

NADİN BEDİKYYAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA GNG7
GENİNİN METİLASYON VE EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

NADİN BEDİKYAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMRA DEMOKAN**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ BİLİM DALI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Sevgili anneannem Ani CEPKİN'e, dedem Garbis CEPKİN'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitüsü Müdürü Sayın **Prof. Dr. Ahmet KİZİR**'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR**'e

Yüksek lisans eğitimimde bilgi birikimi ile bana katkıda bulunarak; tez çalışmalarımı destekleyen saygıdeğer tez danışmanım Deneysel ve Moleküler Onkoloji Bilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Semra DEMOKAN**'a,

Hasta örneklerinin temininde yardımları için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan **Doç. Dr. Murat ULUSAN**'a,

Hastalara ait normal doku örneklerinin patolojik incelemelerinde yardımcı olan İstanbul Üniversitesinde Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı'ndan **Prof. Dr. Vakur OLGAÇ**'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen, değerli zamanlarını bana ayırarak her türlü yardımına el uzatan ve bütün konularda her zaman yanımda var olduklarını hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarım **Öğr. Gör. Sena ŞEN, MSc. Gizem ESENTÜRK YAYLA, MSc. Begüm BULUŞLU, Fulya KARAYEĞİT, Hüseyin Enes DERYA ve Madona GJONA**'ya,

Güvenleri, maddi ve manevi destekleri ve varlıklarıyla güçlü hissettiğim ve gerek akademik hayatımda gerek özel hayatımda her şeyimi borçlu bildiğim sevgili başta annem **Melida Sibil BEDİKYAN**, kardeşim **Karin BEDİKYAN** çekirdek aileme ve kedilerime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-35412

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epigenetik	3
2.1.1. DNA Metilasyonu	4
2.1.1.1. DNA Hipometilasyon.....	5
2.1.1.2. DNA Hipermetilasyonu	6
2.1.2. Histon Modifikasyonu.....	8
2.1.3. miRNA Regülasyonu	9
2.1.4. Kromatin Yeniden Düzenlemesi	10
2.2. Biyomarkerlar	10
2.3. Oral Kavite Anatomisi	11
2.4. Oral Skuamöz Hücre Karsinomu (OSCC).....	12
2.4.1. OSCC Epidemiyolojisi.....	13
2.4.2. OSCC Etiyolojisi.....	13
2.4.3. Oral Kavite Histopatoloji	16
2.4.4. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda Evreleme.....	18
2.4.5. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomun Biyolojisi	19
2.4.6. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomun Önlenmesi ve Kontrolü	20
2.4.7. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom Tedavisi	21
2.5. Guanine Nucleotide-Binding Protein γ 7 (GNG7).....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23

3.1. Materyal	23
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Karışımlar	25
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi	25
3.2.1.1. Doku Eldesi	25
3.2.1.2. Serum Eldesi	26
3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri	26
3.2.2.1. Dokudan DNA İzolasyonu	26
3.2.2.2. Serum Örneklerinden DNA İzolasyon İşlemi	27
3.2.3. Total RNA İzolasyonu	28
3.2.4. cDNA sentezi	29
3.2.5. Bisüfit Modifikasyon İşlemi	29
3.2.6. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Kullanımı	30
3.2.7. <i>GNG7</i> Geninin Relatif Metilasyon Seviyesinin QMSP ile Belirlenmesi	32
3.2.8. <i>GNG7</i> Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	33
3.2.9. Veri Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1. Hasta ve Sağlıklı Gruba Ait Klinik Parametreler	35
4.2. <i>GNG7</i> Geninin Promoter Bölgesinin Metilasyon Analizi	38
4.3. <i>GNG7</i> Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	60
HAM VERİLER	69
FORMLAR	70
ETİK KURUL KARARI	71
PATENT HAKKI İZNİ	72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	73
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Metilasyon İlişkili Kanserin Temel Özellikleri (50)	7
Tablo 2-2. miRNA'ların Kanser Çeşitleri ve Onların Etki Etmiş Olduğu Genler ile İlgili İlişkisi (59)	9
Tablo 2-3. Oral Kanserler ve Alt Gruplarının Sınıflandırılması (107)	16
Tablo 2-4. OSCC'de T Sınıfının Gösterimi (117)	18
Tablo 2-5. OSCC'de N Sınıfının Gösterimi (117)	19
Tablo 2-6. OSCC'de M Sınıfının Gösterimi (117)	19
Tablo 3-1. Doku- DNA izolasyonu prosedürü	26
Tablo 3-2. Likit Biyopsi Örneklerinden DNA izolasyon protokolü	27
Tablo 3-3. Total RNA izolasyonu protokolü	28
Tablo 3-4. cDNA Reaksiyon Koşulları	29
Tablo 3-5. Bisüfit Dönüşüm Protokolü	30
Tablo 3-6. <i>GNG7</i> ve <i>ACTB</i> Genlerine Ait Ekspresyon Primer Dizileri	31
Tablo 3-7. <i>GNG7</i> ve <i>ACTB</i> Genleri Promoter Bölgesinde Metile Bölgeye Özgü Primer Dizileri	31
Tablo 3-8. <i>GNG7</i> ve <i>ACTB</i> Geni Metile Bölgeye Özgü Prob Dizileri	32
Tablo 3-9. Metilasyon Deneyleri İçin QMSP Reaksiyon Karışımı	32
Tablo 3-10. Metilasyon Deneyleri İçin PCR Reaksiyon Koşulları	33
Tablo 3-11. Mix Reaksiyon Karışımı	33
Tablo 3-12. QRT-PCR'ın Reaksiyon Koşulları	34
Tablo 4-1. Oral Malin Tümöre Sahip Hastaların Klinikopatolojik Verileri	35
Tablo 4-2. Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Parametreler	36
Tablo 4-3. Malin Hastaların TNM Sınıflanması	38
Tablo 4-4. OSCC Hastalarının Anatomik Tutulum Bölgelerine Göre Ekspresyon Durumu	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Sitozinin SAM ve metiltransferazlar aracılığı ile metillenmesi (26)	5
Şekil 2-2. CpG adacıklarında metilasyon olayının gösterimi(49)	6
Şekil 2-3. Normal ve kanser hücrelerinde DNA Hipo/Hiper Metilasyonunun Şematize Edilmesi (46).....	7
Şekil 2-4. DNA Üzerindeki Histon Proteinlerinin Gösterimi (53)	8
Şekil 2-5. Baş ve Boyun Bölgesinin Anatomik Bölgelerin Gösterimi (72).....	12
Şekil 2-6. Sol Bukkal Mukozada Skuamöz Hücreli Karsinom (80).....	13
Şekil 3-1. Sitozinin Urasil Bazına Dönüşümü (140)	30
Şekil 3-2. <i>GNG7</i> Geninin Promoter Bölgesindeki CpG Adacıklarının Dağılımının Methprimer Programı ile Gösterimi	31
Şekil 4-1. Kadın ve Erkek Bulunma Yüzdelelerinin Malin & Sağlıklı Gruplara Göre Genel Dağılımı	37
Şekil 4-2. Sigara ve Alkol Kullanım Yüzdelelerinin Malin & Sağlıklı Gruplara Göre Genel Dağılımı	37
Şekil 4-3. Malin Hastaların TNM Sınıflamasına Bağlı Görülen Evre Oranları	38
Şekil 4-4. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarının <i>ACTB</i> Genindeki Amplifikasyon Eğrileri	39
Şekil 4-5. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarının <i>GNG7</i> Genindeki Amplifikasyon Eğrileri	39
Şekil 4-6. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarında <i>ACTB</i> ve <i>GNG7</i> Genlerindeki Standart Eğrileri.....	40
Şekil 4-7. OSCC Hastalarına Ait Tümör ve Eşlenik Normal Doku ile Serum Örneklerindeki Metilasyon Değerleri	40
Şekil 4-8. OSCC Hastalarının Anatomik Tutulumuna Göre <i>GNG7</i> Geninin Metilasyon Düzeyleri.....	41
Şekil 4-9. OSCC Hastalarına Ait Sigara Kullanımına Bağlı Tümör ve Eşlenik Normal Dokularındaki Metilasyon Durumlarının Gösterimi (p=0,0141).....	42
Şekil 4-10. Tümör dokusu ile sağlıklı mukoza arasındaki <i>GNG7</i> metilasyonunu ROC analizi.....	43
Şekil 4-11. Tümör ve Eşlenik Normal Doku Örneklerinde <i>GNG7</i> Geninin Ekspresyon Seviyelerinin Amplifikasyon Örnekleri.....	44

Şekil 4-12. <i>GNG7</i> Geninin OSCC Hastalarına Ait Tümör ve Eşlenik Normal Dokularının Ekspresyon Seviyelerinin Δ Ct Değerleri (Kırmızı: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyeside artma, Yeşil: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyeside azalma, Gri: Malin hasta grubunda) ($p < 0.0001$).....	45
Şekil 4-13. OSCC Hastalarının ve Sağlıklı Bireylerin Serum Örneklerindeki Ekspresyon Δ Ct Değerleri	46
Şekil 4-14. OSCC Hastalarının Tümör, Eşlenik Normal Doku, Serum Örneklerinin Ekspresyon Seviyelerinin Δ Ct Değerleri (P: OSCC Hasta Kodlaması, Mor: Serum örneklerinin Δ Ct değerleri, Kırmızı: Eşlenik normal doku örneklerinin Δ Ct değerleri, Yeşil: Tümör doku örneklerinin Δ Ct değerleri).....	47
Şekil 4-15. Sağlıklı Bireylere Ait Normal Mukoza, Serum Örneklerinin Ekspresyon Seviyelerinin Δ Ct Değerleri (S: Sağlıklı, Mavi: Sağlıklı serum örneklerinin Δ Ct değerleri, Sarı: Sağlıklı mukoza örneklerinin Δ Ct değerleri)	48
Şekil 4-16. OSCC hastalarının <i>GNG7</i> Geninin Ekspresyonda Artış ve Azalışa Bağlı Olarak Sigara Kullanımının Gösterilmesi ($p = 0,0001$).....	49
Şekil 4-17. OSCC hastalarının <i>GNG7</i> Geninin Alkol Kullanımına Bağlı Ekspresyonda Artış ve Azalışının Gösterilmesi.....	50
Şekil 4-18. OSCC Hastalarının Anatomik Tutulumuna Göre <i>GNG7</i> Geninin Ekspresyon Düzeyleri.....	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DNA: Deoksiribonükleik asit

cDNA: Komplementer DNA

BC-DNA: Bisülfiditmodifiye edilmiş DNA

RNA: Ribonükleik asit

miRNA: mikroRNA

CpG: Sitozin-Guanin adacıkları

HPV: İnsan Papiloma Virüsü

HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

HNSCC: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom

OSCC: Oral skuamöz hücreli karsinom

SAM: S-adenozil-L-metiyonin

DNMT: DNA metil transferaz enzimi

5-mC: 5-metilsitozin

TSG: Tümör baskılayıcı gen

GPCR: G protein bağımlı reseptörler

QMSP: Kantitatif Meitlasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

QRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GNG 7: Guanin nükleotid bağlayıcı gamma (γ) 7 geni

ACTB: Beta aktin geni

GTP: Guanintrifosfat

GDP: Guanindifosfat

mRNA: Haberci RNA

LN-DNA: Lenfosit DNA'sı

FAM-TAMRA: 6-florosein amitid-Karboksitetrametilrodamin

ÖZET

BEDİKYAN, N. (2021). Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda *GNG7* Geninin Metilasyon ve Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışmamızda, Demokan ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları Kuzey Amerikalı baş boyun kanserli hastalar ile yaptıkları çalışmalarında bu grubun bir alt grubu olan oral kavite kanserli hastalarda (n=9) tümör süpresör bir gen olan *GNG7*'nin %88,9 oranında metilasyonuna rastlanmış, söz konusu genin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin daha geniş sayıda oral skuamöz hücreli karsinomlu (OSCC) Türk hasta grubunda incelenmesi amaçlanmıştır. İnvaziv/non-invaziv yöntem geliştirerek OSCC'de tanı/erken teşhiste *GNG7*'nin biyomarker olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda OSCC tanısı almış 50 hastaya ait ameliyat sonrasında elde edilmiş tümör, eşlenik normal doku örnekleri ve ameliyat öncesi toplanan serum örnekleri ile 10 sağlıklı bireyin normal mukoza ve serum örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak *GNG7* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyeleri incelenip, metilasyona bağımlı/bağımsız ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Metilasyon analizi için QMSP, ekspresyon düzeylerinin analizi için ise QRT-PCR yöntemleri uygulanmıştır. Tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla hastaların %48'inde (24/50) ekspresyon seviyesinde azalış, %32'sinde (16/50) ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Dokuz hastaya (%18) ait tümör dokusunda genin promoter bölgesinde metilasyon gözlenirken, eşlenik normal doku ve serum örneklerinde metilasyona rastlanmadı. Metilasyon saptanan 9 hastanın 7'sinde (%77,8) ekspresyon oranında azalma gözlenirken, 2 hastada ekspresyon artışı bulundu. Tüm hastaların normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklıların doku ve serum örneklerinde *GNG7* metilasyonu tespit edilmedi. Metilasyon gözlenen OSCC hastalarında sağlıklı bireylere oranla 35 kat ekspresyonunda azalma saptandı. Ekspresyon seviyesinde artış ile nüks arasında (p=0,05) ve sigara kullanımına bağlı olarak ekspresyon seviyelerindeki artış ve azalış arasında ileri derecede istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir (p=0,0001). *GNG7* geninin OSCC hastalarının alt gruplarında yapılacak daha geniş popülasyon içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *GNG7* geninin, OSCC'nin tanı/erken teşhis ve takibinde biyomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Oral skuamöz hücreli karsinoma, *GNG7* geni, Epigenetik, Ekspresyon, Metilasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TYL-2019-35412

ABSTRACT

Bedikyan, N. (2021). Investigation of methylation and expression levels of the *GNG7* gene in oral squamous cell carcinoma. Istanbul University Oncology Institute, Basic Oncology Department. Master Thesis. Istanbul.

Demokan et al. identified 88.9% methylation of *GNG7*, a tumor suppressor gene, among patients with oral cavity cancer (n=9), a subgroup of head and neck cancer patients, in their study with North American head and neck cancer patients published in 2013. We hope to define the applicability of *GNG7* as a biomarker for diagnosis / early diagnosis of OSCC by establishing an invasive/noninvasive technique. In this investigation, we collected tumor, normal, and serum samples from 50 patients with OSCC who were diagnosed and treated, as well as normal mucosal tissue and serum samples from 10 healthy individuals. The ratio of methylation and expression of the *GNG7* gene, as well as the downregulation of the expression ratio due to methylation, were studied after the DNA was isolated. To demonstrate methylation, the QMSP method was utilized, and the QRT-PCR method was used to define expression levels. While decreased expression levels were found in 48% (24/50) of tumor tissue after the study, increased expression levels were found in 32% (16/50). No significant change in expression levels was observed in 20% (10/50) of the patients. Methylation was identified in the promoter region of the gene in 18% (9/50) of the patients' tumor tissues. Reduced expression levels were seen in 7 of 9 (77.8%) of the patients who had methylation. In matched-normal OSCC tissue and serum samples, as well as normal mucosa and serum samples from healthy people, no methylation was identified. The gene's expression was shown to be 35 fold lower in OSCC patients with methylation than in the general population. After research with larger numbers of OSCC patients, it may be able to use the *GNG7* gene, which has no methylation in healthy people, as a biomarker for OSCC early diagnosis and follow-up.

Key Words: Oral squamous cell carcinoma, *GNG7* gene, Epigenetics, Expression, Methylation,

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2019-35412

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kanser, ölüme sebebiyet veren bir sağlık sorunudur (1). Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yayınlanan verilere göre birinci veya ikinci ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (2). Amerikan Kanser Derneği'nin 2021 tahmini verilerine göre yılda Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.898.160 yeni kanser vakası ve 608.570 mortalite oranı bildirilmiştir (3).

Kanser; anormal hücrelerin, hücre bölünmesinin kontrol edilemeyecek düzeye gelip karmaşık hal alması ile ortaya çıkan bir durumdur (4). Kanser hücreleri metastaz yaparak vücuttaki başka doku veya organların yayılımına neden olabilmektedir (5). Yapılan çalışmalar ile birlikte kansere sebebiyet veren temel nedenlerin genetik ve epigenetik modifikasyonlar olduğu ortaya çıkmıştır (6).

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu epigenetik terimi ve epigenetiğin ilişkili olduğu mekanizmalar gündeme getirilerek bilime katkıda bulunulmuştur (7). Epigenetik değişiklikler arasında en çok bilinen mekanizma DNA metilasyonudur (8). Araştırmalar, epigenetik mekanizmaların birçok çevresel faktör ile değişkenlik gösterdiğini (9) epigenetik mekanizmalarda oluşan hataların kanser, nörolojik hastalıklar ve immun sistemi gibi hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynadığını bildirmişlerdir (7).

Oral kavite kanserleri baş ve boyun bölgesindeki en çok rastlanan neoplastik lezyonların başında gelmektedir (10). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (HNSCC); oral kavite, orofarinks, hipofarenks, larinks ve nazofarenksin mukozasından kaynaklanan bir neoplazmik durumdur. Dünya çapında görülme sıklığı 6.sırada yer almaktadır. Dudak ve oral kavitede görülen vaka sayısı 354.864; mortalite oranı ise 177.384 iken Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 21.500'den fazla oral karsinom teşhisi konulmaktadır (2, 10, 11). Öncelikli olarak tedavi belirlendikten sonra cerrahi veya brakiterapi erken evrede amaçlanırken, ileri evre için sadece sağkalım amaçlanmayıp, hastanın yaşam kalitesi için de palyatif tedavi söz konusu olmaktadır (12). Radyasyon ile tedavi (RT) de, baş ve boyun kanserli hastalarda en yaygın tedavi seçeneğindendir (13). Metastaz evresinde, kemoterapi endikedir. Bugüne kadar, moleküler testlerin kullanımı baş ve boyun kanserinde uygulanmamaktadır (14).

Baş-boyun kanserlerinde; *Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein 7(GNG7)* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin Prof. Dr. Semra Demokan ve ark. (2013) tarafından araştırıldığı çalışmada, *GNG7* geninin baş-boyun kanserlerinin erken tanısı için potansiyel bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir. *GNG7*; 19. kromozomda lokalizedir ve GTPaz aktivitesine sahip büyük G protein gama ailesinde yer alıp transmembran sinyal yollarında rol oynamaktadır. Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının 2013'te International Journal of Oncology dergisinde yayınlanan çalışmasında, HNSCC'de epigenetik yolla baskılanan yeni genleri tanımlamak amacıyla farmakolojik demetilasyon ve genişletilmiş mRNA ekspresyon profillemeye yaklaşımı ile mikroarray ekspresyon analizi yöntemleri kullanılmıştır. 2 adet HNSCC hücre soyu, 5-aza-2'-deoxycytidine ile muamele edildikten sonra 13 HNSCC tümörü ve 5 normal mukoza örneği ile Affymetrix 47K mRNA gen ekspresyon array ile incelenerek gen profilleri elde edildi ve hücre soyu verileriyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen 126 aday genin promotör bölgeleri bisülfid DNA dizi analizi yöntemi ile incelenip ve HNSCC'de farklı seviyelerde hipermetile olan 7 aday gen tespit edilmiştir. Seçilen genlerin metilasyon durumları QMSP yöntemiyle 22 normal tükürük, 14 normal mukoza ve 33 HNSCC tümör örneğinde incelenmiştir. QMSP yöntemi ile validasyon sonrası, HNSCC ile ilişkili 3 gen tanımlanmıştır. Tanımlanan aday genlerden *Guanine Nucleotide-Binding Protein Gamma-7 (GNG7)*, geni tümör örneklerinde yüksek derecede metile ve normal tükürük ile mukoza örneklerinde ise metillenmemiş olduğundan bu genin, HNSCC tümör dokusuna özgü metilasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. HNSCC için potansiyel biyomarker adayı olarak tespit edilmiştir. Toplam hasta popülasyonunun içinde bulunan 9 oral kavite tümörlü hastanın 8'sinde *GNG7* geninde metilasyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu nedenle önerilen tez projemizde Türk popülasyonunda OSCC tanılı hastaların doku ve serum örneklerinde *GNG7* geninin metilasyon durumu ve metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Daha geniş hasta grubunda ileri validasyonunun yapılması ile biyomarker olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Böylece invaziv/non-invaziv yöntem geliştirilerek tanı/erken teşhiste *GNG7* geninin biyomarker olarak kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenilmiştir (15).

2. GENEL BİLGİLER

Kanser; dokuların anormal büyümesi ile karakterize, tümör baskılayıcı genler ile onkogenlerde moleküler düzeyde meydana gelen genetik/epigenetik değişiklikten kaynaklanan, farklı biyolojik özelliklere sahip bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Sürekli olarak proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılayıcılardan ve apoptozdan kaçış, doku invazyonu ve kan ve/veya lenf yolu ile metastaz, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kurtulma, düzensiz hücresel enerji üretimi, genomik instabilite ve inflamasyon kanser hücrelerinin özellikleri arasında yer almaktadır (16, 17). Kanser oluşumunda rol oynayan onkogenlerin aktivasyonuna bağlı tümör baskılayıcı genlerdeki sessizleşme (18) ve çevresel bazı etkilerin (19) yanısıra epigenetik mekanizmalarında meydana gelen birtakım değişiklikler de kanseri daha da komplike hale gelmesine neden olmaktadır (20).

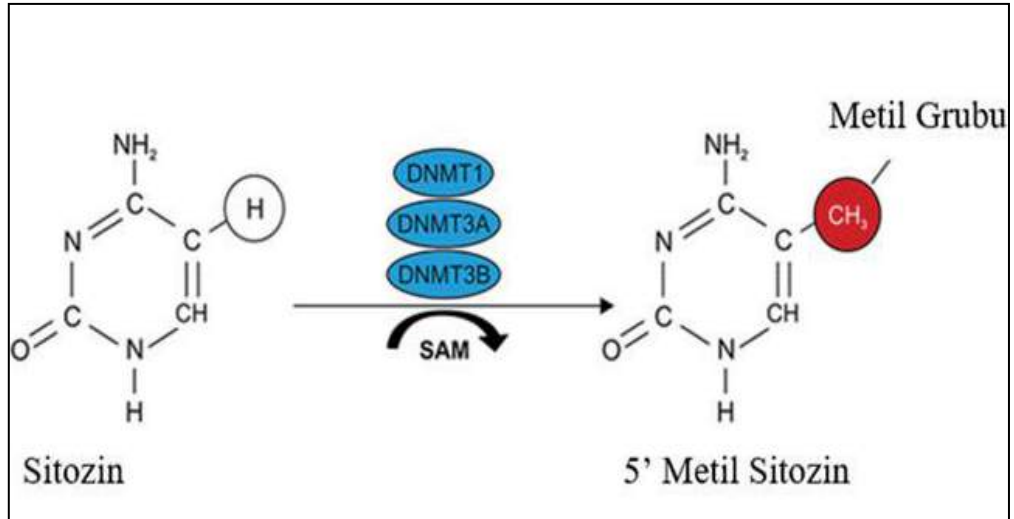
2.1. Epigenetik

“Epigenetik” teriminin kullanımı 1942’de İngiliz embriyolog ve biyolog Conrad Hal Waddington’ın meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) üzerinde yaptığı araştırmalar sonucu (21) gelişimsel çevre, gen regülasyonu ve genotip-fenotip etkileşimleri incelemiştir (22), daha sonraki yıllarda fenotipi ortaya çıkaran genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyolojinin alt dalı olarak belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalar sonucu, neredeyse her çeşit kanserde, bilişsel işlev bozuklukları, solunum, kardiyovasküler, üreme, bağışıklık ve nörodavranışsal hastalıklar da dahil olmak üzere birçok çeşit hastalığın nedeni epigenetik mekanizmalar olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte; tütün dumanı, egzoz, ağır metaller, aromatik hidrokarbonlar, hormonlar, virüs, bakteri gibi bazı kimyasal ve biyolojik ajanların epigenetik mekanizmaların değişimine yol açması birçok araştırmaların konusu olmuştur (23).

Epigenetik mekanizmalar; DNA dizilerinde değişiklik gözlenmeksizin genlerin ekspresyonunda meydana gelen geri dönüşümlü değişiklikler olup DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonları, nükleozom pozisyonunu ve kodlanmayan RNA regülasyonu olmak üzere 4 grupta incelenmektedir (24).

