı ilerleyen bir kanserdir. Bu nedenle hastaların çoğuna ancak ileri evrede tanı koyulabilmektedir (Steuer ve ark 2017). Larinks kanseri ileri evrelerde metastaz yapar ve en sık metastaz yaptığı bölgeler akciğer, kemik, özefagus, karaciğer ve beyindir (Pan ve ark 2019).

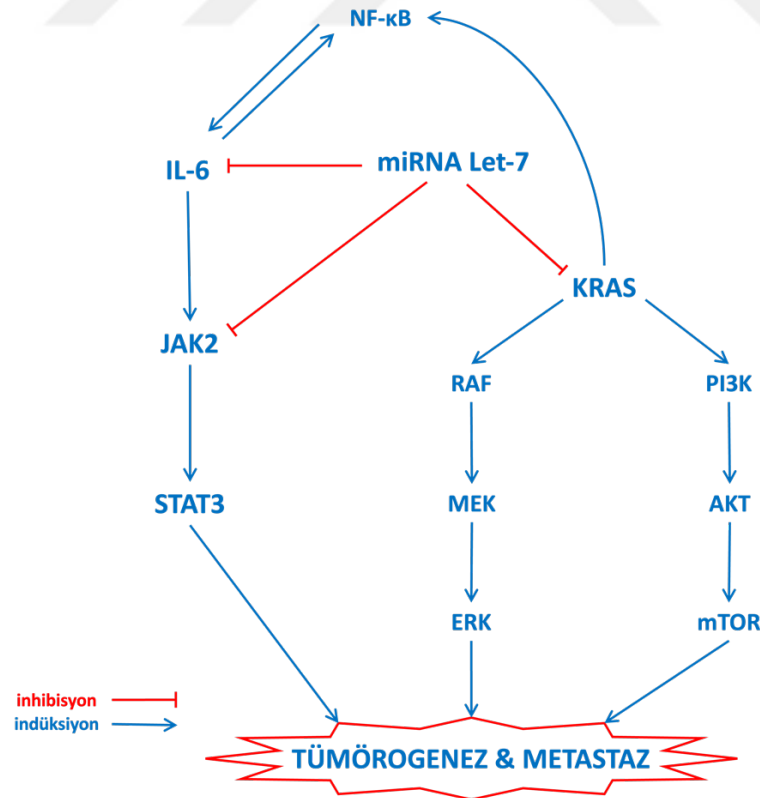
Larinks kanserinde birçok farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlilerinde biri *KRAS* gen mutasyonlarıdır. *KRAS* mutasyonlarının larinks kanserinde görülme oranı %4,8 ila %11,5 arasında değişmektedir (Bissada ve ark 2013, Kodaz ve ark 2017).

1.3. *KRAS* Geni

İlk olarak Kirsten sarcoma virüs (Ki-SV)'de tanımlanan *KRAS* geni, 21,6 kDa'luk bir protein (p21) kodlayan ve insanda ilk keşfedilen proto-onkogendir (Tsuchida ve Uesugi 1981, Tsuchida ve ark 1982). RAS proteini, plazma membranının sitoplazmik yüzünde lokalizedir ve hücre dışından gelen sinyalleri çekirdeğe ileterek hücre büyüme ve bölünmesinde görev alır (Jančík ve ark 2010, Zimmermann ve ark 2013). *HRAS* ve *NRAS* ile birlikte *RAS* gen ailesi olarak bilinen GTP bağlayıcı protein grubunun bir üyesidir (Gremer ve ark 2011).

İnsan *KRAS* geni kromozom 12p12.1’de lokalize olup 45 684 nükleotid uzunluğundadır (McBride ve ark 1983, Popescu ve ark 1985, Jančík ve ark 2010) ve ikisi (*KRAS4A* ve *KRAS4B*) en sık ifade edilen izoformlar olan dört splice varyantına sahip altı ekzondan oluşur (Rásó 2020). Bunlardan *KRAS4A* 188 aminoasitten oluşurken *KRAS4B*’nin aminoasit sayısı 189’dur (Garcia-Robledo ve ark 2022). Membran ilişkili GTPaz sinyal proteinleri olan RAS proteinleri hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenler ve insan kanserlerinde hayati öneme sahiptir. Bu proteinler, en başta RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR ve JAK2/STAT3 olmak üzere farklı sinyal yollarını regüle eder (Şekil 1.15). Aynı şekilde *KRAS* mutasyonları da bu yollar üzerinden onkojenik etki gösterir (Jančík ve ark 2010).

Bugüne kadar 736 gen kanserle ilişkili bulunmuştur (COSMIC 2023). Bu genlerin en önemlilerinden biri olan *KRAS* geni genellikle somatik mutasyonlarla aktive olur ve farklı tümörlerin patogeneğinde kritik rol oynar. Tüm insan kanserlerinin yaklaşık %30’unda *RAS* geni tutulumu vardır. Bunların yaklaşık %85’ini *KRAS* mutasyonları, %11 ila %15’ini *NRAS* mutasyonları ve yaklaşık %1’ini de *HRAS* mutasyonları oluşturur (Kodaz ve ark 2017).



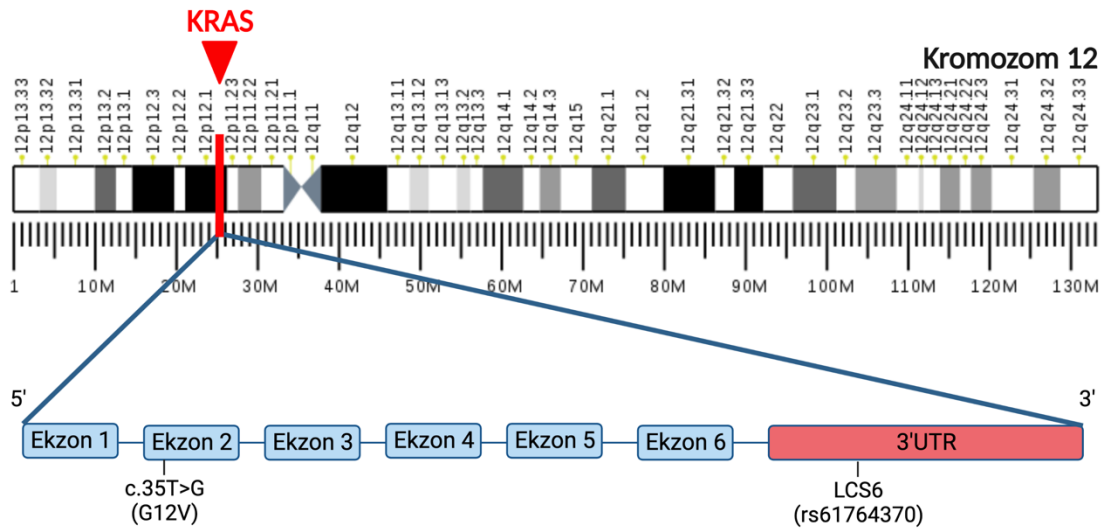
Şekil 1.15. *KRAS*, Let-7, NF-κB, IL-6 ve STAT3’ün birbirleriyle ve tümöroenez/metastaz ile ilişkisi.

1.3.1. KRAS Gen Mutasyonları

KRAS geni üzerinde çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar kolorektal kanser, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve pankreas kanseri başta olmak üzere birçok kanser türü ile ilişkili bulunmuştur (Ren ve ark 2012, Karachaliou ve ark 2013, Dobre ve ark 2015, Keerthana ve ark 2018, Luo 2021). Larinks kanseri de *KRAS* gen mutasyonlarıyla yakından ilişkili bir kanserdir (Kodaz ve ark 2017). Özellikle kodlanan bölge (coding sequence, CDS) içerisinde kalan 12, 13 ve 61. kodon mutasyonlarının birçok kanserin gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. 2. ve 3. ekzonda lokalize olan bu mutasyonlar GTP bağlanma bölgesinin yakınında bulunur ve GTPaz fonksiyonunu bozarak patolojik etki gösterir.

Bunlardan 2. ekzon, 12. kodon üzerinde görülen G12V mutasyonu (c.35G>T), *KRAS* mutasyonları arasında en sık görülenlerden birisidir ve birçok kanserde prediktif öneme sahiptir (Garcia-Robledo ve ark 2022). 12. kodondaki mutasyonlar *KRAS* proteininin daha uzun süre aktif halde kalmasına neden olarak kanser oluşumuna katkıda bulunur (Şekil 1.16) (Jančík ve ark 2010).

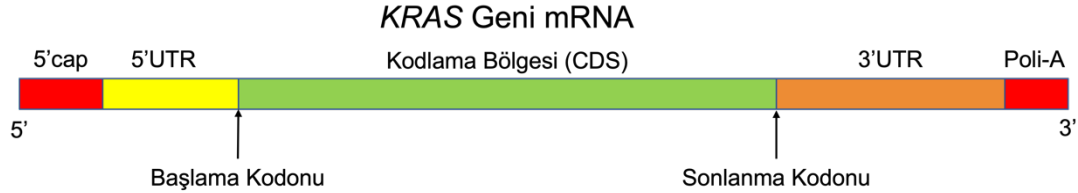
Kodlanan bölge haricinde, *KRAS* geni 3'UTR (untranslated region) mutasyonlarının da klinik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Christensen ve ark 2009, Dai ve ark 2015, Ustinova ve ark 2015). Genlerin 3'UTR bölgeleri mikroRNA'ların (miRNA) hedef dizileri (Didiano ve Hobert 2008) olduğu için bu bölgedeki mutasyonlar miRNA'ların bağlanmasını bozarak kanser gelişimini tetiklemektedir.



Şekil 1.16. *KRAS* geni G12V ve LCS6 varyantlarının şematik gösterimi.

1.3.2. KRAS-3'UTR-LCS6 Varyantı (rs61764370)

UTR (untranslated region)'ler, genlerin transkripte olan ancak translasyona uğramayan bölümleridir. Bir genin her iki ucunda birer UTR bulunur. Bunlar 5' veya 3' ucunda bulunmalarına göre sırasıyla 5'UTR ve 3'UTR olarak adlandırılır (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. *KRAS* geni mRNA yapısı.

miRNA'ların bağlanma bölgesi olması, 3'UTR mutasyonlarını da önemli kılmaktadır. *KRAS* geninin 3'UTR bölgesinde "let-7 complementary sites (LCSs)" olarak adlandırılan, 10 adet, let-7 miRNA'sının bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu bağlanma bölgelerinden LCS6'daki T>G nükleotid değişikliğinin (rs61764370) miRNA let-7 bağlanmasını zayıflattığı ve bunun sonucunda *KRAS* ekspresyonunun arttığı, *KRAS* mRNA'sının hücre içinde kalma süresinin uzadığı, let-7 seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir (Chin ve ark 2008, Paranjape ve ark 2011). *KRAS* ekspresyonunun artması ise larinks kanserinin daha agresif seyretmesine sebep olmaktadır (Papanikolaou ve ark 2021).

KRAS-3'UTR-LCS6'daki bu varyant, başta over kanseri (Ratner ve ark 2010, Ghazi Jumaa 2022), meme kanseri (Paranjape ve ark 2011, Ustinova ve ark 2015, Mohthash ve ark 2020, Gallegos-Arreola ve ark 2021), akciğer kanseri (Nelson ve ark 2010, Farokhzad ve ark 2020), kolorektal kanser (Dai ve ark 2016) ve BBK (Christensen ve ark 2009, Cipollini ve Gemignani 2014) olmak üzere birçok kanserle ilişkili bulunmuştur (Cipollini ve Gemignani 2014).

Rs61764370 varyantının farklı toplumlarda görülme sıklığı farklılık göstermekle birlikte, tüm çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, allel sıklığı %7 dolaylarında gözlenmektedir (NCBI 2023).

1.4. miRNA Let-7

İlk defa 1993 yılında keşfedilen mikroRNA (miRNA)'lar, normal hücre büyümesi, gen ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte yer alan 17-24 nükleotid uzunluğunda, endojen, tek zincirli, kodlanmayan RNA molekülleridir (Lee ve ark 1993, Bartel 2004). Bu düzenleyici etkilerini genellikle hedef genlerin 3'UTR bölgelerine bağlanarak gerçekleştirirler (Didiano ve Hobert 2008). miRNA dizilerindeki veya özellikle hedef DNA dizilerindeki mutasyonlar ve miRNA ekspresyon seviyesi değişimleri kanserin gelişim ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Dahiya ve ark 2008, Ustinova ve ark 2015).

Kanserle ilişkili miRNA'ları iki ana gruba ayırmak mümkündür. (i) Oncomirler, kanserde upregüle edilen ve onkojen gibi davranan miRNA'lar iken; (ii) anti-oncomirler, hücre döngüsünü ve kanser hücrelerinin bölünmesini baskılayarak tümör süpresör gibi aktivite gösteren miRNA'lardır (Jančík ve ark 2010). Örneğin miRNA let-7, RAS protein seviyelerini negatif olarak düzenleyen ve hücre bölünme oranlarını azaltan bir antioncomirdir (Takamizawa ve ark 2004, Goga ve Benz 2007).

İlk tanımlanan miRNA'lardan biri let-7 ailesi olup, bunların tümör süpresör etki gösterdiği bilinmekle birlikte, çeşitli kanserlerde let-7 ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (Takamizawa ve ark 2004, Dahiya ve ark 2008, O'Hara ve ark 2009).

KRAS geninin baskılanmasında etkili olan miRNA let-7, bu işlevini genin 3'UTR bölgesindeki LCSs (let-7 complementary sites) bölgelerine bağlanarak gerçekleştirmektedir (Johnson ve ark 2005). Chin ve ark (2008), *KRAS*-3'UTR-LCSs bölgelerindeki nükleotid değişimlerinin, kanser riskini arttırdığını rapor etmiştir (Chin ve ark 2008). Ayrıca, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve meme kanserinde, *KRAS*-3'UTR-LCS6'da T>G nükleotid değişikliğinin (rs61764370) miRNA let-7'nin bağlanmasını zayıflattığı ve bunun sonucunda *KRAS* ekspresyonunun arttığı, let-7 seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir (Chin ve ark 2008, Paranjape ve ark 2011). Kolorektal kanser hücre hattıyla yapılan bir başka çalışmada ise bu değişikliğin *KRAS* ekspresyonunu etkilememekle birlikte, let-7 seviyesini düşürdüğü belirtilmektedir (Crowley ve ark 2014). Popülasyon temelli çalışmalarda ise, LCS6 varyantının BBK için risk faktörü olmadığı (Bueno Santiago ve ark 2014), buna karşın LCS6 varyantı

olan BBK'li hastalarda surveyin, wild-type ile kıyaslandığında anlamlı oranda azaldığı (Christensen ve ark 2009) bildirilmiştir.

1.5. Hipotez ve Çalışmanın Amacı

Yukarıda da belirtildiği gibi KRAS-3'UTR bölgesinde let-7'nin bağlandığı bölge olan LCS6'daki nükleotid değişikliğinin (rs61764370) klinik çalışmalarla birçok kanserde; kanser gelişimini, relapsı ve tedavi dirençliliğini arttırdığı, bunun yanında hastalarda yaşam süresini (survival) azalttığı yönünde bulgular elde edilmiştir. Ancak bu etkileri hangi mekanizma üzerinden ortaya koyduğu, hangi hücre içi sinyal yolağını ve hangi molekülleri etkilediği bilinmemektedir.

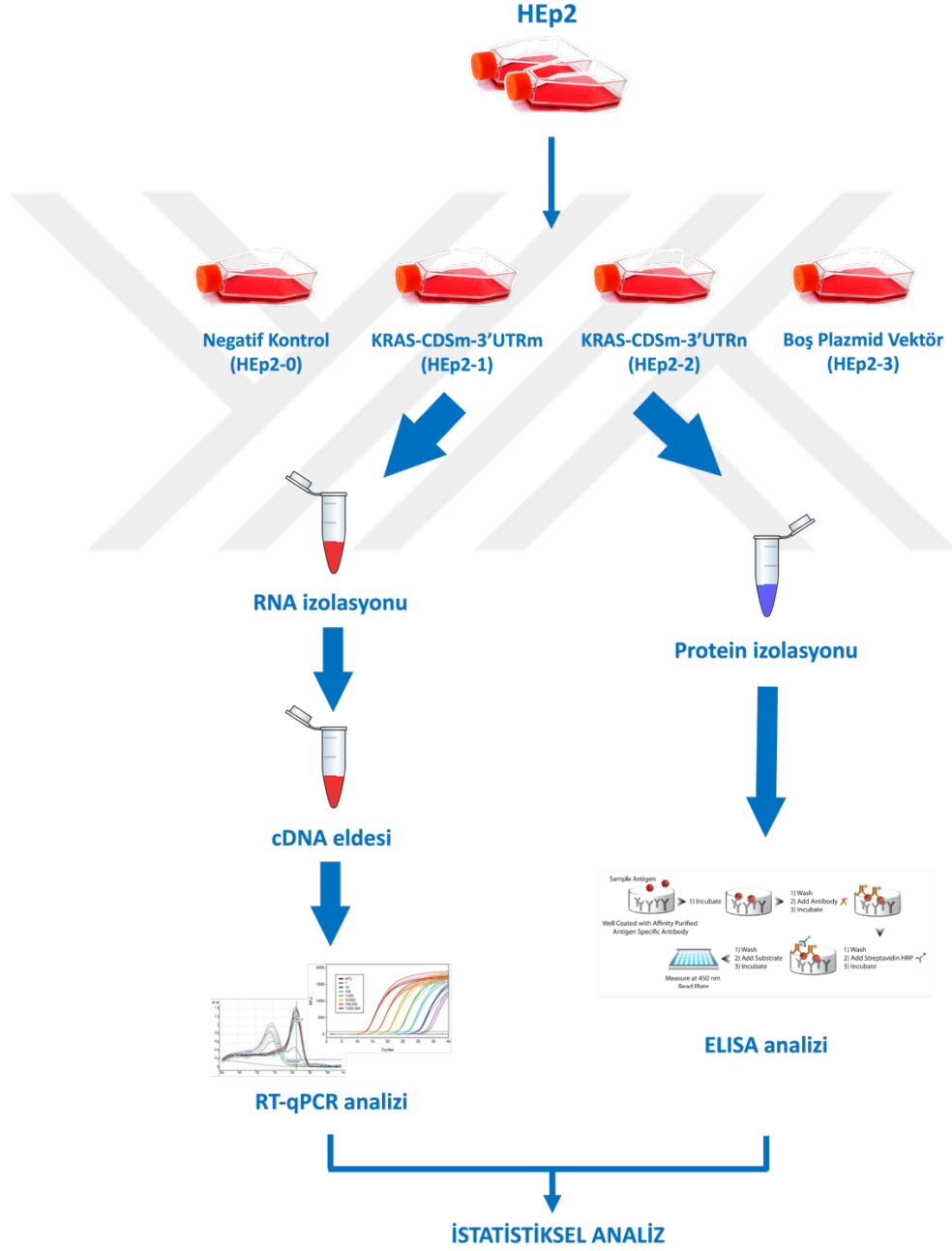
Bu mekanizmayı araştırmak amacıyla gerçekleştirilen önceki projemizde, LCS6 varyantının metastatik etkisi in vitro ve in vivo (xenograft fare deneyleri) deneyler ile araştırılmıştır. Yaptığımız in vitro deneylerde *KRAS* G12V mutasyonunun RAF/MEK/ERK yolağını aktive ettiği, PI3K/AKT/mTOR yolağını etkilemediği tespit edildi. Ayrıca LCS6'daki değişikliğin etkisini ortaya koymak için yapılan çalışmamızda ise, bu değişikliğin metastazı arttırdığı, ancak bu etkiyi RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları üzerinden yapmadığı saptandı. Bu varyantın metastaz üzerindeki etkisini hangi yolak üzerinden yaptığı ve bu yolaktaki etkin moleküllerin hangileri olduğu halen bilinmemektedir.

