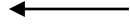


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARDA RASSF4
GENİNİN İNCELENMESİ**

EMİNE HANDE KARAGEDİK

**DANIŞMAN
PROF DR H. ARZU ERGEN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Emine Hande KARAGEDİK** tarafından **Prof. Dr. H.Arzu ERGEN**'in danışmanlığında hazırlanan “**Baş Boyun Kanseri Hastalarda RASSF4 Geninin İncelenmesi**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Bedi ÇAKMAKOĞLU
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Turgay İSBİR
Yeditepe Ün. Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü.Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Elif Sinem İPLİK
İst.Yeniyüzyıl Ü. Ecz. Fak.
Farmasötik Mikrobiyoloji A.D

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Yemliha YILDIZ
İstinye Üniv. Tıp Fak. Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

Emine Hânde Karagedik



İTHAF

Annem Hanife Karagedik'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, tezim süresince yardım ve desteklerini benden esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, insani ve ahlaki değerleriyle de örnek edindiğim İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. H. Arzu Ergen'e, bu süreçte beni kendi öğrencilerinden ayırmayan her zaman koruyup kollayan, desteğiyle ve üzerimdeki emeğiyle bende minnet duygusu uyandıran değerli hocam Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu'na ve tüm kıymetli hocalarıma, tez çalışmam için hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ve klinik süreçteki değerlendirmelerle alakalı destek ve katkılarından dolayı Dr. Saim Pamuk'a,

Doktora eğitimim boyunca yanımda olan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen eşsiz bilgilerini benimle paylaşan, yalnızca eğitim sürecinde değil hayata dair de yol göstericim olan kıymetli hocam Prof. Dr. Uzay Görmüş'e, bu çalışmayı kendi çalışması gibi sahip çıkan MSc. Merve Ataş ve MSc. Barış Ertuğrul'a, kendi yoğunlukları arasında benim için de vakit ayırmaya çalışan Doç. Dr. Özlem Küçük Hüseyin ve Doç. Dr. Özlem Timirci Kahraman'a, bu süre zarfında en büyük kazançlarımdan biri olan desteğini derinden hissettiğim Dr. Beliz Özel'e,

Doktora eğitimim süresince maddi ve manevi tüm desteklerini sağlayan, sevgilerini her daim hissettiğim ve güç aldığım başta sevgili annem Hanife Karagedik ve canım kardeşim Hale Öksüz'e ve varlığını daima hissettiğim babam Cengiz Yusuf Karagedik'e yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29262

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	10
ÖZET	13
ABSTRACT.....	14
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1. Kanser Epidemiyolojisi.....	17
2.1.1. Baş Boyun Kanserİ.....	18
2.1.1.1. Baş Boyun Kanser Bölgeleri	18
2.1.1.2. Risk Faktörleri.....	21
2.1.1.3. Baş boyun Kanserinde Evreleme	23
2.2. Ras Proteinleri ve Ras Yolağı	29
2.2.1. RASSF Ailesi.....	31
2.2.1.1. C-RASSF.....	33
2.2.1.2. N-RASSF	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. ÇALIŞMA GRUBU VE SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI.....	42
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE KİTLER.....	42
3.3. KULLANILAN CİHAZLAR VE GEREÇLER	43
3.4. DOKUDAN DNA İZOLASYONU	43
3.4.1. DNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ	44
3.5. TOTAL RNA İZOLASYONU	45
3.5.1. TOTAL RNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ	45

3.5.2. TERS TRANSKRİPSİYON	46
3.5.3. QRT-PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK RASSF4 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF OLARAK SAPTANMASI	46
3.5.4. REAKSİYONLARDA KULLANILAN QPCR PRİMERLERİ VE TAQMAN PROBLARI.....	47
3.5.5. QPCR REAKSİYON KARIŞIMININ HAZIRLANMASI VE ÜÇLÜ OLARAK İNCELENMESİ	48
3.6. ELISA YÖNTEMİ İLE SERUM DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ	50
3.6.1. PERİFERİK KANDAN SERUM ELDESİ.....	50
3.6.2. RASSF4 SERUM DÜZEYLERİ TAYİNİ	51
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	52
4. BULGULAR.....	53
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	64
FORMLAR	84
ETİK KURUL KARARI	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	90
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Baş boyun kanserinde bölgesel lenf nodları ve uzak metastaz gruplandırması ⁶⁴	24
Tablo 2-2: Dudak ve Oral kavite Primer tümör gruplandırması ⁶⁴	24
Tablo 2-3: Farenks primer tümör gruplandırması ⁶⁴	25
Tablo 2-4: Larenks primer tümör gruplandırması ⁶⁴	26
Tablo 2-5: Nazal kavite ve paranasal sinüsler primer tümör gruplandırması ⁶⁴	27
Tablo 2-6: Majör tükrük bezleri primer tümör gruplandırması ⁶⁴	27
Tablo 2-7: Baş boyun kanserinde anatomik evre ve prognostik grupları ⁶⁴	28
Tablo 2-8: Nazofarenks kanseri anatomik evre ve prognostik grupları ⁶⁴	28
Tablo 3-1: Kalıp RNA ve primer karışım içeriği (1 reaksiyon için)	46
Tablo 3-2: cDNA işlemi için kullanılan ısı-süre tablosu	46
Tablo 3-3: Kullanılan Taqman SNP ve genotipleme PZT karışımları	47
Tablo 3-4: PZT koşulları.....	48
Tablo 3-6: Elisa standart dilüsyon oranları.....	51
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik parametreler	53
Tablo 4-2 : Hasta ve sağlıklı dokuda RASSF4 gen anlatımı kat değişimi	54
Tablo 4-3: Hasta ve sağlıklı kontrollerde RASSF4 RS7896801 genotip ve allel dağılımlarının gösterilmesi	54
Tablo 4-4: Hasta ve sağlıklı kontrollerde RASSF4 RS884879 genotip ve allel dağılımlarının gösterilmesi	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Baş boyun kanser bölgeleri	20
Şekil 2-2: Baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarda genomik karsinogenez modelleri ⁵¹	21
Şekil 2-3: Baş ve boyun bölgesinde insan papilloma virüsünün neden olduğu karsinogenez kavramı ⁵¹	22
Şekil 2-4: Ras (H-, K-, N-Ras), Ras proteinlerinin alan yapısı ⁶⁷	29
Şekil 2-5: Ras (H-, K-, N-Ras), Ras sinyal yolunun şematik gösterimi ⁶⁷	30
Şekil 2-6: RASSF ailesi ⁶⁷	32
Şekil 2-7: RASSF gen ailesi fonksiyon şeması	37
Şekil 2-8: N-terminal RASSF proteinleri ve kanser gelişimi arasındaki olası bağlantı ²²	39
Şekil 3-1: 7896801 için dRn ve döngü linear örnek görüntüsü	49
Şekil 3-2: RS7896801 için örnek allel dağılımları	49
Şekil 3-3: RS884879 için dRn ve döngü linear örnek görüntüsü	50
Şekil 3-4: RS884879 için örnek allel dağılımları	50
Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda RASSF4 RS7896801 genotip dağılımlarına göre RASSF4 serum düzeylerinin gösterilmesi	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AJCC: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Ortak Komitesi)

ALL: Akut Lenfositik Lösemi

ARF6: Adenozin Difosfat Ribosilasyon Faktörü 6

C12ORF12: Chromosome 12 Open Reading Frame 12

CDKN1A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

cDNA: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)

CNA: Circulating Nucleic Acids

C-RASSF: Klasik RASSF

CRP: C-Reaktif Protein

Ct: Cycle threshold

CXCR4: C-X-C kemokin reseptörü tip 4

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate (Deoksiribonükleotit Trifosfat)

EBV: Epstein-Barr virüsü

EGFR: Estimated Glomerular Filtration Rate (Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı)

EMT: Epitel-Mezenkimal Transmisyonu

GDP: Guanozin Difosfat

GPCR: G-Protein-Coupled Receptors (G-protein bağlı reseptörler)

GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein2 (Büyüme Faktör Reseptörüne Bağlı Protein2)

GTP: Guanozin Trifosfat

GTPaz: Guanozin Trifosfataz

HCV: Hepatit C Virüsü

HDAC6: Histon Deasetilaz 6

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2)

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Baş Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom)

HPV: Human Papillomavirus (İnsan Papillomavirüs)

IARC: International Agency For Research On Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)

JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz)

MMP9: Matrix Metallopeptidase 9

MOAP1: Modulator of Apoptosis 1

MRNA: Mesenger RNA(Mesajcı RNA)

NF1: Nörofibromatozis Tip 1

NFE2L2: Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2

NM: Nanometre

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri)

OD: Optik Dansite

PDGFRA: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha (Trombosit Türetilmiş Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa)

PI(4,5)P2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat)

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (Fosfoinositid-3 Kinaz)

PIWIL1: Piwi-like protein 1 (Piwi benzeri protein 1)

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

RA: Ras birleşme alanı

RAS GEF: RAS Guanine Nucleotide Exchange Factor (Guanin Nükleotid Değişim Faktörü)

RASSF: Ras-Association Domain Family

RB: Retinoblastoma Protein

RNA: Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)

RNAZ: Ribonükleaz

RRNA: Ribozomal RNA

RT-QPZR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SARAH: Salvador-RASSF-hippo Alanı

TNM: Tumor-Node-Metastasis (Tümör-Nod-Metastaz)

TRNA: Transfer Ribonucleic Acid (Taşıyıcı RNA)

UICC: Union for International Cancer Control (Uluslararası Kanser Savaş Örgütü)

UV: Ultraviyole

YAP1: Yes Associated Protein 1

ÖZET

Karagedik E.H (2019) Baş Boyun Kanserli Hastalarda Rassf4 Geninin İncelenmesi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Baş boyun kanserleri ağız boşluğu, burun, farenks, larenks, tükürük bezlerinde başlayan bir grup kanserdir. Ras, intristik GTP bağlanma ve GTPaz özelliklerine sahip bir proteindir. Hem büyüme arttırıcı hemde büyüme inhibe edici yolları aktive etme yeteneğine sahiptir. RASSF ailesi RAS onkogeninin büyümesini engelleyici özellikler gösterir. 10 proteinden oluşan RASSF ailesi tümör baskılayıcı olarak görev alır ve tümör alt gruplarında promotör bölgesinin hipermetilasyonu ile inaktivite edilirler. Hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, hücre göçü ve mitoz kontrolünde görev aldıkları tahmin edilmektedir. Apoptoz ve hücre siklusunun durmasında ve birçok kanserde azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda baş boyun kanseri tanısı konmuş 69 hastanın tümör dokuları ve sağlıklı dokuları arasındaki RASSF4 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Çalışmamızda ayrıca 69 baş boyun kanserli hasta ve 70 sağlıklı bireyden alınan DNA örnekleri ile RS7896801 ve RS884879 gen varyantlarının saptanması için Real-time PZR tekniği kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda RS7896801 için hasta grupta G allel taşıma sıklığı 2,4 kat artmıştır ($p=0,015$, $\chi^2=5,95$, OR: 2,4, %95 güven aralığı=1,18-5,26). AA genotipi taşıma sıklığı ise kontrol grubunda istatistiksel olarak artmıştır ($p=0,015$, $\chi^2=5,95$, OR: 1,8, %95 güven aralığı=1,10-3,18). RS884879 genotip ve allel dağılımları incelendiğinde sağlıklı grupta CC genotipi taşıma sıklığı hasta grubuna göre 2,2 kat artmıştır ($p=0,048$, $\chi^2=3,92$, OR: 2,2, %95 güven aralığı=0,97-5,05). Hasta grubunda ise T allel taşıma sıklığının anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,048$, $\chi^2=3,92$, OR: 2,5, %95 güven aralığı=0,98-6,74). RASSF4 serum düzeyi çalışma gruplarında ELISA tekniği ile tayin edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. ($p>0,05$).

Çalışmamız Türkiyede baş boyun kanseri hastalarında RASSF4 geninin gen ekspresyon seviyeleri, serum düzeyleri, RS7896801 ve RS884879 gen varyantları arasındaki ilişkiyi araştıran ilk araştırma olma niteliğindedir. Elde edilen bu ilk verilerin RASSF4 proteini için yapılacak ileri çalışmalara öncülük edeceği inancını taşımaktayız.

Anahtar Kelimeler: Baş boyun kanseri, RASSF4, Gen ekspresyonu, Polimorfizm, Elisa

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29262

ABSTRACT

Karagedik, E.H. (2019). Investigation of Rassf4 Gene in Head and Neck Cancer Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. PhD thesis. İstanbul. (2019).

Head and neck cancers are classified as group cancers that initiates in tissues of oral cavity, nose, pharynx, larynx and salivary glands. RAS is a protein that shows intrinsic GTP binding and GTPase. It has the ability to activate the pathways controlling acceleration and inhibition of growth. RASSF gene family can inhibit the growth of RAS oncogene. The family consists of 10 proteins that act as a tumour suppressor and inactivated by the hypermethylation of promoter area in tumour subgroups. It is estimated that this gene family has a role in cell cycle control, apoptosis, cell migration and mitosis control. A decrease in the gene expression was reported when apoptosis and cell cycle comes to a halt along with the occurrence of cancer. This study evaluated RASSF4 gene expression levels in healthy and diseased tissues dissected from the patients (n=69) diagnosed with head neck cancer. No statistical difference was observed ($P>0,05$). DNA samples taken from 69 diseased and 70 healthy subjects was evaluated to determine areas of RS7896801 and RS884879 gene variants. Results for RS7896801 revealed a x2.4 increase of G-allele presence in diseased group ($p=0,015$). For control, the increase in presence of AA genotype was statistically significant ($p=0,015$). Distribution of genotype and alleles for RS884879 showed an increase of x2,2 in CC genotype for healthy group ($p=0,048$) whereas in diseased group, the presence of T allele showed a significant increase ($p=0,048$). Serum levels of diseased (n=69) and control (n=70) group was tested by using ELISA technique. No statistically significant differences was observed between the study groups ($p>0,05$).

Our study reveals the first data about the RASSF4 gene expression levels, serum levels and areas of RS7896801 and RS884879 gene variants in head and neck cancers. We believe that this study will play a pioneering role for the next studies on RASSF4 gene.

Key Words: Head and Neck Cancer, RASSF4, Gene Expression, Polymorphism, ELISA

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 29262

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Baş boyun kanserleri ağız boşluğu, gırtlak, farenks, tükürük bezleri ve burun boşluğunu içeren kapsamlı tanı ve tedavi gerektiren karmaşık bir hastalıktır.¹ Amerika Birleşik Devletlerindeki tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır.² Tüm yeni kanser vakalarının erkeklerde %5'i kadınlarda ise %2'sini meydana getirmektedir.³ Alkol ve tütün kullanımı baş boyun kanserinin en önemli iki faktörüdür. Bu kanser türünün en az %75'i tütün ve alkol kullanımından kaynaklanmaktadır.⁴ Baş boyun bölgesinde bulunan skuamöz yüzey epiteli tabakası İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu için uygun bir ortam sağlamaktadır.⁵ HPV kadınlarda görülen serviks kanserinin %95 oranında sebeplerinden biridir. Baş boyun kanserinde de en önemli risk faktörlerinden biri olarak sayılmaktadır.⁶

Virüslere dönüştürülmüş hücrelerde Rat sarcoma tümöründen izole edilmiş bir retrovirus RAS süper ailesinin ilk genini meydana getirmiştir.^{7,8} Kirsten sarkom virüsü (K-ras) ve Harvey's sarkom virüsü (H-ras) çeşitli kanser hücrelerinde onkogen olarak bulunur.⁹ Üçüncü bir RAS ailesi üyesi (N-ras) lösemi ve nöroblastom hücre hatlarında DNA aracılı gen transferi ile izole edilmiştir.¹⁰ Tüm süper ailenin ortak özelliği GTP bağlanma bölgesi içermesidir.¹¹ Ras Proteinleri intristik GTP bağlanma ve GTPaz özelliklerine sahip 21kDa proteinleridir.¹²

RAS, hem büyüme arttırıcı hem de büyümeyi inhibe edici yolları aktive etme kabiliyetine sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.¹³⁻¹⁵ Bu zıt etkinlikler, RAS gibi güçlü onkogenlerin aktivasyonunun potansiyel bir tümör hücresinde biyolojik süreçleri kontrol edebileceğini göstermektedir. RASSF ailesinin keşfedilmesi RAS'ın büyümesini engelleyici etkilerin bazılarının açıklanmasına izin vermektedir.¹⁶

Ras association domain family "RASSF" ras ve ras benzeri küçük bir GTPaz efektör ailesi olarak on proteinden oluşur.¹⁷ RASSF proteinleri RA (Ras birleşme) ve SARAH (Salvador-RASSF-hippo) alanları içerirler ve RA alanının bağlanma yeri RASSF proteinlerinin C- veya N-terminal olarak sınıflandırılmasını sağlar.¹⁸

RASSF proteinleri tümör baskılayıcı olarak görev alırlar ve tümör alt gruplarında promotör bölgesinin hipermetilasyonu ile inaktive edilirler. Hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, hücre göçü ve mitoz kontrolünde görev aldıkları tahmin

edilmektedir.¹⁹⁻²¹ RASSF ailesi üyesi 1-6 proteinleri C-terminal bölgesinde drosophila proteinlerine benzer bir sekans içeren Salvador/RASSF/Hippo (SARAH) adı verilen bir motif bulundurur. RASSF 7-10 bu motiften yoksundur.²² SARAH alanının varlığı RASSF 1-6'yı RASSF 7-10'dan ayırır. RA alanı RASSF 1-6'da C-Terminal bölgesine RASSF 7-10'da N-Terminal bölgesine yakındır. Bu nedenle RASS1-6 C-RASSF "klasik RASSF", RASSF7-10 N-RASSF proteinleri olarak adlandırılır.²³

RASSF4, çeşitli insan dokularında eksprese edilir. C- terminal RASSF grubunda yer alan RASSF4 SARAH alanına sahiptir.²⁴ RASSF4'ün ekspresyonu, insan tümör hücrelerinin büyümesini inhibe eder. Bu etki RASSF4'ün COOH terminusuna bir RAS CAAX membran lokalizasyon sinyalinin eklenmesiyle arttırılır.¹⁶ RASSF4 apoptozda ve hücre siklusunun durmasında rol oynadığı ve sıklıkla birçok kanserde azaldığı gösterilmiştir.^{16,25}

Literatüre baktığımızda RASSF4 ile yapılmış çalışmalar genellikle metilasyon veya delesyonların neden olduğu epigenetik inaktivasyon çalışmalarıdır. Azalan RASSF4 mRNA ekspresyonu ve RASSF4'ün hipermetillenmiş promotor bölgesi, baş boyun skuamöz hücreli karsinom ve nazofarengeal karsinomda bulunmuştur.^{26,27} RASSF4'ün hücre invazyonu üzerindeki rolü incelendiğinde, RASSF4'ün akciğer kanseri hücre dizilerinin invazyon yeteneğini inhibe ettiği tespit edilmiştir. RASSF4 restorasyonu, birçok kanser türünde invazyonun önemli araçları olan MMP2 ve MMP9 seviyelerini düşürmüştür.²⁸⁻³¹ Yapılan birçok çalışmada RASSF4 nazofarengeal baş boyun kanserinde sık sık susturulduğu gösterilmiştir.³²⁻³⁴

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; baş boyun kanserinde RASSF4 geninin etkilerinin gen anlatımı, RS7896801 ve RS884879 SNP tayinleri ve serum RASSF4 düzeyinin belirlenmesi ve klinik ve prognostik parametreler birlikte incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Epidemiyolojisi

Bulaşıcı olmayan hastalıklar dünyadaki ölümlerin büyük bir kısmından sorumludur.³⁵ 21. Yüzyılda dünyanın her ülkesinde kanser tek başına önde gelen neden olarak sıralanmaktadır. Dünya Sağlık örgütünün tahminlerine göre 2015 yılında kanser en önemli ikinci ölüm nedenidir.

Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla büyümektedir. Ana risk faktörlerinin dağılımı yaşlanma, nüfusun büyümesi ve sosyoekonomik gelişim ile ilişkili olduğu görülmektedir.^{36,37} Dünya genelinde nüfusun ve yaşlanmanın artması kanserin önde gelen ölüm nedeni olarak öne çıkmasını bir çok ülkede kansere göre inme ve koroner kalp hastalığının mortalite oranlarındaki belirgin düşüşleri kısmen yansıtmaktadır.³⁸ Dünya çapında yapılan kanser araştırmalarında insidans ve mortalite oranları Globocan 2018 projesi ile birlikte uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) tarafından raporlanmıştır. Rapora göre dünya genelinde 2018 yılına 18.1 milyon yeni vaka ve 9.6 milyon kanser ölümü tahmin edilmektedir. Dünyada en sık görülen kanser türü olarak akciğer kanseri ilk sıradadır. Cinsiyete bağlı olarak kadınlarda meme kanseri erkeklerde de prostat kanseri akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır.³⁸

Baş boyun kanserleri Amerika Birleşik Devletlerindeki tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır.² Baş boyun kanserleri 50 yaş üstü insanlarda gençlere göre daha sık teşhis edilir. Araştırmacılar 65.000'den fazla insana 2017 yılında baş boyun kanseri teşhisi konulacağını tahmin etmektedir.³⁹

Birleşik krallık kanser araştırma topluluğu verilerine göre Larenks kanseri görülme oranı tüm yeni kanser vakalarının erkeklerde 4. Sırada %5'i. Kadınlarda ise 13. Sırada %2 oranında görülmektedir. Baş boyun kanseri vakalarının %70'i erkek %30'u kadındır. 2013-2015 yılları arasında Baş boyun kanseri vakalarının %22'si 75 yaş ve üzeri kişilerde oluşmuştur.³

2.1.1. Baş Boyun Kanseri

Baş boyun kanserleri ağız boşluğu, gırtlak, farenks, tükürük bezleri ve burun boşluğunu içeren kapsamlı tanı ve tedavi gerektiren karmaşık bir hastalıktır.¹

2.1.1.1. Baş Boyun Kanseri Bölgeleri

Ağız boşluğu: Dudaklar, diş etleri, yanak ve dudakların iç kısımları dilin altında ağız tabanını, sert damak (ağzın üstünde bulunan kemikli yapı), dilin üçte ikisini içeren bölgedir.⁴⁰

Farenks “boğaz”: Burnun arkasından başlayarak özofagusa giden 5 inç uzunluğunda bulunan içi boş bir tüptür. 3 bölümden oluşur.

Nazofarinks: Farenksin üst kısmı burnun arkasıdır.

Orofarinks: Farenksin orta kısmı, yumuşak damak, ağzın arkası, dilin tabanı ve bademcikler “tonsil” den oluşur.