2.1.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, metil ($-CH_3$) grubunun DNA'nın sitozin halkasının C-5 pozisyonuna DNA metiltransferazlar (DNMTs) aracılığı ile kimyasal olarak bağlanması işlemidir (25). Şekil 2-1'de sitozinin 5' metil sitozine dönüşümü gösterilmiştir (26). DNA metilasyonunun %98'inden fazlası somatik hücrelerde görülüp (27) genellikle promoter bölgelerinde yer alan ve CpG adacıkları (CpGI)(5) olarak adlandırılan ortalama 1000 baz çifti (bp) uzunluğunda, Guanin (G) ve Sitozin(C) bakımından metillenmemiş yüksek baz içeriği bakımından uygun olan bölgeler içermektedir (28). DNA metilasyonu; DNMT1, DNMT1B, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B olan DNMT ailesi tarafından sağlanmaktadır (29). Bu işlem gerçekleşirken DNMT grubu, bir metil grubunun S-adenosilmetionin (SAM) aracılığı ile DNA'ya transfer etmektedir. Memelilerde DNMT enzim ailesinde yalnızca DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B metiltransferaz enzim görevini üstlenmektedir (30). DNMT1; memelilerde sitozinin metilasyon sonucu genin işlev kaybına yol açılmasında rol oynarken (31) DNMT3A, DNMT3B; metillenmeyen CpG adacıklarındaki sitozinler ile ilişkili olan *de novo* metiltransferazlar olarak görev alırlar (32). Memeli hücrelerinde DNA metilasyonu, CpG adacıklarında bulunan sitozin bazının 5-pozisyonunda 5mC (5-metilsitozin) olarak isimlendirilmektedir (33). DNMT2 ise; diğer enzimlere göre daha zayıf DNA metiltransferaz aktiviteye sahip olmakla birlikte transfer RNA (tRNA) metiltransferaz fonksiyonuna sahiptir (34). DNA metilasyonunun insanlarda spesifik genlerin regülasyonu, genomik imprinting, X-kromozomal inaktivasyonu, genom savunması işlevleri bulunmakta (35), tüm kanser formlarında da tümörögenез ile ilişkili olduğu bilinmektedir (36).



Şekil 2-1. Sitozinin SAM ve metiltransferazlar aracılığı ile metillenmesi (26)

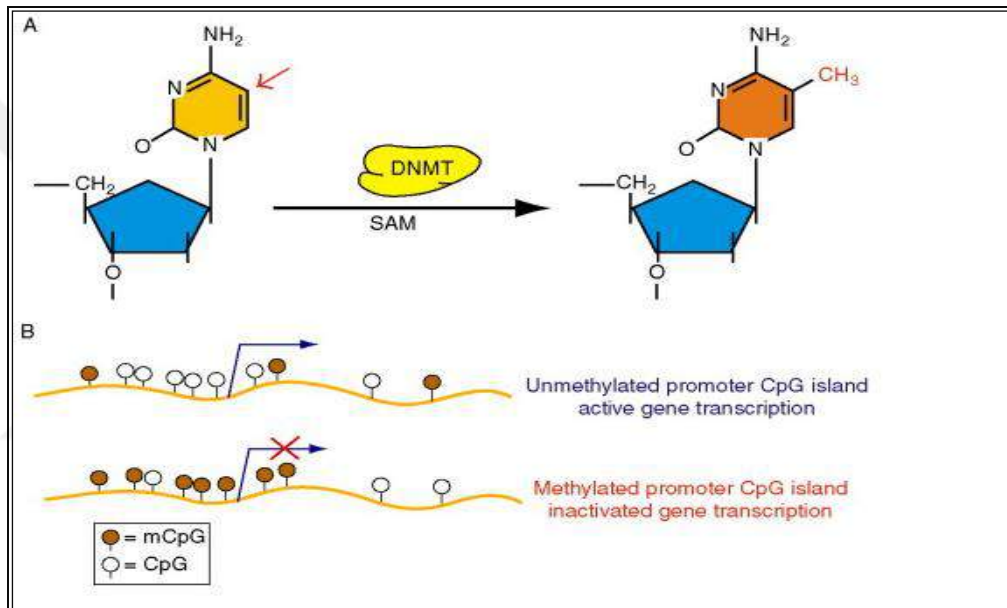
2.1.1.1. DNA Hipometilasyon

DNA hipometilasyonu; insan tümör dokularında analiz edilen ilk epigenetik değişikliktir (37). Genomda yüksek oranda tekrarlanan dizilerde DNA metilasyonu bulunmuştur (Alu repeat vb.) (38). Kanserde yaygın olarak görülen global DNA hipometilasyonun potansiyel şekilde onkogenlerin aktivasyonunda ve kromozomal değişikliklerde (39), genomun yaklaşık ~%17'sini oluşturan tekrarlayan elementlerin (RE) ifadesi de dahil olmak üzere görev aldığı, bu durumun sonucunda karsinogeneze yol açtığı bilinmektedir (40).

Ek olarak DNA hipometilasyonu, cis'te ekspresyonu baskılanan tümör baskılayıcı genlerin promoterlerinde gözlemlenerek kanser oluşumunu hızlandırabilmektedir (41). Kolorektal kanserler; insan karsinogenezinde araştırılan önemli bir sistem olmakla birlikte epigenetik modifikasyonlarından biri olan DNA hipometilasyonun ile ilişkilendirilerek (42), kolorektal kanserlerin genetik ve epigenetik mekanizmaların rol oynadığı normal kolon epitelinden; adenoma invaziv ve metastatik kansere yol açan basamakları içeren Vogelstein'ın tümör ilerleme modeliyle birlikte ele alınmaktadır (43).

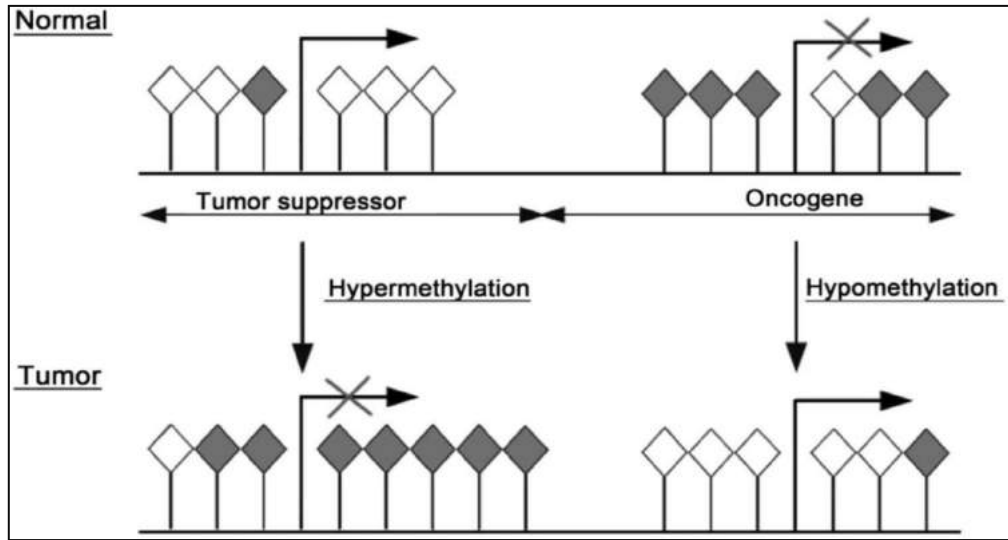
2.1.1.2. DNA Hipermetilasyonu

1948 yılında Rollin Hotchkiss ilk olarak kağıt kromatografisi kullanarak pnömokok DNA'sı ve buzağı timus DNA'sı ile yapılan çalışmalarında (44) DNA bileşenlerini ayırarak nükleo-bazlardan timin, adenin, sitozin ve guanine ek olarak sitozinden biraz büyük olan "episitozin" olarak adlandırılan nükleo-bazı keşfetmiştir (45). Metilasyonların rolü Şekil 2-3'de(46) gösterilmiş olup, S-adenozil metiyonin (SAM) metil donörü olarak görev almaktadır (47). Böylelikle DNMT'lerin metiltransferaz işlevi C-terminal bölgesi, S-adenozilmetiyonin tarafından metil grubunun CpG adacıklarındaki yoğun sitozin bazına bağlanmasını sağlamaktadır (48).



Şekil 2-2. CpG adacıklarında metilasyon olayının gösterimi(49)

Şekil 2-2'de SAM ve DNMT tarafından sitozin bazının metillenmesi gösterilirken B'de koyu kahve rengi şeklin, metillenmiş CpG adacıklarının gen transkripsiyonunu susturduğu, beyaz şeklin ise unmetile bölgelerin gen transkripsiyonu işleyişine engel olmadığını göstermektedir (49).



Şekil 2-3. Normal ve kanser hücrelerinde DNA Hipo/Hiper Metilasyonunun Şematize Edilmesi (46)

Kanser, tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgesinin hipermetilasyonu sonucunda bu genlerin inaktive olması ile korele halindedir (49). Yapılan çalışmalarda; *BRCA1*, *Rb*, *p53* gibi bazı tümör baskılayıcı genlerdeki CpG adacıklarının hipermetilasyon veya hipometilasyonunun görülmesi prostat, meme, glioblastoma, mide, karaciğer ve lösemi gibi birçok kanser çeşitlerinin görülmesine yol açmaktadır. Tablo 2-1’de verilen tümör baskılayıcı genler ve yol açtıkları kanser türleri gösterilmiştir (50).

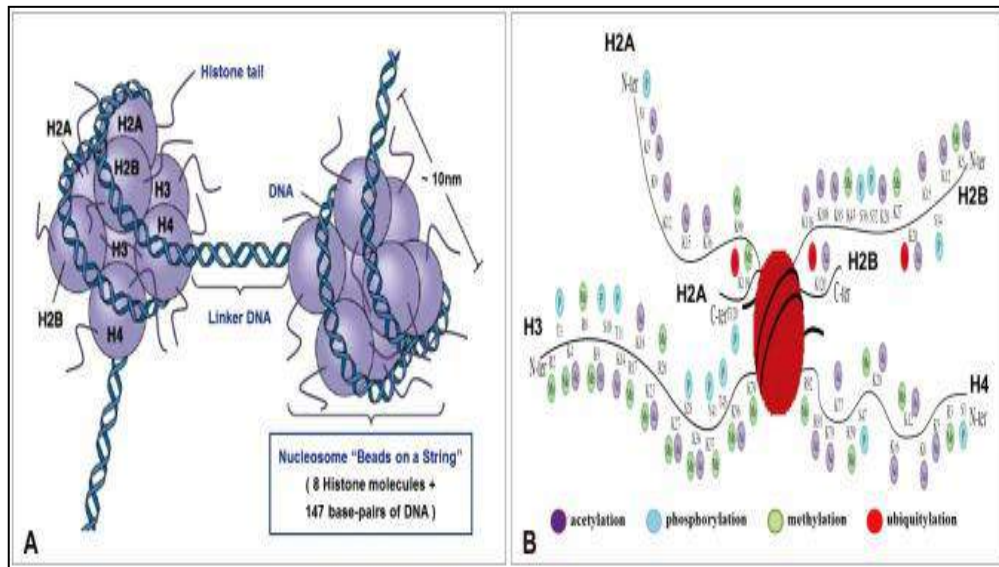
Tablo 2-1. Metilasyon İlişkili Kanser Temel Özellikleri (50)

Hallmark (kazanılan özellikler)	Genler
Büyüme karşı sinyallerine duyarsızlık	<i>p16CDKN2A</i> <i>RARβ</i> <i>Sigma 14-3-3</i>
Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik	<i>RASSF1A</i>
Apoptozdan kaçış	<i>Capase-8</i> <i>TMS1</i> <i>DAP-kinase</i> <i>p14ARF</i>
Sınırsız çoğalma potansiyeli	<i>Rb</i>
Sürekli anjiyogenez	<i>Thrombospondin-1</i> <i>VHL</i>

İnvazyon ve metastaz artışı	<i>E-cadherin</i> <i>TIMP3</i>
Genomik instabilite	<i>hMLH1</i> <i>MGMT</i> <i>BRCA1</i>

2.1.2. Histon Modifikasyonu

Genomik DNA, histon veya histon olmayan proteinler tarafından kromatin adı verilen sıkı ve korunaklı bir yapı halinde ökaryot hücrelerin çekirdeklerinde bulunmaktadır. Kromatinin temelinde çekirdek histon proteinleri adı verilen dört çeşit H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinden iki kopya bulunmaktadır. Histon proteinlerinin etrafına 147 DNA baz çiftinin yaklaşık 1,6 kez dolanması ile nükleozom adı verilen yapılar meydana gelmekte (51), kromatinin bölgelerinde meydana gelen aktivasyon veya baskılanma durumunu kontrol etmek amacı ile küresel biçimde katlı olarak bulunmaktadır (52). Bağlayıcı histonlar olan H1, iki nükleozom arasında bulunarak nükleozomların bağlanmasına yardımcı olmaktadır (53).



Şekil 2-4. DNA Üzerindeki Histon Proteinlerinin Gösterimi (53)

A. Histonlar, elektron mikroları sayesinde "ip üzerinde boncuk" yapıları şeklinde görülerek kromatin yapısının temel birimi olan nükleozom olarak temel oluşturur ve nükleozom çekirdeği, histonoktomerinden [(H2A-H2B) x 2, (H3-H4) x 2] oluşur. B. H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının kuyruklarında N ve C bölgeleri bulunup translasyon sonrası kovalent modifikasyonlar arasında asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikitilasyon DNA üzerinde yer alır.

Histon proteinlerindeki aminoasit kuyruklarında gen ekspresyonu veya metilasyonu gözlemlenmektedir(54). Histon proteinlerinde; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, snitrosilasyon, ubikitinasyon ve sumolasyon olmak üzere altı alt grupta kovalenthiston modifikasyonları meydana gelmektedir (55). Histon modifikasyonlarından biri olan metilasyon, metil gruplarının SAM aracılığı ile histon metiltransferazlar (HMT'ler) tarafından katalize edilmesi sonucu H3 ve H4 histon proteinlerinin N-terminalindeki lizin ve arginin rezidülerinde görülmektedir (54).

2.1.3. miRNA Regülasyonu

microRNA'lar (miRNA) 19 -25 nükleotit arasında olan küçük, evrimsel açıdan korunmuş, kodlanmayan, tek iplikli RNA'lardır. miRNA'lar kendi promoterlerine sahip olup RNA polimeraz II ile kendi transkriptleri 5' cap ve 3' poliadenil kuyruğu gelecek şekilde kopyalanmaktadır (56). Birçok dokunun gen ekspresyonlarında post-transkripsiyonel regülasyon olarak (57) hücre proliferasyonu, anjiyogenez, migrasyon ve apoptoz sırasında görev almaktadır (58). miRNA'ların regülasyonunun bozulması kanserde rol oynamasına yol açmaktadır. miRNA olgunlaştıktan sonra sitoplazmada RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) aracılığı ile post-tanskripsiyonel gen susturma görülmektedir. Buna ek olarak, transkripsiyonel gen susturma (TGS) ve/veya transkripsiyonel gen aktivasyonu (TGA) epigenetik mekanizmalar sayesinde miRNA'ların RNA transkriptlerin promoter veya enhancer bölgelerine bağlandığı da bilinmektedir. Tablo 2-2'de miRNA'ların kanser çeşitleri ve onların etki etmiş olduğu genler ile ilgili ilişkisi gösterilmiştir (59).

Tablo 2-2. miRNA'ların Kanser Çeşitleri ve Onların Etki Etmiş Olduğu Genler ile İlgili İlişkisi (59)

miRNA	Kanser Tipi	Gen
Tümöröenez ve Apoptoz		
miR-423	Meme kanseri	ProgesteronReseptör
miR-211	B hücre lenfoma	<i>CHOP</i>
miR-370, miR-1180, and miR-1236	Mesane kanseri	<i>p21</i>
miR-205	Prostat kanseri	<i>IL24, IL32</i>

miR-124	Meme ve ovaryum kanseri	<i>p27</i>
miR-2478	Meme kanseri	<i>TGFβ1</i>
miR-138	Prostat kanseri	<i>β-catenin</i>
miR-877	Mesane kanseri	<i>p16</i>
miR-6734	Kolon kanseri	<i>p21</i>
Metastaz ve Anjiyogenez		
miR-10a	Meme kanseri	<i>Hoxd4</i>
miR-205	Prostat kanseri	<i>IL24 IL32</i>

2.1.4. Kromatin Yeniden Düzenlemesi

Kromatin organizasyonu, gen ekspresyonu ve memelilerin gelişmesinde rol oynamaktadır. Kromatin organizasyonunun ana nedenleri arasında DNA metilasyonu, histonların modifikasyonu ve kromatinde ATP'ye bağlı değişiklikler yer almaktadır (60). Ökaryotlarda kromatin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan faktörler, kromatinin ATP ile birlikte yapısal olarak yeniden düzenlenmesinde rol almakta ve bu faktörler ile DNA replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve/veya onarımı gerçekleştirmek için birçok proteinleri görev almaktadır (61). Transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlamak için kromatin yeniden düzenlenmesinde görev alan SWI/SNF kompleksi; DNA'ya bağlı ATPaz aktivitesine sahip olup (62) SWI/SNF2 proteinlerinden olan DRD1, PolVb (NRBD1b ve NRBD2a) ile homolog DNA'nın susturulmasına neden olmaktadır (63).

2.2. Biyomarkerlar

Oral kanserlerin erken evrelerde mukozada görünür değişikliklerin olmaması hastaların ileri evrelerde tanı konulmasına yol açmaktadır (64). Ayrıca, epigenetik ve genetik değişiklikler sonucu, moleküler ve klinik heterojenite açısından OSCC tanı ve prognoz oldukça zordur (65). Böylece tümör tiplerine göre spesifik ve güvenilir biyomarkerlara ihtiyaç duyulmaktadır (66). Biyomarkerlar sayesinde, OSCC'nin aydınlatılması amaçlanarak histopatolojik tip belirleme, kanser evreleme, tümörlerin gelişiminin takip edilmesi bakımından avantaj sağlayabilmektedir (67).

miRNA'ların aşırı ekspresyonu sonucu kanser, kardiyovasküler ve daha birçok hastalıkla ilişkili olmasından ötürü uygun bir biyomarker olarak kullanılabilir. Buna örnek olarak, miRNA-23b/27b topluluğu tümör supresör görevi görmesi, miRNA-17-5p ile OSCC'de apoptoza bağlı protein ekspresyonu gözlenlendiği, miRNA-17/20a ise OSCC'de hücre migrasyonunu inhibe etmesi verilmektedir. Ek olarak miRNA-21 ve *PTEN* OSCC için biyomarker olarak tanımlanmaktadır (68).

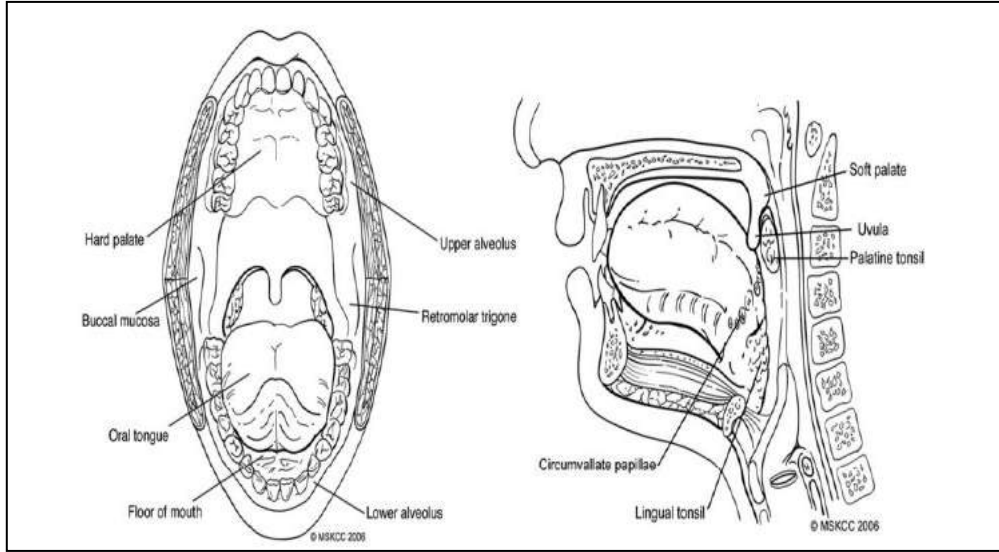
Glukoz taşıyıcı protein olan Glut-1'in, premalin ve malin lezyonlardaki meydana gelen ekspresyonlardaki değişiklikler bildirilmiş olup, OSCC'de erken evrelerde ekspresyon artışı gözlemlendiği ve bunun sonucunda OSCC için uygun prognostik biyomarker olacağı belirtilmektedir (69).

TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IL-8 sitokinler, OSCC hastalarının tükürük örneklerinde premalin lezyon ve kontrollere oranla daha yüksek ifade edilmesinden ötürü OSCC için bir biyomarker olarak betimlenmesi uygun görülebilir. Galectin-1, trophoblast 2, cyclin B1, CXCR4, P63, Rho C, keratin 8, p21 (WAF1/CIP1) ve fosforillenmiş Akt biyomarkerların ekspresyon artışları ve E-cadherin'in kaybı OSCC'de metastaz ile korele halindedir (70).

Diğer bir çalışma ile *PTEN* ve *p16* genlerinin promoter bölgelerinde görülen hipermetilasyona bağlı ekspresyonun aşağı regülasyonunun OSCC'de rol oynadığı ve buna bağlı olarak erken tespit için uygun bir biyomarker olma potansiyeli araştırılmıştır (71).

2.3. Oral Kavite Anatomisi

Oral kavite; dil, ağız tabanı, alt ve üst alveolus, retromolar trigon, sert damak, bukkal mukoza olarak Şekil 2-5'te gösterildiği gibi bölümlere ayrılmıştır (72).



Şekil 2-5. Baş ve Boyun Bölgesinin Anatomik Bölgelerin Gösterimi (72)

Oral kavitenin anatomisi incelendiğinde; alt tabanında mukoza kaplı membran bulunmakta olup majör ve minör tükürük bezlerinden salınan tükürük ile nemli kalmasına yardımcı olmaktadır. Oral kavite kenarları bukkal ve labial mukozalardan oluşan pembe ile açık kırmızı renkten oluşmaktadır. Dudak içini kaplayan labial mucosa mukus salgılayan çok sayıda tükürük bezleri içermektedir. Dudaklar; labial frenulum ile diş etine bağlıdır. Dilin yüzeyi uçtan epiglottis'e kadar dorsum olarak adlandırılır ve tat ile çiğneme için özelleşmiş papilalardan oluşmaktadır (73). Oral kavite bölgesi, sert damak, yanaklardan ve Milohiyoid kas tarafından sınırlanmakta; ağzı sublingual ve submandibular bölgeye ayırmaktadır. Sublingual bölgede sıklıkla tümör oluşumu gözlenmektedir. Submandibular bölgede ise genellikle Evre-I lenf nodu metastazı oluşur. OSCC'nin submandibular bölgede görülmesi ise çok nadirdir (74).

2.4. Oral Skuamöz Hücre Karsinomu (OSCC)

Baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu (HNSCC), dünya 6.sırada yer alan yüksek mortalite ve kötü prognoz gösteren kanser tipidir (75). 2012 yılında yaklaşık olarak 140.000 yeni vaka ve 63.500 ölüm kaydedilmiştir (76).

HNSCC'li hastada; oral kavite, larenks, nazofarenks, hipofarenks ve orofarenkte sıklıkla görülebilmektedir (75). Skuamöz hücreli karsinom (SCC) baş ve boyun kanserlerinde sık görülen tümör olmak ile birlikte bu malinitelerin %91'ini oluşturmaktadır (Şekil 2-6) (76).

Yapılan çalışmalar ile baş ve boyun maliniteleri için DNA onarımı, sinyal iletim mekanizmaları, apoptoz, anjiyogenez ve hücre döngüsünde (77) meydana gelen mutasyonlar, amplifikasyon ve delesyon gibi birtakım genetik değişikliklerin yanında çoğunlukla metilasyon ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikleri de içeren kompleks bir hastalık olarak nitelendirilmiş (78) ve %5 oranında gen promoterlerinin anormal metillendiği bildirilmiştir (79).



Şekil 2-6. Sol Bukkal Mukozada Skuamöz Hücreli Karsinom (80)

2.4.1. OSCC Epidemiyolojisi

Oral kavite kanserlerinin %90'ından fazlası SCC histolojisinde olmakla birlikte görülme nedenini ırk, yaş, cinsiyete ek olarak bulunulan coğrafi bölge de etkilemektedir (81). Malin neoplazmaların yaklaşık olarak %75'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Avrupa ve Amerika'nın büyük bölümünde oral kavite kanserlerin %2 ila %4'ünü oluştururken, Hindistan ve Sri Lanka'da tüm kanserlerin %40'ı kadar büyük bir çoğunluğunu oluşturduğu bilinmektedir (82). Gelişmekte olan ülkelerde oral kavite kanseri görülme riski, genç erkek ve kadınlarda oldukça yüksektir (83).

2.4.2. OSCC Etiyolojisi

OSCC görülmesinin temel nedenlerinden tütün ve alkol kullanımı dışında; kronik mukozal travma, kötü beslenme ve kötü ağız hijyeni gibi diğer faktörlerin de bu hastalığa katkısı olduğu düşünülmektedir (84).

Cannabis sativa bitkisinin yaygın olarak bulunan esrar ile birlikte tütün dumanının solunması, içerisinde bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) nedeniyle hücresel hasara sebebiyet verir ve ağız mukozasının kanserojen ile maruz bırakılmasına

neden olur (85). OSCC için en önemli risk faktörü olan tütünün dumanı içerisinde bulunan nikotin ekzojen oksidatif stres kaynağıdır ve epitel-mezenkimal geçişini (EMT), kanserin gelişimini ve metastazları indüklemektedir (86).

