



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKCİĞER KANSERİNDE PRE-MİR-34A RS35301225 VE PRİ-MİR-
34B/C RS4938723 POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Aycan ÇELİK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ercan ARICAN

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu alışma, 26.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Ercan ARIKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER
İstinye Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 28081 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisansa başladığım günden itibaren her fikrimi hoşgörü ile karşılayıp, isteklerimi geri çevirmeyen, zorlandığım konularda yardımını esirgemeyen, enerjisiyle akademik anlamda beni motive eden danışman hocam Prof. Dr. Ercan ARICAN'a;

Bu tezin hazırlanmasında büyük emeği olan, bana çözüm odaklı düşünebilmeyi öğreten, sadece akademik değil kişisel hayatımda da kendime örnek aldığım, fikirlerine değer verdiğim ve her zaman hoşgörüsünü ve sevgisini hissettiğim 2. danışman hocam Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK'e;

Akademik hayatımın başlangıcından itibaren bana yol gösteren, benimle bilgilerini paylaşan, içtenlikle her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Arzu EROL'a, Arş. Gör. Utku Can ATILGAN'a, İlke ULU'ya ve Esra ERMİŞ'e;

Her zaman tavsiyeleri, bilgisi ve sevgisiyle yanımda olan, birlikte ağlayıp birlikte güldüğümüz, “en”lerimi paylaştığım dostum Fatımatüzzehra ŞİPŞAK'a;

Hayatım boyunca aldığım her kararda desteklerini hissettiren, her sıkıntıma yardımlarıyla göğüs gerdiğim, üzerimde en büyük emeğe sahip olan canım ailem Recep ÇELİK, Saadet ÇELİK ve Abdullah ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2018

Aycan ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. AKCİĞER KANSERİ.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Etiyoloji	5
2.1.2.1. Sigara.....	5
2.1.2.2. Cinsiyet, Yaş ve Irk	5
2.1.2.3. Diyet.....	6
2.1.2.4. Çevresel Kirlilik.....	6
2.1.2.5. Aile Öyküsü ve Genetik Yatkınlık.....	6
2.1.3. Klinik Özellikler.....	7
2.1.4. Histopatolojik Sınıflandırma	7
2.1.5. Evreleme.....	8
2.1.6. Moleküler Patoloji.....	13
2.2. MİKRORNA	15
2.2.1. MikroRNA'ların Tarihçesi	15
2.2.2. MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu.....	16
2.2.3. MikroRNA-Kanser İlişkisi	18
2.2.4. Akciğer Kanserinde MikroRNA'lar	19
2.2.5. miR-34 Ailesi	20
2.2.5.1. miR-34a rs35301225 Polimorfizmi.....	23
2.2.5.2. miR-34b/c rs4938723 Polimorfizmi.....	24
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	27

3.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	27
3.1.1. Alet ve Cihazlar	27
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	28
3.1.3. Çözeltiler	28
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER	30
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	30
3.2.1.1. <i>Prensip</i>	30
3.2.1.2. <i>Protokol</i>	30
3.2.2. Primer Tasarımı ve Restriksiyon Enzimi Seçimi	31
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	32
3.2.4. Agaroz Jel Elektrophorezi	33
3.2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	34
3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi	35
3.2.7. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. MIR-34 GEN POLİMORFİZMLERİNİN FREKANSLARI.....	37
4.1.1. miR-34a rs35301225 Polimorfizmi	37
4.1.2. miR-34b/c rs4938723 Polimorfizmi	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	48
EKLER	60
EK 1. Etik Kurul Belgesi.....	60
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: 2012 yılına ait akciğer kanserine bağlı ölüm oranları [16].	3
Şekil 2.2: miRNA Biyogenezi [68].	17
Şekil 2.3: İnsan miR-34a, miR-34b ve mir34c genlerinin genomik lokasyonu [85].	20
Şekil 2.4: miR-34a, miR-34b ve miR34c 'nin hairpin yapıları.	21
Şekil 2.5: miR-34'ün görev ve hedefleri [98].	22
Şekil 2.6: miR-34a geninin genomik lokasyonu [109].	23
Şekil 2.7: a. Normal miR-34a'nın olgun yapısı. b. Polimorfik miR-34a'nın olgun yapısı [110].	24
Şekil 2.8: miR-34b ve miR-34c genlerinin genomik lokasyonu [112].	24
Şekil 2.9: pri-miR-34b/c'nin promotor bölgesindeki SNP rs4938723'ün lokasyonu ve yapısı [113].	26
Şekil 4.1: miR-34a primerleriyle yapılan PCR'ın agaroz jelde kontrolü.	38
Şekil 4.2: miR-34a gen polimorfizminin sonuçları.	39
Şekil 4.3: miR-34b/c primerleriyle yapılan PCR'ın agaroz jelde kontrolü.	40
Şekil 4.4: miR-34b/c gen polimorfizminin sonuçları.	40
Şekil 4.5: miR-34b/c rs4938723 polimorfizmi genotip frekansları.	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Yüzde Dağılımı [17].	3
Tablo 2.2: Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması [40].	8
Tablo 2.3: Primer Tümör Tanımlanması (T) [42].	10
Tablo 2.4: Bölgesel Lenf Nodu Tanımlanması (N) [42].	11
Tablo 2.5: Uzak Metastazın Tanımlanması (M) (c:Klinik p:Patolojik) [42].	12
Tablo 2.6: TNM Evrelendirmesi [42].	12
Tablo 2.7: Olgun miRNA'ların dizileri [85].	21
Tablo 3.1: Kullanılan enzimler ve reaksiyon koşulları.	34
Tablo 3.2: rs35301225 polimorfizminin genotiplemesi.	35
Tablo 3.3: rs4938723 polimorfizminin genotiplemesi.	36
Tablo 4.1: Akciğer kanseri hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.	37
Tablo 4.2: rs35301225 genotipleri ve akciğer kanseri riski.	39
Tablo 4.3: rs4938723 genotipleri ve akciğer kanseri riski.	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

α	: Alfa
β	: Beta
dk	: Dakika
°C	: Derece
T _m	: Erime sıcaklığı
g	: Gram
χ	: Ki
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ρ	: Rho
cm	: Santimetre
%	: Yüzde

Kisaltmalar Açıklama

A	: Adenin
AGO2	: Argonaute 2 preoteini
AJCC	: Amerikan Kanser Ortak Komitesi
ALK	: Anaplastic lymphoma kinase (ALK Reseptör Tirozin Kinaz)
ARFLP	: Yapay Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
BCL2	: B cell lymphoma 2
BRAF	: B-Raf proto-onkogeni
C	: Sitozin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CREB	: c-AMP response element binding protein
CYP	: Sitokrom P450 ailesi

DGCR8	: DiGeorge syndrome critical region gene-8
dH₂O	: distile su
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EML4	: Echinoderm microtubule associated protein like 4
ERBB2	: Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
EtBr	: Etidyum bromür
G	: Guanin
GST	: Glutasyon S-transferaz
H	: Adenin, timin ya da sitozin
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS	: Kirsten Rat Sarkoma Viral Proto-onkogen
let-7	: lethal-7
lin-4	: lineage-4
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz
miRNA	: MikroRNA
MRAS	: Muscle Rat Sarkoma Viral Proto-onkogen
MYC	: MYC proto-onkogeni
Na₂EDTA	: Disodyum EDTA
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
P53	: Tümör protein 53
R	: Adenin ya da guanin
RAS	: Rat Sarkoma Viral Proto-onkogen
RRAS	: RAS-related protein
RAB43	: RAS onkogen aile üyesi
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RISC	: RNA-induced silencing complex
ROS	: ROS proto-onkogeni
SCLC	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SIRT1	: Sirtuin 1

SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetik asit- EDTA
TNM	: Tümör/nod/metastaz
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U	: Urasil
UICC	: Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği
UTR	: Untranslated region- transle olmayan bölge
W	: Adenin ya da timin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Y	: Timin ya da sitozin

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKCİĞER KANSERİNDE PRE-MİR-34A RS35301225 VE PRİ-MİR-34B/C RS4938723 POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Aycan ÇELİK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ercan ARICAN

II. Danışman : Doç. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Akciğer kanseri GLOBOCAN 2012 verilerine göre dünya genelinde en sık görülen kanserdir. Akciğer kanseri etiyolojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Bazı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri akciğer kanserinde artmış riskle ilişkili bulunmuştur. MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük (19-25 nükleotid), kodlanmayan RNA'lardır ve negatif gen regülatörleri olarak bilinirler. miRNA'lar insan kanserlerinin patogeneğinde önemli roller üstlenmektedirler. Bu sebeple, miRNA polimorfizmleri karsinogenez için fazlasıyla önemli olabilmektedir. miR-34 akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde ekspresyon seviyesinin düştüğü bilinen bir miRNA ailesidir. *MET*, *RET* ve *RAB43* gibi onkogenleri hedefleyerek tümör baskılayıcılar gibi işlev görmektedir.

Bu çalışmada sırasıyla miR-34a ve miR-34b/c'ye ait iki polimorfizmi (rs35301225 C/T, A ve rs4938723 T/C) araştırdık. Çalışma popülasyonu 100 akciğer kanserli hasta ve 100 sağlıklı kontrolden oluşmaktaydı. EDTA içeren tüplere kanlar toplandıktan sonra genomik DNA izolasyonu yapıldı. Genetik polimorfizmler; polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR- RFLP) yöntemiyle tespit edildi.

miR-34b/c rs4938723'ün heterozigot CT varyantının, normal TT varyantına göre akciğer kanseri riskinin önemli ölçüde artmasıyla ilişkili olduğunu bulduk ($p < 0.001$). Kontrollerde hiç polimorfizme rastlanmamasına rağmen, 42 hastada heterozigot polimorfizm olduğunu gördük.

miR-34b/c polimorfizmi rs4938723'ün akciğer kanseri patogeneğinde önemli bir role sahip olduğu düşünölmektedir. Ancak miR-34a polimorfizmi rs35301225 ile insan akciğer kanseri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Aralık 2018, 76 sayfa.

Anahtar kelimeler: akciğer kanseri, miRNA, miR-34a, miR-34b/c, SNP, polimorfizm



SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF PRE-MIR-34A RS35301225 AND PRI-MIR-34B/C RS4938723 POLYMORPHISMS IN LUNG CANCER

Aycañ ÇELİK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ercan ARICAN

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sevim KARAKAŞ ÇELİK

Lung cancer is the most common cancer in the worldwide according to GLOBOCAN 2012. A number of factors play a role in lung cancer etiology. The expression level of some miRNAs in lung cancer has been associated with increased risk of cancer. MicroRNAs (miRNAs) are small (19-25 nucleotides), noncoding RNAs and known as negative gene regulators. miRNAs play an important role in the pathogenesis of human cancers. Because of that, miRNA polymorphisms can be important for carcinogenesis. miR-34 is a family of miRNAs known to have reduced levels of the expression in many human cancers including lung cancer. It functions like tumor suppressors and targets oncogenes like *MET*, *RET* and *RAB43*.

In this study we investigated two polymorphisms (rs35301225 C/T, A, rs4938723 T/C) in respectively miR-34a and miR-34b/c. The study population composed of 100 patient with lung cancer and 100 healthy controls. Blood was collected into EDTA-containing tubes and genomic DNA was extracted. Genetic polymorphisms were detected by using polymerase chain reaction- based restriction fragment length polymorphism (PCR- RFLP).

We found that miR-34b/c rs4938723 variant heterozygote CT was associated with a significant increase in the risk of lung cancer compared with their wild-type homozygote TT ($p < 0.001$).

There was no polymorphism in 100 controls but we found heterozygous polymorphism in 42 patients. rs4938723 polymorphism of miR-34b/c is thought to play an important role in the pathogenesis of lung cancer. However, no significant effects were observed in the relation between miR-34a polymorphism rs35301225 and human lung cancer.

December 2018, 76 pages.

Keywords: lung cancer, miRNA, miR-34a, miR-34b/c, SNP, polymorphism



1. GİRİŞ

Akciğer kanseri tüm dünyada insidansı en yüksek olan ve prognozu düşük olduğu için en sık ölüm nedeni olan kanser türüdür. Uluslararası Kanser Ajansı'nın yayınladığı GLOBOCAN 2012 verilerinde dünyada en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13.0), meme (%11.9) ve kolon kanseri (%9.7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19.4), karaciğer (%9.1) ve mide kanserinden (%8.8) kaynaklandığı belirtilmiştir [1]. Akciğer kanserleri, en sık görülen kanser tipleri arasında üst sıralarda ve kanser sebepli ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Kanser nedenli ölümlerin %28.4'ü akciğer kanseri kaynaklı olmakla birlikte hastalık dünya genelinde yılda ortalama 1,4 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır. Akciğer kanseri; biyoloji, tedavi ve prognoz göz önüne alındığında küçük hücreli akciğer kanseri (Small Cell Lung Cancer, SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Nonsmall Cell Lung Cancer, NSCLC) olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılmıştır [2]. Tedavideki ilerlemelere rağmen 5 yıllık sağkalım oranları NSCLC'de yaklaşık %15, SCLC'de %5 civarındadır [3]. Akciğer kanseri, etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. Sigara, hava kirliliği gibi çevresel faktörler, mesleki karsinogenler, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler başlıca etiyolojik faktörlerdir [4].

MikroRNA'lar (miRNA'lar) 19-25 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlanmayan RNA'lardır ve negatif gen düzenleyicileridir. Direkt olarak mRNA'yı parçalayarak ya da translasyonu inhibe ederek işlev görürler. Belirli miRNA'ların fonksiyon kaybetmesinin ya da kazanmasının veya aşırı miRNA ekspresyonunun, birçok kanser türünün tümörigenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir [5]. Akciğer kanserinde de bazı miRNA'ların ekspresyon seviyesi hasta sağkalımıyla ilişkili bulunmuştur [6]. Bu miRNA'ların kodlandığı DNA dizisinde meydana gelen bir polimorfizmin de miRNA ekspresyonunu, ikincil yapısını ve hedefine bağlanma afinitesini de etkileyebileceği akla gelmektedir.

miR-34, akciğer kanserinde ve başka insan kanserlerinde (pankreas, kolon, glioma) ekspresyon seviyesinin düştüğü bilinen bir miRNA ailesidir. Bu sebeple tümör baskılayıcı rol oynadığı iddia edilmektedir. miR-34a, miR-34b ve miR-34c olmak üzere üç üyesi bulunan miR-34 ailesi hücre döngüsü, apoptoz ve yaşlanma süreçlerinin düzenleyicisi olarak işlev görmektedir [7, 8, 9]. miR-34 ailesinin tümör protein 53 (P53), MYC protoonkogeni (MYC) gibi karsinogenezde

önemli rolleri olan proteinlerin genlerini hedefledikleri bilinmektedir [10, 11]. Bunun yanı sıra; tahmin edilen hedeflerinin MET ve RET protoonkogenleri ve RAB43 (RAS onkogen aile üyesi), RRAS (RAS-related protein), MRAS (Muscle RAS Onkogen Homoloğu) onkogenleri olması ve P53 tümör baskılayıcı geniyle düzenlenmesi sebebiyle kanser prognozunda ekspresyonunun önemli olduğu düşünülmüştür [12, 13, 14].

Bu tez kapsamında; akciğer kanseri hastalarında ve akciğer kanseri bakımından sağlıklı bireylerde, miR-34a'nın rs35301225 polimorfizmi ve mir-34b/c'nin rs4938723 polimorfizmi araştırılmıştır. Bu çalışmanın, akciğer kanserine yatkınlık profili oluşturulmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. AKCİĞER KANSERİ

2.1.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri Türkiye ve dünyada hem erkeklerde hem kadınlarda ölüme sebep olan kanserlerin başında gelmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC – International Agency for Research on Cancer) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2012 verilerine göre dünya genelinde erkekler arasında %23.6 ile en yaygın kanser olan akciğer kanseri, kadınlarda %13.8 görülme sıklığıyla meme kanserinden (%14.7) sonra ikinci sıradadır. Tespit edilen yeni akciğer kanserli vaka sayısı 1.824.700 iken, yaklaşık 1.589.900 vakada akciğer kanserine bağlı ölüm meydana gelmiştir [15].

2012’de çoğunlukla az gelişmiş ülkelerde olmak üzere 1.6 milyon insan akciğer kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir ve 2035’e kadar bu sayının 3 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [16].



Şekil 2.1: 2012 yılına ait akciğer kanserine bağlı ölüm oranları [16].

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerini dikkate alarak Türkiye’de kanser vakalarının on yıl içinde %80 oranında artış gösterdiğini, 2002 yılında %12 olan kansere bağlı ölüm oranının ise 2012 yılında %21’e yükseldiğini açıklamıştır. Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi Başkanlığının son kanser istatistikleri raporunda 2014 yılında erkeklerde trake, bronş ve akciğerde yaşa standardize kanser hızı 52.5/100.000 iken kadınlarda 8.7/100.000 olduğu bildirilmiştir. Yine bu raporda GLOBOCAN 2012 verilerine göre Türkiye’de erkeklerde en sık

görülen kanser türü akciğer kanseri iken, kadınlarda sırasıyla meme, tiroid, kolorektal ve uterus korpus kanserini takiben beşinci sırada yer aldığı belirtilmiştir [17].

Bunlara ek olarak TÜİK 2014 verilerine göre akciğer kanseri evrelerinin yüzde dağılımları lokalize %18.1, bölgesel %29.2 ve uzak metastaz %52.7 olarak açıklanmıştır. Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin yüzde dağılımı incelendiğinde ise Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri %79.2, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri %16.6 ve diğer %4.2 olarak gösterilmiştir [17].

Tablo 2.1: Akciğer Kanserinin Histolojik Tiplerinin Yüzde Dağılımı [17].

HİSTOLOJİK TİP	%	%	%
AKCİĞER	97.2		
Küçük Hücreli Olmayan		79.2	
Yassı Hücreli			37.5
Adenokarsinom			43.8
Büyük Hücreli			1.8
NOS			16.8
Küçük Hücreli		16.6	
Diğer*		4.2	
MEZOTELYOMA	2.8		
TOPLAM	100.0	100.0	100.0

(*Malign epitelial tümör, Malign soliter fibröz tümör, Malign epitelıom, Mukoepidermoid karsinom, Sarkom, Karsinosarkom)

Akciğer kanseri geç teşhis edilen kanserlerden biridir. Türkiye’de erkekler başta olmak üzere akciğer kanseri ve tütüne bağlı kanser türlerinde azalma eğilimi gözlenmektedir. Ancak son yıllarda tütün kullanımının artmasıyla bunun değişebileceği, artma eğilimine dönüşebileceği düşünülmektedir [17].

