

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA
EGFR GEN MUTASYON VE AMPLİFİKASYONLARININ
REAL TIME PCR VE FISH ANALİZLERİ İLE BELİRLENMESİNİN HASTALIK
TANISINDAKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Buket DOĞRUOĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA
EGFR GEN MUTASYON VE AMPLİFİKASYONLARININ
REAL TIME PCR VE FISH ANALİZLERİ İLE BELİRLENMESİNİN HASTALIK
TANISINDAKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Buket DOĞRUOĞLU

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Hakan SAVLI

KOCAELİ

2014



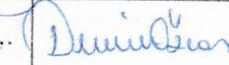
T.C.
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda EGFR Gen Mutasyon ve Amplifikasyonlarının Real-Time PCR ve FISH Analizleri ile belirlenmesinin hastalık tanısındaki önemini araştırma
Tez yazarı: Buket DOĞRUGÖLÜ
Tez savunma tarihi: 03/11/14

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hakan SAVLI

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye Doç. Dr. Hakan SAVLI	
Üye Yard. Doç. Dr. Naci GİNE	
Üye Yard. Doç. Dr. Devrim GABUK	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

03.11.2014

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü

Özet

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarda EGFR Gen Mutasyon Ve Amplifikasyonlarının RT PCR Ve FISH Analizleri İle Belirlenmesinin Hastalık Tanısındaki Öneminin Araştırılması

Akciğer kanseri, 20.yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir. Bütün kanserlerde olduğu gibi, akciğer kanserleri de onkogenleri ve tümör süpresör genleri etkileyen genetik değişiklikler sonucu meydana gelmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü genleri, tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran proteindir ve bu proteini kodlayan genin amplifikasyonları ve mutasyonları başta küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve pek çok epitelyal kanser türünde araştırılmaktadır. Mutasyon analizi ve gen kopya sayısının belirlenmesi günümüzde, tümör hücrelerinde EGFR statüsünün tespit edilmesinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, 50 olgunun 47'sine FISH yöntemi ile EGFR amplifikasyon analizi, 49'una Real-time PCR yöntemiyle EGFR mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, 4 olguda (%8.5) oranında EGFR gen amplifikasyonu, 10 olguda (%20.4) oranında EGFR mutasyonu saptanmıştır. EGFR mutasyonlarının 7'si ekzon 19'da, 2'si ekzon 20'de ve 1'i ekzon 21'de olarak saptanmıştır. Mutasyonu bulunmayan 4 hastamızda, EGFR amplifikasyonu pozitif bulunmuştur. Bu iki yöntemden elde edilen bilgilerin, KHDAK'lerin de EGFR tirozin kinaz inhibitorleri ile hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için bir gösterge olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, EGFR, FISH, Real-Time PCR

Abstract

Significance Investigation of EGFR Gene Mutations and Amplifications Identified by RT PCR and FISH Analysis in Disease Diagnosis on Non Small Cell Lung Cancer Patients

The frequency of lung cancer increased in parallel to the increased smoking habits and became the world's most common cancer, while it was a rare disease during early 20th century. As all cancer types, lung cancer occurs as a result of changes in the oncogenes and tumor suppressor genes. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), is a transmembrane protein with tyrosine kinase activity and amplifications and mutations of this protein-encoding gene have been studying in non small cell lung cancer (NSCLC) particularly, as in many epithelial cancer types. Mutation analysis and gene copy number determination, are used in the detection of EGFR status of tumor cells recently.

In our study, we performed EGFR amplification analysis by FISH technique in 47 of 50 patients and EGFR mutation with Real-Time PCR analysis in 49 of 50 patients. As a result, EGFR gene amplification has been identified in 4 cases (8.5%) and EGFR mutation has been identified in 10 cases (20.4%). EGFR mutations were seen in exon 19 in 6 cases, in exon 20 in 2 cases and in exon 21 in 1 case.

We think that the information obtained from these two methods may be used as an indicator for the development of targeted therapies with EGFR tyrosine kinase inhibitor in NSCLC.

Key words: non-small cell lung cancer, EGFR, FISH, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Genetik alanında çalışabilme şansını bana tanımış olan ve bilimsel konulardaki engin bilgisiyle bu zorlu yolda ilerlememe yardımcı olan değerli tez hocam Doç. Dr. Hakan SAVLI' ya; çalışmamın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmaları boyunca bana yol gösteren değerli hocam Yard. Doç. Dr. Naci ÇİNE' ye;

Çalışmamıza değerli katkılarından dolayı Patoloji ve Onkoloji Bilim Dalları'na;

Birlikte çalıştığım, iyi ve kötü günlerimde hoşgörü ve destekleriyle yanımda olan, eşsiz sabırlarıyla en zor anlarımda yardımcı olup, beni motive eden çok değerli arkadaşlarım Dr. Seda EREN KESKİN, Dr. Deniz AKKOYUNLU ve Uzm. Biyolog Zeynep İLKAY olmak üzere tüm sitogenetik ekibine;

Tezimin deney kısmında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Nevin ÇALIK ve Biyolog Seda REKA olmak üzere tüm moleküler ekibine;

Ayrıca, bu zorlu ve yorucu dönemde, göstermiş olduğu sonsuz sabır ve desteği için sevgili eşim Ali DOĞRUOĞLU' na;

Tüm yaşamımda sevgi ve destekleriyle yanımda olan, özveri ve sabırla beni yetiştirerek bugünlere gelmemi sağlayan, sevgili aileme, gösterdikleri sabır, anlayış ve her türlü maddi-manevi desteklerinden dolayı;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Buket DOĞRUOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanserin Tanımı	4
2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	5
2.3.Kanser ve Genetik Yapısı	6
2.4. Kanser Oluşumunda Etkili Genler	7
2.4.1. Onkogenler	7
2.4.1.1. Protonkogenlerin fonksiyonları	8
2.4.1.2. Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları	8
2.4.1.2.1. Delesyon-nokta mutasyonları	8
2.4.1.2.2. Gen amplifikasyonları	9
2.4.1.2.3. Kromozom yeniden düzenlenmeleri	9
2.4.1.3. Onkogen ürünlerinin tipleri	10
2.4.2. Tümör süpresör genler	11
2.4.2.1.Tümör Süpressör Gen İnaktivasyonu	12
2.4.3. Stabilite genleri (Caretakers)	13
2.5. Akciğer Kanseri	14
2.5.1. Epidemiyolojisi	14
2.5.2.Etiyolojisi	14
2.5.3. Akciger Kanseri Sınıflaması	15
2.5.4. Akciger Kanseri Evrelendirilmesi	18
2.5.5. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi	19
2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	21
2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörlerinin Yapısı	22
2.6.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri Sinyal Yolakları	23
2.6.3. Epidermal büyüme faktör reseptör inhibitörleri	24
2.7. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	25
2.7.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde EGFR' deki Genetik Değişiklikler	25
2.7.1.1.Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	26
2.7.1.2. Real-Time PCR Yöntemi	28
3-GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1. Yöntemler	30
3.1.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	30
3.1.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi	32
3.2.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılan malzemeler	36
3.2.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi kullanılan malzemeler	37
4-BULGULAR	39
5-TARTIŞMA	43
6-SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CISH : Cromogenik In Situ Hibridizasyon

DAPI : 4',6' - diamino-2-fenilindol

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörleri

EGFR :Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

GTP : Guanozin Trifosfat

IHK :İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği

KHAK :Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK :Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

K-PZR : Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NaCl :Sodyum klorür

NaOH :Sodyum hidroksit

RT PCR: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RB: Retinoblastom

SSC : NaCl/ Trisodyum Sitrat

TK : Tirozin Kinazlar

TKIs : Tirozin kinaz inhibitör

TNM : Tümör Node Metastaz

TSG : Tümör Süpressör Gen

TK: Tirozin Kinazlar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. EGFR Sinyal yolağı (Sequist, L.V. et al.,2007)	24
Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)	34
Şekil 4.1. EGFR geni ve sentromer7 için normal hücelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal)	40
Şekil 4.2. Deparafinizasyon başarısızlığı sonucu oluşan görüntü	40
Şekil 5.1. Avrupa ülkeleri - KHDAK EGFR gen mutasyonlarının sıklığının	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. TNM Sınıflaması	18
Çizelge 2.2. TNM sınıflamasına göre evrelendirme	19
Çizelge 3.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılan malzemeler	36
Çizelge 3.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi kullanılan malzemeler	37
Çizelge4.1. Çalışma olgularının FISH yöntemiyle belirlenen EGFR amplifikasyonlarının, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları	39
Çizelge 4.2. Çalışma olgularının exon 18, exon 19'daki delesyon, exon 20, exon 21'deki nokta mutasyonlarının, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları	41
Çizelge 4.3. Çalışma olgularına ait EGFR mutasyon analizi sonuçları	41
Çizelge 5.1. Bazı avrupa ülkelerindeki EGFR mutasyon yüzdeleri	47

1.GİRİŞ

Kanserin görülme sıklığı günümüzde gün geçtikçe artmaktadır. Kanser değişik organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasından oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan hastalıklar grubudur. Kanserin kontrol altına alınması hususunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser yükünün insidans (ortaya çıkan yeni vakalar) ve ölüm sayısı cinsinden tahmin edilmesi gerekmektedir. Kanser kontrolünde en önemli yapıtaş, elimizde doğru, tam ve güvenilir veri olmasıdır.

Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ) tarafından yayınlanan raporda, kanserli hasta sayısının hızla arttığı belirtilmiştir. Kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19.3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. DSÖ, 2012 yılında 14.1 milyon yeni kanser vakası ve 8.2 milyon kanserden kaynaklanan ölüm, gerek kanser vakalarının(%56.8) gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin(%64.9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğunu bildirmiştir. Ülkemizde, 2009 yılı kanser istatistiklerine göre her yıl yaklaşık 98 bin erkek ve 63 bin kadın kansere yakalanmaktadır. (www.cancerresearchuk.org)

Akciğer kanseri tüm dünyada en yaygın kanser türüdür ve mortalitesi oldukça yüksektir. Tüm dünya ortalamasına bakıldığında akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır (Grenle et al.2000). Ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl 20-25 bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın 30-40 bin' e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde akciğer kanserlerinin çoğu erkeklerde görülmektedir. Ancak 1980'lerden sonra ülkemizde kadınlarda artan sigara tiryakiliği bu oranı hızla arttırmaktadır.

Karsinogenik etkiler açısından, sigara ve çok daha az derecede diğer çevresel kötü şartların, akciğer kanserinin oluşmasında etkili olduğu ve genetik değişikliklerin meydana gelmesinden sorumlu olduğuna ilişkin güçlü bulgular vardır. Kanser bugün genetik kökenli bir hastalık grubu olarak bilinmektedir. Kanser oluşumu yani karsinogenezis farklı türlerde genlerin etkili olduğu çok aşamalı bir süreçtir (Geoffey, M.C., and Hausman, E.R., 2006). Kanserde etkili olduğu düşünülen genler; onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri olarak 3 ana grup altında toplanırlar. Gen ve genom mutasyonları kanser gelişiminde etkili olan genleri içerdiğinde (kromozom ve/veya gen delesyonları, amplifikasyonları, yapısal değişimler vb.) gen ürününün az ya da çok sentezlenmesi ya da farklı ürünün sentezlenmesine neden olmaktadır ki, bu değişimler de sellüler fonksiyonlarda bozulmalara yol açmaktadır (Krause and Van Etten, 2005). Son yıllarda

kanserin etyolojisine ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda en çok araştırılan konu başlıklarından biri Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleridir. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. Ardından aynı reseptör ailesinin üç üyesi daha bulunmuştur. Bunlar, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4)' dür. EGFR, proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyallerin iletim yollarını kontrol eden hücre yüzey reseptörü tirozin kinazların ErbB familyasının bir parçasıdır. Bu transmembran reseptörler hücre yüzeyinde monomerler olarak varlıklarını sürdürür ve hücre dışı bir sinyale ("ligand" olarak adlandırılır) bağlandığında aktive olurlar. EGFR ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunun kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, önemli bir kısmını kanserin teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonlarının ilişkisi tespit edilmiştir.

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin tümör gelişimindeki rolü göz önüne alınarak, son yıllarda EGFR aktivasyonunu ve fonksiyonunu bloke eden çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. EGFR inhibitörleri olan Gefitinib ve Erlotinib klinik yollarla test edilen ilk tirozin kinaz inhibitörleridir ve çalışmaları birçok kanser türü için devam etmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptör tirozin kinazı (EGFR-TK) mutasyonlar, EGFR-TK inhibitörleri (EGFR-TKIs) ile tedavileri, standart kemoterapi tedavisine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastaları bu nedenle tedavi kararı vermek için EGFR-TK tümör gen mutasyonları için test edilir. KHDAK tedavisinde özellikle adenokarsinomu olan hastalarda, birinci basamak Irresa gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) uygulanabilirliği, EGFR mutasyon belirlemek için bir ön koşuldur (Yu-Chang et al.,2014).