Tütün ürünlerine maruziyet nedeniyle oral kavite de dahil olmak üzere çeşitli kanserlere neden olmaktadır (87). Llewelyn ve ark. 1994'te yapmış olduğu bir çalışmada toplam 454 hasta ile çalışılmış, karsinomlu hastaların %58'inde sigara içme öyküsü bulunmuştur (88). Tütünde bulunan aromatik hidrokarbon, nitrozamin ve aromatik aminler de dahil olmak üzere 60'dan fazla toksik madde bulundurması sebebiyle, dünya genelinde görülen OSCC için en önemli risk faktörlerindendir (89).

Dünyada görülen kanser ölümlerinin %4,2'si alkol ile ilişkisi olup dudak ve oral kavite kanserlerinin %26,4'ünü oluşturmaktadır. Alkol içerisindeki etanolün ana metabolitleri, karsinojen olmakla birlikte DNA sentez ve onarımı, DNA hipometilasyonu ile onkogen ekspresyonunda değişime uğratmaktadır (90). Kuzey İtalya'da yapılan bir araştırmada oral kavite ve farenks kanserlerinin % 80'inden fazlası tütün ve alkol kullanımının birlikte olmasından kaynaklandığını göstermiştir (91).

Human Papilloma Virus (HPV) papovaviridae ailesine ait olan yaklaşık 55 nm büyüklüğünde, tahmini olarak 7.200-8.000 baz çiftinden oluşan virüstür (92). HPV; genel olarak genital bölgede, oral kavitede ve tırnaklarda görülmektedir. Parmak veya tırnakta görülen HPV ilişkili karsinom çok nadir görülmesiyle birlikte özellikle HPV-16 ile ilişkili orofaringeal kanser insidansı oldukça yüksektir (93). HPV-16 tümör baskılayıcı proteinler olan p53 ve retinoblastomu inaktive eden E6 ve E7 onkoproteinlerin ekspresyonu ile ilişkilidir ve hücre döngüsü akışını bozmaktadır. HPV ile ilişkili HNSCC'nin özelliklerinden biri erken tumörögenез sırasında transkripsiyonel baskının azalması sırasında p53 mutasyonların ve p16 proteinlerinin birikmemesi örnek olarak gösterilebilmektedir (94). Kimyasal ajanlar ile birlikte görülen HPV enfeksiyonları, oral mukozanın maliniteye transformasyonunda etkili olabilir. Ayrıca, HPV'nin OSCC için etki eden ajan olmasına rağmen alkol ve tütün kullanımına nazaran malinite bakımından daha düşük etkisi bulunduğu bildirilmiştir (92). Buna ek olarak, OSCC'de tütün, alkol kullanımı, HPV enfeksiyonuna maruziyet ve metilasyon arasındaki ilişki tam olarak anlaşılmamakla birlikte (95) HPV'ye maruz kalmış epitel dokularında DNA metilasyonu maliniteye dönüşmede rol oynandığı söylenebilmektedir (96). Guerrero-Preston ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada DNA metilasyon ve farklı etiyolojilere sahip oral kavite

vakaları arasındaki ilişki anlaşılmak istenmiş; sigara içme ve DNA metilasyon arasında ters ilişki olmasına rağmen, alkol kullanımı ile DNA metilasyonu ve HPV ile DNA metilasyonunda herhangi bir etkileşim gözlenilmediği görülmüştür (97). Diğer bir çalışma sonucu ise sigara içmeyenlerin HPV pozitif tümöre yakalanma olasılığı sigara içenlere oranla 15 kat daha fazla olduğunu göstermektedir (98). HPV-pozitif HNSCC'li hastaların HPV-negatif HNSCC'li hastalara göre kemoradyoterapiye verdikleri yanıt daha olumludur (99).

OSCC'nin gelişiminde etki eden faktörlerden biri de beslenme şeklidir. A, E ve C vitaminleri ve beta-karoten bakımından yüksek olan bazı meyve ve sebzeler, oral neoplazide koruyucu etki gösterirken et ve kırmızı biber tozu risk faktörleri arasındadır. Oral epitelyal atrofi ve Plummer Vinson (Patterson Brown Kelly) sendromunda görülen demir eksikliği oral kavite kanseri ile ilişkilidir.

OSCC gelişimini etkileyen faktörlerden olan bağışıklık sistemi oldukça önem taşımaktadır. İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ile enfekte olmuş kişiler OSCC'ye yakalanma riski oldukça yüksektir. HIV ile enfekte olan kişilerde genellikle non-Hodgkin B hücreli lenfomalarda Epstein-Barr virüsü ile ilişkililip baş-boyun bölgesinde görülmektedir (100).

Prekanseröz lezyonlar kanser öncesi lezyonlar olup, normal dokulara göre malin forma dönüşme riskleri oldukça yüksektir. Oral kavitede mukoza, %5'ten fazlasının premalin lezyonların malin lezyona dönüştüğü bölgedir. Bu sebepten dolayı, premalin lezyonların erken tanı ve teşhis çok önemlidir (101).

OSCC'de hastalar genellikle ağrı semptomu ile hekimlere başvuru yapılmaktadır. Hastalar hekime lezyonların görülür şekilde büyük olduğu zaman başvurmaktadır. Bu duruma ise erken evrelerde asemptomatik olması sebep gösterilmektedir. Ağrı dışında hastalarda kulak ağrısı, kanama, solunumda güçlük, konuşmada zorluk, disfaji, trismus ve parestezi gibi ek şikayetler bulunmaktadır (102).

OSCC, genel olarak pre-kanseröz epitel alanlarında genetiği değiştirilmiş keratinosit ile birlikte görülmektedir. Oral epitelin bazal hücre katmanında bulunan kök\progenitor hücreleri, bir veya daha fazla genetik değişikliğe uğrayıp farklılaşmaya başlamakta ve böylece klinik olarak lökoplaki veya eritroplakiolarak teşhis edilebilmektedir. Oral kavite kanserlerinin %85'ini oluşturan prekanseröz lökoplaki lezyonların (103), maliniteye dönüşüm oranı %0,1 ile %17,5'tir (104).

. Genetik bakımından değişmiş lezyonlardan OSCC'nin gelişmesi mümkündür(105). OSCC klinik tabloda; lökoplaki, kötü huylu eritroplaki, düzensiz şekilli, kırmızı veya beyaz renkte (106) nekrotik ülser, verrüköz veya pürüzsüz dokulu geniş yüzeysel ekzofitik kitle şeklinde tanı ve teşhis edilebilir.

2.4.3. Oral Kavite Histopatoloji

Minör tükürük bezi karsinomları olan adenokarsinoma, adenokistik karsinoma, mukoepidermoid karsinoma ve yumuşak doku sarkomları, malin melanoma, non-Hodgkin lenfomalar ve diğer malin tümörler %5-10'unu oluşturur (107, 108) (Tablo 2-3). Benin lezyonlar arasında; mukosel, inflamasyon, fibroepitelyal polip, hemanjiyom, fibroma ve submukozal fibroz; malin lezyonlar arasında skuamöz hücreli karsinom en sık görülen malin lezyondur. Skuamöz hücreli karsinom ise daha sık olarak bukkal mukoza, dudak, dil ve damakta rastlanmaktadır (109).

Tablo 2-3. Oral Kanserler ve Alt Gruplarının Sınıflandırılması (107)

Oral Kanserler	Alt Gruplar
Epidermoid Karsinom	Skuamöz Hücreli Karsinom Verrüköz Karsinom Spindle Hücreli Karsinom Bazaloid Karsinom Adenoskuamöz Hücreli Karsinom Bazoskuamöz Karsinom
Tükürük Bezi Karsinomları	Polimorfoz düşük gradlı Adenokarsinom Mukoepidermoid Karsinom Adenokistik Karsinom
Lenfomalar	Hodgkin Dışı Lenfoma Hodgkin Lenfoma Burkitt Lenfoma
*Sarkomalar	Rhabdomiyosarkom Osteosarkom Fibrosarkom Kondrosarkom Liposarkom Fibrözhistiositom Nörofibrosarkom Anjiyosarkom Kaposi sarkom
*Metastatik Tümörler	-

*Melanomlar	Malin melanom
*Multiplmiyelom	-

OSCC; oral kavitede skuamöz epitelin büyüme ve metastaz yapması nedeniyle malin grupta yer almaktadır. Genellikle, çok katlı yassı epitel bölgesinden gelişen neoplazik hücreler subepitelyal bölgeye yayılmaktadır (110). Epidermoid kanserlere verrüköz karsinom, asinik hücreli karsinom, bazaloid karsinom, adenoskuamöz hücreli karsinom ve bazoskuamöz hücreli karsinoma ek olarak skuamöz hücreli karsinom da yer almaktadır (107).

Verrüköz karsinom; karnabakar görünümlü kitleler halinde görülür ve lökoplaki lezyonlar ile ilişkilidir. Bu kanserin özelliklerinden biri yüzeysel ve yavaş büyüme ile karakterizedir. Genellikle bukkal mukoza ve gingiva da görülür. Histolojik olarak incelendiğinde malin olduğu görülmektedir. Ayrıca bu sınıfın lenf noduna metastaz yapma riski düşük olması sebebiyle hastada prognoz daha iyi durumdadır (107).

Bazaloid skuamöz hücreli karsinom; genellikle agresif, ileri evrede ortaya çıkan, skuamöz hücreli karsinom türüdür. Bazaloid ve skuamöz bileşenlerinden oluşur. Epiglotis, piriform sinüs ve dil tabanında daha yaygındır. Ağız tabanı, ağız mukozası, damak, tonsiller, sinonazal kanal, nazofarenks ve trakealarda daha az yer alır (111). Hem kadınlarda hem de erkeklerde görülmesine karşın 60 yaş ve üzeri erkeklerde görülmesi sıklığıdır (112).

İğsi hücreli karsinom; sarkomatoid karsinom olarak da isimlendirilmektedir. Hem epitelyal hem de mezenkimal tümör kökenli olduklarından bu tümörlerin histolojik, sitolojik ve moleküler özellikleri ile benzerlik göstermektedir (113). İğsi şeklinde hücrelerden oluşup agresif olarak ilerlemektedir. Bu tür çok nadir gözlenenle birlikte baş ve boyun bölgesinde tutulumu gerçekleşmektedir. Oral kavitede alt dudak, dil ve dişeti en yaygın görülen bölgelerdendir (114).

Adenoskuamöz karsinom; baş ve boyun bölgesinde nadir görülüp agresif ilerleyen malin türdür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından skuamöz ve glandüler olmak üzere iki bileşenden oluşmuştur. Adenoskuamöz karsinom nadir olarak

larenksin supraglottik bölgesini ve oral kavitede dil, damak, tonsillar ve ağız tabana yerleşim göstermektedir (115).

Adenoid skuamöz karsinom; Oral kavitede seyrek olarak tükürük bezlerinde görülen, baş ve boyun kanserlerinin %1'inden sorumlu düşük dereceli malin tümörlerdir. Genellikle yavaş ilerleme kaydeden ve çoklu nüks yapma eğilimindedir ve çoğunlukla akciğer gibi organlara metastaz yapma riski yüksektir. Hastalar arasında uzun süreli sağkalım oranının düşük olması ile bilinmektedir (116).

2.4.4. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda Evreleme

Amerikan Kanser Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer staging) tarafından isimlendirilmekte ve tüm oral kavite kanserlerinin değerlendirilmesinde TNM sistemi kullanılmaktadır. Evreleme sisteminde kullanılan harfler sırasıyla; T harfi primer tümör boyutunu ve invazyonu, N harfi boyunda bulunan lenf nodu metastazı, M harfi ise uzak metastazı göstermektedir. Aşağıda bulunan Tablo 2-4, Tablo 2-5, Tablo 2-6'da OSCC TNM sınıflandırılmaları sunulmuştur (117).

Tablo 2-4. OSCC'de T Sınıfının Gösterimi (117)

T Sınıfı	Değerlendirilmesi
TX	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümöre ait kanıt bulunmamıştır
Tis	Karsinoma in situ
T1	En büyük boyuttaki tümör 2 cm veya daha küçük
T2	En büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4 cm'den fazla olmayan tümör
T3	4 cm'den büyük tümör
T4a	Genioglossus,hiyoglossus, palatoglossus ve stiloglossus, maksilersinüs, yüz derisi gibi çevreye invazyon

T4b	Tümör, masticator boşluğunu, pterygoid plakları veya kafatabanını işgal eder veya iç karotisarter tutulumu görülür.
------------	---

Tablo 2-5. OSCC'de N Sınıfının Gösterimi (117)

N Sınıfı	Değerlendirilmesi
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tekbir ipsilateral lenf düğümünde metastaz, en büyük boyutu 3 cm veya daha küçük
N2	N2a, 2b, 2c'de belirtildiği gibi metastaz
N2a	Tekbir ipsilateral lenf düğümünde metastaz, en büyük boyutu 3 cm'den fazla ancak 6 cm'den fazla değildir
N2b	Birden fazla ipsilateral lenf düğümünde metastaz, hiçbiri en büyük boyutu 6 cm'den fazla değildir
N2c	Bilateral veya kontralateral lenf düğümlerinde metastaz, en büyük boyutu 6 cm'den fazla olmaz
N3	En büyük boyutu 6 cm'den fazla olan bir lenf düğümünde metastaz görülür

Tablo 2-6. OSCC'de M Sınıfının Gösterimi (117)

M Sınıfı	Değerlendirilmesi
MX	Uzak metastaz değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz bulunmamaktadır
M1	Uzak metastaz görülmektedir

2.4.5. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomun Biyolojisi

DNA onarımını ve hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alan tümör baskılayıcı ve onkogenlerde genetik/epigenetik yollarla gözlenen fonksiyon kaybı ya da anormal artışın karsinogenezin başlamasında ve ilerlemesinde gözlenmektedir (118).

Yapılan birçok çalışma sonucu PI3K yolağı (phosphatidylinositol 3 kinase), RAS proteinin tümörögenezi tetikleyebildiğı, *p53* gen mutasyonu OSCC'de rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, SNAIL gibi birçok proteinlerin ekspresyonu invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğı bilinmektedir (119).

Tümör baskılayıcı genlerden biri olanve *p53* proteinini kodlayan *TP53* geni, tümörün ilerlemesindeve hücre döngüsünde rol oynamaktadır. HNSCC hastalarının büyük bir çoğunluğunda immünohistokimya analizleri ile tespit edilen *TP53* mutasyonları veya mutasyonlara bağılı ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir (120). DNA hasarı meydana geldiğinde G1'den S fazına geçişi bloke ederek hücre döngüsünü durdurur. *p53*, mutasyon birikimi ile tümör baskılayıcı özelliğini kaybederek tümör tetikleyici duruma gelir. Böylece kanser ilişkili hale gelmektedir. Buna ek olarak, *TP53* gen mutasyonları OSCC'nin haricinde meme, beyin, rektum, kolon, özofagus ve akciğer kanserinde de görülmektedir (121). *p53*'ün aşırı ekspresyonu coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Buna neden olabilecek faktörler arasında farklı coğrafi bölgelerde tütün ve alkol kullanımının farklılık göstermesidir (122).

INK4 ailesinin bir üyesi olan *p16*, hücre döngüsünde rol oynayan bir tümör baskılayıcıdır. G1 evresini durdurmak için Rb proteini hipofosforile olarak E2F'ye bağlanır ve *p16* promoterinde hipermetilasyon görülmesi gen susturulmasına yol açıp OSCC'de kanseri tetiklemektedir. *p16* hipermetilasyon görülmesi belirteç olarak tanımlanıp premalin lezyonların oral kanserlere transformasyonunda hipermetilasyonun rol oynadığı bildirilmiştir (123). *p16INK4A*, baş ve boyun kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde baskılandığı bildirilmiştir (124).

Retinoblastoma (Rb), hücre döngüsünde ve hücre farklılaşmasında görev alan tümör baskılayıcı bir gendir. *Rb* geninden transkribe edilen ve kendi ürünü olan fosforillenmiş Rb (pRb) hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişinde (125) siklin D1 ile birlikte siklin bağımlı kinazlardan (Cdk) Cdk4 ve Cdk6 tarafından sağlanmaktadır. Ayrıca, Pande ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada OSCC hastalarının %64'ünde Rb ekspresyon kaybının *Rb* geninin inaktivasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir .

2.4.6. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomun Önlenmesi ve Kontrolü

Hastalığın önlenmesi ve insidansın azaltılabilmesi hastanın alacağı birçok tedbir ile gerçekleşebilir. Hastanın sosyoekonomik durumu, tütün ürünleri ve alkol kullanımı,

sağlıklı beslenme düzenine geçiş, iyi ağız ve cinsel hijyene dikkat edilmesi önemini korumaktadır. Hastalığın semptomlarına karşı bilinçli olup dikkat edilmesi gereklidir (126).

Bununla birlikte doğal tedaviler de kanser riskini azaltmak için alternatif sunabilirler. A, C, E vitaminleri içeren çeşitli meyve ve sebzeler, spirulina, selenyum, yeşil çay, kurkumin kemopreventif olarak adlandırılır. Böylece bu besinlerin kullanımı potansiyel kemoterapötik olarak nitelendirilmektedir (127).

2.4.7. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom Tedavisi

Hastanın kişisel ihtiyaçları ve hayat kalitesi tedavide önem arz etmektedir. OSCC için birçok tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Daha iyi bir evreleme yapılması için ilk önce hekim tarafından hastanın fiziksel muayenesi yapılmakta daha sonrasında ise bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrasonografi ve pozitron emisyon tomografisi (PET)-CT gibi görüntüleme yöntemlerinden faydalanılmaktadır (128). Radyoterapi (RT) de ihtiyaç duyulduğu durumlarda gerekli dozlar ile HNC hastaları için uygun tedavi modellerinden biridir(12).

İleri evre OSCC tanısı almış hastalarda radyo veya radyokemoterapi ardından cerrahi müdahale de yapılmaktadır (129). Evre III ve IV OSCC hastalarında cerrahi ile birlikte 50-60 Gy ile kemoradyoterapi uygun görülmektedir. Ayrıca, radyasyon tedavisi sonrası metastaz görülmeyen fakat nüks eden tümör için rezeksiyon yapılması fayda sağlamaktadır (130).

2.5. Guanine Nucleotide-Binding Protein γ 7 (GNG7)

GNG7 geni, 19. kromozom üzerinde lokalize olan heterotrimerik G proteininin bir alt birimidir(15). RAS, RHO, RAC (131) G proteinleri, yukarı akış(upstream) reseptörler tarafından aktivasyonu gerçekleştirilmesi sonucu G proteine bağlı reseptörler (GPCRs) olarak birçok farklı rol oynarlar. GPCR'ler hücre plazma membranında bulunan heterodimerik G proteinler ile etkileşim halinde bulunmakta (132) ve hücre içi sinyal yollarında görev alarak vazorelaksasyon, olfaksiyon, biyoriitm ve kalp atış hızını düzenlemede görev almaktadırlar (133). İnsanlarda G proteinlerinin alt gruba ayrılmıştır ve heterotrimerik bir yapı sergilemektedir. Bunlar; 23 G α , 5 G β ve 12 G γ bulunmaktadır (134). G proteinlerinin en önemli görevleri, ökaryotlarda sinyal iletim mekanizmasında

görev almalarıdır (135). GPCR'nin ligand etkileşimi ile birlikte GTP'den GDP'ye dönüşümü gerçekleşerek hücre içi sinyalizasyonu başlatmaktadır (132).

Guanin nükleotid bağlayıcı proteinler (G proteinleri), çeşitli transmembran sinyal sistemlerinde bir modülatör veya dönüştürücü olarak yer almaktadır. Beta ve gama zincirleri, GTPaz aktivitesi, GDP'nin GTP ile yer değiştirmesi ve G protein-efektör etkileşimi için gereklidir. Beynin belirli bölgelerinde adenililsiklaz sinyalinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Striatumdaki adenilsiklaz aktivitesi için gerekli olan bir G protein heterotrimerinin (G(olf) alt birimi alfa-beta-gama-7) oluşumunda veya stabilizasyonunda rol oynamaktadır. *GNG7*'nin ekspresyon seviyelerindeki değişim skuamöz hücreli karsinom, pankreas kanseri, gastrointestinal sistem kanseri ve özofagus kanseri gibi birçok kanser çeşitlerinde değiştiği bildirilmiştir (136). Ray ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise pankreas ve özofagus kanserlerinde ekspresyon azalması gözlemlenmiştir (137). Ayrıca Hodgkin lenfomada da tümör baskılayıcı özelliği gösterdiği bildirilmiştir (136). Shibata ve ark. tarafından yürütülen BALB/c çıplak fareler ile denenmiş çalışmada ise *GNG7*'nin insan özofagus karsinom hücre soyunda hücre büyümesini durdurduğu ve tümör oluşumunu baskıladığı görülerek potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olduğu söylenebilmektedir (138). Gen ekspresyon seviyesine bağlı azalışın görülmesi ve fonksiyon kaybının olması *GNG7*'nin baş, boyun ve özofagus bölgesindeki skuamöz hücreli karsinom için potansiyel bir tümör invaziv olduğuna dair tutarlılık söz konusudur (139).

Demokan ve ark. ile yaptıkları bir çalışmada HNSCC'de *GNG7*'nin CpG promoter bölgelerinde metillendiği bildirilmiştir (15). Baş ve boyun bölgesinde görülen skuamöz hücreli karsinomda ilgili genin promoter bölgesinde yüksek oranda metillenme görülürken berrak hücreli renal hücreli karsinom (ccRCC) için *GNG7* genin normal dokularda promoter bölgelerinde metilasyon görülmediği halde tümör dokularında metilasyon olduğu görülmüştür. Bu durumunun promoter bölgelerdeki yüksek CG bakımından bölgelerin yoğun ve metilasyon bakımında zengin olması ccRCC için metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalmaya yol açmıştır (139).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2019/1165 Dosya numarası ile onayı alınmış olan çalışmamız, İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Baş-Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvurmuş ve hekim tarafından OSCC tanısı almış 50 hasta bireylerden ve kendisinde veya ailesinde benin/malin teşhisi bulunmayan ve malinite dışı nedenlerle cerrahi müdahaleye başvurulması önerilen 10 sağlıklı bireye ait doku ve vücut sıvılarından oluşmaktadır. Çalışmamızda yer alan hastalar, hekim tarafından bilgilendirildikten ve onayı alındıktan sonra doku ve serum örnekleri temin edildi. Deneysel çalışmamız, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD, Deneysel Ve Moleküler Onkoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Temin Edilen Ülke
Agaroz Jel Elektroforez Tankı	BRL Life Technologies, ABD
El homojenizatörü	Qiagen,Almanya
Güç Kaynağı	Bio-Metra, Almanya
Jel Dökümentasyon Sistemi	Vilber- Lourmat, Almanya
Mikropipetler	Thermo, İsveç
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 200R, Almanya
Ultra Derin Dondurucu (-80 °C)	Sanyo, Japonya
Etüv	Hereaus, Almanya
Hassas Terazı	Chyo, Japonya
LightCycler 480 Real Time cihazı	ROCHE, Almanya

Vorteks	Snijders, Hollanda
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Kimyasallar	Temin Edilen Ülke
Agaroz	Wisent MultiCell, Kanada
Borik asit	Wisent MultiCell, Kanada
Orange G	Merck, Almanya
Deoksiribonükleotid trifosfat	Fermentas, Litvanya
Ethanol	Riedel De Haen, Almanya
Etilen-diamin-tetraasetik-asit	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Taq Polimeraz	Thermo Scientific, Almanya
İsopropanol	Riedel De Haen, Almanya
Magnezyum Klorür	Thermo, Litvanya
Proteinaz K	Roche, Almanya
Ribonükleaz A	Sigma Aldrich, ABD
SssI metilaz enzimi	New England Biolabs (NEB), ABD
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck, Almanya
Tris	Applchem, Almanya).

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Kimyasallar	Kimyasal İçeriği
Parçalama Tamponu	155 mM NH₄Cl 10 mM KHCO₃ 0,1 mM EDTA (pH: 8.0)
SE Tamponu	75 mM NaCl 25 mM EDTA 30 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
TE Tamponu	20 mM Tris-HCl (pH: 8.0) 1 mM EDTA (pH: 8.0)
Fenol için TE Tamponu (0,5 ml)	0.25 mM Tris (pH:8.0) 0, 5 mM EDTA (pH:8.0)
Fenol/Kloroform/İsopropanol (1:1)	1 (Fenol / Kloroform) / 1 İsopropanol
Proteinaz K	20 mg / ml
Ribonükleaz A	10 mg / ml
SDS (%10; pH:7,2)	100 g sodyum dodesilsülfat

3.2. Yöntemler

3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi

3.2.1.1. Doku Eldesi

OSCC tanısı konmuş 50 hastanın ameliyat esnasında 0,5 cm çaplık tümör, eşlenik normal doku örnekleri ile ailesinde malin bir hikaye bulunmayan, herhangi bir sebeple cerrahi rezeksiyon uygulaması uygun görülmüş olan 10 sağlıklı bireylerden uvulopalatofaringoplasti (UPPP) tekniği ile 0,5 cm çapında olan sağlıklı mukoza örnekleri buz içerisinde laboratuvara teslim edilip DNA\RNA izolasyon işlemlerine kadar doku örnekleri -80°C’de saklandı.