2.1.2. Etiyoloji

2.1.2.1. Sigara

Sigara kullanımı akciğer kanseri için başlıca risk faktörlerinden biridir. Sigara 3500'den fazla kimyasal madde bulundurmaktadır. Bunlardan 20 tanesinin insanlar için karsinojen olduğu bilinmektedir [18]. Gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %90'ının sigara kullandığı, akciğer kanserine bağlı ölümlerin ise erkeklerde %90'ından fazlasının kadınlarda ise yaklaşık %80'inin sigara kullanımıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde ise akciğer kanserli kadınların %17'sinin, erkeklerin ise %94'ünün sigara kullandığı belirtilmiştir. Sağlık Bakanlığı'nın 2014 yılı kanser istatistikleri raporunda sigara kullanımına bağlı kanser vakalarının sayısı erkeklerde 27.718 olarak tahmin edilmektedir. Ayrıca bu raporda; akciğer kanserinde ve sigara kullanımına bağlı kanserlerde insidansın azaldığına, fakat artan sigara kullanımının kanser görülme sıklığını artırabileceğine dikkat çekilmiştir [17]. Sigara kullanmayan insanlarda bile pasif içicilik olarak tabir edilen çevreye yayılan sigara dumanının solunmasıyla alınan karsinojenler sebebiyle akciğer kanseri riskinin 3,5 kat arttığı gözlenmiştir [19]. Erken evrede tanı alan akciğer kanseri hastalarında sigara kullanımını bırakmanın olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Bu hastalarda sigara kullanımı devam ettiği takdirde ise mortalite ve ikinci bir primer tümörün oluşma oranında artış olduğu saptanmıştır [20].

2.1.2.2. Cinsiyet, Yaş ve Irk

Akciğer kanseri erkeklerde daha sık görülmekle beraber, kadınlarda son yıllarda artış göstermektedir. Ancak kadınlarda hayatta kalma erkeklerle göre daha fazla gözlenmiştir. Bazı araştırmacılar sigara maruziyetinde kadınların erkeklerle göre 1,5-2 kat daha akciğer kanseri geliştirme riski taşıdıklarını belirtmişlerdir [21].

Akciğer kanserinin ileri yaşlarda daha fazla görüldüğü bilinmektedir ve en fazla görüldüğü yaş yaklaşık 65'tir. Bu bulgu sigara kullanımıyla ilişkilendirilmektedir çünkü sigara alışkanlığının etkisini göstermesi için gerekli indüksiyon süresinin sağlandığı düşünülmektedir. Ayrıca araştırmalarda 80 yaş üstünde akciğer kanseri görülme sıklığında bir düşüş olduğu gösterilmiştir [22].

Çok belirgin olmasa da etnik kökenler arasında da akciğer kanserine yatkınlık açısından farklar bulunmaktadır. Afrikan-Amerikanlar ve Yeni Zellanda yerlilerinde daha yüksek ölüm oranları

gözlenmiştir [23]. Buna ek olarak bir çalışmada siyahların beyazlara göre taşıdığı akciğer kanseri riskinin 1,8 kat fazla olduğu bildirilmiştir [24].

2.1.2.3. Diyet

İnsanlarda akciğer kanserinden koruyucu olarak A vitamini, β -karoten, retinol içeren sarı-yeşil sebzelerin ve meyvelerin tüketilmesi tavsiye edilmektedir [25]. Buna rağmen bazı çalışmalar vitamin desteğinin koruyucu olmadığını, β -karoten, retinol ya da α -tocopherol'ün bir etkisinin olmadığını savunmaktadır [26, 27, 28]. Hatta takviyeleri alan kişilerde %28'lik bir artmış mortalite olduğu gösterilmiştir [28]. Hayvanlarda yapılan çalışmalardan bazıları ise zeytinyağının önemli bir koruyucu etkisinin olduğunu savunmaktadır [29]. Çok düşük bir risk faktörü de olsa doymuş yağ içeren bir diyet tavsiye edilmemektedir [30].

2.1.2.4. Çevresel Kirlilik

Çevre kirliliği akciğer kanseri için bir risk olarak kabul edilmiştir. Motorlu taşıtların egzoz dumanı, ısıtma sistemleri elektrik santraller vb. oluşturduğu çevresel kirlilik nedeniyle akciğer kanseri kırsal yerlere göre kentlerde daha fazla gözlenmektedir. Çevre kirliliğine maruziyetin miktarı ve süresinin ölçülmesi zor olduğundan ve kirlетici konsantrasyonunun değişmesinden dolayı bu konuda çok fazla çalışma yapılamamaktadır. Benzopiren ve aromatik hidrokarbonların yoğun olduğu yerlerde akciğer kanseri vakalarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca vinil klorür, arsenik, krom, nikel, bisklorometileter, egzoz, kükürt dioksit, radon gazı gibi kirlетicilere maruziyet de riski artırmaktadır [31]. 35 izotopu bulunan radon gazı (özellikle Rn222)'nın RAS ve P53 mutasyonlarına sebep olduğu gösterilmiştir [32]. Ayrıca meslekleri sebebiyle toz veya mikroskobik parçacıklara (asbest, odun tozu, silika) maruz kalan işçilerde akciğer kanseri gelişme riskinin yüksek olduğu belirtilmiştir [33].

2.1.2.5. Aile Öyküsü ve Genetik Yatkınlık

Akciğer kanserli hastaların birinci dereceden akrabalarında kansere yakalanma riskinin 2,4 kat arttığı bildirilmiştir. Ayrıca erken yaşta akciğer tanısı almış birden fazla akrabası olan bireylerde riskin daha fazla olduğu gözlenmiştir [34]. Sigara kullanmayan ve eskiden kullanan bireyler ve ailelerini kapsayan bir çalışmada, herhangi bir kanser tanısı almış aile bireylerinin sayısı ile akciğer kanseri riskinin doğru orantılı olduğu bildirilmiştir [35].

Sigara içicilerinin %15'i akciğer kanserine yakalanır. Bunun sebebi kesin olarak bilinmemekle beraber karsinojenlerin vücutta daha az birikmesine neden olabilen genetik polimorfizmlerin varlığı yani genetik duyarlılığa bağlanmaktadır. Bugüne kadar akciğer kanserinin ortaya çıkmasında sorumlu olabilecek genler sitokrom P450 aile üyeleri *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2A6*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP2E1* ve glutatyon S-transferaz üyeleri *GSTM1*, *GSTT* ve *GSTP* olarak belirlenmiştir. Bunlardan *CYP1A1*, *CYP2D6* ve *GSTM1* en ilişkili olanlardır. Mevcut bilgiler ışığında genetik yatkınlık profili elde edebilmek için çok sayıda genin farklı polimorfizmleri tespit edilerek incelenmelidir [36].

2.1.3. Klinik Özellikler

Akciğer kanseri tanısı çoğunlukla erken evrelerde konulamamaktadır. Bunun muhtemel sebebi hastalığın metastaz yapmadan ya da lokal olarak daha agresif hale gelmeden önce belirti göstermemesidir. Vakaların yaklaşık dörtte biri erken evrede, yarısından fazlası ileri evrede primer tümör, uzak metastaz ve paraneoplastik sendroma bağlı semptomlar sebebiyle tanı almaktadır [37]. En sık gözlenen semptomlar öksürük, kilo kaybı, nefes darlığı, göğüs ağrısıdır [38].

Öksürük sigara içen bireylerde mevcut olup, karakter değiştirerek devam ederse akciğer kanserinden şüphelenilebilir. Nefes darlığı da çoğunlukla karşılaşılan semptomlardan olup ayırıcı bir özelliğe sahip değildir. Bunlarla birlikte invazyonla birlikte Süperior vena kava sendromu, Horner sendromu, ses kısıklığı, disfaji meydana gelebilir. Sürekli baş ağrısı, yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı veya kemik ağrısı kemik, karaciğer ya da beyin metastazını işaret ediyor olabilir [37].

Akciğer kanserinde sıklıkla gözlenen paraneoplastik semptomlar ve sendromlar, uygunsuz antidiüretik hormon sekresyonu, cushing sendromu, hiperkalsemi, hipokalsemi, jinekomasti, karsinoid sendromdan oluşmaktadır. Bunlardan uygunsuz antidiüretik hormon sekresyonu ve cushing sendromu çoğunlukla küçük hücreli karsinomda gözlenirken, hiperkalsemi skuamöz hücreli karsinomda sıklıkla gözlenmektedir. Adenokarsinomlarda diğer tiplere göre endokrin ve paraneoplastik sendromlar daha az gözlenmektedir [39].

2.1.4. Histopatolojik Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü (WHO – World Health Organization) 2015'te akciğer kanseri sınıflandırmasını güncelleyerek açıklamıştır. Bu sınıflandırmada temel olarak akciğer kanseri;

epitelyal tümörler, nöroendokrin tümörler, mezenkimal tümörler, lenfohistiyoit tümörler, ektopik orijinli tümörler ve metastatik tümörler olmak üzere altı ana gruba ayrılmıştır [40].

Tablo 2.2: Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırması [40].

1. EPİTELYAL TÜMÖRLER
1.1. Adenokarsinoma
1.1.1. Lepidik adenokarsinoma
1.1.2. Asiner adenokarsinoma
1.1.3. Papiler adenokarsinoma
1.1.4. Mikropapiler adenokarsinoma
1.1.5. Solid adenokarsinoma
1.1.6. İnvaziv müsinöz adenokarsinoma
Mix invaziv müsinöz ve nonmüsinöz adenokarsinoma
1.1.7. Kolloid adenokarsinoma
1.1.8. Fetal adenokarsinoma
1.1.9. Enterik adenokarsinoma
1.1.10. Minimal invaziv adenokarsinoma
Nonmüsinöz
Müsinöz
1.1.11. Preinvaziv lezyonlar
Atipik adenomatöz hiperplazi
İn situ adenokarsinoma
Nonmüsinöz
Müsinöz
1.2. Skuamöz Hücreli Karsinoma
1.2.1. Keratinize skuamöz hücreli karsinoma
1.2.2. Nonkeratinize skuamöz hücreli karsinoma
1.2.3. Bazaloid skuamöz hücreli karsinoma
1.2.4. Preinvaziv lezyonlar
İn situ skuamöz hücreli karsinoma
2. NÖROENDOKRİN TÜMÖRLER
2.1. Küçük Hücreli Karsinoma
2.1.1. Kombine küçük hücreli karsinoma
2.2. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinoma
2.2.1. Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinoma
2.3. Karsinoid Tümörler
2.3.1. Tipik karsinoid tümörler
2.3.2. Atipik karsinoid tümörler
2.4. Preinvaziv Lezyon
2.4.1. Diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi
2.5. Büyük Hücreli Karsinoma
2.6. Adenoskuamöz Karsinoma
2.7. Sarkomatoit Karsinomalar
2.7.1. Pleomorfik karsinoma
2.7.2. İgisi hücreli karsinoma
2.7.3. Dev hücreli karsinoma
2.7.4. Karsinosarkoma
2.7.5. Pulmoner blastoma

Tablo 2.2 (devam):

2.8. Diğer ve Sınıflandırılmamış Karsinomalar
2.8.1. Lenfoepitelyoma benzeri karsinoma
2.8.2. NUT karsinoma
2.9. Tükürük Bezi Tipi Tümörler
2.9.1. Müköepidermoid karsinoma
2.9.2. Adenoid kistik karsinoma
2.9.3. Epitelyal -myoepitelyal karsinoma
2.9.4. Pleomorfik adenoma
2.10. Papilomalar
2.10.1. Skuamöz hücreli papiloma Ekzofitik Inverted (ters)
2.10.2. Glandüler papiloma
2.10.3. Mix skuamöz ve glandüler papiloma
2.11. Adenomalar
2.11.1. Sklerozan pnömositoma
2.11.2. Alveoler adenoma
2.11.3. Papiller adenoma
2.11.4. Müsinöz kistadenoma
2.11.5. Muköz bez adenoması
3. MEZENKİMAL TÜMÖRLER
3.1. Pulmoner Hamartoma
3.2. Kondroma
3.3. PEComatöz Tümörler
3.3.1. Lenfanjiyoleiomyomatoz
3.3.2. PEComa, iyi huylu Berrak hücreli tümör
3.3.3. PEComa, kötü huylu
3.4. Konjenital Peribronşiyal Myofibroblastik Tümör
3.5. Diffüz Pulmoner Lendanjiyomatöz
3.6. İnflammatuar Myofibroblastik Tümör
3.7. Epiteloid Hemanjiyoendotelyoma
3.8. Pleuropulmoner Blastoma
3.9. Sinoviyal Sarkoma
3.10. Pulmoner Arter İntimal Sarkoma
3.11. Pulmoner Mixoid Sarkoma (EWSR1-CREB1 translokasyonu ile)
3.12. Myoepitelyal Tümörler
3.12.1. Myoepitelyoma
3.12.2. Myoepitelyal karsinoma
4. LENFOHİSTİYOSİT TÜMÖRLER
4.1. Mukoza İlişkili Ekstranodal Marjinal Zon Lenfoma
4.1.1. Lenfoid doku (MALT lenfoma)
4.2. Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma
4.3. Lenfomatoid Granülomatoz
4.4. İntravasküler Büyük B Hücreli Lenfoma

Tablo 2.2. (devam):

4.5. Pulmoner Langerhans Hücreli Histiositoz
4.6. Erdheim- Chester Hastalığı
5. EKTOPIK ORJİNLI TÜMÖRLER
5.1. Germ Hücreli Tümörler
5.1.1. Teratoma, matür
5.1.2. Teratoma, immatür
5.2. İntrapulmoner Thymoma
5.3. Melanoma
5.4. Menenjiyoma, NOS
6. METASTATİK TÜMÖRLER

2.1.5. Evreleme

Akciğer kanseri tanısı konulan hastalarda evreleme, hastalığın seyri, yayılması ve tedavisini belirlemek açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu sayede daha önceki deneyimler ve bunların sonuçlarına göre yeni vakalarda en uygun tedavi seçimi mümkün olabilmektedir. Benzer biyolojiye sahip hastaları gruplandırarak kanser evresinin belirlenmesi, ilk kez 1946 yılında Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC- The American Joint Committee on Cancer) ve Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC- The Union for International Cancer Control's) tarafından önerilen tümör/nod/metastaz (TNM- tumor/node/metastasis) sistemiyle gerçekleştirilmektedir. TNM sisteminde, primer tümörün büyüklüğü ve yayılması (T), bölgesel lenf nodu tutulumu (N) ve uzak metastaz mevcudiyetine (M) göre derecelendirme yapılarak I ile IV arasında kanserin evresi tespit edilir. 1986 yılında ise Uluslararası Akciğer Kanseri Evreleme Sistemi adı verilerek akciğer kanserine özgü bir evreleme sistemi geliştirilmiştir [41]. Sonraki yıllarda da güncellemeler ilave edilerek bu sistem kullanılmaya devam edilmiştir. Böylece dünya çapında uygulanabilen en kullanışlı sistem olma özelliği göstermektedir. AJCC tarafından 5 Haziran 2018'de Kanser Evreleme Kılavuzu'nun 8. Baskısı (2016) güncellenmiştir [42].

Tablo 2.2: Primer Tümör Tanımlanması (T) [42].

T Kategorisi	T Kriteri
TX	Primer tümör değerlendirilemez veya tümör, balgam veya bronşiyal yıkamalarda malign hücrelerin varlığı ile kanıtlanır, ancak görüntüleme veya bronkoskopi ile görüntülenemez.
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ Skvamöz hücreli karsinoma in situ (SCIS) Adenokarsinoma in situ (AIS): saf lepidik desenli adenokarsinoma, en büyük boyutta ≤ 3 cm

Tablo 2.3 (devam):

T1	Tümörün en büyük boyutu ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrelenmiş, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale invazyon yapmayan (yani ana bronşta değil).
-T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom: adenokarsinom (en büyük boyutta ≤ 3 cm) ve büyük ölçüde lepidik patern ve ≤ 5 mm invazyon
-T1a	Tümörün en büyük boyutu ≤ 1 cm. İnvazif bileşeni bronş duvarı ile sınırlı ve proksimalden ana bronşa kadar uzanabilen herhangi bir büyüklükte yüzeysel, yayılan bir tümör T1a olarak sınıflandırılır, ancak bu tümörler nadirdir.
-T1b	Tümör >1 cm ama en büyük boyutta ≤ 2 cm
-T1c	Tümör >2 cm ama en büyük boyutta ≤ 3 cm
T2	Tümör >3 cm ama ≤ 5 cm veya aşağıdaki özelliklerden herhangi birine sahip: - Karinaya olan mesafeden bağımsız olarak ana bronşları içerir, ancak karinaya katılmadan - Visseral plevrayı kaplar (PL1 veya PL2) - Akciğerin bir kısmının ya da tümünün dahil olduğu hiler bölgeye uzanan atelektazi ya da obstrüktif pnömonit ile ilişkilidir Bu özelliklere sahip T2 tümörleri ≤ 4 cm ise T2a olarak sınıflandırılır veya boyut belirlenemezse ve > 4 cm ama ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.
-T2a	Tümör >3 cm ama en büyük boyutta ≤ 4 cm
-T2b	Tümör >4 cm ama en büyük boyutta ≤ 5 cm
T3	Tümör >5 cm ama en büyük boyutta ≤ 7 cm ya da aşağıdakilerden herhangi birini doğrudan kaplar: parietal plevra (PL3), göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard; veya tümör nodül (ler) ü birincil ile aynı lobda ayırır.
T4	Tümör >7 cm veya aşağıdakilerden birini veya daha fazlasını kaplayan herhangi bir büyüklükteki tümör: diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, omur gövdesi veya karina; Birincil tümörden farklı bir ipsilateral lobda ayrı tümör nodül(ler)' ü.

Tablo 2.3: Bölgesel Lenf Nodu Tanımlanması (N) [42].

N Kategorisi	N Kriteri
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	İpsilateral peribronşiyal ve / veya ipsilateral hiler lenf nodlarında ve intrapulmoner nodlarda metastaz.
N2	İpsilateral mediastinal ve / veya subkarinal lenf nodu(lar)' nda metastaz.
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral scalen veya supraklaviküler lenf nodu(lar)' nda metastaz.

Tablo 2.4: Uzak Metastazın Tanımlanması (M) (c:Klinik p:Patolojik) [42].

M Kategorisi	M Kriteri
cM0	Uzak metastaz yok.
cM1	Uzak metastaz var.
-cM1a	Kontralateral lobda ayrılan tümör nodülü (ler); plevral veya perikardiyal nodüllerle birlikte tümör veya malign plevral veya perikardiyal efüzyonlu tümör. Akciğer kanserli çoğu plevral (perikardiyal) efüzyon, tümörün bir sonucudur. Bununla birlikte, birkaç hastada, plevral (perikardiyal) sıvının çoklu mikroskopik incelemeleri tümör için negatiftir ve sıvı, kanlı ve eksüda değildir. Bu elementler ve klinik yargı, efüzyonun tümörle ilişkili olmadığını dikte ederse, efüzyon bir evreleme tanımlayıcısı olarak dışlanmalıdır.
-cM1b	Tek bir organda tek ekstrathorakik metastaz (tek bir bölgelerarası düğümün ilişkisi bile dahildir).
-cM1c	Tek bir organda veya çoklu organlarda multipl ekstrathorakik metastazlar.
pM1	Mikroskopik olarak doğrulanmış uzak metastaz.
-pM1a	Kontralateral lobda ayrılan tümör nodülü (ler); plevral veya perikardiyal nodüllerle birlikte tümör veya malign plevral veya perikardiyal efüzyonlu tümör (mikroskopik olarak doğrulanmış). Akciğer kanserli çoğu plevral (perikardiyal) efüzyon, tümörün bir sonucudur. Bununla birlikte, birkaç hastada, plevral (perikardiyal) sıvının çoklu mikroskopik incelemeleri tümör için negatiftir ve sıvı, kanlı ve eksüda değildir. Bu elementler ve klinik yargı, efüzyonun tümörle ilişkili olmadığını dikte ederse, efüzyon bir evreleme tanımlayıcısı olarak dışlanmalıdır.
-pM1b	Tek bir organda tek ekstrathorakik metastaz (tek bir bölgelerarası düğümün ilişkisi bile dahildir). Mikroskopik olarak doğrulanmıştır.
-pM1c	Tek bir organda veya çoklu organlarda multipl ekstrathorakik metastazlar. Mikroskopik olarak doğrulanmıştır.