Hipofarenks: Farenksin alt kısmıdır. Orofarinksi, larenksin dışına inferior şekilde özofagusla birleştiren tüptür. Hipofarenksin üç alt alt bölgesi vardır: pirif fossa, postkricoid alanı, arka faringeal duvar.⁴⁰

Larinks: Ses kutusu veya ses telleri olarak da adlandırılan gırtlak, boyundaki farenksin hemen altında kıkırdak tarafından oluşturulan kısa bir geçittir. Temel olarak larinks; tiroid, krikoid, epiglotik ve aritenoid kıkırdakları ve hyoid kemiğinden oluşur. Tiroid kıkırdak larenksin yumuşak dokularını destekler. Epiglotik kıkırdak laringeal giriş yolunun ön duvarını oluşturur ve dil tabanına posterior olarak uzanır ve yutma sırasında gırtlak üzerinde aşağıya doğru katlandığından, gırtlak açıklığının aspirasyondan korunmasına yardımcı olur.

Larinksin üç ana bölümü vardır:

Supraglottis: epiglotun ucundan gırtlak ventrikülüne uzanan gırtlak kısmıdır. Epiglot, aritenoid kıkırdak, sahte vokal kıvrımlar ve ventriküllerden oluşur.

Glottis: Ses tellerinin yerleştiği yaklaşık 5-7 mm uzanan gırtlak orta kısmıdır.

Subglottis: İnferiorglottis'ten krikoid kıkırdaktaki alt kenara uzanan gırtlak alt kısmıdır.⁴⁰

Paranasal sinüsler ve burun boşluğu: Burun boşluğu nazal alandan önden arkaya doğru uzanan hava geçiş yolunu oluşturan yapıdır. Nazal septum tarafından ikiye bölünür. Her iki tarafta, maksiller sinüslerle çevrilidir ve önden arkaya doğru ön, etmoid ve sfenoid sinüslerle örtülmüştür. Paranasal sinüsler burun çevresindeki kemiklerde içi boş, hava dolu boşluklardır. İnsanlarda 4 adet çiftleşmiş sinüs vardır.

Maksiller sinüsler: Maksiller kemiklerinde gözlerin altında bulunan paranasal sinüslerin en büyüğüdür.

Frontal sinüsler: Frontal kemik içinden gözlerden daha yukarı alnın içine doğru bulunan sinüslerdir.

Etmoid sinüsler: Etmoid kemik içindeki burun ve göz arasında birkaç ayrı hava hücresinden oluşur.

Sfenoid sinüsler: Sfenoid kemiğin içinde bulunur.

Paranasal sinüsler kafatasının nispi ağırlığını azaltmak, sesin rezonansını artırmak, yüz travmasına karşı tampon sağlanması, hassas yapıların burundaki hızlı sıcaklık dalgalanmalarından yalıtılması, havalandırma nemlendirmesi ve ısıtılması, immünolojik savunma gibi farklı görevleri vardır.⁴¹

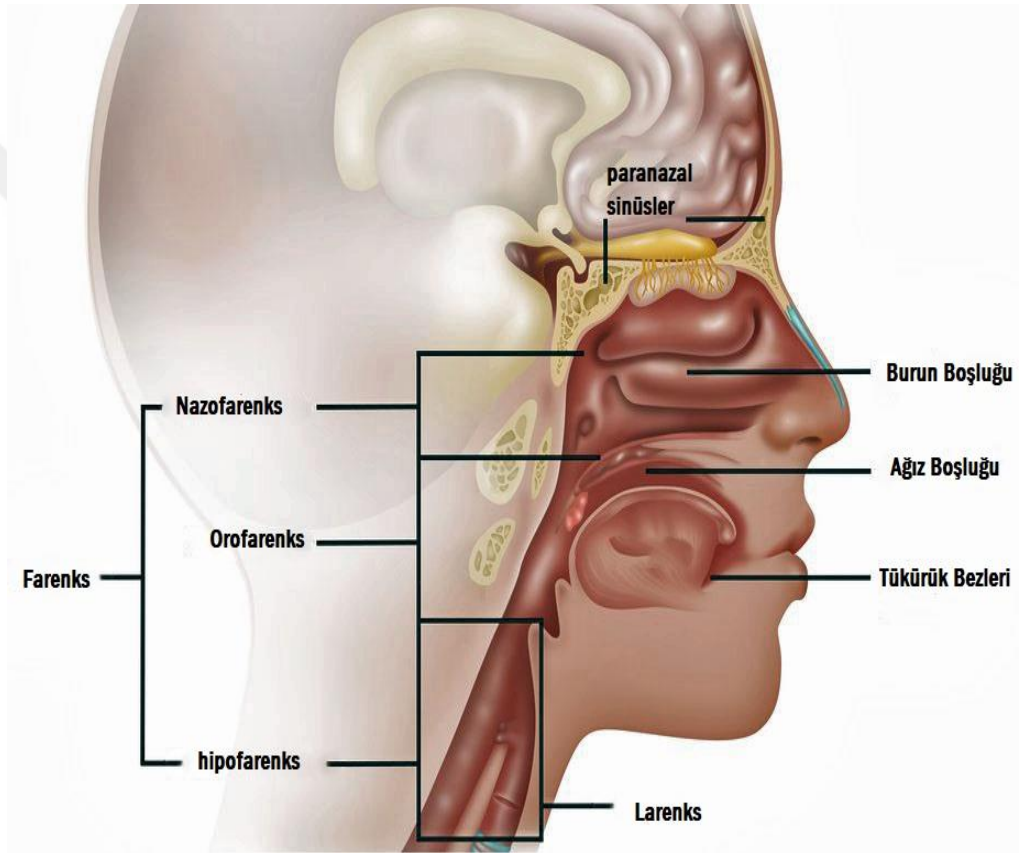
Tükürük bezleri: Tükürük bezleri parotis, submandibular ve dil altı bezleri ile ağız boşluğunun labiyal, bukkal, palatal ve lingual yüzeyleri üzerine dağılmış minör bezlerle birlikte bulunur. Lezzet için gerekli olan sulu ortamı sağlar, nişasta sindirimi başlatan ve antimikrobiyaller immünoglobulin A ve lizozimi salgılayan amilaz salgılar.⁴²

3 çift ana tükürük bezi vardır:

Parotid bezleri: Parotid, üç tükürük bezinin en büyüğüdür. Bu bezlerden salgılanan tükürük; Çiğnemeyi, yutmayı, konuşmayı, ve sindirime yardımcı olan ağız nemlendirir. Parotid bez yanak lateral yüzeyinde her bir kulağın önünde ve altında bulunur. Her parotid bezi yüzeyel bir lobdan ve arka fasyal ven ve fasyal sinirden ayrılan derin bir lobdan oluşur.⁴³

Sublingual bezleri: Üç ana tükürük bezinin en küçüğüdür. Dil altı tükürük bezi olarakta adlandırılır. Dilin altından ağız mukozasının tabanında ve mylohyoid kasın üzerinde uzanır. ⁴⁴

Submandibular bezler: Bu bezler çene kemiğinin altında bulunur. Submandibuler üçgen alanında bulunan bu bezler mandibula gövdesinin altında bulunan önemli bir anatomik dönüm noktasıdır. Üç ana tükürük bezinin parotid bezden sonra en büyük ikinci tükürük bezidir. ⁴⁵

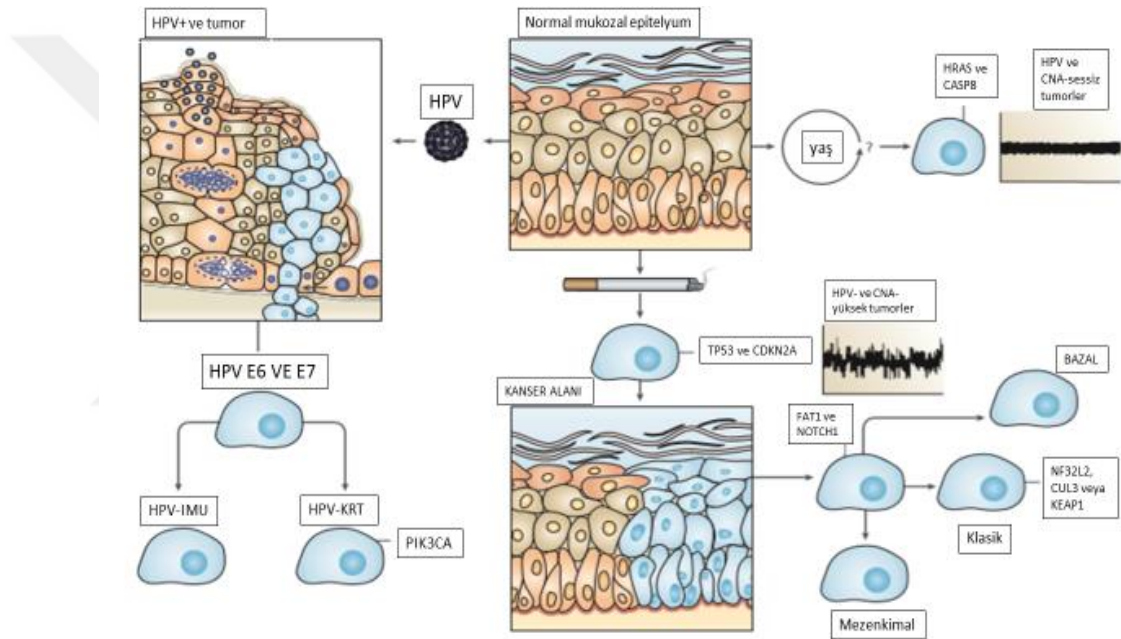


Şekil 2-1: Baş boyun kanser bölgeleri

Baş boyun kanserlerini Hipofarengeal Kanser, Laringeal Kanser, Dudak ve Ağız Boşluğu Kanseri, Metastatik Skuamöz Boyun Kanseri, Nazofarengeal Kanser, Orofaringeal Kanser, Paranasal Sinüs ve Burun Boşluğu Kanseri, Tükürük Bezi Kanseri oluşturmaktadır. ⁴⁶

2.1.1.2. Risk Faktörleri

Alkol ve tütün kullanımı baş boyun kanserlerinin en önemli iki faktörüdür. Baş boyun kanserlerinin en az %75'i tütün ve alkol kullanımından kaynaklanmaktadır.⁴ Hem tütün hem de alkol kullanan kişilerde bulunan risk sadece alkol veya tütün kullananlardan daha fazladır.⁴⁷ İnsan papilloma virüs tipleri (HPV) özellikle tip 16 ile enfeksiyon bademcikleri ve dil tabanını içeren orofarengeal kanserler için risk faktörüdür.⁴⁸ Kötü ağız hijyeni ve eksik dişler ağız boşluğu kanserleri için risk faktörüdür.⁴⁹

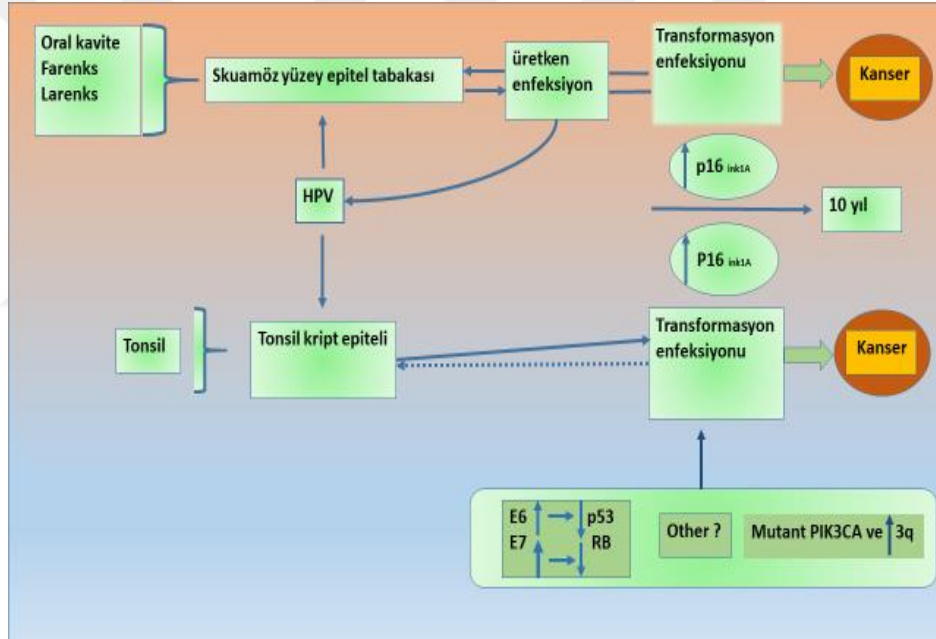


Şekil 2-2: Baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarda genomik karsinogenez modelleri

51

Baş ve boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinomlarda (HNSCC'ler) arasındaki temel ayrım üç genetik alt grubun varlığındadır. Transkripsiyonel olarak insan papilloma virüsü HPV+ içeren tümörler, HPV- negatif olan ve çok sayıda kopya sayısına sahip tümörler (CNA-yüksek) ve HPV negatif ancak CNA sessiz olan tümörler. Oral skuamöz epitelde HPV enfeksiyonu çoğunlukla üretken enfeksiyonlara neden olurken özellikle spesifik orofaringeal kript hücrelerinde HPV-KRT (HPV-keratinosit farklılaşması ve oksidatif redüksiyon işlemi) veya HPV-IMU ile sonuçlanan onkojenik bir olaya neden olabilir. (HPV-immün yanıt ve mezenkimal hücre farklılaşması tümörleri)⁵² Hücre döngüsü kontrolünde kilit bir

rol oynayan p53 ve RB yolları CNA-sessiz tümörlerde aktif kalmaları dışında, HPV+ tümörlerinde sıklıkla ortadan kaldırılmaktadır. Birçok kanser yolunun HPV+ ve CNA yüksek tümörlerin ilerlemesinde rol oynadığı görülmektedir. WNT- β -katenin yolunda etki edebilen FAT1 ve NOTCH1, sigara kullanımında bilinen bir risk faktörüdür. Klasik, bazal ve mezenkimal olarak ifade edilen ekspresyon profiline dayanarak en az üç tümör grubu tanımlanabilir, Klasik HPV ve CNA yüksek alt grubu, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NFE2L2) yolu mutasyonları ile karakterizedir. HPV ve tümörleri tipik olarak lökoplakias şeklinde ortaya çıkabilen mukozal prekürsör değişikliklerinden gelişir. Bu hücreler mutasyon birikimi ile kanserleşme eğilimi göstermektedirler.⁵²⁻⁵⁵



Şekil 2-3: Baş ve boyun bölgesinde insan papilloma virüsünün neden olduğu karsinojeniz kavramı⁵¹

Baş boyun bölgesindeki skuamöz yüzey epiteli İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu için uygun bir ortam sağlamaktadır. Orofarenks, ağız boşluğuna göre daha yüksek risk oranına sahiptir. Rahim ağzında olduğu gibi HPV'nin transforme edici bir enfeksiyona dönüşme eğiliminin düşük olduğu varsayılmaktadır. HPV enfeksiyonu tonsiller kript epitel hücrelerinin enfeksiyon olasılığını arttırmaktadır. Bu hücreler normal viral yaşam döngüsünü desteklememektedir ancak dönüştürücü bir hpv

enfeksiyonuna karşı oldukça hassastırlar. Dönüştürücü enfeksiyonlar, çoğalan hücrelerde düzensiz HPV E6 ve E7 onkoprotein ekspresyonu ile karakterize edilir. E7 ve E6, sırasıyla RB ve p53'ü inaktive eder. Birlikte, bu özellikler hücre döngüsü düzenlemesinin bozulmasına ve p53 aracılı apoptotik yanıtların inhibe edilmesine, ölümsüzleşmeye neden olan ve kansere doğru ilerlemek için gerekli olan epigenetik ve genetik değişikliklerin birikmesine neden olur.⁵ Bir başka yolak ise PI3K yolunun onkojenik aktivasyonunu içerir. Rahim ağzı kanseri gelişimine benzer şekilde, HPV'ye bağlı baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun (HNSCC) transformasyonlu bir enfeksiyondan gelişmesi 10 yıldan fazla sürebilir.

Ahşap tozuna mesleki olarak maruz kalmak nazofarengeal kanser için risk faktörüdür.⁵⁶ Asbest ve sentetik liflere maruz kalma gırtlak kanseri ile ilişkilendirilmiştir.⁵⁷ İnşaat, metal, tekstil, seramik ve gıda endüstrisinde belirli işlerde çalışan insanlar, gırtlak kanseri riskini arttırmış olarak değerlendirilmektedir.⁵⁸ Ahşap, nikel tozu veya formaldehite endüstriyel olarak maruz kalmak paranazal sinüsler ve burun boşluğu kanserleri için bir risk faktörüdür.⁵⁹ Belirli bir süre radyasyona maruz kalmak baş boyun bölgesinde tükürük bezlerinin kanseri için risk faktörüdür.^{60,61} Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu bir herpes virüsü türüdür. Dünyadaki insanların %90'ından fazlasını etkileyen en yaygın virüslerden biridir. EBV ile enfeksiyon genellikle çocukluk dönemlerinde başlar ve hafif semptomlar ile geçerir. EBV yaşam boyunca vücutta kalır ancak herhangi bir belirti göstermez. EBV uzun süreli enfeksiyonlar, nazofarenks kanser ve tükürük bezi kanserleri için risk faktörüdür.^{62,63}

2.1.1.3. Baş boyun Kanseri Evreleme

Baş boyun kanserlerinde tedavi planının yapılabilmesi ve hastalığın takibinin sağlanabilmesi için evreleme çok önemlidir. Evreleme için “American Joint Committee on Cancer (AJCC)” ve “The International Union for Cancer Control (UICC)” tarafından geliştirilen tümör nod-metastaz (TNM) sistemi kullanılmaktadır. Bu sisteme göre, birincil tümör T; birincil tümörün boyutu veya çevreye devamlılık gösteren uzanımının durumunu belirtir. Bölgesel lenf nodu tutulumu N, bölgesel lenf nodlarındaki kanserin durumunu, varlığı veya yokluğu ile tanımlanır. Uzak metastaz M ise genel olarak kanserin vasküler kanallar ile yayılabileceği lokalizasyonlar veya bölgesel olarak tanımlanan lenf nodlarından daha uzaktaki lenf nodlarında uzak yayılım veya metastazın varlığı veya yokluğu ile tanımlanır. Baş boyun kanserinin TNM sistemine

göre sınıflandırılması baş boyun bölgesinin anatomik bölgelerine göre dudak ve oral kavite, farenks, larenks, nazal kavite ve paranasal sinüsler, majör tükürük bezleri olarak gösterilmektedir.⁶⁴

Tablo 2-1: Baş boyun kanserinde bölgesel lenf nodları ve uzak metastaz gruplandırması⁶⁴

	Bölgesel lenf nodları (N)
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 3 cm olan tek lenf nodu metastazı
N2	Aynı tarafta en büyük boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı veya aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı veya iki taraflı ya da karşı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı
N2a	Aynı tarafta en büyük boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı
N2b	Aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı
N2c	İki taraflı ya da karşı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı
N3	En büyük boyutu > 6 cm olan lenf nodu metastaz(lar)ı
	Uzak Metastaz (M)
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
	Nazofarenks için Bölgesel Lenf Nodları (N)
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı tarafta supraklaviküler bölgenin üstünde en büyük boyutu ≤ 6 cm servikal lenf nodları ve/veya tek taraflı/bilateral ≤ 6 cm retrofarenjeal lenf nodları
N2	Bilateral supraklaviküler bölgenin üstünde en büyük boyutu ≤ 6 cm servikal lenf nodları
N3	En büyük boyutu > 6 cm ve/veya supraklaviküler bölge tutulumu
N3A	En büyük boyutu > 6 cm
N3B	Supraklaviküler bölge tutulumu

Tablo 2-2: Dudak ve Oral kavite Primer tümör gruplandırması⁶⁴

	Dudak ve Oral Kavite Primer Tümör (T)
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	En büyük boyutu 2 cm veya daha küçük tümör
T2	En büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4 cm'den küçük tümör

T3	En büyük boyutu 4 cm'den büyük tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık (Dudak) Tümör kortikal kemik, inferior alveolar sinir, ağız tabanı ve çene veya burun derisine invaze (Oral Kavite) tümör sadece çevre dokulara (kortikal kemik [mandibula veya maksilla], derin [ekstrinsik] ve dil kaslarına [genioglossus, hyoglossus, palatoglossus ve styloglossus], maksiller sinüs ve yüz derisine) invaze
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör mastikatör boşluk, pterigoid düzlemlere veya kafa tabanına invaze ve/veya internal karotit arteri sarmış

Tablo 2-3: Farenks primer tümör gruplandırması⁶⁴

	FARENKS PRİMER TÜMÖR (T)
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
	NAZOFARENKS
T1	Nazofarenkse sınırlı veya parafarenjeal uzanımı olmadan orofarenks ve/veya nazal kaviteye uzanan tümör
T2	Parafarenjeal uzanımlı tümör
T3	Kafatabanının kemik yapılarını ve/veya paranasal sinüsleri tutan tümör
T4	İntrakraniyal uzanımı olan ve/veya kraniyal sinir, hipofarenks, orbita tutulumu olan veya infratemporal/mastikatör boşluğa uzanımı olan tümör
	OROFARENKS
T1	En büyük boyutu 2 cm veya daha küçük tümör
T2	En büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4 cm'den küçük tümör
T3	En büyük boyutu 4 cm'den büyük ya da epiglotun lingual yüzeyine uzanımı olan tümör
T4A	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tümör larenks, dilin ekstrinsik kasları, mediyal pterigoid, sert damak ve mandibulaya invaze
T4B	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör lateral pterigoid kas, pterigoid düzlem, lateral nazofarenks veya kafa tabanına invaze ya da karotid arteri sarmış
	HİPOFARENKS
T1	Hipofarenksin bir alt bölgesine sınırlı ve/veya en büyük boyutu 2 cm veya daha küçük tümör
T2	Hipofarenksin birden fazla alt bölgesine veya çevre dokuya invaze ya da hemilarenks fiksasyonu olmadan en büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4 cm'den küçük tümör
T3	En büyük boyutu 4 cm'den büyük veya hemilarenks fiksasyonu olan veya özofagusu uzanımı olan tümör
T4A	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tümör tiroid/krikoid kartilaj, hiyoid kemik, tiroid bez veya yumuşak dokunun santral bölümüne invaze
T4B	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral fasyaya invaze veya karotid arteri sarmış veya mediastinal yapıları tutmuş