3.2.1.2. Serum Eldesi

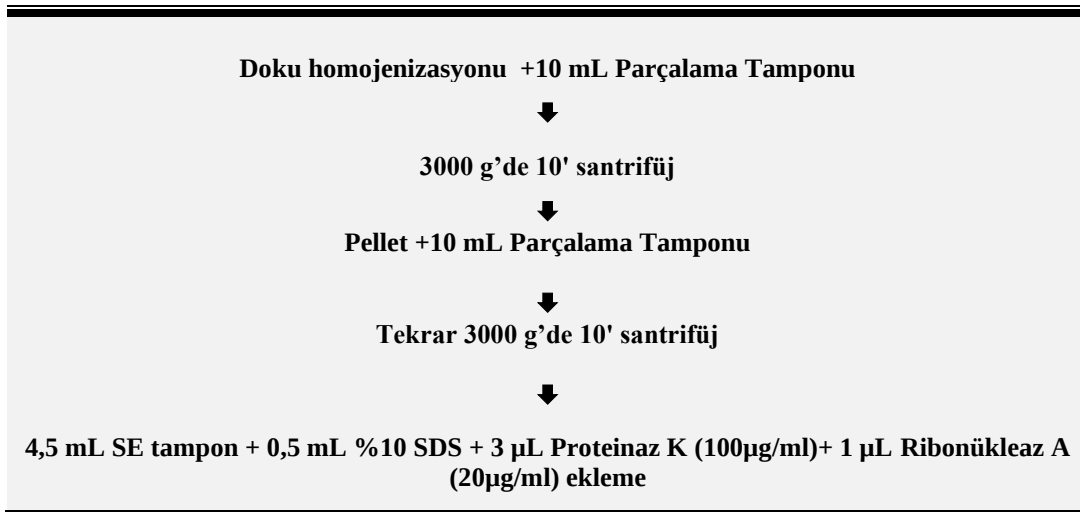
Cerrahi müdahale öncesinde sarı kan tüpüne (kuru tüp) 8-10 mL alınması ile birlikte sağlıklı ve hasta bireylerden elde edilen periferik kan örnekleri laboratuvara teslim edildikten sonra örnekler 1950 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve en üstte kalan sarı faz (serum) kısmı kriyotülelere 1 mL olacak şekilde dağıtıldı.

3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri

3.2.2.1. Dokudan DNA İzolasyonu

OSCC hastası ve sağlıklı bireylere ait tümör ve normal doku ve serum örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Tabloda 3-1). Dokular el homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenize edilen dokular parçalama tamponunda bekletilerek hücre duvarı parçalanıp 3000 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak pellet olarak çöktürülmesi sağlandı. Pellet alınıp tekrardan 10 ml parçalama tamponu eklenerek 3000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Pellet alınıp, 4,5 ml SE Tamponu, 100 µg/ml Proteinaz K, %1 SDS, 20 µg/ml Ribonükleaz A karışımı eklenerek 4 - 18 saat, 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, 5 ml SE Tamponu ve 10 ml Fenol/Kloroform (1:1) karışımına maruz bırakılarak 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınarak 10 ml Fenol/Kloroform (1:1) da bekletildikten sonra 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınıp 10 ml İzopropanol da bekletilerek DNA iplikleri çöktürüldü. En son olarak DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerleri oranlanarak belirlendi. %0,8'lik agaroz jelde DNA örneklerinin kontrolünün ardından metilasyon deneylerine kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3-1. Doku- DNA izolasyonu prosedürü

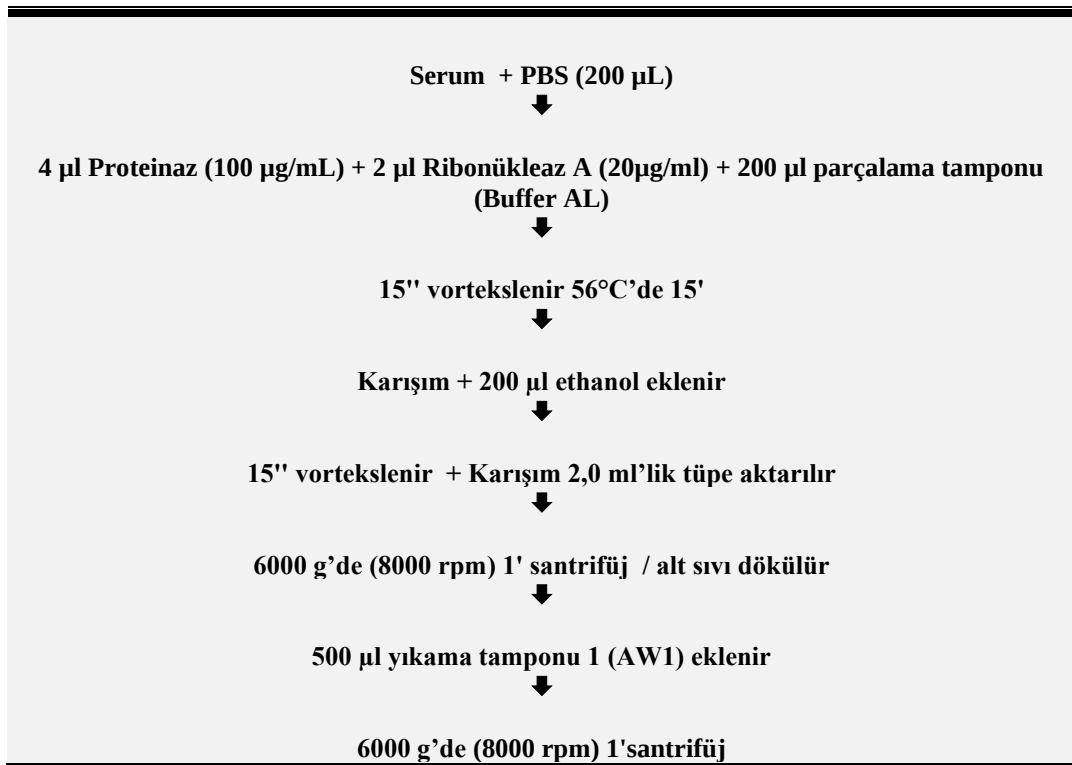


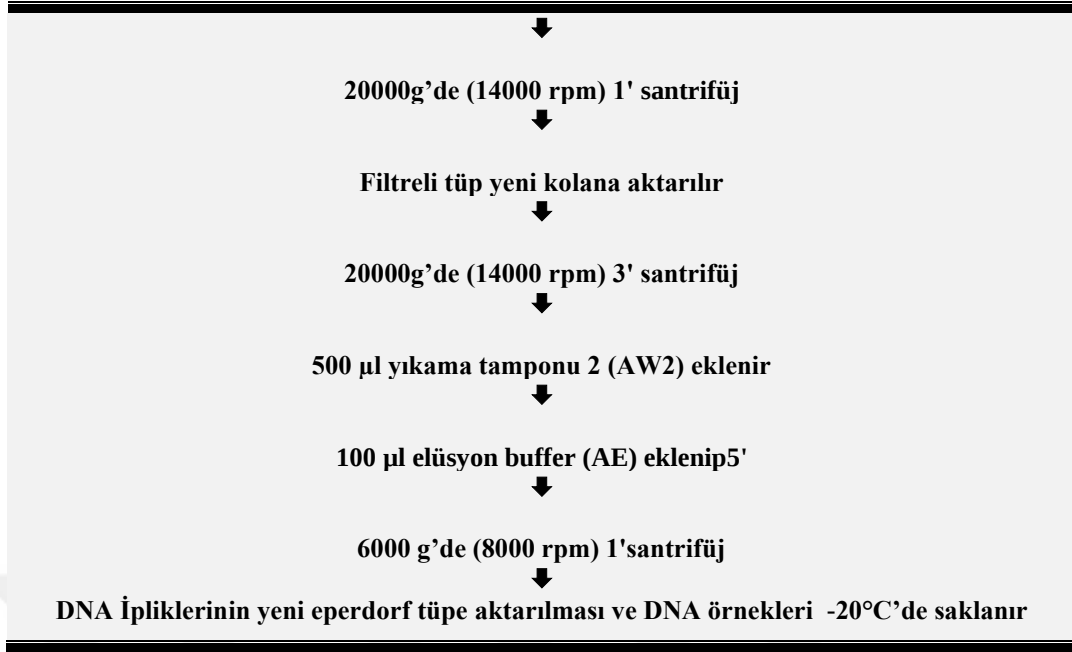


3.2.2.2. Serum Örneklerinden DNA İzolasyon İşlemi

Cerrahi müdale öncesi hasta ve sağlıklı bireylerden hekimler tarafından alınan 8-10 mL'lik periferik kan serum ayırma tüpüne (kuru tüp) toplandı. Serumdan DNA izolasyonu Tablo 3-2'deki protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3-2. Likit Biyopsi Örneklerinden DNA izolasyon protokolü



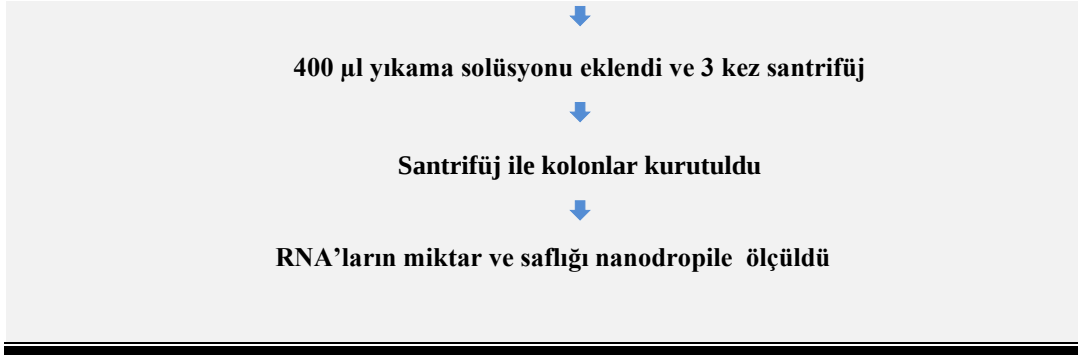


3.2.3. Total RNA İzolasyonu

Hasta ve sağlıklı kişilerden alınan doku örneklerinin total RNA izolasyonu “Norgen Total RNA Purification Kit” (Norgen, Ontario, Kanada) ile yapıldı. Doku örnekleri ayrı bir tüpe alınarak 600 µl Lizis tamponu içerisinde çözöldükten sonra 600 µl etanol eklendi. Vortex yapıldıktan sonra sıvının tamamı kolonlardan santrifüj sayesinde geçirilmesi sağlandı ve sıvı kısım atıldı. 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra kolonlar santrifüj yapılarak kurutuldu. 40 µl elüsyon tamponu içerisinde total RNA elde edildi. Elde edilen RNA'ların miktar ve saflığı (A260/A230) Nanodrop 2000c (Thermofisher, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçölüp kalite kontrolü tamamlandı. Son olarak, cDNA dönüşümüne kadar -80 °C'de saklandı.

Tablo 3-3. Total RNA izolasyonu protokolü





3.2.4. cDNA sentezi

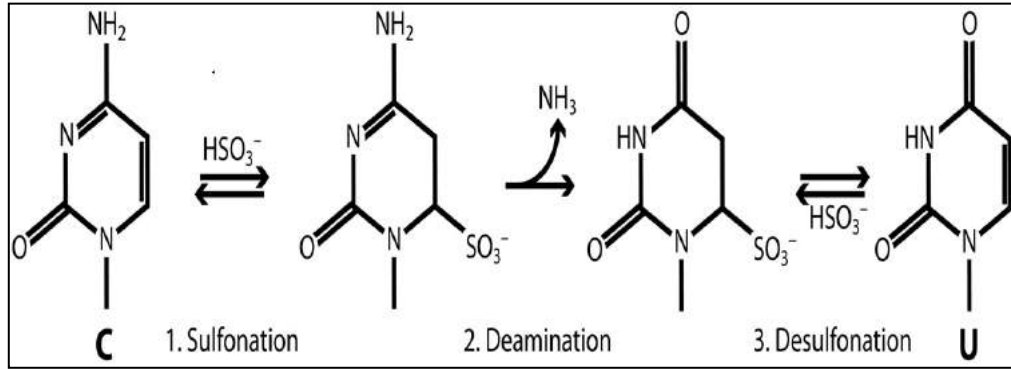
Total RNA örneklerinden cDNA dönüşümünde “Bioline SensiFAST cDNA SynthesisKit” kullanıldı. Elde edilen cDNA örnekleri Nanodrop 2000c (Thermofisher, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra QRT-PCR deneylerine kadar -20°C’ de saklandı.

Tablo 3-4. cDNA Reaksiyon Koşulları

Kullanılan Malzemeler	Miktar
Toplam RNA (1 µg'ye kadar)	n µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
dH ₂ O	20 µl'ye kadar

3.2.5. Bisülfite Modifikasyon İşlemi

Hasta ve sağlıklı bireylere ait tümör ve normal doku ile serumdan elde edilen DNA örneklerine bisülfite dönüşüm işlemi uygulandı (Şekil 3-1). Bisülfite işlemleri “Zymo Methylation Gold Kit” (Zymo research, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Bisülfite dönüşüm protokolü Tablo 3-5’te gösterilmiştir. Bisülfite dönüşümü gerçekleşen DNA örnekleri -20°C’ de saklandı.



Şekil 3-1. Sitozinin Urasil Bazına Dönüşümü (140)

Tablo 3-5. Bisüfit Dönüşüm Protokolü

20 µl DNA + 130 µl bisüfit dönüşüm re-ajanı
↓
95°C,30 sn ve 50°C,1 sa,16 siklus inkübe edildi
↓
600 µl bağlanma tampon eklenildi
↓
100 µl yıkama tamponu eklenildi + santrifüj
↓
200 µl desülfonasyon tamponu + santrifüj
↓
200 µl yıkama tamponu
↓
10 µl elüsyon tamponu
↓
-20°C 'de BC-DNA saklandı

3.2.6. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Kullanımı

Çalışmamızda metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *GNG7* geninin primer ve prob tasarımları Demokan ve ark. yapmış çalışmasından elde edildi (15). Primer ve prob lar Tablo 3-6-Tablo 3-8’de gösterildi. Referans gen olan *ACTB* için primer ve prob tasarımları daha önce yapılmış olan çalışmadan alındı (141).



Şekil 3-2. GNG7 Geninin Promoter Bölgesindeki CpG Adacıklarının Dağılımının Methprimer Programı ile Gösterimi

Tablo 3-6. GNG7 ve ACTB Genlerine Ait Ekspresyon Primer Dizileri

Gen		Primer Dizi (5'- 3')
GNG7	F:	CGGAGTTGGTATGTAGGATTCTG
	R:	CCCCGACTACGAAAAACCGAA
ACTB	F:	GTCTTCCCCTCCATCGTG
	R:	AGGGTGAGGATGCCTCTCTT

Tablo 3-7. GNG7 ve ACTB Genleri Promoter Bölgesinde Metile Bölgeye Özgü Primer Dizileri

Gen		Primer Dizi (5'- 3')
GNG7	F:	TCGGAGTTGGTATGTAGGATTCTG
	R:	CGACTACGAAAAACCGAAACGA
ACTB	F:	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
	R:	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

Tablo 3-8. *GNG7* ve *ACTB* Geni Metile Bölgeye Özgü Prob Dizileri

Gen		Primer Dizi (5' - 3')
<i>GNG7</i>	F:	FAM-5' TCGGTTTCGTTTCGCGTTTCGGAGTTTCG 3'-TAMRA
<i>ACTB</i>	F:	FAM-5' ACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA 3'-TAMRA

3.2.7. *GNG7* Geninin Relatif Metilasyon Seviyesinin QMSP ile Belirlenmesi

GNG7 geninin promoter bölgesinde metilasyon durumunu Kantitatif Metilasyon Spesifik PCR (QMSP) yöntemi ile incelendi. Pozitif kontrol olarak sağlıklı insana ait lenfosit DNA'sı (LN-DNA) *SssI* metilaz enzimi ile muamele edilerek hazırlanan %100 metillenmiş standart kullanıldı. Bisülfite modifikasyon işleminden sonra standart konsantrasyonu 20 ng/μL olarak ayarlanıp kantitatif bir sonuç elde etmek için standartın 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlandı. *GNG7* geni için metilasyon seviyelerinin araştırılması için 5' ucunda 6-florosein amitid (FAM) ile 3' ucunda FAM baskılayıcı (quencher) görevi olan karboksitetrametilrodamin (TAMRA) ile işaretlenmiş TaqMan hidroliz probu (TaqMan) kullanıldı. QMSP deneyleri için kullanılan reaksiyon karışımı ile reaksiyon koşulları Tablo 3-9 ve Tablo 3-10'da gösterildi.

Tablo 3-9. Metilasyon Deneyleri İçin QMSP Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 kuyucu hacim
10X SensiFAST Probe No-ROX Kit Mix	5 μL
100 μM Primer (F)	0,6 μL
100 μM Primer (R)	0,6 μL
100 μM prob	0,2 μL
dH ₂ O (PCR grade)	1,1 μL
BC-DNA	2,5 μL

Tablo 3-10. Metilasyon Deneyleri İçin PCR Reaksiyon Koşulları

PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
DENATÜRASYON	95°C	30 s
ANNEALİNG	95°C	15 s
	64°C	1 dk
	72°C	15s
COOLİNG	40°C	30 s

3.2.8. GNG7 Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

GNG7 geninin ekspresyon seviyeleri SYBR Green ile kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR) ile gerçekleştirildi. PCR için uygun reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra (Tablo 3-11), içerisinde *GNG7* genine özgü primerleri içeren 96 kuyucuk bulunan platelere, her bir kuyucukta 20 µl olacak şekilde dağıtıldı. Reaksiyon karışımı dağıtıldıktan sonra kuyucuklara, uygun sıcaklıklarda reaksiyon ayarlanıp LightCycler 480 Real Time cihazında başlatıldı (Tablo 3-12).

Relatif ekspresyon düzeyleri foldchange ile incelendi. Formül aşağıda gösterilmiştir.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ hedef} - Ct \text{ referans}) \text{ örnek} - (Ct \text{ hedef} - Ct \text{ referans}) \text{ kontrol}$$

Tablo 3-11. Mix Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 kuyu için hacim
10X SYBRMix	5 µL
100µM Primer Forward	1 µL
100µM Primer Reverse	1 µL
dH ₂ O (PCR grade)	1,5 µL
cDNA	1,5 µL

Tablo 3-12. QRT-PCR'ın Reaksiyon Koşulları

PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
DENATÜRASYON	95°C	30 s
ANNEALİNG (40 siklus)	95°C	15 s
	60°C	1 dk
MELTING CURVE	95°C	10 s
	60°C	20 s
	95°C	Cont.
SOĞUMA	40°C	30 s

3.2.9. Veri Analizi

İstatiksel anlamda analizlerin hesaplamalarında, IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılarak ki-kare testleri uygulandı. $p \leq 0,05$ olan değerler istatiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Hasta ile sağlıklı bireylerin materyallerinin metilasyon seviyelerinin karşılaştırılmasında "Wilcoxon Rank Testi" kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Sağlıklı Gruba Ait Klinik Parametreler

Çalışmamızda, Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de OSCC tanısı almış 50 hastaya aittümör/eşlenik doku ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylerin normal doku ile serum örnekleri kullanılmış olup OSCC grubunun yaş ortalaması 60,02 ($\pm$ 11,02) ve sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 45,5 ($\pm$ 10,22) bulunmuştur.OSCC grubunda erkek hasta birey sayısı 38 (%76); kadınların sayısı 12’ye (%24) göre fazla iken, sağlıklı bireylerin tümü erkek bireylerden oluşmaktadır. OSCC hasta bireylerin sigara kullanım oranı %64 (32/50), sağlıklı bireylerin oranı %60’dır (6/10). Alkol tüketimi OSCC grubunun %18’inde (9/50) görülürken sağlıklı grupta ise alkol kullanımı %2 (1/50) rastlanmıştır.

OSCC hasta grubu TNM evrelerine ve anatomik tutulum bölgelerine göre değerlendirildi ve %14’ü (7/50) evre I, %14’ü (7/50) evre II, %20’si (10/50) evre III, %52’sinin (26/50) evre IV oluşu tespit edildi.OSCC hastalarının anatomik tutulum bölgelerine göre incelendiğinde dil %28 (14/50), ağız tabanı %18 (9/50), bukkal mukoza %18 (9/50), inferior alveolar ark %12 (6/50), retromolar trigon %20 (10/50), sert damak %4 (2/50) oranında tutulum gözlemlendi. OSCC hastalarının %48’inde (24/50) lenf nodu tutulumu gözlemlenmişken; %52’sinde (26/50) görülmemiştir.

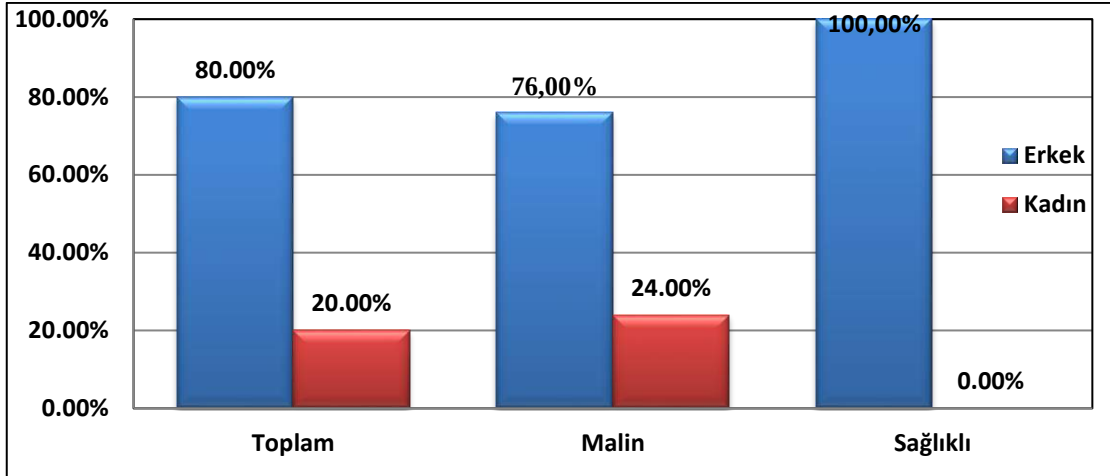
Tablo 4-1. Oral MalinTümöre Sahip Hastaların Klinikopatolojik Verileri

Parametreler		Hasta Sayısı	Yüzde(%)
Yaş	≤61	25	50
	>61	25	50
Cinsiyet	Kadın	12	24
	Erkek	38	76
AnatomikTutulumBölgesi	SertDamak	2	4
	AğızTabanı	9	18
	BukkalMukoza	9	18
	Dil	14	28
	İnferior Alveolar Ark	6	12
	Retromolar Trigon	10	20
Evre	1	7	14
	2	7	14
	3	10	20
	4	26	52
Histapotoloji	SCC	25	50
	YEH	25	50

LenfNoduTutulumu	Yok	26	52
	Var	24	48
Sigara	Kullanmıyor	18	36
	Kullanıyor	32	64
Alkol	Kullanmıyor	31	62
	Kullanıyor	19	38
Diferansiyasyon Derecesi	Az	4	8
	İyi	7	14
	Orta	39	78
Nüks	Yok	25	50
	Var	25	50

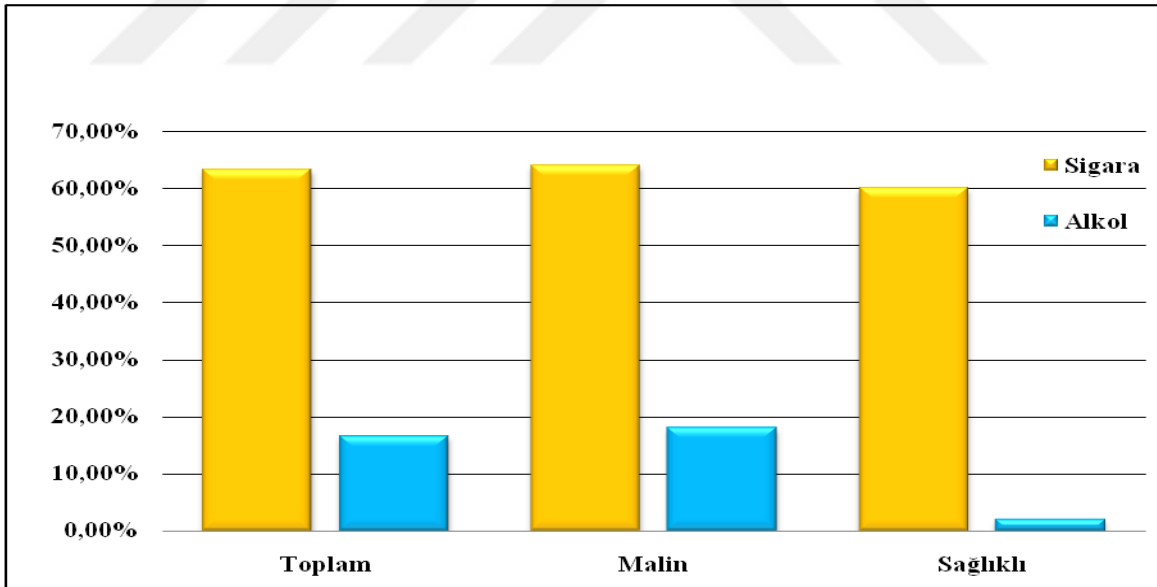
Tablo 4-2. Sağlıklı Kontrol Grubuna Ait Parametreler

Parametreler		SağlıklıBireySayısı	Yüzde(%)
Yaş	≤61	9	90
	>61	1	10
Cinsiyet	Erkek	10	100
	Kadın	0	0
Sigara	Kullanmıyor	4	40
	Kullanıyor	6	60
Alkol	Kullanıyor	1	10
	Kullanmıyor	9	90



Şekil 4-1. Kadın ve Erkek Bulunma Yüzdelerinin Malin & Sağlıklı Gruplara Göre Genel Dağılımı

Şekil 4-1’de verilen grafikte sigara alkol kullanım yüzdelerinin malin, sağlıklı gruplara göre dağılım verilmiştir. Hem sağlıklı hem malin grup ile birlikte toplam 60 kişinin %80 ile 48 kişi erkek olup %20’sini kadın oluşturmaktadır. Malin gruba bakıldığında 50 hastanın %76’sı olan 32 kişi erkek hasta olup %24’ünü 12 kadın hasta oluşturmaktadır. Buna ek olarak sağlıklı 10 hastanın 10’u erkek bireylerden oluşmaktadır.