Tablo 2.5: TNM Evrelendirmesi [42].

T	N	M	Evre
TX	N0	M0	Gizli Karsinoma
Tis	N0	M0	0
T1mi	N0	M0	IA1
T1a	N0	M0	IA1
T1a	N1	M0	IIB
T1a	N2	M0	IIIA
T1a	N3	M0	IIIB
T1b	N0	M0	IA2
T1b	N1	M0	IIB
T1b	N2	M0	IIIA

Tablo 2.6 (devam):

<i>T1b</i>	N3	M0	IIIB
<i>T1c</i>	N0	M0	IA3
<i>T1c</i>	N1	M0	IIB
<i>T1c</i>	N2	M0	IIIA
<i>T1c</i>	N3	M0	IIIB
<i>T2a</i>	N0	M0	IB
<i>T2a</i>	N1	M0	IIB
<i>T2a</i>	N2	M0	IIIA
<i>T2a</i>	N3	M0	IIIB
<i>T2b</i>	N0	M0	IIA
<i>T2b</i>	N1	M0	IIB
<i>T2b</i>	N2	M0	IIIA
<i>T2b</i>	N3	M0	IIIB
<i>T3</i>	N0	M0	IIB
<i>T3</i>	N1	M0	IIIA
<i>T3</i>	N2	M0	IIIB
<i>T3</i>	N3	M0	IIIC
<i>T4</i>	N0	M0	IIIA
<i>T4</i>	N1	M0	IIIA
<i>T4</i>	N2	M0	IIIB
<i>T4</i>	N3	M0	IIIC
<i>Herhangi bir T</i>	Herhangi bir N	M1	IV
<i>Herhangi bir T</i>	Herhangi bir N	M1a	IVA
<i>Herhangi bir T</i>	Herhangi bir N	M1b	IVA
<i>Herhangi bir T</i>	Herhangi bir N	M1c	IVB

2.1.6. Moleküler Patoloji

Kanser bilindiği üzere hücrelerin birtakım farklılaşmalar geçirerek kontrolsüz bir biçimde aşırı çoğalmaya başlamasının sonucunda ortaya çıkmaktadır. Normal hücrelere göre daha hızlı bölünen ve durdurulamayan bu hücrelerdeki çeşitli genlerde ekspresyon farklılıkları ve meydana gelen mutasyonlar kanser tipine göre farklılık göstermekte ve çoğu araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Bu farklılıklara bakılarak hastalık ve evre teşhisi yapılabilmekte, bunun yanında yatkınlık derecesi belirlenebilmektedir.

Tirozin kinaz reseptörlerinden epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*- Epidermal growth factor receptor)'nün aktive edici etkiye yol açan mutasyonu akciğer adenokarsinomalarının

%20'sinde tespit edilmiştir ve ileri evre akciğer kanserinin tanısında test edilmektedir. Anormal aktivasyonu çeşitli sinyal yollarını aşırı etkinleştirerek apoptoz inhibisyonu, hücre çoğalması, migrasyon artışı yollarıyla kanser gelişimine katkı sağlamaktadır. Bunun yanı sıra aşırı ekspresyonu da küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %50-90'ında gözlenmiştir. Bunların tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak tümör gerilemesi sağlanmaktadır [43]. *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase) genindeki kromozomal değişiklikler akciğer adenokarsinomlarının %5'inde gözlenmiştir. En sık rastlanan değişiklik *EML4* (Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4)-*ALK* insersiyonudur [44]. Kromozomal değişiklikler görülen diğer önemli genler *ROS1* ve *RET* genleridir. İkisinin de akciğer kanserinde insidansı %1-2 arasındadır ve yine tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavileri önerilmektedir [44]. *ROS1* değişiklikleri *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* ve diğer onkogenik değişikliklerle bir arada görülebilmektedir [45].

Onkogenik mutasyonlardan *KRAS* mutasyonu akciğer adenokarsinomlarının %20-30'unda gözlenmiştir. Mutasyonla birlikte *RAS* yolağı aktif kalmakta ve *MAPK* (Mitojen-aktif protein kinaz) fosforilasyonu aktifleşmektedir. Bu da hücre çoğalması ve tümör gelişimine neden olmaktadır [46]. Bunun yanı sıra daha nadir olmakla beraber diğer kanserlerdeki gibi *BRAF* mutasyonu da onkogenik değişikliğe sebep olmaktadır. Özellikle meme kanserinde karşılaşılan ve kullanılan *ERBB2* (Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 / *HER2*) mutasyonu ve amplifikasyonu akciğer adenokarsinomalarında sırasıyla %2-4 ve %10-20 oranında saptanmaktadır [47,48].

MET protoonkogeni akciğer kanserinde büyük öneme sahip değişime uğrayan bir diğer gendir ve amplifikasyonu, aşırı ekspresyonu ve mutasyona uğraması bulunduğu sinyal yolağının etkilenmesini farklı biyolojik rollerinden ötürü çeşitli kanserlerde tümör gelişimini, ilerlemeyi ve invazyonu artırdığı gösterilmiştir [49- 51].

Ayrıca bu genler dışında mikroRNA (miRNA) genlerinde meydana gelen değişikliklerin de tümörigenezde etkili olduğu keşfedildikten sonra akciğer kanseriyle ilişkili miRNA'lar araştırılmıştır. Bunlardan en önemlisi farklı kromozomların çoğunlukla fragil bölgelerinde konumlanmış *let-7* (lethal-7) miRNA ailesinin genleridir. Akciğer kanserinde bu genlerin sıklıkla delesyona uğradığı saptanmıştır [52]. Delesyon olmadığı zamanlarda ise tümör baskılayıcı role sahip *let-7*'nin azalmış ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [53]. *let-7* ailesinin hedef genleri siklin bağımlı kinaz *CDK6*, *c-MYC* ve *KRAS* gibi onkogenlerdir. Akciğer kanserinde ekspresyonunun azaldığı bilinen başka bir miRNA ailesi, *c-MYC*, *CREB*,

CDK4/6, *MET*, *BCL-2* gibi onkogenleri hedefleyen miR-34 ailesidir [54]. P53 tarafından uyarılan tümör baskılayıcı role sahip miR-34'ün birçok kanser tipinde etkisi olduğu gösterilmiştir [55].

Küçük hücreli akciğer kanserinde miR-17-92 (miR-17, miR18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) ailesinin ekspresyon seviyesinin arttığı bilinmektedir [56]. Bunun gibi ekspresyon seviyesi veya aktivitesi artarak kanser gelişimine katkıda bulunan miRNA'lara onkomir adı verilmektedir ve tümör baskılayıcı genleri hedeflemektedirler. Akciğer kanserinde onkomir olarak bilinen bazı miRNA'lar; miR-31 [57], miR-21, miR-200b, miR-375, miR-486 [58]'dir.

2.2. MİKRORNA

İnsan genomunun yalnızca %1.5'inin fonksiyonel ürüne dönüştürüldüğü bilinmektedir. Genomun kalan büyük bölümünün önemi işlevsel küçük RNA'ların keşfedilmesiyle anlaşılmıştır. Bu küçük RNA'lardan olan mikroRNA'lar (miRNA) tek zincirli, saç tokası yapısı içeren, kodlanmayan RNA'lardır. 19-25 nükleotid uzunluğunda olup negatif gen düzenleyicileri olarak işlev görmektedirler [5]. Binlerce insan miRNA'sı keşfedilmiş olup insan genomunun yaklaşık %3'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unun düzenlenmesinde görev almaktadır [59].

2.2.1. MikroRNA'ların Tarihçesi

miRNA'lar ilk olarak Lee ve diğ. tarafından 1993'te *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) isimli nematodta *lin-4* (linage-4) geninin tanımlanmasıyla tespit edilmiştir. *lin-4* bu nematodun larva gelişiminin zamanlamasını kontrol eden bir gendir ve 22 nükleotidlik bir RNA dizisi transkribe etmektedir. Bunun yanı sıra *lin-14* mRNA translasyona uğramayan 3'UTR (untranslated region) bölgesiyle komplementer olup baz eşleşmesi ile translasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [60]. Moss ve diğ. *lin-4*'ün *lin-28*'i de regüle ettiğini bildirmişlerdir [61].

2000'de ise Reinhart ve diğ. tarafından yine *C. elegans*'ta 22 nükleotidlik let-7 (lethal-7) adında ikinci miRNA keşfedilmiştir [62]. Aynı çalışmada bu miRNA'nın *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* mRNA'larının fonksiyonlarını inhibe ettiğini bulmuşlardır [62].

Daha sonraki yıllarda çoğu çok hücreli organizmada bunlara benzeyen küçük RNA molekülleri keşfedilmiş ve mikroRNA (miRNA) terimi kullanılmaya başlanmıştır [63].

2.2.2. MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu

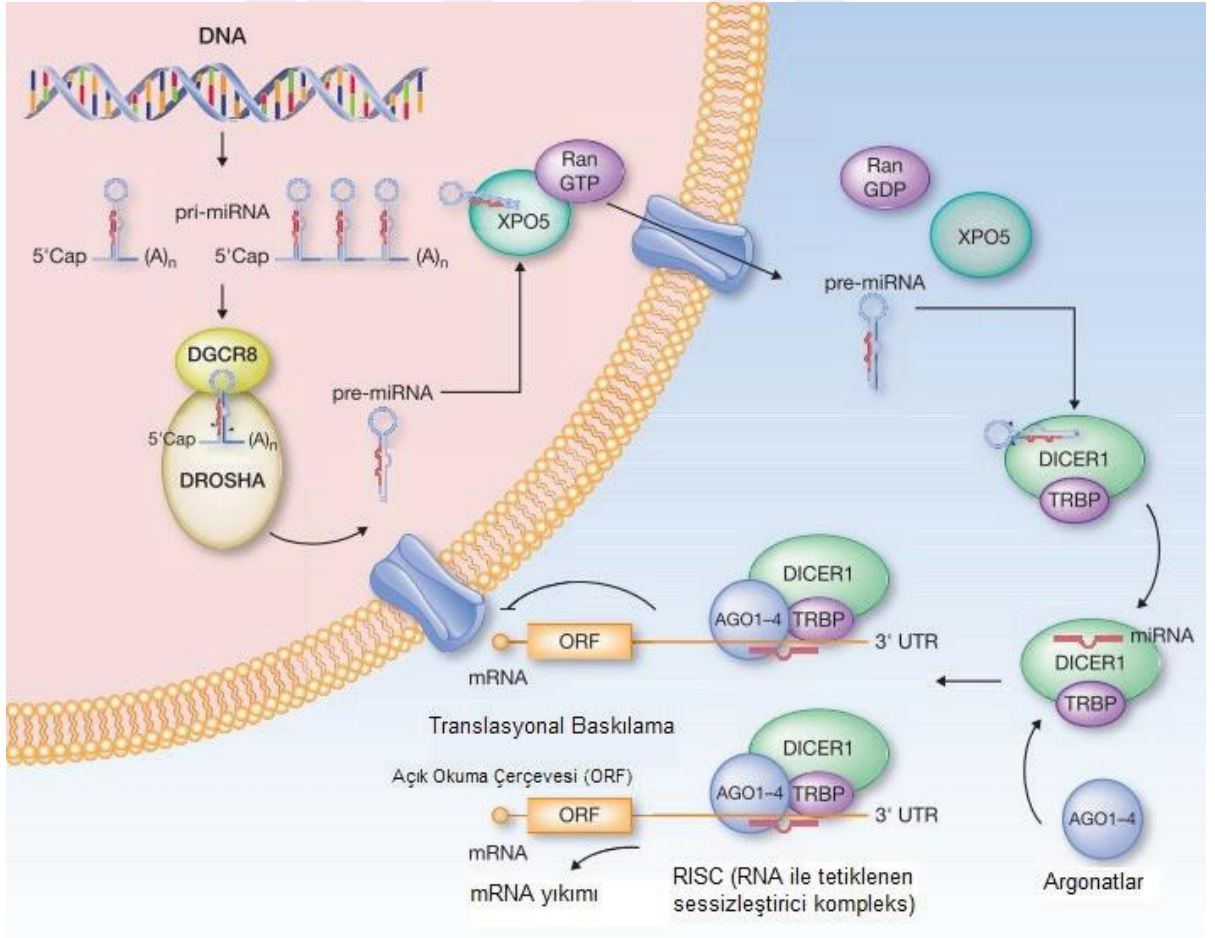
MikroRNA'lar nükleusta bulunan genetik materyaldeki miRNA genlerinden RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Transkripsiyon sonrası oluşan ürüne pri-miRNA adı verilir. Bu çift iplikli sap- ilmek yapısındaki primer prekürsör, 1 kb'dan daha büyük olabilir ve 5' cap (m^7G) ile 3' poli A kuyruğuna sahiptir [64]. Nükleusta pri-miRNA RNaz III ailesinden bir enzim olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene-8) tarafından kesilerek pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha ve DGCR8 birlikte mikroişlemci kompleksi (microprocessor complex) oluşturur ve DGCR8 çift iplikli RNA molekülünü tanır. Drosha ise bu molekülü iki ucundan keserek 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil bulunan pre-miRNA'yı meydana getirir. Bu prekürsör molekül yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda ve hairpin (saç tokası) yapısındadır. Bazı pre-miRNA'lar birtakım mRNA'ların çok kısa intronlarından (mirtron) splicing (uç birleştirme) ve debranching (parçalama) ile üretildiği için Drosha-DGCR8 adımını atlar [65].

Oluşan pre-miRNA, nüklear bir taşıma reseptörü olan Exportin 5 ile Ran (Ras-related nuclear protein)-GTP bağımlı olarak sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada yine RNaz III ailesinden bir endonükleaz olan Dicer ve çift zincirli RNA'yı tanıyan TRBP (transactivating response RNA binding protein) ile kesilir. İşlem sonunda 18-24 nükleotidlik çift iplikli miRNA:miRNA dubleksisi oluşur [66]. Bazı pre-miRNA'larda RNaz-H benzeri endonükleaz aktivitesine sahip Argonaute 2 proteini (AGO2) 3' ucundan kesim yaparak Dicer'ın işlevini destekleyebilir. Bu durumda ac-pre-miRNA (AGO2-cleaved precursor miRNA) adı verilen bir ara ürün oluşur [65]. Daha sonra miRNA dubleksisi meydana getirilir.

AGO2 proteini, Dicer ve TRBP kompleksine katılarak RISC (RNA-induced silencing complex) adı verilen bir ribonükleoprotein kompleksini meydana getirir. Mevcut miRNA dubleksinden biri de bu komplekse katılacaktır. AGO2 bu dubleksten 5' ucu daha kararlı olanı seçerek RISC'e dahil edilmesini sağlar. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) adını alır. Diğer RNA ipliği ise yolcu ya da anti-kılavuz iplik olarak adlandırılmaktadır [67]. Çoğunlukla yıkıma uğrar fakat nadiren miRNA olarak işlev görmek üzere RISC'e dahil olabilir [65]. miRNA biyogenezi Şekil 2'de gösterilmektedir [68].

miRNA'lar RISC'e katıldıktan sonra hedefledikleri mRNA'nın yıkımına sebep olabilir ya da bu mRNA'nın translasyonuna engel olabilir. Hedef mRNA'nın genellikle 3' UTR bölgesi ile (5'UTR ya da açık okuma çerçevesinde (ORF- open reading frame) de olabilir) miRNA'nın 5'

ucundaki çekirdek (seed) adı verilen 6- 8 nükleotidlik dizisi tamamen komplementer ise RISC mRNA'yı degrades eder. RISC'e katılan miRNA'ların mRNA deadenilasyonu ile poli-A kuyruklarını kaybederek ve 5' cap yapılarını yok ederek bu degradasyonu tetiklediği belirtilmiştir. Poli-A kuyrukları ve 5' cap yapılarını kaybeden mRNA'lar kararlılıklarını kaybederek AGO2 proteinlerinin hedefleri olurlar ve bu proteinler RNaz aktivitesi göstererek ilgili mRNA'nın yıkımını sağlar [69]. mRNA'nın 3'ucu ile miRNA'nın çekirdek bölgesi arasındaki komplementerlik azaldıkça hedef mRNA'nın translasyonu baskılanabilmektedir. Mekanizma kesin olarak belirlenemese de hedef mRNA seviyesi artarken protein seviyesinin değişmediği dolayısıyla translasyonel baskılanmanın mevcut olduğu tahmin edilmektedir [70]. Bazı çalışmalar ökaryotik hücrelerde translasyon başlama faktörlerinden eIF-4F'nin aktivitesiyle ribozomun 40S ve 60S alt birimlerinin birleşmesinin önlendiğini, başka bir yol olarak RISC'in, translasyonun uzama aşamasında ribozomal kompleksin mRNA'dan ayrılmasına sebep olarak translasyonu baskıladığını ileri sürmüştür [71].



Şekil 2.2: miRNA Biyogenezi [68].

miRNA'lar bütün bunların yanı sıra hedef mRNA'ların ifadesinin artmasını da sağlayabilirler. AGO2'ye bağlı olgun miRNA'lar, FXR1-iso-a proteini (Fragile X mental retardation related protein 1) ile birlikte hedef mRNA'nın A (adenin) ve U (urasil) yönünden zengin bölgelerine bağlanarak ifadesini artırabilmektedir [72].

2.2.3. MikroRNA-Kanser İlişkisi

miRNA'lar post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen RNA molekülleridir. Dokuya spesifik olarak ifade edilirler ve hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptoz gibi hücresel yollarda önemli roller üstlenirler. Aynı zamanda kanserle ilişkilendirilmiş lokuslarda ya da fragil bölgelerin %50'sinden fazlasında konumlanmış olmaları kanser patogenezindeki önemlerini ortaya çıkarmıştır [73]. miRNA'lar hedef mRNA'larının fonksiyonuna bağlı olarak onkogen veya tümör baskılayıcı özellikte olabilmektedir. Bir onkogenin ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak adlandırılmaktadır. Bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki azalma onkogenin ekspresyonunu artıracığından karsinogeneze katkı sağlamaktadır. Onkogen özelliği gösteren miRNA'lar (onkomir) ise tümör baskılayıcı genlerin translasyonuna engel olduklarından kanserleşmeye sebep olabilirler [74]. miRNA'ların bu rollerinin keşfedilmesi sonrasında farklı kanser tiplerinde miRNA ekspresyonlarının seviyeleri ve değişimleri incelenmiş, normal ve tümürlü dokular arasında farklı seviyelerde eksprese edilebildikleri veya mutasyon, polimorfizm gibi çeşitlilik barındırabildikleri görülmüştür. İlk olarak 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemide (KLL) sıklıkla görülen delesyona uğrayan 13q14 bölgesinde miR-15a ve miR-16-1 kodlayan genlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmada KLL hastalarının yarısından fazlasında bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da hiç yapılmadığı gösterilmiştir [75].