Bu nedenle, LCS6 varyantının mevcut metastatik etkisinin, metastazda etkili bir diğer yolak olan IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerinden oluşturabileceği düşünüldü. Mevcut çalışmada, geliştirilen hücre modelleri ile KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının (rs61764370) IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için gerekli olan etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (01.11.2022 tarih ve 2022/456 sayılı kararı) (Bkz. EK-A).

Mevcut çalışmanın deney akışı Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Deney akış şeması.

2.1. Hücre Kültürü

Projede, metastatik larinks kanseri hücre hattı olan HEp2 (**H**uman **E**pidermoid carcinoma-2) hücreleri ve viral yöntem aracılığıyla transfeksiyon işleminde virüs elde etmek için amfotropik retroviral paketlenme hücre hattı 2A (CRL-12013) hücreleri kullanıldı. Bu iki hücre hattı ATCC®’den (İngiltere) temin edildi. Ayrıca çalışmada kullanılması planlanan non-metastatik larinks kanseri UM-SSC-17A hücre hattı ise Michigan Üniversitesinden (Professor Thomas E. Carey) temin edildi.

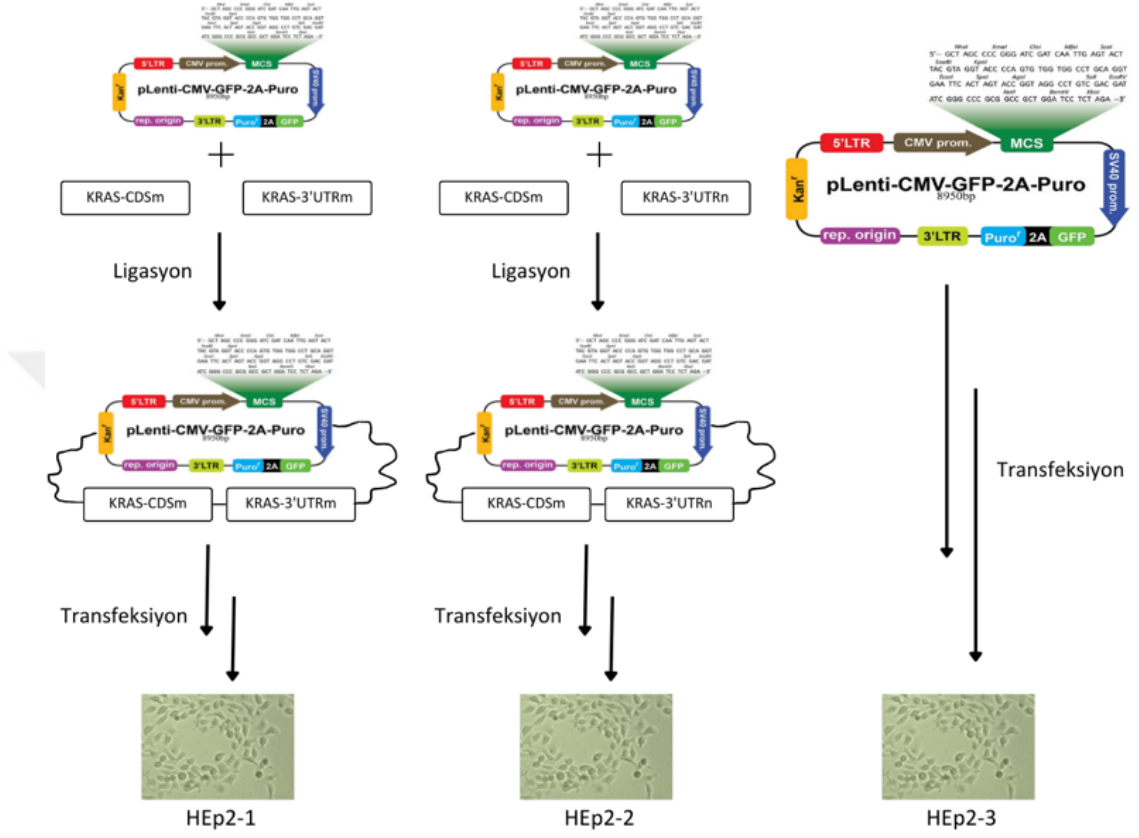
Hücreler %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom, Almanya) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) (Biochrom, Almanya) içeren DMEM (Gibco, ABD) medyumunda T-25 flasklar içerisinde kültüre edildi. Kültüre etme aşamasında, her flaska 4 ml medyum eklendi. Flasklar, 37°C’da %5 CO₂’li etüvde, 2 günde bir medyum değiştirilmek suretiyle kültüre edildi. Hücreler flask yüzeyinin %80’ini doldurduğunda 1xPBS (phosphate-buffered saline) (Gibco, ABD) ile yıkandıktan sonra %0,25 tripsin (Gibco, ABD) ile kaldırıldı. İnvert ışık mikroskopuyla (Leica, Almanya) 10x büyütmede hücrelerin flask zemininden kalktığının görülmesinin ardından tripsin inaktivasyonu amacıyla flasklara aynı hacimde kültür medyum eklenildi. O anda çalışılmayacak hücreler, daha sonra çalışmak üzere %10 DMSO’lu (Applichem, Almanya) dondurma medyumunda -86 °C’da stoklandı.

Kültüre edilen hücrelerin sayımı için, tripsin muamelesi ile flasktan kaldırılan hücreler 15 ml’lik falkon tüplere (Biosorfa, Çin) aktarıldıktan sonra 1200 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücre peleti üzerine 5 ml kültür medyum eklenildi ve pipetaj işlemiyle hücreler çözündürüldü. Bundan alınan 15 µl hücre süspansiyonu aynı hacimde %0,04 tripan mavisi boya solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra karışımın 15 µl’si hemositometri lamına (Hausser-Bright-Line, ABD) aktarıldı. Lam üzerinde mavi ile boyanmayan hücreler invert ışık mikroskobu altında (10x büyütme) sayıldı. 4 farklı bölge sayılarak ortalaması alındı. Elde edilen değere göre canlı hücre sayısı hesaplandı.

2.2. KRAS Geninin HEp-2 Hücrelerine Transfeksiyonu

Çalışmanın bu bölümü, 112S498 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi (Proje yürütücüsü Prof. Dr. Hasan ACAR) kapsamında gerçekleştirilmiştir. Özetle, önce

KRAS geni CDS ve 3'UTR bölgeleri mutant ve normal dizilerini içeren plazmid konstraktları oluşturuldu. Ardından bu konstraktlar ve boş plazmid vektör 2A hücrelerine aktarıldı. Son olarak da bu iki konstrakt ve boş plazmid vektörü 2A hücreleri vasıtasıyla HEp2 hücrelerine transfekte edildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. HEp2 hücrelerine konstrakt transfeksiyonu.

2.2.1. *KRAS* Plazmid Konstraktlarının Oluşturulması

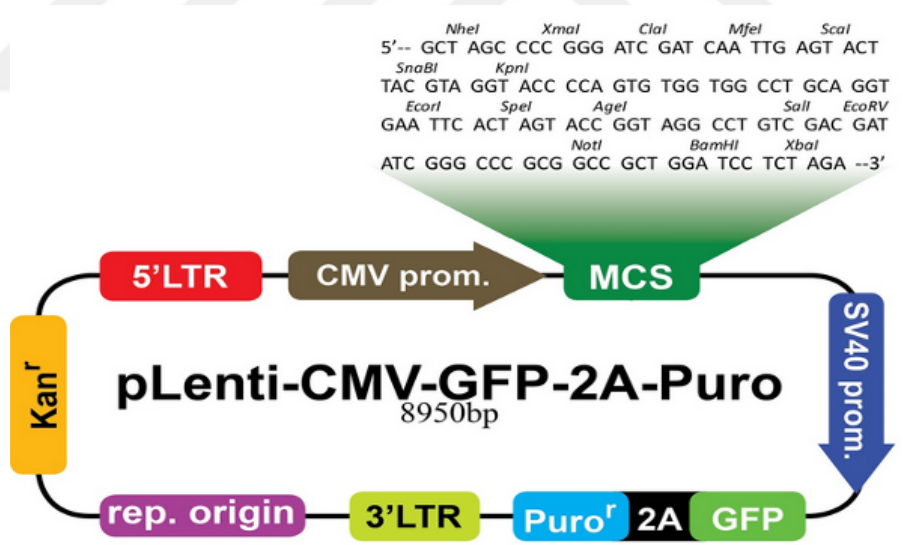
Çalışmanın bu aşamasında, *KRAS* geninin kodlanan bölgesi (CDS) ve 3'UTR dizilerinin beraber klonlanması amaçlandı (Bkz. EK-B). Bunun için;

- KRAS* geni CDS-G12V mutant ve 3'UTR normal olan konstrakt (KRAS-CDSm-LCS6n) ve
- KRAS* geni CDS-G12V mutant ve 3'UTR mutant olan konstrakt (KRAS-CDSm-LCS6m) oluşturuldu.

KRAS geni CDS-G12V mutant ve 3'UTR-LCS6 mutant dizileri için ticari olarak Addgene'den (Addgene, ABD) temin edilen plazmidler (sırasıyla #13544; #32003) kullanıldı. Bu plazmidlerin çoğaltılmasıyla hedef diziler elde edildi.

Bu işlem için öncelikle çoğaltılan plazmidlerden GF-1 Plazmid DNA izolasyon kiti (Vivantis, Malezya) ile DNA izole edildi. Ardından *KRAS* geni için spesifik olarak dizayn edilen ve enzim kesimi için kuyruklanan primerler aracılığıyla PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR ile ayrı ayrı çoğaltılan *KRAS* geni CDS ve 3'UTR dizleri ilk olarak *Sall* enzimiyle, sonrasında da *NheI* ve *XhoI* enzimleriyle (NEB, İngiltere) çift kesim olarak kesildi. Daha sonra bu iki dizinin ligasyonu gerçekleştirilerek lentiviral vektöre aktarılabilecek olan *KRAS* dizileri elde edildi. PZR ve ligasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi.

Elde edilen *KRAS*-CDSm-LCS6n ve *KRAS*-CDSm-LCS6m dizilerinin klonlanması için pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (8950 bp) bi-cistronik lentiviral vektörü (Applied Biological Materials Inc., Kanada) (Şekil 2.3) kullanıldı. Lentiviral vektörü kesmek için *NheI*, *Sall* ve *BamHI* enzimleri kullanıldı. Ardından ligasyon, kültür, plazmidten DNA izolasyonu basamakları gerçekleştirildi. İşlemler sonucunda pLenti-*KRAS*-CDSm-LCS6n ve pLenti-*KRAS*-CDSm-LCS6m konstraktları elde edilmiş oldu.



Şekil 2.3. pLenti-CMV-GFP-2A-Puro bi-cistronik vektör (www.abmgood.com).

2.2.2. Konstraktların 2A Hücrelerine Aktarılması

Viral vektörler, istenilen genin hücre içine transfeksiyonunda kullanılan birer araçtır. Virüsler genomlarını, enfekte ettikleri hücrelere aktarmak için özelleşmiş yapılardır. Viral yolla transfeksiyon da virüslerin bu özelliğinden yararlanılarak gerçekleştirilir. Biz de çalışmamızda transfeksiyon işlemini retrovirüslerin bir alt grubu olan lentivirüsler aracılığıyla gerçekleştirdik.

Bu amaçla, elde edilen pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n ve pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m konstraktları ile boş plazmid vektör çalışmada kullanılacak olan HEp2 hücrelerine kalıcı olarak aktarılması için öncelikle 2A hücrelerine aktarılması planlandı. Bu transfeksiyon işlemi için 2A hücreleri -86 °C'den alınarak T25 flasklarda kültüre edildi. %80 doluluk oranına ulaşan hücreler yukarıda belirtildiği şekilde tripsin aracılığıyla kaldırılarak sayım yapıldı. Sayılan hücrelerin 6 kuyucuklu kültür kaplarına 200-500 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi. 2A hücreleri ekimi yapılan kuyucuklar %80-90 doluluk oranına ulaştığında transfeksiyon işlemine geçildi.

Önceki basamaklarda elde edilen pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n ve pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m konstraktları ile boş plazmid vektör, her bir kuyucuk için 1 µg/100 µl konsantrasyonda olacak şekilde 125 µl hacimli serum içermeyen besiyerinde seyreltildi. Eş zamanlı olarak 6 µl Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, ABD) transfeksiyon ajanı da aynı hacimde serum içermeyen besiyerinde seyreltildi. 125'er µl hacimli bu iki tüp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesinin ardından birleştirildi ve karışım lipid kompleksi oluşturması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Bu 250 µl hacimli karışım, 2A hücresi ekilen ve %80-90 doluluk oranına ulaşan her bir kuyucuğa damla damla eklendi ve 37 °C'da CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyonu gerçekleştirildi. Transfekte olan 2A hücreleri floresan mikroskobu altında GFP belirteci ile incelendi. Yapılan inceleme sonucunda transfeksiyon işleminin başarısı belirlendikten sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak HEp2 hücrelerinin transfeksiyonu için kullanıldı.

2.2.3. Konstraktların 2A Hücreleri Aracılığıyla HEp2 Hücrelerine Transfeksiyonu

2A hücrelerinin transfeksiyonu sonucunda plazmid konstraktlarını taşıyan virüsler elde edildi ve bu virüsler HEp2 hücrelerini transfekte etmek için kullanıldı. Bunun için 2A hücreleriyle eş zamanlı olarak başka bir 6 kuyucuklu kültür kabına yukarıda anlatıldığı şekilde HEp2 hücreleri ekildi. Hücreler, tutunmaları için 37 °C'da CO₂'li etüvde inkübe edildi. Transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen 2A hücrelerinin üzerindeki besiyeri alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, çöken ölü hücrelere dokunulmadan dikkatlice alındı ve 6 kuyucuklu kültür kabındaki, 2 kez

1xPBS ile yıkanan HEp2 hücrelerinin üzerine eklendi. Bu deney 6, 12, 24 ve 48 saat olmak üzere 4 farklı zaman diliminde gerçekleştirildi. Bunlardan en uygun sürenin 24 saat olduğuna karar verildi. Transfekte olmayan hücreleri elimine etmek amacıyla 24 saatin sonunda hücelere 4 µg/ml dozdan başlayıp yavaş yavaş dozu azaltmak suretiyle puromisin antibiyotik (Gibco, ABD) uygulaması yapıldı. Puromisin uygulamasından yaklaşık 1 ay sonra hücre ölümü azalan hücrelerin floresan mikroskopu altında GFP pozitifliği kontrol edildi. %80-90 GFP pozitifliği olan hücreler, düşük doz puromisin (0,2 µg/µl) içeren besiyerlerinde bir süre daha kültüre edildikten sonra, ileride eş zamanlı yapılacak deneylerde kullanılmak amacıyla -86°C’da yukarıda anlatıldığı şekilde stoklandı.

2.2.4. Konstrakt İçeren HEp2 Hücrelerinin İsimlendirilmesi

Çalışmamızda konstrakt içeren ve içermeyen HEp2 hücreleri, kolay takip edilebilmesi için aşağıdaki şekilde isimlendirilmiştir (Tablo 2.1).

- i. Plazmid transfeksiyonu yapılmayan HEp2 hücresi (kontrol) → HEp2-0
- ii. pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m konstraktını içeren HEp2 hücresi → HEp2-1
- iii. pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n konstraktını içeren HEp2 hücresi → HEp2-2
- iv. pLenti-CMV-GFP-2A boş vektörü içeren HEp2 hücresi → HEp2-3

Tablo 2.1. HEp2 hücrelerinin konstrakt durumlarına göre isimlendirilmesi.

HÜCRE İSMİ	KRAS-CDS	KRAS-3’UTR
HEp2-0 (kontrol)	Hiçbir konstrakt içermeyen	
HEp2-1	G12V mutant	T>G mutant
HEp2-2	G12V mutant	Normal
HEp2-3	Boş plazmid vektör	

2.3. Gen Ekspresyon Analizi

Hipotez çerçevesinde, yukarıda bahsedildiği şekilde oluşturulan HEp2-0, HEp2-1, HEp2-2 ve HEp2-3 hücrelerinde mRNA ve protein seviyesinde ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. RNA ve protein analizlerinin optimizasyonu HEp2-0 hücreleri kullanılarak yapıldı.