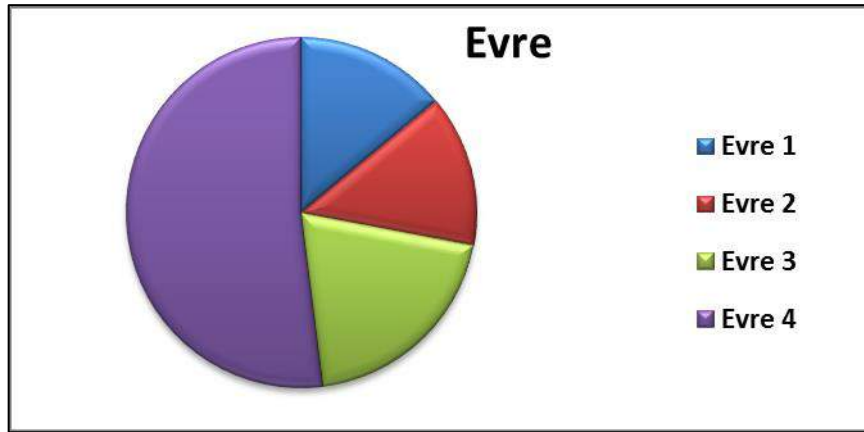
Şekil 4-2. Sigara ve Alkol Kullanım Yüzdelerinin Malin & Sağlıklı Gruplara Göre Genel Dağılımı

Şekil 4-2’de sigara ve alkol kullanım yüzdelerinin malin ve sağlıklı gruplara göre genel durumu gösteren grafik oluşturulmuştur. 50 OSCC hastası ve 10 sağlıklı bireyden oluşan toplam 60 kişide %63,30 oranında sigara ve %16,60 oranında alkol kullanım mevcuttur. 50 kişiden oluşan malin grupta, %64 oranında sigara kullanılıp alkol kullanma

yüzdesi %18 iken 10 kişiden oluşan sağlıklı grupta bu oran sigara kullanan bireylerde %60, alkol kullanım yüzdesi %2'dir.

Tablo 4-3. Malin Hastaların TNM Sınıflanması

Görülen Evre	n	%
Evre 1	7	(14,00)
Evre 2	7	(14,00)
Evre 3	10	(20,00)
Evre 4	26	(52,00)



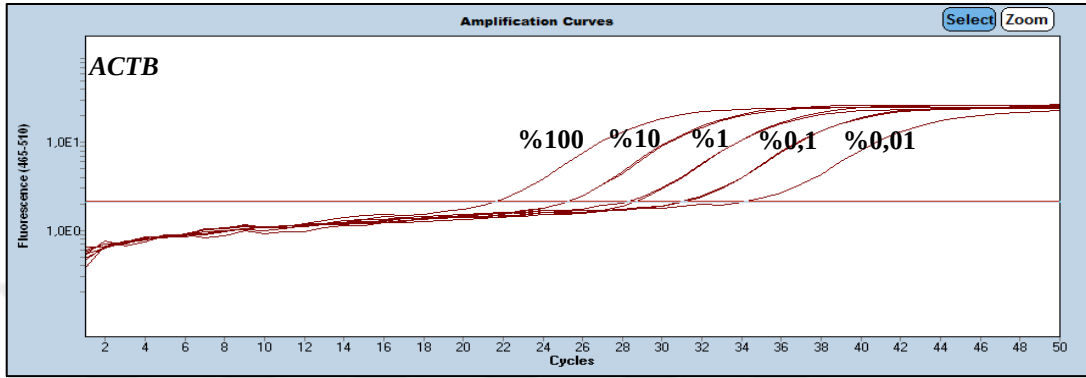
Şekil 4-3. Malin Hastaların TNM Sınıflamasına Bağlı Görülen Evre Oranları

Şekil 4-3'te OSCC hastalarının TNM sınıflandırılmasına bağlı olarak görülen evre ve oranları verilmiştir. 50 hastada en çok görülen evre, Evre IV olup mor renk ile gösterilmiş görülme yüzdesi %52 olarak belirlenmiştir. İkinci olarak yüksek görülen Evre III olup yeşil renk ile renklendirilmiş ve görülme yüzdesi %20 olarak belirlenmiştir. Evre I ve Evre II, %14 ile eşit olarak görülme oranına sahip olup sırasıyla mavi ve kırmızı renk ile şematize edilmiştir.

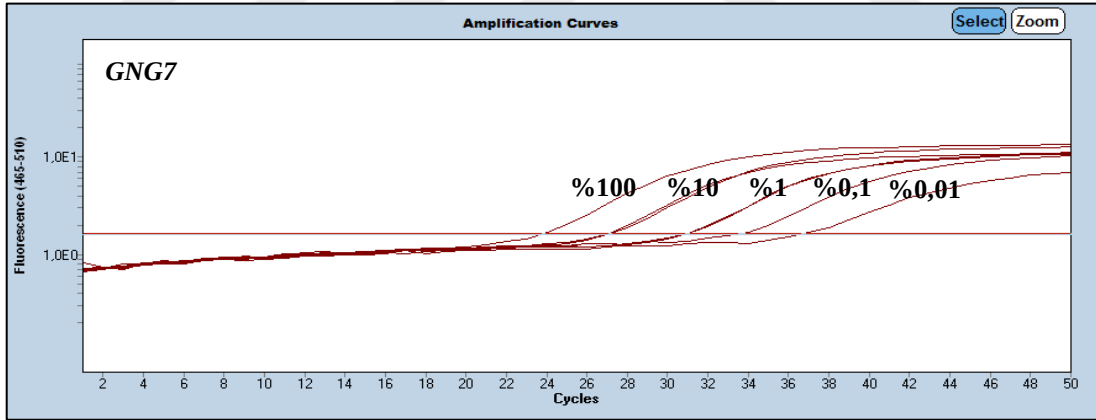
4.2. GNG7 Geninin Promoter Bölgesinin Metilasyon Analizi

Hasta ve sağlıklı bireylere ait doku ve serum örneklerinin metilasyon durumu "Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP)" ile

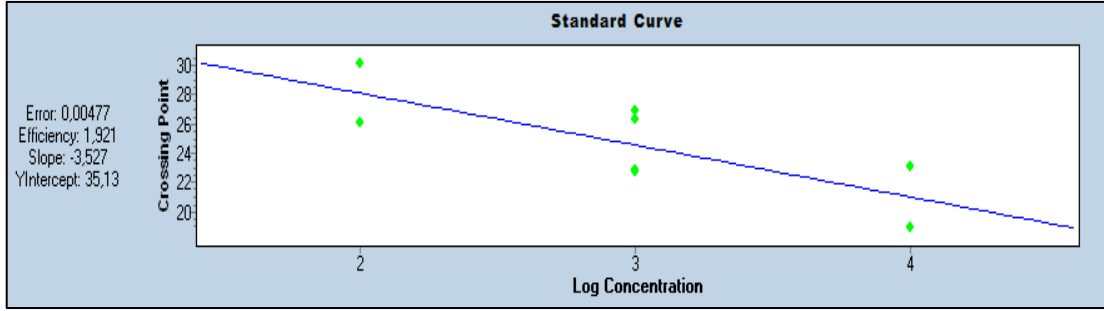
incelenmiştir. Kantitatif analiz yapılması için, önceden hazırlanmış tamamı metillenmiş standart ve seri dilüsyonlar kullanılmıştır. Sonuçların analizi, LightCycler 480 programındaki "Absolute Hesaplama/Fit Points" ile gerçekleştirilmiştir. *GNG7* hedef ve referans gen olan *ACTB* genlerine ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'te, standart curve eğrisi ise Şekil 4-6'da gösterilmektedir.



Şekil 4-4. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarının *ACTB* Genindeki Amplifikasyon Eğrileri

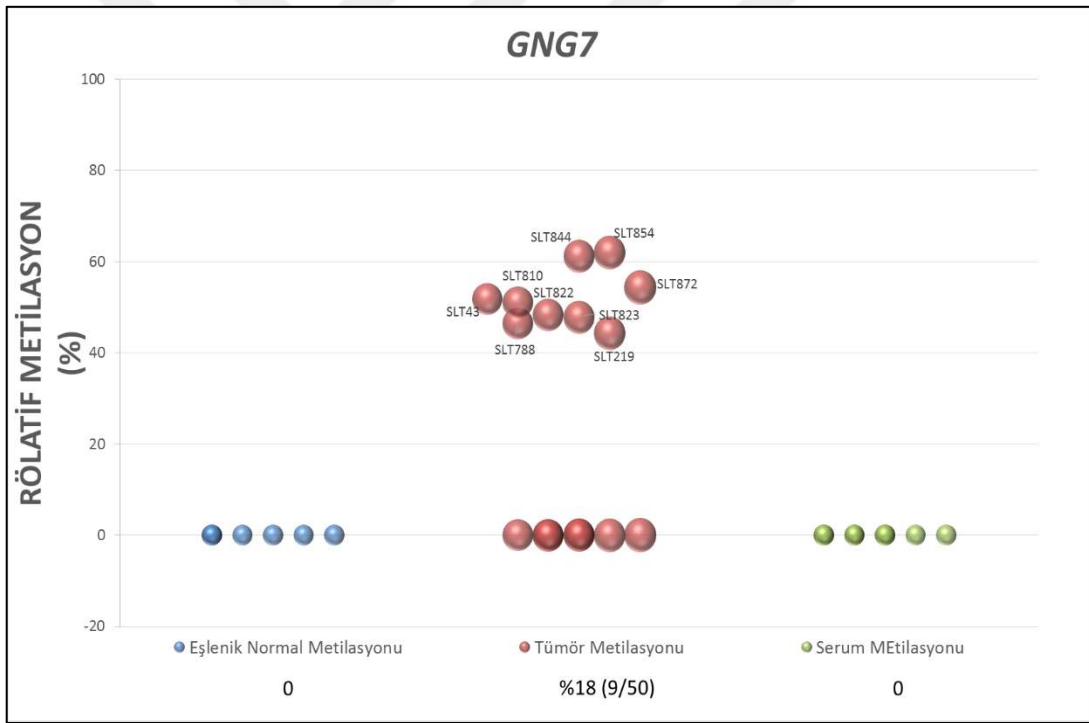


Şekil 4-5. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarının *GNG7* Genindeki Amplifikasyon Eğrileri

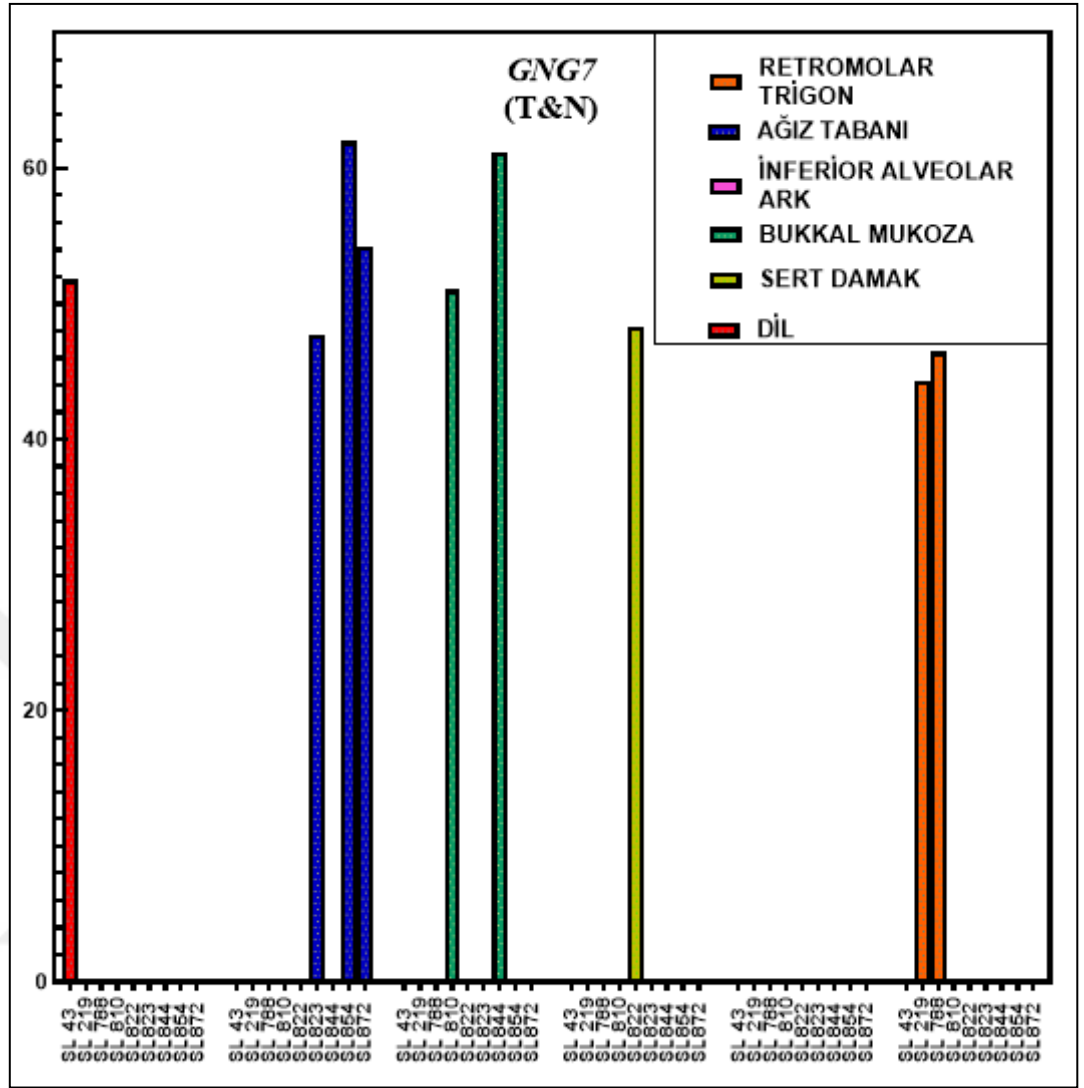


Şekil 4-6. %100 Metile Standart ve Dilüsyonlarında *ACTB* ve *GNG7* Genlerindeki Standart Eğrileri

GNG7 geninde tümör dokusunda metilasyon gözlenen 9 OSCC hastası tespit edilmiş ve OSCC hastalarına ait tümör örneklerinde *GNG7* geninin promoter bölgesindeki metilasyon oranı %18 (9/50) olarak belirlenmiştir. Hastaların eşlenik normal doku ve serum örneklerinde metilasyona rastlanmadı (Şekil 4-7).

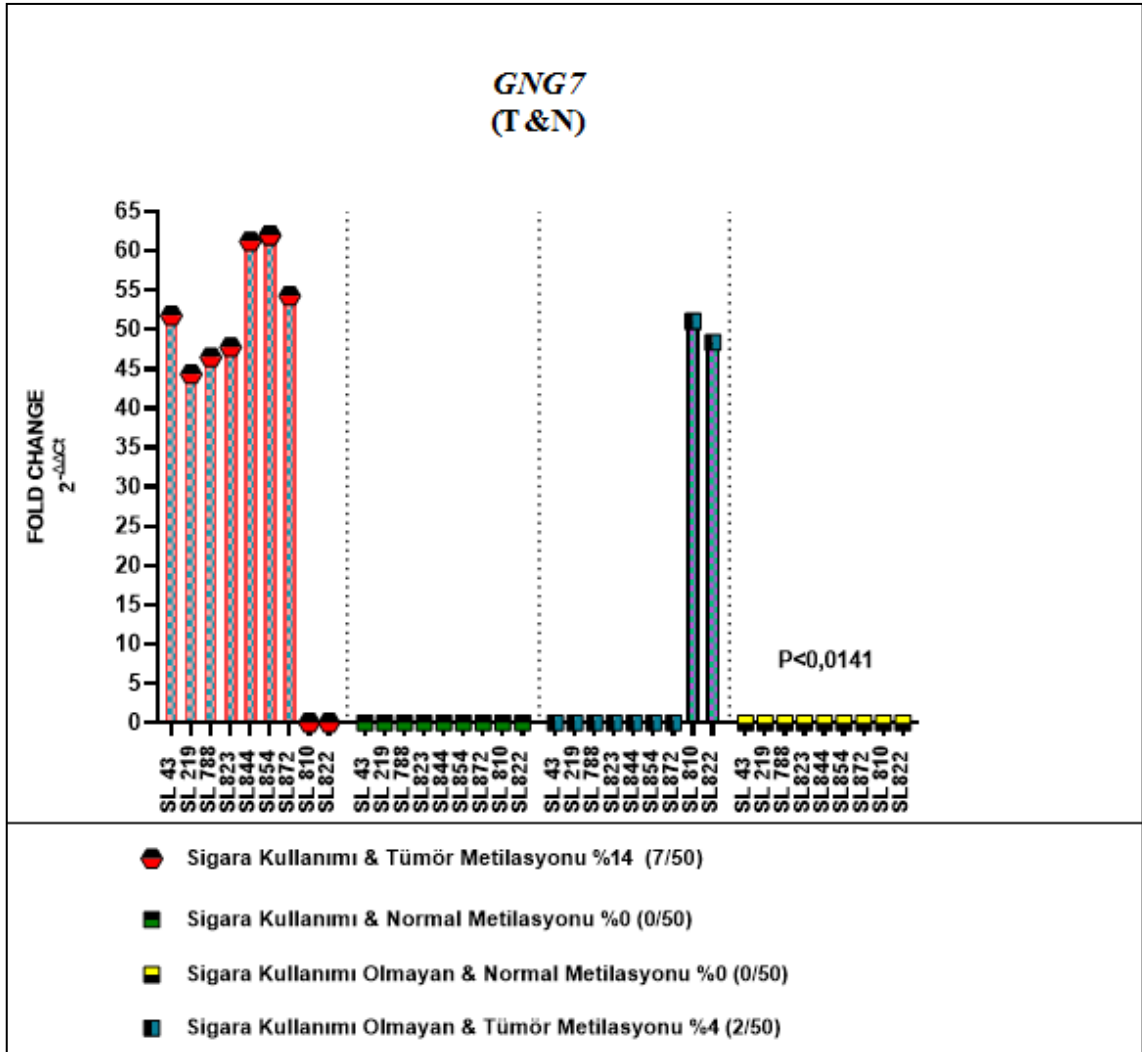


Şekil 4-7. OSCC Hastalarına Ait Tümör ve Eşlenik Normal Doku ile Serum Örneklerindeki Metilasyon Değerleri



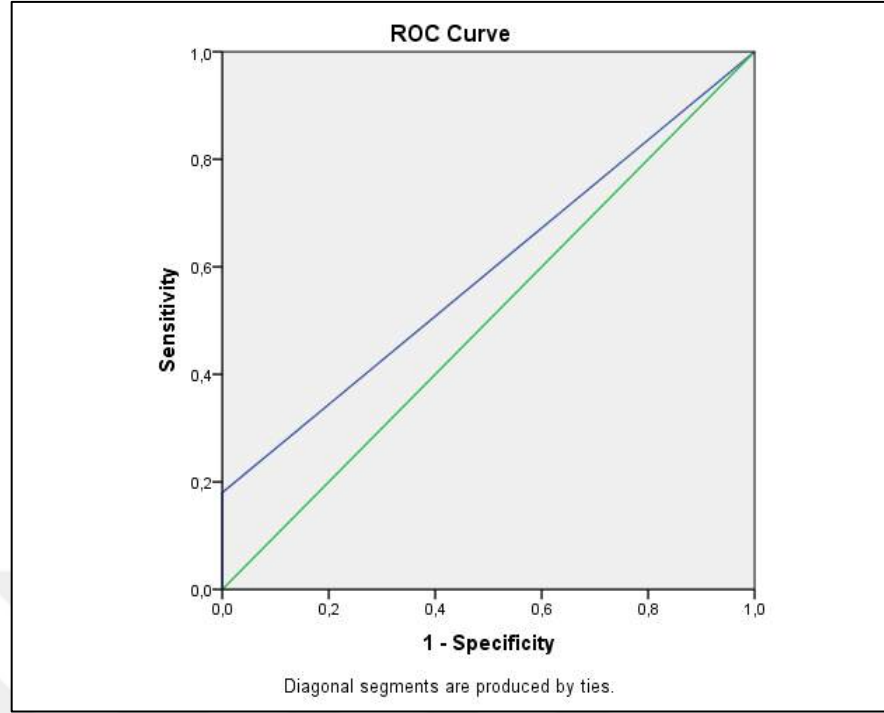
Şekil 4-8. OSCC Hastalarının Anatomik Tutulumuna Göre GNG7 Geninin Metilasyon Düzeyleri

50 OSCC hastalar içerisinde gözlemlenen 9 hastanın 3'ünde ağız tabanı bölgesinde (%33,33); 2 bukkal mukoza (%22,22) ve retromolar trigonda (%22,22); 1 dil (%11,11) ve 1 sert damakta (%11,11) olmak üzere metilasyon gözlemlenmiştir.



Şekil 4-9. OSCC Hastalarına Ait Sigara Kullanımına Bağlı Tümör ve Eşlenik Normal Dokularındaki Metilasyon Durumlarının Gösterimi (p=0,0141)

Şekil 4-9’da OSCC hastalarına ait sigara kullanımına bağlı tümör ve eşlenik normal dokularındaki metilasyonların gösterilmiştir. Sigara kullanan 32 OSCC hastasında tümör dokusunun 7’sinde (%21,87) metilasyon görülürken normal eşlenik dokularında metilasyon görülmemiştir. Sigara kullanımı olmayan 18 kişide 2’sinde (%11,11) metilasyon gözlemlenirken aynı hastaların normal eşlenik dokularında metilasyon görülmemiştir.



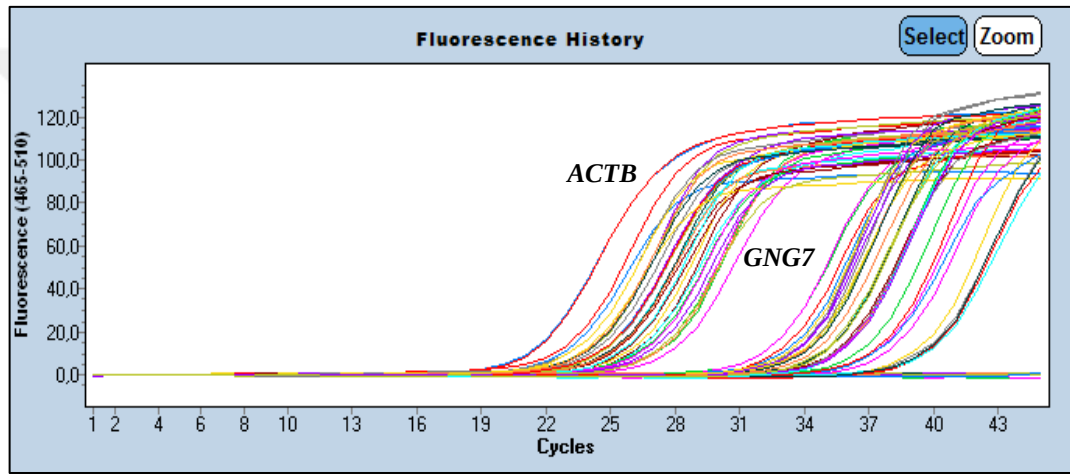
Şekil 4-10. Tümör dokusu ile sağlıklı mukoza arasındaki *GNG7* metilasyonunu ROC analizi

OSCC tümör dokusu ile sağlıklı grup normal mukozasındaki *GNG7* geninin metilasyon seviyeleri ROC analizi ile incelendiğinde, *GNG7* geninin promoter bölgesinde meydana gelen metilasyonun OSCC hastalarının dokularında tanı konulmasında özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir test olmadığı görülmektedir. Tablodan anlaşılabacağı üzere eğri altında kalan alan (AUC) 0,590'dur ve 1'e yakın olduğu görülmektedir. Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin en yüksek olduğu değer olan 22,15 eşik değeri (cut-off point) belirlenebilir. Grafik 1 ve tablo X'den anlaşılabacağı üzere eğri altında kalan alan 0,590'dır. *GNG7* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenmesi OSCC hasta grubu için Area değeri 1'e yakın olmadığı için tanı konulmasında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test değildir. Kesim değerinin hesaplanmasında duyarlılık ve özgüllük değerlerinin en yüksek olduğu değer seçilir. Tablo 13'e göre 95,5 değeri kesim noktası olarak belirlenebilir.