Bu çalışmalarla miRNA'ların ekspresyon profillerinin kansere yatkınlıkta, progresyonunun öngörülmesinde veya tanı amaçlı kullanılabilir biyobelirteçler oldukları fikri ortaya atılmıştır. Örneğin; miR-16-1 KLL'de, miR-146a, miR-196a-2 meme kanserinde ve let-7a akciğer kanserinde tanı amaçlı değerlendirilmektedir. Ayrıca miRNA profilleri kanserlerin alt tiplerinin belirlenmesi için de kullanılabilir [76]. miRNA ekspresyon seviyelerinin yanı sıra miRNA ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri (miRSNP) de biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanılmak üzere araştırılmaktadır. Farklı miRSNP'ler gen ekspresyonu düzenlemesinde farklı etkilere sahiptir. Bu miRSNP'ler genel olarak; miRNA genlerindeki

SNP'ler, miRNA biyogenezinde ve işlenmesinde görevli genlerdeki SNP'ler ve hedef genlerde bulunan miRNA bağlanma bölgesindeki SNP'ler olmak üzere üç grupta incelenmektedir. SNP'lerin ekspresyon seviyesine etkisi ise bulunduğu bölgeye göre değişmekte ve böylece genetik hastalıklara yatkınlık veya direnç sağlayabilmektedir [77].

2.2.4. Akciğer Kanseri MikrokRNA'lar

Akciğer kanserinde miRNA ekspresyon seviyeleri ile ilişkili birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; miR-17-92 ailesinin (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-92-1) ekspresyon düzeyinin küçük hücreli akciğer kanserinde arttığı tespit edilmiştir [78]. let-7 ailesinin ise akciğer kanseri dokularında azalmış ekspresyon seviyesine sahip oldukları gösterilmiştir [79]. miR-21, miR-486, miR-375 ve miR-200b'nin artmış ekspresyon düzeyleri gözlenmiştir [80]. Bu çalışmaların yanı sıra benzer bir çalışmada miR-574-5p ve miR-1254'ün biyobelirteç olarak tanımlanması önerilmektedir [81]. Bunların yanı sıra miR-34, akciğer kanserinde ve başka insan kanserlerinde (pankreas, kolon, glioma) ekspresyon seviyesinin düştüğü bilinen bir miRNA ailesidir [5, 6, 8, 9].

Bunun yanı sıra; miRNA genlerinde, hedeflerinin genlerinde ve sentezinde görevli genlerde bulunan SNP'lerin pozisyonlarına bağlı olarak akciğer kanseri riskini etkilediği öngörülmektedir. miRNA sentezinde görevli genlerle ilgili yapılan bir çalışmada *AGO1* üzerinde bulunan rs636832 (A/G) polimorfizminin guanin (G) allele sahip bireylerin akciğer kanserine yakalanma ihtimallerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir [82]. miRNA genlerindeki polimorfizmlerin hastalık riskine katkısı araştırılan bir çalışmada miR-196a2 rs11614913 (T/C, Timin/Sitozin) TT genotipinin akciğer kanseri riskine karşı bireyleri koruyabilir olabileceği bulunmuştur [83].

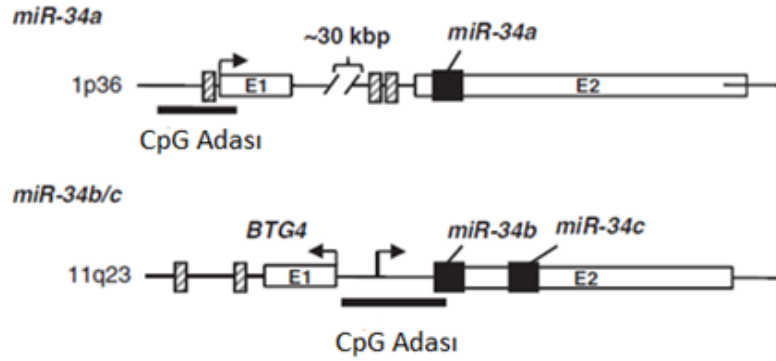
miRNA'ların hedef genlerinin miRNA ile ilişki kuracakları 3' UTR'sinde bulunan SNP'ler de kanser gelişimine katkı sağlayabilmektedir. Anti-apoptotik bir protein olan *BCL2* geninin 3' UTR'sindeki yeni bir miRNA bağlanma bölgesi oluşturan rs1564483 (G/A) polimorfizmiyle akciğer kanseri arasındaki ilişki incelenmiştir. A allelinin düşük akciğer kanseri riski ile ve ileri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastaları için daha iyi sağkalım sunması ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [84].

Sonuç olarak yapılan çalışmalar miRNA genlerini, bağlanma bölgelerini, hedeflerini etkileyen genetik değişikliklerin hücresel protein düzeyleri üzerinde büyük ölçüde önem arz ettiğini ve genetik hastalıkların gelişiminde katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

2.2.5. miR-34 Ailesi

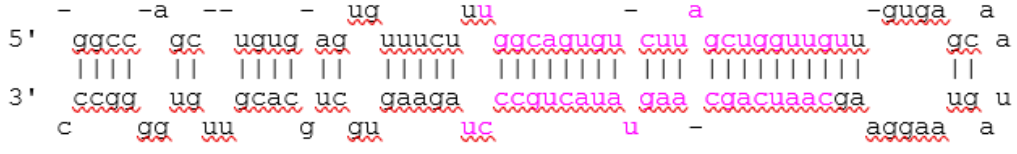
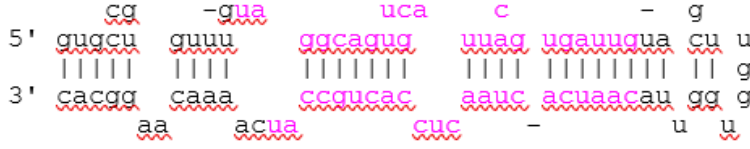
Memelilerde miR-34 ailesi iki farklı genden kodlanan 3 miRNA'dan oluşmaktadır (miR-34a, miR-34b ve miR-34c). miR-34a kendi transkriptini kodlarken, miR-34b ve miR-34c aynı promotörü ve primer transkripti paylaşmaktadır [85].

miR-34a 1p36.22 lokasyonunda bulunmaktadır. 110 bp transkriptten oluşturulan olgun miRNA 22 nükleotidden oluşmaktadır [86]. miR-34b ve miR-34c 11q23.1 lokasyonunda bulunmaktadır. Sırasıyla 84 ve 77 bp transkript kodlayan bu genden ikisi de 23 nükleotid içeren iki miRNA'ya olgunlaştırılır [87, 88] (Şekil 3).



Şekil 2.3: İnsan miR-34a, miR-34b ve miR-34c genlerinin genomik lokasyonu [85]. Yukarıda siyahla gösterilen kutular miRNA hairpinlerini, beyazla gösterilenler ekzonları temsil etmektedir. Taranmış kutular ise P53 bağlanma bölgelerini göstermektedir [85].

Aşağıdaki şekilde (Şekil 4.) miR-34a, miR-34b ve miR-34c 'nin hairpin yapıları, tabloda (Tablo 7.) bu miRNA'ların olgun formlarının dizileri verilmiş ve çekirdek dizileri gösterilmiştir [85, 89, 90, 91]. Buna bakıldığında hedef mRNA ile asıl ilişkiyi kuran çekirdek dizilerinin yüksek derecede benzerlik gösterdiği görülmektedir. Dolayısıyla bu miRNA'ların hedef genlerinin aynı olabileceği, aynı yollarda benzer işlev gösterebilecekleri tahmin edilmektedir.

miR-34a:**miR-34b:****miR-34c****Şekil 2.4:** miR-34a, miR-34b ve miR34c ‘nin hairpin yapıları [89, 90, 91].**Tablo 2.6:** Olgun miRNA’ların dizileri [85].

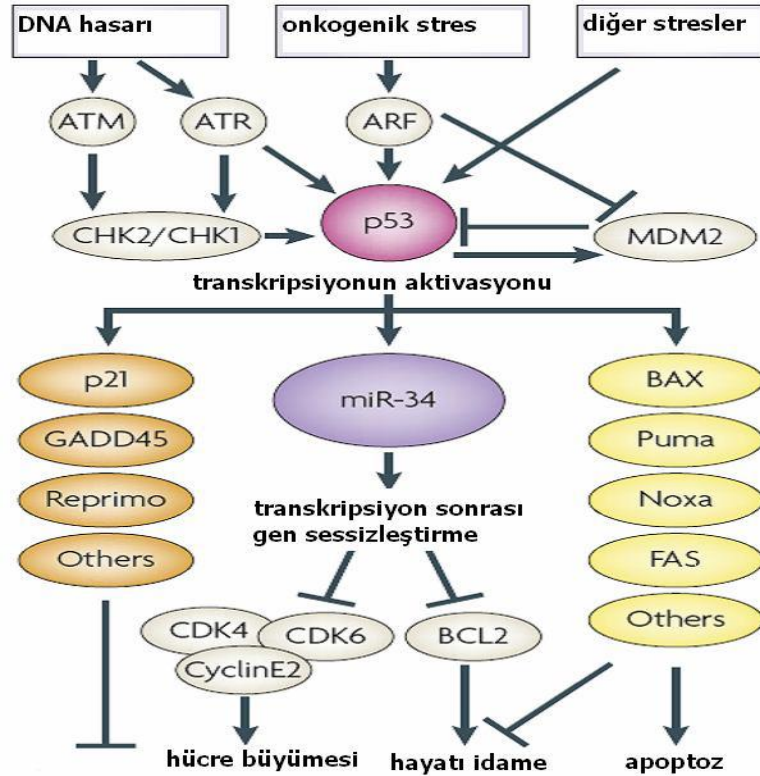
miRNA	Dizi
hsa-miR-34a	5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3’
hsa-miR-34b	5’-UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG-3’
hsa-miR-34c	5’-AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC-3’

((hsa: Homo sapiens) Kalın harflerle gösterilen dizi bölgeleri miRNA’nın çekirdek dizisini göstermektedir.)

miR-34, akciğer kanserinde ve diğer insan kanserlerinden bazılarında (pankreas, kolon, glioma) ekspresyon seviyesinin düştüğü bilinen bir miRNA ailesidir [5, 6, 8, 9]. Yapılan çalışmalarda 1p36 bölgesindeki delesyonların nöroblastoma, glioma, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, melanoma, kolorektal kanser gibi çeşitli insan kanserlerinde gözlenmiştir [92]. Gallardo ve diğ. yaptıkları bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserine sahip insanların tümör dokularında miR-34a ekspresyonunun azaldığını ve bu düşük ekspresyon seviyesi ile artmış nüks riski arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [93]. miR-34a’nın düşük ekspresyonu kolon kanseri, akciğer kanseri, nöroblastoma ve glioblastomada da gösterilmiştir [10, 94, 95,]. Bununla birlikte malignant melanoma, kolon kanseri ve oral kanserde miR-34b/c’nin de DNA metilasyonu ile ekspresyon seviyesinin azaldığı bildirilmiştir [105, 106, 107].

miR-34 ailesinin baskıladığı genler arasında *SIRT1* (Sirtuin 1), *MET*, *MYC*, *BCL2*, *CDK4/6*, *NOTCH1*, *E2F3* gibi hücre döngüsünde ve apoptozda rol oynayan, hücre için son derece önemli olduğu bilinen genler bulunmaktadır [7, 10, 11, 96, 97]. He ve diğ. (2007) yaptıkları çalışmada miR-34 ailesinin P53 tarafından düzenlendiğini ortaya çıkarmışlardır [98]. P53'ün miR-34 genlerinin upstream bölgesinde bulunan P53 cevap elementine bağlandığı ve miR-34'ün de dahil olduğu birçok miRNA'nın ekspresyonunu artıran bir transkripsiyon faktörü olarak iş gördüğü gösterilmiştir [10, 98, 99, 100].

miR-34'ün; P53'ün rol oynadığı yollarda CDK4 ve siklin E2'yi baskılayarak rol oynadığı bildirilmiştir [98]. Araştırmalar sonrasında miR-34a'nın apoptozu ve G₁ fazında durdurulmayı teşvik ettiği bulunmuştur. Tümör baskılayıcı özelliği ortaya çıkarılan miR-34a'nın E2F yolağını inhibe edip P53/P21 yolağını aktive ettiği ve hücre döngüsünü durdurduğu keşfedilmiştir [97]. Bunu siklin D1 ve CDK6'yı hedefleyerek gerçekleştirdiği bilinmektedir [98]. Bunun yanı sıra miR-34b ve miR-34c'nin de P53'ü hedefleyerek hücre proliferasyonu ve büyümesini kontrol ettiği bulunmuştur [101].



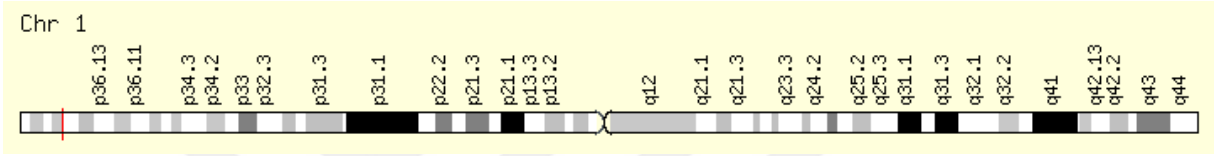
Şekil 2.5: miR-34'ün görev ve hedefleri [98].

Genel olarak onkogen aktivasyonu, replikasyon stresi, telomer kısalması ve oksidatif stres gibi etkenler sonucu DNA hasarı meydana gelir ve P53'ün ATM-kinazlar tarafından aktivasyonu

gerçekleştirilir. P53 korunmuş bağlanma bölgelerine bağlanarak miR-34'ün de aralarında bulunduğu hedef genlerin ekspresyonunu artırır. Drosha ve Dicer kompleksleriyle işlenen ve olgun hale gelen miR-34 aile üyeleri RISC kompleksi vasıtasıyla hedeflerinin translasyonunu inhibe eder. Bunun sonucunda hücre büyümesi engellenerek apoptoz teşvik edilir. Dahası, G₁'de durdurulma, yaşlanma ve migrasyonun inhibisyonu da meydana gelir [85].

2.2.5.1. miR-34a rs35301225 Polimorfizmi

miR-34a, 1. kromozomdan 9.151.668-9.151.777 nükleotidler arasından kodlanmaktadır. Polimorfizm ise 9.151.743. nükleotidde bulunmaktadır [108].



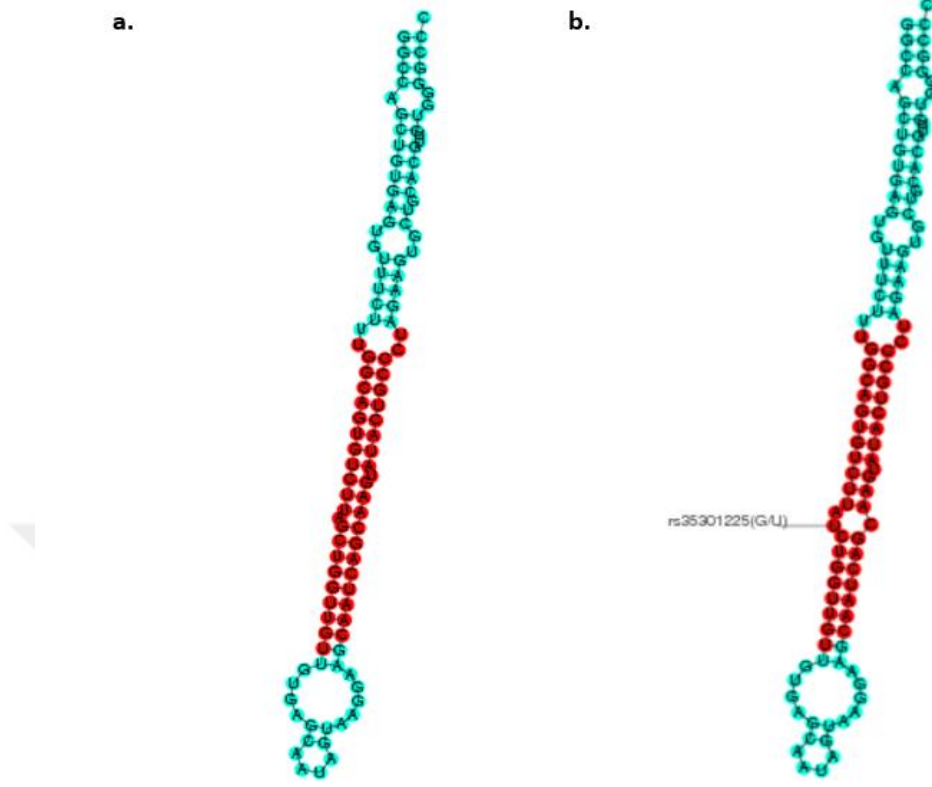
Şekil 2.6: miR-34a geninin genomik lokasyonu [109].

Dizi bilgisi [108];

>gnl|dbSNP|rs35301225|allelePos=301|totalLen=601|taxid=9606|snpclass=1|alleles='A/C/T'|
mol=Genomic|build=131

GCAAACACTGGCTACTATTCTCCCTACGTGCAAACCTTCTCCCAGCCAAAAGCCGC
CCACACCAAGCCCCTGTGCCTTTTTCTTCCGCACCCACGAGCAGGCTGCTCCTGG
GGCCCTGGAGCTCACTTTCCCAGCCGCCCTCACCACCCACCGTGGCGCAGAAGAG
CTTCCGAAGTCCTGGCGTCTCCCACTGGTCTGGGCATCTCTCGCTTCATCTTCCCT
CTTGGGGCCCCACAACGTGCAGCACTTCTAGGGCAGTATACTTGCTGATTGCTTCCT
TACTATTGCTCACAACAACCAGHTAAGACACTGCCAAAGAAACACTCACAGCTG
GCCGGTCCACGGCATCCGGAGGGGACTCGGGGGACAGGCCTGTCCTGCCTCTCCC
CAGCACCTGTTGATAAGAAGGAAATGTGGGGAGGAAAGAAAGGATGCAGGAGG
CCGAGGTGGGAGGATCGCTTCAGGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCCAGGCAACTA
GCAAGACTCCATCTCTACAAAAAATTTTAAAAATTAGCCAGGCATGGTGACATG
CGTGCTGTAGTCCTAGCTACTGGAGAGGCCAGGGCAGGAGGATCGCTTGAG

Yukarıda verilen dizide H; C, T ya da A nükleotidlerini ifade etmektedir. Polimorfizm meydana geldiğinde C allelinin yerini T ya da A almaktadır.