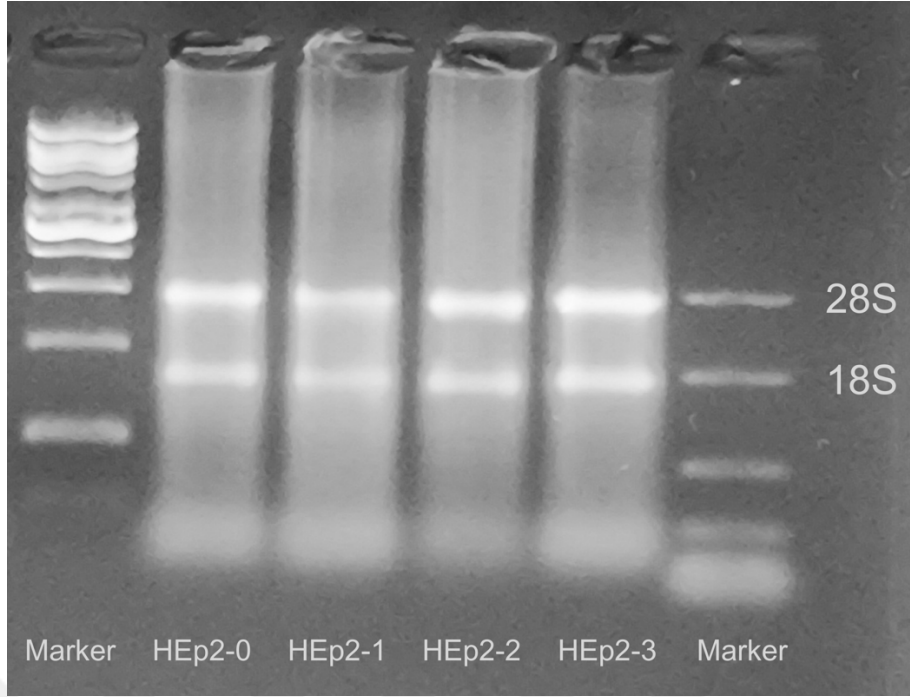
2.3.1. RNA İzolasyonu

Kültüre edilen her bir hücre yaklaşık %80 doluluk oranına ulaştığında flasklardan tripsin ile kaldırılarak 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Ardından 1200 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 2 kez 1xPBS ile yıkandı ve 1000 µl TRIzol® (Invitrogen, ABD) eklenerek pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen hücre-TRIzol süspansiyonu 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktararak üzerine 200 µl kloroform eklendi. Tüp 5 kez alt üst edilerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından karışım +4 °C soğutmalı santrifüjde 12 000xg devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra ortaya çıkan faz ayrımında, şeffaf üst kısım alınarak 1,5 ml'lik yeni bir nükleaz-free ependorf tüpe aktarıldı. Yaklaşık 500 µl olan RNA karışımına 500 µl izopropanol eklendi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin sonunda +4 °C soğutmalı santrifüjde 12 000xg devirde 10 dakika santrifüj edilerek RNA'nın dibe çökmesi sağlandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından 3 kez (sırasıyla %70, %70 ve %95) -20 °C etanol ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her yıkamadan sonra +4 °C soğutmalı santrifüjde 7500xg devir hızında 5'er dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Doğal kurutma yöntemi ile kurutulan RNA peleti, 50 µl steril ddH₂O ile çözdürüldü.

2.3.2. RNA Miktarı ve Kalitesi

RNA izolasyonunda sonra her örnek spektrofotometre cihazı (ACTGene, ABD) ile ölçülerek RNA miktar ve kalite tayini yapıldı. Ölçümlerde RNA peletinin çözdürüldüğü ddH₂O blank olarak kullanıldı. Ölçümler, RNA okuma moduna alınan spektrofotometre ile, 2 µl RNA örneği kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler esnasında nükleaz-free pipet uçları kullanıldı. RNA miktarı ng/µl biriminde kaydedildi. İzolasyon esnasında oluşabilecek genomik DNA ve protein kontaminasyonların belirlenmesi amacıyla A260/A280 ve A260/A230 ölçüm oranları değerlendirildi.

Ölçümleri yapılan RNA örnekleri, RNA kalitesinin belirlenmesi için 1 µg/5 µl RNA örneği üzerine 5x yükleme boyasından 2 µl eklenerek Etidyum Bromür eklenen %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel UV-transluminatörde görüntülenerek 18S ve 28S rRNA (ribozomal RNA) bantlarının kalitesi değerlendirildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hücrelere ait total RNA agaroz jel görüntüsü.

Total RNA izolasyonu sırasında oluşabilecek genomik DNA (gDNA) kontaminasyonu ortadan kaldırmak amacıyla, üretici firma (Thermo Fisher Scientific, ABD) protokolüne göre, DNase-I enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Buna göre 1 µg/8 µl total RNA'ya 1 µl DNase-I reaksiyon tamponu ve 1 µl DNase-I enzimi eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda reaksiyonun durdurulması için, reaksiyon karışımına 1 µl 50 mM EDTA eklendi ve 65 °C'da 10 dakika inkübe edildi. İşlem sonucunda gDNA kalıntıları ortadan kaldırılmış oldu.

İzole edilen RNA'lar ölçümleri yapıldıktan ve gDNA'dan arındırıldıktan sonra direkt cDNA sentezinde kullanıldı ya da hemen kullanılmayacaksa kullanılabilecek kadar -86 °C'da muhafaza edildi.

2.3.3. cDNA Eldesi

cDNA sentezi için ticari RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Bunun için 1 µg/11 µl DNase-I ile gDNA uzaklaştırılmış total RNA kalıp olarak kullanılarak protokole göre revers transkripsiyon (RT) gerçekleştirildi. 1 µg/11 µl total RNA'ya 1 µl oligo dT ve 1 µl random hekzamer primer karışımı eklenerek primerlerin bağlanması için 65 °C'da 5 dakika inkübe edildi. Ardından 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 2 µl dNTP, 1 µl revers transkriptaz enzimi ve 1µl RNase inhibitörü içeren RT reaksiyon karışımından 8 µl

ilave edilerek 25 °C’da 5 dakika, 42 °C’da 1 saat inkübasyon gerçekleştirilerek cDNA elde edildi. İşlemin sonunda karışım, enzim inaktivasyonu için 70 °C’da 10 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA kullanılıncaya kadar -20 °C’da saklandı.

2.3.4. Primer Dizaynı ve Sulandırılması

Çalışmada kullanılan primerler ya literatürdeki farklı makalelerden alındı ya da online araçlar kullanılarak dizayn edildi. Dizayn edilen primerler için genlerin mRNA dizileri Gen Bankasından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) temin edildi. IDT PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) ve Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) online tasarım araçları kullanılarak bu mRNA dizilerine uygun primerler dizayn edildi (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. RT-qPZR analizinde kullanılan primer dizileri.

Hedef Gen	Primer Dizisi
IL-6_F	5'-TGGCAAAAAGGAGTCACACA-3'
IL-6_R	5'-CCCAAGCCTGGATTATGAAG-3'
STAT3_F	5'-ACCAGCAGTATAGCCGCTTC-3'
STAT3_R	5'-GCCACAATCCGGGCAATCT-3'
JAK2_F	5'- GATGAGAATAGCCAAAGAAAACG-3'
JAK2_R	5'- TTGCTGAATAAATCTGCGAAAT-3'
NF-κB_F	5'-ATGGAGAGTTGCTACAACCCA-3'
NF-κB_R	5'-CTGTTCCACGATCACCAGGTA-3'
GAPDH_F	5'-GGAGCGATCCCTCCAAAAT-3'
GAPDH_R	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'
AKT_F	5'-TCGTGTGGCAGGATGTGTAT-3'
AKT_R	5'-ACCTGGTGTTCAGTCAGAGG-3'

Dizayn işleminden sonra primerler 30 nMol miktarında sipariş edildi (Macrogen, Güney Kore). Liyofilize pelet halinde gelen primer tüpleri 3000xg devirde 3 dakika santrifüj edilmesinin ardından 50 pMol/μl konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz-free ddH₂O ile sulandırılarak ana stoklar hazırlandı. Ana stoklardan her bir gen için forward ve reverse primer alt stokları oluşturularak -20 °C’da saklandı.

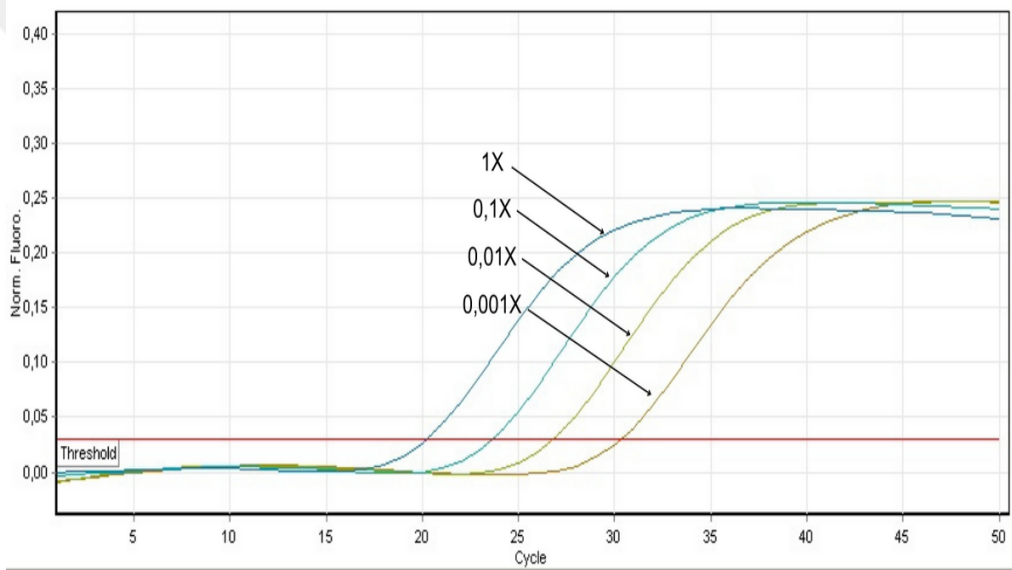
2.3.5. Referans Gen Seçimi

Referans gen seçimi için literatürde sıklıkla kullanılan *GAPDH*, *ACTB* (β-aktin), *B2M* (β-2-mikroglobulin) ve *HPRT1* (hypoksantin fosforiboziltransferaz 1) genleri aday referans gen olarak belirlendi. Yapılan optimizasyon çalışmaları

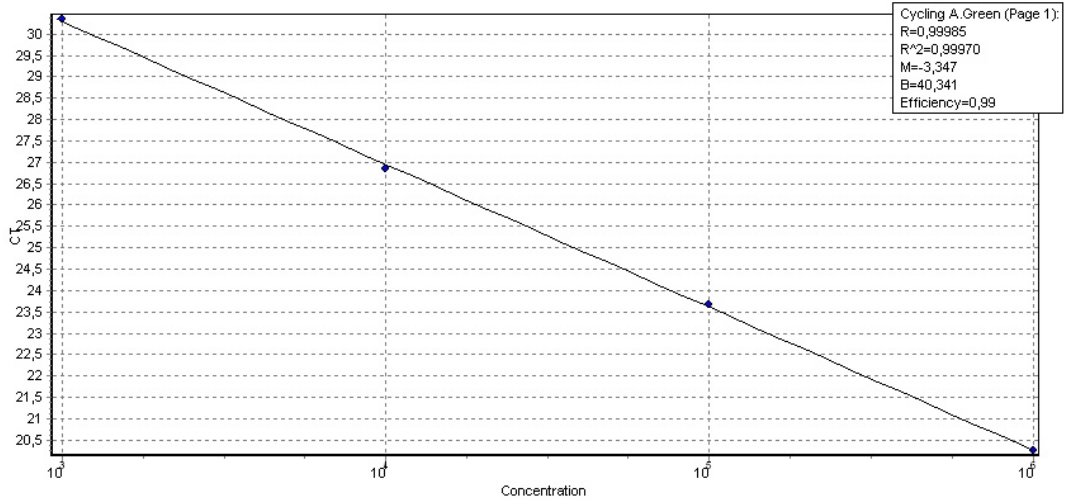
sonucunda en stabil olarak ölçümlendiğimiz *GAPDH* geninin referans gen olarak kullanılmasına karar verildi.

2.3.6. Seri Sulandırma ve Primer Etkinliğinin Hesaplanması

Elde edilen cDNA örneklerinden 5'er µl alınarak cDNA havuzu oluşturuldu. Oluşturulan bu cDNA havuzu her defasında 1/10 olacak şekilde ddH₂O ile seri sulandırılarak 1X, 0,1X, 0,01X ve 0,001X konsantrasyonlarda cDNA'lar elde edildi. Bu 4 seri konsantrasyondaki cDNA'lardan gerçekleştirilen Real-Time PZR işlemi sonucunda elde edilen C_t (cycle of threshold) değerlerinden dağılım grafiği çizildi ve doğru denklemleri elde edildi. Doğru denklemlerinden de eğimleri hesaplanarak $E=10^{-1/\text{eğim}}$ formülünden primer etkinlik değerleri hesaplandı (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6).



Şekil 2.5. Primer etkinliğinin hesaplanması için seri sulandırma qPZR amplifikasyon eğrisi.

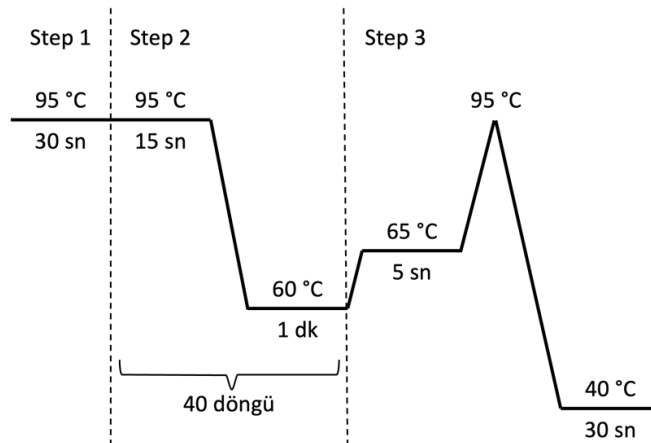


Şekil 2.6. Primer etkinliği doğru denklemi ve grafiği.

2.3.7. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR/qPZR)

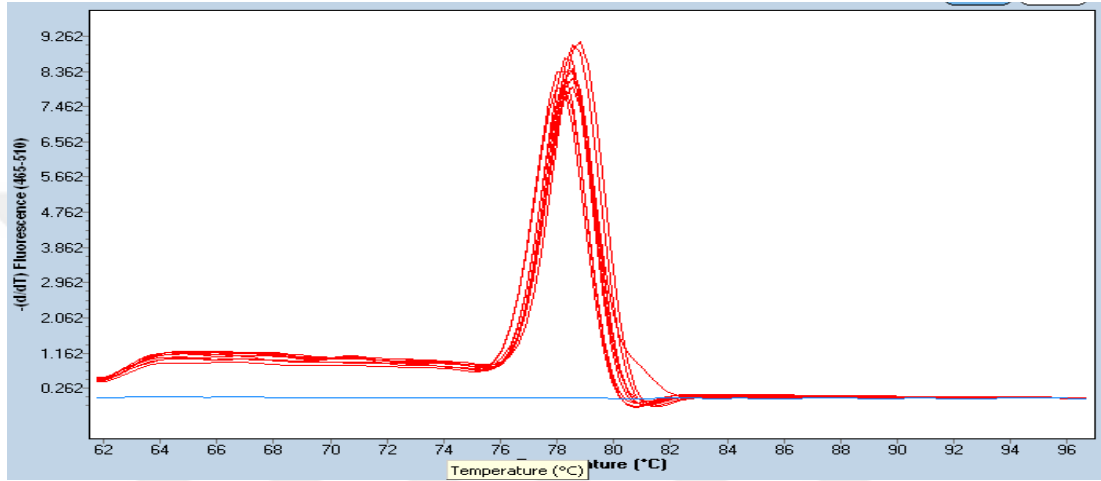
Konstrakt içeren ve içermeyen hücrelerde hedeflenen gen ekspresyon düzeylerini ölçebilmek için, elde edilmiş olan her bir cDNA'dan qPZR işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için, dizayn edilen spesifik primerler ve interkalasyon ajanı olarak da çift iplikli DNA'ya bağlanabilen SyberGreen floresan indikatörü kullanıldı. RT-qPZR deney protokolü; 5 µl 2x SyberGreen karışımı (BioRad, ABD), son hacimde her biri 250 nM konsantrasyonda olacak şekilde forward ve reverse primerler, 2 µl cDNA ve toplam hacim ddH₂O ile 10 µl'ye tamamlanarak gerçekleştirildi.

Reaksiyonlar için Light Cycler 480 II (Roche, Almanya) cihazı ve steril, nükleaz-free 96 kuyucuklu qPZR plateleri kullanıldı. qPZR deney profili 1 kez 95 °C'da 30 saniye ve 40 döngü (95 °C'da 15 saniye, 60 °C'da 60 saniye) olarak ayarlandı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. qPZR protokolü.

Her döngüde ışıma yapan SyberGreen miktarının belirlenmesi için cihazın hassas kameraları ile her döngünün sonunda otomatik ölçümler gerçekleştirildi. Bu 40 döngü tamamlandıktan sonra 65 °C'dan 95 °C'a kadar 0,1 °C/saniye hızında kademeli sıcaklık artışı gerçekleştirilerek her 1 °C sıcaklık artışında optik ölçüm yapılarak erime eğrisi (melting curve) grafiği çizildi (Şekil 2.8). Deneylerde elde edilen optik analiz sonuçları Cq (Cycle of quantification) olarak kaydedildi. Negatif kontrol olarak her deneyde cDNA yerine aynı hacimde ddH₂O eklenerek reaksiyona dahil edildi.



Şekil 2.8. qPZR erime eğrisi (melting curve) grafiği.