Çalışmamızda, histopatolojik olarak incelenerek "küçük hücreli dışı akciğer kanseri" tanısı almış, cinsiyet farkı gözetmeksizin, 50 hastaya ait kanser dokusu içeren formalin fiske-parafine gömülü 5'er mikronluk (μ) doku örneklerine ait kesitler kullanılmıştır. Her hasta için doku örnekleri ependorf tüp içerisine konularak ve pozitif şarjlı lamlara tespit edilerek gönderilmiştir. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, histopatolojik bulguları hasta dosyalarından temin edilmiştir. Akciğer karsinogenезinde önemli bir yere sahip EGFR onkogenindeki mutasyon varlığını belirlemek için EGFR onkogenine özgü dizayn edilmiş primer ve prob çiftleri kullanılarak, cobas z 480 analiz sistemi ile ekzon 18, ekzon 19, ekzon 20, ekzon 21'deki mutasyonların belirlenmesi ve EGFR onkogeninin FISH tekniği için dizayn edilmiş sentromer ve lokus spesifik gen bölgesini inceleyerek bu gendeki olası amplifikasyonları belirlemek hedeflenmiştir. Türk toplumunda KHDAK'li hastaların Real Time PCR ve

FISH (fluoresan in situ hibridizasyon) analizleri ile EGFR genindeki mutasyon ve amplifikasyon frekansını hesaplamak, elde edilen verilerin hastalık tanısındaki önemini araştırmak ve akciğer kanserleri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KANSERİN TANIMI

Kanser, genel anlamda vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan ve genellikle tek bir hastalık gibi görünse de, gerçekte birbirinden ayrı hücre ve dokuları etkileyen yüzden fazla hastalık grubudur. Kanser tiplerinin hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar. Kanser birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılmaz. Ancak, kanser vakalarının % 1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Kızılbey ve ark. 2008).

Hücrelerin merkezinde, çekirdek içinde, hücrenin ve organizmanın genetik bilgisinin saklandığı, elektron mikroskopu ile de görüntülenebilen, DNA olarak adlandırılan mikroskobik iplikçikler mevcuttur. DNA, hücrenin normal fonksiyonlarını gerçekleştirmesini sağlamaktadır. Kanserli hücreler bu DNA iplikçikindeki hasardan dolayı oluşur. Hücrenin normal yaşam siklusunda DNA hasarı olsa da hücre ya bunu onarır ya da ölür. Kanserli hücrelerde hasarlanmış DNA onarılamaz ve kontrolsüz çoğalma başlar. DNA, çevresel etkenler (kimyasallar, virüsler, tütün ürünleri veya aşırı güneş ışını vs gibi) nedeniyle hasar görebilir (www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html).

Kanser hücreleri birikerek tümörleri oluştururlar. Tümörlerin hepsi kanser değildir; tümörler benign ve malign olabilir. Benign tümörlerdeki hücreler vücudun diğer taraflarına yayılmazlar. Benign tümörler nadiren hayatı tehdit ederler. Malign tümörler kanserdir. Malign tümörlerdeki hücreler anormaldirler. Kontrolsüz ve düzensiz bölünürler. Bu tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluşturdukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere, doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve hücreleri istila ederek metastaz özelliği kazanırlar. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım o genin kodladığı proteinin üretilmemesi, yanlış üretilmesi, normalden az ya

da çok üretilmesi ile sonuçlanır ve ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar (Merlo et al.,2006).

2.2.KANSER HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ

Kanser daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize edilen neoplazinin daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Neoplazi “normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan uyarıyı durduktan sonra bile aşırı büyümeye devam eden anormal bir doku kütlesi” olarak tanımlanmıştır. Neoplazmlar genel olarak “tümör” adıyla bilinir (Kumar ve ark.,2003).

Kanserin oluşum basamaklarından birincisi tümör başlangıcıdır. Tek bir hücrenin anormal davranışlarına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden meydana gelen hücre topluluğu giderek büyür. Her adımda, çoğalan her bir hücre yeni bir mutasyona sahip olur. Böylelikle meydana gelen mutasyonlar hücreye yaşamını devam ettirmesinde kolaylık sağlar. Ortama adaptasyonu kolaylaşır ve diğer hücrelerin önüne geçer. Tümörün ortam koşulları değişip, besin ve oksijen miktarı azaldığında büyüme çevredeki normal dokular tarafından engellenebilir. Fakat koşulların değişimine iyi adapte olabilen kanser hücresinden köken alan hücreler çoğalmaya devam eder ve lezyon baskın duruma geçer. Tümör büyümeye başlar. Çoğalma devam ettiği sürece ortaya çıkabilecek mutasyonlar kanser hücrelerine yeni avantajlar sağlar. Büyüme ve çoğalmadaki hızları artarak tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın özellikler kazanırlar. Normal hücreler, hücre-hücre teması sonucunda hareket etmeye ve çoğalmaya son verirken, kanser hücreleri çoğalmayı inhibe eden bu temasa karşı duyarsızdır. Kanser hücreleri, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve komşu dokunun içine yayılıma olanak veren proteazlar, anjiogenezi hızlandıran büyüme faktörleri salgırlar.

Birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerinden olan apoptoz kanser hücrelerinin çoğunda görülmez. Buna ek olarak kanser hücreleri telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir. Böylece anormal sağ kalım ve çoğalma yeteneği sayesinde kanser hücrelerinin sınırsız çoğalması mümkün olur.

Kanserin gelişim ve oluşum süreci “Karsinogenez” olarak adlandırılmaktadır. Bu gelişimsel süreç karsinojenlerin etkisiyle oluşmaktadır. Bu karsinojenler; kimyasal bileşikler, radyasyon ve virüsler olabilmektedir. Radyasyon, DNA hasarına ve mutasyonlara sebep olan en önemli çevresel faktördür. Sonuç olarak karsinojenlere maruz kalan tek bir hücre, gelişimsel süreç sonucunda tümör oluşumuna sebep olabilmektedir (Cooper et al.,2006).

2.3.KANSER VE GENETİK YAPISI

Kanser, hücrelerin bölünmek için sahip oldukları kontrol mekanizmalarını kaybettikleri bir durumdur. Bu mekanizmaların yazılımları genetik koddadır ve ancak genetik kodun zarar görmesi halinde bu kontrolsüzlük meydana gelebilir. Kanserli hücrelerde genetik bozukluklar hücrenin sahip olduğu genomda farklı organizasyon düzeylerinde gerçekleşmektedir. Bu doğrultu ele alındığında kanser genetik bir hastalıktır. Kanserlerin büyük çoğunluğunun genetik değişiklikler ile tetiklendiğini düşünmemiz için geçerli nedenler vardır (Nussbaum et al.,2006). Kanser hücrelerinin DNA dizilerinde tümörün çevresindeki normal hücrelerden ayıran ortak anormallikler vardır. Kansere yol açtığı bilinen etkenlerin birçoğu genetik değişikliklere de neden olur;

1. Karsinogenez (kanserin oluşumu),
2. Mutagenез (DNA dizisinde değişikliğin oluşması),
3. Kimyasal Karsinojenler (nükleotid diziliminde basit değişikliklere neden olurlar),
4. X-ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyonlar (kromozom kırıkları ve translokasyonlara neden olurlar),
5. Virüsler (hücre içine yabancı DNA yerleştirirler).

Hücrenin 3 temel yaşam fonksiyonu olan büyüme, bölünme ve ölüm çeşitli genler tarafından kontrol edilir. Yapılan son araştırmalarda yoğun olarak hücre proliferasyonunun ve apoptozisinin kontrolünden sorumlu genlerin mutasyonlarının kansere neden olduğu gösterilmiştir. Farklı kanser türlerin gelişimi; mitotik döngü düzenleyicilerini kodlayan genler, programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler, hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler, kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genlerdeki farklı bozuklukların ve hasarların oluşması sonucunda meydana gelmektedir.

Genetik hastalıklar ve kanser arasında iki temel farklılık bulunmaktadır:

1. Kanserin temelini somatik mutasyonlar, genetik hastalıkların temelini ise germ hücrelerinde meydana gelen mutasyon oluşturmaktadır.
2. Kanser tek bir mutasyon sonucu ortaya çıkmamaktadır. Birden çok mutasyonun birikimi ile kanserin ortaya çıkması kanserin türüne bağlı olarak değişmektedir.

Mutasyonların birikimiyle malignensiye doğru gelişim başkalaşım sıklığına bağlıdır. Başkalaşım sıklığı çevredeki mutajenlerden dolayı veya hücre içi defektlerden dolayı fazla olabilir. Ultraviyole ışın sebebiyle DNA' da oluşan bir hatanın DNA tamir mekanizmalarında oluşturduğu defektlerden dolayı ortaya çıkan bir genetik hastalık olan *Xeroderma Pigmentosum*'lu bireyler bu durum için iyi bir örnektir (Lodish et al.,2000).

Kanserin gelişmesi için on ya da daha fazla sayıda gende mutasyon olması gerektiği görüşü, tümör gelişimi ile ilgili olarak bilinen hücre davranışındaki ilk ılımlı bozukluğun giderek kansere dönüştüğünü öngören bilgi ile uyumludur. Bir hücrenin kanser hücresi olarak başarılı olabilmesi için, evrimleştikçe yıkıcı yeni becerilere, bir dizi farklı özellikler bütününe sahip olması gereklidir. Farklı kanserler bu özelliklerin farklı bileşimini gerektirir. Kanseri hücrelerinin genel davranışlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

1. Hücre çoğalmasını düzenleyen dıştan ve içten gelen sinyallere itibar etmezler.
2. Apoptoz yoluyla intihardan kaçınma eğilimindedirler.
3. Farklılaşmadan kaçınarak, çoğalmaya karşı programlanmış çoğalma kısıtlamalarını atlatırlar.
4. Genetik olarak kararsızlardır.
5. Köken aldıkları dokulardan kaçarlar (istilacı).
6. Yabancı bölgelerde yaşar ve çoğalırlar (metastaz yaparlar) (Alberts et al.,2002).

2.4. KANSER OLUŞUMUNDA ETKİLİ GENLER

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere kan-lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır (Cooper and Geoffrey, 2006). Hücreler, DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler. Kanseri potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği onkogen içermesi yani bulunduğu dokudan tamamen farklı yeni bir hücre olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır. Karsinogenezisin meydana gelmesinde sürekli değişime uğrayan yüzün üzerinde gen tanımlanmıştır. Ancak keşfedilmeyi bekleyen daha pek çok sayıda gen vardır (Alberts et al.,2002). Kanserde etkili olduğu düşünülen genler 3 ana grup altında toplanırlar;

1. Onkogenler
2. DNA tamir genleri
3. Tümör süpresör genler

2.4.1. Onkogenler

Onkogenlerin kökeni hakkındaki ilk ipucu, yüksek derecede onkogenik virüslerin izolasyon şekline elde edilmiştir. Onkogenler yine tümör virüsleri ile yapılan çalışmalarda, hücreleri transforme edebildikleri gösterilerek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların oluşturulmasını sağlamışlardır. Retroviral onkogenlerin oluşmasına

öncülük eden hücresel genlere ‘protoonkogen’ adı verilmiştir. Protoonkogenler hücre büyümesi, gelişmesi ve bölünmesini kontrol eden genlerdir. Protoonkogenler mutasyona uğradığında veya hatalı ifade bulduğunda kansere sebep olabilecek onkogen haline dönüşürler. Protoonkogenleri, onkogen haline getiren mutasyon, fonksiyon kazandıran mutasyon olarak isimlendirilir. Onkogenler böylece anormal hücre çoğalmasına ve tümör gelişimine sebep olur.

2.4.1.1. Protoonkogenlerin fonksiyonları

Normal hücresel genler (protoonkogenler) çeşitli nedenlerle hücresel onkogenlere dönüşerek, onkogenik hale gelirler. Protoonkogenler sinyal iletimini, hücresel farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu kontrol ederler. Sinyal iletimi karmaşık ve çok aşamalı bir şekilde hücre membranından başlayıp, sitoplazmaya ve nükleusa kadar gider. Normal hücre farklılaşması ve proliferasyonu için pozitif ve negatif feed back mekanizmalarıyla protoonkogen tiplerinin çeşitliliği önemlidir (Turnpenny and Ellard, 2005). Protoonkogenler, temel biyolojik olayları düzenleyen ve evrim boyunca yüksek oranda korunmuş genlerdir. Protoonkogenler sinyal iletiminde 3 temel noktada görev yapar;

1. ATP'nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonunu sağlar. Böylece protein konfigürasyonunun da değişiklik yaparak proteinin kinaz özelliğini aktive eder ve sinyal iletimini sağlayan proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Bu durum Epidermal Büyüme Faktör ailesi protoonkogenleri için bir örnektir.
2. RAS ailesi protoonkogenleri GDP/GTP döngüsünde aracı olarak görev yaparlar.
3. Nükleus içindeki proteinlerdir ve gen ekspresyonunda, DNA replikasyonun da ayrıca hücre döngüsünün kontrolünde görev yaparlar.

2.4.1.2. Onkogenlerin aktivasyon mekanizmaları

Onkogen aktivasyonu, delesyonlar ve nokta mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar, amplifikasyonlar ve transkripsiyonel düzenlemenin bozulmasıyla olmaktadır.

2.4.1.2.1. Delesyon-nokta mutasyonları

Delesyonlar ve nokta mutasyonları, protoonkogenlerden onkogen oluşmasına sebep olan değişimlerden biridir. Retroviral onkogenlerin sahip olduğu delesyonlar onların aktif

hale gelmesine neden olur. Örnek olarak Met, trk, kit, ve erb-B onkogenlerinin amino uçlarında bulunan ligand bağlanma domainlerindeki delesyonları gösterilebilir.