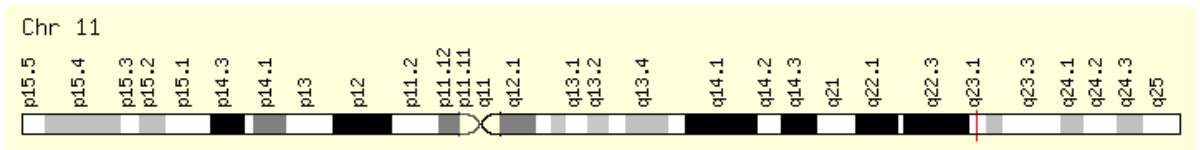


Şekil 2.7: a. Normal miR-34a'nın olgun yapısı. b. Polimorfik miR-34a'nın olgun yapısı [110].

Bu polimorfizm miRNA'nın olgun dizisinde yer almaktadır ve miR-34a'nın ikincil yapısını değiştirdiği tahmin edilmektedir [110]. Aşağıda normal ve polimorfik miR-34a'nın tahmini ikincil yapısı gösterilmiştir (Şekil 7, Şekil 8) [110]. Kırmızı renkle gösterilen bölge miRNA'nın olgun dizisini ifade etmektedir. SNP'yi barındıran miR-34a'nın olgun dizisinde, normalde olmayan bir loop (ilmek) oluşmaktadır. Bu yapı değişimi miRNA'nın fonksiyonunu etkileyebilmektedir.

2.2.5.2. miR-34b/c rs4938723 Polimorfizmi

miR-34b ve miR-34c 11. kromozomdan sırasıyla 111.512.938-111.513.021 ve 111.513.439-111.513.515 nükleotidleri arasından kodlanmaktadır [111].



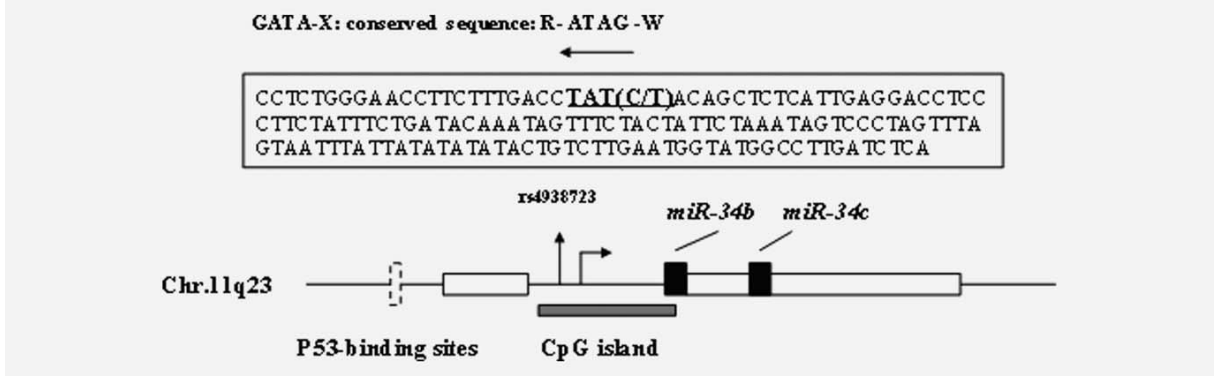
Şekil 2.8: miR-34b ve miR-34c genlerinin genomik lokasyonu [112].

Dizi bilgisi [111];

>gnl|dbSNP|rs4938723|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=150

TCCTTGGGCAGTTCTTTAGTTGTTTTAATAGTGTGAGTTTGTAGTTTGTATTGAAT
GATCCAGATGACCTGCCCCCTGTTTCATGTTACTTGTGGCATCTATGAGACCATTTCG
TGGTTTTAGGGAATCAATCTATAGGTGGGAAGTTTTCTTTTGCAGAACTAATTTA
GAACTAAGCCTTTGGTGTGTCAGCAATGGGTGCTCTATACTGGATGCATGAAGACCA
TATTTCTAGGGGAGGCTGCTTCCAGCTGAATTTTACAAGGTGAGGATAAAGAGAA
CATTCCTTATCCTCTCCTGATTAATTCATTAAAGGCAAAGGAGGGGAAGGAAAGT
TATTAGCAGAGATCTCCCAGAAGTCCTCTGTAAGTGTCCCTTTTGCCCAACTGTCA
CAAGATACTGTTTTTCTGGCATCCACAGCCCTAACCTGAATATCCAAATGTACTC
GTGCATCAAGGATCTACTCAAGTCTCACCTCCTCTGGGAACCTTCTTTGACCTATY
ACAGCTCTCATTGAGGACCTCCCTTCTATTTCTGATACAAATAGTTTCTACTATTC
TAAATAGTCCCTAGTTTGTAGTAATTTATTATATATACTGTCTTGAATGGTATGGC
CTTGATCTCAAGAGGACCACGATTTGATGTAACATAACAAGCTGCCTGGCTCACTA
TTTGACTAGAAGGCCAGGCTTCACATCACTGCATGGCCCTCTAAGAGTATAAGG
CCAAGTCCCCAACAGAGCACAGAGGTGCAGATGAGACTCTCCAAGCCATCCTCCC
ATATGTCAGAGGCTACCCAAGCCCACCTCCATTTGGAAAATTCAAACCTATAATT
TGAGGTACCTGGGAAGCCGCTTTCCCAGGGCGGAATGGTCACGGAACTGGGTA
GGCTGGGGGCCTTCTTGGGGAATGAGGGAGTGGAGGAGCTCTTTGTCCCTCCTGC
TAGATCAGAAAGAGAAACGTCTCAAGAATCTGGGCCTCCATCTTCTAGGCGTCTC
CCTT

Bu iki miRNA aynı kromozomda yakın lokuslarda bulunmaktadır ve ortak promotörü ve primer transkripti (pri-miR-34b/c) paylaşmaktadır. Promotor bölgesinde tanımlanmış olan SNP (rs4938723); 111.511.840. nükleotidde T'nin C'ye değişimiyle meydana gelmektedir [111]. Polimorfizmin promotor bölgesinde bulunması olgun miR-34b/c'nin ekspresyonunun ve/veya fonksiyonunun ve dolayısıyla hedef genlerinin değişiminde önemli olabilir.



Şekil 2.9: pri-miR-34b/c'nin promotor bölgesindeki SNP rs4938723'ün lokasyonu ve yapısı [113]. Beyaz ve siyah kutular sırsıyla eksonları ve miRNA hairpinlerini göstermektedir. En solda P53 bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Siyah çizgi CpG adasını belirtmektedir. rs4938723 promotor bölgesinde bulunmakta olup saği işaret eden ok transkripsiyon yönünü göstermektedir.

rs4938723 transkripsiyon başlama bölgesinde 423 bp yukarıda, CpG adasında meydana gelen bir SNP'dir. Web tabanlı SNP analiz aracı TFSEARCH 1.3'e göre buradaki T/C değişimi tahmini GATA-X transkripsiyon faktörlerinin, promotordaki (A/T)-G-A-T-A-(A/G) korunmuş dizisine bağlanmasını etkilemektedir. Bu da karsinogenezle ilişkili yollarda rol alan hedef genlerin ekspresyonlarının direkt olarak aktive edilmesine ya da baskılanmasına yol açabilecektir [114, 115].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Bu çalışmaya, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak akciğer kanseri tanısı konmuş, akraba olmayan 100 hasta (çalışma grubu) ve herhangi bir inflamatuvar hastalığı olmayan 100 sağlıklı birey (kontrol grubu) dahil edilmiştir. Bilgilendirme işleminin ardından tüm gönüllü bireylerin rutin kontrolü için verdikleri kanın 2ml'si EDTA'lı tüplere alınmıştır. Periferik dolaşımdaki lökositlerden PureLink® Genomic DNA Mini Kit ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. miR-34a ve miR-34b/c gen polimorfizmlerinin genotiplenmesi için öncelikle uygun primerler tasarlanarak PCR ile ilgili diziler çoğaltılmıştır. Daha sonra seçilen restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir ve agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.1.1. Alet ve Cihazlar

- Thermal Cycler (BIO-RAD T100™)
- Buzdolabı (Bosch)
- Buzdolabı (Altus)
- Mikrosantrifüj (Nüve NF 048)
- Minisantrifüj (Isolab)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Termal Blok (Inovia UHB-1)
- Etüv (Nüve EN 500)
- Mikropipet seti (Thermo Scientific – Finn timer, Sartorius, Isolab)
- Mikrodalga Fırın (Altus ALMD 17B)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK 418)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific EC 300XL)
- Elektroforez Tankı (JUNYI®)
- Jel Dökümantasyon Sistemi (Vilber Lourmat Bio-Print ST4, Cedex, France)
- Derin Dondurucu (Bosch)
- Otoklav (Nüve)

- Spektrofotometre (Mecasys- Optizen)
- Hassas Terazı (Rad-Wag)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- PureLink Genomic DNA Mini Kit (invitrogen by life technologies)
- dH₂O (distile su) (Eczacıbaşı)
- Trizma base (Sigma T1503)
- Asetik Asit (Merck – UN 2789)
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma 3341160)
- Ethidium Bromide (EtBr) (Sigma E-7637)
- Orange G (Sigma – O7252-25G)
- Disodyum EDTA (Na₂EDTA) (Thermo Scientific – 17892)
- Gliserol (Aklar Kimya)
- Ethanol Absolute (≥%99.9) (Isolab chemicals UN1170)
- Agaroza (life technologies)
- 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific GeneRuler 100bp)
- 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific GeneRuler 50bp)
- 10X Taq Buffer (+ (NH₄)₂SO₄, -MgCl₂) (Thermo Scientific)
- 2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (VMR Life Science)
- Taq DNA Polimeraz 5U/μl (Thermo scientific)
- Primerler (Oligomer – 100nmol)
- DdeI restriksiyon enzimi (Thermo Scientific)
- MseI restriksiyon enzimi (Thermo Scientific)
- BccI restriksiyon enzimi (New England BioLabs)

3.1.3. Çözeltiler

- 50X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris baz

57.1 ml asetik asit

37.2 g Na₂EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır.

➤ Elektroforez Yürütme Tamponu

Hazırlanan 50X TAE'den 20 ml alınır, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 1X'lik TAE yürütme tamponu hazırlanmış olur.

➤ Orange G Çözeltisi

2.232 g Na₂EDTA

200 mg Orange G

60 ml Gliserol

40 ml distile suda çözülür.

➤ %3'lük Agaroza Jel Çözeltisi

200 ml 1X TAE Tamponu

6 g Agaroza

10 µl Ethidium Bromide

➤ %1.5'lik Agaroza Jel Çözeltisi

200 ml 1X TAE Tamponu

3 g Agaroza

10 µl Ethidium Bromide

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

3.2.1.1. *Prensip*

Periferik kanda bulunan hücreler nükleaz inhibitörü guanidin HCl varlığında, proteinlerin degradasyonunu sağlayan proteinaz K ile inkübe edilir. Bu işlemle hücrelerin parçalanması sağlanır. Açığa çıkan hücresel nükleik asitler spin kolona yerleştirilmiş silika tabanlı membrana bağlanırlar. Bu özel matriksteki fiberlere bağlanan nükleik asitleri kontaminasyona veya safsızlığa sebep olabilecek hücresel elemanlardan ve ortamdaki diğer moleküllerden arındırmak için yıkama ve santrifügasyon işlemleri gerçekleştirilir. Sonrasında düşük yoğunluklu tuz elüsyonu ile fiberlere bağlı olan nükleik asitlerin bu yapıdan ayrılması sağlanır.

3.2.1.2. *Protokol*

Toplanan kanların 200 µl'si ile PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen by Life Technologies) kullanılarak üretici firmanın aşağıdaki protokolüne göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Protokol:

1. 55 °C'de su banyosu veya ısı bloğu hazırlanır.
2. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne, 200 µL taze veya donmuş kan örneği eklenir.
3. Örneğe 20 µL Proteinaz K eklenir.
4. Örneğe 20 µL RNase A eklenir, karıştırmak için kısaca vortekslenir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. 200 µL PureLink® Genomic Lysis Binding Buffer eklenir ve homojen bir çözelti elde etmek için iyice vortekslenir.
6. Proteinlerin parçalanmasını teşvik etmek için 55 ° C'de 10 dakika inkübe edilir.
7. Lizat'a 200 µL %96-100 etanol eklenir, homojen bir çözelti elde etmek için 5 saniye boyunca vortekslenir.

8. Bir toplama tüpü ve bir PureLink® Spin Column'u (spin kolon) paketten çıkarılır.
9. PureLink® Genomic Lysis Binding Buffer ve etanol ile hazırlanan lizat (~ 640 µL) PureLink® Spin Kolonu'na eklenir.
10. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlenir.
11. Toplama tüpü atılır ve spin kolon kitle birlikte verilen temiz bir PureLink® toplama tüpüne yerleştirilir.
12. Kolona etanol ile hazırlanan 500 µL Wash Buffer 1 eklenir.
13. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüj edilir.
14. Toplama tüpü atılır ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirilir.
15. Kolona etanol ile hazırlanmış 500 µL Wash Buffer 2 eklenir.
16. Kolonu 3 dakika boyunca maksimum hızda oda sıcaklığında santrifüj edilir. Toplama tüpü atılır.
17. Spin kolon steril bir 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
18. Kolona 25–200 µL PureLink® Genomic Elution Buffer eklenir.
19. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlenir. Tüp saflaştırılmış genomik DNA içerir.
20. İkinci bir elüsyon aşaması aynı hacimde Elution Buffer kullanılarak gerçekleştirilir. Kolon oda sıcaklığında 1,5 dakika maksimum hızda santrifüjlenir.
21. Tüpe akan genomik DNA içeren buffer DNA'nın saklanacağı mini santrifüj tüplerine aktarılır ve -20 °C'de uzun süre saklanabilir.

3.2.2. Primer Tasarımı ve Restriksiyon Enzimi Seçimi

NCBI (National Center for Biotechnology Information-Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)'ın kısa genetik varyasyonların bilgilerini derlemek için oluşturduğu dbSNP veritabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) polimorfizmlerin ID'leri taranarak dizi bilgileri sağlandı

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs35301225 / https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4938723). Bu diziler, mevcut kesim bölgeleri ve restriksiyon enzimlerinin haritasını çıkarmaya yarayan online bir araç olan NEB Cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) adresine kopyalandıktan sonra polimorfizmi tanıyan enzimler belirlenerek aralarında diziyi en az lokustan kesenler seçildi. Daha sonra enzimlerin diziyi bir bölgeden kesebileceği nükleotid aralıkları belirlenerek bu diziyi primer tasarlama çalışmaları gerçekleştirildi.

Primer tasarımında temel olarak Primer 3 programını kullanan NCBI'nin primer tasarlama aracı Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ve PerlPrimer uygulamasından yararlanıldı. Edinilen primer çiftlerinden T_m ve %GC oranı uygun olanlar, kendileri ve birbirleriyle komplementer baz eşleşmesi yapmayanlar seçilerek online bir primer özellikleri hesaplayıcısı olan OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator- <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)'ta kontrol edildi.

miR-34b/c için tanıma bölgesi bu genin polimorfizmine spesifik olan enzim bulunamadığı için primer tasarlanırken forward primer (ileri primer)'de baz değişikliği yapılmıştır. SNP'nin olduğu bazın upstream'inde bulunan bazlardan 3.sü (T) primer sipariş edilirken C olarak yazılmış ve orada bir kesim bölgesi oluşması sağlanmıştır. Bu stratejiyi içeren PCR-RFLP yöntemi; PCR-ARFLP (Polymerase Chain Reaction- Artificial-Restriction Fragment Length Polymorphism / Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Yapay Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak isimlendirilmektedir.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İzole edilen DNA'ların kalitesi ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalgaboylarındaki ölçümler kullanılarak değerlendirildi. PCR'da kullanılacak konsantrasyonda olacak şekilde ayarlandı (25-50 ng). miR-34a ve miR-34b/c gen amplifikasyonları PCR yöntemiyle gerçekleştirildi. Kullanılan forward ve reverse (ileri ve geri) primer dizileri aşağıdaki gibidir:

miR-34a F: 5' CAA ACA CTG GCT ACT ATT CTC CCT A 3'

miR-34a R: 5' ATC CTT TCT TTC CTC CCC ACA TTT C 3'

miR-34b/c F: 5' CCT CTG GGA ACC TTC TTT GAC CCA T 3'

miR-34b/c R: 5' CTC TGT TGG GGA CTT GGC CTT ATA 3'

Her bir örnek için toplam 25 µl reaksiyon hacminde PCR ortamı hazırlandı. Reaksiyon tüpüne 1 mM 1X Taq Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 30 pmol primerler, 25-50 ng DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi eklendi. Amplifikasyonlar “Biorad T100™ Thermal Cycler” cihazı ile aşağıdaki programlarda gerçekleştirildi.

miR-34a Program:

95°C 3 dakika..... (İlk Denatürasyon)	
95°C 1 dakika..... (Denatürasyon)	} 35 Döngü
55°C 1.5 dakika.. (Primer Bağlanması)	
72°C 1 dakika..... (Uzama)	
72°C 7 dakika..... (Son uzama)	

miR-34b/c Program:

95°C 3 dakika..... (İlk Denatürasyon)	
95°C 1 dakika..... (Denatürasyon)	} 35 Döngü
57°C 1.5 dakika.. (Primer Bağlanması)	
72°C 1 dakika..... (Uzama)	
72°C 7 dakika..... (Son uzama)	

Amplifikasyon sonunda elde edilen ürünler %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek UV altında görüntülendi ve bant boyları (sırasıyla 431 bp ve 265 bp) doğrulandı.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Öncelikle 242g Tris baz, 57.1 ml glasiyel asetik asit ve 37.2 g Na₂EDTA bir cam şişe içerisinde manyetik karıştırıcıda bir gece boyunca çözdürülerek 50X'lik TAE tamponu hazırlandı. Daha sonra elektroforez işleminde kullanılmak üzere 1X'e seyreltmek için 50X'likten 20 ml alınarak

dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Jelin hazırlanırken ve yürütme esnasında yürütme tamponu olarak bu çözelti kullanıldı.

PCR sonrasında tasarlanan primerlerin doğru bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını kontrol etmek için ürünler agaroz jelde yürütüldü. Amplikonların miR-34a için 431 bp ve miR-34b/c için 265 bp'lik tek bant içermesi beklenmekteydi. Bunun belirlenmesi için %1.5'luk agaroz jel hazırlandı. 200 ml 1X TAE tamponu ve 3 g agaroz bir erlen içerisine aktarıldı ve mikrodalgada homojen bir görünüm oluşuncaya kadar agarozun erimesi sağlandı. Jelin tablaya ve taraklara zarar vermemesi için hafifçe karıştırılarak soğuması beklendi. Daha sonra 10 mg/ml'lik EtBr'den 10 µl eklenerek iyice karışması sağlandı ve hazırlanan tablaya döküldü ve taraklar yerleştirildi. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak içinde 1X'lik yürütme tamponu (1X TAE tamponu) bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri üzerlerine 10 µl Orange G boyası eklenerek pipetaj yapılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Bant boyutlarını karşılaştırarak tespit etmek amacıyla referans DNA bantları içeren 100 bp'lik DNA Ladder kullanıldı. Örnekler 120 voltta 30 dk yürütüldü. Yürütme sonunda jel, jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat Bio-Print ST4, Cedex, France) ile UV altında görüntülendi. Elde edilen bantların boyutları kullanılan DNA Ladder ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi ve doğrulandı.