Tablo 2-4: Larenks primer tümör gruplandırması⁶⁴

	LARENKS PRİMER TÜMÖR (T)
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
TiS	Karsinoma in situ
	SUPRAGLOTTİS
T1	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte supraglottisin bir kesimine sınırlı tümör
T2	Larenks fiksasyonu olmadan supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottise ya da supraglottis dışında bir bölgeye (Dil kökü, valleküla, piriform sinüsün mediyal duvar mukozası, vb) invaze tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya postkrikoid alanın, preepiglotik boşluk, paraglotik boşluktan herhangi birine ve/veya tiroid kıkırdağın iç korteksine invaze tümör
T4A	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özofagus vb) invaze tümör
T4B	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
	GLOTTİS
T1	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte vokal kord(lar)a sınırlı (anterior veya posterior komissürü tutabilir) tümör
T1a	Bir vokal korda sınırlı tümör
T1b	Her iki vokal kordu tutmuş tümör
T2	Supraglottis ve/veya subglottise uzanan tümör ve/veya vokal kord hareketlerinde bozukluk
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluğa invaze ve/veya tiroid kartilajın iç korteksine invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilajın dış korteksine ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özofagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
	SUBGLOTTİS
T1	Subglottise sınırlı tümör
T2	Tümör vokal korda uzanıyor ve vokal kord hareketleri normal ya da bozulmuş
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Krikoid veya tiroid kartilaja ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özofagus vb) invaze tümör

T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
------------	---

Tablo 2-5: Nazal kavite ve paranasal sinüsler primer tümör gruplandırması⁶⁴

	NAZAL KAVİTE VE PARANAZAL SİNÜSLER PRİMER TÜMÖR (T)
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
Tis	Karsinoma in situ
	MAKSİLLER SİNÜS
T1	Tümör maksiller sinüs mukozası ile sınırlı kemikte erozyon veya destrüksiyon yok
T2	Tümör sert damak ve/veya orta nazal meatusa yayılımı içeren maksiller sinüsün arka duvarına ve pterigoid levhalara yayılımı dışında kemik erozyonuna veya destrüksiyonuna neden olmuş
T3	Tümör, maksiller sinüsün arka duvar kemiği, subkutan dokular, orbitanın mediyal duvarı veya tabanı, pterigoid fossa, etmoid sinüslerden herhangi birine invaze
T4A	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tümör anterior orbital içeriği, yanak derisini, pterigoid plakaları, infratemporal fossayı, kribriiform plakayı, sfenoid veya frontal sinüsleri invaze etmiş
T4B	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör, orbita apeksi, dura, beyin, orta kranial fossa, trigeminal sinirin (V2) maksiller bölümü dışındaki kranial sinirler, nazofarinks veya klivustan herhangi birine invaze
	NAZAL KAVİTE VE ETMOİD SİNÜS
T1	Tümör herhangi bir alt bölge ile sınırlı, kemik invazyonu var veya yok
T2	Tümör tek bölgedeki iki alt bölgeyi invaze etmiş veya nazoetmoidal kompleks içinde bir komşu bölgeye yayılmış, kemik invazyonu var veya yok
T3	Tümör orbitanın mediyal duvarına veya tabanına, maksiller sinüse, damağa veya kribriiform plakaya yayılmış
T4A	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tümör, anterior orbita içeriği, burun veya yanak derisi, anterior kranial fossaya minimal yayılım, pterigoid plakalar, sfenoid veya frontal sinüslere invaze
T4B	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör, orbita apeksi, dura, beyin, orta kranial fossa, trigeminal sinir (V2) dışındaki kranial sinirler, nazofarinks veya klivusa invaze

Tablo 2-6: Majör tükrük bezleri primer tümör gruplandırması⁶⁴

	MAJÖR TÜKRÜK BEZLERİ PRİMER TÜMÖR (T)
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulgusu yok
T1	Parankim dışı uzanımı olmayan en büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan tümör
T2	Parankim dışı uzanımı olmayan en büyük çapı 2 cm'den büyük 4 cm'den küçük tümör

T3	En büyük çapı 4 cm'den büyük ve/veya parankim dışı uzanımı olan tümör
T4A	Orta düzeyde ileri hastalık Tümör deri, mandibula, kulak kanalı ve/veya fasiyal siniri tutmuş
T4B	Çok ileri hastalık Tümör kafa tabanını ve/veya pterigoid planı tutmuş ve/veya karotis arteri kaplamış

Tablo 2-7: Baş boyun kanserinde anatomik evre ve prognostik grupları⁶⁴

ANATOMİK EVRE/PROGNOSTİK GRUPLAR BAŞ BOYUN KANSERİ*			
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N0	M0
EVRE 2	T2	N0	M0
EVRE 3	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
EVRE 4A	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
EVRE 4B	Herhangi T	N3	M0
	T4b	Herhangi N	M0
EVRE 4C	Herhangi T	Herhangi N	M1

*Nazofarenks kanserlerinin bölgesel lenf noduna yayılım şekli ve prognoz üzerindeki etkisi diğer diğer baş boyun kanserlerinden farklıdır. Bu nedenle farklı bir N sınıflandırması kullanılır.

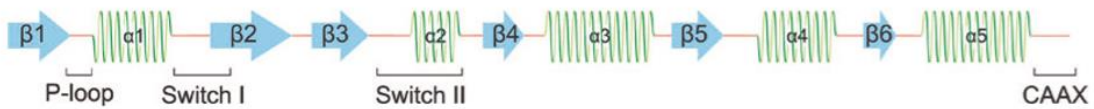
Tablo 2-8: Nazofarenks kanseri anatomik evre ve prognastik grupları⁶⁴

ANATOMİK EVRE/PROGNOSTİK GRUPLAR NAZOFARENKS			
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N0	M0
EVRE2	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
EVRE 3	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE 4A	T4	N0	M0

	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
EVRE4B	HERHANGİ T	N3	M0
EVRE 4C	HERHANGİ T	HERHANGİ N	M1

2.2. Ras Proteinleri ve Ras Yolağı

Virüslere dönüştürülmüş hücrelerde viral genlerin translasyonu ilk kez 1970lerin başında Green ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir.⁷ Rat sarkoma tümöründen izole edilmiş bir retrovirüs, Ras süper ailesinin ilk genini meydana getirmiştir.⁸ Bu tespitle birlikte viral genler tarafından kodlanan ve guanin nükleotidi bağlama özelliklerine sahip 21kDa proteinin Kirsten ve Harvey sarkom virüsüyle enfekte olmuş hücrelerde transformasyonu sürdürmek için gerekli olduğu keşfedilmiştir.⁶⁵ Dönüştürülmüş proteinler normal insan, sıçan, fare genom dizileri ve onları kodlayan genlere çok yüksek derecede benzerlik gösterir. Kirsten sarkom virüsü (K-ras) ve Harvey's sarkom virüsü (H-ras) çeşitli kanser hücrelerinde onkogen olarak bulunur.⁹ Aktive edici nokta mutasyonları içeren üçüncü bir RAS ailesi üyesi (N-ras) lösemi ve nöroblastom hücre hatlarında Hall ve arkadaşları tarafından DNA aracılı gen transferi ile izole edilmiştir.¹⁰ İnsan genomunda 12p12 K-RAS, 11p15 H-RAS, 1p22 N-RAS kromozom bölgelerinde bulunur. Bu üç gen çok benzer proteinler kodlar ancak genlerin intronlarının değişken uzunlukları ekspresyon seviyelerinde farklılık gösterir. Tüm süper ailenin ortak özelliği GTP bağlanma bölgesi içermesidir.¹¹ Ras Proteinleri intristik GTP bağlanma ve GTPaz özelliklerine sahip 21kDa proteinleridir.¹² Ras proteininin üç boyutlu yapısı 1990 yılında yayınlanmıştır. Protein yapısı Ras ve GTP arasında yüksek afinitiyi sağlar ve bağlı bulunan GTP'nin g-fosfatını stabilize ederek etki gösterir.⁶⁶

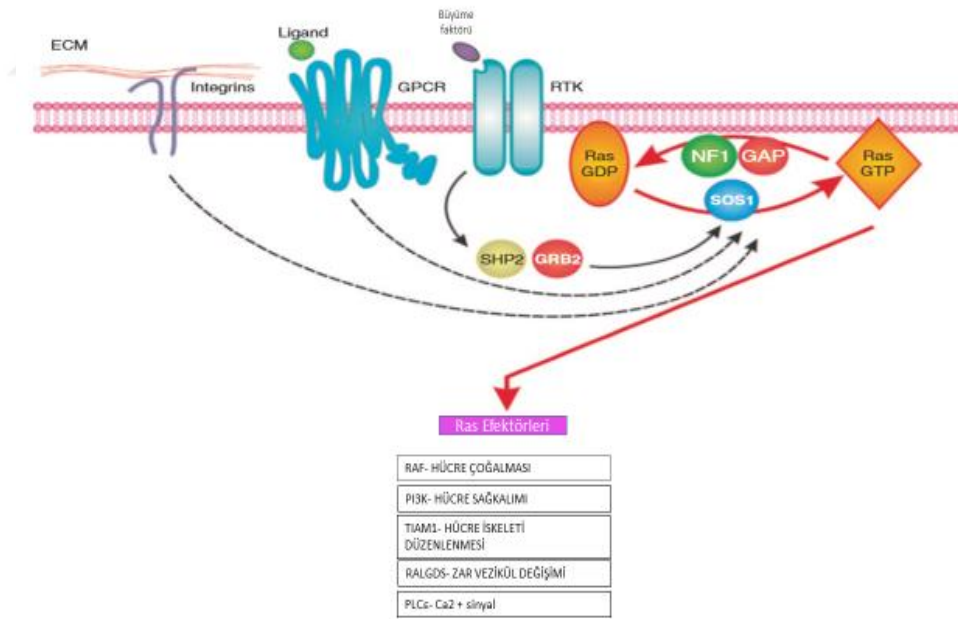


Şekil 2-4: Ras (H-, K-, N-Ras), Ras proteinlerinin alan yapısı⁶⁷

A-helisleri A1-A6, b-tabakasını oluşturan altı şerit ise B1-B6 olarak gösterilmiştir. B1 ve A1 arasındaki P-döngüsü, proteinin onkojenik versiyonlarında GTP'nin g-fosfatını stabilize eder ve sıklıkla mutasyona uğramış bir bölgedir. Switch 1

ve Switch 2 bölgeleri, protein-protein etkileşimleri için önemlidir ve CAAX bölgesi, bir post-translasyonel modifikasyonun hedefidir.

GTP bağlı durumda Ras proteinleri aktif bir konformasyondadır ve Ras efektör proteinleri ile yüksek afinite etkileşimine katılabilir. Ras proteinlerinin kendine özgü GTPase aktiviteleri vardır. Bu proteinler sadece zayıf bir şekilde birleştiği GTP'nin GDP'ye hidrolizini sağlar. GDP molekülü serbest kalır ve Ras proteini aktif olmayan bir duruma gelir. Bu olaya **GTPaz döngüsü** de denir. Bu durum Ras GTPaz aktive edici proteinler (Ras GAP'ler) ve Ras guanin nükleotid değişim faktörleri (Ras GEF'ler) ile sağlanmaktadır. Ras GAP proteinleri Ras'ın GTPaz aktivitesini artırır. Bu durumda Ras aktif halinden pasif duruma geçer. Ras GEF proteinleri aktif olmayan RAS-GDP yi bağlar ve Ras'ın aktivasyonunu tetikleyerek GDP-GTP değişimini sağlar. RasGEF'ler birçok protein-protein etkileşim alanı içerir. Kanserde Ras proteinlerinin mutant formları sıklıkla bulunur ve bu formlar GTP için zayıflatılmış affinite gösterir. Mutant formlar efektör proteinlerde sinyal etkileşimini sağlayan aktif bir konformasyona sahiptir.⁶⁸



Şekil 2-5: Ras (H-, K-, N-Ras), Ras sinyal yolunun şematik gösterimi⁶⁷

Büyüme faktörünün reseptör tirozin kinazlara bağlanması, bir Ras GEF olan SOS1'i aktive eden GRB2 ve SHP2 gibi proteinleri aktive eder. GPCR ve integrin sinyalleri de dolaylı olarak Ras'ı aktive edebilir. NF1 ve diğer GAP'ler sırayla aktif Ras'ı

bağlar ve Ras sinyallemesini durdurarak GDP'ye bağlı aktif olmayan forma dönüşümünü katalize eder.

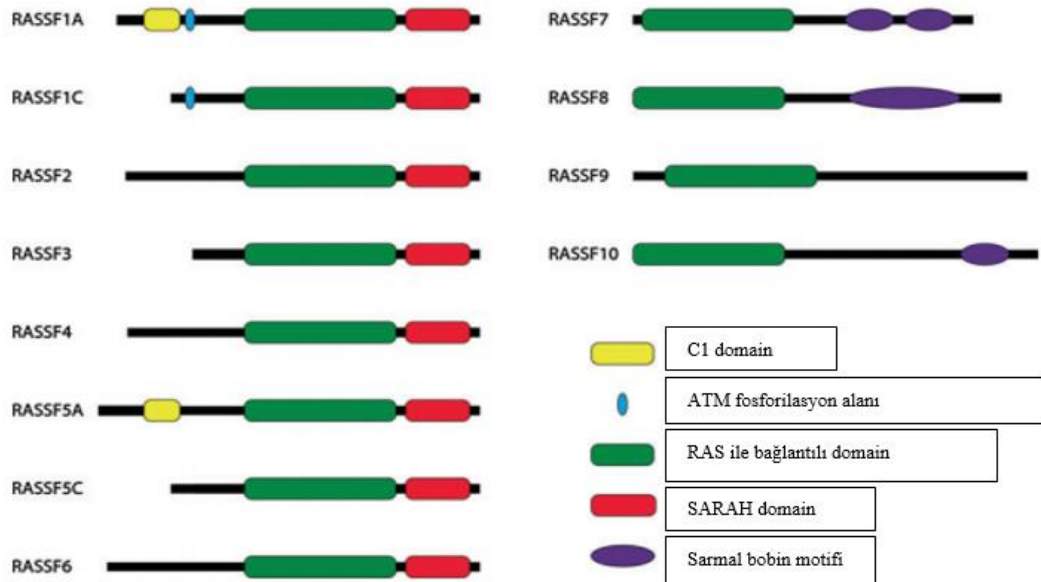
Ras çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenir. Ras'ın palmitolasyonu C-terminal bölgesinde hücre zarı ile ilişkisini kolaylaştırır.⁶⁹ C-terminal bölgesinde bulunan CAAX motifi farnesil transferaz ile prenilasyon reaksiyonunun hedefinde bulunur ve bu durumu AAX sekansının bölünmesi izler. C-terminalinde sitozin kalıntıları birikir. Bu sitozin kalıntıları karboksi metillenir ve ras proteininin hücre zarına güvenli bir şekilde bağlanmasını sağlar.⁷⁰ Ras'ın aynı zamanda Golgi aparatına da yerleşebileceği ve orada da aktif olabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkmıştır.⁷¹ Üç Ras proteini N-Ras, K-Ras, H-Ras ilk üç ekzonu oldukça benzer olmasına rağmen dördüncü ekzonda farklılıklar mevcuttur ve K-Ras diğer iki Ras proteininden ayrılır. H-Ras ve N-Ras sitozin kalıntıları içerir ve bunlar palmitotile edilir. K-Ras bu sisteinlerden yoksundur. Bu özellik K-Ras'ın zara getirilme şeklini değiştirir ve farnesiltransferaz inhibitörleri ile inhibisyona karşı daha dirençli hale getirir. K-ras'ın farnesiltransferazın yokluğunda guranil transferaz enzimi tarafından ters çevrilerek modifiye edilebilmesi ve proteinin plazma zarına lokalizasyonunu sağlar.⁷¹ Ras proteinleri tirozin kinaz reseptörleri, integrinlerden ve G protein bağlantılı reseptörlerden gelen sinyaller ile aktiveleştirilebilir. Aktif Ras proteini Map kinaz sinyal yolağında, PI3 kinaz sinyal yolağında ve birçok sinyal yolağında görev alır.⁶⁷

RAS onkoproteinlerin çok yönlü işlevselliği RAS onkoproteinlerinin geniş bir heterolog efektör protein grubuyla etkileşime girme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. Bu efektör proteinler genellikle RA alanı içerir. RAS onkoproteinin aktif formları büyüme kontrolü kaybı ve tümörjenik transformasyon ile ilişkilidir. RAS ve diğer onkogenlerin hem büyüme artırıcı hem de büyümeyi inhibe edici yolları aktive etme kabiliyetine sahip olduğu yapılan çalışmalarla daha da belirgin hale gelmiştir.¹³⁻¹⁵ Bu zıt etkinlikler, RAS gibi güçlü onkogenlerin aktivasyonunun potansiyel bir tümör hücresinde biyolojik süreçleri kontrol edebileceğini göstermektedir. RASSF ailesinin keşfedilmesi RAS'ın büyümesini engelleyici etkilerin bazılarının açıklanmasına izin vermektedir.¹⁶

2.2.1. RASSF Ailesi

Ras association domain family “RASSF” ras ve ras benzeri küçük bir GTPaz efektör ailesidir. İnsan patolojisindeki rolleri nedeniyle genişleyen ve ilgi gören on

proteinden oluşur.¹⁷ RASSF aile üyesi proteinler RA (Ras birleşme) ve SARAH (Salvador-RASSF-hippo) alanları içerirler ve RA alanının bağlanma yeri RASSF proteinlerinin C- veya N-terminal olarak sınıflandırılmasını sağlar.¹⁸ RASSF proteinleri tümör baskılayıcı olarak görev alırlar. Tümör alt gruplarında promotör bölgesinin hipermetilasyonu ile inaktive edilirler. Proteinlerinin etki mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır ancak hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, hücre göçü ve mitoz kontrolünde görev aldıkları tahmin edilmektedir.¹⁹⁻²¹ RASSF proteinleri bilinen herhangi bir enzimatik aktiviteden yoksundur ve büyük olasılıkla daha büyük multiprotein kompleksleri için adaptör proteinleri veya iskeletleri olarak işlev görür. Bu amaçla RASSF proteinleri birçok karakteristik alan taşır. C-terminali veya klasik RASSF proteinleri olarak adlandırılan ilk altı RASSF proteini, hem C-terminal RAS birleşme (RA) etki alanına hem de bir Salvador-RASSF-Hippo (SARAH) etki alanına sahiptir. N-terminali RASSF proteinleri olarak adlandırılan RASSF 7-10, RA domenine sahiptir fakat bir SARAH domenine sahip değildir. RA etki alanlarının çeşitli RAS GTPazları ile etkileşime girdiği düşünülürken, RASSF1-6'nın C-terminal SARAH alanlarının, proapoptotik kinazlar ailesi de dahil olmak üzere diğer SARAH alanı içeren proteinler arasında dimerizasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir.⁷² RASSF proteinlerinin çoğunun, tümör baskılanmasında rol oynadığı belirlenmiştir.⁷³



Şekil 2-6: RASSF ailesi⁶⁷

Şekil 2-6 da RASSF ailesi üyeleri 1-10 gösterilmektedir. (C1 domeni) sarı renkte, RAS-bağlanma (RA) alanı yeşil renkte, Salvador / RASSF / hippo (SARAH) domeni kırmızı renkte ve sarmal-bobin motifi mor renkte gösterilmektedir. RASSF1A ve RASSF1C'deki konsensüs dizileri ATM fosforilasyonu için açık mavi renkle gösterilmiştir. RASSF1-6, C-terminal RA alanlarından dolayı gruplandırılmıştır RASSF7-10 N-terminal RA alanlarına göre gruplandırılmış (Şekil 2-6).

2.2.1.1. C-RASSF

RASSF ailesi 1-6, C-terminal bölgesinde drosophila proteinlerine benzer bir sekans içeren Salvador/RASSF/Hippo(SARAH) bir motif bulundurur. RASSF 7-10 bu motiftan yoksundur.²² SARAH alanının varlığı RASSF 1-6'yı RASSF 7-10'dan ayırır. RA alanı RASSF 1-6'da C-Terminal bölgesine RASSF 7-10'da N-Terminal bölgesine yakındır. Bu nedenle RASSF 1-6 C-RASSF “klasik RASSF”, RASSF7-10 N-RASSF proteinleri olarak adlandırılır.²³

2.2.1.1.1 RASSF1

İnsan kromozomu 3p21.3 bölgesi sıklıkla kanserde heterozigotluk kaybı sergiler ve bu durum bir tümör baskılayıcının bu bölgede kodlandığı anlamına gelir. Xeroderma pigmentosum A (XPA) ile etkileşime giren proteinleri belirlemeye yönelik araştırmalar, bu bölgede RASSF1 olarak bildirilen bir gen ortaya çıkartmıştır.²¹ Diferansiyel promotör kullanımı, sekiz izoformu (A-H) oluşturur. RASSF1A, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H metilasyonunun promotör bölgesini kapsar ve insan kanserlerinde en yaygın olaylardan biri olduğu gösterilmiştir.^{74 1975} . İzoformlar A ve C, genin ana transkriptleridir ve her yerde bulunurlar.²³ B izoformu esas olarak hematopoetik hücrelerde eksprese edilir. D ve E sırasıyla kardiyak ve pankreas dokusunda bulunur.⁷⁴

RASSF1A 340 aminoasitten meydana gelen bir proteindir. Transkripsiyon ekson 1a ve ardından ekson 2ab ile başlar. Bu eksonlar, RASSF1A'da 51-101 amino asitlerini kodlayan protein kinaz C korunmuş bölgesi (C1) olarak da adlandırılan bir diasilgliserol / forbol ester alanı (DAG) için kodlar.⁷⁶ Ras birleşme alanı RA veya RalGDS / AF-6 alanı, ekson 4 ve 5 tarafından kodlanır ve bu, RASSF1A'nın 194-288 aralığını oluşturur. Bu yapı Raf1 kinazın RasGTP bağlanma alanı ile aynıdır.⁷⁷ RASSF1A'nın COOH terminusundaki son 47 amino asit, SARAH bölgesinin bir parçasıdır. SARAH alanı, protein-protein etkileşimlerine aracılık eder.⁷⁸

RASSF1A üzerine yapılmış olan birçok çalışmada supresyonunun, insan kanserlerinde tümör progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Çok yönlü mekanizmalar RASSF1A aracılı tümör baskılanmasına katkıda bulunur. Bunlar arasında, mikrotübül stabilizasyonu en belirgin mekanizmalardan biridir ve RASSF1A'ya özgüdür.⁷⁹⁻⁸² Aktif KRAS, RASSF1A ile apoptozu indüklemektedir.⁸³ RASSF1A, mitoz ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Mikrotübül stabilitesini etkilediği ve HDAC6 (histon deasetilaz 6) aktivitesini inhibe ederek stabilizeyi arttırdığı belirtilmiştir.⁸⁴ RASSF1A kanser metastazı ile ilişkilendirilmiştir.⁸⁵ RASSF1A, RAF1 ve MST2'nin kompleksini ayrıştırır, RAF1'in inhibe edici fosforilasyonunu azaltır ve MEK aktivitelerini artırır. Bu gözlem, RASSF1A'ın Ras sinyalleşmesinin bir değiştiricisi olarak işlev gördüğünü göstermektedir.⁸⁶ Ubiquitin'e özgü proteaz 7, DAAX ve MDM2 bir kompleks oluşturur ve p53 degradasyonunu artırır.⁸⁷ DNA hasarı üzerine, RASSF1A kompleksi bozar ve p53 ifadesini artırır.⁸⁸