2.3.8. Protein İzolasyonu

Çalışmanın bu aşamasında ELISA analizinde kullanılmak üzere hücre kültürlerinden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için izolasyondan 48 saat önce yukarıda belirtildiği şekilde hücre sayımı yapılarak 12 kuyucuklu pleyte her kuyucuğa 2×10^5 hücre olarak şekilde ekim yapıldı. Her kuyucuğa 1'er ml medyum eklendi. 48. saatin sonunda hücre kültür süpernatantı buz üzerinde bekletilmiş ayrı bir soğuk endorf tüpe alınarak ayrıldı. Hücreler ise 2 kez soğuk 1xPBS ile yıkandı. Son yıkama solüsyonu da uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 100 µl RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich, Almanya) ve uygun oranda proteaz inhibitörleri karışımı eklenerek hücreler kazıyarak kaldırıldı. Ardından pleyt mikroskop altında gözlenerek kalkmayan bölge olup olmadığı kontrol edildi. Bütün hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra karışım yine buz üzerinde bekletilmiş olan soğuk endorf tüpe aktarıldı. Karışım iyice vortekslendikten sonra buz üzerinde 40 dakika beklemeye alındı. Bu süre boyunca her 5-10 dakikada bir tekrar vortekslenerek tüp içeriğinin karışması sağlandı. 40 dakikanın sonunda +4 °C soğutmalı santrifüjde 13 000 rpm'de

15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant yeni bir soğuk ependorf tüpe alınarak pelet atıldı. Elde edilen proteinler ya hemen çalışmada kullanıldı ya da hemen kullanılmayacaksa etiketlenerek daha sonra kullanılmak üzere -86 °C’da stoklandı.

2.3.9. ELISA Analizi

ELISA analizi için bir önceki basamakta tarif edildiği şekilde izole edilip stoklanan total proteinler kullanıldı. IL-6 analizi için Human Interleukin 6 ELISA Kit (Cook Koon Bio, Çin) ve STAT3 için de Human STAT3 ELISA Kit (FineTest, Çin) ticari kitleri kullanıldı. İki kit de sandviç ELISA yöntemini kullanmaktaydı. Çalışmanın optimizasyon aşamasında hem hücre kültür süpernatantından hem de RIPA Buffer® yardımıyla hücre içinden elde edilen proteinlerden analizler gerçekleştirildi. Sonuçlarda anlamlı bir fark olmadığı görülen proteinlerde çalışmanın geri kalanı RIPA Buffer® ile izole edilen proteinlerden gerçekleştirildi.

İlk aşamada standart ve kontrol kuyucukları hazırlandı. Bunun için standart kuyucuklarına 50’şer µl standartlar, kontrol kuyucuğuna da yine 50 µl kontrol numunesi eklendi. Ardından örneklerin eklenmesine geçildi. Bunun için her örnekten -86 °C’da stoklanan örneklerden 10’ar µl alınarak ddH₂O ile 100 µl’ye sulandırıldı. Bu dilüe edilen örneklerden kuyucuklara 10’ar µl yüklendi ve üzerlerine 40’ar µl sample diluent solution eklendi. Blank kuyucuğuna ise bu aşamada hiçbir şey eklenmedi.

Daha sonra her kuyucuğa 100 µl HRP-conjugate reagent eklenerek mikropleytin üzeri kapatıldı ve 60 dakika 37 °C sallamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 5 kez yıkandı. Ardından her kuyucuğa 50’şer µl önce chromogen A solüsyonu akabinde de chromogen B solüsyonu eklendi. Karışım yavaşça çalkalanarak mikropleyt, ışık geçirmez bir kutu içinde 15 dakika 37 °C etüvde bekletildi. Sürenin sonunda kuyucuklara 50’şer µl Stop Solution eklenerek reaksiyon durduruldu. Bu aşamada mavi rengin hızla sarıya döndüğü gözlemlendi. Ve stop solution eklenmesinin hemen ardından Clariostar® otomatik mikropleyt okuyucusu (BMG Labtech, İngiltere) ile 450 nm dalga boyunda örneklerin ölçümleri gerçekleştirildi. Standartların konsantrasyonuna ve karşılık gelen optik dansite (OD) değerlerine göre, standart

eğrisinin lineer regresyon denklemi çıkarıldı ve bu denklem kullanılarak ölçülen OD değerlerinden örneklerin konsantrasyonu hesaplandı. Tüm standart ve örnekler en az üçer kez çalışıldı.

2.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmada kullanılan mutant geni içeren ve içermeyen hücreler ile negatif kontroller arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldı ve *p değeri* hesaplanarak anlamlılık değerlendirildi. İstatistiksel açıdan $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Veriler GraphPad Prism® V.9.5.1 (GraphPad software Inc., ABD) programı ile *one-way ANOVA* ve *Student's t testi* uygulanarak değerlendirildi.

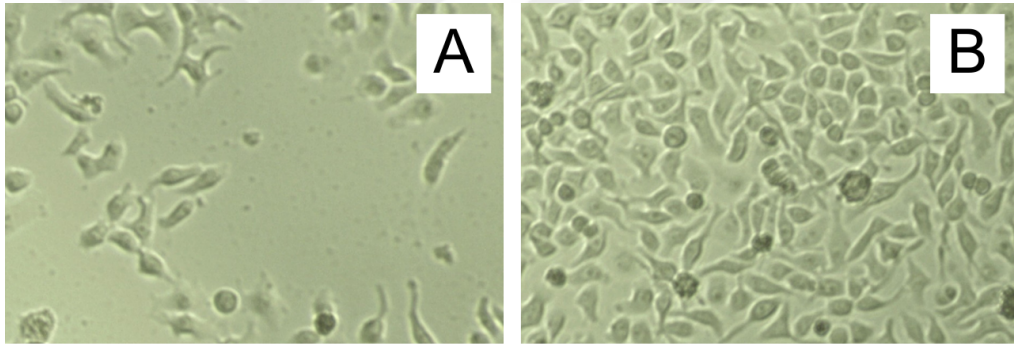


3. BULGULAR

Çalışmada lentiviral yöntemle mutasyonlu ve mutasyonsuz *KRAS* geni transfekte edilen HEp2 hücreleri kullanılmıştır.

3.1. Hücre Kültürü

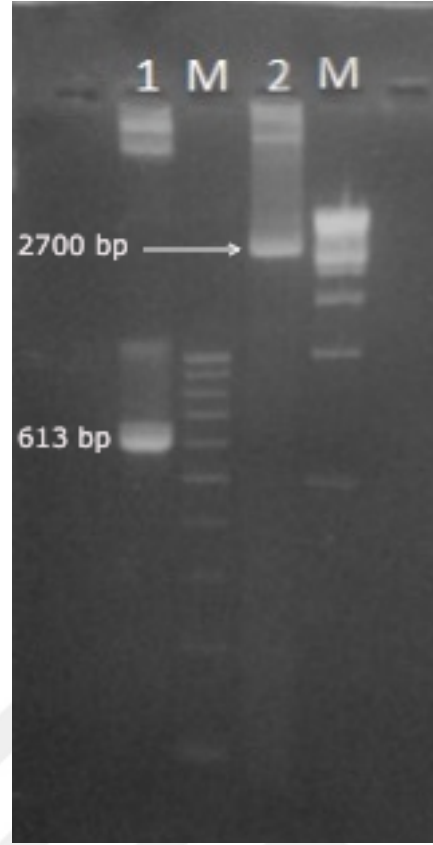
Çalışmada *KRAS*-3'UTR bölgesinde let-7 miRNA'sının bağlandığı bölge olan LCS6 (let-7 complementary site 6)'daki nükleotid değişikliğinin (rs61764370) larinks kanserinde, IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine etkisinin incelenmesi için metastatik bir larinks kanseri hücre hattı olan HEp2 hücreleri kullanıldı. Ayrıca mutant ve normal geni HEp2 hücrelerine transfekte etmek amacıyla 2A hücrelerinden yararlanıldı. Bu hücreler 37 °C'da %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi ve yeterli doluluk oranına ulaşp ulaşmadıkları invert ışık mikroskopunda görüntülendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. HEp2 hücre kültürü invert ışık mikroskop görüntüsü (A) düşük yoğunluk, (B) yüksek yoğunluk (20x büyütme).

3.2. *KRAS* Konstraktlarının Oluşturulması

KRAS konstraktlarını elde etmek için yukarıda belirtildiği şekilde ticari olarak temin edilen plazmidler kullanıldı. Bu plazmidler çoğaltılarak ve PZR ile *KRAS* geni CDS-G12V mutant ve 3'UTR-LCS6 mutant dizileri ayrı ayrı elde edildi. Elde edilen ürünler jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri sağlandı (Şekil 3.2).

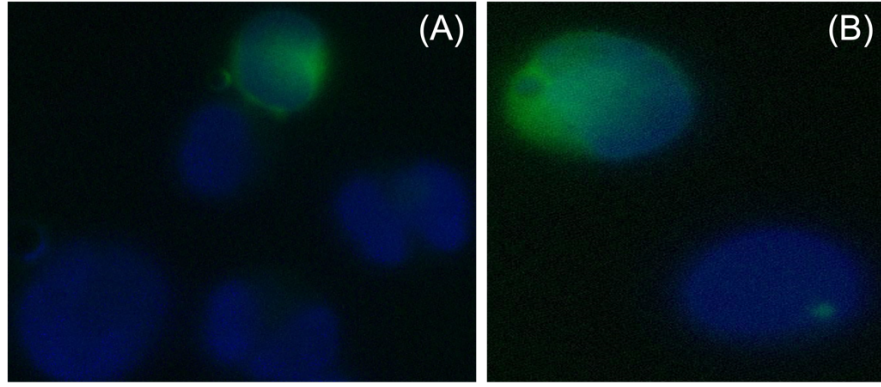


Şekil 3.2. *KRAS* konstraktlarının agaroz jel görüntüsü (1) CDS 613 bp, (2) 3'UTR dizisi 2700 bp PZR ürünleri, (M) marker (TÜBİTAK 112S498 nolu projeden alınmıştır).

Elde edilen *KRAS* dizileri ligasyon işlemiyle birleştirildikten sonra pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (8950 bp) bi-cistronik lentiviral vektörüne aktarıldı. Bunun için yukarıda belirtildiği şekilde enzim kesimi ve ligasyon işlemleri gerçekleştirildi. Sonuçta lentiviral pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n ve pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m konstraktları elde edilerek stoklandı.

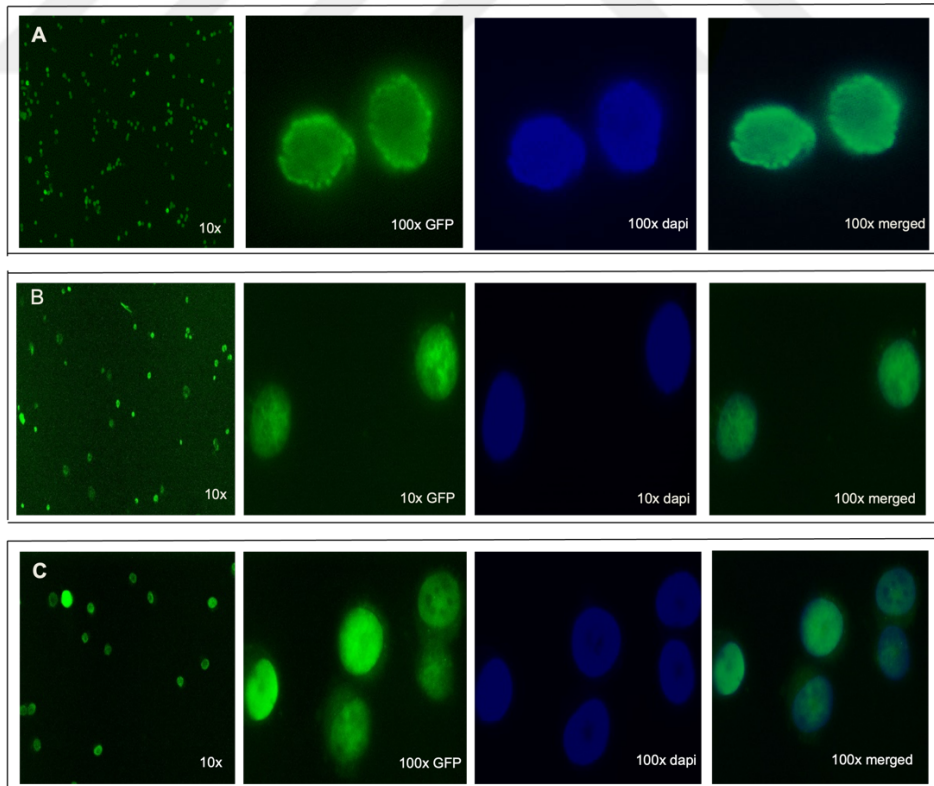
3.3. Konstraktların HEp2 Hücrelerine Transfeksiyonu

Konstraktlar HEp2 hücrelerine aktarılmadan önce bu transfeksiyonda kullanılmak üzere Lipofectamine® 2000 ile 2A hücrelerine aktarıldı. Bu işlem floresan mikroskopunda kontrol edildi. 2A hücrelerinde floresan ışığa gözlenmesi ile işlem başarılı kabul edildi (Şekil 3.3).



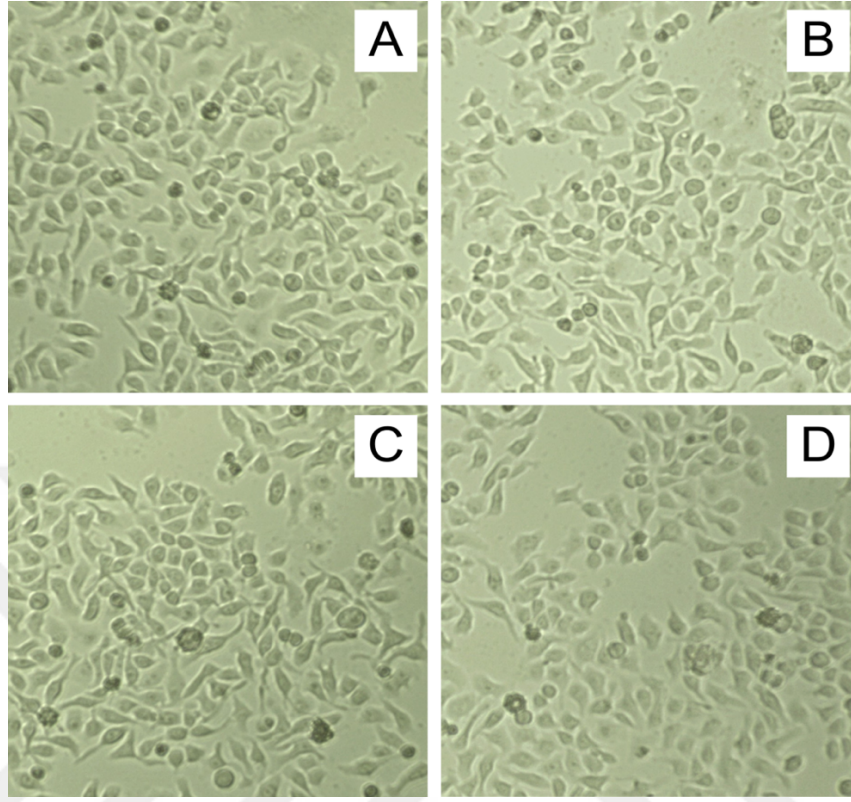
Şekil 3.3. 2A hücrelerinin (A) pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m ve (B) pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n plazmidleri ile transfeksiyonu sonrası floresan mikroskop görüntüsü (TÜBİTAK 112S498 nolu projeden alınmıştır).

Plazmid konstraktları içeren 2A hücrelerinden viral partiküller elde edildi ve bu viral partiküller HEp2 hücrelerine transfekte edildi. Puromisin antibiyotik seleksiyonu sonucu, transfekte olmayan hücreler elimine edildi. Aynı zamanda kontrol amaçlı negatif kontrol konstraktı (pLenti-CMV-GFP-2A-Puro) aynı yöntem kullanılarak HEp2 hücrelerine aktarıldı. Kültüre edilmeye devam eden hücreler floresan mikroskobu altında kontrol edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. (A) HEp2-1; (B) HEp2-2 ve (C) HEp2-3 hücrelerinin transfeksiyonun ardından puromisin seleksiyonu sonrası floresan mikroskop görüntüsü (TÜBİTAK 112S498 nolu projeden alınmıştır).

Transfeksiyon işlemi sonrasında elde edilen HEp2 hücreleri kültüre edildi ve %80-90 doluluk oranına geldiklerinde kaldırılarak -86 °C’da stoklandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hücre kültürü invert ışık mikroskop görüntüsü (A) HEp2-0, (B) HEp2-1, (C) HEp2-2 ve (D) HEp2-3 hücreleri (20x büyütme).