3.2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

PCR sonrası elde edilen amplikonların, seçilen uygun enzimlerle ve bunların optimum çalışma sıcaklıklarında inkübe edilerek restriksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon, 10-15 µl PCR ürünü, 5U restriksiyon enzimi ve 1X tampon (enzime uygun) ile 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Aşağıda kullanılan enzimler ve reaksiyon koşulları gösterilmiştir (Tablo 3.1). Enzim kesimi sonrasında yukarıda anlatıldığı gibi %3'lük agaroz jel hazırlanarak örnekler yüklendi ve 120 voltta 50-60 dk yürütüldü. Bant boyutları kullanılan DNA Ladder'a göre değerlendirildi.

Tablo 3.1: Kullanılan enzimler ve reaksiyon koşulları.

Gen	SNP ID	Restriksiyon Enzimi	Kesim Bölgesi	Reaksiyon koşulları
miR-34a	rs35301225	DdeI	5'...C↓TNAG...3'	37°C'de 4 saat
	C/T,A		3'...GANT↑C...5'	inkübasyon

miR-34b/c rs4938723 polimorfizminde normal allel T'nin yerine C'nin bulunması söz konusudur. Kullanılan BccI enzimi polimorfik allel C'yi tanıyarak kesmektedir. Genotipte T alleli bulunması durumunda 265 bp'lik, C alleli bulunması durumunda 235 bp ve 30 bp'lik bantlar beklenmektedir. Ancak 30 bp'lik bant değerlendirmenin yapıldığı %3'lük agaroz jelde gözlenememektedir. Dolayısıyla genotipleme 265 bp ve 235 bp bantlar göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir. Genotipleme yaparken gözlenen bantlar ve bunlara göre belirlenen genotipler aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.3: rs4938723 polimorfizminin genotiplemesi. Bant boyutları yukarıdan aşağıya 265, 235 ve 30 bp'dir. 30 bp'lik bant jelde gözlenememektedir.

TT	CC	CT
BccI	BccI	BccI
		

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Gerçekleştirilen vaka kontrol çalışmasında akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller arasındaki polimorfizmlerin genotip sıklığını karşılaştırmak için χ^2 (ki-kare) testi kullanıldı. Polimorfizmler ve akciğer kanseri arasındaki ilişki ikili lojistik regresyon analizi yoluyla modellendi. Genotipler arasındaki akciğer kanseri riskini karşılaştırmak için OR değeri ve %95 güven aralığı hesaplandı. $p < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Akciğer kanseri ile miR-34 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin incelendiği bu çalışmaya 100 akciğer kanseri hastası, 100 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Akciğer kanseri hasta grubunda 89 erkek 11 kadın bulunurken, kontrol grubunda 88 erkek 12 kadın bulunmaktadır. Gruplar arasında yaşa ve cinsiyete bağlı anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Akciğer kanseri hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.

miR-34b/c (rs4938723)	Kontrol	Hasta
Kadın	12	11
Erkek	88	89
Yaş Ortalaması	45,8±10,62	43,26±10,54

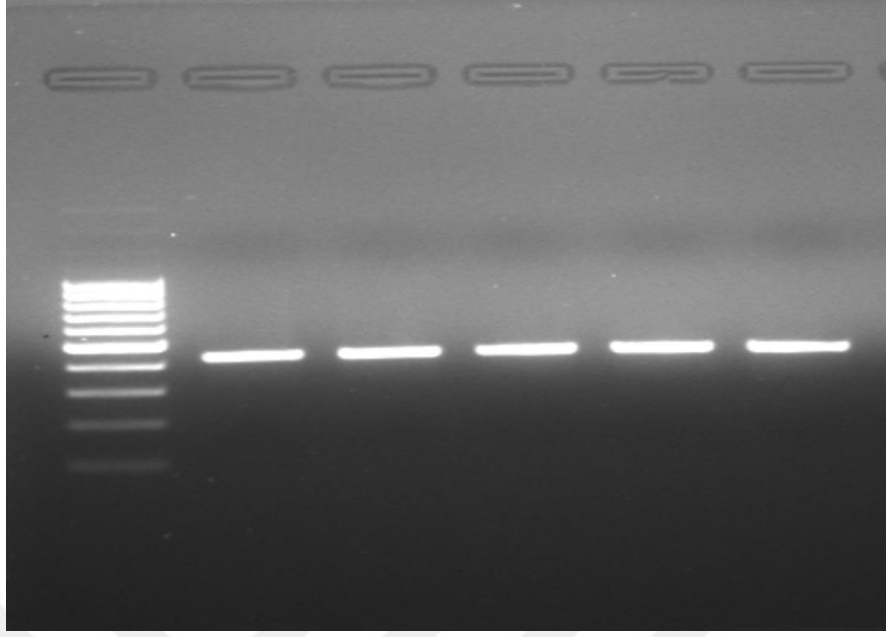
Her bireyden onayları dahilinde alınan kanlardan PureLink Genomic DNA Mini Kit kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Uygun primer ve enzimler kullanılarak PCR-RFLP yöntemiyle rs35301225 ve rs4938723 polimorfizmleri için allel ve genotipler belirlenmiştir.

miR-34a polimorfizmi rs35301225 akciğer kanseri riskiyle ilişkili bulunmamıştır. Kontrol ve hasta gruplarının ikisinde de polimorfizme rastlanmamıştır. Ancak miR-34b/c polimorfizminin akciğer kanserine yakalanma riskini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir.

4.1. MIR-34 GEN POLİMORFİZMLERİNİN FREKANSLARI

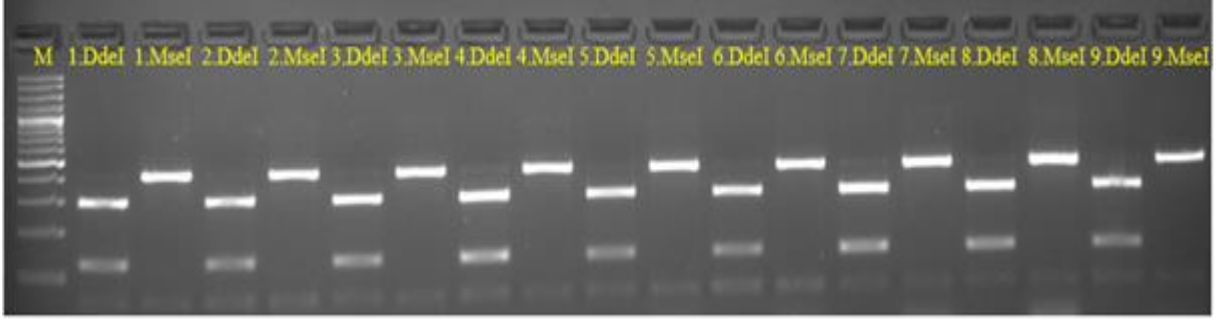
4.1.1. miR-34a rs35301225 Polimorfizmi

Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerde rs35301225 polimorfizmini saptamak için ilgili gen bölgesi amplifiye edilen her bir örnek %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 4.1). Bant boyutları marker (100 bp DNA Ladder) ile karşılaştırıldığında beklenildiği gibi yaklaşık 431 bp (± 10 bp) olarak gözlemlendi.



Şekil 4.1: miR-34a primerleriyle yapılan PCR'ın agaroz jelde kontrolü. İlk kuyucukta 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır. Diğer kuyucuklarda farklı bireylere ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

PCR ürünleri ikiye bölündü ve biri DdeI ile diğeri ise MseI ile kesilerek RFLP gerçekleştirildi. Genotipleme için kesim ürünleri hazırlanan %3'lük agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 4.2). Marker (DNA Ladder) ile kıyaslanarak belirlenen bantlara göre genotiplerin (1. kesim DdeI ve 2. kesim MseI olmak üzere) şu şekilde olması beklenmekteydi; 1- 300+131 bp / 2- 431 bp CC alleli, 1-431 bp / 2- 300+131 bp TT alleli, 1- 431 bp / 2- 431 bp AA alleli, 1- 431+300+131 bp / 2- 431+300+131 bp CT alleli, 1-431+300+131 bp / 2- 431 bp CA alleli, 1- 431 bp / 2- 431+300+131 bp AT alleli. Genotipleme sonucunda hasta ve kontrol grubundaki bütün bireylerin CC genotipine sahip oldukları görülmüştür (Tablo 4.1). Dolayısıyla rs35301225 polimorfizminin akciğer kanseri riskini etkilemediği düşünülmektedir. Çalışmadaki bireylerde polimorfizm bulunmaması sebebiyle göreceli risk analizi gerçekleştirilememiştir.



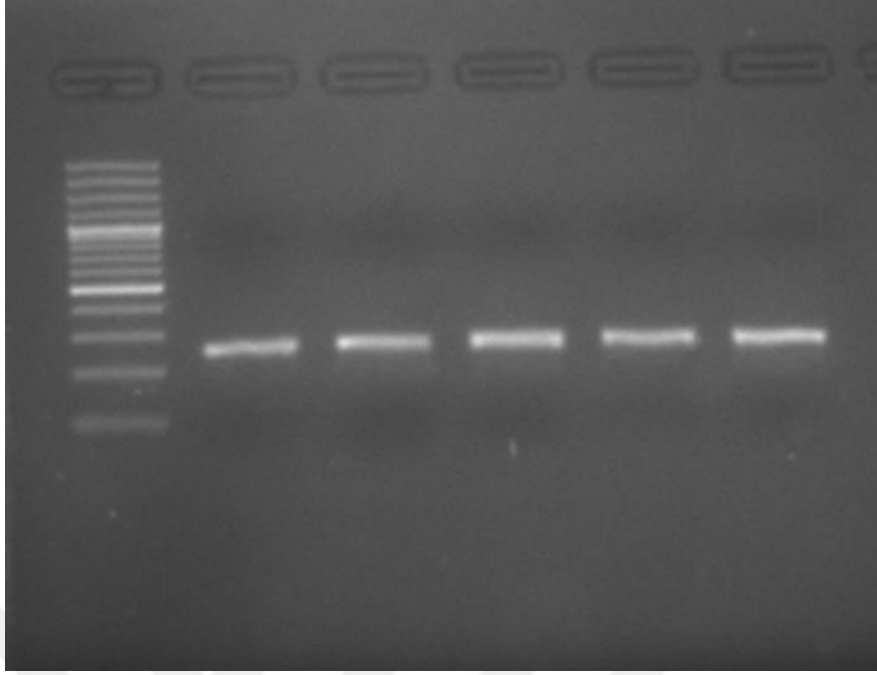
Şekil 4.2: miR-34a gen polimorfizminin sonuçları. (İlk kuyucuğa 100 bp DNA Ladder yüklenmiştir. Daha sonra ikişer kuyucuk bir bireye ait olmak üzere DdeI ve MseI restriksiyon ürünleri sırayla yüklenmiştir. Bütün bireylerde yukarıda görüldüğü gibi CC genotipi gözlenmiştir.)

Tablo 4.2: rs35301225 genotipleri ve akciğer kanseri riski. n; gözlenme sayısı.

SNP ID	Parametreler	Kontrol (n)	Hasta (n)	ρ değeri
rs35301225	Genotip			
	CC	100	100	-
	Allel			
	C	200	200	

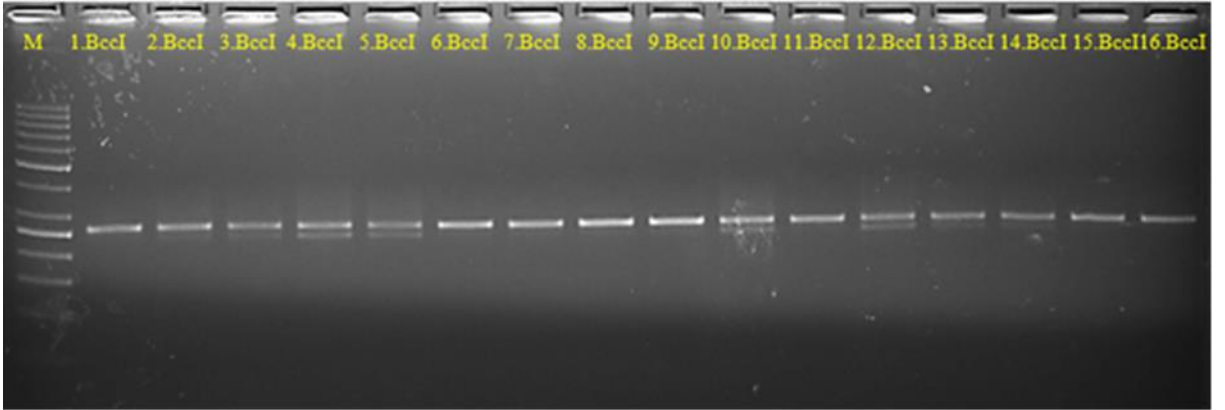
4.1.2. miR-34b/c rs4938723 Polimorfizmi

Akciğer kanseri hastaları ve kontrollerde rs4938723 polimorfizmini saptamak için ilgili gen bölgesi amplifiye edilen her bir örnek %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 4.3). Bant boyutları marker (100 bp DNA Ladder) ile karşılaştırıldığında beklenildiği gibi yaklaşık 265 bp (± 10 bp) olarak belirlendi.



Şekil 4.3: miR-34b/c primerleriyle yapılan PCR'ın agaroz jelde kontrolü. İlk kuyucukta 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır. Diğer kuyucuklarda farklı bireylere ait PCR ürünleri bulunmaktadır.

PCR ürünlerinden 15 µl kullanılarak BclI enzimi ile restriksiyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Genotipleme için kesim ürünleri hazırlanan %3'lük agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 4.4).



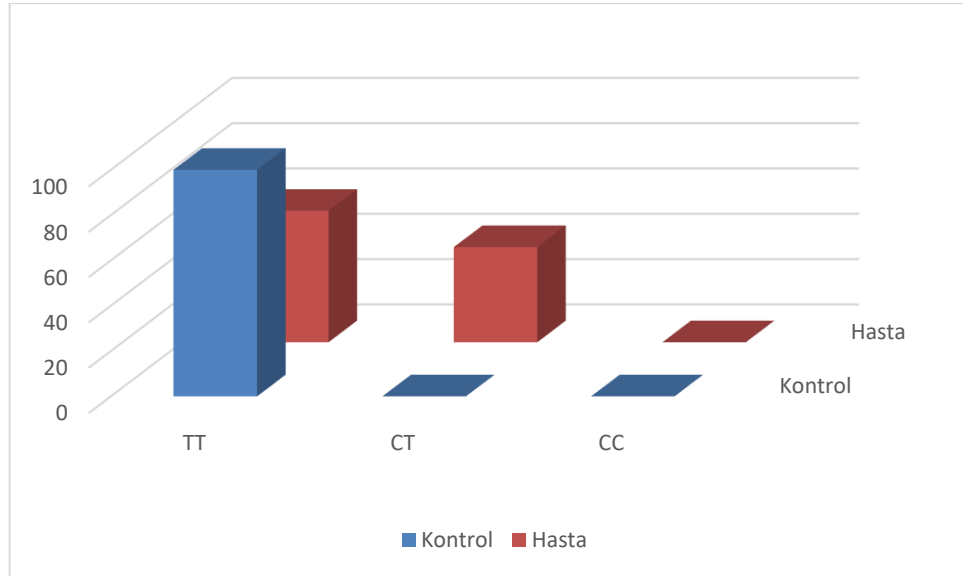
Şekil 4.4: miR-34b/c gen polimorfizminin sonuçları. İlk kuyucuğa 50 bp DNA Ladder yüklenmiştir. Sonraki her kuyucukta farklı birer bireye ait restriksiyon ürünleri bulunmaktadır. 265 bp bant bulunan kuyucuklarda TT genotipi (örn. 6. birey), 265+235 bp bant bulunan kuyucuklarda CT genotipi (örn. 4. birey) gözlenmektedir. Gruplarda CC genotipi bulunmamaktadır.

Marker (DNA Ladder) ile kıyaslanarak belirlenen bantlara göre genotiplerin şu şekilde olması beklenmekteydi; 265 bp TT alleli, 235+30 bp CC alleli, 265+235+30 bp CT alleli. 30 bp'lik bantlar jelde gözlenemediğinden değerlendirme 265 ve 235 bp'lik bantlara göre yapılmıştır.

Genotipleme sonucunda hasta grubunda 58 TT ve 42 CT genotipli birey gözlenirken hiç CC genotipe sahip olan bireye rastlanmamıştır (Tablo 4.2). Kontrol grubunda ise bütün bireyler polimorfik olmayan TT genotipine sahiptir. Polimorfizmin genotip frekansları Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Bu bulgulara göre rs4938723 polimorfizminin CT genotipinin akciğer kanseri riskini artırdığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Ancak kontrollerin hepsi normal genotipe sahip olduğu için relatif risk oranı (OR- odds ratio) hesaplanamamıştır.

Tablo 4.3: rs4938723 genotipleri ve akciğer kanseri riski. İstatistiksel analiz ikili lojistik regresyon analizi ve ki-kare testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. n; gözlenme sayısı.

SNP ID	Parametreler	Kontrol (n)	Hasta (n)	p değeri
rs4938723	Genotip			
	TT	100	58	<0.001
	CT	0	42	
	Allel			
	T	200	158	
	C	0	42	



Şekil 4.5: miR-34b/c rs4938723 polimorfizmi genotip frekansları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri GLOBOCAN 2012 verilerine göre dünya genelinde ölüme sebep olan kanserler arasında ilk sırada yer almaktadır [15]. Genel olarak sigara, cinsiyet, yaş, ırk, diyet, çevresel kirlilik, aile öyküsü, genetik yatkınlık gibi etiyolojik faktörlerin sebep olduğu akciğer kanseri; diğer kanser türlerinde olduğu gibi ülkemizde gittikçe görülme sıklığı artan bir hastalıktır [17].

Kanser patogeneğinde rol oynayan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler akciğer kanserinde de gözlenmektedir. Örneğin bir tirozin kinaz reseptörü olan EGFR'nin aktivasyonunu artıran bir mutasyon akciğer adenokarsinomalarının %20'sinde tespit edilmiş ve ileri evre akciğer kanseri tanısında biyomarker olarak kullanılmaktadır [43].