RASSF1B transkripti RASSF1A ile aynı promotörden kopyalanır. RASSF1B özellikle hematopoetik hücrelerde eksprese edilir.⁸⁹ RASSF1C, RASSF1 geninin her yerde bulunan ikinci izoformudur. RASSF1C promoter hipermetilasyon göstermez ve bugüne kadar analiz edilen akciğer, meme, pediatrik ve pankreas endokrin tümörlerinde ve kanser hücre dizilerinde eksprese edilir.⁸⁹⁻⁹³ RASSF1C' nin aktif Ras ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aktif KRas'a bağlanmanın RASSF1C' nin apoptotik yol aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü sağladığı bildirilmiştir.⁹⁴ Over kanseri hücrelerinde, RASSF1C' nin hücreleri sisplatin tedavisine duyarlı hale getirdiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur.⁹⁵ RASSF1C osteoblastlarda ve akciğer kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını ve meme kanseri hücre hatlarında migrasyonu arttırmıştır.^{96,97} RASSF1C' nin meme kanseri hücre dizilerindeki C-X-C kemokin reseptörü tip 4 (CXCR4) up regülasyonuna yol açar, bu da hücre çoğalmasını ve metastazı artırır.⁹⁷ RASSF1C' nin, akciğer kanserinde kök hücre yenileme geni Piwi benzeri protein 1 (PIWIL1) ekspresyonunu modüle ettiği öne sürülmüştür.⁹⁸ Pankreas endokrin tümörleri, büyük hücreli nöroendokrin karsinomları, küçük hücreli akciğer karsinomları ve özofagus skuamöz hücreli karsinomu gibi çeşitli kanserlerde RASSF1C up regülasyonunu gösterilmiştir.^{91,99-101}

RASSF1D ve RASSF1E izoformlarının her ikisi de, özellikle kardiyak ve pankreas dokusunda spesifik olarak ifade edilen RASSF1A ek varyantları olarak kabul edilir.⁷³

2.2.1.1.2 RASSF2 – RASFADİN

İnsan Kromozom bölgesi 20p13 te bulunan RASSF2 ilk olarak Rasfadin olarak adlandırıldı daha sonra yeni bir gen olarak tanımlandı.¹⁰² RASSF2'nin zorla ekspresyonu hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olur. RASSF2' nin delesyonu akciğer kanseri hücrelerinde tümör oluşumunu ve ilaç direncini artırır. Çeşitli kanserlerde hipermetilasyon yoluyla RASSF2 susturma bildirilmiştir.^{23,103,104} Kansere bağlı fibroblastlar, RASSF2 ekspresyonunu baskılayan miR-7'yi üretir.¹⁰⁵ Bu veriler, RASSF2' nin bir tümör baskılayıcı olduğunu gösterir. Ras proteinlerinin hedefi olarak RASSF2 Aktif KRAS, RASSF2 ve PAR-4 arasındaki etkileşimi artırır. RASSF2 KRAS'ın bir hedefidir. Meme, akciğer, kolorektal ve mide kanserinde normal mukozanın metillenmemiş olduğu tespit edildiğinden tümör durumunun spesifik bir belirteci olarak düşünülmektedir.^{103,106} RASSF2' nin nazofarenks karsinomunda lenf nodu ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁰⁷

2.2.1.1.3 RASSF3

12q14.1'de bulunan RASSF3 geni ekzonların alternatif birleşiminden dolayı üç transkript ürettiği tahmin edilmektedir (RASSF3A, RASSF3B ve RASSF3C).¹⁰⁸ RASSF3, RASSF1A' nın homologue olarak bildirilmiştir.¹⁰⁸ RASSF3 İşlevleri RASSF3'ün bir tümör baskılayıcı olarak etki edebileceğine dair göstergeler olmasına rağmen, bugüne kadar hiçbir sistematik fonksiyonel karakterizasyon yapılmamıştır ve tümör baskılayıcı rolünü destekleyen mekanizmalar hala eksiktir. Son zamanlarda, RASSF3'ün p53'ü stabilize ettiği ve p53'e bağlı apoptozu indüklediği, böylece hem hücre döngüsü hem de DNA onarım mekanizmalarında bir rol oynadığı bildirilmiştir.¹⁰⁹ Bu verilerle uyumlu olarak, HER2 / Neu pozitif meme kanseri hücre hatlarında RASSF3 aşırı ekspresyonu hem fare hem de insan hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve NSCLC hücrelerinde RASSF3 göç oranını arttırdığı böylece RASSF3'ün bir tümör supresör geni oluşturduğu hipotezi pekiştirilmiştir.^{110,111} RASSF3 proteini hem kanser hücrelerinde hem de normal hücrelerde bulunmuştur.¹⁰⁸

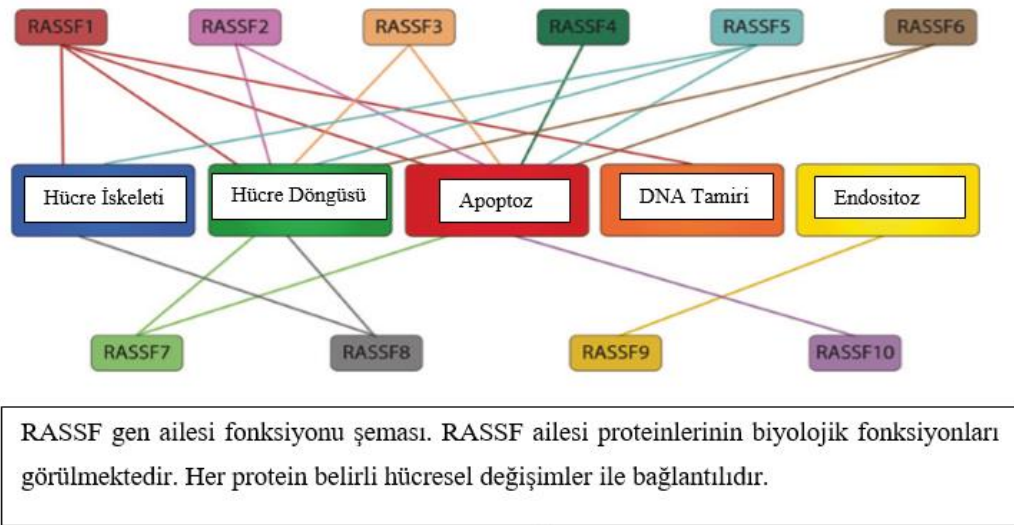
2.2.1.1.4 RASSF4-AD037

RASSF4, AD037 geni, 10q11.21 kromozomunda bulunur. 5 transkriptin protein kodlaması olduğu alternatif eklemekten kaynaklanan 12 transkript varyantına sahiptir. RASSF4 yaklaşık %60 benzerlik göstererek RASSF2'ye en yakın homoloji taşır. RASSF4, RASSF1A ve RASSF5'te bulunan sistein bakımından zengin alandan yoksundur. Ayrıca RASSF1A'da bulunan ATM fosforilasyon bölgesinde RASSF4'te bulunmaz.¹¹² RASSF4, diğer aile üyelerinde olduğu gibi COOH terminalinde SARAH motifi içerir.²⁴ RASSF4, KRas efektör proteinini ve diğer Ras ailesi üyelerini GTP'ye bağlı bir şekilde birleşme alanı vasıtasıyla bağlayan potansiyel bir tümör baskılayıcısıdır.¹⁶ Bu durum RASSF4'ün bir RAS efektör olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Aktive edilmiş Kras'ın büyüme önleyici özelliklerini uyarmak için RASSF4'ü bağladığı ve aktive ettiği tespit edilmiştir.²⁴

RASSF4, çeşitli insan dokularında eksprese edilir. RASSF4'ün ekspresyonu, insan tümör hücrelerinin büyümesini inhibe eder. Bu etki RASSF4'ün COOH terminusuna bir RAS CAAX membran lokalizasyon sinyalinin eklenmesiyle artırılır. RASSF4 primer tümörlerde aşağı regüle edilir. RASSF4 ifadesinin aşağı regülasyonu promotörün metilasyonu ile ilişkilidir.¹⁶ RASSF4 apoptozda ve hücre siklusunun durmasında rol oynadığı ve sıklıkla birçok kanserde azaldığı gösterilmiştir.^{16,25} Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, nazofarenks karsinomu ve multiple miyelomda RASSF4 baskılanması gözlenmiştir.^{25,26,113} RASSF4 aşırı ekspresyonu apoptozu indükler ve HEK293 hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder.¹⁶ RASSF4 osteosarkom hücrelerinde β -katenin, MYC ve CCND1 ekspresyonunu azaltır.¹¹⁴ RASSF4, alveoler rabdomiyosarkomda (aRMS) düzenlenir, burada YAP1'i aktive eder ve tümörijenizi teşvik eder.¹¹⁵ Araştırmacılar RASSF4'ün MST1'i inhibe ettiğini ve YAP1'in fosforilasyonunu baskıladığını açıklamıştır. MST kinazlar ve bazı C-RASSF proteinleri bazal koşullar altında birbirlerini inhibe eder. Bu karşılıklı inhibisyon, apoptozdan kaçınmak için anlamlıdır. Hücreler DNA hasarı gibi streslere maruz kaldıklarında, MST kinazları ve C-RASSF inhibisyonundan serbest bırakılır, paralel bir şekilde apoptoza aracılık ederler.¹¹⁵ Yapılan bir araştırmada, RASSF4 ekspresyon yapısını MCF-7 hücreleri gibi RASSF4 negatif tümör hücrelerine transfekte ederek RASSF4 ekspresyonunu geri yüklediğinde büyümenin güçlü bir inhibisyonu olduğu belirlenmiştir. Böylece, RASSF4 transforme hücrelerin büyümesini antagone edebilmektedir.¹⁶

RASSF4, GDP'ye bağılı adenosin difosfat ribosilasyon faktörü 6 (ARF6) formuyla etkileşime girer ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PI (4,5) P2) seviyelerini arttırmak için tip I fosfatidilinositol fosfat kinazı aktive eder.¹¹⁶ Buna cevaben, endoplazmik retikulum (ER) Ca²⁺ sensör stromal etkileşim molekülü 1, ER-plazma zarı birleşiminde biriktirilir ve depoda çalışan Ca²⁺ girişi tetiklenir. RASSF4, fosfoinositid metabolizmaları ve Ca²⁺ sinyalleşmesi ile tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır.¹¹⁶ RASSF4'ün, insan oral skuamöz hücreli karsinomunda MAPK yolağının baskılanmasıyla büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir.¹¹⁷ Aşırı ekspresyonu osteosarkom hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, invazyon, epitel-mezenkimal transmisyonu (EMT) ve Wnt sinyalini inhibe eder.¹¹⁴

RASSF4'ün gen lokusu (10p11.21) primer prostat tümörlerinde heterozigotite kaybı bölgesi olduğu bulunmuştur.¹¹⁸ Primer prostat tümörlerinde yapılan çalışmalarda RASSF1A promotor metilasyonu gösterdiği tespit edilmiştir.¹¹⁹ Tümörjenez sırasında RASSF4 ekspresyon kaybı diğer RASSF aile üyelerinde olduğu gibi RASSF4'ün insan tümörlerinin oluşumunda önemli bir rol oynadığı anlamına gelmektedir.



Şekil 2-7: RASSF gen ailesi fonksiyon şeması

2.2.1.1.5 RASSF5-NORE1, RAPL, Maxp1

Tanımlanan ilk C-RASSF proteini RASSF5' tir.¹²⁰ 1q32.1 kromozomu üzerinde bulunur ve dört transkript varyantına (RASSF5A-D) sahiptir. RASSF5 yüksek affinite ile Ras proteinlerine bağlanma özelliğine sahiptir bu nedenle kolayca tespit edilmiştir.

^{121,122} RASSF5A'nın hücre iskeleti etkileşimlerinin, RASSF5'in hücre döngüsü inhibe edici rollerine negatif ERK sinyali yoluyla aracılık ettiği tespit edilmiştir. ¹²³ RASSF5A'nın, apoptotik bir şekilde tümör hücre çizgisi büyümesini Ras ve MST 1 / 2' den bağımsız bir şekilde sınırladığı gösterilmiştir. ¹²⁴⁻¹²⁶ RASSF5A, spesifik olarak hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu tarafından hedeflenen ve inhibe edilen antiviral aktivite gösterir. ¹²⁷ RASSF5C'nin RASSF1A gibi, tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olduğu ve çeşitli tümörlerde epigenetik olarak susturulduğu gösterilmiştir. ^{128,129} Hücre polaritesini ve lenfosit adezyonunu indüklemek için MST1'in aktivitesini ve lokalizasyonunu düzenler. ¹³⁰ RASSF5C mikrotüplere yerleşir. ¹³¹

RASSF5 çeşitli tümörlerde aşağı doğru regüle edildiği bulunmuştur ve kanıtlanmış bir tümör baskılayıcıdır. ¹⁰⁸⁻¹²⁶ Diğer RASSF ailesi üyeleri gibi, RASSF5'in epigenetik inaktivasyonu, nöroblastom, tiroid, akciğer, kolorektal ve böbrek kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde rapor edilmiştir. ^{126,129,132-135} Oral kanserlerde miR-214 RASSF5' i baskılar. RASSF5A'nın p53 kaynaklı apoptoz ve senesens dengesini düzenlemede önemli bir eleman olduğu belirlenmiştir. ¹³⁶

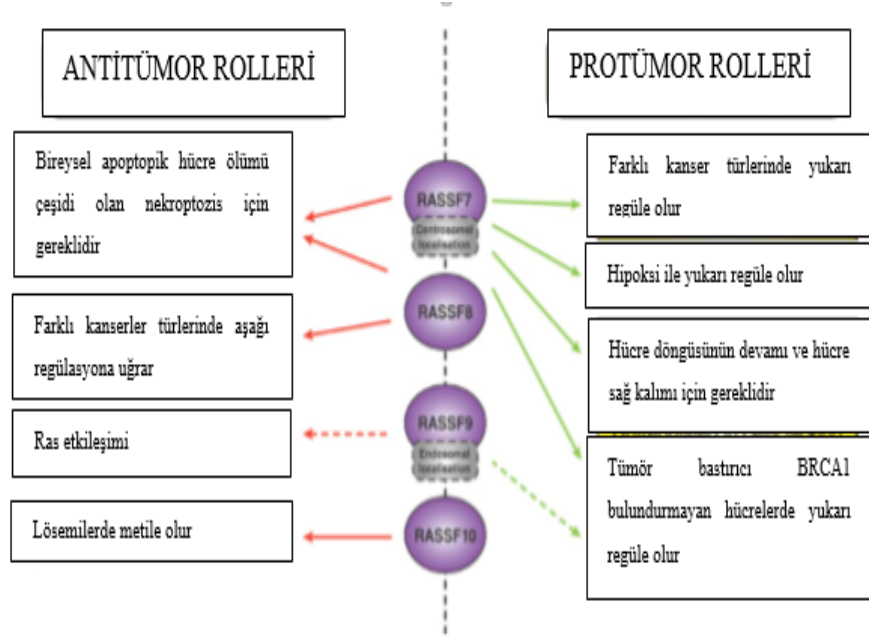
2.2.1.1.6 RASSF6

RASSF6 geni 4q13.3 kromozomunda bulunur. Bilinen 5 splice varyanta sahiptir. Diğer RASSF proteinlerden farklı olarak C-terminal bölgesinde PDZ-bağlanma motifi içerir. ¹³⁷ RASSF6, yüksek oranda apoptotik bir proteindir. RASSF6, kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptoza neden olur. ¹³⁸ RASSF6, BAAP'ı MOAP1 yoluyla aktive eder ve sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör ve mitokondriden endonükleaz G'nin salınmasını sağlar. ¹³⁸⁻¹⁴⁰ RASSF6, MDM2 ile etkileşime girer ve p53'ün MDM2 aracılı bozulmasını bloke eder. ¹⁴¹ KRAS, RASSF6 ve MDM2 arasındaki etkileşimi artırır. ¹⁴² RASSF6, NFκB ve MAPK sinyalini inhibe eder ve JNK aracılığıyla CDKN1A birikimini artırır. ^{139,143} RASSF6 ekspresyonu kanser hücrelerinde ve primer tümörlerde sıklıkla prognostik değere sahip olduğu ve epigenetik olarak susturulduğu belirtilmiştir. ^{135,144-146} Mide kanserinde miR-181a-5p, RASSF6'yı baskılar. ¹⁴⁷

2.2.1.2. N-RASSF

RASSF proteinlerin her birinde bulunan RA bölgesinin C-Terminalinde RASSF (1-6) veya N-terminalinde bulunan RASSF (7-10) bulunmasıyla karakterizedir. ¹⁴⁸ Bu alan, klasik RASSF ailesi üyelerinin çoğunun, farklı RAS üyeleri için değişen bir afinite

ve özgüllük derecesine rağmen, RAS bağlanması mümkün kılar. Klasik RASSF üyeleri ayrıca bir C-terminal SARAH alanına (SALVADOR-RASSF-HIPPO) sahiptir.¹⁴⁹ SARAH alanı N-terminal üyelerinde mevcut değildir. Klasik ve N-terminali RASSF alt grupları arasındaki yapısal farklılıklar, iki farklı aile olma önerisine yol açmıştır.²² RASSF 7, 8 ve 10 genlerinin tümü genomdaki Ras ailesinin üyelerine yakın yerleştirilmiştir.¹⁵⁰¹⁵¹¹⁵²



Şekil 2-8: N-terminal RASSF proteinleri ve kanser gelişimi arasındaki olası bağlantı²²

2.2.1.2.1 RASSF7

RASSF7 geni, 11p15.5 kromozomu üzerinde bulunur ve 3 transkript varyanta sahiptir.¹⁴⁸ RASSF7 epidermis, nöral tüp, kulak, böbrek gibi embriyonik dokular gelişirken ifade edilir.¹⁵³ RASSF7' nin özellikle akciğer ve beyindeki ekspresyonu diğer dokulara göre daha fazladır.¹⁵⁴ RASSF7 hücre büyümesi ve apoptozun düzenlenmesinde rol alır.¹⁴⁸ RASSF7 proteini insan vertebral disk dejenerasyonunda gelişimsel olarak önemli olabilecek bir rol olan proapoptotik JNK sinyalini olumsuz yönde düzenleyen N-RAS ve MKK7 ile etkileşime girerek antiapoptotik bir rol üstlenir.^{155,156} Pankreas duktal adenokarsinomları, pankreatik adacık hücresi tümörleri, endometrial karsinomlar dahil olmak üzere birçok kanseri düzenlediği belirlenmiştir.

¹⁵⁷⁻¹⁶¹ Malign tiroid neoplazmaları ve saydam hücreli over karsinomlarda bir onkogen olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. ¹⁶²⁻¹⁶⁴ RASSF7 özellikle pankreatik adacık hücre tümörlerinde ve endometrial tümör tanımlamalarında spesifik olarak regüle edilmiş ekspresyonu göz önüne alındığında potansiyel teşhis markeri olarak önerilmiştir. ^{159,161} RASSF7 ekspresyonu, katı tümörlerin ortak bir özelliği olan hipoksik koşullarda da artar. ¹⁴⁹ RASSF7' nin nöroblastomlarda epigenetik olarak susturulduğu gösterilmiştir. ¹³⁵

2.2.1.2.2 RASSF8-C12orf2

RASSF8 geni-C12orf2 geni, 12p12.3 kromozomu üzerinde bulunur ve en az dört transkript varyanta sahip olduğu tahmin edilmektedir. RASSF8 insan yetişkin dokularında her zaman ifade edilir.¹⁶⁵ RASSF8 lokalitesi sayesinde akciğer kanserogenezinde potansiyel bir tümör supresör olarak tanımlanmıştır. Bu bölge K-RAS genini içerir. Akciğer adenokarsinomunda RASSF8 transkript seviyelerinin azaldığı, akciğer tümör hücre hatlarında RASSF8 proteininin yeniden ekspresyonunun bağımsız büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur.^{166,167} RASSF8 kaybının akciğer kanserinde tümör ilerlemesi ve metastatik eğilim ile korele olduğu belirlenmiştir. RASSF8 de bulunan yaygın polimorfizmler akciğer adenokarsinom riski ile ilişkili bulunmadığı bildirilmiştir. ¹⁶⁸ Yetişkin erkek germ hücreli tümörlerde 12p hedef genlerin ekspresyon seviyelerinde yapılan çalışmalarda C12orf2 nin ekspresyonunun azaldığı, lösemi ve lenfoma retroviral girişinin RASSF8 genine bitişik bir bölgede meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durum RASSF8'in yalnız düzenlenmesinin lösemi ve lenfoma oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir.¹⁶⁹ Ekstraselüler RASSF8 meme kanserli hastaların plazma ve hücre bağlı fraksiyonlarında iyi huylu tümörleri olan hastalara kıyasla RASSF8'in potansiyel bir teşhis marker olduğu düşünülmektedir.¹⁷⁰ İnsan RASSF8 çalışmalarında, hücre-hücre yapışması ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde potansiyel bir rolü vurgulanmaktadır. ¹⁷¹ RASSF8'in hücre büyümesini inhibe ettiği ve akciğer kanserinde yapışık birleşme oluşumunu teşvik ettiği ve özellikle yapışık bileşimlerde E-kadherin ve B-katenin ile etkileşime girdiği bulunmuştur. ¹⁶⁵ RASSF8'in, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz gibi çeşitli moleküler mekanizmaları düzenleyen her yerde bulunan iskele protein 14-3-3 ile etkileşime girdiği bildirilmiştir. ^{172,173} RASSF8'in tümör baskılayıcı rolü, akciğer adenokarsinomlarındaki ekspresyonun azalması nedeniyle önerilmiştir. ¹⁶⁸ Melanom üzerine yapılan

çalışmalarda RASSF8 metilasyonu ve tümör ilerlemesi arasında pozitif bir korelasyon göstermiştir. ¹⁷⁴

2.2.1.2.3 RASSF9, PAMCI, PCIP1

RASSF9 geni, 12q21.31 bölgesinde bulunur. İki izoforma sahiptir. RASSF9'un kanser gelişimi üzerinde bir etkisi olduğuna dair net bir kanıt yoktur. Kromozomal lokalizasyonuna dayanarak kolorektal kanser için iyi bir aday olarak kabul edildi. ¹⁷⁵ RASSF9, geri dönüşüm endozomları ile ilişkili olduğu için PAM trafiğini düzenlemede rol oynamaktadır ve Ras proteinleriyle etkileşime girdiği tespit edilmiştir. ¹⁷⁶ Yapılan çalışmalarda epidermal homeostazda önemli olabileceği belirlenmiştir. Epidermal epitel hücre çoğalması ve farklılaşmasında hızlandırılmış yaşlanma belirtileri ve kusurları göstermektedir. ¹⁷⁷

2.2.1.2.4 RASSF10

RASSF10 geni, 11p15.2 kromozom bölgesinde bulunur. Moleküler fonksiyonu bilinmemekle birlikte genin ifadesi çeşitli dokularda tespit edilmiştir. ¹⁷⁸⁻¹⁸¹ RASSF10 bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda RASSF10'un tiroid, melanoma, glioma, akciğer, baş boyun, sarkom ve pankreas dahil olmak üzere bir çok kanserde epigenetik olarak inaktif olduğu tespit edilmiştir. ^{179,181-183} Çocuk lösemilerinde tümör baskılayıcı olarak görev alan RASSF10 T hücreli akut lenfositik lösemilerde "ALL" sıklıkla metillendiği, B hücreli ALL'de normal olarak metillendiği bulunmuştur. Metilasyonun inhibe edilmesi, lösemi ekspresyonunun yukarı regülasyonuna neden olmuştur. ¹⁸⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU VE SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada kullanılan örnekler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından baş boyun kanseri teşhisi konmuş 68 hastanın tümörlü dokularından, tümör çevresi sağlıklı dokularından ve hastalardan alınmış olan periferik kanlardan oluşmaktadır. Serum düzeyi farklılıklarının tespitinde kullanılacak olan kontrol grubunun ise baş boyun kanseri tanısı almamış 70 sağlıklı bireyden alınmıştır. Çalışmaya katılan hastalara ve kontrollere yapılacak olan araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutularak imzalatılmıştır.