Nokta mutasyonları daha çok RAS ailesi (K-ras, H-ras ve N-ras) protoonkogenlerin de belirlenmiştir. Belirlenmemiş insan tümörlerinin yaklaşık olarak % 15- 20' sinin bir mutasyonu RAS taşıyabileceği tahmin edilmektedir. RAS mutasyonları sonucu RAS proteininin sinyal iletim fonksiyonu aktive olur.

2.4.1.2.2. Gen amplifikasyonları

İnsan tümör hücrelerinde, onkogenlerin aktive olmasında diğer bir mekanizma da, genlerin fazla sayıda ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Gen amplifikasyonu genomik DNA'nın gereğinden fazla replike olması sebebiyle ortaya çıkar ve genellikle homojen olarak boyan alan bölgeler (HSR'ler) veya double-minute kromozomlar (DM) olarak ifade edilen karyotipik bozukluklara sebep olur (Kufe et al.,2003). DM kromozomlar, sentromer içinde yer alan mini kromozom yapıları ile karakterizedir. HSR' ler ise kromozom üzerinde koyu ve açık renkte boyanan bandların normal görüntünün dışına çıkılması ile ortaya çıkan kromozom segmentleridir. DM' ler ve HSR' ler genin birkaç binden fazla kopya sayısında genomik DNA bölgeleri içerdiğini gösterir. Amplifikasyon hücre büyümesi için seçici bir avantaj sağlayarak genlerin ekspresyonunun artmasına yol açar. Gen amplifikasyonu bir hücrede onkogen kopya sayısını birkaç kattan birkaç yüz kata kadar arttırabilir. Gen amplifikasyonu, normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha sık gözlenir. Pek çok tümörün prognozunda, onkogen amplifikasyonları rol oynar. Tümörün hızlı gelişimine ve malign yapısının artmasına neden olurlar. Bu gruba en iyi örnek nöroblastomda N-myc; meme ve over kansinomlarında ise erbB-2 onkogen amplifikasyonlarıdır. Amplifiye N-myc kopyaları hızla gelişen agresif tümörlerde sıklıkla gözlenir ki bu da N-myc'in nöroblastomanın malign özelliğinin artmasında önemli bir rolü olduğunu ifade eder. Ayrıca RAS gen ailesi üyeleri içinde yer alan K-ras ve N-ras çeşitli kansinomlarda sporadik olarak amplifiye olurlar (Kufe et al.,2003).

2.4.1.2.3. Kromozom yeniden düzenlenmeleri

Genlerin protein kodlayan bölgesinde bazı protoonkogenlerin translokasyonu değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasını sağlar. Buna en tipik örnek; kronik myeloid lösemide, kromozom 9q2'da lokalize olan abl protoonkogenin kromozom 22q da lokalize bcr geni ile translokasyonudur. Bu translokasyon sonucunda

bcr/abl füzyon proteini sentezlenir. Abl protoonkogeni onkogenik aktivite kazanmıştır (Kufe et al.,2003).

2.4.1.3. Onkogen ürünlerinin tipleri

1. Büyüme faktörleri:

Polipeptid karakterinde olan bu faktörler hücre DNA'sını uyarmada etkin fonksiyonlara sahiptirler. Hücrelerin genomlarında lokalize olan bu protoonkogenler, eğer retroviruslerdeki çok kuvvetli promotor/güçlendirici (enhanser) sekanslarının (LTR, long terminal repeat) kontrolü altına girerlerse, çok fazla uyarılır ve aşırı eksprese (transkripsiyon ve translasyon) olurlar. Bu stimulasyon sonunda, devamlı olarak çoğalma faktörleri (onkoproteinler) sentezlenerek hücrelerin normalinden çok fazla, kontrolsüz ve sınırsız üremelerine ve bu durum devam ettiği takdirde onkogeneze yol açarlar. Fibroblast hücre kültürlerinde yapılan in vitro çalışmalarda, üreme faktörü sentezinin artması fibroblastların fazla çoğalmasına ve ölümsüz hücrelerin oluşmasına (immortalizasyon) sebep olduğu ortaya konulmuştur. Sentezlenen üreme faktörleri, hücrelerin yüzeyinde lokalize olan çoğalma faktör reseptörlerine bağlanarak hücreleri uyarırlar.

2. Çoğalma faktör reseptörleri:

Hücreler tarafından sentezlenen çoğalma faktörlerinin etkin olabilmeleri için, bunların hücre yüzeyindeki özel reseptörlere (çoğalma faktör reseptörleri) bağlanması ve taşıdıkları çoğalma sinyallerini, reseptörler aracılığı ile hücre içine transfer etmeleri gereklidir. Bu reseptörlerin hücre içi uzantıları, aldıkları veya kendilerine iletilen transmembran uyarıları, intrasellüler transdüserlere aktarırlar. Hücreler tarafından sentezlenerek membranda lokalize olan bu reseptörler de çeşitli yapısal mutasyonlar meydana gelirse, onkogenlere dönüşebileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Şöyle ki, viral ErbB genleri, onkogeninin ekstrasellüler ligand bağlanma bölgesi olmayan epidermal çoğalma faktörü reseptör geni olduğu bildirilmiştir. İntrasellüler reseptörler arasında kabul edilen bu tür moleküllerden v-erbA gen ürünleri bir tirozin reseptörü olup, bunun aktive olmuş formu diferensiyasyon önleme yeteneğine sahiptir. *Avian erythroblastosis virus (AEV)* infeksiyonunda hem v-erbA ve hem de v-erbB genleri sinerjetik bir tarzda etkilenecek onkojeniteye yol açarlar.

3. Sinyal transfer faktörleri:

Bu moleküller, reseptörlerden aldıkları çoğalma sinyallerini hücre çekirdeğine veya hücresel hedef bölgelere iletmede önemli rol alan spesifik proteinlerdir. Bunları, kodlayan genler arasında en iyi tanımlanan H-ras ve K-ras onkogenleri bulunmaktadır. Özellikle

RAS molekülleri istirahat halindeki hücrelerde inaktif bir durumdadır. Eğer bunlar, reseptörlerden gelen transmembran sinyaller yardımı ile uyarılırsa, guanosin trifosfat sentezine yol açarlar (ras molekülleri hücre içinde, genellikle, guanosin difosfat ile bileşik oluştururlar). Fosforilize olmuş bu proteinler, ikincil mesenger görevi yaparak sinyallerin kromozoma transferini sağlarlar. Bu grupta bulunan onkogenlerin çoğu trozin kinaz proteininin kodlarına sahiptirler. Onkogen kinazlar hedef proteinlerini hem tanımada ve hem de fosforile etmede önemli fonksiyonlara sahiptirler.

4. Nükleer transkripsiyon faktörleri:

Bütün onkogenler, bir veya birkaç mekanizma ile (direkt veya indirekt yollarla) hücre nukleusunda bazı değişiklikler oluştururlar. Bu grupta bulunan onkogenler ise, direkt olarak ya transkripsiyona etkilerler veya DNA'ya bağlanırlar. Örn, v-jun onkogeni, AP-1'in çok yakın homologudur. AP-1, bir transkripsiyon faktörü geni olup diğer bir nükleer onkoprotein olan Fos'a kuvvetlice bağlanır. Jun onkogeni, transkripsiyonal regülâtör fonksiyonu nedeniyle tümör oluşumunu indükleyebilir. Fosfoprotein kodlayan genler arasında yer alan myc, myb ve fos genleri, diğer genleri transaktive edebilir ve bunun sonunda DNA'yı stimule ederek, direkt veya indirekt olarak, replikasyonu başlatabilir. Oluşan yapısal veya regülâtör değişiklikler tümör gelişimini artırır. Genoma (kromozomlara) ulaştırılan transmembran sinyaller, DNA'nın aşırı uyarılmasına ve aşırı ekspresyonuna yol açarlar. Transdüserler hücre tarafından sentezlenerek sitozol içinde depolanırlar ve gerektiği zaman ve gerektiği yerde görev yaparlar. Onkogenler, yapısal ve görevsel olarak birbirlerinden az çok farklıdırlar. Şimdiye dek 100'den fazla onkogenin varlığı bildirilmiştir. Onkogenlerin kodladığı proteinlerin (onkoprotein), normal protoonkogenlerin proteinlerinden bazı farkları bulunmaktadır;

1. Onkoproteinler, çok önemli olan regülâtör proteinlerden yoksundurlar.
2. Onkoproteinler, diğer eksternal sinyallere bağımlı değildirler.
3. V-onc'larda intron yoktur.

Nonviral orijinli tümörlerde de, protoonkogenler benzer etkinlik gösterirler. Şöyle ki, böyle bir özellik gösteren tümör hücrelerinden ekstre edilen DNA'ların in vitro fare fibroblast hücrelerinde transformasyonlar oluşturması, tümör hücrelerinde onkogenlerin varlığını ortaya koymaktadır.

2.4.2. Tümör süpresör (baskılayıcı) genler

Hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptozise

yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler. Tümör süpressor genlerin (TSG) hücre üzerindeki etkileri genetik değişiklikler sonrasında ortadan kalkar. Resesif karakterli oldukları için her iki allelde de değişiklik (çift vuruş - two hit) olması durumunda TSG inaktive olur ve hücre üzerindeki fonksiyonu tamamen ortadan kalkar. İnaktivasyon sonrasında hücre üzerindeki kısıtlayıcı etkilerinin kaybolmasına bağlı olarak kanser gelişimi gözlenir.

Hücre çoğalmasını baskılayan TSG etkilerini iki farklı şekilde gerçekleştirirler. Hücre siklusunu kontrol altında tutan ve gatekeeper (bekçi) adı verilen APC ve VHL gibi genler bu etkilerini hücre proliferasyonunu direk baskılayarak gösterirler. Hücre proliferasyonu üzerine indirek etki gösteren ve caretaker (bakıcı) olarak adlandırılan BRCA1, BRCA2, MLH1 ve MSH2 gibi genler ise DNA tamirinden sorumlu olup mutasyon oluşumuna engel olarak genomun stabil kalmasında etkin rol oynarlar.

Sperm veya yumurta hücresi aracılığıyla embriyoya aktarılan TSG mutasyonları, resesif özellikleri nedeniyle embriyonik gelişimi etkilemedikleri için yaşamla bağdaşır ve kişinin tüm hücrelerinde gözlenirler. Ayrıca, embriyo gelişimi sırasında oluşabilir ve meydana geldiği zamana göre vücut hücrelerinin bir kısmında (mozaik) saptanabilir. Üreme hücrelerinden embriyoya geçen veya embriyo gelişimi esnasında ortaya çıkarak gonadal hücreleri etkileyen mozaik durumlarda kişilere aktarılan bu mutasyonlar sonraki nesillere aktarılma riskini de beraberinde getirecektir.

Bunun aksine, onkogenler hücre proliferasyonunu stimüle ettikleri için sperm ve yumurta kanalı ile embriyoya geçtikleri veya embriyonik gelişim sırasında meydana geldikleri zaman farklı etkiye sahiptirler. Dominant (baskın) karakterli olmaları nedeniyle tek bir mutasyon dahi aktive olmalarına ve bunun neticesinde de hücre proliferasyonunun aşırı uyarılmasına neden olarak embriyonik gelişimi etkilemekte ve gebeliğin devamını engellemektedir.

2.4.2.1. Tümör Süpressor Gen İnaktivasyonu

TSG'leri onkogenlerden ayıran en önemli özelliklerden birisi çekinik karakterli hareket etmeleri olup bu özellikleri bazı klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olur. Onkogenler ise tek bir mutasyon sonrasında kansere neden oldukları için yaşam içerisinde somatik hücrelerde meydana gelen değişiklikler neticesinde hastalık gözlenir ve üreme hücreleri ile sonraki nesillere aktarılmazlar. TSG'lerin inaktivasyonu için gerekli olan iki

değişiklik yaşam içerisinde arka arkaya kazanılabildiği gibi bir tanesi nesiller boyu aktararak bu kişilerde kanser predispozisyonuna ve ailesel kanser sendromlarının gözlenmesine neden olabilirler.

TSG' ler içerisinde yer alan bazı genetik yapılar ve bunların etkileri klasik çift vuruş hipotezi ile açıklanamamaktadır. Özellikle; retinoblastomaya neden olan RB geni ile NF1 ve PTCH1 genleri farklı mekanizmalar ile kanser gelişimine neden olabilmektedir.

Günümüzde; kanser gelişiminde rol olan TSG' lerin inaktivasyonuna neden olan farklı mekanizmalar ortaya konmuştur. TSG' in inaktive olması için hücre içerisinde bulunan bir genin her 2 kopyasının fonksiyon dışı kalması gereklidir. Yaşam içerisinde her iki allel mutasyona uğrayarak kanser gelişimi gözlenebilir. Ancak bu çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Genellikle ilk mutasyon ailesel olarak sonraki nesillere aktarılır. Mutasyonu taşıyan kişiler ise tüm hücrelerinde bu değişiklikleri taşırlar. Diğer bir deyişle tüm hücrelerinde etkilenen genin bir alleli inaktif olarak bulunur. Yaşam sırasında somatik (vücut) hücrelerde aynı genin diğer allelinde meydana gelen ikinci bir mutasyon sonrasında sağlam allel de inaktive olur ve hücre çoğalması üzerindeki süpressör etki ortadan kalkarak hücrenin bulunduğu doku bölgesine spesifik kanser gelişimi gözlenir.