Akciğer kanserinde MET, BRAF, HER2 gibi önemli fonksiyonlara sahip proteinleri kodlayan genlerde de ekspresyon değişiklikleri ve mutasyonlar saptanmıştır [47-51]. Bu genlerle birlikte bu genleri hedefleyen miRNA'ların da kodlandığı genlerde meydana gelen değişimlerin ve ekspresyon farklılıklarının kansere etki edebileceği keşfedilmiş ve araştırmalar bu alana yönelmiştir. Akciğer kanserinde belirlenen ilk miRNA değişimi let-7 miRNA ailesinde olmakla beraber sıklıkla delesyona uğradıkları gözlenmiştir [52].

Bunun gibi bazı miRNA'ların kanser üzerinde etkileri göz önünde bulundurularak onkogenik miRNA'lar (oncomiR) ve tümör baskılayıcı miRNA'lar (tumor suppressor miR) olmak üzere sınıflandırılmışlardır [102]. miR-34 de akciğer kanseri ve diğer insan kanserlerinde ekspresyon seviyesinin düştüğü tespit edilen tümör baskılayıcı bir miRNA'dır [5, 6]. Hedeflediği genler arasında *SIRT1*, *MET*, *MYC*, *BCL2*, *CDK4/6*, *NOTCH1*, *E2F3* gibi hücre döngüsü, apoptoz ve yaşlanmada önemli roller üstlenen genler olduğu bilinmektedir [7, 10, 11, 96, 97]. Tümör baskılayıcı p53 ile birlikte görev yapan miR-34'ün yaşlanma, apoptozu ve G₁ fazında durdurulmayı teşvik ettiği, migrasyonu inhibe ettiği, hücre proliferasyonunu ve büyümesini kontrol ettiği bildirilmiştir [85, 97, 101].

Bu tez kapsamında PCR-RFLP yöntemi kullanılarak, miR-34 ailesinden olan miR-34a'nın pre-miRNA dizisinde bulunan rs35301225 (C/T, A) ve miR-34b ve miR-34c'nin ortak promotorlarında yer alan rs4938723 (T/C) polimorfizmlerinin akciğer kanseri riski ile ilişkisi

araştırılmıştır. Literatürde bu iki polimorfizmin akciğer kanseri ile ilişkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Gallardo ve diğ. [93] küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde yaptıkları bir çalışmada tümör dokularında miR-34a ekspresyonunun azaldığını ve bu düşük ekspresyon seviyesinin akciğer kanserinde nüks riskini artırdığını ortaya koymuşlardır.

Gong ve diğ. [103] biyoinformatik analizleri kullanarak rs35301225'in varyant allelinin miR-34a ve hedefleri arasındaki etkileşimin kaybına sebep olduğunu açıklamıştır. miR-34'nın olgun dizisinde bulunan bu polimorfizmin; büyük dizileme projelerinde bildirilmemesine rağmen hastalıklarda önemli rol oynuyor olabileceğini düşünmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda 100 akciğer kanserli birey, 100 sağlıklı birey rs35301225 açısından incelenmiş ve hiçbirinde polimorfizme rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu polimorfizmin, akciğer kanseri ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir. Az çalışılmış olan bu polimorfizmin literatürde akciğer kanseri ile ilişkisine rastlanmamıştır.

Çalışmamızdan farklı olarak; Jiang ve diğ. [104] yaptıkları çalışmada insan kolon kanserinde miR-34a'nın rs35301225 polimorfizminin E2F1'in ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmada polimorfizmin sadece C/A değişimi incelenmiştir. Kontrol grubunda CC, CA ve AA genotiplerine sahip bireylerin sayısı sırasıyla 328, 184 ve 106 olarak gözlenmiştir. Hasta bireylerde ise CC, CA ve AA genotipleri sırasıyla 189, 155 ve 341 olarak tespit edilmiştir. CA ve AA genotipin kolon kanseri riskini artırdığı, A alleli taşıyıcılarının daha büyük tümör boyutu ve kötü farklılaşma ile ilişkili olduğu ve ameliyat sonrası sağkalımın daha kısa olmasıyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Bunların yanı sıra polimorfizmin S fazı yüzdesini artırarak hücre döngüsünü değiştirebildiği bildirilmiştir. Polimorfik allel frekanslarındaki farklılığın ise etnik varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda malignant melanomada, kolorektal kanserde ve oral kanserde miR-34b ve miR-34c'nin ortak promotorlarında bulunan CpG adalarının hipermetilasyonu ile down-regüle edildiği tespit edilmiştir [105, 106, 107].

Hastalıklara genetik yatkınlık sağlayabilen SNP'lerin promotor bölgelerinde bulunmasının kanser gelişimi için kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Son zamanlarda miR-34b ve miR-

34c'nin promotorlarında (11q23.1) fonksiyonel bir polimorfizm olan rs4938723 tanımlanmıştır. Atasal allel olan T'nin C'ye değişimini içeren polimorfizmin, GATA-X bağlanma bölgesini etkilediği tahmin edilmektedir. GATA-X transkripsiyon faktörleri promotordaki spesifik W-G-A-T-A-R dizisine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Normal allel GATA-X transkripsiyon faktörlerine bağlanamazken; polimorfik C alleli GATA-X transkripsiyon faktörlerine bağlanabilmektedir [114].

Xu ve diğ. [113] çalışma grubu 501 hasta 548 kontrolden oluşan araştırmalarında, rs4938723'ün CT ve CC genotiplerinin TT'ye göre hepatoselüler karsinoma riskini artırdığını bildirmişlerdir. Hepatoselüler karsinoma üzerine benzer bir çalışma Han ve diğ. [116] tarafından gerçekleştirilmiş olup CC varyantının kanser riskiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Son ve diğ. [117] ise CT ve CC frekansının hepatoselüler kanserli hastalarda kontrollere oranla daha yüksek olduğunu fakat sağkalımla ilişkili olmadığını göstermiştir.

İlginç olarak Zhang ve diğ. [118] Çin popülasyonunda rs4938723'ün CC varyantının özofagus skuamöz hücreli karsinomada azalmış risk ile ilişkili bulmuştur. Yin ve diğ. [119] yine özofagus skuamöz hücreli karsinomada CC genotipinin frekansının kontrollerde hastalara göre daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Bu miRNA'ların farklı kanserlerde çeşitli görevler üstlenebileceğini akla getirmektedir.

Oh ve diğ. [120] bu polimorfizmin ve miR-34'ü direkt olarak regüle ettiği bilinen TP53'ün bir polimorfizminin (Arg72Pro) kolorektal kanser riski ile ilişkisini araştırmışlardır. Gerçekleştirdikleri 545 hasta 428 kontrol bulunan PCR-RFLP çalışmasında; rs4938723 polimorfizminin CT varyantının kolorektal kanseri riskini artırdığını açıklamışlardır. TP53 polimorfizminin ise normal olan GG genotipinin kolorektal kanserden koruyucu oldukları gözlenmiştir. Sonuç olarak iki polimorfizm de kolorektal kansere yatkınlık sağlamaktadır. Ancak Gao ve diğ. [121] kolorektal kanserle rs4938723 polimorfizmi arasında bir ilişki bulunmadığını bildirmiştir.

2014 yılında yapılan bir diğer çalışmada Çin popülasyonunda mide kanseri ve rs4938723 arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yang ve diğ. [122] CC genotipinin ve C allelinin, TT genotipi ve T alleliyle karşılaştırıldığında mide kanseri riskini azalttığını, C allelinin mide kanseri açısından koruyucu bir rol üstlenmiş olabileceğini göstermiştir.

Chen ve diğ. [123] yapmış oldukları çalışmada bu polimorfizmin CT ve CC genotiplerinin TT genotipiyle karşılaştırıldığında, papiller tiroid karsinomaya (PTC-papillary thyroid carcinoma) yatkınlık sağladığını dolayısıyla polimorfizmin kanser riskini artırdığını bildirmiştir. Bununla beraber kombine analizler sonucunda rs4938723 CT/CC ve TP53 CG/CC (Arg72Pro) normal genotiplere kıyasla PTC riskini artırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada PTC hastalarında miR-34b ekspresyon seviyesi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur.

Carvalho ve diğ. [124] retinoblastoma üzerine yaptıkları bir araştırmada 130 hasta ve 105 kontrol kullanmışlardır. C allelinin retinoblastoma (RB) riskini etkilemediği gösterilmiştir. Ancak CC genotipine sahip RB hastalarında TT genotiplilere göre tanının daha erken yaşta mümkün olduğu saptanmıştır. C allelinin, bir RB1 gen mutasyonu ile birlikte bulunduğu zaman retinoblastoma başlangıcını artırabileceği düşünülmüş ve rs4938723 polimorfizminin bu koşullar altında kalıtsal RB için bir aday biyomarker olabileceği ileri sürülmüştür.

2018 yılında yapılan bir araştırmada ise mesane kanseri ile pri-miR-34b/c rs4938723 polimorfizmi araştırılmıştır. Hashemi ve diğ. [125]; 136 hasta ve 144 kontrolden oluşan çalışma popülasyonlarında PCR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirdikleri araştırmada kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlemediklerini rapor etmişlerdir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında rs4938723 genel olarak hepatoselüler karsinoma riskini artırıyor, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi ve mide kanserinde riski azaltıyor gibi görünmektedir. Bunların yanı sıra Zhang ve diğ. [126] özofagus skuamöz hücreli karsinomada azalmış riskle ilişkili olduğunu bildirmişken; Zhu ve diğ. [127] herhangi bir ilişki bulamamıştır. Sanaei ve diğ. [128] meme kanseri riski ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda akciğer kanserine sahip 100 hasta ve sağlıklı 100 kontrol rs4938723 polimorfizmi açısından genotiplenerek değerlendirilmiştir. Normal allel olan T'nin C'ye değişimi söz konusu olan polimorfizmde kontrollerin hepsi normal genotipe (TT) sahipken, hasta grubunda 58 TT ve 42 CT genotipli birey tespit edilmiştir. Homozigot polimorfizm hiç gözlenmemiştir. Heterozigot genotipin kontrollerde bulunmamasına rağmen, hastaların neredeyse yarısının bu genotipe sahip olması çok önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Nitekim analizler sonucunda rs4938723 polimorfizminin, istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0.001$). Buna bağlı olarak CT genotipinin akciğer kanseri riskini artırdığını düşünmekteyiz. Literatürde akciğer kanseri ile

rs4938723 polimorfizminin ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan bakıldığında da büyük önem arz etmektedir.

Akciğer kanseri dünya genelinde erkekler arasında en yaygın kanserken kadınlar arasında meme kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir. GLOBOCAN verilerine göre 1.824.700 yeni vaka tespit edilmiş ve yaklaşık 1.589.900 vakada akciğer kanserine bağlı olarak ölüm meydana gelmiştir. Sigara, cinsiyet, yaş, ırk ve çevresel kirlilik gibi etiyolojik faktörlerin yanında çok sayıda genetik değişim bu kanserin gelişimine yol açabilmektedir.

KRAS, *BRAF*, *EGFR* ve *MET* gibi kanserde ekspresyon seviyesi değişen veya genetik değişime uğrayan genlerin yanı sıra bu genleri hedefleyen miRNA'ların değişimleri de kanser riski oluşturabilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar let-7, miR-17-92 ailesi, miR-21, miR-34 miRNA'larının akciğer kanseri ile ilişkisi olduğunu öngörmüştür.

Bu çalışma için akciğer kanseri riski oluşturabilecek genetik değişiklikler araştırılmış ve miR-34a ve miR-34b/c 'deki tek nükleotid polimorfizmleri rs35301225 ve rs4938723 seçilmiştir.

Literatürde rs35301225 ile ilgili sadece bir tane çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada kolon kanserinde bir risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hasta veya kontrollerde polimorfizme rastlanmamıştır. Sonuçlara göre polimorfizmin minör allel frekansının (bildirilmemiştir) düşük olabileceği tahmin edilmekte ve dolayısıyla çalışmanın daha geniş bir popülasyonla tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra sonuçlar bireylerin etnik kökenlerine de bağlı olabileceğinden; farklı coğrafyalardaki bireyler rs35301225 açısından değerlendirilmelidir. Bu polimorfizm miR-34'ün pre-miRNA dizisinde yer almakta ve miRNA'nın ikincil yapısında bir değişikliğe sebep olmaktadır. Bu değişim miR-34'ün olgunlaştırılmasını, hedef genlerini ve işlevini etkileyebileceğinden önemli olarak değerlendirilmektedir. Bundan dolayı akciğer kanserinin yanında bu polimorfizmin diğer kanserler ve genetik hastalıklarda da risk oluşturabileceği veya koruyucu rol üstlenebileceği tahmin edilmektedir. Sonraki çalışmalarda farklı hastalık gruplarında, daha geniş ve farklı etnisiteden çalışma popülasyonlarıyla polimorfizmin değerlendirilmesinin gerektiği düşünülmektedir.

miR-34b/c polimorfizmi için ise literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Yapılan çalışmalar sonucu rs4938723'ün kanser türlerine göre etkisi değişirken aynı kanser türü için farklı sonuçların da bildirildiği gözlenmektedir. Çalışmamızda fonksiyonel rs4938723

polimorfizminin akciğer kanseri riskini artırıcı bir etkisinin olduğunu gösterilmiştir. CT genotipi istatistiksel olarak akciğer kanseriyle önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Ancak yine de akciğer kanserinde rs4938723'ün etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olması sebebiyle çalışmanın daha yüksek sayıda hasta ve sağlıklı bireyle tekrar edilmesi faydalı olacaktır. Yine araştırmanın farklı ırklarda gerçekleştirilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Boyle, P. and Levin, B., Eds., 2008, *World Cancer Report*, International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneva, 1-6-2010.
- [2]. Coşkunpınar, E., 2013, *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında RRM1, RRM2 ve ERCC2 gen polimorfizmleri ve serum 8-OHG ve LDH düzeylerinin hastalığın riski ve prognozu üzerine etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [3]. Janssen-Heijnen, M.L., Coebergh, J.W., 2003, The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*, 41, 245-258.
- [4]. Anonim 2006. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi, *Toraks Dergisi*, 7, 1-37.
- [5]. Xu, J., Yin, Z., Shen, H., Gao, W., Qian, Y., Pei, D., Liu, L., Shu, Y., 2013, A genetic polymorphism in pre-miR-27a confers clinical outcome of non-small cell lung cancer in a Chinese population, *PLoS One*, 8.11, e79135.
- [6]. Wang, Z., Chen, Z., Gao, Y., Li, N., Li, B., Tan, F., Tan, X., Lu, N., Sun, Y., Sun, N., He, J., 2011, DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage I non-small cell lung cancer, *Cancer biology & therapy*, 11.5, 490-496.
- [7]. Yamakuchi, M., and Lowenstein, C.J., 2009, MiR-34, SIRT1, and p53: the feedback loop, *Cell cycle*, 8.5, 712-715.
- [8]. Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Yang, M., Li, L., Xiang, D., DeSano, J. T., Bommer, G. T., Fan, D., Fearon, E. R., 2009, MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells, *PloS One*, 4(8), e6816.
- [9]. Guessous, F., Zhang, Y., Kofman, A., Catania, A., Li, Y., Schiff, D., Purow, B., 2010, microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells, *Abounader R. Cell Cycle*, 9(6), 1031-6.
- [10]. Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A.J., Kuick R., Love R.E., 2007, p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes, *Curr Biol*, 17, 1298-307.
- [11]. Leucci E., Cocco M., Onnis A., De Falco G., van Cleef P., Bellan C., van Rijk A., Nyagol J., Byakika B., Lazzi S., Tosi P., van Krieken H., Leoncini L., 2008, MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation, *J Pathol.*, 216(4), 440-450.
- [12]. Wong, N., and Wang, X., 2015, *miRDB- MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database*, <http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-34a-5p&full=1> [Ziyaret tarihi: 15.09.2017]

- [13]. Wong, N., and Wang, X., 2015, *miRDB- MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database*, <http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-34b-5p&full=1> [Ziyaret tarihi: 15.09.2017]
- [14]. Wong, N., and Wang, X., 2015, *miRDB- MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database*, <http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-34c-5p&full=1> [Ziyaret tarihi: 15.09.2017]
- [15]. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin D. M., Forman D., Bray, F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International journal of cancer*, 136(5).
- [16]. Didkowska, J., Wojciechowska, U., Mańczuk, M., Łobaszewski, J., 2016, Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide, *Annals of translational medicine*, 4(8).
- [17]. Gültekin, M., and Boztaş, G. 2014, *Türkiye kanser istatistikleri*, Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43.
- [18]. Hecht, SS., 1999, Tobacco smoke carcinogens and lung cancer, *J Natl Can Inst*, 91,1194-210.
- [19]. Müsellim, B., 2007, Türkiye'de sık karşılaşılan hastalıklar 2, *Akciğer Kanseri Güncel Yaklaşım Sempozyum Dizisi No: 58*,113-118.
- [20]. Parsons, A., Daley, A., Begh, R., 2010, Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis, *BMJ*, 340, 5569.
- [21]. Zang, E.A., Wynder, E.L., 1996, Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence, *J Natl Can Inst*, 88,183-92.
- [22]. Parkin, D.M., Ehelan, S.L., Ferlay, J., Raymond, L., Young, J., 1996, *Cancer incidence in five continents*, vol. VII. No. 143. Lyon: IARC.
- [23]. Schottenfeld, D., Fraumeni, J.F., 1996, *Cancer Epidemiology and Prevention*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 141-67.
- [24]. Wynder, E.L., Muscat, J.E., 1995, The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology, *Environ Health Perspect*, 103(Suppl. 8),143-8.
- [25]. İtil, O., 2000, Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi, *Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi*, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 15-34.
- [26]. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994, The effect of vitamin and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *N Engl J Med*, 330,1029-35.

- [27]. Hennekens, C.H., Buring, J.E., Manson, J.E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N.R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., Willett, W., Peto, R., 1996, Lack of effect of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular diseases, *N Engl J Med*, 334, 1145-9.
- [28]. Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, JP, Meyskens, FL, Valanis, B, Williams, JH, Barnhart, S, Hammar, S., 1996, Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease, *N Engl J Med*, 334, 1150-5.
- [29]. Smith, T.J., Yang, G., Seril, D.N., Liao, J., Kim, S., 1998, Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene, *Carcinogenesis*, 19, 703-6.
- [30]. Alavanja, M.C.R., Brownson, R.C., Benichou, J., 1996, Estimating the effect of dietary fat on the risk of lung cancer in non-smoking women, *Lung Cancer*, 14(Suppl. 1), 63-74.
- [31]. Chen, C.L., Hsu, L.I., Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Chen, S.Y., Wu, M.M., Chen, C.J., 2004, Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan, *JAMA*, 292, 2984.
- [32]. Vähäkangas, K.H., Samet, J.M., Metcalf, R.A., Welsh, J.A., Bennett, W.P., Lane, D.P., Harris, C.C., 1992, Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners, *Lancet*, 339, 576-80.
- [33]. Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P., 1997, Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, 1997, *Cancer Causes Control*, 8, 444-72.
- [34]. Spitz, M.R., Hong, W.K., Amos, C.I., Wu, X., Schabath, M.B., Dong, Q., Shete, S., Etzel, C.J., 2007, A risk model for prediction of lung cancer, *J Natl Cancer Inst*, 99, 715-26.
- [35]. Brownson, R.C., Alavanja, M.C.R., Caporaso, N., Berger, E., Chang, J.C., 1997, Family history of lung cancer and risk of lung cancer in lifetime non-smokers and long-term ex-smokers, *Int J Epidemiol*, 26, 256-63.
- [36]. Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Barros-Dios, J.M., 2003, Lung cancer and related risk factors: an update of the literatür, *Public Health*, 117, 149-156.
- [37]. Ost, D.E., Yeung, S-C.J., Tanoue, L.T., Gould, M.K., 2013, Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines, *CHEST Journal*, 143(5_suppl), e121S-e141S.
- [38]. Hyde, L., Hyde, C.I., 1974, Clinical manifestations of lung cancer, *Chest*, 65, 299-306
- [39]. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins and Cotran, 2005, *Pathologic Basis of Disease*, 7th edition. Philadelphia: E Saunders, 711-773.