Çalışmaya katılan hastaların klinik değerlendirmeleri, doku ve kan örneklerinin alınması İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Alınan kan ve doku örnekleri uygun koşullar sağlanarak anabilim dalımıza getirilmiş ve çalışma yapılınca kadar muhafaza edilmiştir.

Ekspresyon ve polimorfizm çalışması için alınan doku örneklerinden total RNA ve DNA izolasyonu yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinden ise serum elde edilerek RASSF4 düzeyleri tayin edilmiştir.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE KİTLER

Proteinaz K –Invitrogen

RNA Later -Ambion-Am7021

Kloroform (CHCl₃) - Sigma-Aldrich, Almanya

RNAZ A -Invitrogen

%99 Etanol - Sigma-Aldrich, Almanya

İzopropil Alkol - Sigma-Aldrich, Almanya

2mercaptoethanol- Sigma-Aldrich, Almanya

PureLink™ Genomic DNA Mini Kit – Invitrogen

PureLink® RNA Mini Kit - Invitrogen

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit – Invitrogen

TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG

TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix
 TaqMan® Gene Expression Assay, GAPDH
 TaqMan® Gene Expression Assay, RASSF4
 TaqMan® SNP Genotyping Assay, rs884879
 TaqMan® SNP Genotyping Assay, rs7896801
 RASSF4 Elisa kit - BT LABS E4368Hu

3.3. KULLANILAN CİHAZLAR VE GEREÇLER

Pipet takımı (Eppendorf)
 Buzdolabı (+4°C)
 Buzdolabı (-30°C) (SANYO Biomedical Freezer)
 Ultra Derin Dondurucu (-80 °C)
 Isı bloğu (BIOSAN Thermo Block TDB-120)
 Vorteks (BIOSAN MICROSPIN FV-2400)
 Mikrosantrifüj (ALFAGEN Mini-14K)
 Hassas terazi (Mettler)
 Spektrofotometre (MaestroNano)
 Elisa plate okuyucu
 Real-time PCR Cihazı (Applied Biosystems 7500 Fast Instrument, Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument)

3.4. DOKUDAN DNA İZOLASYONU

Dokudan DNA izolasyonu için INVITROGEN PureLink® Genomik DNA Kiti kullanılmıştır. Kit içeriği gerekli talimatlara göre hazırlandı ve izolasyon işlemi yapıldı. DNA izolasyonu için izlenen yol aşağıdaki gibidir;

Isı bloğu proteinaz K'nın optimum çalışma sıcaklığı 55 C'ye ayarlandı. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne 25 mg bisturi ile iyice parçalanmış baş boyun dokusu yerleştirildi. 180 µl PureL PureLink® Genomik Sindirim Tamponu ve 20 µL Proteinaz K eklendi. Lizis işlemi tamamlanmaya kadar ara sıra vortekslenerek bir gece inkübe edildi. Oluşan lizat maksimum hızda santrifüjlenip parçacık halinde kalan yapılar çıkartıldı ve süpernatant yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Lizata 20 µl RNase A eklendi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında yapılan 2 dakikalık inkübasyondan sonra 200 µl PureLink® Genomik Lizis / Bağlama Tamponunu eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.

Lizata 200 µL% 96-100 etanol eklendi ve tekrar vortekslendi. DNA'nın kolona tutunmasını sağlayacak olan apolar ortam hazırlanmış oldu.

Mikrosantrifüj tüpünde bulunan yaklaşık 640 µL'lik lizat spin kolonuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 g'de santrifüj edildi. DNA, kolonun silika membranına bağlandı. Kolonun içinde bulunduğu toplama tüpü atılarak yeni bir toplama tüpü içerisinde yerleştirildi.

Kolona 500 µL yıkama tamponu 1 eklendi ve oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atılıp yerine yeni bir toplama tüpü yerleştirildi. 500 µL yıkama tamponu 2 eklendi ve oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılıp yerine steril mikrosantrifüj tüpü yerleştirildi. Yıkama işlemlerinde kolonda bulunan DNA geri kalan lizat içerinden arındırılmış olması sağlandı.

200 µL Elüsyon tamponu eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Genomik DNA elüsyon tamponunda çözünerek kolondan ayrılıp mikrosantrifüj tüpünde toplandı. Elde edilen saf genomik DNA konsantrasyon ölçümünden sonra +4°C'de saklandı.¹⁸⁴

3.4.1. DNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

DNA'nın konsantrasyonu ve kalitesi spektrofotometrik ölçümler ile tespit edilmektedir. Ölçüm 260 nm, 280 nm, ve 230nm dalga boylarında ultraviole (UV) ışın kullanılarak yapılır. Çift iplikli sarmal yapıda bulunan DNA'nın en iyi absorbans gösterdiği dalga boyu 260 nm'dir. 260 nm dalgaboyunda ölçülen her 1 absorbans değere optik dansite 260 (OD260) denir. 50 ug/ml çift iplikli DNA içeriğinin 1 optik dansite (OD) ye 1 absorbanslık değer verdiği kabul edilmektedir. DNA konsantrasyonu 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıda bulunan formüle göre hesaplanmıştır.

$$\boxed{\text{DNA (ug/ml)} = \text{OD260} \times 50}$$

DNA'nın saflığını öğrenebilmek için OD260/OD280 ve OD260/OD230 oranları kullanıldı. DNA'nın OD260/OD280 değeri yaklaşık 1,8 ise elde edilen DNA yeteri kadar saf demektir. OD260/OD280 değeri 1.8'den küçük olduğu durumda kontaminasyonun ortamda bulunan fenol veya protein kaynaklı olduğunu göstermektedir. Öte yandan OD260/OD280 değeri 1.8'den büyük olması RNA

kontaminasyonu göstermektedir. DNA'nın OD260/OD230 absorbands değeri 2.0'dan büyük olmalıdır. Bu değerin 2.0'dan daha düşük bir değerde olması fenol ve etanol kontaminasyonunu göstermektedir.

3.5. TOTAL RNA İZOLASYONU

68 hastaya ait baş boyun tümör dokularından ve normal baş boyun dokularından easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea) kullanılarak toplam RNA elde edildi.

Yöntemde 50-100 mg taze doku bisturi yardımıyla parçalara ayrıldı. Daha sonra 1 ml easy-BLUE™ reaktifi parçalanmış doku parçalarının üzerine eklendi oluşan lizat 18-21 gauge iğneden geçirilerek parçalama işlemine devam edildi. İyi parçalanması sağlanan lizat 30 saniye boyunca oda sıcaklığında vortekslendi. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek tekrar vorteks işlemine tabi tutuldu. Solüsyon 13.000 rpm'de 4 °C 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 400 µl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Solüsyon 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın atılması ile yıkama işlemleri gerçekleşti. Yıkama işleminde 1 ml %75 etOH eklendi ve 5 dakika 10.000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi. 30 µl distile su yardımıyla RNA çözdürüldü ve RNA örnekleri spektrofotometre yardımıyla miktar ve saflığı tespit edildi.

3.5.1. TOTAL RNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede 260 nm, 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçümler yapılarak saptandı. RNA konsantrasyonu 260 nm dalga boyundaki optik yoğunluğundan (OD) belirlendi. 40 µg/ml RNA içeriğinin 1 optik yoğunluğu (OD) verdiği kabul edilmektedir.

RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluğu (OD) ölçülerek saptandı. RNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

$$\text{RNA konsantrasyonu (ng / } \mu\text{l) : OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40}$$

İzole edilen ve ölçüm işlemleri tamamlanan RNA örnekleri -80 C de saklandı.

3.5.2. TERS TRANSKRİPSİYON

Baş boyun dokularından elde edilen toplam RNA’lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, USA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda bulunan RNA içerikler 100 ng/ µl olacak şekilde hazırlanan solüsyon karışımına eklendi.

Tablo 3-1: Kalıp RNA ve primer karışım içeriği (1 reaksiyon için)

Bileşen	Hacim
Total RNA	1,0
10x RT buffer	2,0
25x dNTP karışımı (100 mM)	0,8
10x RT primerleri	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Distile su	3,2
Toplam	10,0

68 doku örneği için hazırlanan ana karışım 10 ul olarak tüplere eklendi. Her kuyucuğa 10 ul 100 ng/ µl’ye sulandırılmış RNA örneği eklenip pipetaj işlemi ile karıştırıldı. Hazırlanan tüpler Termal Döngü Cihazı, Applied Biosystems cihazına yerleştirildi. Isı ve süre özellikleri kit içeriğine uygun şekilde uygulandı.

Tablo 3-2: cDNA işlemi için kullanılan ısı-süre tablosu

	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama	4. aşama
Isı	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.5.3. QRT-PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK RASSF4 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF OLARAK SAPTANMASI

Gen ekspresyonu, bir genden gelen bilgilerin fonksiyonel bir gen ürününün sentezinde kullanıldığı bir işlemdir. Bu ürünler genellikle proteinlerdir ancak rRNA veya tRNA genleri gibi protein kodlayan genlerde ürün yapısal veya idaresel bir RNA’dır. Daha küçük ve kodlayıcı olmayan RNA’lar (miRNA, piRNA, siRNA) ve

kodlayıcı olmayan uzun RNA sınıfları çoklu düzenleme fonksiyonlarına katılmaktadır. Çalışmamızda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksyonu ile gen ekspresyonunda gen spesifik transkript miktarını ölçerek RASSF4 geninin ekspresyonundaki değişiklikleri araştırmaktayız. Kantitatif ters transkripsiyon PZR (RT-qPZR) veya kantitatif PZR (qPZR) olarak da bilinen Gerçek Zamanlı PZR, mevcut en güçlü ve hassas gen analizi tekniklerinden biridir.

Her gerçek zamanlı PZR çalışmasında bir TaqMan® probu veya SYBR™ Yeşil boya gibi PZR ürününün birikimini izlemek için bir floresan raporör molekülü olması gerekmektedir. Hedef ampikonun miktarı arttıkça, florofordan yayılan floresan miktarı da artar. Bu tez çalışmasında TaqMan® probu kullanılmıştır.

Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)'ın iki farklı uygulaması mevcuttur. Uygulamalardan biri cDNA sentezinde PZR amplifikasyonuna kadar olan bütün reaksiyonların tek tüpte gerçekleşmesidir. İkinci uygulama ise iki aşamalı olup RT-PZR ve qPZR'nin farklı tüplerde gerçekleştirilmesidir. Bu tez çalışmamızda RASSF4 gen ekspresyon düzeylerini tek tüpte qRT-PZR reaksiyonunu kullanarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. REAKSİYONLARDA KULLANILAN QPCR PRİMERLERİ VE TAQMAN PROBLARI

RASSF4 assay primerleri problemlerle birlikte etkinlikleri incelenip özelliklerinin belirlenmesi için TaqMan Gene Expression Master Mix Kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır.

Tablo 3-3: Kullanılan Taqman SNP ve genotipleme PZT karışımları

	Hacim		Hacim
TaqMan genotipleme master karışımı	5 µl	TaqMan genotipleme master karışımı	5µl
SNP TaqMan genotipleme assay	0,25µl	TaqMan gen ekspresyon assay	0,5µl
Nükleaz içermeyen su	2,75µl	Nükleaz içermeyen su	2,5µl
DNA	2µl	DNA	2µl
Toplam Hacim	10µl	Toplam Hacim	10µl

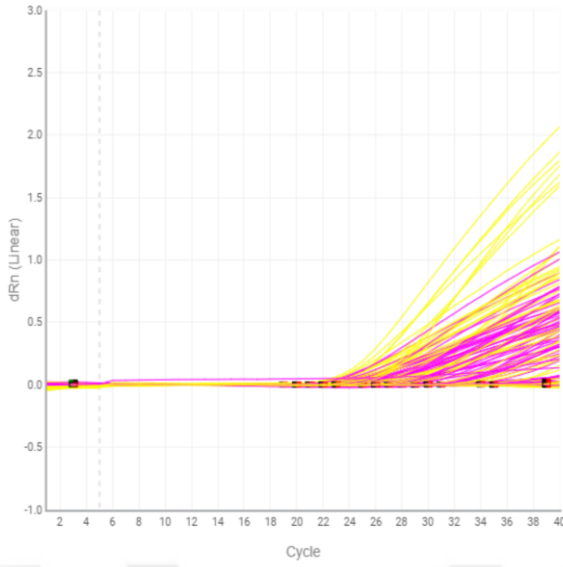
Tablo 3-4: PZT koşulları

Bölüm	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Süre
PZT öncesi	1	50°C	2 dk
Enzim etkinleşmesi	1	95°C	10 dk
Bozunma	40	95°C	15sn
Bağlanma/Uzama		60°C	1dk
PZT sonrası	1	60°C	1 dk

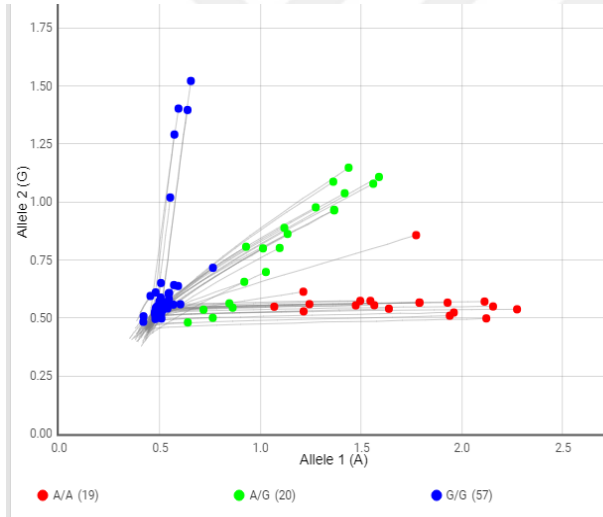
3.5.5. QPCR REAKSİYON KARIŞIMININ HAZIRLANMASI VE ÜÇLÜ OLARAK İNCELENMESİ

Özellikleri belirlenen primer ve probler TaqMan Gene Expression Master Mix Kiti (Applied Biosystems, A.B.D.) ile üçlü çalışılarak birbirleriyle uyumları tespit edilmiştir. Üçlü çalışma için dizayn edilen probler üç farklı boya (FAM, VIC ve NED) ile işaretlenmiştir. FAM boyası mavi renkte ışığı emiş gücü 494 nanometre (nm) ve yayma gücü 518 nm, VIC boyası yeşil renkte ışığı emiş gücü 538 nm ve yayma gücü 554 nm, NED boyası sarı renkte ışığı emiş gücü 546 nm ve yayma gücü 575 nm'dir.

RS7896801 için probler, FAM işaretli prob A allelini saptamak için kullanıldı VIC işaretli prob G allelini belirlemek için kullanıldı. Amplifikasyon sonucunda FAM boyasında floresans ışımadaki artış A allelinin bulunduğunu göstermektedir. Örnek Şekil 3-1 ve 3-2'de gösterilmiştir.

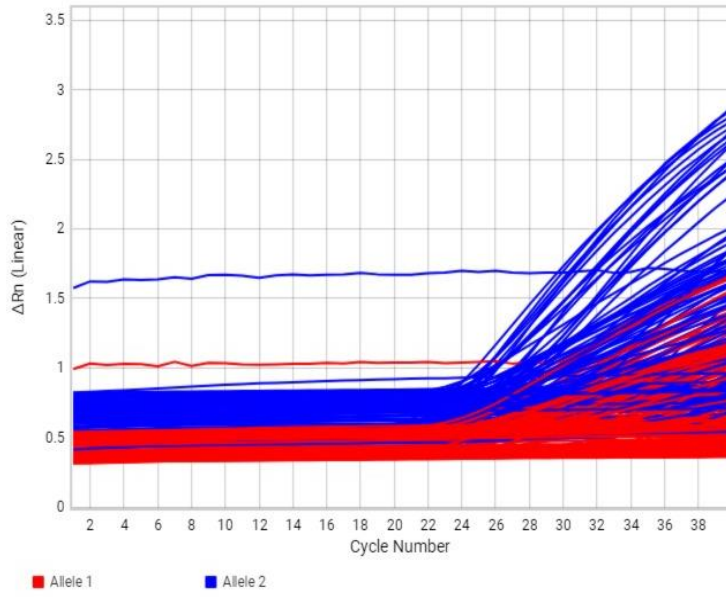


Şekil 3-1: 7896801 için dRn ve döngü linear örnek görüntüsü

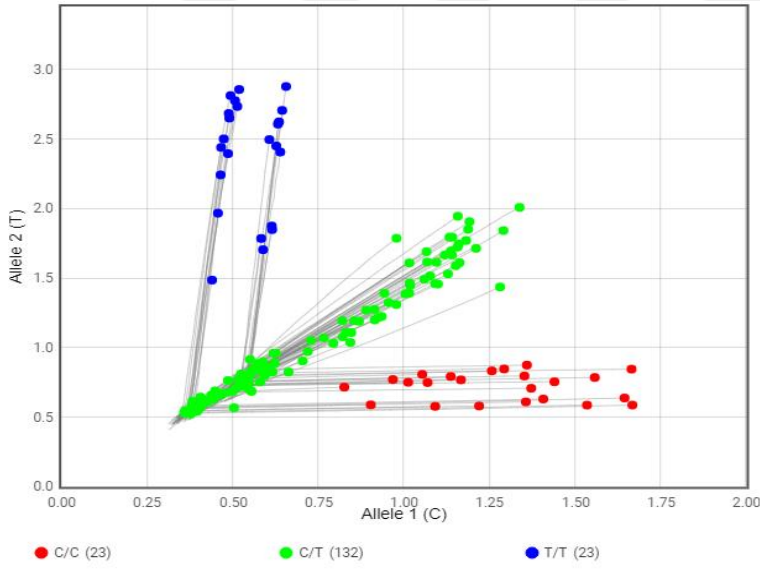


Şekil 3-2: RS7896801 için örnek allel dağılımları

RS884879 için Problar; FAM işaretli prob C allelini saptamak için kullanıldı. VIC işaretli prob T allelini belirlemek için kullanıldı. Örnek Şekil 3-3 ve 3-4'te gösterilmiştir.



Şekil 3-3: RS884879 için dRn ve döngü linear örnek görüntüsü



Şekil 3-4: RS884879 için örnek allel dağılımları

3.6. ELISA YÖNTEMİ İLE SERUM DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

3.6.1. PERİFERİK KANDAN SERUM ELDESİ

Çalışmamızda yer alan hastalardan kuru tüplere yaklaşık olarak 5-10 cc periferik kandan +4 santrifüj cihazı kullanılarak 10 dakika 3000rpm’de santrifüj edilerek serum elde edilmiştir.

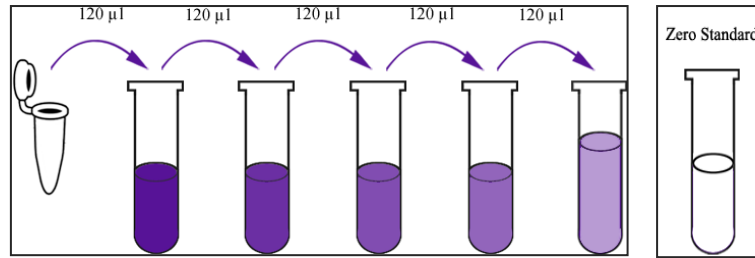
3.6.2. RASSF4 SERUM DÜZEYLERİ TAYİNİ

RASSF4 serum tayini için daha önce ayrılan ve -80°C de saklanan serum örnekleri BT Labs E4368Hu elisa kiti prosedürüne göre işleme tabi tutularak serum düzeyleri tayin edilmiştir.

Çalışma başlamadan önce serum örnekleri 30-60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. 1600 ng/ L standart stok çözeltisi oluşturmak için standart 120µl' yi (3200 ng/ L) 120µl standart seyreltici ile yeniden seyreltildi. Standart stok çözeltisi (1600ng/L) 1:2 seyreltilecek şekilde 800ng/L, 400ng/L, 200ng/L ve 100ng/L seri olarak seyreltilerek kopya standartlar oluşturuldu. Standart seyreltici sıfır standart olarak (0 ng/L) standartların hazırlanması tamamlanmıştır.

Tablo 3-5: Elisa standart dilüsyon oranları

1600ng/L	Standard No.5	120µl Orjinal Standard + 120µl Standard Diluent
800ng/L	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
400ng/L	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
200ng/L	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
100ng/L	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent



Standard konsantrasyon	Standard No.5	Standard No.4	Standard No.3	Standard No.2	Standard No.1
3200ng/L	1600ng/L	800ng/L	400ng/L	200ng/L	100ng/L

Yıkama tamponu 20 ml 25x olarak kit içeriğinden temin edilmiştir. Deiyonize su ile 500 ml 1x yıkama tamponu oluşturulmuştur.