2.4.3. Stabilite genleri (Caretakers)

Mutasyon oluştuğunda tümörögenезis tamamen farklı bir yolda ilerler. Bu sınıf yanlış eşleşme tamiri, nükleotit eksizyon tamiri ve baz eksizyon (kesip çıkarma) tamiri genlerini içerir. Bu genler, normal DNA replikasyon sürecindeki ortaya çıkan hataların ve mutajenlere maruz kalınma durumunda ortaya çıkan hataların tamirinden sorumludur. Diğer stabil genler kromozomal segregasyon ve mitotik rekombinasyon gibi büyük kromozom parçalarını ilgilendiren kontrol sürecinde yer alır. Stabilite genleri, genetik değişimleri minimumda tutmayı sağlar ve onlar inaktive olduklarında diğer genlerde meydana gelecek mutasyon oranı daha çok artar. Bütün genler, mutasyon oranının artması sonucu olabildiğince etkilenir. Fakat sadece onkogen ve tümör süprosör genlerdeki mutasyonlar, hücre büyümesini ve mutant hücreye seçici büyüme avantajını sağlarlar. Tümör süprosör genlerde olduğu gibi stabilite genlerinin de her iki alleli fizyolojik bir etki sonucu aktive olmalıdır (Vert and Kenneth, 2004).

2.5. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başında nadir görülen bir hastalıkken sıklığı giderek artmış ve 2008 yılında tüm dünyada 1.6 milyon yeni akciğer kanseri hastası kaydedilmiştir. 2010 yılında tüm dünyadaki kanser ölümlerinin %19'undan akciğer kanserinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri erkeklerde 1930'lu yıllarda kanserden ölüm nedenlerinin başında yer alırken, kadın olguların sayısı, 1960'larda artmaya başlamış ve artış günümüze dek sürmüştür. 1980'li yıllarda sigara karşıtı kampanyaların başlaması, erkeklerde 87/100 000 olarak saptanan akciğer kanseri insidansı 1991'de 80/100 000'e düşürmüştür. Tüm dünya ortalamasına baktığımızda Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sıradadır. Akciğer kanseri onkoloji, göğüs cerrahisi, göğüs hastalıkları, radyoloji, nükleer tıp, radyasyon onkolojisi, gibi birçok anabilim dalını ilgilendiren güncel bir hastalıktır (Öz ve ark., 2013).

2.5.1. Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, 20.yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanserinden ölmektedir.

Tüm dünyada kanser olgularının %12.8'inden akciğer kanseri sorumludur. Akciğer kanserli olgularda tanı sonrası 5 yıllık yaşam, 1974-76 yılları arasında %12 iken, 1992-97 yılları arasında çok az yükselmiş ve %15 oranına ulaşmıştır. Akciğer kanserinin evreleri incelendiğinde %57.9'unun uzak metastaz yaptığı görülmektedir. Akciğer kanserinin teşhisi genellikle geç olmaktadır, bu nedenle de sağkalımları da diğer kanserlere göre oldukça düşüktür (<http://www.who.int/cancer/en>). Ülkemizdeki akciğer kanser olgularında erkek/kadın oranı 9.4' tür.

2.5.2. Etiyolojisi

Akciğer kanserinin nedenleri büyük çoğunlukla çevresel olmasına rağmen solunumsal karsinojenlere bireysel yatkınlıkta önemlidir. Hastalık riski, etyolojik ajanlara maruziyet ve bu ajanlara bireysel yatkınlığın karşılıklı etkileşiminin yansıması olarak düşünülebilir. Akciğer kanserinin patogenezinin %94 oranında sigara sorumlu olup, etkeni belli olan az sayıdaki kanserlerden birisidir. Sigara, tüm dünyada her 6 saniyede bir

insanın ölümüne sebep olmakta ve kendine bağımlı olan her iki insandan birini öldürmektedir. Eğer gerekli önlemler alınmazsa 2030 yılına kadar tahminen toplam 175 milyon insanın daha ölümüne sebep olacaktır. Akciğer kanseri insidansı yaşla artmaktadır. Genç erişkinlerde (50 yaş altında %5-10 dolayında) sıklığı daha azdır. Bu yaş grubunda görülen akciğer kanseri sıklıkla adenokanser olup genellikle aile öyküsü eşlik etmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda, günlük sigara tüketimi ve yaş dikkate alınmadığında, sigara içen kadınların erkeklere göre daha fazla akciğer kanserine yakalandığı saptanmıştır.

Sigaradan sonra akciğer kanserinin ikinci en sık nedeninin radon olduğu belirlenmiştir. Radon, uranyumun ve radyumun kırılmasıyla doğal olarak oluşan bir gazdır. Genellikle toprak ve suda bulunur. Radonla ilişkili risk artışı, konutlarda ortama yayılan parçalanma ürünlerinin inhalasyonu ile ilişkilidir. İnhalasyonun karsinojenik etkisi, partiküle radon emülsiyonundan daha fazladır. Akciğer kanserinin %2-14'ünden radonun sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir.

Radondan başka mesleki olarak krom, nikel, kömür, kadmiyum, uranyum parçalanma ürünleri, demir, arsenik, alüminyum, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, dizel partikülleri ve formaldehite maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttırmaktadır.

Beslenme alışkanlığı, akciğer kanseri üzerinde hem koruyucu hem de zarar verici etkilere sahiptir.

Hava kirliliğinin yoğun olduğu kentlerde yaşayanlarda, kırsal kesimde yaşayanlarla karşılaştırıldığında küçük hücreli akciğer kanseri iki, büyük hücreli akciğer kanseri bir kat daha fazla görülmektedir.

Tüberküloz, bronşektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, interstisyel akciğer hastalıkları gibi akciğerde skatris bırakan hastalıklarda, skar dokusunun kanser gelişimine zemin oluşturduğu bilinmektedir.

Akciğer kanseri riski, akciğer kanserli hastaların hem sigara içen, hem de içmeyen akrabalarında 2.4 kat fazladır.

Bireylerin %10-20'inde akciğer kanseri gelişmesi ve pasif sigara dumanına maruz kalan ve ailesinde DNA onarım kapasitesi fonksiyon bozukluğu bulunan bireylerde akciğer kanseri riskinin 3.8 kat arttığı saptanmıştır. göz önüne alındığında akciğer kanseri etyolojisinde genetik yatkınlık dikkati çekmektedir.

2.5.3. Akciğer Kanseri Sınıflaması

Akciğer kanserinin histopatolojik sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) öngördüğü sınıflama sistemine dayanmaktadır. DSÖ'nün önceki akciğer tümörleri

sınıflaması 1981 yılında yapılmıştır. Bu tarihten sonra patolojik tanı yöntemleri ve kriterlerinde belirgin değişiklikler gerçekleşmiş, bunun üzerine sınıflama DSÖ tarafından 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir. Hücre tipleri ışık mikroskobu altındaki görünümüne göre adlandırılmıştır. Akciğer karsinomlarının %85'den fazlasını 2 majör tip küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) oluşturmaktadır; non-skuamöz karsinomlar (Adenokarsinom, Büyük hücreli karsinom ve diğer subtipler) ve skuamöz hücreli karsinomlar. Akciğer kanserlerinin geri kalanı yani yaklaşık %15'ini ise küçük hücreli karsinom (KHAK) oluşturur.

Günümüzde tedavi açısından değerlendirme yapılırken ilk 3 tip bir kategoriye sokulup "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu"(KHDAK) diye adlandırılır. Bu şekilde "Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu"(KHAK) bu gruptan ayrılmış olur (Kumar et al., 2003).

1. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomları (KHDAK)

a. Squamöz hücreli karsinoma

Erkeklerde daha sık görülmektedir. Özellikle sigara kullanımı olan bireylerde gözlenir. Bronkojenik karsinomlar arasında ülkemizde en sık görülen karsinom türüdür. Büyük bronşların santralinden çıkmaya meyillidir, lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılır. Squamöz karsinoma, bronş epitelinde yıllar önce başlayan bir metaplazi veya displaziye izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Mukozada 1-2 cm çapında, kalınlaşma ve irregüler nodül tarzında kabarıklık yavaş yavaş gelişir. Bu durumda henüz klinik ve radyolojik bir bulgu olmadığı halde, balgamda bronş yıkama ve fırça ile alınan materyalde atipik epitel hücreleri görülür. Erken metastaz yapması sıklıkla beklenmez. Hücresel farklılaşmanın derecesine göre; iyi,orta ve az diferansiye olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Squamöz hücreli karsinomlar, metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan semptomatik kitle yaptıklarından diğer tiplere göre hafifçe daha iyi bir prognoza sahiptir. Tanı konulduğunda genellikle cerrahi olarak çıkarılabilir durumdadırlar. Skuamöz hücreli karsinomların en iyi prognoza sahip akciğer kanseri türü olduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

b. Adenokarsinom

Adenokarsinom, asiner ya da glanduler yapılar oluşturan ve ülkemizde, kadın erkek, her iki cinsiyette ikinci sıklıkta görülen akciğer karsinomudur. Tüm KHDAK içinde %30-35 oranında görülmektedir. Erkek ve kadında görülme sıklığı aynıdır. Sigara kullanımı ile ilişkisi squamöz karsinomaya göre daha zayıftır. Santral yerleşimli olabileceği gibi,

çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Adenokarsinomlar, yavaş büyürler ve daha küçük kitle yaparlar. Ayrıca diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Bronkioloalveolar karsinoma (BAC), özel bir adenokarsinoma tipidir. İki çeşidi vardır. BAC'ın yarısından azı multifokal müsinöz tümörlerdir. Bazen tek başlarına kitle yaparlar, bazen de birbirleri ile birleşen kitleler oluştururlar. Histolojik görünüm yanıltıcı olarak benign olup mitoz nadirdir. Diğer çeşidi 10 cm çapa kadar ulaşabilen, gri-beyaz tek bir nodül şeklinde olur. Üst lob içinde ve periferik yakın yerleşimlidir. BAC'ın prognozu diğer bronkiyöjenik karsinoma göre daha iyidir. Adenokarsinomların en sık metastaz yaptıkları yerler; akciğer, adrenal, kemik ve merkezi sinir sistemidir. Olguların %50' inden fazlasında otopsi ile saptanan beyin metastazı vardır. Tek başına beyin metastazı ise olguların %12' sinde görülür.

c. Büyük hücreli karsinom

Tüm bronkiyöjenik karsinomların yaklaşık %10'unu oluşturan büyük hücreli karsinomlar, geniş stoplazmalı ve belirgin hücre nükleusu olan pleomorfik hücrelerden oluşur. Büyük hücreli karsinomlar, hücresel herhangi bir farklılaşma göstermedikleri için 'indiferansiyel karsinom' olarak da adlandırılırlar. Sitolojik diferansiyasyon göstermeyen belki de skuamöz veya glandüler neoplazmların, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar, indifferansiyel şeklidir. Bu tümörlerin tanısı, hücresel farklılaşmanın olmaması nedeniyle bazen kesin olarak konulamaz. Tümör bazen vahşi bir anaplazi gösteren dev hücrelerden oluşmuştur. Erken fazda uzak yerlere yayılma eğiliminden dolayı kötü prognozludurlar. Büyük hücreli karsinomların yaklaşık %60' ı periferik akciğer dokusu kaynaklıdır. Metastatik yayılımı adenokarsinoma benzer; olguların yaklaşık %50'sinde beyin metastazı vardır. Çoğunlukla geç evrelerde saptanırlar ancak evre I ya da II gibi erken evrelerde saptanırsa cerrahi rezeksiyon ile kür şansları vardır. Tümörün yaygın metastaz yapma yeteneği vardır ve ince barsaklar metastazın en sık görüldüğü organdır. Yarısından fazlasında tanı konduğu zaman beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşama oranı %2-3 dür.

2. Küçük hücreli akciğer karsinomları (KHAK)

Erkeklerde kadınlara oranla daha sıktır ve sigara kullanımı ile çok yakın ilişkilidir. Küçük hücreli karsinomlar, DSÖ sınıflamasına göre, saf küçük hücreli ve kombine küçük hücreli karsinom olarak iki ana gruba ayrılırlar. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitleler olup, hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Histolojik varyantlarından biri olan yulaf hücreli (lenfosit benzeri) karsinom, yuvarlak- oval şekilli, hücre nükleolusları daima belirsiz görünümlü ve bol stoplazmalı hücrelerden oluşur. Poligonel varyant en sık görülür ve fuziform ya da iğsi yapıda nükleus içeren büyük

hücrelerden oluşur. Kombine küçük hücreli karsinomda, küçük hücreli ve küçük hücreli dışı karsinom hücreleri bir arada bulunur. En önemli kombine varyant tipi ise küçük hücreli ve büyük hücreli varyanttır. KHAK' lar hızlı büyüyen ve erken yayılan lezyonlardır ve nadiren rezeke edilebilir durumda yakalanırlar. Bu nedenle hemen her zaman kombine radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilirler. Uzak metastazların en sık görüldüğü yerler sırasıyla; kemik, karaciğer, kemik iliği, beyin ve ekstratorasik lenf nodlarıdır. İki yıllık sağ kalım oranı %5-8 dolayındadır.

2.5.4. Akciğer Kanseri Evrelendirilmesi

Amerikan Kanser Birliği ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği, akciğer kanseri için primer tümörün büyüklüğü, yaygınlığına, tümörün özelliklerini derecelendirir (T), bölgesel lenf nodu tutulumuna (N), metastazın varlığı veya yokluğunu (M) belirler. TNM evrelendirme klasifikasyonunu oluşturmuşlardır. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde evreleme TNM sistemine göre yapılır.