4.3. *GNG7* Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları

Kliniğe oral skuamöz hücre kanser tanısı ile gelen 50 hastaya ait tümör, eşlenik-normal doku ve serum örnekleri ile geçmişinde kanser hikayesi olmayan 10 sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve serum örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta

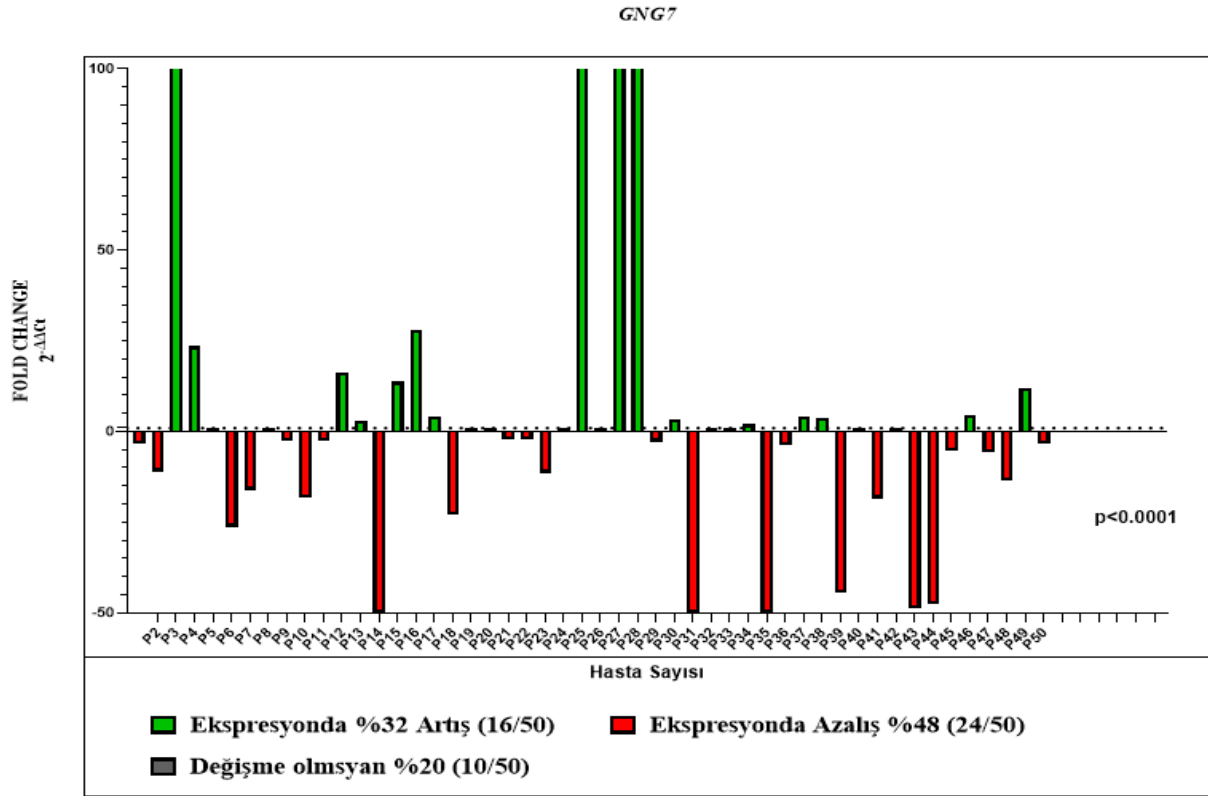
örneklerinden izole edilen RNA örneklerinden cDNA izole edilip *GNG7* geninin ekspresyon seviyeleri, SYBR Green Master karışımı kullanılarak "Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR)" tekniği kullanılarak incelendi. *GNG7* ve referans *ACTB* genlerinin Ct sonuçları "Basic Relative Quantification" programı ile hesaplanıp tümör dokusunun normal dokuya göre kat değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. Fold change değerlerine göre 2'nin üzerinde olan değerler ekspresyon artışı, 2'nin altındaki değerler ise ekspresyonda azalma olarak ele alındı (Şekil 4-8).



Şekil 4-11. Tümör ve Eşlenik Normal Doku Örneklerinde *GNG7* Geninin Ekspresyon Seviyelerinin Amplifikasyon Örnekleri

Tablo 4-4. OSCC Hastalarının Anatmik Tutulum Bölgelerine Göre Ekspresyon Durumu

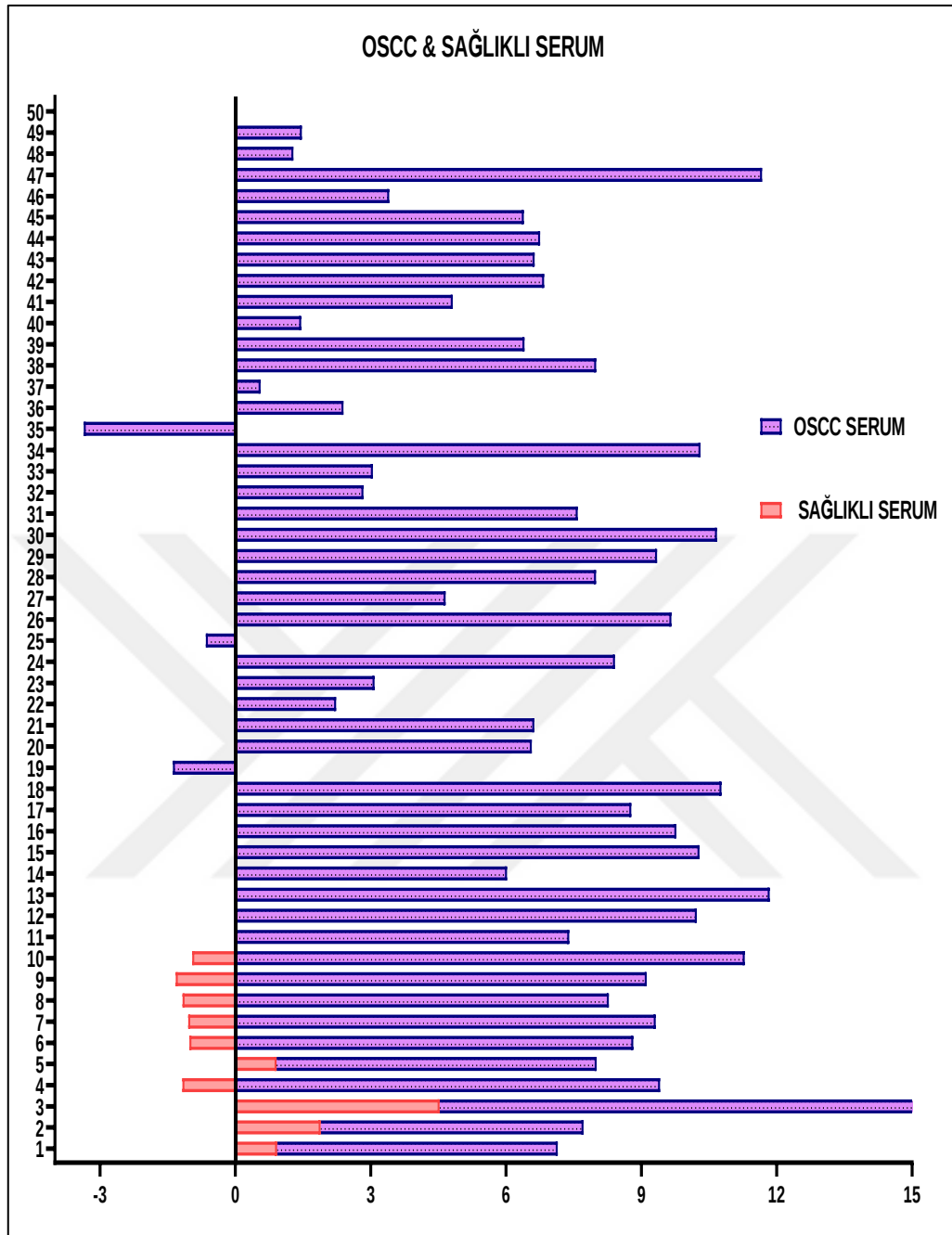
Anatomik Tutulum Bölgesi	Toplam Hasta Sayısı	T/N Ekspresyon Azalışı Gözlemlenen Hasta Sayısı	T/N Ekspresyon Artış % Gözlemlenenme Yüzdesi	T/N Ekspresyon Artış Gözlemlenen Hasta Sayısı	T/N Ekspresyon Artış % Gözlemlenenme Yüzdesi
Bukkal Mukoza	9	6	%66,66	1	%11,11
Sert Damak	2	1	%50	1	%50
Retromolar Trigon	10	3	%30	5	%50
Dil	14	4	%28,57	6	%42,85
Ağız Tabanı	9	6	%66,66	2	%22,22
İnferior Alveolar Ark	6	3	%50	1	%16,66



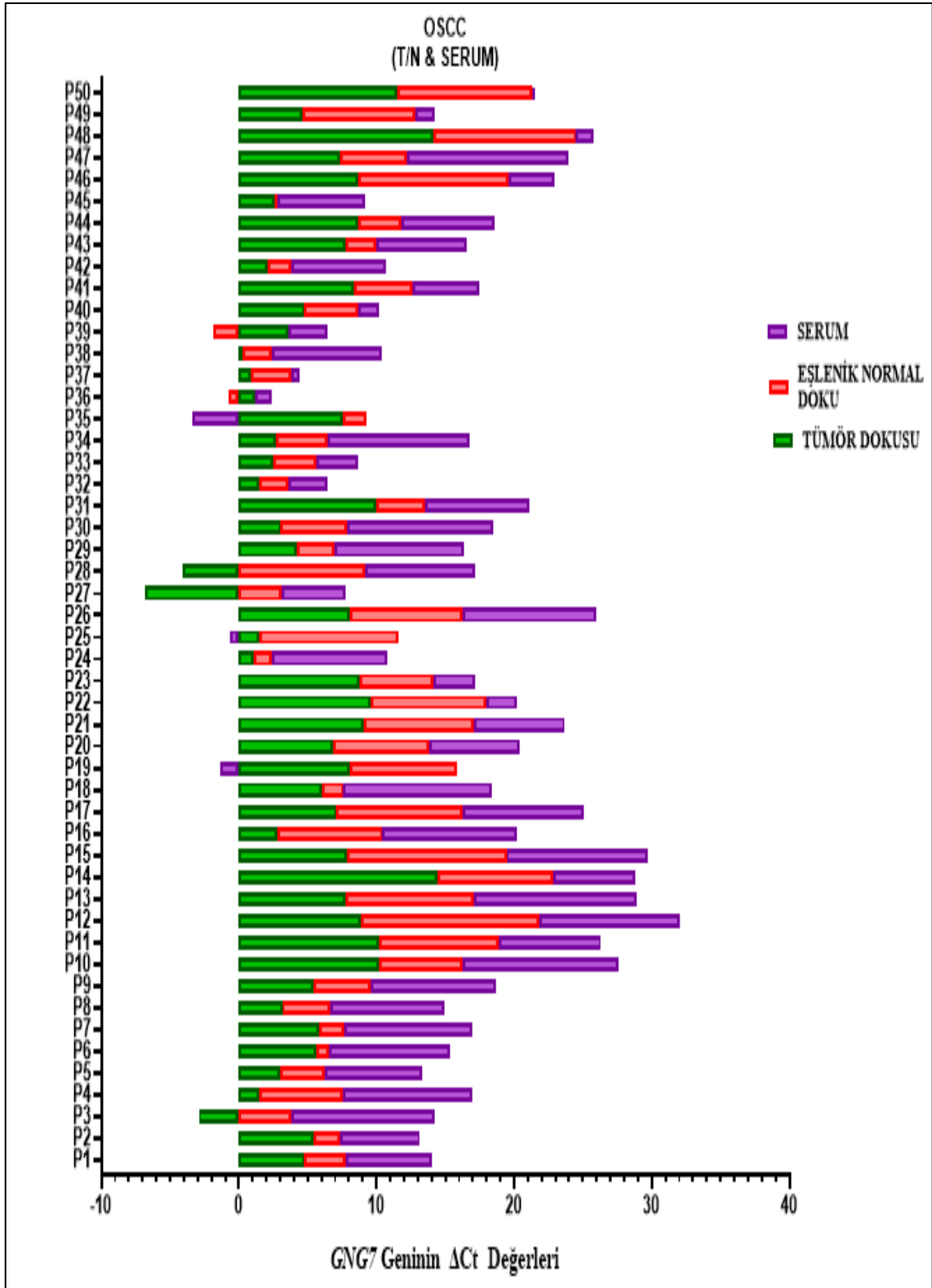
Şekil 4-12. *GNG7* Geninin OSCC Hastalarına Ait Tümör ve Eşlenik Normal Dokularının Ekspresyon Seviyelerinin ΔC_t Değerleri (Kırmızı: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde artma, Yeşil: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde azalma, Gri: Malin hasta grubunda) ($p < 0.0001$)

Şekil 4-9’da *GNG7* geninin ekspresyon artış, azalış ve değişim gözlemlenmeyen OSCC hastalarına ait sonuçlar şematize edilmiştir. Tümör dokusunun eşlenik normal dokuya oranla hastaların %48’inde (24/50) ekspresyon seviyesinde azalma, %32’sinde (16/50) ekspresyon seviyelerinde artma tespit edildi. Hastaların %20’sinde (10/50) ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

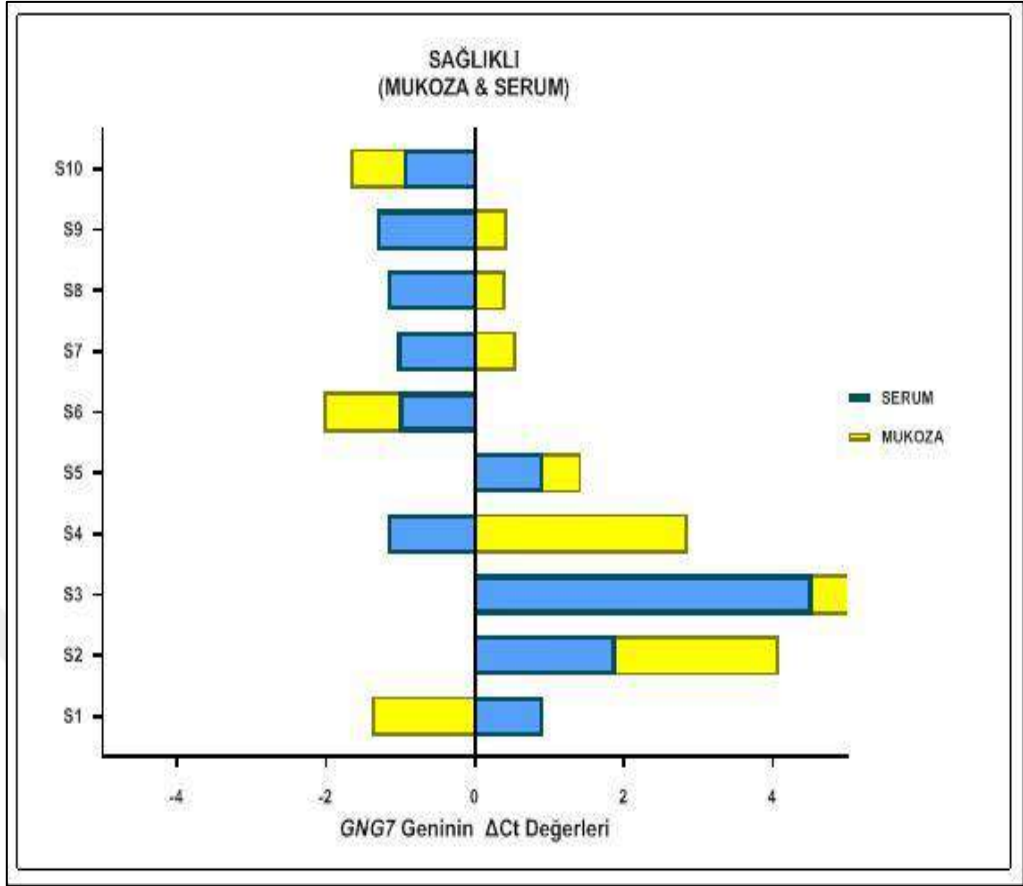
Tümör dokusunda metilasyon gözlenen 9 hastanın 7’sinde tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi.



Şekil 4-13. OSCC Hastalarının ve Sağlıklı Bireylerin Serum Örneklerindeki Ekspresyon Δ Ct Değerleri

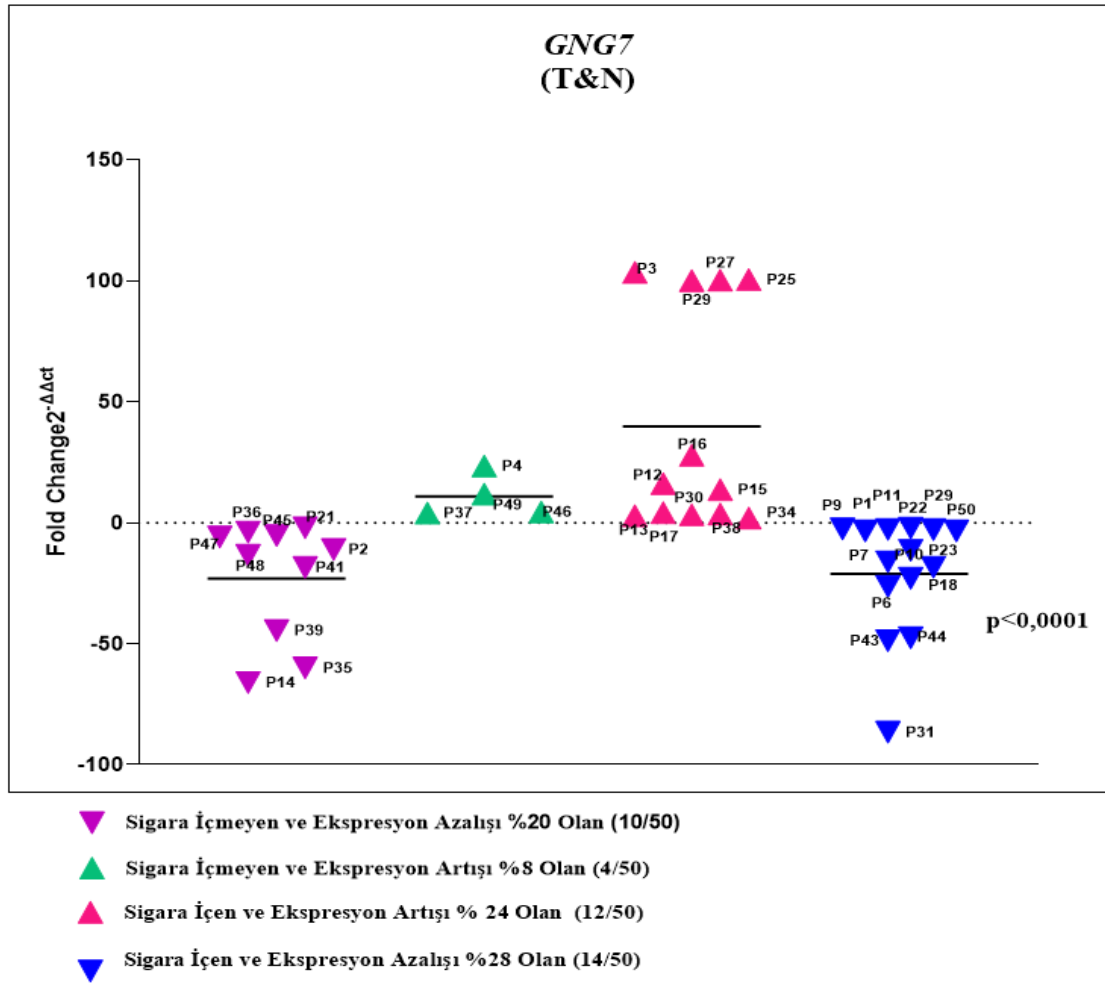


Şekil 4-14. OSCC Hastalarının Tümör, Eşlenik Normal Doku, Serum Örneklerinin Ekspresyon Seviyelerinin ΔC_t Değerleri (P: OSCC Hasta Kodlaması, Mor: Serum örneklerinin ΔC_t değerleri, Kırmızı: Eşlenik normal doku örneklerinin ΔC_t değerleri, Yeşil: Tümör doku örneklerinin ΔC_t değerleri)



Şekil 4-15. Sağlıklı Bireylere Ait Normal Mukoza, Serum Örneklerinin Ekspresyon Seviyelerinin ΔC_t Değerleri (S: Sağlıklı, Mavi: Sağlıklı serum örneklerinin ΔC_t değerleri, Sarı: Sağlıklı mukoza örneklerinin ΔC_t değerleri)

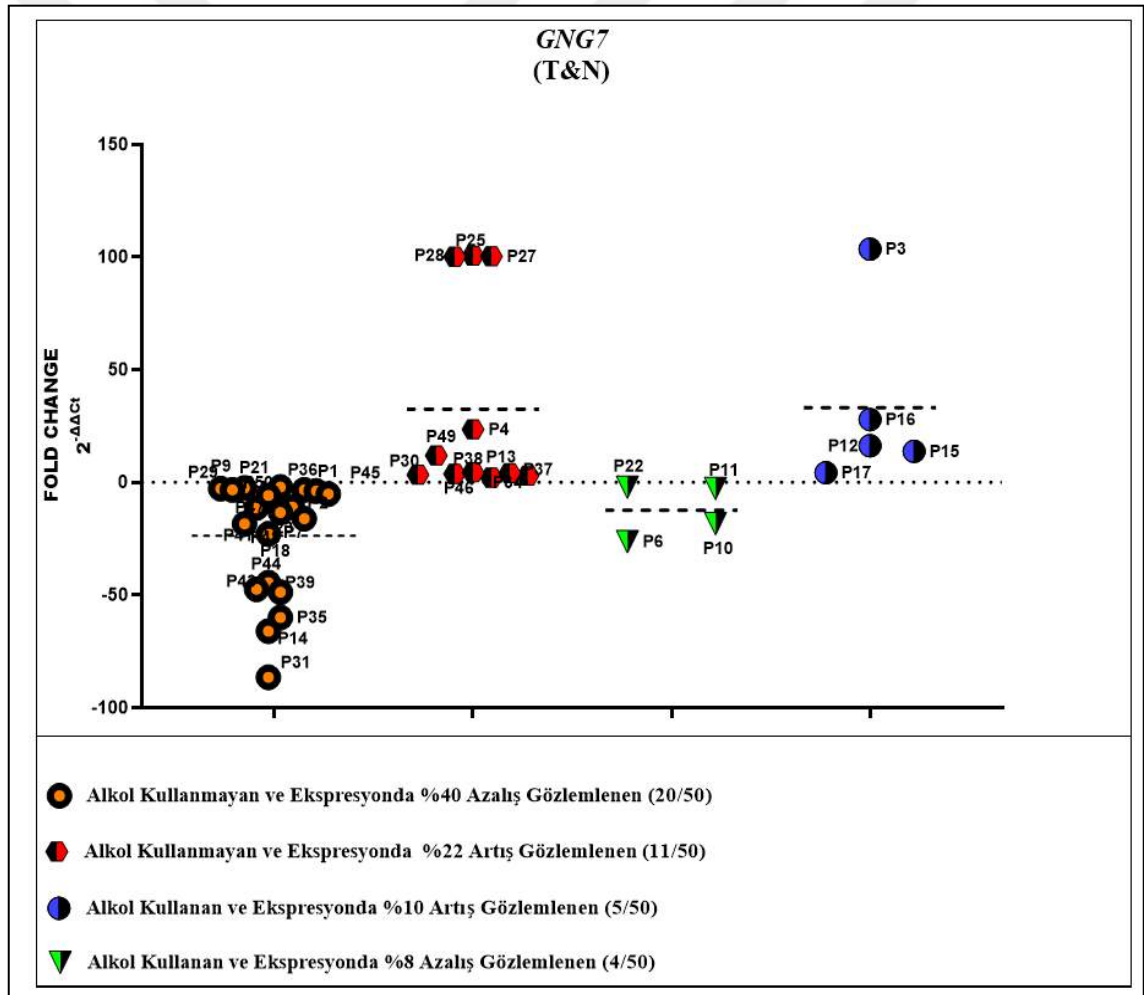
Hastaların tümör dokularına ait C_t değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait C_t değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda sağlıklı bireylere göre *GNG7* geninin ekspresyon seviyesinde 29 kat azalma tespit edildi. Sadece metilasyon gözlenen 9 hastanın tümör dokularının C_t değerleri ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarının C_t değerlerinin ortalamaları karşılaştırılıp foldchange değeri hesaplandı ve metilasyon gözlenen hastalarda 35 kat ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-16. OSCC hastalarının GNG7 Geninin Ekspresyonda Artış ve Azalışa Bağlı Olarak Sigara Kullanımının Gösterilmesi (p=0,0001)