Tüm reaktiflerin oluşturulmasından sonra standart kuyucuklarına 50µl standartlar eklendi. Test için kullanılacak olan 68 baş boyun kanseri hastası ve 70 herhangi bir hastalığı bulunmayan kontrol bireylerinin örneklerinden 40µl alınarak kalan her bir kuyucuğa eklenmiştir. Standartlar hariç her bir kuyucuğa 10µl anti-RASSF4 antikoru ilave edilip daha sonra standart kuyucukları da dahil olmak üzere “boş kontrol kuyusu hariç” her kuyucuğa 50µl streptavidin-HRP eklendi. Plaka 37° C'de 60 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 50µl substrat çözeltisi A eklendi ve daha sonra her kuyucuğa 50µl substrat çözeltisi B eklendi. Karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika boyunca plaka inkübe edildi. Her kuyucuğa 50µl Stop Solüsyonu eklendi, mavi rengin hemen sarıya dönmesi gözlemlendi. Durdurma çözeltisini ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış Elisa mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi. Standart absorbansları kullanılarak standart eğri grafiği regresyon analizi ile çizilmiş ve elde edilen serum absorbans değerlerinin hesaplamaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 21.0 Paket programı kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde χ^2 ve Fisher Exact testi kullanılmıştır.

Gruplar arası demografik verilerin karşılaştırılmasında Student't, One-way Anova ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza hasta grubu olarak baş boyun kanseri tanısı konulmuş 68 hasta birey ve herhangi bir hastalık tanısı olmayan 70 sağlıklı birey dahil edilmiştir.

Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik parametreler Tablo 1’de gösterilmiştir. Çalışma gruplarımızın yaşları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik parametreler

Parametreler	Hasta(n=68)	Kontrol (n=70)	p Değeri
Yaş (yıl)	55,85±12,94	59,77±10,76	0,061
WBC	9,15±2,90	7,83±2,37	0,028
Hemoglobin	13,58±1,69	12,92±1,80	0,004
Cinsiyet (K/E)	15/53	24/46	>0,05
Serum RASSF4 düzeyi	398,07±86,04	346,46±75,80	0,65
Aile Hikayesi (n/%)	28/41,2	-	-
Alkol kullanımı (n/%)	27/39,7	-	-
Sigara Kullanımı (n/%)	49/72,1	-	-
Tümör Lokalizasyonu			
Oral Kavite (n/%)			
Larinks (n/%)	29/42,6	-	-
Dil (n/%)	23/33,8		
	16/23,5		
Tümör Tipi			
Skvamöz(n/%)	51/75		-
İnvaziv Skvamöz(n/%)	17/25		
Diferansiasyon			
Az(n/%)	14/20,6	-	
Orta(n/%)	40/58,8		
İyi(n/%)	14/20,6		
T Evrelemesi			
1-2 (n/%)	15/22,4	-	
3-4 (n/%)	52/77,6		

Hasta ve sağlıklı dokuda RASSF4 gen anlatımları açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 2).

Tablo 4-2 : Hasta ve sağlıklı dokuda RASSF4 gen anlatımı kat değişimi

	2- $\Delta\Delta CT$ (min-maks)	Kat Değişimi	P değeri	%95 güven aralığı
RASSF4	7,70 (-7,19-9,38)	1,00	0,09	0,18-2,19

Hasta ve sağlıklı kontroller arasında RASSF4 RS7896801 genotip ve allel dağılımları incelendiğinde hasta grupta G allel taşıma sıklığı 2,4 kat artmıştır ($p=0,015$, $\chi^2=5,95$, OR: 2,4, %95 güven aralığı=1,18-5,26). AA genotipi taşıma sıklığı ise kontrol grubunda istatistiksel olarak artmıştır ($p=0,015$, $\chi^2=5,95$, OR: 1,8, %95 güven aralığı=1,10-3,18) (Tablo 3).

Tablo 4-3: Hasta ve sağlıklı kontrollerde RASSF4 RS7896801 genotip ve allel dağılımlarının gösterilmesi

	Hasta (n=68)	Kontrol (n=70)
Genotip		
AA	15 (%22,1)	29 (%41,4)*
AG	35 (%51,5)	31 (%44,3)
GG	18 (%26,5)	10 (%14,3)
Allel		
A	65 (%47,8)	89 (%63,5)
G	71 (%52,2)*	51 (%36,5)

* $p=0,015$

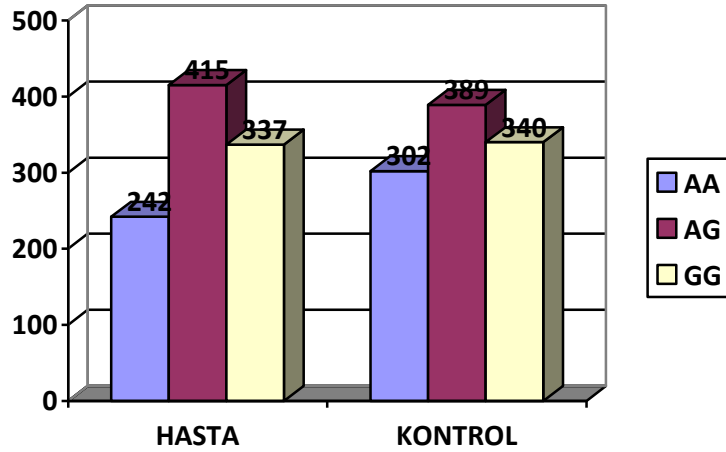
Hasta ve sağlıklı kontroller arasında RASSF4 RS884879 genotip ve allel dağılımları incelendiğinde sağlıklı grupta CC genotipi taşıma sıklığı hasta grubuna göre 2,2 kat artmıştır ($p=0,048$, $\chi^2=3,92$, OR: 2,2, %95 güven aralığı=0,97-5,05). Hasta grubunda ise T allel taşıma sıklığının anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,048$, $\chi^2=3,92$, OR: 2,5, %95 güven aralığı=0,98-6,74) (Tablo 4).

Tablo 4-4: Hasta ve sağlıklı kontrollerde RASSF4 RS884879 genotip ve allel dağılımlarının gösterilmesi

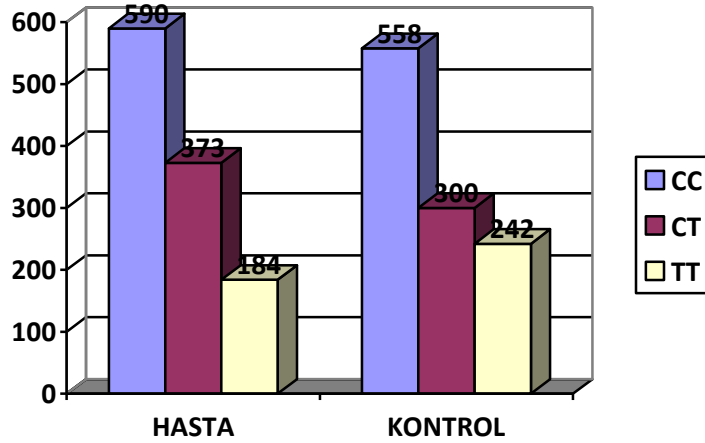
	Hasta (n=68)	Kontrol (n=70)
Genotip		
CC	7 (%10,3)	16 (%22,9)*
CT	47 (%69,1)	38 (%54,3)
TT	14 (%20,6)	16 (%22,9)
Allel		
C	61 (%44,85)	70 (%50)
T	75 (%55,15)*	70 (%50)

*p=0,048

Hasta ve kontrol grubunda RASSF4 RS7896801 ve RS884879 genotip dağılımlarına göre RASSF4 serum düzeyleri incelendiğinde anlamlı bir bulgu elde edilmemiştir ($p>0,05$) (Grafik 1 ve 2).



Şekil 4-1: Hasta ve kontrol grubunda RASSF4 RS7896801 genotip dağılımlarına göre RASSF4 serum düzeylerinin gösterilmesi



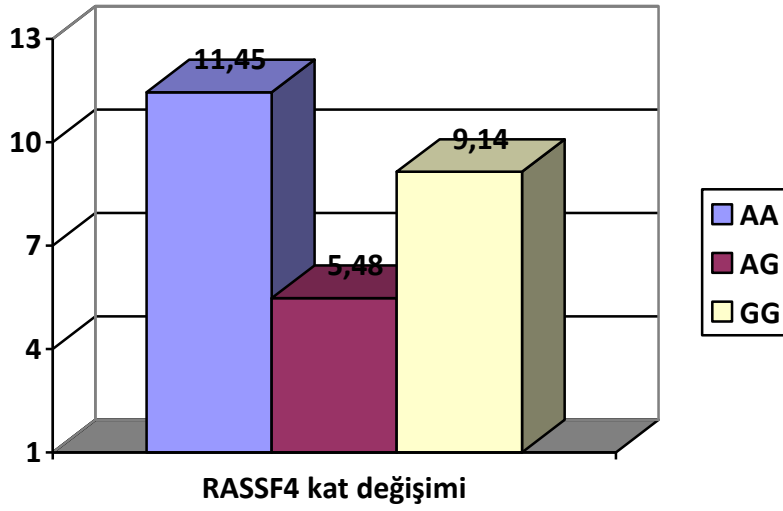
Grafik 2: Hasta ve kontrol grubunda RASSF4 RS884879 genotip dağılımlarına göre RASSF4 serum düzeylerinin gösterilmesi

Hasta grubunda tümör evrelemesine göre RASSF4 geni kat değişimleri ve serum RASSF4 düzeyleri incelendiğinde erken ve ileri evre tümörler arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 5).

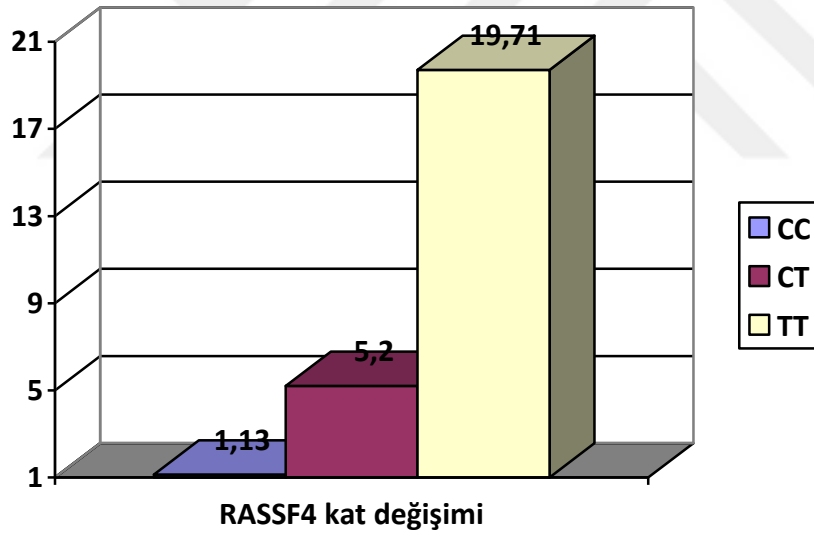
Tablo 5: Tümör evrelemesine göre RASSF4 geni kat değişimleri ve serum RASSF4 düzeylerinin gösterilmesi

Tümör Evresi	RASSF4 geni kat değişimi	Serum RASSF4 düzeyi
1-2	4,09±2,29	186,47±99,98
3-4	8,97±4,16	449,90±103,32

Hasta grubunda RASSF4 RS7896801 ve RS884879 genotip dağılımlarına göre RASSF4 geni kat değişimleri incelendiğinde anlamlı bir bulgu elde edilmemiştir ($p>0,05$) (Grafik 3 ve 4).

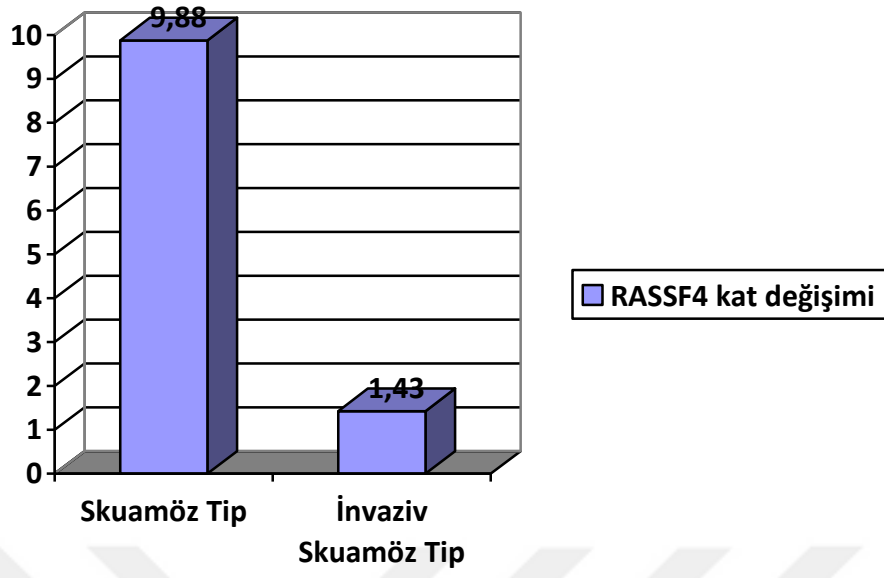


Grafik 3: Hasta grubunda RASSF4 RS7896801 genotip dağılımlarına göre RASSF4 geni kat değışimleri



Grafik 4: Hasta grubunda RASSF4 RS884879 genotip dağılımlarına göre RASSF4 geni kat değışimleri

Tümör tipine göre RASSF4 geni kat değışimleri incelendiğinde skuamöz tip tümörlerde invaziv skuamöz olanlara göre RASSF4 geni istatistiksel anlamlılık sınırında artış göstermiştir ($p=0,05$) (Grafik 5).



Grafik 5: Tümör tipine göre RASSF4 geni kat değışimleri

5. TARTIŞMA

Kanser belli genlerin ifadelerinin artması, azalması ya da kaybolması sonucu gelişen bir süreçtir. Gen ifadelerindeki değişiklikler kodlandıkları proteinlerdeki etkinlik kaybına veya kazanımına neden olmasından kaynaklı farklı etkiler göstermektedir. İfadeleri değişen genlerin tümör hücrelerinde saptanması kanser gelişimini, ilerlemesini ve moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında önemlidir. Klinikte kanser risk, tanı ve prognozunun belirlenmesi, tedaviye yanıtın izlemesi açısından tümör belirteçlerinin tespiti kanser önleyici ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.¹⁸⁵

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, hücrel genomda meydana gelen mutasyonların kanser oluşumunda tek başına sorumlu olmadığı, gen ifadesini düzenleyen mekanizmalardaki değişikliklerin de bu süreçte etkili olduğu tespit edilmiştir.¹⁸⁶

Baş boyun kanserinin çeşitli yönleri geniş çapta araştırılmıştır ancak az sayıda çalışmada mutasyonların rolü, mRNA ekspresyon seviyeleri çalışmalara dahil edilmiştir. Zhang ve arkadaşlarının yapmış olduğu nazofarengial karsinom çalışmasında PIK3CA, KIT, RAS gibi onkogenlerin mutasyonlara karşı en duyarlı; BRAF, PDGFRA, ABL1 ve EGFR mutasyonlarının ise daha az sıklıkla meydana geldiği tespit edilmiştir. Nüks veya metastazı olan veya olmayan hastaların alt gruplarındaki mutasyon sıklıkları karşılaştırıldığında nazofarengial kanser hastalarının tekrarlayan ve gelişen mutasyon sıklığının arttığı tespit edilmiştir.¹⁸⁷

RAS/RAF/ERK yolunun tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. KRAS, HRAS ve NRAS mutasyonları tüm insan kanserlerinin en az üçte birinde meydana gelmektedir. KRAS mutasyonları en yaygın olanıdır.^{188–190} Ancak, Zhang ve arkadaşları nazofarengial kanserde NRAS ve HRAS mutasyonlarına oranla KRAS mutasyonlarına beklenenden daha az rastlamıştır.¹⁸⁷

RASSF4 ile yapılmış çalışmalar genellikle metilasyon veya delesyonların neden olduğu epigenetik inaktivasyon çalışmalarıdır. Azalan RASSF4 mRNA ekspresyonu ve RASSF4'ün hipermetillenmiş promotor bölgesi, baş boyun skuamöz hücreli karsinom ve nazofarengial karsinomda bulunmuştur.^{26,27} Biz çalışmamızda baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarda ve nazofarengial karsinomda mRNA ekspresyon seviyelerinde

istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edememiş bulunmaktayız. P değeri 0,09 (Tablo 4-2)

Yong Han ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada RASSF4 protein ekspresyonunun %38,6 (NSCLC) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri dokusunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun lenf nodu metastazı ve TNM evresi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu RASSF4'ün NSCLC'de varsayılan bir tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir. RASSF4 kaybının hasta prognozunun kötüleşmesi ile korele olduğu belirlenmiştir.²⁵ Yapmış olduğumuz çalışmada RASSF4 proteini ekspresyonunun hasta ve sağlıklı dokuda gen anlatımları açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. ($p>0,05$) TNM evresi ile RASSF4 seviyeleri arasındaki ilişki 1-2 tümör evresi için $4,09\pm 2,29$, 3-4 tümör evresi için $8,97\pm 4,16$ bu sonuçlar istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir ($p>0,05$).

Protein ekspresyon paterni ve RASSF4'ün insan kanserinde klinik önemini arttıran çalışmalar araştırmacıların giderek artan bir şekilde ilgisini çekmektedir.

Yong Han ve arkadaşları, RASSF4 plazmidini kullanarak düşük endojen ekspresyonu olan NSCLC hücre hatlarındaki restorasyonunun proliferasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir.²⁵

Eckfeld ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, RASSF4'ün aşırı ekspresyonunun hücre ölümünü indüklediği ve MCF-7 hücre hattında sağkalımı inhibe ettiği bildirilmiştir.¹⁶ RASSF4'ün hücre siklusu ve hücre invazyonu üzerindeki etkisi bir tümör baskılayıcı olarak mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda, hücre döngüsü ilerlemesini ve ilgili proteinleri incelendiğinde RASSF4'ün aşırı ekspresyonunun S faz yüzdesini ve siklin D1 ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Siklin D1, G1-S kontrol noktasında hücre döngüsü ilerlemesi sırasında kritik bir rol oynar. Birçok çalışma, siklin D1'in, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde aşırı eksprese edildiğini ve malign progresyon ve kötü prognoz ile korele olduğunu göstermiştir.^{191,192} Bu sonuçlar, RASSF4'ün, siklin D1 durumunun modülasyonu yoluyla hücre proliferasyonunu düzenleyebileceğini göstermiştir.

RASSF4'ün hücre invazyonu üzerindeki rolü incelendiğinde, RASSF4'ün akciğer kanseri hücre dizilerinin invazyon yeteneğini inhibe ettiği tespit edilmiştir. RASSF4 restorasyonu, birçok kanser türünde invazyonun önemli araçları olan MMP2 ve MMP9 seviyelerini düşürmüştür.²⁸⁻³¹ Bu nedenle, RASSF4'ün invazyon inhibisyonu

üzerindeki rolü, MMP2 ve MMP9 aşağı regülasyonu üzerindeki rolünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yong Han ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri RASSF4 protein ekspresyonunun aşağı regülasyonunu ve TNM evresi, nodal durum ve zayıf prognoz ile korelasyonunu göstermiştir.²⁵ Bu sonuçlar göz önüne alındığında RASSF4, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde önemli bir tümör supresör olarak görev yaptığı söylenebilmektedir.

RASSF4'ün K-Ras'ı efektör alanı aracılığıyla GTP'ye bağlı bir şekilde bağladığını ve 293-T hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklemek için K-Ras ile sinerjize ettiğini göstermektedir. RASSF4'ün ifadesi, insan tümör hücrelerinin büyümesini inhibe eder ve bu etki, RASSF4'ün COOH terminusuna bir Ras CAAX membran lokalizasyon sinyalinin eklenmesiyle artırılır. RASSF4 genel olarak insan dokularında eksprese edilir, ancak sıklıkla insan tümör hücre çizgileri ve primer tümörlerde aşağı regüle edilir. RASSF4 ifadesinin aşağı regülasyonu, promotörün metilasyonu ile ilişkilidir.

RASSF5, meme (% 40), böbrek (% 33,3), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (% 17,6) kolorektal (% 16,7) ve küçük hücreli akciğer kanseri (% 10) dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre çizgilerinde promotör hipermetilasyonu ile sıklıkla susturulur.^{126,193} RASSF5'in metilasyonu küçük hücreli dışı akciğer kanseri (% 24), Wilms tümörü (% 15) ve Renal hücre karsinomu numunelerinde (% 19) tespit edilmiştir.¹⁹⁴ Buna karşılık Tommasi ve arkadaşları, akciğer kanseri hücre dizilerinde ve melanomda RASSF5'in hiçbir metilasyonu olmadığını bildirmişlerdir.¹⁰⁸ Yapmış olduğumuz çalışmada RASSF4'ün gen ekspresyon seviyelerinin hasta ve sağlıklı dokuda anlatımları açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0,05$) Çalışmamızda iki SNP bölgesi RS884879 ve RS7896801'in hasta grubunun kontrol grubuna göre mutasyon değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik.

Vos ve arkadaşları, bir akciğer kanseri hücre hattında RASSF5'in aşırı ekspresyonunun RAS bağımlı ve apoptotik büyüme inhibisyonu ile sonuçlandığını göstermiştir.¹²⁶ Bu bulgular RASSF5'in RAS sinyal mekanizmasında ve apoptozda rol oynayan bir tümör baskılayıcı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda RASSF4'ün baş boyun kanseri hücrelerinde gen ekspresyonunun nispeten artması 7,70

(-7,19-9,38) RAS bağımlı ve apoptotik büyüme inhibisyonu ile alakasını sorgulatmaktadır.

Ortiz-Vega ve arkadaşları, ne RASSF1A'nın ne de RASSF1C'nin Ras ve diğer Ras benzeri GTPazlara doğrudan bağlanamadığını göstermiştir.¹⁹⁵ Hem RASSF1A hem de RASSF5'in proapoptotik kinaz MST1 ile etkileşime girdiği ve sonuçta apoptoza yol açtığı da bildirilmiştir.¹⁹⁶ Bu bulgular bazı RASSF aile üyelerinin ailenin diğer üyeleri ile etkileşime girerek RAS sinyalleşme yolağında dolaylı bir rol oynayabileceğini göstermektedir. RASSF gen ailesinin etkisizleştirilmesi tümörjenezle sonuçlanan temel sinyal yollarının düzensizliğine yol açabilmektedir.²⁶

Nazofarengeal kanserde yapılan bir çalışmada Porter ve arkadaşları RAS proteinini saptanmasına rağmen, RAS geninde yapısal bir değişiklik saptamamıştır.¹⁹⁷ Yapılan birçok çalışmada RASSF1A, RASSF1C, RASSF4 ve RASSF5 in nazofarengeal baş boyun kanserinde sık sık susturulduğu gösterilmiştir.³²⁻³⁴ RASSF1A'nın nazofarengeal kanserde hedef tümör baskılayıcı olması muhtemeldir.²⁶ Çalışmamızda larengeal tümör grubu dokularında RASSF4 ün gen ekspresyonunun nispeten arttığı tespit edildi ancak istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediğinden dolayı larengeal tümörlerde RASSF4'ün de hedef tümör baskılayıcı olabileceği söylenememektedir.