Çizelge 2.1. TNM Sınıflaması

PRİMER TÜMÖR (T)	BÖLGESEL LENF BEZİ (N)	UZAK METASTAZ (M)
T0: Primer tm belirtisi yok	N0: Bölgesel lenf bezi yok	M0: Uzak metastaz yok
Tis: Karsinoma in situ	N1: İpsilateral peribronşial ve/veya hiler lenf bezi metastazı (akciğer içi lenf bezi)	M1: Uzak metastaz var
T1: Genis çapı <3cm, akciğer ve visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronsundan daha proksimale uzanmayan	N2: İpsilateral mediastinal lenf bezi metastazı (Subkarinal dâhil)	
T2: Genis çapı >3cm, ana bronşlarda yerlesen ancak ana karinaya uzaklığı > 2cm olan, visseral plevraya kadar uzanan, atelektazi veya pnömoniye neden olan	N3: Kontralateral mediastinal veya supraklaviküler lenf bezi metastazı	
T3: Herhangi büyüklükte olan tümörün göğüs duvarı, diafragma, mediastinal plevra, perikard gibi yapılara invaze olması, ana bronş içinde karinaya 2 cm dan yakın yerlesmesi, tüm akciğeri kaplayan atelektazi veya pnömoniye neden olması		
T4: Herhangi büyüklükte olan tümörün mediasten yağ dokusu,		

kalp, büyük damarlar, trakea özofagus, vertebral kolon, karina gibi yapıları tutması, malign plevral veya perikardial sıvı bulunması, tümör ile aynı lob içinde satelit nodül bulunması		
---	--	--

Çizelge 2.2. TNM sınıflamasına göre evrelendirme

EVRE 0	Karsinoma in situ (Tis N0 M0)
EVRE IA	T1 N0 M0
EVRE IB	T2 N0 M0
EVRE IIA	T1 N1 M0
EVRE IIB	T2 N1 M0/T3 N0 M0
EVRE IIIA	T3 N1 M0/T1-2-3 N2 M0
EVRE IIIB	T4 N M0/T N3 M0
EVRE IV	T N M1

2.5.5. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da en sık görülen kanser çeşidi olup vakaların %90'ında etiolojide sigara bulunmaktadır. Akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin en sık nedenidir. Türkiye, dünyada akciğer kanseri insidansı en yüksek ülke olarak kabul edilebilir. Birçok ülkede akciğer kanseri insidansındaki değişikliklere, tümörlerin histolojik tiplerinin dağılımındaki değişikliklerin de eşlik ettiği bildirilmiştir. Mevcut tedavi yöntemleriyle 5 yıllık ortalama yaşam süresi %15'tir. Ortalama yaşam süresi ve sigara içilmesindeki artışa bağlı olarak yıllar içinde akciğer kanseri insidans ve mortalitesi artış göstermiştir. Akciğer kanseri, KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri) ve KHDAK (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) olmak üzere iki grupta incelenir. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'i KHDAK' dir. KHDAK' de sık görüleni ise adenokarsinomdur (Kirişoğlu ve ark., 2003). Bütün kanserlerde olduğu gibi, akciğer kanserleri de onkogenleri ve tümör süpresör genleri etkileyen genetik değişiklikler sonucu meydana gelir. Kanser oluşumunda hücrenin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör baskılayıcı genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiyogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur. Bunun dışında, sinyal iletimi, hücre döngüsünün kontrolü ve DNA tamiri, hücre büyümesi ile ilişkili genler de akciğer kanseri oluşumunda

değişik basamaklarda hasar görebilir. Akciğer kanserlerinde gözlenen genom dengesizliği; birçok kromozomal (anöploidi) ve yapısal sitogenetik anormallikleri (delesyon, amplifikasyon, nonresiprokal translokasyonları) içerir (Janina et al., 2006).

Akciğer kanserinin karsinogenezinde önemli genetik olaylar şöyle sıralanabilir;

1.Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu

Nokta mutasyonları sonucu oluşan değişiklikler en sık RAS onkogen ailesinde (HRAS, KRAS ve NRAS) görülür. H-ras, K-ras ve N-ras'tan oluşan ras ailesi, akciğer kanserinin gelişiminde nokta mutasyonu ile rol oynamaktadır. RAS mutasyonları KHDAK' lerinin %10-15' inde, adenokarsinomların % 20-30' unda görülmekte, KHAK' lerinde de neredeyse hiç görülmemektedir. En sık görülen K-ras mutasyonu küçük KHDAK' lerinin %15-50'sinde saptanmaktadır. K-ras mutasyonu görülenlerde sağkalımda azalma, erken nüks ve kötü prognoz görülmektedir. Bu mutasyonlar, hot spot bölgelerde yer alan, içsel GTPaz aktivitesine sahip kodon 12, 13, ve 61'i etkiler. C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşan myc geni sıklıkla amplifikasyon ve transkripsiyonel disregülasyon ile onkogen haline dönüşmektedir. KHDAK' lerinin %8-20' sinde, KHAK' lerinin %18-31' inde Myc ailesi üyelerinden birinin amplifikasyonu görülmektedir (Nair,2005).

2.Tümör supresör genlerin inaktivasyonu

Kanser oluşumuna sebep olan en önemli tümör süpresör mutant gen p53 olup, 17p13 lokusunda yerleşiktir. Tüm kanserlerin % 50'sinde görülürken, KHAK'lerinin % 90'ında, epidermoid kanserin % 65'inde, büyük hücreli kanserin % 60'ında ve adeno kanserin % 33'ünde gösterilmiştir. Sigara içimi maruziyeti, p53 mutasyonu gelişme riskini artırır. Retinoblastom(RB) geni de akciğer kanserlerinde rastlanan bir diğer tümör süpresör genidir. RB protein yokluğu KHAK' lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK' lerinin sadece % 10-30'unda görülmektedir.

3.Hücre siklus regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler

Ökaryotik hücre siklusu G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. Karsinogenezis sırasında hücre büyümesinin G1 fazında koordinasyon noktasındaki değişiklikler kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. Hücre siklus regülasyonunda 3 önemli intrasellüler protein ailesi tanımlanmıştır; siklin bağımlı protein kinazlar (CDK), siklinler ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKD). Kontrolsüz CDK aktivitesinin onkojenik olduğu ve CDKD'lerin ise supresör fonksiyonları olduğu ileri sürülmektedir.

4. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler

DNA tamiri ve apoptozis hücre döngüsünün devamı için esastır ve hatalı DNA tamiri karsinogenez gelişiminden sorumlu önemli bir faktördür. DNA hasarını gidermek

üzere işlev gören başlıca genler kromozom 3p üzerinde lokalizedir. Kromozom 3p kayıpları akciğer kanseri gelişimini 14 kat arttırmaktadır.

5. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler

Büyüme faktörleri, afinite gösterdikleri hücre membran reseptörlerine spesifik olarak bağlanan, normal hücre proliferasyonunu uyaran, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen polipeptitlerdir. Büyüme faktörleri hedef hücrelerinin plazma zarlarını geçme yeteneğine sahip olmadıklarından etkilerini hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Epidermal growth faktör (EGF) ve transforming growth faktör-a (TGF-a) hücre proliferasyon ve differansiyasyonunu uyaran mitojenik etkileri gösterilmiş olan peptidlerdir. Pek çok çalışmada aberran EGFR sinyalizasyonu ve EGFR regülasyon bozukluğunun tümör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yüksek düzeyde EGFR ekspresyonu ileri evre hastalık, metastatik fenotip gelişimi, sağkalımda azalma ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. KHDAK'lerin % 13-80'inde EGFR aşırı ekspresyonu saptanmıştır.

2.6. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. Ardından aynı reseptör ailesinin üç üyesi daha bulunmuştur. Bunlar, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 (HER-3), ErbB-4 (HER-4)' dür. EGFR, proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyallerin iletim yollarını kontrol eden hücre yüzey reseptörü tirozin kinazların ErbB familyasının bir parçasıdır. Bu transmembran reseptörler hücre yüzeyinde monomerler olarak varlıklarını sürdürürler. Bu reseptörler hücre dışı bir sinyale ("ligand" olarak adlandırılır) bağlandığında aktive olurlar. EGFR için bilinen ligandlar epidermal büyüme faktörü "EGF", epiregulin ve transforming büyüme faktörü alfa'dır. Normal, dinlenme halindeki EGFR "bloke" bir durumdadır: dimerize olamaz, çünkü reseptörün hücre dışı kısmında yerleşik dimerizasyon kolları o şekilde katlanmıştır ki molekülün yüzeyinde görünmezler. EGFR ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunun kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, önemli bir kısmını kanserin teşkil ettiği birçok hastalıkta aktivasyonlarının veya aşırı ekspresyonlarının ilişkisi tespit edilmiştir. Ligand bağlanma uyum için gerekli değişiklikleri harekete geçirir; molekülün hücre dışı kısmı açılır ve dimerizasyon kolları açığa çıkar, böylece dimerizasyon gerçekleşir. Homodimerizasyon, EGFR'nin bir başka EGFR ile bir araya gelmesidir. Bir başka partner daha (örneğin Her2 ya da Her3) devreye girerse, o zaman sürece heterodimerizasyon denir. "Dimerizasyon" reseptörün "aktivasyon" u demektir. Aktif durum demek, ATP' den bir

fosfat grubunun reseptörün sitoplazmik kuyruğuna, özellikle, bu kuyruktaki tirozin kalıntılarına, transfer olabilmesi demektir (tirozin transfosforilasyon). Reseptörün aktivasyonu, reseptörün ATP bağlayan yarığın dimerizasyon süreciyle kendini açması, böylece ATP' nin reseptöre girebilmesi ve kinazın fosfat transfer etmesine izin verilmesi anlamına gelir. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü'nü engellemenin bir yolu, ATP bağlayan yarığa girmek için ATP ile yarışan küçük bir moleküler molekül yaratmaktır. Bu yolla, reseptörün kinaz aktivitesi bloke edilir. Bu "tirozin kinaz inhibitörleri" (TKI'ler) diye adlandırılan gefitinib ve erlotinib'in geliştirilmesinin temelini oluşturur. Hücre dışı kısım ligand ile bağlandığında reseptör hücre yüzeyinde homodimer veya heterodimer yapılar oluşturur. Ligand bağlandığında intrasitoplazmik kısımda otofosforilasyon gelişir ve bu da hücre içi tirozin kinazı aktive eder. Bunun sonucunda da RAS-RAF-MAPK (mitogen activated protein kinase), PI3K(phosphoinositide 3 kinase)/AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog), protein kinaz C, ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase) gibi sinyal ileti yolları aktive olur. EGFR' nin ana sinyal ileti yolağı RAS-RAF-MAPK'dir.

EGFR overekspresyonu tümör hücre büyümesi, tümör invazyonu, yeni damar oluşumu ve metastaza neden olur. EGFR overekspresyonu ile hücre adezyonu, apoptozun inhibisyonu ve kemoterapiye rezistans arasında da ilişki gösterilmiştir. Pulmoner adenokarsinom gelişmesinde EGFR geninde meydana gelen mutasyonların rol oynadığı gösterilmiştir.

2.6.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörlerinin Yapısı

ErbB-1, insanda 7p11.2 pozisyonunda lokalize olmuştur, gen içinde 28 ekzon içerip, 170 kDA' luk glikoprotein kodlar. ErbB-2 ise, 17q11-q21 pozisyonunda lokalize olmuştur, 27 ekzon içeren glikoproteindir. EGFR' ler üç önemli fonksiyonel domaine sahiptir. Hücre dışında ligandların bağlandığı bir domain, hidrofobik transmembran bir domain ve hücre içinde yer alan sitoplazmik bir tirozin kinaz domaini. Hücre dışı domain L1, CR1, L2 ve CR2 olmak üzere dört farklı bölgeden oluşur. ErbB-1'de L1 ve L2 bölgeleri arasına ligand bağlanırken, ErbB- 2'de bu bölgeler arasında güçlü bir etkileşim bulunduğundan ErbB-2'nin ligand bağlama yeteneği kaybolmuştur. Bu sebeple de ErbB-2'nin fonksiyonel olabilmesi için ailenin diğer üyeleriyle heterodimer oluşturması gerekmektedir. CR1 ve CR2 domainleri çeşitli küçük moleküllerden meydana gelmiştir. Her biri bir veya iki disülfid bağıyla bir arada tutulur. Hücre içi domain ise C-terminal düzenleyici bölge ve tirozin kinaz bölgesine sahiptir. TK bölgesi N ve C olmak üzere iki

lobtan oluşur. N-terminal lob ve daha büyük C- terminal lob arasında ATP bölgeleri yer alır. EGFR' nin C- terminal lobu tirozin aminoasitleri içerir. Reseptör üzerindeki bu alıcı tirozin aminoasitlerine ATP'nin γ -fosfat gruplarından ATP transfer edilir. Bu şekilde EGFR aracılığıyla sinyal iletimi tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile gerçekleştirilmiş olur.

2.6.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri Sinyal Yolakları

EGFR' nin ana sinyal iletim yolağı RAS-RAF-MAPK'dir. Aktive olan bu yolaklar çeşitli mekanizmalarla tümör hücre büyümesi, hücrelerin transformasyon göstermesi, apoptozun inhibe olması, tümör hücrelerin ömrünün uzaması, yeni damar oluşumu ve tümör hücrelerinin invazyonuna neden olurlar. Reseptör tirozin kinazlar grubunda yer alan EGF1 ve EGF2 reseptörlerinin aldığı sinyallerin hücre içinde takip ettiği temel 3 yolak vardır.