3.4. UM-SCC-17A Hücre Hattı Bulguları

HEp2 hücrelerine gerçekleştirilen transfeksiyon işlemi, non-metastatik larinks kanseri hücre hattı olan UM-SCC-17A hücrelerinde de aynı şekilde gerçekleştirildi. Ancak pLenti-KRAS-CDSm-LCS6n ve boş plazmid vektör konstraktlarını içeren hücreler başarıyla elde edilirken, pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m plazmid konstraktını içeren UM-SSC-17A hücrelerinin puromisin antibiyotik seleksiyonu sırasında toplu olarak apoptoza gittiği gözlenmiştir. Bu durumun puromisin seleksiyonundan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmesinin ardından GFP pozitif hücrelerin seleksiyonunun puromisin yerine flow-sitometri ile yapılmasına karar verildi.

pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m plazmid konstraktının UM-SSC-17A hücrelerine transfeksiyonu sonrası elde edilen hücreler, flow-sitometri yöntemi ile izole edildi. İzole edilen GFP pozitif hücreler yukarıda anlatıldığı gibi kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin yine önceki yöntemlerden elde edilen hücreler gibi öldükleri

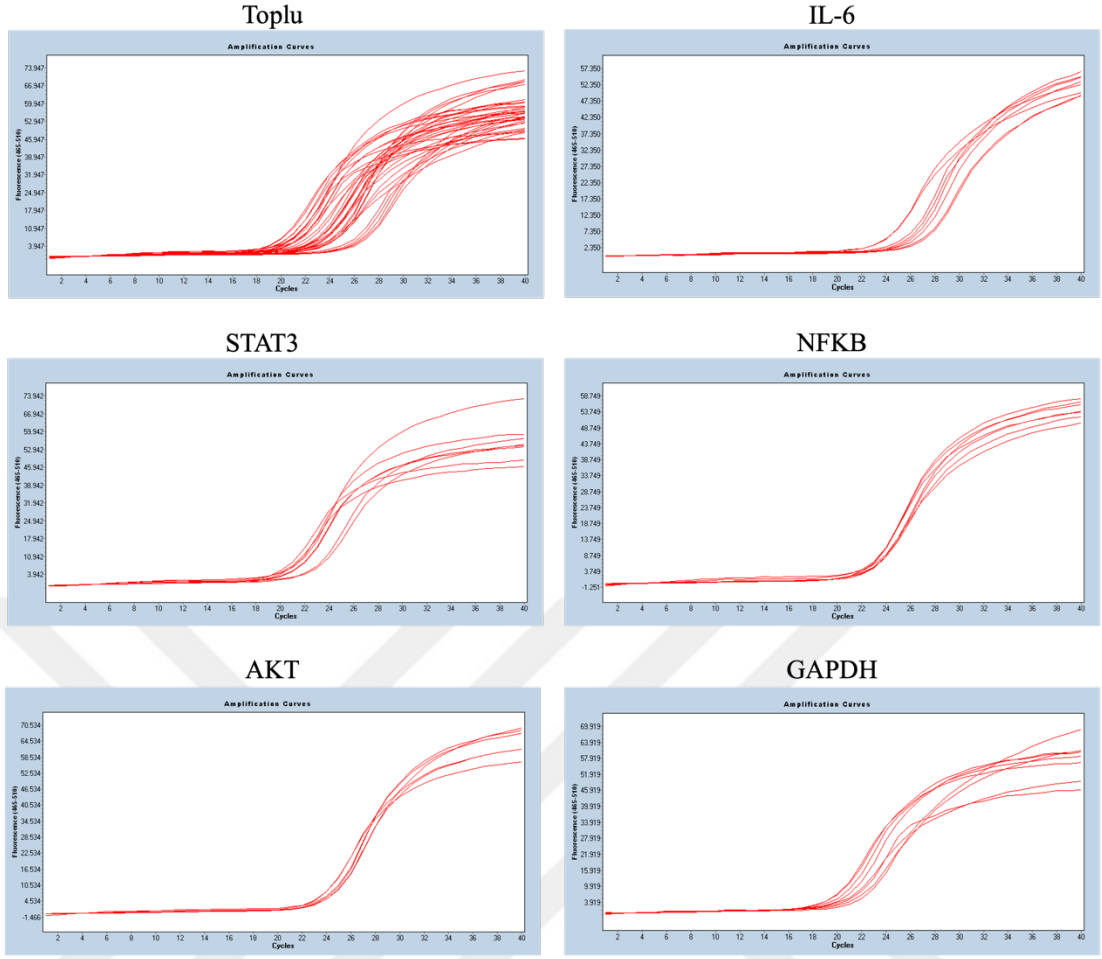
tespit edildi. Her iki yöntemden elde edilen bulgular birbirine benzer sonuçlar alındığı için pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m konstraktının UM-SSC-17A hücresi için ölümcül etkisi olabileceği düşünüldü ve UM-SSC-17A hücreleri çalışmadan çıkarıldı.

3.5. Hedef Genlerin Ekspresyon Analizleri

KRAS geninin 3'UTR-LCS6 varyantının (rs61764370) IL-6/JAK2/STAT3 yolağı üzerindeki etkisinin incelenmesi için hedef genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyonları real-time qPZR analizi ile ve protein seviyesindeki ekspresyonları da ELISA analizi ile incelendi.

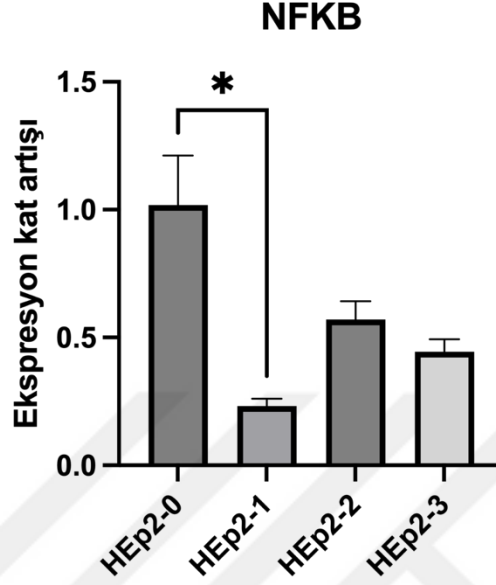
3.5.1. Real-Time qPZR Analizi

qPZR analizi için öncelikler hiçbir plazmid konstraktı içermeyen HEp2-0 hücresi kullanılarak optimizasyon işlemleri yapıldı. Referans gen seçimi için yapılan optimizasyon sonucunda *GAPDH*, *ACTB* (β -aktin), *B2M* (β -2-mikroglobulin) ve *HPRT1* (hypoksantin fosforiboziltransferaz 1) genleri arasından en uygun referans kontrol genin *GAPDH* olduğu kararlaştırıldı. Daha sonra ise tüm hücre gruplarında *IL-6*, *STAT3*, *JAK2*, *NF- κ B* ve *AKT* genlerinin analizi gerçekleştirildi (Şekil 3.6). Hedef genler referans gen ile kıyaslanarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak rölatif kat değişiklikleri belirlendi. Veriler GraphPad Prism® V.9.5.1 (GraphPad software Inc., ABD) programı ile *one-way ANOVA* ve *Student's t testi* uygulanarak değerlendirildi. $P < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.



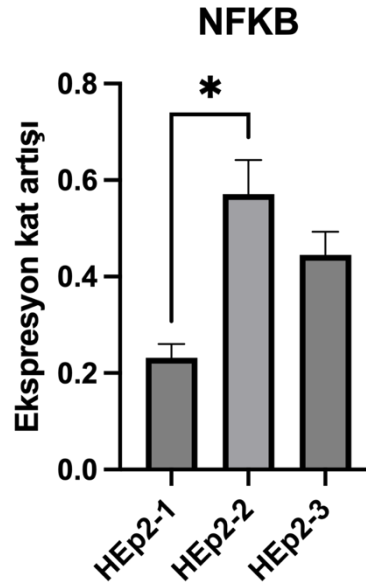
Şekil 3.6. Hedef genlerin real-time qPCR amplifikasyon eğrileri.

NF- κ B gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde; 4 hücre grubu birlikte kıyaslandığında, yalnızca HEp2-1 hücresi ile kontrol hücresi (HEp2-0) arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi ($p=0,0217$) (Şekil 3.7).



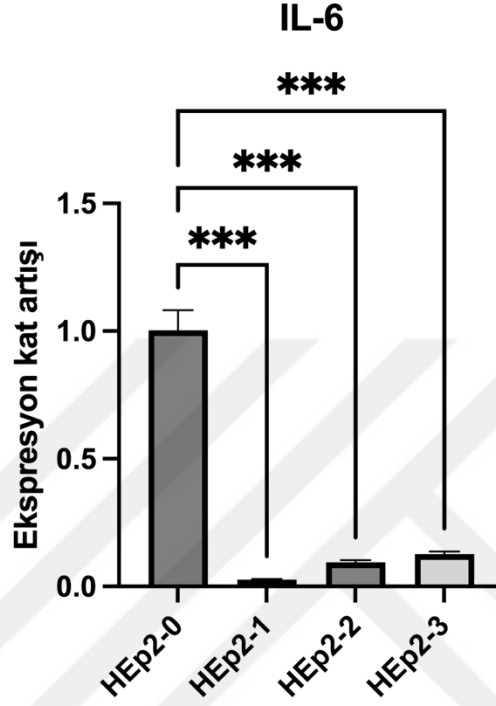
Şekil 3.7. Tüm hücre grupları için *NF- κ B* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Konstrakt içeren hücre grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise *NF- κ B* seviyesi HEp2-1 hücresinde HEp2-2 hücresine göre anlamlı oranda düşük bulundu ($p=0,039$) (Şekil 3.8).



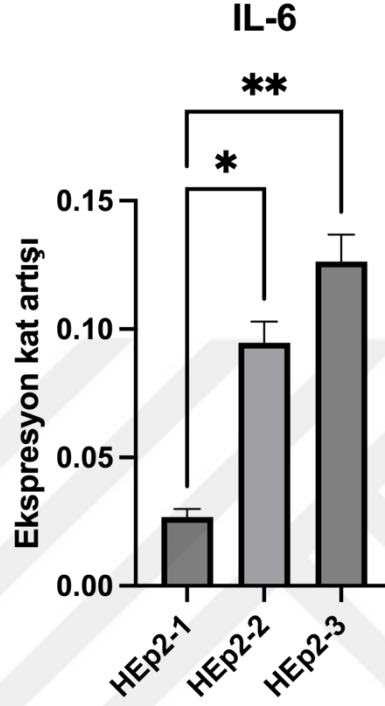
Şekil 3.8. Konstrakt içeren hücre grupları için *NF- κ B* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

***IL-6* gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde;** 4 hücre grubu birlikte kıyaslandığında, konstrakt içeren tüm hücre gruplarında, kontrol hücre grubuna (HEp2-0) göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma saptandı ($F(3,4)=134,1$ $p<0,001$) (Şekil 3.9).



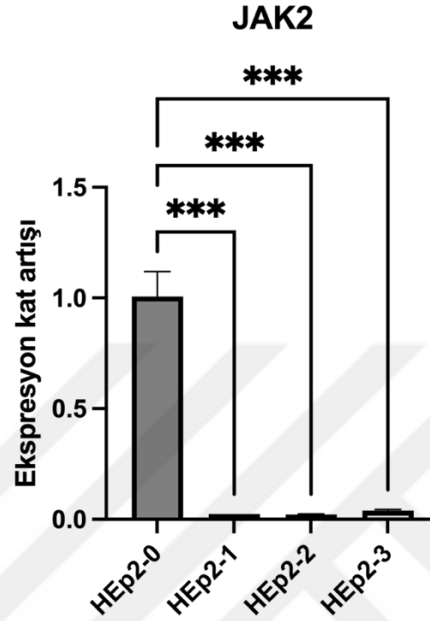
Şekil 3.9. Tüm hücre grupları için *IL-6* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Konstrakt içeren hücre grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise *IL-6* gen ekspresyon seviyesi HEp2-1 hücresinde, HEp2-2 ve HEp2-3 hücrelerine kıyasla anlamlı oranda düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,0184$ ve $p=0,0062$); HEp2-2 ile HEp2-3 arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 3.10).



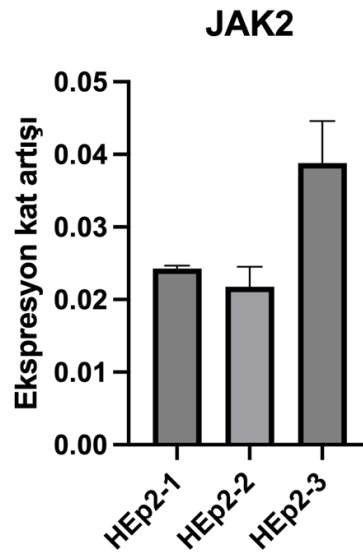
Şekil 3.10. Konstrakt içeren hücre grupları için *IL-6* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

JAK2 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde; 4 hücre grubu birlikte kıyaslandığında, konstrakt içeren tüm hücre gruplarında, kontrol hücre grubuna (HEp2-0) göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma saptandı ($F(3,4)=74,11$ $p<0,001$) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Tüm hücre grupları için *JAK2* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

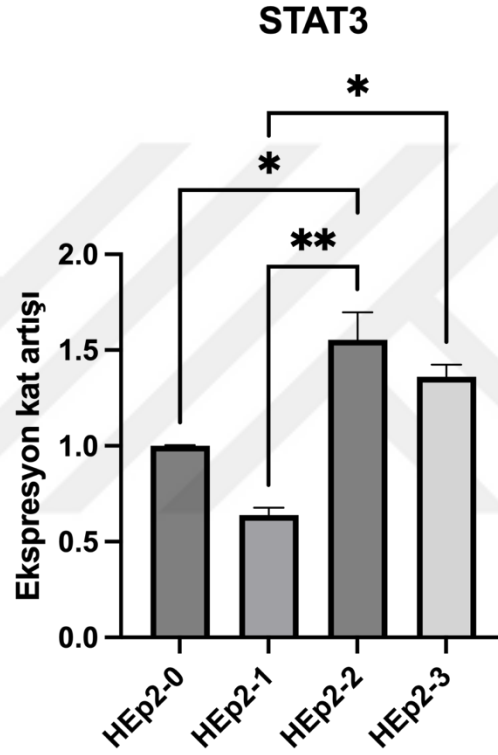
Konstrakt içeren hücre grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise *JAK2* gen ekspresyon seviyesi HEp2-1 ve HEp2-2 hücrelerinde HEp2-3 hücresine göre düşük bulunurken bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Konstrakt içeren hücre grupları için *JAK2* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri ($p>0,05$).

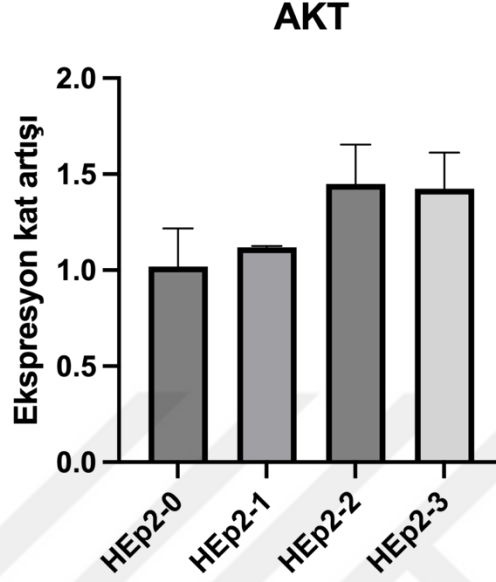
STAT3 gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde; HEp2-0 kontrol hücresiyle kıyaslandığında HEp2-2 hücresinde anlamlı bir artış saptandı ($p=0,0278$). HEp2-1 ve HEp2-3 hücrelerindeki *STAT3* gen ekspresyon değişikliği ise istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

Bunun yanında, HEp2-1 hücresi ise HEp2-2 ve HEp2-3 hücrelerine göre daha düşük seviyede *STAT3* eksprese ediyordu (sırasıyla $p=0,0045$ ve $p=0,0109$) (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Tüm hücre grupları için *STAT3* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

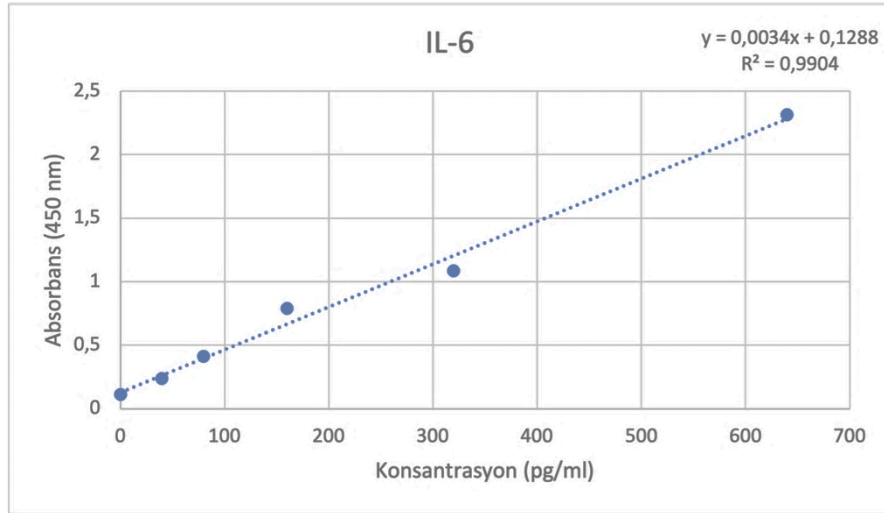
AKT gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde; konstrakt içeren hücrelerde bir miktar artış gözlenirken, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($F(3,4)=1,589$ $p=0,3247$) (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Tüm hücre grupları için *AKT* geni qPZR rölatif ekspresyon seviyeleri ($p>0,05$).

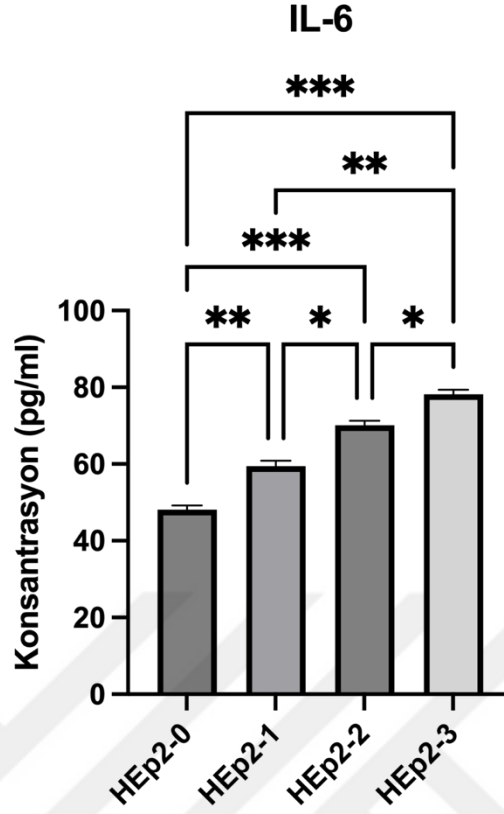
3.5.2. ELISA Analizi

IL-6 ve STAT3 genlerinin ekspresyonunu protein seviyesinde ortaya koymak için ELISA yöntemi kullanıldı. IL-6 seviyesi hem hücre kültür süpernatantından hem de hücrelerden elde edilen total proteinden ölçülürken, STAT3 seviyesi total proteinden ölçüldü. Kit içerisinde gelen ve konsantrasyonu bilinen standart solüsyonları kullanılarak her çalışma için standart eğrileri elde edildi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. IL-6 standart eğri grafiği.