Herman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada promotor metilasyonunun bazı tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybında önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir.¹⁹⁸ İnsan kanserinde RASSF1 ekspresyon kaybı en az 37 tümör tipinde anormal promotor metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. RASSF1A'nın çeşitli tümör tiplerinde metilasyonu normal dokulara oranla belirgin bir şekilde gerçekleştiğinden ideal bir kanser biyobelirteç olma potansiyeli yüksektir.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Erken tümör tespiti, prognostik belirteç olarak kullanılması, iyi huylu büyümelerden kaynaklanan kanser gelişim riskini tahmin etmek ve teşhis edilmiş bir tümörün prognozunu tahmin etmek için kullanılabileceği düşünülmektedir.⁷³ Biz çalışmamızda RASSF4'ün baş boyun kanser dokuları gen ekspresyon seviyelerinde dağınık düzeyler tespit ettik.

Vos ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada RASSF2 proteininin akciğer kanseri hücre dizilerinde sıkça aşağı regüle edildiğini bildirmiştir.²⁰² Akino ve arkadaşları RASSF2'nin etkisizleştirilmesinin mutasyondan kaynaklı olmadığını ortaya koymuştur.¹⁰⁶ Çalışmamızda baş boyun kanserinde sağlıklı dokuya göre RASSF4 gen anlatımlarında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Hasta ve sağlıklı kontroller

arasında RASSF4 RS7896801 genotip ve allel dağılımları incelendiğinde hasta grupta G allel taşıma sıklığı 2,4 kat artmıştır ($p=0,015$). AA genotipi taşıma sıklığı ise kontrol grubunda istatistiksel olarak artmıştır ($p=0,015$). RS884879 için ise genotip ve allel dağılımları incelendiğinde sağlıklı grupta CC genotipi taşıma sıklığı hasta grubuna göre 2,2 kat artmıştır ($p=0,048$). Hasta grubunda ise T allel taşıma sıklığının anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,048$).

RASSF2 promoter metilasyonu akciğer tümör hücre dizilerinde, mide kanseri ve nazofarengeal karsinomda lenf nodu metastazı ile korele şekilde görülmektedir.^{107,202-204} Çalışmamızda RASSF4 ekspresyonundaki düzensiz artışın lenf nodu metastazı ile arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Eckfeld ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada RASSF4'ün kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası ve pankreas dokularında eksprese edildiği bulunmuştur.¹⁶ Bazı tümör hücre hatları ve primer tümörlerde promotörün metilasyonu ile ilişkili aşağı regüle edildiği tespit edilmiştir.¹⁶ Chow ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada RASSF4'ün sadece nazofarengeal karsinom ve glioma hücre hatlarında görüldüğünü, primer tümörlerde görülmediğini bulmuştur.²⁶ Çalışmamızda RASSF4'ün baş boyun kanseri dokularında da eksprese edildiğini gözlemledik.

Eckfeld ve arkadaşları RASSF4'ün kodlama dizisinin inaktive edici mutasyonlar açısından incelediğinde hiçbirini ile bağlantı sağlayamamıştır.¹⁶ Biz çalışmamızda RS884879 ve RS7896801 SNP bölgelerinde hastaların sağlıklı bireylere oranla her iki bölgede de anlamlı derecede mutasyon tespit edilmiştir.

Günümüze kadar cDNA array ve analizleri gibi yöntemlerle kanser ile ilişkili bir çok gen tanımlanmıştır. Bu çalışmamızda RASSF4 gen anlatımı ile baş boyun kanseri arasında bir ilişki gözlemlenmemekle beraber, RASSF4 RS884879 ve RS7896801 gen varyantları ile hastalık arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız Türkiye'de baş boyun kanserli hastalarda RASSF4 gen etkinliğinin araştırıldığı ve ilk verilerin elde edildiği bir araştırma olma özelliğini taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Head and Neck Cancer Questions & Answers | What to Ask Your Doctor | CTCA. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/head-and-neck-cancer/questions>. Accessed January 30, 2019.
2. & ACSBCF, Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society I 2017. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017. *Open J Obstet Gynecol*. 2011. doi:10.4236/ojog.2011.13029
3. Head and neck cancers incidence statistics | Cancer Research UK. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/head-and-neck-cancers/incidence#heading-Zero>. Accessed January 30, 2019.
4. Day GL, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Liff JM, Preston-Martin S, Sarkar S, Schoenberg JB, et al. BWJ, Day GL, Blot WJ, et al. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst*. 1994.
5. Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer CJLM. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*. 2014. doi:10.1038/nrc3728
6. International Agency for Research on Cancer. Human papillomavirus and related diseases report. *HPV Inf Cent*. 2018.
7. GREEN M, ROKUTANDA H, ROKUTANDA M. Virus Specific RNA in Cells transformed by RNA Tumour Viruses. *Nat New Biol*. 1971;230(16):229-232. doi:10.1038/newbio230229a0
8. Scolnick EM, Papageorge AG, Shih TY. Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 1979. doi:10.1073/pnas.76.10.5355
9. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten

- sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 1982. doi:10.1073/pnas.79.11.3637
10. Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*. 1983. doi:10.1038/303396a0
 11. Pellicer A. RAS Genes. In: *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011:3181-3184. doi:10.1007/978-3-642-16483-5_4951
 12. WENIG BM, RICHARDSON M. Nasal Cavity, Paranasal Sinuses, and Nasopharynx. In: *Modern Surgical Pathology*. Elsevier; 2009:141-207. doi:10.1016/B978-1-4160-3966-2.00009-6
 13. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998. doi:10.1016/S0959-437X(98)80061-0
 14. Cox AD, Der CJ. The dark side of Ras: Regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003. doi:10.1038/sj.onc.1207111
 15. Hueber AO, Evan GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet*. 1998. doi:10.1016/S0168-9525(98)01520-0
 16. Eckfeld K, Hesson L, Vos MD, Bieche I, Latif F, Clark GJ. RASSF4/AD037 is a potential Ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res*. 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2065
 17. Avruch J, Xavier R, Bardeesy N, et al. Rassf family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem*. 2009. doi:10.1074/jbc.R800073200
 18. Dallol A, Latif F. Ras Association Domain Family 1. In: *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011:3178-3181. doi:10.1007/978-3-642-16483-5_4953
 19. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene*. 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210547
 20. Lerman MI, Minna JD, Sekido Y, et al. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: Identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res*. 2000.
 21. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic

- inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 2000. doi:10.1038/77083
22. Sherwood V, Recino A, Jeffries A, Ward A, Chalmers AD. The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domaincontaining proteins, with emerging links to cancer formation. *Biochem J.* 2010;425(2):303-311. doi:10.1042/BJ20091318
 23. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2009. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.004
 24. Scheel H, Hofmann K. A novel inter action motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Curr Biol.* 2003. doi:10.1016/j.cub.2003.11.007
 25. Han Y, Dong Q, Hao J, et al. RASSF4 is downregulated in nonsmall cell lung cancer and inhibits cancer cell proliferation and invasion. *Tumor Biol.* 2016. doi:10.1007/s13277-015-4343-9
 26. Chow LSN, Lo KW, Kwong J, Wong AYW, Huang DP. Aberrant methylation of RASSF4/AD037 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep.* 2004.
 27. Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009. doi:10.3892/or_00000596
 28. Feng X, Miao G, Han Y, Xu Y. CARMA3 is overexpressed in human glioma and promotes cell invasion through MMP9 regulation in A172 cell line. *Tumor Biol.* 2014. doi:10.1007/s13277-013-1018-2
 29. Dong QZ, Wang Y, Tang ZP, et al. Derlin-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes cancer cell invasion via EGFR-ERK-mediated up-regulation of MMP-2 and MMP-9. *Am J Pathol.* 2013. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.019
 30. Song H, Tian Z, Qin Y, Yao G, Fu S, Geng J. Astrocyte elevated gene-1 activates MMP9 to increase invasiveness of colorectal cancer. *Tumor Biol.* 2014. doi:10.1007/s13277-014-1883-3
 31. Jian H, Zhao Y, Liu B, Lu S. SEMA4B inhibits growth of non-small cell lung

- cancer in vitro and in vivo. *Cell Signal*. 2015. doi:10.1016/j.cellsig.2015.02.027
32. Chow LSN, Lo KW, Kwong J, et al. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2004. doi:10.1002/ijc.20079
 33. Lo KW, Kwong J, Hui ABY, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 2001.
 34. Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PML, Johnson PJ, Poon Huang D. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002.
 35. WHO. Global Health Observatory (GHO): Data Repository. GHO. doi:-
 36. Vishnevsky A. The demographic revolution is changing the reproductive strategy of *Homo sapiens*. *Demogr Rev*. 2014.
 37. Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res*. 2002. doi:10.4054/DemRes.2002.7.5
 38. F. Bray, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Siegel; RL, Torre; LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2018. doi:10.3322/caac.21492
 39. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017. doi:10.3322/caac.21387
 40. Masters G, Brockstein B. Overview of head and neck cancer. *Cancer Treat Res*. 2003. doi:10.1007/0-306-48060-3_1
 41. Cappello ZJ, Dublin AB. *Anatomy, Head and Neck, Nose Paranasal Sinuses*. StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763001>. Accessed February 11, 2019.
 42. Ellis H. Anatomy of the salivary glands. *Surg*. 2012;30(11):569-572. doi:10.1016/J.MPSUR.2012.09.008
 43. Chason HM, Downs BW. *Anatomy, Head and Neck, Parotid Gland*. StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30480958>. Accessed February 13, 2019.

44. Grewal JS, Bordoni B, Ryan J. *Anatomy, Head and Neck, Sublingual Gland*. StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30571047>. Accessed February 13, 2019.
45. Casale J, Varacallo M. *Anatomy, Head and Neck, Submandibular Triangle*. StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30521254>. Accessed February 13, 2019.
46. Head and Neck Cancers - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>. Accessed May 24, 2019.
47. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0347
48. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294-4301. doi:10.1200/JCO.2011.36.4596
49. Vogel DWT, Vogel T, Zbaeren P, Thoeny HC. Cancer of the oral cavity and oropharynx. *Cancer Imaging*. 2010. doi:10.1102/1470-7330.2010.0008
50. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: Results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007. doi:10.1093/aje/kwm193
51. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018. doi:10.1038/nrc.2018.11
52. Zhang Y, Koneva LA, Virani S, et al. Subtypes of HPV-positive head and neck cancers are associated with HPV characteristics, copy number alterations, PIK3CA mutation, and pathway signatures. *Clin Cancer Res*. 2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0323
53. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011. doi:10.1038/nrc2982
54. Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, et al. Comprehensive genomic

- characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015. doi:10.1038/nature14129
55. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med*. 2017. doi:10.1038/nm.4407
 56. Soong YL, Tham IWK. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. In: *Clinical Insights: Nasopharyngeal Carcinoma: Management Strategies*. ; 2014. doi:10.2217/EBO.13.596
 57. Olshan AF, Hashibe M. Cancer of the larynx. In: *Schottenfeld and Fraumeni Cancer Epidemiology and Prevention, Fourth Edition*. ; 2017. doi:10.1093/oso/9780190238667.003.0027
 58. Boffetta P, Richiardi L, Berrino F, et al. Occupation and larynx and hypopharynx cancer: An international case-control study in France, Italy, Spain, and Switzerland. *Cancer Causes Control*. 2003. doi:10.1023/A:1023699717598
 59. Luce D, G??rin M, Leclerc A, Morcet J ???F, Brug??re J, Goldberg M. Sinonasal cancer and occupational exposure to formaldehyde and other substances. *Int J Cancer*. 1993. doi:10.1002/ijc.2910530209
 60. Preston-martin S, Thomas DC, White SC, Cohen D. Prior exposure to medical and dental X-rays related to tumors of the parotid gland. *J Natl Cancer Inst*. 1988. doi:10.1093/jnci/80.12.943
 61. Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology*. 1997. doi:10.1097/00001648-199707000-00011
 62. Maruo S. Epstein-Barr virus and cancers. *Biotherapy*. 2005. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0670-3
 63. Kanakry JA, Ambinder RF. Epstein-Barr Virus Infection. In: *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Fifth Edition*. ; 2016. doi:10.1002/9781118416426.ch90
 64. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*.

2010. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
65. Shih TY, Weeks MO, Young HA, Scolnick EM. p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *J Virol.* 1979.
 66. Brunger AT, Milburn M V., Tong L, et al. Crystal structure of an active form of RAS protein, a complex of a GTP analog and the HRAS p21 catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci.* 1990. doi:10.1073/pnas.87.12.4849
 67. Samuel MS. Ras (H-, K-, N-Ras). In: Choi S, ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing; 2018:4463-4468. doi:10.1007/978-3-319-67199-4_67
 68. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):517-531. doi:10.1038/nrm2438
 69. Sefton BM, Trowbridge IS, Cooper JA, Scolnick EM. The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. *Cell.* 1982;31(2 Pt 1):465-474. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297767>. Accessed February 15, 2019.
 70. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(1):11-22. doi:10.1038/nrc969
 71. Schubbert S, Bollag G, Lyubynska N, et al. Biochemical and Functional Characterization of Germ Line KRAS Mutations. *Mol Cell Biol.* 2007. doi:10.1128/MCB.00965-07
 72. Rawat SJ, Chernoff J. Regulation of mammalian Ste20 (Mst) kinases. *Trends Biochem Sci.* 2015. doi:10.1016/j.tibs.2015.01.001
 73. van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2007. doi:10.1016/j.bbcan.2007.06.003
 74. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.* 2007. doi:10.1242/jcs.010389
 75. Jones, P. and Baylin S. : The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683-692, 2007. *Cell.* 2007.

76. Newton AC. Protein Kinase C: Seeing two domains. *Curr Biol*. 1995. doi:10.1016/S0960-9822(95)00191-6
77. Ponting CP, Benjamin DR. A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci*. 1996. doi:10.1016/S0968-0004(96)30038-8
78. Hwang E, Ryu K-S, Pääkkönen K, et al. Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 2007. doi:10.1073/pnas.0610716104
79. Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene*. 2003. doi:10.1038/sj.onc.1206984
80. Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL, et al. RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res*. 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0267
81. Vos MD, Martinez A, Elam C, et al. A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res*. 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0339
82. Liu L, Vo A, McKeehan WL. Specificity of the methylation-suppressed A isoform of candidate tumor suppressor RASSF1 for microtubule hyperstabilization is determined by cell death inducer C19ORF5. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3896
83. Vos MD, Dallol A, Eckfeld K, et al. The RASSF1A tumor suppressor activates bax via MOAP-1. *J Biol Chem*. 2006. doi:10.1074/jbc.M512128200
84. Jung H-Y, Jung JS, Whang YM, Kim YH. RASSF1A Suppresses Cell Migration through Inactivation of HDAC6 and Increase of Acetylated α -Tubulin. *Cancer Res Treat*. 2013;45(2):134-144. doi:10.4143/crt.2013.45.2.134
85. Kaverina I, Straube A. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol*. 2011. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.017
86. Romano D, Nguyen LK, Matallanas D, et al. Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. *Nat Cell Biol*. 2014. doi:10.1038/ncb2986

87. Li M, Chen D, Shiloh A, et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*. 2002. doi:10.1038/nature737
88. Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J*. 2008. doi:10.1038/emboj.2008.115
89. Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2003;18(2):665-677. doi:10.14670/HH-18.665
90. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*. 2001. doi:10.1093/jnci/93.9.691
91. Malpeli G, Amato E, Dandrea M, et al. Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors. *BMC Cancer*. 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-351
92. Harada K, Toyooka S, Maitra A, et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene*. 2002. doi:10.1038/sj.onc.1205446
93. Reeves ME, Firek M, Chen S-T, Amaar Y. The RASSF1 Gene and the Opposing Effects of the RASSF1A and RASSF1C Isoforms on Cell Proliferation and Apoptosis. *Mol Biol Int*. 2013. doi:10.1155/2013/145096
94. Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem*. 2000. doi:10.1074/jbc.C000463200
95. Lorenzato A, Martino C, Dani N, et al. The cellular apoptosis susceptibility CAS/CSE1L gene protects ovarian cancer cells from death by suppressing RASSF1C. *FASEB J*. 2012;26(6):2446-2456. doi:10.1096/fj.11-195982
96. Amaar YG, Baylink DJ, Mohan S. Ras-association domain family 1 protein, RASSF1C, is an IGFBP-5 binding partner and a potential regulator of osteoblast cell proliferation. *J Bone Miner Res*. 2005. doi:10.1359/JBMR.050311

97. Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, et al. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer*. 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-562
98. Reeves ME, Baldwin ML, Aragon R, et al. RASSF1C modulates the expression of a stem cell renewal gene, PIWIL1. *BMC Res Notes*. 2012. doi:10.1186/1756-0500-5-239
99. Prando É da C, Cavalli LR, Rainho CA. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. *Epigenetics*. 2011. doi:10.4161/epi.6.12.18271
100. Guo W, Cui L, Wang C, et al. Decreased expression of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C is associated with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2014. doi:10.1007/s10585-014-9646-5
101. Pelosi G, Fumagalli C, Trubia M, et al. Dual role of RASSF1 as a tumor suppressor and an oncogene in neuroendocrine tumors of the lung. *Anticancer Res*. 2010.
102. Comincini S, Castiglioni BM, Foti GM, Del Vecchio I, Ferretti L. Isolation and molecular characterization of rasfadin, a novel gene in the vicinity of the bovine prion gene. *Mamm Genome*. 2001. doi:10.1007/s003350010239
103. Hesson LB, Wilson R, Morton D, et al. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene*. 2005. doi:10.1038/sj.onc.1208566
104. Cooper WN, Dickinson RE, Dallol A, et al. Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer. *Oncogene*. 2008. doi:10.1038/sj.onc.1210805
105. Shen Z, Qin X, Yan M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cancer cell growth through a miR-7-RASSF2-PAR-4 axis in the tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.13609
106. Akino K, Toyota M, Suzuki H, et al. The ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005.

doi:10.1053/j.gastro.2005.03.051

107. Zhang Z, Sun D, Do N Van, Tang A, Hu L, Huang G. Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2007. doi:10.1002/ijc.22185
108. S. T, R. D, SG. J, XF. Z, J. A, GP. P. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene*. 2002. doi:10.1038/sj.onc.1205365
109. Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, et al. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G 1-S cell-cycle arrest via p53. *Cancer Res*. 2012. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0572
110. Jacquemart IC, Springs AEB, Chen WY. Rassf3 is responsible in part for resistance to mammary tumor development in neu transgenic mice. *Int J Oncol*. 2009. doi:10.3892/ijo_00000177
111. Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, et al. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014. doi:10.1016/j.lungcan.2013.10.014
112. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation. *Mol Cell Biol*. 2002. doi:10.1128/MCB.22.12.4309-4318.2002
113. De Smedt E, Maes K, Verhulst S, et al. Loss of RASSF4 expression in multiple myeloma promotes RAS-driven malignant progression. *Cancer Res*. 2018. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1544
114. Zhang M, Wang D, Zhu T, Yin R. RASSF4 Overexpression Inhibits the Proliferation, Invasion, EMT, and Wnt Signaling Pathway in Osteosarcoma Cells. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*. 2017. doi:10.3727/096504016x14719078133447
115. Crose LES, Galindo KA, Kephart JG, et al. Alveolar rhabdomyosarcoma-Associated PAX3-FOXO1 promotes tumorigenesis via Hippo pathway suppression. *J Clin Invest*. 2014. doi:10.1172/JCI67087
116. Chen YJ, Chang CL, Lee WR, Liou J. RAS SF4 controls SOCE and ER-PM

- junctions through regulation of PI(4,5)P2. *J Cell Biol.* 2017. doi:10.1083/jcb.201606047
117. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.021
 118. Dumur CI, Dechsukhum C, Ware JL, et al. Genome-wide detection of LOH in prostate cancer using human SNP microarray technology. *Genomics.* 2003. doi:10.1016/S0888-7543(03)00020-X
 119. Liu L, Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the rassf1a gene in prostate cancer. *Oncogene.* 2002. doi:10.1038/sj.onc.1205814
 120. Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem.* 1998. doi:10.1074/jbc.273.10.5439
 121. Chan JJ, Flatters D, Rodrigues-Lima F, Yan J, Thalassinou K, Katan M. Comparative analysis of interactions of RASSF1-10. *Adv Biol Regul.* 2013. doi:10.1016/j.jbior.2012.12.001
 122. Avruch J, Praskova M, Ortiz-Vega S, Liu M, Zhang XF. Nore1 and RASSF1 Regulation of Cell Proliferation and of the MST1/2 Kinases. *Methods Enzymol.* 2005. doi:10.1016/S0076-6879(05)07025-4
 123. Moshnikova A, Frye J, Shay JW, Minna JD, Khokhlatchev A V. The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. *J Biol Chem.* 2006. doi:10.1074/jbc.M511837200
 124. Kumari G, Singhal PK, Rao MRKS, Mahalingam S. Nuclear Transport of Ras-associated Tumor Suppressor Proteins: Different Transport Receptor Binding Specificities for Arginine-rich Nuclear Targeting Signals. *J Mol Biol.* 2007. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.026
 125. Aoyama Y, Avruch J, Zhang XF. Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. *Oncogene.* 2004. doi:10.1038/sj.onc.1207486
 126. Vos MD, Martinez A, Ellis CA, Vallecorsa T, Clark GJ. The pro-apoptotic RAS effector Nore1 may serve as a RAS-regulated tumor suppressor in the lung. *J*

- Biol Chem.* 2003. doi:10.1074/jbc.M211019200
127. Arora P, Basu A, Schmidt ML, et al. Nonstructural protein 5B promotes degradation of the NORE1A tumor suppressor to facilitate hepatitis C virus replication. *Hepatology.* 2017. doi:10.1002/hep.29049
 128. Macheiner D, Heller G, Kappel S, et al. NORE1B, a candidate tumor suppressor, is epigenetically silenced in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2006. doi:10.1016/j.jhep.2005.12.017
 129. Lee CK, Lee JH, Lee MG, et al. Epigenetic inactivation of the NORE1 gene correlates with malignant progression of colorectal tumors. *BMC Cancer.* 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-577
 130. Katagiri K, Imamura M, Kinashi T. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol.* 2006. doi:10.1038/ni1374
 131. Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, et al. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes. *J Biol Chem.* 2005. doi:10.1074/jbc.M409701200
 132. Morris MR, Hesson LB, Wagner KJ, et al. Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2003. doi:10.1038/sj.onc.1206914
 133. Geli J, Kogner P, Lanner F, et al. Assessment of NORE1A as a putative tumor suppressor in human neuroblastoma. *Int J Cancer.* 2008. doi:10.1002/ijc.23533
 134. Nakamura N, Carney JA, Jin L, et al. RASSF1A and NORE1A methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors. *Lab Invest.* 2005. doi:10.1038/labinvest.3700306
 135. Djos A, Martinsson T, Kogner P, Carén H. The RASSF gene family members RASSF5, RASSF6 and RASSF7 show frequent DNA methylation in neuroblastoma. *Mol Cancer.* 2012. doi:10.1186/1476-4598-11-40
 136. Donninger H, Calvisi DF, Barnoud T, et al. NORE1A is a Ras senescence effector that controls the apoptotic/senescent balance of p53 via HIPK2. *J Cell*