1. RAS/ERK yolağı:

Grb2 veya Shc proteinlerinin fosforile olmuş ErbB reseptörlerine bağlanmasıyla ERK yolağı aktive olur. SOS (Son of sevenless) aktive olmuş reseptör dimerine bağlanır, daha sonra RAS' ı aktive ederek RAF-1' in de aktive olmasına sebep olur. RAF-1, MEK1 ve MEK2' yi fosforile eder. Daha sonra MEK1, ERK1' i, MEK2 de ERK2' yi aktive eder. Bu yolak hücre proliferasyonu, apoptozis, protein inhibitörünün ve Bcl-2 ailesi üyelerinin artan transkripsiyonu ile sonuçlanır. Böylece hücre devamlılığı sağlanır.

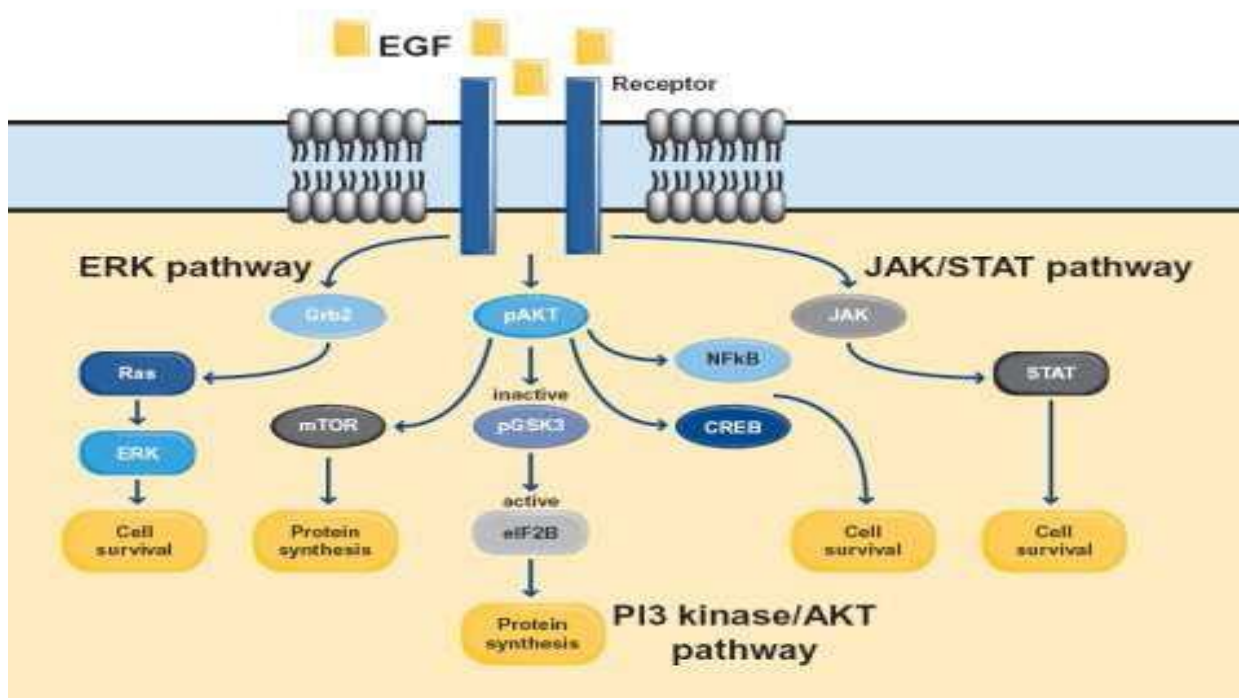
2. PI3 kinaz/AKT (PI-3 kinaz/protein kinaz B) yolağı:

EGF önceki yolak yanında bu sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla hücre devamlılığını sağlar. EGF, aktive olan ERBB reseptörüne PI-3 kinazın bağlanmasını tetikler. Bu olay PI-3' deki domainin fosforile olmuş tirozinlere bağlanması ile gerçekleşir. PI-3 kinazın katalitik alt birimi fosfotidilinozitol(4,5) bifosfatı fosforile ederek PtdIns(3,4,5)P3' ün oluşmasına yol açar. PI-3 kinaz aynı zamanda RAS' ı da aktive edebilir. Bu, ERK sinyal yolağının aktivasyonu ile hayatta kalım yolakları arasındaki iletişimi gerçekleştirir. PtdIns(3,4,5)P3' ün temel efektörü AKT' dir. AKT, anti-apoptotik proteinlerin transkripsiyonu ile hücre devamlılığını sağlar. Bu süreçte yer alan ara transkripsiyon faktörleri NFkB ve CREB' tür. AKT' nin bir başka downstream hedefi GSK3' tür. GSK3' ün sürekli aktivitesi bazal şartlar altında eIF2B'in fosforilasyonuna ve inhibasyonuna sebep olur. eIF2B protein translasyonunun başlamasını düzenleyen bir proteindir. Bu yüzden GSK' nın AKT ile inaktivasyonu eIF2B' yi defosforile eder. Bu da protein sentezi ve aminoasitlerin depolanmasına yol açar. AKT aynı zamanda mTOR' u aktive eder. mTOR

proteini, P70 ribozomal S6 kinaz ve eIF2B bağlama proteininin (4E-BP1) inhibasyonu ile protein sentezini tetikler. Sonuç olarak, bu süreçlerin hepsi EGF' ye yanıt olarak hücre büyümesini ve devamlılığını sağlar.

3. JAK/STAT yolağı:

EGF ile başlayan diğer bir sinyal yolağında JAK/STAT yolağıdır. Bu yolak hücre devamlılığının yanıtlanmasında görev alır. JAK, plazma membranında yer alan STAT proteinlerini fosforile eder. Bu da hücre devamlılığı ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu aktive eder.



Şekil 2.1. EGFR Sinyal yolağı (Sequist, L.V. et al., 2007).

2.6.3. Epidermal büyüme faktör reseptör inhibitörleri

EGFR'nin tümör gelişimindeki rolü göz önüne alınarak, son yıllarda EGFR aktivasyonunu ve fonksiyonunu bloke eden çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. Gefitinib ve erlotinib klinik yollarla test edilen ilk tirozin kinaz inhibitörleridir. EGFR aktivasyonunu engellemenin bir yolu, ATP bağlayan rezidüye ATP ile yarışan bir molekül geliştirmektir. Böylece reseptörün kinaz aktivitesi bloke edilir. Bu "tirozin kinaz inhibitörleri" (TKI'ler) diye adlandırılan gefitinib (Iressa®) ve erlotinib (Tarceva®) tedavisinin temelini oluşturur. Oral yolla aktif olan gefitinib ve erlotinibin çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olan EGFR' yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri inhibitörü ajanlar KHDAK'de yüksek oranda eksprese edilen EGFR'nin bloke edilmesi, tirozin kinaz

aktivitesinin inhibe edilmesi ve sonuçta hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun inhibisyonuna neden olur.

Gefitinib ileri evre KHDAK tedavisinde FDA onayı alarak 3.sıra kemoretarapi ajanı olmuştur. Gefitinip, sentetik bir quinazolin inhibitörüdür. Preklinik çalışmalarda, büyüme inhibisyonu, hücre siklusunun durması, apoptozda artış, antiangiogenik etki gibi anti tümöral etkileri gösterilmiştir. Erlotinib de diğer oral yolla aktif olan EGFR tirozin kinaz inhibitörüdür.

Erlotinib (OSI-774)'de oral quinazoline derivativedir ve EGFR' ye reversibl olarak bağlanır. Invitro çalışmalarda tümör hücrelerinde G0/G1 fazında duraklamaya ve apoptoz indüksiyonuna yol açmıştır.

2.7. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ VE KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ

EGFR ile karsinogenez arasındaki ilişki iki şekilde görülür. Birincisi, normal Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ile hücre bölünmesinin uyarılmasıdır. İkincisi ise reseptörde mutasyon gelişimi ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand-reseptör dengesinin bozulması, fosfotaz aktivitesindeki azalma ve heterodimerizasyondur. Genellikle immünohistokimyasal metotla araştırılmış hastalarda, KHDAK' lerinin %13-80'ninde EGFR ekspresyonu artmış olup, bu artışın hayatta kalabilirlik, tekrarlayabilirlik ve verilecek tedavinin belirlenmesine katkı sağlayabilmesi açısından prognostik önemi vurgulanmıştır. EGFR geninin aşırı ekspresyonundan başka KHDAK' de EGFR' nin tirozin kinaz domaininde çeşitli mutasyonlar rapor edilmiş ve karsinogenez sürecinde ortaya çıkan belli mutasyonlar bildirilmiştir. EGFR geninin 21. ekzonunda, 858. pozisyonunda yer alan lösin-arjinin aminoasit substitasyonu, 19. ekzonundaki karakterize aminoasit 747- 750 delesyonları, 20. ekzonunda yer alan 790. pozisyonunda yer alan treonin-metionin aminoasit substitasyonu ile aynı ekzondaki insersiyon tipi delesyonlar ile çok sık görülmemekle birlikte 18. ekzon mutasyonları gen üzerinde saptanmış mutasyonlardır.

2.7.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde EGFR' deki Genetik Değişiklikler

EGFR ile karsinogenez arasındaki ilişki normal EGFR' nin aşırı ekspresyonu, reseptörde mutasyon gelişimi ile reseptörün sürekli aktivite kazanması, ligandların aşırı yapımına bağlı olarak fizyolojik ligand-reseptör dengesinin bozulması, fosfotaz

aktivitesindeki azalma ve heterodimerizasyondur. Yapılan pek çok çalışmada ekspresyon artışı olan hastaların küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörlerine karşı da duyarlı olduğu bildirilmiş olup, KHDAK hastalarında bu EGFR inhibitörlerinin tedavide kullanılabilir ajanlar olduğunu bildirmişlerdir. EGFR geninin aşırı ekspresyonundan başka KHDAK' de EGFR' nin tirozin kinaz domaininde çeşitli somatik mutasyonlar rapor edilmiş ve karsinogenez sürecinde ortaya çıkan belli mutasyonlar bildirilmiştir. Bu mutasyonların tamamının yine tirozin kinaz inhibitörlerine karşı da duyarlılığı saptanmıştır. Artmış EGFR gen ekspresyonu ve gen mutasyonlarından başka genin kopya sayısında artış KHDAK' lerinde saptanmış değişimlerdendir. EGFR genindeki mutasyon ve amplifikasyonu belirlemek için Real time PCR ve FISH yöntemleri kullanılmaktadır.

2.7.1.1.Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

İn Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA dizilerinin doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin kendi doğal hücresel ortamlarında incelenmesini sağlayan bir tekniktir. İzotopik olmayan (Non-İzotopik) İn Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik veya afinite reaksiyonları ile floresan veya enzimatik olarak görüntülediği bir ISH tekniğidir. FISH ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir. Moleküler sitogenetik, işaretli DNA' problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskopik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskopik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Artan tarafından bildirildiğine göre (1996), sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu ilk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilmiştir (Artan, 1996). Araştırmacılar, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir. Başlangıçta ISH radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin ekonomik olmayışı, yarı ömürleri, toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklar nedeniyle yöntemin ilk dönemlerde kullanım alanı kısıtlanmıştır. 1970 lerde moleküler klonlama tekniklerinin gelişmesi, 1975 yılında biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom

enzim veya koloidal altın gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesi tekniğın hassasiyet ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve floresan ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması Horgman ve arkadaşlarının iki renkli, Nedersof ve arkadaşlarının üç renkli hibridizasyonu gerçekleştirilmesini sağlamıştır. 1986'da Pinkel ve Cremer non-radyoaktif işaretli problar kullanarak FISH tekniğini geliştirmişlerdir.

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli aşama prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir. Prob, örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. Probun hangi yöntemle işaretlendiğı, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri arttırabilir.

FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problar şunlardır;

1. Tekrarlayan dizi probları (satellit problar)
2. Lokusa özgü problar
3. Tüm kromozomu boyayan problar
4. Banda özgü problar - Telomer bölgesine özgü problar

FISH presedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

1. Preparatların Hazırlanması
2. Preparatların Ön Yıkaması
3. Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
4. Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
5. Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
6. Görüntüleme ve İnceleme

Moleküler hibridizasyona dayanan bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) altında yatan mekanizma, iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonun da prob ve hedef DNA'ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek zincir halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir.

Bu koşullarda etkili olan dört parametre vardır;

1. Isı
2. pH
3. Monovalent katyon konsantrasyonu
4. Organik solvent varlığı

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

1. Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
2. Probla hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
3. Hibridizasyonun yüksek bir reporter ile sinyali en parlak şekilde görüntülenmesi.

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller epifloresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, akua ve oranj florokromlar gözlenebilmektedir. Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyaller, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla ortamdaki uzaklaştırılır.