ELISA analizi sonucunda elde edilen absorbans değerleri standart eğri denkleminde yerine konularak karşılık geldiği konsantrasyonlar hesaplandı. Elde edilen verilere göre, hücre gruplarının IL-6 seviyeleri *one-way ANOVA* yöntemiyle kıyaslandığında, hem hücre kültürü total proteininden hem de hücre kültürü süpernatantından elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gözlemlendi (sırasıyla $F(3,4)=113,0$ $p<0,001$ ve $F(3,4)=79,31$ $p<0,001$) (Şekil 3.16, Şekil 3.17).

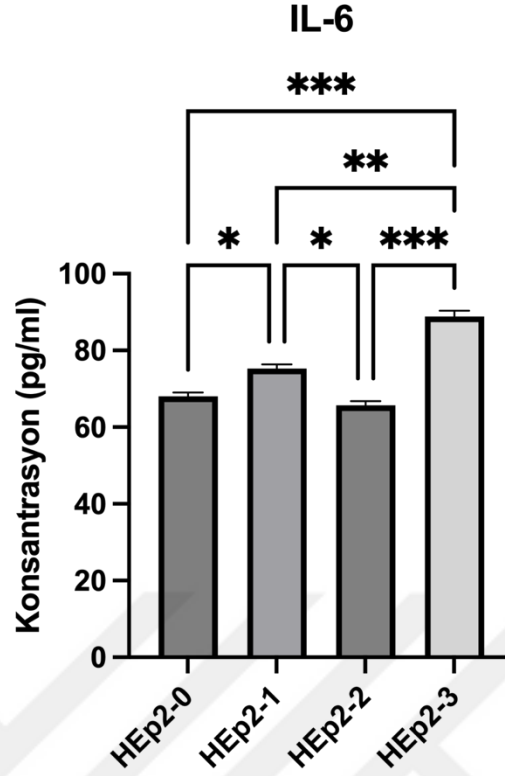


Şekil 3.16. Hücre kültürü total proteininden ELISA Analizi ile IL-6 konsantrasyonları (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Hücre kültürü total proteininden yapılan IL-6 analizine göre; konstrakt içeren tüm gruplarda (HEp2-1, HEp2-2, HEp2-3), kontrol grubu (HEp2-0) ile kıyaslandığında anlamlı oranda artış tespit edildi (sırasıyla $p=0,01$; $p=0,0008$; $p=0,0002$).

Ancak internal kontrol olarak çalışmaya dahil edilen ve boş plazmid vektör içeren HEp2-3 hücrelerinden elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında HEp2-1 ve HEp2-2 anlamlı oranda düşük bulundu (sırasıyla $p=0,0015$; $p=0,0324$).

HEp2-1 ve HEp2-2 kendi aralarında kıyaslandığında ise HEp2-1 seviyesi HEp2-2 seviyesinden anlamlı oranda düşük olduğu tespit edildi ($p=0,012$) (Şekil 3.16).



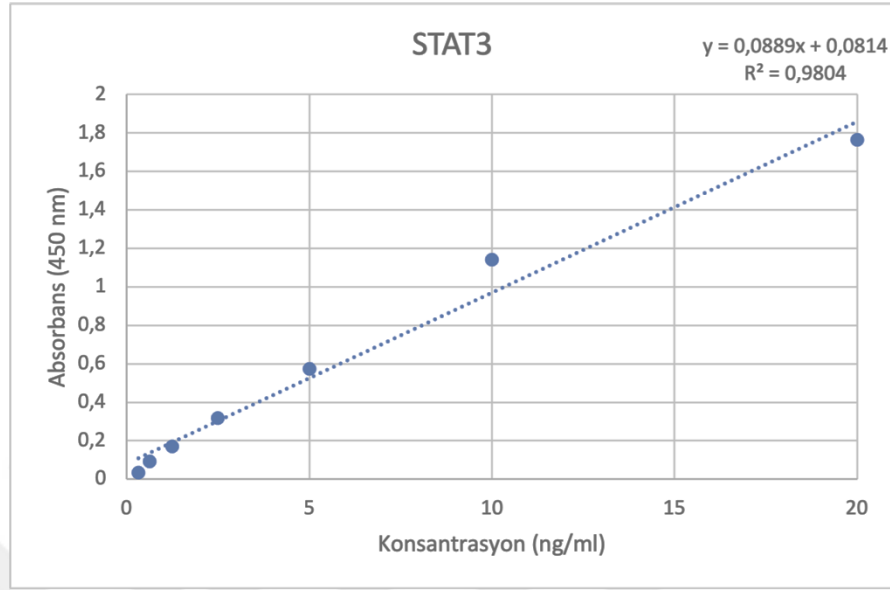
Şekil 3.17. Hücre kültürü süpernatantından ELISA Analizi ile IL-6 protein konsantrasyonları (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Hücre kültürü süpernatantından yapılan IL-6 analizine göre; HEp2-1 ve HEp2-3 ile kontrol grubu (HEp2-0) arasında anlamlı bir farklılık (artış) gözlenirken (sırasıyla $p=0,04$; $p=0,0008$), HEp2-2 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

İnternal kontrol olarak çalışmaya dahil edilen ve boş plazmid vektör içeren HEp2-3 hücrelerinden elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında HEp2-1 ve HEp2-2 anlamlı oranda düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$; $p=0,0005$).

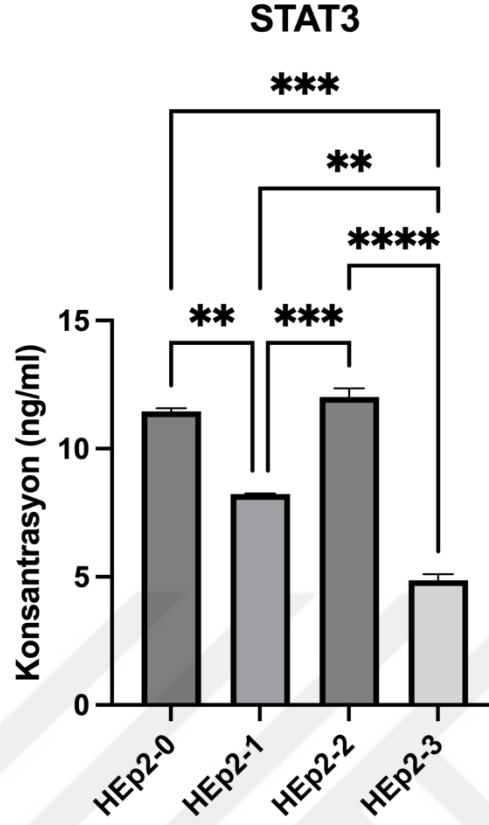
HEp2-1 ve HEp2-2 kendi aralarında kıyaslandığında ise HEp2-1 hücre süpernatantında IL-6 protein seviyesi HEp2-2 hücresinden anlamlı oranda yüksekti ($p=0,0154$) (Şekil 3.17).

STAT3 proteini ELISA analizi sonucunda, konsantrasyonu bilinen standart solüsyonları kullanılarak standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. STAT3 standart eğri grafiği.

Ölçüm sonucunda elde edilen absorbans değerleri standart eğri denkleminde yerine konularak karşılık geldiği konsantrasyonlar hesaplandı. Elde edilen verilere göre, hücre gruplarının STAT3 seviyeleri *one-way ANOVA* yöntemiyle kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($F(3,4)=227,0$ $p<0,001$) (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Hücre kültürü total proteininden ELISA Analizi ile STAT3 protein konsantrasyonları (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

Hücre kültürü total proteininden yapılan STAT3 analizine göre ise; kontrol grubu (HEp2-0) ile kıyaslandığında HEp2-1 ve HEp2-3 anlamlı oranda azalmıştı (sırasıyla $p=0,0017$; $p=0,0001$). Ancak kontrol grubu ile HEp2-2 hücresinden elde edilen veriler arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$).

İnternal kontrol olarak çalışmaya dahil edilen ve boş plazmid vektör içeren HEp2-3 hücrelerinden elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında HEp2-1 ve HEp2-2 anlamlı oranda yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,0014$; $p<0,0001$).

HEp2-1 ve HEp2-2 hücrelerinden elde edilen sonuçlar kendi aralarında kıyaslandığında ise HEp2-1 hücresinde STAT3 protein seviyesi, HEp2-2 hücresinden anlamlı oranda düşük olduğu tespit edildi ($p=0,0009$).

Çalışma sonucunda elde edilen veriler şu şekilde özetlenebilir (Tablo 3.1);

NF-κB açısından bakıldığında; KRAS-CDS-G12V mutasyonunun *NF-κB* seviyesi üzerine bir etkisi görülmezken, LCS6 varyantı (rs61764370) *NF-κB* ekspresyonunu azaltmaktadır.

IL-6 açısından bakıldığında; *NF-κB*'ye benzer şekilde, G12V mutasyonu *IL-6* seviyesini etkilemezken, LCS6 varyantı *IL-6* ekspresyonunu azaltmaktadır.

JAK2 açısından bakıldığında; G12V mutasyonu *JAK2* gen ekspresyon seviyesini yaklaşık 2 kat oranında düşürmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Diğer yandan, LCS6 varyantının ise *JAK2* ekspresyonu üzerine bir etkisi yoktur.

STAT3 gen ekspresyonu açısından bakıldığında; G12V mutasyonunun *STAT3* üzerine bir etkisi gözlemlenmezken, LCS6 varyantı *STAT3* ekspresyonunu azaltmaktadır.

AKT açısından bakıldığında; G12V mutasyonunun da LCS6 varyantının da *AKT* ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır.

Tablo 3.1. mRNA seviyesinde KRAS-CDS-G12V mutasyonu ile 3'UTR-LCS6 varyantının (rs61764370) hedef genler üzerine etkileri.

	G12V mutasyonu	LCS6 varyantı
<i>NF-κB</i>	-	↓
<i>IL-6</i>	-↓	↓
<i>JAK2</i>	-↓	-
<i>STAT3</i>	-	↓
<i>AKT</i>	-	-

(-) değişiklik yok; (↓) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcut; (-↓) azalma mevcut ama istatistiksel olarak anlamlı değil.

Protein seviyesinde kıyaslama yapıldığında; qPZR verileriyle uyumlu olarak G12V mutasyonu hücre kültürü total proteininde *IL-6* seviyesini azaltırken, LCS6 varyantının *IL-6* seviyesini daha da azalttığı görülmüştür.

Hücre kültür süpernatantında ise durum biraz farklılık arz etmektedir. Burada G12V mutasyonu IL-6 seviyesini azaltırken, LCS6 varyantı varlığında IL-6 seviyesi artış göstermektedir.

STAT3 protein ekspresyonu açısından ise; G12V mutasyonu STAT3 seviyesini arttırırken, qPZR verilerine benzer şekilde LCS6 varyantı STAT3 seviyesini azaltmaktadır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Protein seviyesinde KRAS-CDS-G12V mutasyonu ile 3'UTR-LCS6 varyantının (rs61764370) hedef genler üzerine etkileri.

	G12V mutasyonu	LCS6 varyantı
IL-6 (total protein)	↓	↓
IL-6 (hücre kültürü süpernatantı)	↓↓	↑
STAT3 (total protein)	↑↑	↓

(↓) azalma mevcut; (↓↓) daha fazla azalma mevcut; (↑) artma mevcut; (↑↑) daha fazla artma mevcut.

4. TARTIŞMA

Baş-Boyun Kanseri (BBK) dünya genelinde en sık görülen 7. kanser türüdür. Bunlar arasında ikinci sırada yer alan larinks kanseri, tüm kanser ölümlerinin %1,57'sine sebep olmaktadır (Aupérin 2020). Hızlı ilerleyen bir kanser olması nedeniyle bir çok larinks kanseri hastasına ancak ileri evrede tanı konulabilmektedir (Steuer ve ark 2017). Larinks kanseri ise ileri evrelerde metastaz yapar ve en sık metastaz yaptığı bölgeler akciğer, kemik, özefagus, karaciğer ve beyindir (Pan ve ark 2019).

Larinks kanserinde birçok farklı mutasyon tanımlanmıştır (Stransky ve ark 2011). Bunlardan en önemlilerinde biri *KRAS* gen mutasyonlarıdır. *KRAS* mutasyonlarının larinks kanserinde görülme oranı %4,8 ila %11,5 arasında değişmektedir (Bissada ve ark 2013, Kodaz ve ark 2017).

KRAS geni üzerinde ise çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar kolorektal kanser, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve pankreas kanseri başta olmak üzere birçok kanser türü ile ilişkili bulunmuştur (Ren ve ark 2012, Karachaliou ve ark 2013, Dobre ve ark 2015, Keerthana ve ark 2018, Luo 2021). Larinks kanseri de *KRAS* gen mutasyonlarıyla ilişkili kanserlerden birisidir (Papanikolaou ve ark 2021). Özellikle 12, 13 ve 61. kodon mutasyonlarının kanser gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. 2. ve 3. ekzonda lokalize olan bu mutasyonlar GTP bağlanma bölgesinin yakınında bulunur ve GTPaz fonksiyonunu bozarak patolojik etki gösterir.

Bu mutasyonlardan 2. ekzon, 12. kodon üzerinde görülen G12V mutasyonu (c.35G>T), *KRAS* mutasyonları arasında en sık görülenlerden birisidir ve birçok kanserde prediktif öneme sahiptir. 12. kodondaki mutasyonlar *KRAS* proteininin hücre içi sinyal iletiminde daha uzun süre aktif halde kalmasına neden olarak kanser oluşumuna katkıda bulunur (Jančík ve ark 2010).

KRAS geni kodlanan bölge mutasyonlarının yanı sıra, 3'UTR (untranslated region) mutasyonlarının da klinik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Christensen ve ark 2009, Dai ve ark 2015, Ustinova ve ark 2015). Genlerin 3'UTR bölgeleri miRNA'ların hedef dizileri (Didiano ve Hobert 2008) olduğu için bu bölgedeki mutasyonlar miRNA'ların bağlanmasını ve hücre sinyalizasyon sistemini bozarak kanser gelişimini tetiklemektedir.

3'UTR değişikliklerinden biri olan KRAS-3'UTR-LCS6'daki T>G değişikliğinin (rs61764370) başta over kanseri (Ratner ve ark 2010, Ghazi Jumaa 2022), meme kanseri (Paranjape ve ark 2011, Ustinova ve ark 2015, Mohthash ve ark 2020, Gallegos-Arreola ve ark 2021), akciğer kanseri (Nelson ve ark 2010, Farokhzad ve ark 2020), kolorektal kanser (Dai ve ark 2016) ve BBK (Christensen ve ark 2009, Cipollini ve Gemignani 2014) olmak üzere biręok kanserle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Cipollini ve Gemignani 2014). Paranjape ve ark (2011), KRAS-3'UTR-LCS6 varyantını (rs61764370) triple-negatif meme kanseriyle ilişkili olduğunu bildirmektedir. Bu varyanta sahip bireylerin gen ekspresyon paternlerinde önemli farklılıklar olduğunu ortaya koyup ileride bu varyantın, premenopozal kadınlarda triple-negatif meme kanseri için genetik markır olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Paranjape ve ark 2011). Bir başka ęalıřmada, bu varyantın over kanseri gelişim riski için de markır niteliğinde olduğu değerlendirilmiştir (Ratner ve ark 2010). Diğer bir vaka-kontrol ęalıřmasında ise, kadınlarda rs61764370 varyantı ile kronik myeloid lösemi riski arasında bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Gutiérrez-Malacatt ve ark 2016).

Rs61764370 varyantının farklı kanser türleriyle ilişkisini ortaya koyan ęalıřmaların yanı sıra, kanserle ilişkili olmadığını söyleyen yayınlar da mevcuttur. 2008-2014 yılları arasında yayınlanmış olan 30 yayından yapılan meta-analiz bunlardan birisidir. Bu meta-analize göre beyaz ırkta rs61764370 varyantının kanserle ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (Zhang ve Shi 2016). 2012'de yapılan bir kohort ęalıřmasında ise KRAS-LCS6 varyantının over kanseriyle ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (Caiola ve ark 2012).

BBK açısından bakıldığında ise Christensen ve ark (2009) yaptığı ęalıřmada, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının, oral kanserlerde yaşam beklentisini önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bir başka ęalıřmada, LCS6 varyantı BBK'de azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Cipollini ve Gemignani 2014). Ancak aynı yıl yayınlanan bir ęalıřmada ise LCS6 varyantının BBK için risk faktörü olmadığı ifade edilmektedir (Bueno Santiago ve ark 2014). Yakın zamanda yayınlanan, 216 BBK hastası ve 85 sağlıklı kontrolün incelendiği diğer bir ęalıřmada ise LCS6 varyantının BBK riskiyle ilişkili olmadığı ancak BBK'lı hastalarda lenf nodu metastazıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Uluslan ve ark 2022).

Bütün bunların yanında, 2016 yılında kolorektal kanser hastaları üzerinde yapılan bir çalışma, bu varyantın metastazla ilişkisi açısından ipuçları vermektedir. Bu çalışmada, *KRAS* varyantının düşük sağkalıma ve daha yüksek relaps ve metastaz riskine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca rs61764370 varyantı, kolorektal kanser hastalarında oksaliplatin-temelli kemoterapi direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Dai ve ark 2016). LCS6 varyantı ile metastaz arasındaki ilişkiyi ortaya koyan başka bir çalışmayı ise Zhang ve ark (2016) yapmışlardır. Buna göre rs61764370 varyantı osteosarkomda metastaz gelişme riskini arttırmaktadır (Zhang ve ark 2016).

Crowley ve ark (2014), kolorektal kanser hücre hattı olan SW48 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, rs61764370 varyantının *KRAS* ekspresyonunu etkilememekle birlikte let-7 seviyesini düşürdüğünü, hücre proliferasyonunu artırırken MEK, ERK, PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Crowley ve ark 2014).