- [40]. Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, A. S., Wistuba, I., 2015, The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification, *Journal of thoracic oncology*, 10(9), 1243-1260.
- [41]. Silvestri, G., Tanoue, L., Margolis, M., The Noninvasive Staging of Non Small Cell Lung Cancer, *Chest*, 1,147-56, 123 Supp
- [42]. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, M., Gress, D.M., Meyer, L.R. (Eds.), 2018, *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Ed. (AJCC Cancer Staging Form Supplement) 191-194.
- [43]. Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., Porta, R., Cobo, M., Garrido, P., Longo, F., Moran, T., Insa, A., De Marinis, F., Corre, R., Bover, I., Illiano, A., Dansin, E., de Castro, J., Milella, M., Reguart, N., Altavilla, G., Jimenez, U., Provencio, M., Moreno, M.A., Terrasa, J., Muñoz-Langa, J., Valdivia, J., Isla, D., Domine, M., Molinier, O., Mazieres, J., Baize, N., Garcia-Campelo, R., Robinet, G., Rodriguez-Abreu, D., Lopez-Vivanco, G., Gebbia, V., Ferrera-Delgado, L., Bombaron, P., Bernabe, R., Bearz, A., Artal, A., Cortesi, E., Rolfo, C., Sanchez-Ronco, M., Drozdowskyj, A., Queral, C., de Aguirre, I., Ramirez, J.L., Sanchez, J.J., Molina, M.A., Taron, M., Paz-Ares, L., 2013, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *Lancet Oncol*, 13, 239-246.
- [44]. Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamanaka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., Lim Choi, Y., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Mano, H., Ishikawa, Y., 2012, RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer, *Nat Med*, 18:378-381.
- [45]. Warth, A., Muley, T., Dienemann, H., Goeppert, B., Stenzinger, A., Schnabel, P.A., Schirmacher, P., Penzel, R., Weichert, W., 2014, ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases, *Histopathology*, 65:187-194.
- [46]. Lohinai, Z., Klikovits, T., Moldvay, J., Ostoros, G., Raso, E., Timar, J., Fabian, K., Kovalszky, I., Kenessey, I., Aigner, C., Renyi-Vamos, F., Klepetko, W., Dome, B., Hegedus, B., 2017, KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis, *Sci Rep*, 7:39721.

- [47]. Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Franklin, W.A., Veve, R., Chen, L., Helfrich, B., Baron, C.A., Bunn, P.A., 2002, Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in nonsmall cell lung carcinomas, *Br J Cancer*, 86:1449-1456.
- [48]. Cancer Genome Atlas Research Network, 2014, Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma, *Nature*, 511:543-550.
- [49]. Yano, S., Nakagawa, T., 2014, The current state of molecularly targeted drugs targeting HGF/Met, *Jpn J Clin Oncol*, 44(1): 9-12.
- [50]. Sierra, J.R., Tsao, M.S., 2011, c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer, *Ther Adv Med Oncol*, 3(1): 21- 35.
- [51]. Jung, K.H., Park, B.H., Hong, S.S., 2012, Progress in cancer therapy targeting c-Met signaling pathway, *Arch Pharm Res*, 35(4): 595-604.
- [52]. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M., 2004, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 2999-3004
- [53]. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T., 2004, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Res*, 64: 3753-6.
- [54]. Liu, X., Sempere, L.F., Guo, Y., Korc, M., Kauppinen, S., Freemantle, S.J., Dmitrovsky, E., 2011, Involvement of microRNAs in lung cancer biology and therapy, *Transl Res*, 157: 200-8
- [55]. Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., MacDougald, O.A., Cho, K.R., Fearon, E.R., 2007, p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes, *Curr Biol*, 17: 1298-307
- [56]. Lin, P.Y., Yu, S.L., Yang, P.C., 2010, MicroRNA in lung cancer, *Br J Cancer*, 103: 1144-8.
- [57]. Liu, X., Sempere, L.F., Ouyang, H., Memoli, V.A., Andrew, A.S., Luo, Y., Demidenko, E., Korc, M., Shi, W., Preis, M., Dragnev, K.H., Li, H., Drenzo, J., Bak, M., Freemantle, S.J., Kauppinen, S., Dmitrovsky, E., 2010, MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors, *J Clin Invest*, 120: 1298-309.
- [58]. Yu, L., Todd, N.W., Xing, L., Xie, Y., Zhang, H., Liu, Z., Fang, H., Zhang, J., Katz, R.L., Jiang, F., 2010, Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers, *Int J Cancer*, 127: 2870-8.

- [59]. Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M., 2005, Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, *Nature*, 433: 769-773
- [60]. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75: 843-854.
- [61]. Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V., 1997, The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA, *Cell*, 88(5), 637.
- [62]. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000, The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 403, 901-906.
- [63]. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science*, 294:853-858
- [64]. Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *RNA*, 10(12):1957-66.
- [65]. Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W., 2010, The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay, *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597.
- [66]. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004, Nuclear export of microRNA precursors, *Science*, 303:95-98.
- [67]. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2005, Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell*, 123:631-640.
- [68]. Melo, S.A., Kalluri, R., Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics., 2012, *Clinical Cancer Research*, 18(16):4234-9.
- [69]. Wu, L., Fan, J., Belasco, J.G., 2006, MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11):4034-9.
- [70]. Nissan, T., Parker, R., 2008, Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition, *RNA*, 14(8):1480-91.
- [71]. Li, Z., and Rana, T.M., 2014, Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges, *Nat Rev Drug Discov*, 13, 622-38.
- [72]. Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*, 318, 1931-4.
- [73]. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M., 2004, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(9):2999-3004.

- [74]. Cowland, J.B., Hother, C., Gronbaek, K., 2007, MicroRNAs and cancer, *APMIS*, 115:1090–1106.
- [75]. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M., 2002, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:15524-15529.
- [76]. Hydrbring, P., and Badalian-Very, G., 2013, Clinical applications of microRNAs, *F1000Research*, 2.
- [77]. Dzikiewicz-Krawczyk, A., 2015, MicroRNA polymorphisms as markers of risk, prognosis and treatment response in hematological malignancies, *Critical reviews in oncology/hematology*, 93 (1):1-17.
- [78]. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K., Dang, C.V., Mendell, J.T., 2005, c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression, *Nature*, 435(7043), 839–43.
- [79]. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Takahashi, T., 2004, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Research*, 64(11), 3753–6.
- [80]. Yu, L., Todd, N.W., Xing, L., Xie, Y., Zhang, H., Liu, Z., Jiang, F., 2010, Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers, *International Journal of Cancer, Journal International Du Cancer*, 127(12), 2870–8.
- [81]. Foss, K., Sima, C., Ugolini, D., Allen, K., & Weiss, G., 2011, miR-1254 and miR-574-5p Serum-Based microRNA Biomarkers for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 6(3), 482–488.
- [82]. Kim, J.S., Choi, Y.Y., Jin, G., Kang, H.G., Choi, J.E., Jeon, H.S., Lee, W.K., Kim, D.S., Kim, C.H., Kim, Y.J., Son, J.W., Jung, T.H., Park, J.Y., 2010, Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: a two-stage case-control study, *Molecular carcinogenesis*, 49(10):913-21.
- [83]. Yin, Z., Cui, Z., Ren, Y., Xia, L., Li, H., Zhou, B., 2017, MiR-196a2 and lung cancer in Chinese non-smoking females: a genetic association study and expression analysis, *Oncotarget*, 8(41):70890-8.
- [84]. Xu, P., Liu, L., Wang, J., Zhang, K., Hong, X., Deng, Q., Xiang, J., Zhang, X., He, M., Wu, T., Guo, H., 2013, Genetic variation in BCL2 3'- UTR was associated with lung cancer risk and prognosis in male Chinese population, *PloS One*, 8(8):e72197.
- [85]. Hermeking, H., 2010, The miR-34 family in cancer and apoptosis, *Cell Death Differ*, 17(2): 193-199.
- [86]. Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Giro'n, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N.,

- Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Helen Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P., 2018, *Ensembl genome browser*, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000284357;r=1:9151668-9151777;t=ENST00000385130 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [87]. Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Giro'n, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Helen Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P., 2018, *Ensembl genome browser*, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000207811;r=11:111512938-111513021;t=ENST00000385076 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [88]. Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Giro'n, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Helen Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P., 2018, *Ensembl genome browser*, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000207562;r=11:111513439-111513515;t=ENST00000384831 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [89]. Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S., 2014, *miRBase: the microRNA database*, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000268 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [90]. Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S., 2014, *miRBase: the microRNA database*, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000742 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [91]. Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S., 2014, *miRBase: the microRNA database*, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000743 [Ziyaret tarihi: 13.10.2018]
- [92]. Henrich, K.O., Schwab, M., Westermann, F., 2012, 1p36 tumor suppression--a matter of dosage?, *Cancer Res*, 72(23):6079-6088.
- [93]. Gallardo, E., Navarro, A., Vinolas, N., Marrades, R.M., Diaz, T., Gel B., Quera, A., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J., Ramirez, J., Monzo, M., 2009, miR-34a as a prognostic

marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer, *Carcinogenesis*, 30: 1903-9.

- [94]. Welch, C., Chen, Y., Stallings, R.L., 2007, MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells, *Oncogene*, 26(34):5017-5022.
- [95]. Gao, H., Zhao, H., Xiang, W., 2013, Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis, *Journal of neuro-oncology*, 113(2):221-228.
- [96]. Migliore, C., Petrelli, A., Ghiso, E., Corso, S., Capparuccia, L., Eramo, A., Comoglio, P.M., Giordano, S., 2008, MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth, *Cancer Res*, 68(24): 10128-10136.
- [97]. Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., Nakagama, H., 2007, Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(39): 15472-15477.
- [98]. He, L., He, X., Lowe, S.W., Hannon, G.J., 2007, microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle, *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 819.
- [99]. He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A., Hannon, G.J., 2007, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, *Nature*, 447:1130-4.
- [100]. Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Arking, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., Mendell, J.T., 2007, Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis, *Mol Cell*, 26:745-52.
- [101]. Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., Nikitin, A.Y., 2007, MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth, *Cancer research*, 67(18), 8433-8438.
- [102]. Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., Zhang, X., 2013, MicroRNA: function, detection, and bioanalysis, *Chem Rev*, 113, 6207-33.
- [103]. Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., Guo, A.Y., 2012, Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis, *Human Mutation*, 33(1): 254-263.
- [104]. Jiang, H., Ge, F., Hu, B., Wu, L., Yang, H., Wang, H., 2017, rs35301225 polymorphism in miR-34a promotes development of human colon cancer by deregulation of 3' UTR in E2F1 in Chinese population, *Cancer cell international*, 17(1), 39.
- [105]. Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setién, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P.P., Caldas, C., Miska, E., Esteller, M., 2007, Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells, *Cancer Res*, 67, 1424–1429.

- [106]. Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., 2008, Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer, *Cancer Res*, 68, 4123–4132.
- [107]. Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K., Inazawa, J., 2008, Exploration of tumor suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer, *Cancer Res*, 68, 2094–2105.
- [108]. Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Sirotkin, K., 2001, *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs35301225 [Ziyaret Tarihi: 24.10.2018]
- [109]. Safran, M., Dalah, I., Alexander, J., Rosen, N., Stein, T.I., Shmoish, M., Nativ, N., Bahir, I., Doniger, T., Krug, H., Sirota-Madi A., Olender, T., Golan, Y., Stelzer, G., Harel, A., Lancet, D., 2010, *Genecards Database*, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR34A> [Ziyaret Tarihi: 24.10.2018]
- [110]. Gong, J., Liu, C., Liu, W., Wu, Y., Ma, Z., Chen, H., Guo, A.Y., 2015, *miRNASNP Database*, http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/miRNA_details.php?id=hsa-mir-34a [Ziyaret Tarihi: 24.10.2018]
- [111]. Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Sirotkin, K., 2001, *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4938723 [Ziyaret Tarihi: 24.10.2018]
- [112]. Safran, M., Dalah, I., Alexander, J., Rosen, N., Stein, T.I., Shmoish, M., Nativ, N., Bahir, I., Doniger, T., Krug, H., Sirota-Madi A., Olender, T., Golan, Y., Stelzer, G., Harel, A., Lancet, D., 2010, *Genecards Database*, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR34B&keywords=mir-34b> [Ziyaret Tarihi: 24.10.2018]
- [113]. Xu, Y., Liu, L., Liu, J., Zhang, Y., Zhu, J., Chen, J., Liu, S., Liu, Z., Shi, H., Shen, H., Hu, Z., 2011, A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma, *International Journal of Cancer*, 128(2), 412-417.
- [114]. Bossard, P., Zaret, K.S., 1998, GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation, *Development*, 125, 4909-17.
- [115]. Chou, J., Provot, S., Werb, Z., 2010, GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!, *J Cell Physiol*, 222:42–9.
- [116]. Han, Y., Pu, R., Han, X., Zhao, J., Zhang, Y., Zhang, Q., Yin, J., Xie, J., Shen, Q., Deng, Y., Ding, Y., Li, W., Li, J., Zhang, H., Cao, G., 2013, Associations of pri-miR-34b/c and pre-miR-196a2 polymorphisms and their multiplicative interactions with hepatitis B virus mutations with hepatocellular carcinoma risk, *PLoS One*, 8(3), e58564.

- [117]. Son, M.S., Jang, M. J., Jeon, Y. J., Kim, W.H., Kwon, C.I., Ko, K.H., Park, P.W., Hong, S.P., Rim, K.S., Kwon, S.W., Hwang, S.G., Kim, N.K., 2013, Promoter polymorphisms of pri-miR-34b/c are associated with hepatocellular carcinoma, *Gene*, 524(2), 156-160.
- [118]. Zhang, J., Huang, X., Xiao, J., Yang, Y., Zhou, Y., Wang, X., Liu, Q., Yang, J., Wang, M., Qiu, L., Zheng, Y., Zhang, P., Li, J., Wang, Y., Wei, Q., Jin, L., Wang, J., Wang, M., 2014, Pri-miR-124 rs531564 and pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphisms are associated with decreased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese populations, *PloS One*, 9(6), e100055.
- [119]. Yin, J., Wang, X., Zheng, L., Shi, Y., Wang, L., Shao, A., Tang, W., Ding, G., Liu, C., Liu, R., Chen, S., Gu, H., 2013, Hsa-miR-34b/c rs4938723 T>C and hsa-miR-423 rs6505162 C>A Polymorphisms Are Associated with the Risk of Esophageal Cancer in a Chinese Population, *Plos One*, 8, e80570.
- [120]. Oh, J., Kim, J. W., Lee, B. E., Jang, M. J., Chong, S. Y., Park, P. W., Hwang, S.G., Oh, D., Kim, N.K. 2014, Polymorphisms of the pri-miR-34b/c promoter and TP53 codon 72 are associated with risk of colorectal cancer, *Oncology reports*, 31(2), 995-1002.
- [121]. Gao, L.B., Li, L.J., Pan, X.M., Li, Z.H., Liang, W.B., Bai, P., Zhu, Y.H., Zhang, L., 2013, A genetic variant in the promoter region of miR-34b/c is associated with a reduced risk of colorectal cancer, *Biol Chem*, 394, 415-20.
- [122]. Yang, C., Ma, X., Liu, D., Wang, Y., Tang, R., Zhu, Y., Xu, Z., Yang, L., 2014, Promoter polymorphisms of miR-34b/c are associated with risk of gastric cancer in a Chinese population, *Tumor Biology*, 35(12), 12545-12554.
- [123]. Chen, P., Sun, R., Pu, Y., Bai, P., Yuan, F., Liang, Y., Zhou, B., Wang, Y., Sun, Y., Zhu, J., Zhang, L., Gao, L., 2015, Pri-Mir-34b/C and Tp-53 polymorphisms are associated with the susceptibility of papillary thyroid carcinoma: a case-control study, *Medicine*, 94(38).
- [124]. Carvalho, I.N., Reis, A.H., dos Santos, A.C., Vargas, F.R., 2017, A polymorphism in mir-34b/c as a potential biomarker for early onset of hereditary retinoblastoma, *Cancer Biomarkers*, 18(3), 313-317.
- [125]. Hashemi, M., Hasanpour, V., Danesh, H., Bizhani, F., Narouie, B., 2018, Association between Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism and bladder cancer risk, *Journal of biomedical research*, [Epub ahead of print] doi: 10.7555/JBR.31.20170044.
- [126]. Zhang, S., Qian, J., Cao, Q., Li, P., Wang, M., Wang, J., Ju, X., Meng, X., Lu, Q., Shao, P., Zhang, Z., Qin, C., Yin, C., 2014, A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population, *Mutagenesis*, 29, 149-54.
- [127]. Zhu, J., Yang, L., You, W., Cui, X., Chen, Y., Hu, J., Liu, W., Li, S., Song, X., Wei, Y., Zhang, W., Li, F., 2015, Genetic variation in miR-100 rs1834306 is associated with decreased risk for esophageal squamous cell carcinoma in Kazakh patients in northwest China, *Int J Clin Exp Pathol*, 8(6): 7332-7340.

- [128]. Sanaei, S., Hashemi, M., Rezaei, M., Hashemi, S. M., Bahari, G., Ghavami, S., 2016, Evaluation of the pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism and its association with breast cancer risk, *Biomedical reports*, 5(1), 125-129.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Belgesi



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

TOPLANTI TARİHİ : 20/12/2017
TOPLANTI NO : 2017/21

KARARLAR :

- 4- Fen- Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Da Başkanlığı'nın 2017-116-20/12 Protokol no'lu "Akciğer Kanseri pre-miR-34 rs35301225 ve pri-miR-34b/c rs4938723 Polimorfizmlerinin İncelenmesi" konul çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Prof. Dr. Gönur ÖZBAKİŞ DENGİZ
B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Aycan ÇELİK
Doğum Yeri	Karabük
Doğum Tarihi	25.05.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+905395853882
E-Posta Adresi	aycan.celik93@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
1-Eroglu O., Güvenir E., Çelik A., “Meme Kanseri Hastalarında PCR-RFLP Yöntemiyle PPAR γ Genindeki Pro12Ala Polimorfizminin İncelenmesi” 22. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi 10-14 Ağustos 2015, Ankara. (Özet Bildiri)	
2-Celik A., Karakas Celik S., Arpacı E., Engin H., Arıcan E., “Investigation of pre-miR-34a rs35301225 and pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphisms in lung cancer” 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress 25-27 April 2018, Konya. (Sözlü Bildiri)	