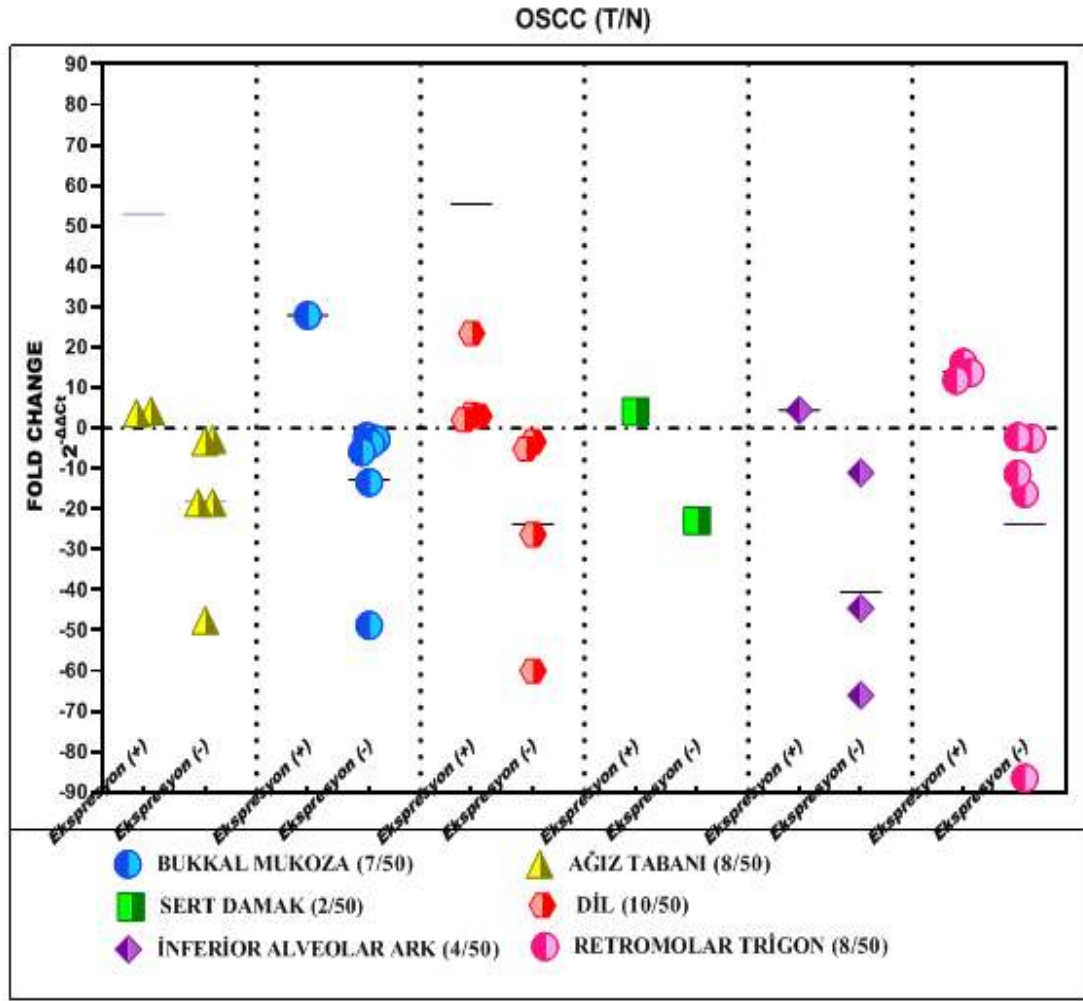
Şekil 4-15'te ele alındığında, OSCC hastalarına ait *GNG7* geninin sigara kullanımına bağlı olarak ekspresyon artış ve azalış yüzdeleri verilip incelenmiştir (p=0,0001). Sigara kullanan 32 hastanın 12'sinde ekspresyonda artış (%37,5), 14'ünde (%43,75) ekspresyon azalışı gözlemlenmiş ve 6 hastada herhangi bir bulgu gözlenmemiştir. 18 sigara kullanmayan hastaların 4'ünde (%22,22) ekspresyonda artış, 10'unda (%55,55) ekspresyonda azalış gözlemlenmiş ve 4'ünde herhangi bir bulgu gözlenmemiştir. Sigara kullanımına bağlı anatomik tutulum bölgesine göre incelendiğinde 12 ekspresyon artışı gözlemlenen hastalardan 4'ü (%33,33) ağız tabanı; 2'si (%16,66) retromolar trigon; 5'i (%41,66) dil ve 1'i (%8,33) bukkal mukozada görülmektedir. 14 kişide sigaraya bağlı ekspresyonda azalma analiz edildiğinde 2'si (%14,28); 5'i (%35,71) retromolar trigon; 4'ü (%28,57) ağız tabanı; 2'si (%14,28) bukkal mukoza ve 1'i (%7,14) sert damakta görülmektedir. 10 kişide sigara kullanılmamasına

bağlı ekspresyon azalışı ise 4'ü (%40) bukkal mukoza; 3'ü (%30) inferior ark.; 2'si (%20) dil ve 1'i (%10) ağız tabanında ; sigara kullanılmamasına bağlı ekspresyonda artış gözlemlenen 4 kişinin 1'i (%25) dil; 1'i (%25) sert damak; 1'i (%25) inferior ark.; 1'i (%25) retromolar trigon anatomik bölgelerinde görülmektedir.



Şekil 4-17. OSCC hastalarının GNG7 Geninin Alkol Kullanımına Bağlı Ekspresyonda Artış ve Azalışının Gösterilmesi

OSCC hastalarının alkol kullanımına bağılı olarak *GNG7* geninin ekspresyon seviyelerinde artma veya azalma Şekil 4-16'da gösterilmiştir. Alkol kullanmayan 31 OSCC hastasının 11'inde ekspresyon artış (%35,48) gözlemlenirken, 20 kişide azalış (%64,51) görülmektedir. Alkol kullanan 19 hastanın 5'inde ekspresyonda artış (%26,31) ve 4 kişide ekspresyonda azalış (%21,05) gözlemlenmiştir. Alkol kullanan 19 hastanın ekspresyon artışı gözlemlenen 5 hastada anatomik tutulum bölgelerine göre; 2 (%40) ağız tabanı 2 (%40) retromolar trigon ve 1 (%20) bukkal mukoza olarak gözlemlenirken; ekspresyon azalışı gözlemlenen 4 hastada; 1 (%25) dil, 2(%50) ağız tabanı, 1 (%25) retromolar trigon olarak gözlemlenmiştir. Alkol kullanmayan 31 hastanın ekspresyonu artışı gözlemlenen 11 hastada anatomik tutulum bölgelerine göre incelendiğinde ise; 6 (% 54,54) dil, 2 (%18,18) ağız tabanı, 1 (%9,09) retromolar trigon, 1 (%9,09) inferior ark ve 1 (%9,09) sert damak olarak belirtilmiştir.



Şekil 4-18. OSCC Hastalarının Anatomik Tutulumuna Göre *GNG7* Geninin Ekspresyon Düzeyleri

Tümör dokusunun eşlenik normal dokuya oranla 16'sında ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenen hastaların 4'ü (%25) ağız tabanı; 1'i (%6,25) bukkal mukoza; 6'sı (%37,5) dil; 1'i (%6,25) sert damak; 3'ü (%18,75) retromolar trigon ve 1'i (%6,25) inferior alveolar arkta gözlemlenmiştir. Ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenen 24 OSCC hastalarından ağız tabanında 6 (%20,83); bukkal mukozada 6 (%25); dilde 4 (%16,66); sert damakta 1(%4,16); inferior alveolar arkta 3(%12,5) hastada ve retromolar trigonda 5 (%20,83) kişi gözlemlenmiştir.

Tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon azalışı veya artışı ile hastalara ait klinikopatolojik bilgilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması IBM SPSS Statistics 20 programı yardımıyla gerçekleştirildi. Ekspresyon durumu ile hastaların klinikopatolojik verileri karşılaştırıldığında lenf nodu tutulumu, anatomik tutulum bölgeleri ve metastaz ile anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

Ekspresyon seviyesinde artış ile nüks arasında istatistiksel anlamlılık saptanmaktadır ($p=0,05$). OSCC hastalarının sigara kullanımına bağlı olarak *GNG7* geninin ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında ileri derecede istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir ($p=0,0001$). %95 güven aralığında yapılan ANOVA (F-testi) testine göre diferansiyasyon derecesi ve TNM evresi (I-II-III-IV) ile *GNG7* geninin ekspresyon seviyesinde artma/azalma ve promoter metilasyon durumları incelendiğinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ($p>0,05$). Wilcoxon Rank testi ile yapılan analizde metilasyon gözlenen hastalarda, ekspresyon seviyesinde artma ve ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen gruplar arasındaki kat değişim oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



5. TARTIŞMA

Oral kavite kanserleri, dünyada en sık görülen sekizinci kanser olup yılda 300.000'den fazla vaka görülmektedir. Oral kavite kanserleri arasında büyük çoğunluğunu OSCC oluşturmaktadır (142, 143). Oral skuamöz hücreli karsinom kötü prognoz ile karakterize olup metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir (144).

Yaş, alkol tüketimi, diyet, iyonize radyasyon ve östrojene maruziyet (145), tütün ile alkol kullanımı, kötü ağız hijyeni (POH), kuruyemiş tüketimi ve mukozal travma OSCC'nin görülmesi nedenlerindendir (84). Genellikle, dil, ağız tabanı, bukkal mukoza, sert damakta gözlemlenip (146) coğrafi bölgelere göre de insidansta değişiklik gözlemlenmektedir (147). Tedavi planının yapılması ile kişinin durumu, hayat kalitesi, göz önünde bulundurulması gerekmektedir. OSCC tedavi seçeneklerinde ise daha sık kullanılan yöntem cerrahi rezeksiyon ve sonrasında brakiterapi uygulamasıdır (128). İlerlemiş tümör vakaları için ise adjuvan radyoterapi, kemoterapi gerektiği durumlarda ise her ikisi birden uygulanmaktadır. Hastalığın teşhisine bağlı değerlendirilme yapıldığında bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrasonografi ve pozitron emisyon tomografisi (PET)-CT'den yararlanılmaktadır(11).

Epigenetik mekanizmaların keşfi ile insanlarda görülen birçok kanserin patogenezinde genetik ile birlikte epigenetiğin rol aldığı ortaya çıkmıştır. Tümör dokularından ayrılan DNA'lar kana karışarak, tümörojenizasyon oluşumunun erken döneminde, bazen premalin lezyonlarda da birtakım epigenetik değişikliklerin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Oral mukozada, bazı epigenetik değişikliklerin görülmesi ile birlikte "moleküler parmak izi" olarak adlandırılan ve dokuların maliniteye dönüşümünü teşhis etmesinde yardımcı olmaktadır. Bu amaçla insan kanserlerinde belirteç olarak araştırılma yapılmakta ve böylece bu yeni yaklaşımların baş ve boyunda ağız içi epitel kanserlerinde morbidite ve mortaliteye olumlu katkı sağlayabilir, erken teşhis edilerek geç kalınmayı engellemeye yardımcı olabilmektedir (148).

Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının yapmış olduğu 2013 yılına ait bir çalışma sonucunda (15) 126 aday gen arasından sadece 7 gende (*MAP3K3*, *MAP2K3*, *GNG7*, *GALNT10*, *PPFIBP2*, *TUSC2* ve *TXNIP*) tümör dokularında metilasyon gözlemlenip normal mukozada bisülfid ile muamele sonucunda metilasyon görülmediği tespit edilmiştir. QMSP tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlara göre; *GNG7* geni için, 33 HNSCC hastalarında 20 metile tümör dokusu içinden 8 oral kavite bölgesinde olmak

üzere, oldukça yüksek metilasyon varlığı, normal mukozada ise metilasyonun görülmediği anlaşılmıştır.

GNG7 geni 19. kromozom üzerinde bulunan ve içerdiği β ve γ zincirler üzerinde GTPaz aktivitesine sahip olan bir gendir. Ayrıca, G proteini ailesinin üyelerinden olup hücre transmembran sinyalizasyonunda görev almaktadır. Güncel literatürlerde, *GNG7* geninin oral skuamöz hücreli karsinomlarında metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamıştır.

Literatürde *GNG7* mRNA ekspresyon seviyelerinin; akciğer (149), karaciğer (150, 151), böbrek (139), özofagus (131), pankreas (152) ve baş-boyun kanserlerinin araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Skuamöz hücre karsinomlu bölgeleri alınan larenks ve ağız tabanı kanseri olan bireylerden 68/188 vakada (%36) *GNG7* ekspresyon kaybı gözlemlenmiştir (14). Özofagus kanserli hastalarla ile yapılan çalışmada, 55 hastanın 27'sinde *GNG7* ekspresyonunda azalma gözlemlenmiş olup tümör dokusunun normal özofagus dokusuna kıyasla daha fazla baskılandığı bildirilmiştir (131). İntrahepatik kolanjiyokarsinomlu (IHCC) hastalar ile yapılan çalışmada, *GNG7* geni mRNA ekspresyonu IHCC'li 18 hastanın 17'sinde (%94) tümör dokusunda normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlemlenmiş ve ekstrahepatik kolanjiokarsinomlu (EHCC) 21 hastada ise *GNG7* mRNA ekspresyonu EHCC dokularında peri-kanserli safra kanalı dokusuna ve normal safra kanalı dokularına kıyaslanması sonucu önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (150). Berrak hücreli böbrek hücreli karsinomlu (ccRCC) hastalar ile *GNG7* geninin biyolojik işlevini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, *GNG7*'nin ccRCC dokularında aşağı regüle edildiğini ve ccRCC hastalarında survi ile ters ilişki olduğu ve klinik patolojik değerler ile kıyaslanması beklenildiğinde ise *GNG7*'nin düşük ekspresyonunun tümör derecesi ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (139). Pankreas kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada, *GNG7* geninin Northern blot analizi ile 9'u kanal (duct) hücre karsinomu, 2'si kistadenokarsinom ve blastom içeren toplam 12 pankreas kanserlerinde ekspresyon azalışı belirlenmiştir (152). Bunun aksine, akciğer kanserli hastalar ile FOXP1 ve kemokin sinyal yollarındaki genler (*CCR1*, *ADCY5*, *GNG7*, *VAV3* ve *PLCB1*) ile ilgili bir çalışmada FOXP1'in bastırılmasının, akciğer kanseri hücrelerinde *GNG7* geninde ekspresyonun artışı tetiklediği bunun sonucunda *GNG7* geninin akciğer kanseri dokuları için onkojenik bir etki yarattığı düşünülmüştür (149).

Literatürde; Prof. Dr. Semra Demokan ve ark. yaptığı çalışma haricinde, *GNG7* geninin promoter bölgesindeki metilasyon durumunu araştıran çok az çalışma vardır. Bu çalışmalardan biri olan ve ccRCC'li hastalar ile yapılan bir çalışmada *GNG7* geninin promotör bölgesinde tümörlü dokularda metilasyon gözlemlenip normal dokularda metillenmediği ve *GNG7* metilasyonunun ccRCC'nin progresyonunu etkilediği *GNG7* geninin inaktivasyonu sonucu varılmıştır (139). Bir diğer çalışmada; özofagus kanserli hastalarda *GNG7* promoter hipermetilasyonunun, erken tümörlerde olduğu gibi geç evre tümörlerinde görüldüğü, kanserli olmayan özofagus dokusunda orta derecede metillenme görülmüştür.

GNG7 promoter hipermetilasyonu, *GNG7* ekspresyonunun baskılanmasına neden olduğuna varıldığı bir diğer çalışmada, *GNG7* gen ekspresyonunun larenks kanseri hücre hatlarında ve 15 örnekte *GNG7* downregülasyonunda hipermetilasyon ile önemli ölçüde ilişkili olduğu görülmüştür. Böylece hipermetilasyonun *GNG7* ekspresyonunun baskılanmasında rolü olduğu anlaşılmıştır (14).

Yapılan çalışmamızda, OSCC teşhisi konulmuş 50 hastanın tümör, eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile 10 sağlıklı bireylerin normal mukoza ve serum örnekleri alınmıştır. Elde edilen örneklerin uygun prosedürler ile DNA/RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra metilasyon deneylerinde kullanılmak üzere BC-DNA; ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere cDNA dönüşümleri yapılmış olup ekspresyon için QRT-PCR; metilasyon analizleri için ise QMSP yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak klinik parametrelerle karşılaştırılmıştır.

GNG7 geninde tümör dokusunda metilasyon gözlenen 9 OSCC hastası gözlemlendi. OSCC hastalarına ait tümör örneklerinde *GNG7* geninin promoter bölgesindeki, metilasyon oranı %18 (9/50) olarak tespit edilmiştir. Hastaların eşlenik normal doku ve serum örneklerinde metilasyona rastlanılmamıştır. 50 OSCC hasta örneklerinin yanında kontrol amaçlı kullanılan 10 sağlıklı bireylerin doku ve serum örneklerinde metilasyon gözlemlenmemiştir. 50 OSCC hastalar içerisinde gözlemlenen 9 hastanın 3'ünde (%33,33) ağız tabanı bölgesinde; 2 (%22,22) bukkal mukoza ve retromolar trigonda; 1 (%11,11) dil ve 1 (%11,11) sert damakta olmak üzere metilasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca OSCC hastalarına ait sigara kullanımına bağlı tümör ve eşlenik normal dokularındaki metilasyon değerlerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlenmiştir ($p=0,0141$). Ek olarak, tümör dokusunda metilasyon gözlenen 9 hastanın 7'sinde

(%77,77) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi. 7 hastanın anatomik tutulum bölgelerine göre analiz edildiğinde; 2'si retromolar trigon, 1'i dil, 2'si bukkal mukoza, 2'si ağız tabanında metilasyona bağlı ekspresyonda azalış gözlemlenmektedir. Sigara kullanımı ve bulunulan evre beraber incelendiğinde; dil bölgesinde görülen 1 hastanın Evre II'de olduğu ve sigara kullandığı, retromolar trigonda görülen 2 hastanın 2'si sigara kullanmakta ve biri Evre III diğeri Evre IV'te olduğu, bukkal mukozada görülen 2 hastanın sadece 1'i sigara kullanmakta ve sigara kullanan hastanın Evre II, sigara kullanmayan hasta ise Evre III'te olduğu, ağız tabanında görülen 2 hastanın 2'si sigara kullanmakta ve ikisi de Evre IV'te bulunduğu buna bağlı olarak evre değerlendirmesinin sigara ile ilişkisinin olmadığı sadece sigara kullanımının metilasyona bağlı ekspresyonda azalışta bir etken olduğu söylenebilir. Metilasyonu görülen 9 hastanın anatomik tutulum bölgelerine göre sigara kullanımı incelendiğinde; dil bölgesinde metilasyonu görülen 1 hasta (%100), retromolar trigonda metilasyonu görülen 2 hastanın 2'si (%100), bukkal mukozada metilasyonu görülen 2 hastanın sadece 1'i (%50), ağız tabanında metilasyonu görülen 3 hastanın 3'ünde sigara kullanımı var iken (%100) sert damakta metilasyonu görülen 1 hasta sigara kullanmamaktadır. Buna bağlı olarak sigara kullanımının metilasyon görülmesinde etki ettiği varsayılabilmektedir. Ek olarak metilasyonu görülen 9 hastanın 2'si Evre II, 3'ü Evre III, 4'ü Evre IV olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre evre artışı gözlemlendikçe metilasyon görülme oranı gittikçe artmakta olduğu varsayımında bulunulabilir. Alkol kullanımına bağlı olarak metilasyon seviyeleri incelendiğinde metilasyon görülen 9 hastanın hiçbirisi alkol kullanmamaktadır. Sadece metilasyon gözlenen 9 hastanın tümör dokularındaki *GNG7* geninin ekspresyon seviyelerinin sağlıklı mukozaya göre 35 kat azaldığı olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda, tümör dokusunun eşlenik normal dokuya oranla hastaların %48'inde (24/50) ekspresyon seviyesinde azalma, %32'sinde (16/50) ekspresyon seviyelerinde artma tespit edildi. Hastaların %20'sinde (10/50) ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Ayrıca, metilasyonu gözlemlenmeyen 41 OSCC hastanın 14'ünde (%34) ekspresyonda artış; 17'sinde (%41) ekspresyonda artış gözlemlenmiştir. OSCC hastalarının sigara kullanımına bağlı olarak *GNG7* geninin ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında ileri derecede istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir ($p=0,0001$). Toplam 50 OSCC hastaları arasından sigara kullanan 32 hastanın 12'sinde ekspresyonda artış (%37,5), 14'ünde (%43,75) ekspresyon azalışı

gözlemlenmiş ve 6 hastada herhangi bir bulgu gözlenmemiştir. 18 sigara kullanmayan hastaların 4'ünde (%22,22) ekspresyonda artış, 10'unda (%55,55) ekspresyonda azalış gözlemlenmiş ve 4'ünde herhangi bir bulgu gözlenmemiştir. Tümör dokusunun eşlenik normal dokuya oranla 16'sında ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenen hastaların 4'ü (%25) ağız tabanı; 1'i (%6,25) bukkal mukoza; 6'sı (%37,5) dil; 1'i (%6,25) sert damak; 3'ü (%18,75) retromolar trigon ve 1'i (%6,25) inferior alveolar arkta gözlemlenmiştir. Ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenen 24 OSCC hastalarından ağız tabanında 6 (%20,83); bukkal mukozada 6 (%25); dilde 4 (%16,66); sert damakta 1(%4,16); inferior alveolar arkta 3(%12,5) hastada ve retromolar trigonda 5 (%20,83) kişide gözlemlenmiştir.

Sigara kullanımına bağlı anatomik tutulum bölgesine göre incelendiğinde 12 ekspresyon artışı gözlemlenen hastalardan 4'ü (%33,33) ağız tabanı; 2'si (%16,66) retromolar trigon; 5'i (%41,66) dil ve 1'i (%8,33) bukkal mukozada görülmektedir. 14 kişide sigaraya bağlı ekspresyonda azalma analiz edildiğinde 2'si (%14,28); 5'i (%35,71) retromolar trigon; 4'ü (%28,57) ağız tabanı; 2'si (%14,28) bukkal mukoza ve 1'i (%7,14) sert damakta görülmektedir. 10 kişide sigara kullanılmamasına bağlı ekspresyon azalışı ise 4'ü (%40) bukkal mukoza; 3'ü (%30) inferior ark.; 2'si (%20) dil ve 1'i (%10) ağız tabanında ; sigara kullanılmamasına bağlı ekspresyonda artış gözlemlenen 4 kişinin 1'i (%25) dil; 1'i (%25) sert damak; 1'i (%25) inferior ark.; 1'i (%25) retromolar trigon anatomik bölgelerinde görülmektedir.

Alkol kullanmayan 31 OSCC hastasının 11'inde ekspresyon artış (%35,48) gözlemlenirken, 20 kişide azalış (%64,51); alkol kullanan 19 hastanın 5'inde ekspresyonda artış (%26,31) ve 4 kişide ekspresyonda azalış (%21,05) gözlemlenmiştir. Alkol kullanan 19 hastanın ekspresyon artışı gözlemlenen 5 hastada anatomik tutulum bölgelerine göre; 2 (%40) ağız tabanı 2 (%40) retromolar trigon ve 1 (%20) bukkal mukoza olarak gözlemlenirken; ekspresyon azalışı gözlemlenen 4 hastada; 1 (%25) dil, 2(%50) ağız tabanı, 1 (%25) retromolar trigon olarak gözlemlenmiştir. Alkol kullanmayan 31 hastanın ekspresyonu artışı gözlemlenen 11 hastada anatomik tutulum bölgelerine göre incelendiğinde ise; 6 (% 54,54) dil, 2 (%18,18) ağız tabanı, 1 (%9,09) retromolar trigon, 1 (%9,09) nferior ark ve 1 (%9,09) sert damak olarak belirtilmiştir.

Nüks görülmesine bağlı ekspresyonda artış oranında istatistiksel anlamlılık görülmektedir ($p=0,05$). 10 sağlıklı bireylerin serum örneklerinin ΔCt değerlerinin

ortalaması 0,1575 ve 50 OSCC hastası bireylerin serum örneklerinin ΔC_t değerlerinin ortalaması 6,3362'dir. Hastaların tümör dokularına ait C_t değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait C_t değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda sağlıklı bireylere göre *GNG7* geninin ekspresyon seviyesinde 29 kat azalma tespit edildi.