2.7.1.2. Real-Time PCR Yöntemi

Araştırmacıların, bir milyar kattan daha fazla DNA'nın belirli parçalarını çoğaltmaya olanak sağlayan PCR'in devrimci metodu "real time PCR", 1980'lerde Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir (Valasek and Repa, 2005). Gerçek zamanlı kantitatif PCR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. Bu teknoloji "kinetic PCR" ve "homogenous PCR" isimleriyle de tarif edilmektedir. "Real-time PCR" da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit metottur. "SYBR-Green I" boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metottur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar "TaqMan ® probe" veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. "Real-time PCR"ın kullanımında birçok avantajlar vardır. "Real-time PCR"ın tipik kullanım alanları patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda "real-time" immüno PCR ile protein belirlemesidir. Ticari olarak satılan birçok "real-time" cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar "eksitasyon" ve

"emiyon" dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. "Real-time PCR" teknolojisinin, kullanıcılar tarafında tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır. Çalışmamızda cobas z 480 (Roche Molecular Systems, Inc.) analiz sistemi sayesinde EGFR geninde exon 18, exon19, exon 20 ve exon 21' de oluşabilecek 41 mutasyon taraması yapılmıştır. Cobas z 480 florasan boya ile işaretlenmiş tamamlayıcı primer çiftleri ve oligonükleotid problemleri kullanılarak PCR amplifikasyonu ve hedeflenen DNA'nın saptanması mekanizmasıyla çalışır ve otomatik olarak sonuç verir. Mutasyon algılama Cobas z 480 analiz sistemi tarafından PCR analizi ile elde edilir. Real Time PCR yönteminin kanser çalışmalarında önemli bir yeri vardır (Sayitoğlu, 2005).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Araştırmamız, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 3/4 karar numarasıyla kabul edilmiş ve Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından KOU KA EK 2014/46 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik olarak incelenerek "küçük hücreli dışı akciğer kanseri" tanısı almış, cinsiyet farkı gözetmeksizin, 50 hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışmada yer alan hastaların doku örnekleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına, FISH analizi için doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara tespit edilerek ve mutasyon analizi için de formalin fiske- parafine gömülü 5 mikronluk kesitler halinde ependorf tüp içerisine konularak laboratuvarımıza gönderilmiştir. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, sigara kullanımlarının olup olmaması, histopatolojik bulguları hasta dosyalarından temin edilmiştir.

3.1. YÖNTEMLER

3.1.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH):

FISH yöntemi öncesi dokulardan parafini uzaklaştırmak için pozitif şarjlı lamlara tespit edilmiş parafin kesitlere deparafinizasyon protokolü uygulanmıştır.

a. Genel deparafinizasyon:

1. Preparatlar 56°C'lik etüvde 60 dakika bekletilmiştir.
2. Etüvden çıkarılan slaytların doku alanları elmas uçlu kalem ile çizilerek belirlenmiştir.
3. 3 ayrı şaleye ksilol (varsa histoclear) konur. Slayt her şalede 10'ar dakika bekletilir.

b. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu:

1. Ksilolden sonra sırasıyla %100, %100, %70, %70 alkol serilerinden ve 2'şer dakika, 2 kez distile sudan geçirilir.
2. Oda sıcaklığında kurutulur.
3. Slaytlar oda sıcaklığında kururken 100ml pretreatment solüsyonu 98-100°C'de su banyosuna yerleştirilir.
4. Alkol ve su muamelesinden sonra slayt 20-40dk ısınmış pretreatment kit içinde bekletilir.
5. Enzim 37°C'de etüvde bekletilir.
6. Pretreatmentkitde 20dk bekleyen slayt 2 kere 3'er dakika distile sudan geçirilir.
7. Sudan çıkan slaytlar iyice kurulanır, slaytın üstündeki parafinli dokunun etrafındaki su damlacıkları peçete ile kurulanır. Bu aşama enzim muamelesinde çok kritik bir aşamadır.
8. Slaytın üzerindeki doku kapanıncaya kadar enzim damlatılır. Etüv içerisinde 10dk bekletilir.
9. 10dk bekleyen slayt pepsinden arındırılır. Oda sıcaklığında 2'şer kez 3'er dk distile sudan geçirilir.
10. Distile suda sonra sırasıyla %70, 85, 100, 100'lük alkol serilerinde 2'şer dk geçirilir.
11. Slayt kurutma kağıdına konulup, kurulanır.

c. Prob denatürasyonu ve Hibridizasyon:

1. Bekleme süresinde proplar ependorfa alınır, 5 dakika 37°C'de etüv içerisinde bekletilir.
2. Çalışmada kullanılan proplar santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanır.
3. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm'lik lamel kapatılır.
4. Lamel çevresi su girmemesi için rubbersement ile yalıtılır.
5. Slayta 5 dakika 75°C'de denatürasyon yapılır.
6. Preparatlar 37 °C'de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılır.
7. Hibridizasyon sonrası solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlandı.

20XSSC Solüsyonu	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
2XSSC/Tween-20 Solüsyonu	

20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml
0,4XSSC Solüsyonu	
20XSSC	4 ml
Distile su	196 ml
*Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

d. Hibridizasyon sonrası yıkamalar:

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA' sının ortamdaki uzaklaştırılması ve olgu DNA' sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Yıkamaların hepsi karanlık alanda yapılmıştır.

1. Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar ertesi sabah (yaklaşık 16-17 saat sonra) etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenir.
2. Lameller preparatlardan dikkatlice uzaklaştırılır.
3. Preparatlar 0.4XSSC solüsyonu ile 72 °C' de 2 dakika yıkanmıştır.
4. Sonrasında 2XSSC/Tween–20 solüsyonunda 30 saniye yıkanmıştır.
5. Preparatların üzerine 10µl DAPI eklenerek lamel ile kapatılmıştır.
6. Analiz için preparatlar saklama kabına kaldırıldı ve 4°C'de saklanmıştır.

e. Preparatların mikroskopta incelenmesi:

Preparatlar Olympus BX-51 Floresan mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Metasystem Imaging) ile sinyaller değerlendirilerek kamera aracılığıyla FISH sinyalleri içeren nükleuslar analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır.

f. Değerlendirme:

KHDAK tanısı almış her hastaya yapılan FISH analizinde her prob için 50 hücre değerlendirilmiştir. Her hücre için hedef gene ve bu genin lokalize olduğu kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Değerlendirme sonucunda olgular, FISH pozitif ve FISH negatif olarak 2 gruba ayrılmıştır. Hücrelerin %40 ve daha fazlasında ≥ 4 kopya bulunması durumuna ya da gen amplifikasyonun ($\%10 \geq$ hücrede, gen kopya sayısı ≥ 15 ise ya da gen/kromozom oranı ≥ 2) saptandığı durumlardan birine sahip olgular 'FISH pozitif'

olarak değerlendirilmiştir. Tüm hücrelerin %40 ve daha fazlasında ≤ 4 kopya bulunması durumunda ise olgular 'FISH negatif' olarak değerlendirilmiştir.

3.1.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi

a. Reaktif Hazırlama:

1. Proteinaz K(PK) içerisine 4,5ml steril, Nuclease-Free Water(PCR grade) eklenerek, 5-10 defa alt üst edilerek sulandırılır. 450 μ l'ler halinde Proteinaz K(PK) 1,5 ml'lik ependorflara alikodlanır. Hazırlanan karışım -20°C'de muhafaza edilir.

2. İzolasyon işlemine başlamadan önce tüm kullanılacak solüsyonlar oda sıcaklığına getirilir.

3. DNA Wash Buffer I(WBI) üzerine 15ml absolut etanol ilave edilir. Üzerine tarih yazılır ve 15 ile 30°C arasında muhafaza edilir.

4. DNA Wash Buffer II(WBII) üzerine 50ml absolut etanol ilave edilir. Üzerine tarih yazılır

ve 15 ile 30°C arasında muhafaza edilir.

b. Genel deparafinizasyon:

1. Parafinli dokudan 5 μ m ' lik kesitler alınmıştır ve ependorf tüpü içerisine konulmuştur

2. Kesit bulunan ependorf tüpüne 500 μ l ksilol eklenir.

3. Ksilol eklenen ependorf tüp 30 saniye vortekslenir.

4. 15°C ile 30°C arasında 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

5. 500 μ l absolut etanol ilave edilip, 10 saniye vortekslenir.

6. 15 ile 30°C arasında 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

7. 16,000xg'de 2 dakika santrifüj edilir. Pelleti kaldırmadan dikkatlice supernatant atılır.

8. 1000 μ l absolut etanol ilave edilip, 10 saniye vortekslenir.

9. 16,000xg'de 2 dakika santrifüj edilir. Pelleti kaldırmadan dikkatlice supernatant atılır.

10. Doku pelletini bulunduran tüp, kapağı açık bir şekilde, önceden 56° C'ye ısıtılmış ısıtıcı blokta 10 dakika inkübe edilir.

11. Doku pelleti üzerine 180 μ l DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) ilave edilir.

12. 70 μ l Proteinaz K(PK) ilave edilip 30 saniye vortexlenir ve 20,000 xg'de santrifüj edilir.

c. DNA İzolasyon Protokolü:

1. Negatif kontrol hazırlanır. 180 μ l DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB)+ 70 μ l Proteinaz K(PK)

2. DNA TLB/PK karışımı içeren tüp 30 saniye vortekslenir.

3. Tüp önceden 56° C'ye ısıtılmış ısıtıcı blokta 60 dakika inkübe edilir.

4. Isıtıcı bloktan alınan tüp 10 saniye vortekslenir.
5. Tüp önceden 90° C'ye ısıtılmış ısıtıcı blokta 60 dakika inkübe edilir.
6. Isıtıcı bloktan alınan tüplerin oda sıcaklığına gelmesi beklenir.
7. Oda sıcaklığına gelen tüpe 200 µl DNA PBB eklenir karışması için 3 kere pipetlenir.
8. Tüp oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
9. Karışıma 100 µl izopropanol eklenir ve karışması için 3 kere pipetlenir.
10. Elde edilen karışım önceden hazırlanan FT/CT(FilterTube/Collection Tube) ünitesine aktarılır.
11. FT/CT ünitesi 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
12. FT yeni CT ünitesine aktarılır.
13. 500 µl WB I tüm FT ünitelerine eklenir.
14. FT/CT ünitesi 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
15. 500 µl WB II tüm FT ünitelerine eklenir.
16. FT/CT ünitesi 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
17. FT yeni CT ünitesine aktarılır.
18. FT/CT ünitesi 16,000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
19. FT ünitesi 1.5mLependorf tüpüne aktarılır.
20. FT membranının ortasına, membrana değmeden 100 µl DNA EB eklenir.
21. FT ünitesi 15 ile 30°C arasında 5 dakika inkübe edilir.
22. FT ünitesi 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
23. 1.5 mLependorf tüpünde toplanan DNA miktarı 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçülür.



Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

d. Numuneye ait DNA seyreltme hesaplaması:

DNA stok konsantrasyonları 2 ng / ml ile 36ng / uL için seyreltme hesaplama

1. Her numune için, gerekli DNA stok hacmi (mcL) hesaplamak:

$$\mu\text{L of DNA stock} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{DNA Stockconcentration [ng}/\mu\text{L}]$$

2. Her numune için, gerekli (DNA SpecimenDiluent)(DNA SD) hacmi (mcL) hesaplamak:

$$\mu\text{L of DNA SD} = 90 \mu\text{L} - \mu\text{L of DNA Stock}$$

Örnek: DNA stockconcentration = 6.5ng/ μL

A. $\mu\text{L of DNA Stock} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 6.5\text{ng}/\mu\text{L} = 27.7 \mu\text{L}$

B. $\mu\text{L of DNA SD} = (90 \mu\text{L} - 27.7\mu\text{L}) = 62.3 \mu\text{L}$

DNA Stok Konsantrasyonları > 36 ng / ml için seyreltme hesaplama

Her örnek için, 2 ng / μL DNA Stokta 5 μL sulandırmak için gerekli DNA SD hacmi (μL) hesaplamak:

$$\text{Vol. } 5 \text{ uL} - \text{uL} = (\text{ng} / \text{ml}) / 2 \text{ ng} / \text{ml DNA stok} \times \text{DNA stok konsantrasyonunun (5 uL) gerekli DNA SD}$$

e. MMX-1,MMX-2,MMX-3 Hazırlama

1. EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3,ve MGAC çalışma öncesi 2 ile 8°C'ye getirilir.

2. Kullanılacak kimyasallar 5 saniye vortexlenir. Mix'ler için steril microsantrifüj tüpleri hazırlanır.

3. Aşağıda belirtildiği gibi Mix'ler hazırlanır.

Örnek; 3 hasta için Mix hazırlanması

EGFR MMX-1=120 μL +30 μL (MGAC)

EGFR MMX-2=120 μL +30 μL (MGAC)

EGFR MMX-3=120 μL +30 μL (MGAC)

NEGATİF KONTROL=45 μL (DNA SD)+ 45 μL (DNA)

		# of Specimens*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 μL	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 μL	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Total Vol. for Each Working MMX (μL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

f. Plaka Hazırlanması

Row / Column	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MUT MMX-1	MUT MMX-2	MUT MMX-3	S7 MMX-1	S7 MMX-2	S7 MMX-3	S15 MMX-1	S15 MMX-2	S15 MMX-3	S23 MMX-1	S23 MMX-2	S23 MMX-3
B	NEG MMX-1	NEG MMX-2	NEG MMX-3	S8 MMX-1	S8 MMX-2	S8 MMX-3	S16 MMX-1	S16 MMX-2	S16 MMX-3	S24 MMX-1	S24 MMX-2	S24 MMX-3
C	S1 MMX-1	S1 MMX-2	S1 MMX-3	S9 MMX-1	S9 MMX-2	S9 MMX-3	S17 MMX-1	S17 MMX-2	S17 MMX-3	S25 MMX-1	S25 MMX-2	S25 MMX-3
D	S2 MMX-1	S2 MMX-2	S2 MMX-3	S10 MMX-1	S10 MMX-2	S10 MMX-3	S18 MMX-1	S18 MMX-2	S18 MMX-3	S26 MMX-1	S26 MMX-2	S26 MMX-3
E	S3 MMX-1	S3 MMX-2	S3 MMX-3	S11 MMX-1	S11 MMX-2	S11 MMX-3	S19 MMX-1	S19 MMX-2	S19 MMX-3	S27 MMX-1	S27 MMX-2	S27 MMX-3
F	S4 MMX-1	S4 MMX-2	S4 MMX-3	S12 MMX-1	S12 MMX-2	S12 MMX-3	S20 MMX-1	S20 MMX-2	S20 MMX-3	S28 MMX-1	S28 MMX-2	S28 MMX-3
G	S5 MMX-1	S5 MMX-2	S5 MMX-3	S13 MMX-1	S13 MMX-2	S13 MMX-3	S21 MMX-1	S21 MMX-2	S21 MMX-3	S29 MMX-1	S29 MMX-2	S29 MMX-3
H	S6 MMX-1	S6 MMX-2	S6 MMX-3	S14 MMX-1	S14 MMX-2	S14 MMX-3	S22 MMX-1	S22 MMX-2	S22 MMX-3	S30 MMX-1	S30 MMX-2	S30 MMX-3

NEG = Negative Control, MUT = Mutant Control, S# = sample ID, and MMX-# correspondsto Master MixReagent 1, 2, or 3.