- Biol.* 2015. doi:10.1083/jcb.201408087
137. Bradley L, Koennig D, Tognoli ML, van der Vaart J, O'Neill E. RASSF Family. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing; 2018:4501-4523. doi:10.1007/978-3-319-67199-4_101852
 138. Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, et al. Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp Cell Res.* 2007. doi:10.1016/j.yexcr.2007.02.013
 139. Allen NPC, Donniger H, Vos MD, et al. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene.* 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210440
 140. Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, et al. Hippo pathway-dependent and-independent roles of RASSF6. *Sci Signal.* 2009. doi:10.1126/scisignal.2000300
 141. Iwasa H, Kudo T, Maimaiti S, et al. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J Biol Chem.* 2013. doi:10.1074/jbc.M113.507384
 142. Sarkar A, Iwasa H, Hossain S, et al. Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2. *FEBS Lett.* 2017. doi:10.1002/1873-3468.12551
 143. Liang YY, Zheng LS, Wu YZ, et al. RASSF6 promotes p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and apoptosis through activation of the JNK/SAPK pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Cell Cycle.* 2014. doi:10.4161/cc.28416
 144. Wen Y, Wang Q, Zhou C, et al. Decreased expression of RASSF6 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer patients after curative surgery. *Ann Surg Oncol.* 2011. doi:10.1245/s10434-011-1668-5
 145. Guo W, Dong Z, Guo Y, et al. Decreased expression and frequent promoter hypermethylation of RASSF2 and RASSF6 correlate with malignant progression and poor prognosis of gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Carcinog.* 2016. doi:10.1002/mc.22416
 146. Mezzanotte JJ, Hill V, Lee Schmidt M, et al. RASSF6 exhibits promoter

- hypermethylation in metastatic melanoma and inhibits invasion in melanoma cells. *Epigenetics*. 2014. doi:10.4161/15592294.2014.983361
147. Mi Y, Zhang D, Jiang W, et al. miR-181a-5p promotes the progression of gastric cancer via RASSF6-mediated MAPK signalling activation. *Cancer Lett*. 2017. doi:10.1016/j.canlet.2016.12.033
 148. Underhill-Day N, Hill V, Latif F. N-terminal RASSF family: RASSF7-RASSF10. *Epigenetics*. 2011.
 149. Saucedo LJ, Edgar BA. Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. doi:10.1038/nrm2221
 150. Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: Regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet*. 2003. doi:10.1093/hmg/ddg162
 151. Tsang HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*. 2006. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.003
 152. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4088
 153. Sherwood V, Manbodh R, Sheppard C, Chalmers AD. RASSF7 Is a Member of a New Family of RAS Association Domain-containing Proteins and Is Required for Completing Mitosis. *Mol Biol Cell*. 2008. doi:10.1091/mbc.e07-07-0652
 154. Recino A, Sherwood V, Flaxman A, et al. Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation, Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis. *Biochem J*. 2010. doi:10.1042/BJ20100883
 155. Liu ZH, Huo JL, Wu ZG, et al. RASSF7 expression and its regulatory roles on apoptosis in human intervertebral disc degeneration. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015.
 156. Takahashi S, Ebihara A, Kajiho H, Kontani K, Nishina H, Katada T. RASSF7

- negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ.* 2011. doi:10.1038/cdd.2010.137
157. Vasseur S, Malicet C, Calvo EL, et al. Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene. *Mol Cancer.* 2003. doi:10.1186/1476-4598-2-19
 158. Friess H, Ding J, Kleeff J, et al. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2003. doi:10.1007/s00018-003-3036-5
 159. Mutter GL, Baak JPA, Fitzgerald JT, et al. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol Oncol.* 2001. doi:10.1006/gyno.2001.6352
 160. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003. doi:10.3322/canjclin.53.1.5
 161. Lowe AW, Olsen M, Hao Y, et al. Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues. *PLoS One.* 2007. doi:10.1371/journal.pone.0000323
 162. Li X, Zhao G, Wang Y, Zhang J, Duan Z, Xin S. RASSF7 and RASSF8 proteins are predictive factors for development and metastasis in malignant thyroid neoplasms. *J Cancer Res Ther.* 2013. doi:10.4103/0973-1482.122519
 163. Tan DSP, Lambros MBK, Rayter S, et al. PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2009. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2403
 164. Gulsen T, Hadjicosti I, Li Y, Zhang X, Whitley PR, Chalmers AD. Truncated RASSF7 promotes centrosomal defects and cell death. *Dev Biol.* 2016. doi:10.1016/j.ydbio.2015.11.001
 165. Lock FE, Underhill-Day N, Dunwell T, et al. The RASSF8 candidate tumor suppressor inhibits cell growth and regulates the Wnt and NF- κ B signaling pathways. *Oncogene.* 2010. doi:10.1038/onc.2010.192
 166. Gariboldi M, Manenti G, Canzian F, et al. A major susceptibility locus to murine

- lung carcinogenesis maps on chromosome 6. *Nat Genet.* 1993. doi:10.1038/ng0293-132
167. Yanagitani N. Localization of a human lung adenocarcinoma susceptibility locus, possibly syntenic to the mouse *Pas1* locus, in the vicinity of the D12S1034 locus on chromosome 12p11.2-p12.1. *Carcinogenesis.* 2002. doi:10.1093/carcin/23.7.1177
 168. Falvella FS, Spinola M, Manenti G, et al. Common polymorphisms in D12S1034 flanking genes *RASSF8* and *BHLHB3* are not associated with lung adenocarcinoma risk. *Lung Cancer.* 2007. doi:10.1016/j.lungcan.2006.11.008
 169. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Flynn CM, et al. Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol.* 2005. doi:10.1371/journal.pbio.0030254
 170. Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer.* 2006. doi:10.1038/sj.bjc.6603117
 171. Langton PF, Colombani J, Chan EHY, Wepf A, Gstaiger M, Tapon N. The dASPP-dRASSF8 Complex Regulates Cell-Cell Adhesion during *Drosophila* Retinal Morphogenesis. *Curr Biol.* 2009. doi:10.1016/j.cub.2009.10.027
 172. Hemert MJ Van, Steensma HY, Van Heusden GPH. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays.* 2001.
 173. Jin J, Smith FD, Stark C, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol.* 2004. doi:10.1016/j.cub.2004.07.051
 174. Wang J, Hua W, Huang SK, et al. *RASSF8* regulates progression of cutaneous melanoma through nuclear factor- κ B. *Oncotarget.* 2015;6(30):30165-30177. doi:10.18632/oncotarget.5030
 175. Sánchez-Tomé E, Rivera B, Perea J, et al. Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. *J Gastroenterol.* 2015. doi:10.1007/s00535-014-1009-0
 176. Chen L, Johnson RC, Milgram SL. P-CIP1, a novel protein that interacts with the

- cytosolic domain of peptidylglycine α -amidating monooxygenase, is associated with endosomes. *J Biol Chem*. 1998. doi:10.1074/jbc.273.50.33524
177. Lee CM, Yang P, Chen LC, et al. A novel role of RASSF9 in maintaining epidermal homeostasis. *PLoS One*. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0017867
 178. Reeves N, Posakony JW. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS. *Dev Cell*. 2005. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.020
 179. Hill VK, Underhill-Day N, Krex D, et al. Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis. *Oncogene*. 2011. doi:10.1038/onc.2010.471
 180. Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, et al. The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. *Mol Cancer*. 2009. doi:10.1186/1476-4598-8-42
 181. Schagdarsurengin U, Richter AM, Wöhler C, Dammann RH. Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer. *Epigenetics*. 2009. doi:10.4161/epi.4.8.10056
 182. Helmbold P, Richter AM, Walesch S, et al. RASSF10 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin but uncommon in nevus cell nevi. *J Invest Dermatol*. 2012. doi:10.1038/jid.2011.380
 183. Richter AM, Walesch SK, Würfl P, Taubert H, Dammann RH. The tumor suppressor RASSF10 is upregulated upon contact inhibition and frequently epigenetically silenced in cancer. *Oncogenesis*. 2012. doi:10.1038/oncsis.2012.18
 184. *Nucleic Acid Purification Higher Genomic DNA Yields and Purity Using Your Favorite Format PureLink™ Genomic DNA Kits*. www.invitrogen.com. Accessed March 14, 2019.
 185. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004. doi:10.1038/nm1087
 186. Heimberger AB, Cazacu S, Paz N, et al. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*. 2007. doi:10.1101/gr.6493107
 187. Zhang ZC, Fu S, Wang F, Wang HY, Zeng YX, Shao JY. Oncogene mutational profile in nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014.

doi:10.2147/OTT.S58791

188. Kratz CP, Schubbert S, Bollag G, Niemeyer CM, Shannon KM, Zenker M. Germline mutations in components of the Ras signaling pathway in Noonan syndrome and related disorders. *Cell Cycle*. 2006. doi:10.4161/cc.5.15.3128
189. Ma BBY, Lui VWY, Poon FF, et al. Preclinical activity of gefitinib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma cell lines and biomarkers of response. *Invest New Drugs*. 2010. doi:10.1007/s10637-009-9316-7
190. Hui ABY, Lo KW, Teo PML, To KF, Huang DP. Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*. 2002.
191. Liu J, Liao Q, Zhang Y, Sun S, Zhong C, Liu X. Cyclin D1 G870A polymorphism and lung cancer risk: A meta-analysis. *Tumor Biol*. 2012. doi:10.1007/s13277-012-0397-0
192. Liu Y, Wang L, Lin XY, et al. The transcription factor DEC1 (BHLHE40/STRA13/SHARP-2) is negatively associated with TNM stage in non-small-cell lung cancer and inhibits the proliferation through cyclin D1 in A549 and BE1 cells. *Tumor Biol*. 2013. doi:10.1007/s13277-013-0697-z
193. Hesson L, Dallol A, Minna JD, Maher ER, Latif F. NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers. *Oncogene*. 2003. doi:10.1038/sj.onc.1206191
194. Morris MR, Hesson LB, Wagner KJ, et al. Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2003. doi:10.1038/sj.onc.1206914
195. Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, et al. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene*. 2002. doi:10.1038/sj/onc/1205192
196. Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, et al. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol*. 2002. doi:10.1016/S0960-9822(02)00683-8
197. Porter MJ, Field JK, Leung SF, et al. The detection of the c-myc and ras

- oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol.* 1994. doi:10.3109/00016489409126025
198. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003. doi:10.1056/NEJMra023075
 199. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, et al. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3972
 200. Xing M, Cohen Y, Mambo E, et al. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res.* 2004.
 201. Lehmann U, Länger F, Feist H, Glöckner S, Hasemeier B, Kreipe H. Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol.* 2002. doi:10.1016/S0002-9440(10)64880-8
 202. Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ülkü AS, Taylor BJ, Clark GJ. RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2003. doi:10.1074/jbc.M300554200
 203. Kaira K, Sunaga N, Tomizawa Y, et al. Epigenetic inactivation of the RAS-effector gene RASSF2 in lung cancers. *Int J Oncol.* 2007.
 204. Endoh M, Tamura G, Honda T, et al. RASSF2, a potential tumour suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2005. doi:10.1038/sj.bjc.6602854

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

(Hasta Bireyler İçin)

ÇALIŞMANIN ADI: “BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARDA RASSF4 GENİNİN İNCELENMESİ”

- o Çalışmamıza Baş boyun kanseri tanısı konulmuş 100 hasta birey katılacaktır.
- o Sizden ameliyat esnasında çıkarılacak olan tümörlü dokudan numune alınacaktır.
- o Ayrıca kemoterapi tedavisi başlamadan önce 5 cc kuru tüpte kan örneği alınacaktır.
- o Alınan doku örneklerinden DNA izolasyonu ve RNA izolasyonu işlemi yapılacaktır.
- o Alınan Kan örneğinden serum ayırma işlemi yapılacaktır.
- o Elde edilen DNA ve RNA örneklerinde hastalığınızın oluşmasında rol oynayabileceği düşünülen RASSF4 geninin Real time PCR yöntemi ile gen ekspresyonu ve tek gen mutasyonları incelenecektir. Bu çalışma direkt hastalık sonucu belirtmemekle birlikte kişiye söz konusu hastalıkla ilişkisi genetik yatkınlığa sahip olup olmadığını göstermektedir.
- o Elde edilen serum örnekleri ile RASSF4 serum düzeyleri tayin edilecektir.
- o Elde edilen DNA,RNA ve serum örnekleri bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.
- o Eğer başka bir çalışmada örneklerinizin kullanılması gerektiğinde sizden izin alınacaktır.
- o Uygulama esnasında hernagi bir rahatsızlık ve rsikle karşılaşmanız söz konusu değildir.
- o Bu çalışmada sizin hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir. Arzu ederseniz üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- o Kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- o Bu işlemler için sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

- o Bu çalışma için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- o Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır.
- o Çalışmaya katılmayı reddetmeniz gelecekteki takip ve tedaviniz üzerinde olumsuz etkisi bulunmayacaktır.
- o Çalışma kabul kriterlerin'e ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırmacının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- o Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.
- o Sayın Doç. Dr. Murat Ulsan tarafından İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.
- o Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
- o Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.
- o Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.
- o İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).
- o Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç Dr Murat Ulsan 'ı arayabileceğimi biliyorum.
- o Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya

katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

o Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

o İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı, İmzası

Doç Dr Murat Ulusan

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı, İmzası, Görevi

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1138

Tarih : 17.10.2017

Konu: Prof. Dr. H. Arzu ERGEN hk.

Sayın Prof. Dr. H. Arzu ERGEN
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi : Moleküler Tıp Anabilim Dalının 28/09/2017 gün ve 360411 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Msc. Emine Hande KARAGEDİK' in yürüteceği 2017/1110 dosya numaralı "Baş Boyun kanserli hastalarda RASSF4 geninin incelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 13/10/2017 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Baş Boyun kanserli hastalarda RASSF4 geninin incelenmesi"		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. H. Arzu ERGEN		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Tıp		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
		FAZ 4	☐	
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐	
		Yüksek Doz Araştırması	☐	
		Diğer ise belirtiniz :		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI

"Baş Boyun kanserli hastalarda RASSF4 geninin incelenmesi"

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	■			Türkçe ■	İngilizce □
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■			Türkçe ■	İngilizce □	Diğer □
OLGU RAPOR FORMU	□			Türkçe □	İngilizce □	Diğer □
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	□			Türkçe □	İngilizce □	Diğer □
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	□	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	□				
	SİGORTA	□				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	□				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	□				
	İLAN	□				
	YILLIK BİLDİRİM	□				
	SONUÇ RAPORU	□				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	□				
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD			
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No:16	Tarih: 13/10/2017			
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. H. Arzu ERGEN' in sorumluluğunda ve Msc. Emine Hande KARAGEDİK' in yürütmeyeği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ■ K □	E □ H ■	E □ H ■	E □ H ■	IZINLI	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E □ K ■	E □ H ■	E ■ H □	E ■ H □	IZINLI	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■ K □	E □ H ■	E □ H ■	E □ H ■	IZINLI	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■ K □	E □ H ■	E ■ H □	E ■ H □	IZINLI	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E □ K ■	E □ H ■	E ■ H □	E ■ H □	IZINLI	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARDA "RASSF"4 GENİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%8	%3	%1	%7
BENZERLİK İNDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİ KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%3
2	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.kanservakfi.com İnternet Kaynağı	<%1
5	tpog.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emine Hande	Soyadı	Karagedik
Doğ.Yeri	Sinop	Doğ.Tar.	10.06.1988
Email	handekaragedik@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2014
Lisans	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	2011
Lise	Şehit Osman Altinkuyu Anadolu Lisesi- Yalova	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	YökdiL	66,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	72,177	75,924	79,29
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office, 2010	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI INDEXLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. SB Kuran, EH Karagedik, C Iyibozkurt, ES Iplik, B Cakmakoglu, A Ergen "Prevalence of MMP-3 E45K polymorphism in Turkish patients with endometrial carcinoma" Medicine 7 (4), 762-5 -2018
2. Acar L., Atalan N., Karagedik E., Ergen H.A., "Tumour Necrosis Factor-alpha and Nuclear Factor-kappa B Gene Variants in Sepsis.", BALKAN MEDICAL JOURNAL, vol.-, 2017
3. Kucukhuseyin O., Ozgen T., Karagedik E.H., Cesur Y., Aydoğan H.Y., Yaylim I., et al., "The effects of Advanced Glycation End Products (RAGE)-374T/A and Gly82Ser variants and soluble-RAGE levels to obesity in children", CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.62, pp.9-14, 2016
4. Atalan N., Karagedik H., Acar L., Isbir S., Yilmaz S.G., Ergen H.A., et al., "Analysis of Toll-like Receptor 9 Gene Polymorphisms in Sepsis", IN VIVO, vol.30, pp.639-643, 2016
5. Özgen I.T., Torun E., Ergen H.A., Cesur Y., Karagedik H., Zeybek Ü., et al., "Myeloperoxidase 463 G > A and superoxide dismutase Ala16Val gene polymorphisms in obese children", TURKISH JOURNAL OF PEDIATRICS, vol.56, pp.511-517, 2014
6. Ergen H.A., Karagedik H., Karaali Z.E., Isbir T., "An Association between MPO-463 G/A Polymorphism and Type 2 Diabetes", FOLIA BIOLOGICA, vol.60, pp.108-112, 2014

DİĞER DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Karagedik E., Atalan N., Acar L., Ergen H.A., "Sepsiste Toll Like Reseptör-2'nin Rolünün İncelenmesi", Deneysel Tıp Dergisi, cilt.5, ss.3-9, 2015 (Link)
2. Yaylim İ., Küçüküseyin Ö., Karagedik E.H., Torun E., Özgen T., Yilmaz Aydoğan H., et al., "Is there any association between the variants of receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and obesity?", Diger, pp.291-291, 2013

HAKEMLİ KONGRE/SEMPOZYUM BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. Atalan N., Acar L., Karagedik E.H., Candan G., Ergen H.A., "Analysis of TLR-9 Gene Polymorphisms And Serum Levels In Sepsis. ", 6th International Congress of Molecular Medicine, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-25 Mayıs 2017, pp.75-75
2. Küçük hüseyin Ö., Karagedik E., Torun E., Ozgen T., Yaylim İ., Yilmaz Aydoğan H., et al., "The Effects of Soluble-RAGE Plasma Levels to the Development of Childhood Obesity in Girls. ", 6th International Congress of Molecular Medicine, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-25 Mayıs 2017, pp.137-137
3. Karagedik E., Atalan N., Acar L., İsbir T., Ergen H.A., "Effects Of Toll Like Receptor-2 In Septic Coronary Artery Patients", 5th International Congress of Molecular Medicine, İZMİR, TÜRKİYE, 20-22 Mayıs 2015, pp.56-56
4. Karagedik E.H., Atalan N., Timirci-Kahraman O., Acar L., Tunoğlu S., Çelikel B., İsbir T., Ergen H.A., "Effects Of Tlr-2 Polymorphisms On Sepsis", IFCC WorldLab, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-26 Haziran 2014, pp.959-959
5. Yaylim Eraltan İ., Küçük hüseyin Ö., Karagedik H., Torun E., Özgen T., Yilmaz Aydoğan H., Ergen H.A., "Is There Any Association Between The Variants Of Receptor For Advanced Glycation End Products (Rages) And Obesity?", 38th FEBS Congress, saint petersburg, RUSYA, 6-11 Temmuz 2013, pp.1-1
6. Küçük hüseyin Ö., Yanar K., Aygün E., Verim A., Turan S., Özkan N.E., Karagedik H., Seyhan M.F., Ergen H.A., Öztürk O., Cakatay U., Aydın S., Yaylim Eraltan İ., "The Effects Of Receptor For Advanced Glycation End Products (Rage) Gly82ser Variants On The Formation Of Frap Oxidant Parameteres In Laryngeal Cancer Patients", The 5th EMBO Meeting, amsterdam, HOLLANDA, 21-24 Eylül 2013, pp.1-1
7. Ergen H.A., İsbir S., Karagedik H., İsbir T., "Abca1 Gene Polymorphisms In Coronary Artery Disease", 81th European Atherosclerosis Society Congress, lyon, FRANSA, 2-5 Haziran 2013, pp.1-1
8. Ergen H.A., Ermiş Karaali Z., Zeybek Ş.Ü., Karagedik H., Yaylim Eraltan İ., "Tip2 Diyabette Myeloperoksidaz Gen Polimorfizminin Rolü", XXV.Ulusal Biyokimya Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 3-6 Eylül 2013, ss.1-1
9. Özgen I.T., Torun E., Ergen H.A., Cesur Y., Karagedik H., Zeybek Ş.Ü., Aksu M.Ş., Öktem F., "Obez Çocuklarda Myeloperoksidaz 463g>A Ve Manganez Superoksit Dismutaz Ala16val Gen Polimorfizimleri", XVII.Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 1-5 Ekim 2013, ss.161-161
10. Özgen I.T., Torun E., Ergen H.A., Cesur Y., Öktem F., Aksu M.Ş., Zeybek Ş.Ü., Karagedik H., "Myeloperoxidase G-463a Polymorphism In Obese Children With Metabolic Syndrome", 9th joint meeting of paediatric endocrinology, milano, ITALYA, 19-22 Eylül 2013, pp.111-111

11. Özgen I.T., Torun E., Ergen H.A., Karagedik H., Cesur Y., Aksu M.Ş., Öktem F., Zeybek Ş.Ü., "Manganase Superoxide Dismutase Ala16val Gene Polymorphism In Obese Children With Metabolic Syndrome", 9th joint meeting of paediatric endocrinology, milano, ITALYA, 19-22 Eylül 2013, pp.111-111
12. Karatoprak Ö., Karagedik H., Ermiş Karaali Z., Ergen H.A., "Mdr1 Gen Polimorfizmlerinin Tip2 Diyabette Rolü", XXV.Ulusal Biyokimya Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 3-6 Eylül 2013, ss.1-1
13. Nazlı Ezgi Ozkan, Saime Turan, Gurbet Korkmaz, Canan Cacina, Hande Karagedik, Soykan Arıkan, Esra Kaytan Sağlam, Gülay Tuna, Arzu Ergen, İlhan Yaylın. Alterations in Key Cellular Regulator Genes and Their Combined Effects on Colorectal Cancer. 12-14 June 2013 Systems Biology of Human Disease, Heidelberg.

PROJELER / ÖDÜLLER

İstanbul Üniversitesi 1512 Proje Patent Ödülü - 2018