Chin ve ark (2008), küçük hücreli dışı akciğer kanseri riskiyle ilişkili buldukları LCS6 varyantının bu klinik etkisini miRNA let-7'nin bağlanma bölgesini bozarak ve dolayısıyla *KRAS* ekspresyonunu arttırarak gösterdiğini belirtmektedir (Chin ve ark 2008). Artmış *KRAS* ekspresyonunun larinks kanseri agresif fenotipi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Papanikolaou ve ark 2021).

KRAS geninin CDS mutasyonlarının klinik etkileri, hatta tedaviye yanıtındaki etkileri literatürde çokça çalışılmıştır (Margonis ve ark 2015, Shen ve ark 2016). Aynı zamanda, *KRAS* geninin farklı kanser türlerinde hücre içi ve hücreler arası sinyal yollarındaki etkisi de aydınlatılmaya çalışılmıştır (Ji ve ark 2007). Ancak literatürde, *KRAS*-3'UTR-LCS6 varyantının metastazla ilişkisi üzerine çok az sayıda çalışma vardır (Zhang ve ark 2016, Uluhan ve ark 2022) ve bu etkisinin muhtemel mekanizmalarını araştıran bir çalışma ise bulunmamaktadır. TÜBİTAK 1001 112S498 nolu projede (yayınlanmamış veriler), bu literatür boşluğunu doldurmak üzere, RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları incelenmiştir. Çalışma sonucunda, LCS6 varyantının uzak organ metastazlarını arttırdığı, ancak bu etkiyi bu iki yolak üzerinden yapmadığı tespit edilmiştir.

Bu bulgular bizi bu metastatik etkiye sebep olurken başka bir yolak kullandığı düşüncesine itmiştir. Burada da aday yollardan birisi IL-6/JAK2/STAT3 sinyal

yolağı olarak tespit edilmiştir. Ancak literatürde bu alanda da yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bir sitokin-reseptör yolağı olan IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı, kontrolsüz hücre büyümesi ve kanserle yakından ilişkilidir. NF- κ B tarafından uyarılarak transkripte olan IL-6'nın reseptörüne bağlanmasıyla aktive olan bu yolak, birçok vücut fonksiyonunda ve hücre farklılaşması, immün düzenleme, apoptoz, kanser gelişimi, hematopoez gibi bazı önemli biyolojik süreçlerde görev almaktadır.

Mevcut çalışmada, bu yolaktaki moleküllerden *NF- κ B*, *IL-6*, *JAK2*, *STAT3* genlerini ve PI3K/AKT/mTOR yolağındaki ara molekül olan *AKT* ekspresyonunu qPZR yöntemiyle mRNA düzeyinde; IL-6 ve STAT3'ü de ayrıca ELISA yöntemiyle protein düzeyinde inceledik.

mRNA düzeyinde yapılan analizde hem *NF- κ B* hem de *IL-6* gen ekspresyon seviyelerinin düşük bulunması, *NF- κ B*'nin *IL-6*'nın düzenleyicisi olduğu (Libermann ve Baltimore 1990) düşünüldüğünde, LCS6 varyantının *NF- κ B* seviyesini düşürerek *IL-6*'yı baskıladığı sonucunu düşündürmektedir. Bu durum, literatürde bilinen *NF- κ B* ve *IL-6* ilişkisiyle uyumlu bulunmaktadır (Naugler ve Karin 2008).

IL-6'nın çok farklı fonksiyonları olan pleiotropik bir sitokin olduğu bilinmektedir. Tümör söz konusu olduğunda da durum değişmemektedir ve IL-6 iki ucu keskin bir bıçak olarak karşımıza çıkmaktadır. IL-6'nın tümörü hem uyarıcı hem de inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Hem hücre hatlarında hem de tümör dokularında yapılan çalışmalarda çelişkili IL-6 seviyeleri ile karşılaşmakta ve bazı çalışmalarda IL-6 seviyeleri yüksek bulunurken, bazılarında artmadığı gözlenmektedir (Knüpfer ve Preiß 2007).

IL-6 metastaz dahil, tümör gelişiminin hemen her evresiyle ilişkili olduğu değerlendirilmektedir (Kumari ve ark 2016). Ancak bu ilişkinin nasıl olduğuna dair çelişkili veriler mevcuttur. Bu durumda IL-6–kanser ilişkisi için iki farklı hipotez öne sürmek mümkündür; birinci hipotezde, IL-6'nın kanser için pozitif prognostik belirteç olarak düşünülürken, diğer hipoteze göre IL-6 kanser için negatif prognostik belirteç olarak değerlendirilmektedir (Knüpfer ve Preiß 2007). Meme kanseri hücrelerinde IL-6, tümörü hem uyarıcı hem de inhibe edici etki göstermektedir. Hastaların serum IL-6 seviyeleri meme kanseri hastalarında negatif prognostik belirteç olarak karşımıza

çıkılmaktadır (Knüpfner ve Preiß 2007). Çoklu ilaç direnç olan meme kanseri MCF-7/ADR hücreleri süpernatantında IL-6 seviyesi, ilaç direnci olmayan meme kanseri hücrelerine kıyasla yüksek saptanmıştır. Buna göre hücre kültürü süpernatantında IL-6'nın yüksek olmasının kemoterapi direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Conze ve ark 2001).

Bizim çalışmamızda da mRNA düzeyinde ve hücre kültürü total proteininde IL-6 seviyesi düşük bulunmuştur. Bu sonuç literatürde IL-6'nın kanser için negatif prognostik faktör olabileceği hipoteziyle uyumlu görülmektedir. Bunun aksine, hücre kültür süpernatantında IL-6 protein seviyesinin yüksekliğinin kemoterapi direnciyle ilişkili olduğuna dair literatür bilgisi göz önüne alındığında, LCS6 varyantı varlığında hücre kültür süpernatantında IL-6 seviyesinin yüksek bulunmasının, IL-6'nın LCS6 varyantının metastatik etkisini artırıyor olabileceği düşünülmüştür.

IL-6 yolağının alt basamaklarında yer alan STAT3 molekülü, IL-6'nın reseptörüne bağlanmasıyla JAK2 aracılığıyla fosforile olarak aktif hale geçer. STAT3'ün onkojenik etkisi uzun yıllardır çalışılmaktadır. Bunun yanında, az sayıda çalışmada, STAT3'ün tümör süpresör etkisinden de bahsedilmektedir (Zhang ve Lai 2014). Bazı durumlarda STAT3'ün inhibe edilmesi kanser gelişimini tetikleyebildiği rapor edilmiştir (Dutta ve ark 2014). Bir başka çalışmada tiroid kanseri hücre hatlarında STAT3'ün azaltılmasının, tümör büyümesini artırdığı gösterilmiştir (Couto ve ark 2012). Diğer bir çalışmada ise Apc(Min/+) farelerin bağırsak epitel hücrelerinde STAT3'ün susturulmasının, tümör oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (Musteanu ve ark 2010).

Çalışmamızda LCS6 varyantı varlığında mRNA ve protein düzeyinde STAT3 ekspresyonunun düşük bulunması, NF-κB/IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağının üst basamaklarında yer alan NF-κB ve IL-6 düşüklüğüyle uyumlu bulunmaktadır. Diğer yandan STAT3 ekspresyon seviyesinin düşük olması, STAT3'ün yukarıda belirtilen tümör süpresör etkisini ortadan kaldırarak LCS6 varyantının metastaz yolunu açıyor olabileceği düşünülmüştür.

LCS6 varyantı varlığında, NF-κB/IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı moleküllerinden üçünün ekspresyon seviyesinin düşmesine rağmen JAK2 ekspresyonunun değişmemiş bulunması ise JAK2'yi etkileyen başka moleküllerin

olduğunu ve bu moleküllerin etkisiyle JAK2 ekspresyonunun düşmeyip normal seviyede seyrettiğini düşündürmektedir.

Bütün veriler birlikte değerlendirildiğinde, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine negatif etki gösterdiği sonucuna ulaşılabilir. Bu etkiyi de *NF-κB* gen ekspresyonunu düşürerek gerçekleştiriyor olması muhtemel gözükmektedir. LCS6 değişikliğinin bu etkisi daha önce literatürde gösterilmemiştir.

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı birçok kanserde aktive olmaktadır. Çalışmamızda, KRAS-G12V mutasyonunun da LCS6 varyantının da *AKT* gen ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin bulunmaması, LCS6 varyantının metastaz gelişimi üzerindeki etkisini PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinden yapmadığını düşündürmektedir. Bu sonuç daha önceki çalışmamızda elde ettiğimiz LCS6 varyantının PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine bir etkisinin olmadığı bulgusuyla uyumludur (TÜBİTAK 1001 112S498 nolu proje, yayınlanmamış veriler). Aynı zamanda literatürde de bunu destekler az sayıda çalışma bulunmaktadır (Crowley ve ark 2014).

Diğer taraftan, kontrakt içeren tüm hücre gruplarında *IL-6* ve *JAK2* genlerinin ekspresyonunun transfeksiyon yapılmayan hücre grubuna kıyasla anlamlı oranda ($p<0,001$) düşük olması, lentiviral yöntemle yapılan transfeksiyonun *IL-6* ve *JAK2* ekspresyonunu baskılıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun lentiviral transfeksiyon yapıldığı durumlarda göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Ayrıca çalışmamızda, non-metastatik larinks kanseri hücre hattı olan UM-SSC-17A hücrelerine de transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ancak pLenti-KRAS-CDSm-LCS6m plazmid kontraktını içeren UM-SSC-17A hücreleri, transfeksiyondan sonra 1-2 hafta yaşamış, sonra toplu olarak apoptoza gitmiştir. Farklı yöntemlerle gerçekleştirilen transfeksiyon ve seleksiyon işlemleri sonrasında da aynı durumla karşılaşmıştır. Bu bulgu, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının UM-SSC-17A hücrelerinde apoptotik etki oluşturduğunu göstermektedir.

Literatürde, bazı hücrelerin plazmid transfeksiyonlarına karşı dirençli olduğu bildirilmektedir. Bu durum mevcut çalışmada elde edilen bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının UM-SSC-17A hücre tipi için ölümcül olduğu belirlendi. Literatürde, *KRAS* geninin baş-boyun kanserleri (BBK)

etiyojisinde nispeten düşük gözlenmesinin muhtemel nedenlerinden birisinin, BBK gelişim sürecinde *KRAS* genindeki mutasyonların apoptotik süreci uyararak klonal hücrelerin ortadan kaldırılması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, larinks kanserinde KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının (rs61764370) IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine etkisi araştırıldı. Bunun için larinks kanseri hücre hattı olan HEP2 hücrelerine mutasyonlu ve mutasyonsuz genler transfekte edildi. Ardından ilgili genlerin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları incelendi.

LCS6 varyantının IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine etkisi literatürde daha önce çalışılmamıştı. Çalışmamız sonucunda, KRAS-3'UTR-LCS6 varyantının IL-6/JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerine negatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu literatür açısından yeni bir bulgudur.

Literatür bilgisi ve mevcut çalışma sonucu birlikte değerlendirildiğinde, LCS6 varyantının metastatik etkisini hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği halen tam olarak anlaşılmış değildir. Bu mekanizmanın ortaya konulabilmesi için farklı sinyal yolakları üzerinde daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, hem farklı larinks kanseri hücre hatlarında hem de farklı kanser türlerinde bu varyantın IL-6/JAK2/STAT3 yolağı üzerine etkisi incelenmelidir. Ayrıca bu etkinin *in vivo* olarak hayvan modelleri üzerinde de çalışılması gerekmektedir.

Diğer yandan, çalışmamızda lentiviral yöntemle yapılan transfeksiyon sonrasında, konstrakt içeren tüm hücre gruplarında bazı genlerin ekspresyonu ciddi oranda baskılanmıştır. Bu durum, lentiviral transfeksiyonun, bazı genlerin ekspresyonunu doğrudan etkilemiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Lentiviral transfeksiyon çalışmalarında, bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz şekilde, hücre hatlarına boş plazmid vektör de transfekte edilmesi ve bu hücrelerin internal kontrol olarak çalışmada kullanılması ile bu problemin üstesinden gelinebilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S, 2014. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor biology*, 35, 9, 8483-523.
- Understanding What Cancer Is: Ancient Times to Present, 2018. American Cancer Society, Erişim tarihi 15 January 2023. Erişim adresi, <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/history-of-cancer/what-is-cancer.html>.
- Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB, 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25, 9, 2097-116.
- Aupérin A, 2020. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Current opinion in oncology*, 32, 3, 178-86.
- Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116, 2, 281-97.
- Bhattacharyya S, Mandal S, Banerjee S, Mandal GK, Bhowmick AK, Murmu N, 2015. Cannabis smoke can be a major risk factor for early-age laryngeal cancer—a molecular signaling-based approach. *Tumor Biology*, 36, 8, 6029-36.
- Bissada E, Abboud O, Abou Chacra Z, Guertin L, Weng X, Nguyen-Tan PF, Tabet J-C, Thibaudeau È, Lambert L, Audet M-L, 2013. Prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and impact on clinical outcomes. *International journal of otolaryngology*, 2013.
- Breasted JH, 1930. The Edwin Smith surgical papyrus: published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes, Chicago, Ill., University of Chicago Press, p.
- Bueno Santiago M, de Lima Marson FA, Secolin R, Ribeiro JD, Passos Lima CS, Bertuzzo CS, 2014. SLC23A2-05 (rs4987219) and KRAS-LCS6 (rs61764370) polymorphisms in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncology letters*, 7, 6, 1803-11.
- Caiola E, Rulli E, Fruscio R, Buda A, Broggin M, Marabese M, 2012. KRas-LCS6 polymorphism does not impact on outcomes in ovarian cancer. *American journal of cancer research*, 2, 3, 298.
- Carrel A, Burrows MT, 1910. Cultures de sarcome en dehors de l'organisme. *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la société de biologie*, 69, 332.
- Chaffer CL, Weinberg RA, 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *science*, 331, 6024, 1559-64.
- Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller R-U, Straka E, Su L, Burki EA, 2008. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer research*, 68, 20, 8535-40.
- Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT, 2009. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis*, 30, 6, 1003-7.
- Cipollini M, Gemignani F, 2014. MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 173-91.
- Committee ACPRS, 2022. Cancer in 2022. *Cancer Discovery*, 12, 12, 2733-8.
- Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, Rincón M, 2001. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer research*, 61, 24, 8851-8.
- Couto JP, Daly L, Almeida A, Knauf JA, Fagin JA, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P, Lyden D, 2012. STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 35, E2361-E70.
- Crowley EH, Arena S, Lamba S, Di Nicolantonio F, Bardelli A, 2014. Targeted Knock-in of the Polymorphism rs61764370 Does Not Affect KRAS Expression but Reduces let-7 Levels. *Human mutation*, 35, 2, 208-14.
- Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang T-L, Davidson B, Shih I-M, Zhang Y, Wood III W, Becker KG, Morin PJ, 2008. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PloS one*, 3, 6, e2436.
- Dai Q, Wei HL, Huang J, Zhou TJ, Chai L, Yang Z-H, 2015. KRAS polymorphisms are associated with survival of CRC in Chinese population. *Tumor Biology*, 1-8.
- Dai Q, Wei HL, Huang J, Zhou TJ, Chai L, Yang Z-H, 2016. KRAS polymorphisms are associated with survival of CRC in Chinese population. *Tumor Biology*, 37, 4, 4727-34.
- Didiano D, Hobert O, 2008. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *Rna*, 14, 7, 1297-317.

- Dobre M, Dinu DE, Panaitescu E, Birlă RD, Iosif C, Boeriu M, Constantinoiu S, Ivan RN, Ardeleanu CM, Costache M, 2015. KRAS gene mutations prognostic factor in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol*, 56, 2 Suppl, 671-8.
- Dutta P, Sabri N, Li J, Li WX, 2014. Role of STAT3 in lung cancer. *JAK-STAT*, 3, 4, e999503.
- Farokhzad N, Hosseini SM, Edalat H, Sadeghi M, 2020. Association of Rs61764370 polymorphism within let-7 microRNA-binding site with lung cancer in Iranian population. *African Health Sciences*, 20, 3, 1299-303.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F, 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149, 4, 778-89.
- Gallegos-Arreola M, Verdín PG, Magaña-Torres M, Figuera L, Zúñiga-González G, Rosales-Reynoso M, Gómez-Meda B, Puebla-Pérez A, 2021. Association between rs61764370, rs9266, and rs140080026 polymorphisms of the KRAS gene and breast cancer risk in a Mexican population. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25, 21, 6454-64.
- Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD, 2016. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature reviews Drug discovery*, 15, 1, 35-50.
- Garcia-Robledo JE, Rosell R, Ruíz-Patiño A, Sotelo C, Arrieta O, Zatarain-Barrón L, Ordoñez C, Jaller E, Rojas L, Russo A, de Miguel-Pérez D, Rolfo C, Cardona AF, 2022. KRAS and MET in non-small-cell lung cancer: two of the new kids on the ‘drivers’ block. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 16, 17534666211066064.
- Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, Banerjee A, 2006. Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, 25, 51, 6781-99.
- Ghazi Jumaa M, 2022. Evaluation of the Role of the KRAS Gene Polymorphism LCS6 (rs61764370) in Iraqi Women with Ovarian Cancer. *Archives of Razi Institute*, 77, 1, 187-93.
- Goding Sauer A, Siegel RL, Jemal A, Fedewa SA, 2019. Current prevalence of major cancer risk factors and screening test use in the United States: disparities by education and race/ethnicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28, 4, 629-42.
- Goga A, Benz C, 2007. Anti-oncomir suppression of tumor phenotypes. *Molecular Interventions*, 7, 4, 199.
- Gremer L, Merbitz-Zahradnik T, Dvorsky R, Cirstea IC, Kratz CP, Zenker M, Wittinghofer A, Ahmadian MR, 2011. Germline KRAS mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders. *Hum Mutat*, 32, 1, 33-43.
- Gutiérrez-Malacatt H, Ayala-Sanchez M, Aquino-Ortega X, Dominguez-Rodriguez J, Martinez-Tovar A, Olarte-Carrillo I, Martinez-Hernandez A, Orozco L, Cordova EJ, 2016. The rs61764370 functional variant in the KRAS oncogene is associated with chronic myeloid leukemia risk in women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17, 4, 2265-70.
- Ha N-H, Faraji F, Hunter KW, 2013. Mechanisms of metastasis. *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream*, 435-58.
- Hajdu SI, 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117, 5, 1097-102.
- Hajdu SI, 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer*, 117, 12, 2811-20.
- Hajdu SI, 2012. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer*, 118, 4, 1155-68.
- Hajdu SI, Darvishian F, (2013). A note from history: landmarks in history of cancer, part 5, Wiley Online Library. **119**: 1450-66.
- Hajdu SI, Vadmal M, 2013. A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6. *Cancer*, 119, 23, 4058-82.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Wunsch-Filho V, 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 10, 777-89.
- Hecht SS, Szabo E, 2014. Fifty Years of Tobacco Carcinogenesis Research: From Mechanisms to Early Detection and Prevention of Lung Cancer. *Cancer Prevention Research*, 7, 1, 1-8.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S-i, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 6092, 73-6.
- Hoffmann A, Baltimore D, 2006. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunological reviews*, 210, 1, 171-86.
- Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–132, 2022. IARC, Erişim tarihi 9 January 2023. Erişim adresi, <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>

- Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M, 2010. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X, 2007. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 19, 14048-55.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ, 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 5, 635-47.
- Kabel AM, 2014. Relationship between cancer and cytokines. *J Cancer Res Treat*, 2, 2, 41-3.
- Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, Rosell R, 2013. KRAS mutations in lung cancer. *Clinical lung cancer*, 14, 3, 205-14.
- Keerthana S, Rs AH, Ramakrishnan. Effects of KRAS Gene Mutations in Gynaecological Malignancies.
- Knüpfer H, Preiß R, 2007. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Research and Treatment*, 102, 2, 129-35.
- Kodaz H, Kostek O, Hacıoglu MB, Erdogan B, Kodaz CE, Hacıbekiroglu I, Turkmen E, Uzunoglu S, Cicin I, 2017. Frequency of RAS mutations (KRAS, NRAS, HRAS) in human solid cancer. *Breast cancer*, 7, 12, 1-7.
- Koroulakis A, Agarwal M, 2022. Laryngeal Cancer.[Updated 2022 Mar 15]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN, 2016. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology*, 37, 9, 11553-72.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75, 5, 843-54.
- Libermann TA, Baltimore D, 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 5, 2327-34.
- Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Seminars in oncology*, 10-8.
- Margonis GA, Kim Y, Spolverato G, Ejaz A, Gupta R, Cosgrove D, Anders R, Karagkounis G, Choti MA, Pawlik TM, 2015. Association between specific mutations in KRAS codon 12 and colorectal liver metastasis. *JAMA surgery*, 150, 8, 722-9.
- Marie P, 1910. Contribution a L'etude du developement des tumeurs malignes sur le ulcers de Roentgen. *Bull Assoc Franc'l'eude du Cancer*, 3, 404-26.
- McBride O, Swan D, Tronick S, Gol R, Klimanis D, Moore D, Aaronson S, 1983. Regional chromosomal localization of N-ras, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic acids research*, 11, 23, 8221-36.
- Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB, 2014. *The Molecular Basis of Cancer* E-Book, Elsevier Health Sciences, p.
- Mengie Ayele T, Tilahun Muche Z, Behaile Teklemariam A, Bogale Kassie A, Chekol Abebe E, 2022. Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in the tumorigenesis, chemotherapy resistance, and treatment of solid tumors: a systemic review. *Journal of Inflammation Research*, 1349-64.
- Mohthash M, Shah SK, Thirupathi A, 2020. KRAS gene polymorphism (rs61764370) and its impact on breast cancer risk among women in kerala population, South India. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 11, 2, 140.
- Musteanu M, Blaas L, Mair M, Schleder M, Bilban M, Tauber S, Esterbauer H, Mueller M, Casanova E, Kenner L, 2010. Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in ApcMin mice. *Gastroenterology*, 138, 3, 1003-11. e5.
- Naugler WE, Karin M, 2008. NF-κB and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development*, 18, 1, 19-26.
- dbSNP: rs61764370, 2023. NCBI, Erişim tarihi 9 April 2023. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs61764370#frequency_tab
- Nelson H, Christensen B, Plaza S, Wiencke J, Marsit C, Kelsey K, 2010. KRAS mutation, KRAS–LCS6 polymorphism, and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 69, 1, 51-3.
- O'Hara AJ, Wang L, Dezube BJ, Harrington WJ, Damania B, Dittmer DP, 2009. Tumor suppressor microRNAs are underrepresented in primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma. *Blood*, 113, 23, 5938-41.
- Pan Y, Hong Y, Liang Z, Zhuang W, 2019. Survival analysis of distant metastasis of laryngeal carcinoma: analysis based on SEER database. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 276, 1, 193-201.

- Papanikolaou V, Chrysovergis A, Mastronikolis S, Tsiambas E, Ragos V, Peschos D, Spyropoulou D, Pantos P, Niotis A, Mastronikolis N, 2021. Impact of K-Ras Over-expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *in vivo*, 35, 3, 1611-5.
- Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, Keane FK, Hoffman A, Hollestelle A, Dorairaj J, Geyda K, Pelletier C, Nallur S, 2011. A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *The lancet oncology*, 12, 4, 377-86.
- Popescu N, Amsbaugh S, DiPaolo J, Tronick S, Aaronson S, Swan D, 1985. Chromosomal localization of three humanras genes by in situ molecular hybridization. *Somatic cell and molecular genetics*, 11, 2, 149-55.
- HUMAN INTERLEUKIN-6, 2023. PDB, Erişim tarihi 5 February 2023. Erişim adresi, <https://www.rcsb.org/structure/1IL6>.
- Rásó E, 2020. Splice variants of RAS—translational significance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39, 4, 1039-49.
- Ratner E, Lu L, Boeke M, Barnett R, Nallur S, Chin LJ, Pelletier C, Blitzblau R, Tassi R, Paranjape T, 2010. A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. *Cancer research*, 70, 16, 6509-15.
- Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y, 2012. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of the colon & rectum*, 55, 8, 913-23.
- Rose-John S, 2018. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10, 2, a028415.
- Schwann T, 1838. Ueber die Analogie in der Structur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen. *Neue Not Geb Nat Heil*, 91, 33-6.
- Segiet OA, Piecuch A, Mielanczyk L, Michalski M, Nowalany-Kozielska E, 2019. Role of interleukins in heart failure with reduced ejection fraction. *Anatol J Cardiol*, 22, 6, 287-99.
- Shen Y, Han X, Wang J, Wang S, Yang H, Lu S-H, Shi Y, 2016. Prognostic impact of mutation profiling in patients with stage II and III colon cancer. *Scientific reports*, 6, 1, 1-7.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A, 2021. *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71, 1, 7-33.
- Song M, Kellum JA, 2005. Interleukin-6. *Critical Care Medicine*, 33, 12, S463-S5.
- Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF, 2017. An update on larynx cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67, 1, 31-50.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortés ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareño C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR, 2011. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, 333, 6046, 1157-60.
- Sudhakar A, 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1 2, 1-4.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71, 3, 209-49.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*, 64, 11, 3753-6.
- , 2021. *Türkiye Kanser İstatistikleri 2017* p.
- Tsuchida N, Ohtsubo E, Ryder T, 1982. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science*, 217, 4563, 937-9.
- Tsuchida N, Uesugi S, 1981. Structure and functions of the Kirsten murine sarcoma virus genome: molecular cloning of biologically active Kirsten murine sarcoma virus DNA. *Journal of virology*, 38, 2, 720-7.
- Ulusan M, Sen S, Yilmazer R, Dalay N, Demokan S, 2022. The let-7 microRNA binding site variant in KRAS as a predictive biomarker for head and neck cancer patients with lymph node metastasis. *Pathology-Research and Practice*, 239, 154147.
- Ustinova M, Daneberga Z, Bērziņa D, Nakazawa-Miklaševiča M, Maksimenko J, Gardovskis J, Miklaševičs E, 2015. Impact of KRAS variant rs61764370 on breast cancer morbidity. *Experimental oncology*, 37, 4, 292-4.
- Valastyan S, Weinberg RA, 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 2, 275-92.

- Wild C, Weiderpass E, Stewart BW, 2020. World cancer report: cancer research for cancer prevention, IARC Press, p.
- Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability, 2020. World Health Organization, Erişim tarihi 5 January 2023. Erişim adresi, <https://www.who.int/data/gho/data/themes/theme-details/GHO/mortality-and-global-health-estimates>.
- Yamagiwa K, 1915. Experimentelle studie uber die pathogenese der epithelialgeschwulste. Mitt. Med. Fad. Tokio, 15, 295-344.
- Zhang H-F, Lai R, 2014. STAT3 in Cancer—Friend or Foe? Cancers, 6, 3, 1408-40.
- Zhang S, Hou C, Li G, Zhong Y, Zhang J, Guo X, Li B, Bi Z, Shao M, 2016. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the KRAS gene disrupts the interaction with let-7a and enhances the metastatic potential of osteosarcoma cells. International Journal of Molecular Medicine, 38, 3, 919-26.
- Zhang S-Y, Shi J, 2016. rs61764370 polymorphism of Kras and risk of cancer in Caucasian population: A meta-analysis. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 12, 2, 699-704.
- Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, Hahn SA, Triola G, Wittinghofer A, Bastiaens PI, Waldmann H, 2013. Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. Nature, 497, 7451, 638-42.



EK-B: KRAS Gen Dizisi

Homo sapiens K-ras oncogene protein (KRAS) mRNA, complete cds. Sequence ID: gb|M54968.1|HUMKRASM

ORIGIN

```
1 tcctaggcgg cggccgcggc ggcggaggca gcagcggcgg cggcagtggc ggcggcgaag
61gtggcggcgg ctgcccagc actccgggcc cccgccattt cggactggga gcgagcgcgg
121 cgcaggcact gaaggcggcg gcggggccag aggtcagcg gctcccaggt gcgggagaga
181 ggctgctga aatgactga atataaactt gtggtagtgt gagcttggc ctaggcaag
241 agtgccttga cgatacagc aattcagaat cttttgtgg acgaatatga tccaacaata
301 gaggttcct acaggaagca agtagtaatt gatggagaaa cctgtctctt ggatattctc
361 gacacagcag gtcaagagga gtacagtgtc atgagggacc agtacatgag gactggggag
421 ggctttctt gtgtattgc cataaataat actaaatcat ttgaagatat tcaccattat
481 agagaacaaa taaaagagt taaggactct gaagatgtac ctatggctct agtaggaaat
541 aatgtgatt tgcctctag aacagtagac aaaaacagg ctcaggactt agcaagaagt
601 tatggaattc cttttattga aacatcagca aagacaagac aggggtgtga tcatgccttc
661 tatacattag ttcgagaaat tcgaaaacat aaagaaaaga tgagcaaaga tggtaaaaag
721 aagaaaaaga agtcaaagac aaagtgtgta attatgtaa tacaatttgt actttttct
781 taaggcatac tagtacaagt ggtaatttt gtacattaca ctaaattatt agcatttgt
841 ttagcattac ctaattttt tctgctcca tgcagactgt tagctttac cttaaatgt
901 tattttaaaa tgacagtggg agttttttt tctcgaagt gccagtattc ccagagtttt
961 ggttttgaa ctagcaatgc ctgtgaaaaa gaaactgaat acctaagatt tctgtcttg
1021 ggttttggg gcatgcagtt gattacttct tttttctt accaagtgtg aatgttggtg
1081 tgaaacaaat taatgaagct ttgaatcat ccctattctg tgtttatct agtcacataa
1141 atggattaat tactaattc agttgagacc ttctaattgg ttttactga aacattgagg
1201 gacacaaatt tatgggcttc ctgatgatga ttctctagg catcatgtcc tatagtttgt
1261 catccctgat gaatgtaaag ttactgtgt cacaagggtt ttgtctcct tccactgta
1321 ttagcatggt tctctctccc caaatatta ttttttct ataaaaagaa aaaaatggaa
1381 aaaaattaca aggcaatgga aactattata aggccatttc ctttcacat tagataaatt
1441 actataaaga ctctaatag cttttcctg ttaaggcaga ccagtatga atgggattat
1501 tatagcaacc attttggggc tatatttaca tgctactaaa ttttataat aattgaaaag
1561 attttaacaa gtataaaaaa atttcatag gaattaaatg tagtctcct gtgtcagact
1621 gctcttcat agtataactt taaatcttt ctcaacttg agtctttgaa gatagtttta
1681 attctgcttg tgacattaaa agattatttg ggccagtat agcttattag gtgtgaaga
1741 gaccaaggtt gcaagccagg ccctgtgtga acctgagct tcatagaga gtttcacagc
1801 atggactgtg tgccccacgg tcatccgagt ggtgtacga tgcattggtt agtcaaaaat
1861 ggggagggac tagggcagtt tggatagctc aacaagatac aatctcactc tgtggtggtc
1921 ctgctgacaa atcaagagca ttgctttgt ttcttaagaa aacaaactct ttttaaaaa
1981 ttacttttaa atattaactc aaaagttag attttggggg ggtggtgtgc caagacatta
2041 atttttttt taacaatga agtgaaaaag tttaacaatc tctaggtttg gctagtctc
2101 ttaacactgg ttaaattaac attgcataaa cacttttcaa gtctgatcca tatttaataa
2161 tgctttaaaa taaaaataaa aacaatcctt ttgataaatt taaaatgta cttattttta
2221 aataaatgaa gtgagatggc atggtgaggt gaaagtatca ctggactagg ttgttggtga
2281 cttaggttct agataggtgt ctttaggac tctgattttg aggacatcac ttactatcca
```

2341 ttcttcacatg ttaaaagaag tcctctcaaa ctcttagttt tttttttta cactatgtga
 2401 tttatattcc atttacataa ggatacactt atttgtcaag ctcagcaciaa tctgtaaatt
 2461 tttaacctat gttacacat ctctcagtgcc agtcttgggc aaaattgtgc aagaggtgaa
 2521 gtttatattt gaatatccat tctcgtttta ggactcttct tccatattag tgcacattg
 2581 cctccctacc ttccacatgc cccatgactt gatgcagttt taatacttgt aattcccta
 2641 accataagat ttactgctgc tgtggatac tccatgaagt ttccactg agtcacatca
 2701 gaaatgccct acatcttatt ttctcaggg ctcaagagaa tctgacagat accataaagg
 2761 gatttgacct aatcactaat ttccaggtgg tggctgatgc ttgaacatc tcttgctgc
 2821 ccaatccatt agcgacagta ggatttttca accctgggtat gaatagacag aaccctatcc
 2881 agtgaagga gaatttaata aagatagtgc agaaagaatt ccttaggtaa tctataacta
 2941 ggactactcc tggtaacagt aatacattcc attgttttag taaccagaaa tctcatgca
 3001 atgaaaaata cttaattca tgaagcttac tttttttt ttggtgtcag agtctcgtc
 3061 ttgtcaccca ggctggaatg cagtggcgcc atctcagctc actgcaacct tccatcttc
 3121 caggttcaag cgattctcgt gcctcggcct cctgagtagc tgggattaca ggcgtgtgca
 3181 ctacactcaa ctaattttg tatttttagg agagacgggg ttccacctgt tggccaggct
 3241 ggtctcgaa tcttgacctc aagtgttca cccacctgg cctcataaac ctgttttga
 3301 gaactcattt attcagcaaa tatttattga gtgcctacca gatgccagtc accgcacaag
 3361 gcaactggga tatggtatcc ccaacaaga gacataatcc cggctcttag gtactgctag
 3421 tgtggtctgt aatatcttac taaggccttt ggtatacgac ccagagataa cacgatgcgt
 3481 attttagtt tgcaagaag gggtttggc tctgtgccag ctctataatt gtttgctac
 3541 gattccactg aaactcttcg atcaagctac tttatgtaaa tcaattcatt gttttaaagg
 3601 aataaacttg attatattgt tttttattt ggcataactg tgattcttt aggacaatta
 3661 ctgtacacat taagggtgtat gtcagatatt catattgacc caaatgtgta atattccagt
 3721 ttctctgca taagtaatta aaataactt aaaaattaat agttttatct gggtaacaat
 3781 aaacagtgc tgaactagt cagacagaag ggaaacttct atgtaaaaat cactatgatt
 3841 tctgaattgc tatgtgaac tacagatctt tggaactg tttaggtagg gtgttaagac
 3901 ttgacacagt acctcgttc tacacagaga aagaaatggc catacttcag gaactgcagt
 3961 gcttatgagg ggatatttag gcctcttgaa ttttgatgt agatgggcat tttttaagg
 4021 tagtggttaa ttacctttat gtgaacttg aatgggttaa caaaagattt gtttttag
 4081 agattttaaa gggggagaat tctagaaata aatgttacct aattattaca gccttaaaga
 4141 caaaaatcct tgttgaagt ttttaaaaa aagactaaat tacatagact taggcattaa
 4201 catgttttg gaagaatata gcagacgtat attgtatcat ttgagtgaat gttccaagt
 4261 aggcattcta ggctctattt aactgagtc cactgcatag gaatttagaa cctaactttt
 4321 ataggttacc aaaactgttg tcaccattgc acaattttgt cctaataat acatagaaac
 4381 ttgtggggc atgttaagt acagtttgca caagtcac tcaattgtat tccattgatt
 4441 tttttttc ttctaaacat ttttcttca aaacagtata tataacttt ttaggggat
 4501 ttttttaga cagcaaaaa ctatctgaag attccattt gcaaaaaagt aatgattct
 4561 tgataattgt gtagtgaatg ttttttagaa cccagcagtt acctgaaag ctgaattat
 4621 atttagtaac ttctgtgtta atactggata gcatgaattc tgcattgaga aactgaatag

8. TURNİTİN RAPORU

LARİNKS KANSERİNDE KRAS 3'UTR LCS6 MUTASYONU İLE IL-6 ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**9**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**5**

2

acikerisim.selcuk.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

acikerisim.aku.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

www.tibbigenetik.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

motifyayincilik.dergipark.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Submitted to Gaziantep Aniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

7

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Submitted to Ege Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

9

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**