GNG7 geni ile Amerikan popülasyonunda yapılan Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının önceki çalışmasında metilasyon yüzdesi ile bizim çalışmamızdaki metilasyon yüzdeleri farklı bulunmuştur. Toplam hasta popülasyonun içinde bulunan 8 OSCC hastasının 7'sinde *GNG7* geninde metilasyon gözlemlendiği, bizim çalışmamızda ise 50 OSCC hastası arasından sadece 9'unda metilasyon gözlemlenmiştir. Bunun temel nedenlerinden biri iki farklı coğrafi bölgede iki farklı insan popülasyonundan kaynaklanmasıdır. Epigenetik, gen-çevre etkileşiminin en önemli örneklerinden biridir. Bu nedenle iki farklı popülasyon olan Amerikan-Türk popülasyonlarındaki *GNG7* geninde farklı metile özellikler göstermesi doğaldır. Ayrıca popülasyon farklılıkları haricinde hastaların alkol, sigara, *Cannabis sativa* gibi ürünlerin kullanımı, POH, iyonize radyasyona maruziyet, uyguladığı diyet ve östrojen maruziyeti kişiden kişiye farklılık gösterebileceğinden ötürü metilasyon görülme oranlarında değişime neden olmuş olabilir. Buna ek olarak, genellikle promotor bölgelerinde yer alan "C" ve "G" bazların içeriği bakımından CpG adacıklarının fazla ve metillenmemiş olması sebebiyle metilasyona uygundur. CpG adacıklarının baz uzunluğunun her popülasyonda veya her bir bireyde farklılık taşıyabilirliği olabilmesinden ötürü metillenme oranında da birtakım değişiklikler mevcut olabilir. Önceki çalışmada kullanılan *GNG7* genine ait primer-prob ile bizim tez çalışmamızda kullandığımız primer-prob farklıdır.

GNG7 geninin Türk popülasyonunda OSCC karsinogenez ile ilişkili rolünü kavramak amacıyla daha geniş hasta gruplarında ileri validasyon yapılması gerektiği böylece *GNG7* geninin potansiyel bir biyomarker potansiyeli olup olamayacağı anlaşılabilir.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30. Epub 2020/01/09. doi: 10.3322/caac.21590. PubMed PMID: 31912902.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2018;68(6):394-424.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2021;71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654. PubMed PMID: 33433946.
4. De Silva S, Tennekoon KH, Karunanayake EH. Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy.* 2019;11:71.
5. Ayaz GB, Şahin Ö, Ayaz U, Özdemir SM. Epigenetik ve Kanser.
6. Dumitrescu RG. Interplay between genetic and epigenetic changes in breast cancer subtypes. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine.* 2018:19-34.
7. KÜREKÇİ GK, Bunsuz M, Gizem Ö, Dincer P. INHERITANCE OF ACQUIRED EPIGENETIC MODIFICATIONS AND ITS ROLE IN DISEASE SUSCEPTIBILITY. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine.* 2017;80(1):45-53.
8. GÜNGÖR ÖF. Epigenetik ve genomik baskılanma. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2015;55(2):73-81.
9. Karakülah K, Şengül C, Şengül CB. Sigara Bağımlılığının Genetiği. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar.* 2014;6(3):284-93.
10. Fronie A, Bunget A, Afrem E, Preoteşcu LL, Corlan Puşcu D, Streba L, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(2):343-8.
11. Givony S. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) an overview. *Medicinos mokslai Medical sciences Kėdainiai: VšĮ" Lietuvos sveikatos mokslinių tyrimų centras",* 2020, vol 8, no 13, Mar 23. 2020.
12. Lalla RV, Treister N, Sollecito T, Schmidt B, Patton LL, Mohammadi K, et al. Oral complications at 6 months after radiation therapy for head and neck cancer. *Oral diseases.* 2017;23(8):1134-43.
13. Marur S, Forastiere AA, editors. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings;* 2016: Elsevier.
14. Hartmann S, Szaumkessel M, Salaverria I, Simon R, Sauter G, Kiwerska K, et al. Loss of protein expression and recurrent DNA hypermethylation of the GNG7 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of applied genetics.* 2012;53(2):167-74.
15. Demokan S, Chuang AY, Chang X, Khan T, Smith IM, Pattani KM, et al. Identification of guanine nucleotide-binding protein γ -7 as an epigenetically silenced gene in head and neck cancer by gene expression profiling. *International journal of oncology.* 2013;42(4):1427-36.
16. BAYKARA O. KANSER TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2016;5(3):154-65.
17. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews genetics.* 2006;7(1):21-33.
18. Larsson L-G. Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Seminars in Cancer Biology.* 2011;21(6):367-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.10.005>.

19. Fontham ET, Thun MJ, Ward E, Balch AJ, Delancey JOL, Samet JM. American Cancer Society perspectives on environmental factors and cancer. *CA: a cancer Journal for Clinicians*. 2009;59(6):343-51.
20. Noble D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *The Journal of experimental biology*. 2015;218(6):816-8.
21. Tronick E, Hunter RG. Waddington, dynamic systems, and epigenetics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2016;10:107.
22. Deans C, Maggert KA. What do you mean, “epigenetic”? *Genetics*. 2015;199(4):887-96.
23. Weinhold B. *Epigenetics: the science of change*. National Institute of Environmental Health Sciences; 2006.
24. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Cancer Epigenetics*. 2015;3-25.
25. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
26. Mıhçıoğlu D. Epigenetik Mekanizmaların Besinlerin Biyoaktif Bileşenleri ile İlişkisi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*. 2019;47(3):102-8.
27. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & cancer*. 2011;2(6):607-17.
28. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*. 2011;25(10):1010-22.
29. Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2709-19. doi: 10.1128/MCB.23.8.2709-2719.2003. PubMed PMID: 12665573.
30. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.
31. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics*. 2000;24(1):88-91.
32. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):604-17. doi: 10.7150/ijbs.11218. PubMed PMID: 25892967.
33. Anteneh H. *DNA Methylation in Health and Disease*: UC Riverside; 2021.
34. Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes*. 2019;10(2):172.
35. von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss medical weekly*. 2013;143(2122).
36. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer research*. 2016;76(12):3446-50.
37. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009;1(2):239-59.
38. Kochanek S, Renz D, Doerfler W. DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells. *The EMBO journal*. 1993;12(3):1141-51.
39. Nishida N, Kudo M, Nishimura T, Arizumi T, Takita M, Kitai S, et al. Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PloS one*. 2013;8(9):e72312.

40. Zhang W, Klinkebiel D, Barger CJ, Pandey S, Guda C, Miller A, et al. Global DNA hypomethylation in epithelial ovarian cancer: passive demethylation and association with genomic instability. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):764.
41. Ehrlich M, Lacey M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Epigenetic alterations in oncogenesis*. 2013:31-56.
42. Frigola J, Solé X, Paz MF, Moreno V, Esteller M, Capellà G, et al. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Human Molecular Genetics*. 2004;14(2):319-26. doi: 10.1093/hmg/ddi028.
43. Canbay E, Buğra D. Kolorektal kanser: Genetik ye moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu? *Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi*. 2011;27(4).
44. Witkin EM. Remembering Rollin Hotchkiss (1911-2004). *Genetics*. 2005;170(4):1443-7. PubMed PMID: 16144981.
45. Stricker SH, Götz M. DNA-Methylation: Master or Slave of Neural Fate Decisions? *Front Neurosci*. 2018;12:5-. doi: 10.3389/fnins.2018.00005. PubMed PMID: 29449798.
46. Nowacka-Zawisza M, Wiśnik E. DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer. *Oncology reports*. 2017;38(5):2587-96.
47. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb j*. 1996;10(4):471-80. Epub 1996/03/01. PubMed PMID: 8647346.
48. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*. 2001;20(24):3156-65.
49. Kulis M, Esteller M. 2 - DNA Methylation and Cancer. In: Herceg Z, Ushijima T, editors. *Advances in Genetics*. 70: Academic Press; 2010. p. 27-56.
50. Chen L, Liu S, Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):1-25.
51. Araki Y, Mimura T. The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:2608605. doi: 10.1155/2017/2608605.
52. Chen W, Liu Y, Zhu S, Chen G, Han J-DJ. Inter-nucleosomal communication between histone modifications for nucleosome phasing. *PLoS computational biology*. 2018;14(9):e1006416.
53. Kim YZ. Altered histone modifications in gliomas. *Brain tumor research and treatment*. 2014;2(1):7-21.
54. Breuls N, Giacomazzi G, Sampaolesi M. (Epi)genetic Modifications in Myogenic Stem Cells: From Novel Insights to Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2019;8(5):429. PubMed PMID: doi:10.3390/cells8050429.
55. İzmirli M. Epigenetik mekanizmalar ve kanser tedavisinde epigenetik yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*. 2013;20(1):48-51.
56. Adams Brian D, Kasinski Andrea L, Slack Frank J. Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Current Biology*. 2014;24(16):R762-R76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.043>.
57. Loh H-Y, Norman BP, Lai K-S, Rahman NMANA, Alitheen NBM, Osman MA. The regulatory role of microRNAs in breast cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19):4940.
58. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015;5(10):1122.

59. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Molecular cancer*. 2018;17(1):1-14.
60. Hota SK, Bruneau BG. ATP-dependent chromatin remodeling during mammalian development. *Development*. 2016;143(16):2882-97.
61. Wang W, Xu J, Limbo O, Fei J, Kassavetis GA, Chong J, et al. Molecular basis of chromatin remodeling by Rhp26, a yeast CSB ortholog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(13):6120-9.
62. Zhang Z, Buchman AR. Identification of a member of a DNA-dependent ATPase family that causes interference with silencing. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5461-72.
63. Cho EJ, Choi SH, Kim JH, Kim JE, Lee MH, Chung BY, et al. A mutation in plant-specific SWI2/SNF2-like chromatin-remodeling proteins, DRD1 and DDM1, delays leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*. 2016;11(1):e0146826.
64. Huang Y-K, Peng B-Y, Wu C-Y, Su C-T, Wang H-C, Lai H-C. DNA methylation of PAX1 as a biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Clinical oral investigations*. 2014;18(3):801-8.
65. Ribeiro IP, Caramelo F, Marques F, Domingues A, Mesquita M, Barroso L, et al. WT1, MSH6, GATA5 and PAX5 as epigenetic oral squamous cell carcinoma biomarkers-a short report. *Cellular oncology*. 2016;39(6):573-82.
66. Al-Kaabi A, Van Bockel L, Pothén A, Willems S. p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Disease markers*. 2014;2014.
67. Zhong L, Liu Y, Wang K, He Z, Gong Z, Zhao Z, et al. Biomarkers: paving stones on the road towards the personalized precision medicine for oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2018;18(1):1-20.
68. Zhang H, Li T, Zheng L, Huang X. Biomarker MicroRNAs for diagnosis of oral squamous cell carcinoma identified based on gene expression data and MicroRNA-mRNA network analysis. *Computational and mathematical methods in medicine*. 2017;2017.
69. Harshani JM, Yeluri S, Guttikonda VR. Glut-1 as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. 2014;18(3):372.
70. Wu J-Y, Yi C, Chung H-R, Wang D-J, Chang W-C, Lee S-Y, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2010;46(4):226-31.
71. Sushma P, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M, Triveni B. PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. *Tumor Biology*. 2016;37(6):7625-32.
72. Stambuk HE, Karimi S, Lee N, Patel SG. Oral cavity and oropharynx tumors. *Radiologic Clinics*. 2007;45(1):1-20.
73. Cohen BA. *Pediatric Dermatology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2013.
74. Hoppe R, Phillips TL, Roach M. *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology-E-Book*: Expert Consult: Elsevier Health Sciences; 2010.
75. Gaździcka J, Gołąbek K, Strzelczyk JK, Ostrowska Z. Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. *Biochemical Genetics*. 2020;58(2):213-44. doi: 10.1007/s10528-019-09941-1.
76. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J, Escorial-Hernandez V, Rodríguez-Campo FJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *International*

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2020;49(12):1525-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2020.03.009>.

77. Demokan S, Dalay N. Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clinical epigenetics*. 2011;2(2):123-50.

78. Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):670. PubMed PMID: doi:10.3390/ijms19030670.

79. Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, Dhanda J, Lane B, Liloglou T, et al. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2013;108(2):370-9. doi: 10.1038/bjc.2012.568.

80. Yazar H, Karaca İR. Oral kavitede görülen invaziv kanserler/Invasive cancers of the oral cavity. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2018;10(4):523-9.

81. Sharma P, Saxena S, Aggarwal P. Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: an institutional study. *Indian Journal of Dental Research*. 2010;21(3):316.

82. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2008;19(6):1699-702.

83. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2006;39(2):277-94.

84. Mathur R, Singhavi HR, Malik A, Nair S, Chaturvedi P. Role of Poor Oral Hygiene in Causation of Oral Cancer-a Review of Literature. *Indian J Surg Oncol*. 2019;10(1):184-95. Epub 2018/12/07. doi: 10.1007/s13193-018-0836-5. PubMed PMID: 30948897.

85. Lopes CFB, de Angelis BB, Prudente HM, de Souza BVG, Cardoso SV, de Azambuja Ribeiro RIM. Concomitant consumption of marijuana, alcohol and tobacco in oral squamous cell carcinoma development and progression: recent advances and challenges. *Archives of oral biology*. 2012;57(8):1026-33.

86. Wang M, Niu W, Qi M, Chen H, Zhang M, Wang C, et al. Nicotine promotes cervical metastasis of oral cancer by regulating peroxiredoxin 1 and epithelial-mesenchymal transition in mice. *OncoTargets and therapy*. 2019;12:3327.

87. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob Induc Dis*. 2019;17:29-. doi: 10.18332/tid/105844. PubMed PMID: 31582940.

88. Llewelyn J, Mitchell R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: A 10-year experience. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1994;32(3):146-52.

89. Scheidt JHG, Yurgel LS, Cherubini K, Figueiredo MAZd, Salum FG. Characteristics of oral squamous cell carcinoma in users or non users of tobacco and alcohol. *Revista Odonto Ciência*. 2012;27:69-73.

90. Tenore G, Nuvoli A, Mohsen A, Cassoni A, Battisti A, Terenzi V, et al. Tobacco, alcohol and family history of cancer as risk factors of oral squamous cell carcinoma: Case-control retrospective study. *Applied Sciences*. 2020;10(11):3896.

91. Stornetta A, Guidolin V, Balbo S. Alcohol-Derived Acetaldehyde Exposure in the Oral Cavity. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1). doi: 10.3390/cancers10010020.

92. Castro TPPG, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2006;72(2):272-81.

93. Fu T-cJ, Hughes JP, Feng Q, Hulbert A, Hawes SE, Xi LF, et al. Epidemiology of Human Papillomavirus (HPV) Detected in the Oral Cavity and Fingernails of Mid-Adult Women. *Sexually transmitted diseases*. 2015;42(12):677.
94. de Abreu PM, C6 ACG, Azevedo PL, do Valle IB, de Oliveira KG, Gouvea SA, et al. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2018;18(1):1-8.
95. González-Ramírez I, García-Cuellar C, Sánchez-Pérez Y, Granados-García M. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms and clinical implications. *Oral diseases*. 2011;17(8):771-8.
96. Khanal S, Shumway BS, Zahin M, Redman RA, Strickley JD, Trainor PJ, et al. Viral DNA integration and methylation of human papillomavirus type 16 in high-grade oral epithelial dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(54):30419-33. doi: 10.18632/oncotarget.25754. PubMed PMID: 30100997.
97. Guerrero-Preston R, Baez A, Blanco A, Berdasco M, Fraga M, Esteller M. Global DNA methylation: a common early event in oral cancer cases with exposure to environmental carcinogens or viral agents. *Puerto Rico health sciences journal*. 2009;28(1).
98. Mehta V, Yu GP, Schantz SP. Population-based analysis of oral and oropharyngeal carcinoma: changing trends of histopathologic differentiation, survival and patient demographics. *Laryngoscope*. 2010;120(11):2203-12. Epub 2010/10/13. doi: 10.1002/lary.21129. PubMed PMID: 20938956.
99. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16–Positive and Human Papillomavirus Type 16–Negative Head and Neck Cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(6):407-20. doi: 10.1093/jnci/djn025.
100. Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 2006;43(2):60-6. Epub 2006/06/23. doi: 10.4103/0019-509x.25886. PubMed PMID: 16790942.
101. KARACA İ, Yazar H. Ağız mukozasının sık görülen premalign lezyonları. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2018;10(2):190-200.
102. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral oncology*. 2010;46(6):414-7.
103. Shetty SR, Chadha R, Babu S, Kumari S, Bhat S, Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2012;8(6):123.
104. Sridharan G, Ramani P, Patankar S. Serum metabolomics in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2017;13(3):556.
105. Bouckaert M, Munzhelele T, Feller L, Lemmer J, Khammissa R. The clinical characteristics of oral squamous cell carcinoma in patients attending the Medunsa Oral Health Centre, South Africa. *Integr Cancer Sci Therap*. 2016;3:575-8.
106. Muthu K, Vaishnavi V, Sivadas G. Warning signs and symptoms of oral cancer and its differential diagnosis. *Journal of Young Pharmacists*. 2018;10(2):138.
107. KAYHAN KB, Meral Ü. Oral cavity cancers and classification. *European Oral Research*. 2011;45(1):55.
108. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of oral pathology & medicine*. 2010;39(4):299-305.

109. Mehta NV, Dave KK, Gonsai R, Goswami H, Patel PS, Kadam TB. Histopathological study of oral cavity lesions: A study on 100 cases. *Int J Res Rev.* 2013;5:110-6.
110. Yalçın E, Süslü N, Avcu N. RETROMOLAR TRİGON SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.*24(3).
111. Heera R, Ayswarya T, Padmakumar S, Ismayil P. Basaloid squamous cell carcinoma of oral cavity: Report of two cases. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP.* 2016;20(3):545.
112. Zbären P, Nuyens M, Stauffer E. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery.* 2004;12(2).
113. Feng L, Cai D, Muhetaer A, Yang Y-L, Ren F, Yishake M, et al. Spindle cell carcinoma: the general demographics, basic clinico-pathologic characteristics, treatment, outcome and prognostic factors. *Oncotarget.* 2017;8(26):43228-36. doi: 10.18632/oncotarget.18017. PubMed PMID: 28591732.
114. Sengüven B, Tokman B, Uluoğlu Ö, Cebeci ARİ. Alt çene dişeti yerleşimli iğsi hücreli skuamöz karsinom (Sarkomatoid Karsinom). *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.*23(2):117-20.
115. Sravya T, Rao GV, Kumar MP, Sudheerkanth K. Oral adenosquamous carcinoma: Report of a rare entity with a special insight on its histochemistry. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20(3):548-. doi: 10.4103/0973-029X.190969. PubMed PMID: 27721632.
116. Li C, Chen Q, Tian Z, Li S, Gong Z, Lin Z, et al. Expression of MIF, Beclin1, and LC3 in human salivary gland adenoid cystic carcinoma and its prognostic value. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(20):e15402-e. doi: 10.1097/MD.00000000000015402. PubMed PMID: 31096436.
117. Haksever M. Oral kavite kanserlerinde evreleme, prognostik faktörler ve evreleme sistemi üzerine değerlendirmeler. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2013;14(2):109-17.
118. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(10):a003236.
119. Lin T, Zhang B, He H. Identification of genes correlated with oral squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and therapeutics.* 2018;14(10):675.
120. Supsavhad W, Dirksen WP, Hildreth BE, Rosol TJ. p16, pRb, and p53 in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary sciences.* 2016;3(3):18.
121. Yang L, Wang Y, Guo L, Wang L, Chen W, Shi B. The expression and correlation of iNOS and p53 in oral squamous cell carcinoma. *BioMed research international.* 2015;2015.
122. Kerdpon D, Sriplung H, Kietthubthew S. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma and its association with risk habits in southern Thailand. *Oral oncology.* 2001;37(7):553-7.
123. Agarwal A, Kamboj M, Shreedhar B. Expression of p16 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma and correlation of its expression with individual atypical features. *Journal of oral biology and craniofacial research.* 2019;9(2):156.
124. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16INK4A and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters.* 2000;160(1):3-8. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00546-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00546-2).
125. Thomas S, Balan A, Balaram P. The expression of retinoblastoma tumor suppressor protein in oral cancers and precancers: A clinicopathological study. *Dent Res J (Isfahan).* 2015;12(4):307-14. doi: 10.4103/1735-3327.161427. PubMed PMID: 26288619.

126. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Amarasinghe H, Subramanian S, Johnson N. Oral Cancer: Prevention, Early Detection, and Treatment. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S, editors. *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank © 2015 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.; 2015.
127. Danaraddi S, Koneru A, Hunasgi S, Ramalu S, Vanishree M. Natural ways to prevent and treat oral cancer. *Journal of Oral Research and Review*. 2014;6(1):34.
128. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology*. 2014;19(3):423-30.
129. Freier K, Engel M, Lindel K, Flechtenmacher C, Mühling J, Hassfeld S, et al. Neoadjuvant concurrent radiochemotherapy followed by surgery in advanced oral squamous cell carcinoma (OSCC): A retrospective analysis of 207 patients. *Oral Oncology*. 2008;44(2):116-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.01.006>.
130. Horn D, Zittel S, Moratin J, Metzger K, Ristow O, Krisam J, et al. Prospective feasibility analysis of salvage surgery in recurrent oral cancer in terms of quality of life. *Oral Oncology*. 2020;102:104580. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104580>.
131. Ohta M, Mimori K, Fukuyoshi Y, Kita Y, Motoyama K, Yamashita K, et al. Clinical significance of the reduced expression of G protein gamma 7 (GNG7) in oesophageal cancer. *British Journal of Cancer*. 2008;98(2):410-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6604124.
132. El-Haibi CP, Sharma P, Singh R, Gupta P, Taub DD, Singh S, et al. Differential G protein subunit expression by prostate cancer cells and their interaction with CXCR5. *Molecular Cancer*. 2013;12(1):64. doi: 10.1186/1476-4598-12-64.
133. Wang Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(1). doi: 10.3390/ijms17010095.
134. Gibson SK, Gilman AG. Galpha and Gbeta subunits both define selectivity of G protein activation by alpha2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):212-7. Epub 2005/12/21. doi: 10.1073/pnas.0509763102. PubMed PMID: 16371464.
135. Chakravorty D, Gookin TE, Milner MJ, Yu Y, Assmann SM. Extra-large G proteins expand the repertoire of subunits in Arabidopsis heterotrimeric G protein signaling. *Plant Physiology*. 2015;169(1):512-29.
136. Liu J, Ji X, Li Z, Yang X, Wang W, Zhang X. G protein γ subunit 7 induces autophagy and inhibits cell division. *Oncotarget*. 2016;7(17):24832.
137. Ray K, Kunsch C, Bonner LM, Robishaw JD. Isolation of cDNA Clones Encoding Eight Different Human G Protein γ Subunits, Including Three Novel Forms Designated the $\gamma 4$, $\gamma 10$, and $\gamma 11$ Subunits (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(37):21765-71.
138. Shibata K, Tanaka S, Shiraishi T, Kitano S, Mori M. G-protein gamma 7 is down-regulated in cancers and associated with p 27kip1-induced growth arrest. *Cancer Res*. 1999;59(5):1096-101. Epub 1999/03/10. PubMed PMID: 10070968.
139. Xu S, Zhang H, Liu T, Chen Y, He D, Li L. G Protein γ subunit 7 loss contributes to progression of clear cell renal cell carcinoma. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(11):20002-12.

140. Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010;Chapter 7:Unit-7.9.17. doi: 10.1002/0471142727.mb0709s91. PubMed PMID: 20583099.
141. Demokan S, Chuang A, Suoğlu Y, Ulasan M, Yalnız Z, Califano JA, et al. Promoter methylation and loss of p16INK4a gene expression in head and neck cancer. *Head & neck*. 2012;34(10):1470-5.
142. Elaiwy O, El Ansari W, AlKhalil M, Ammar A. Epidemiology and pathology of oral squamous cell carcinoma in a multi-ethnic population: Retrospective study of 154 cases over 7 years in Qatar. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020;60:195-200. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.10.029>.
143. Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Holleczer B, et al. Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PloS one*. 2013;8(1):e53415.
144. Ayşe T, YILMAZ S, Sindel A. Oral Skuamoz Hücreli Karsinom–3 Olgu Sunumu. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 42(5):142-7.
145. De Silva S, Tennekoon KH, Karunanayake EH. Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2019;11:71-80. doi: 10.2147/BCTT.S185870. PubMed PMID: 30718964.
146. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head & neck*. 2017;39(2):297-304.
147. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JBCd, Tavares AS, Luz PSRd, Santos TCRBd. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *Journal of Applied Oral Science*. 2013;21:460-7.
148. Hema K, Smitha T, Sheethal H, Mirnalini SA. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. 2017;21(2):252.
149. Sheng H, Li X, Xu Y. Knockdown of FOXP1 promotes the development of lung adenocarcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2019;20(4):537-45.
150. Utsunomiya T, Inoue H, Taguchi K-I, Shimada M, Sugimachi K, Mori M. G Protein $\gamma 7$ Expression as a New Clinicopathological Marker in Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Archives of Surgery*. 2002;137(2):181-5. doi: 10.1001/archsurg.137.2.181.
151. Wang M, Gong B, Li Y, Wang Y. Human G-protein gamma 7 in extrahepatic cholangiocarcinoma and its clinicopathological significance. *Hematology/oncology and stem cell therapy*. 2010;3(2):66-70.
152. Shibata K, Mori M, Tanaka S, Kitano S, Akiyoshi T. Identification and cloning of human G-protein $\gamma 7$, down-regulated in pancreatic cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(1):205-9.

HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA GNG7 GENİNİN
METİLASYON VE EKSPRESYON SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ_2

ORJİNALLİK RAPORU

% 19	% 17	% 3	% 9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 9
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 5
3	vs1.doczz.cz İnternet Kaynağı	% 1
4	drsertac.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	ulusalkanser.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.drsertac.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.odevsel.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