Negatif kontrol(NC),Mutant kontrol(MK) ve MIX'ler belirtildiği gibi plakadaki kuyucuklara (25 µL) dağıtılır. Plaka hazırlandığında 1 saat içerisinde cihaza yüklenmelidir.

Tüm çalışma ve örnek doğrulama Cobas ® 480 yazılımı tarafından gerçekleştirilir.

g. EGFR Mutasyon Testi ® Cobas Sonucu Yorumlama

Test Result	Mutation Result	Interpretation
Mutation Detected	Exon 19 Deletion S768I L858R T790M G719X (G719A, G719C, G719S) Exon 20 Insertion (More than one mutation may be present)	Mutation detected in specified targeted EGFR region.
Mutation Not Detected*	N/A	Mutation not detected in targeted EGFR regions
Invalid	N/A	Specimen result is invalid. Repeat the testing of specimens with invalid results following the instructions outlined in the "Retesting of Specimens with Invalid Results" section below.
Failed	N/A	Failed run due to hardware or software failure. Contact your local Roche office for technical assistance

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılan malzemeler

Çizelge 3.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılan malzemeler

Kullanılan Gereçler	Cam Malzeme	Kimyasal Maddeler
Buzdolabı	Beher (500 ml, 1000ml)	EGFR Amplificationprobe LPS 003(7p11.2)CytocellAquariusPathologyProbes
Sensys kamera	Lamel	Absolüt Alkol Merck
Deep-Freeze	Mezür	DAPI Cytocell
Elektronik terazi	Yatay ve dikey Şale	Distile Su
Etüv		Tween 20
Floresan mikroskop Olympus BX-51		RubberCement
Image Analyser Applied Imaging		Parafilm
Su banyosu		Pepsin
Mikropipet Eppendorf		HC1 Merck
Mikrosantrifüj		İmmersiyon yağı Merck
Termometre		KsilolMerck
Cam kalemi		Na3C6H5O7.2H2O
Eppendorf Centrifuge 5415		NaCl Merck
pH Metre		NaOHMerck
Pipet uçları		
Eppendorf tüpü (1,5 ml lik)		
Kronometre		
Enjektör		

3.2.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi kullanılan malzemeler

Çizelge 3.2. Real time PCR Yöntemi ile EGFR Mutasyon Analizi kullanılan malzemeler

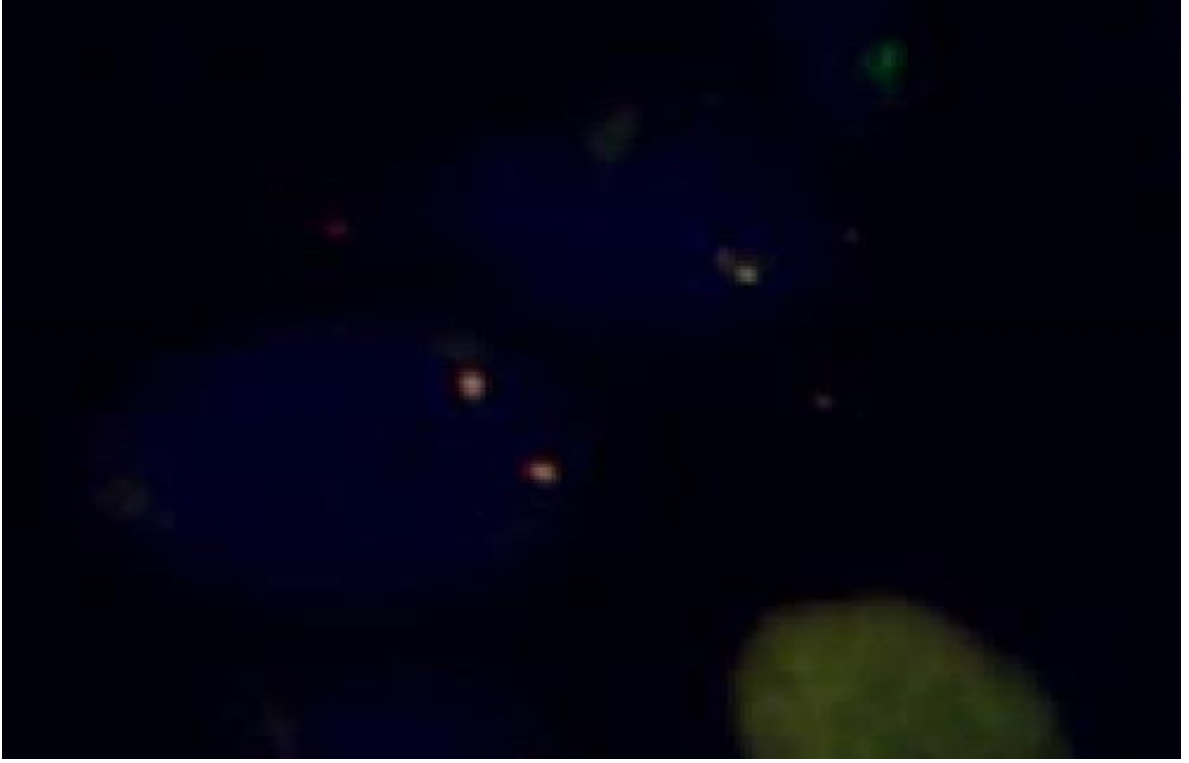
Kullanılan Gereçler	Kimyasal Maddeler
cobas z 480 analyzer	RocheCobas DNA SamplePreparation Kit
cobas® 4800 SR2 System Control Unitwith	DNA TLB 1 x 10 MI (DNA TissueLysisBuffer);
Printer HP P2055d	PK 1 x 100 mg(Proteinase K)Proteinase K
Barcode Reader ext USB	DNA PBB 1 x 10 mL (DNA ParaffinBindingBuffer)
EGFR Analysis Package Software version1.0	WB I 1 x 25 mL (DNA WashBuffer I)
cobas® 4800 SR2 System Software version2.0	WB II 1 x 12.5mL(DNA WashBuffer II)
OSXP image	DNA EB 1 x 6 mL (DNA ElutionBuffer)
cobas® 4800 SealingFoilApplicator	Nuclease-Freewater
cobas® 4800 SystemMicrowellPlate (AD-Plate) andSealingFoil	cobas® EGFR Mutation Test
Sterilpipet: 5 ve 25 mL	EGFR MMX-1 2 x 0.4mL
Derin dondurucu (-20°C Arçelik)	EGFR MMX-2 2 x 0.4mL
Microcentrifuge tüp rakı	EGFR MMX-3 2 x 0.4mL
Vorteks	MGAC 6 x 0.2MI (Magnesiumacetate)
Nanodrop UV-VisSpectrophotometer	EGFR MC 6 x 0.1mL(EGFR Mutant Control)
Magnetik Isıtıcı Blok	DNA SD 2 x 3.5mL(DNA SpecimenDiluent)
Otomatik pipet (2. 5, 10, 100, 1000 µL)	Ksilol
	Absolit etanol
	Isopropanol

4. BULGULAR

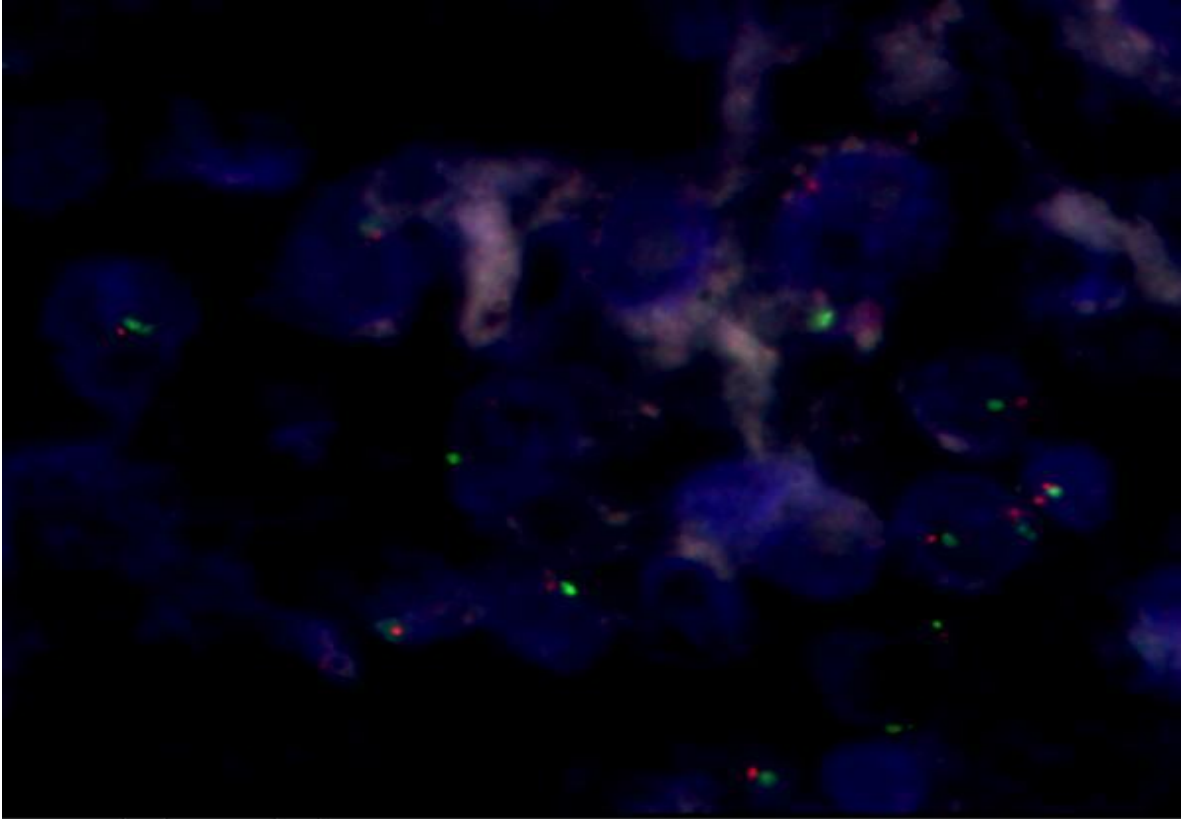
Çalışmamız, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli dışı akciğer kanseri” tanısı almış, cinsiyet farkı gözetmeksizin, 50 hastaya ait tümör dokusu içeren formalin fiske-parafine gömülü 5'er mikronluk doku örneklerine ait kesitler kullanılmıştır. Real-Time PCR ve FISH yöntemleri kullanılarak incelemeye alınan tümör dokularına sahip olguların 7'si kadın, 43'ü erkek olup, yaş aralıkları 52-75 olarak saptanmıştır. FISH analizi ile değerlendirilen 50 olgunun 4'ünün de EGFR gen bölgesi için amplifikasyon pozitif sonucu tespit edilmiştir. Yüzde olarak ifade edildiğinde çalışılan olgularda EGFR gen bölgesi için de % 8.5 amplifikasyon saptanmıştır. Analiz edilen 50 olgunun 3'ünden sonuç alınamamıştır. Olguların bir kısmı sigara kullanıcısı olmakla birlikte ailede kanser öyküsü bulunan olgular da mevcut olup bu dağılımlar çizelgede ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerinin ulaşılamadığı hastalar çizelgede belirtilmemiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma olgularının FISH yöntemiyle belirlenen EGFR amplifikasyonlarının, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımları

EGFR FISH	CİNSİYET		AİLE ÖYKÜSÜ		SİGARA	
	Kadın	Erkek	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Amplifikasyon(FISH pozitif)	-	4	4	-	4	-
Normal	7	36	13	8	20	2
Toplam(n=50)	7	40	17	8	24	2



Şekil 4.1. EGFR geni ve sentromer 7 için normal hücelere sahip bir olgunun FISH görüntüsü (Cep7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal).



Şekil 4.2. Deparafinizasyon başarısızlığı sonucu oluşan görüntü

Real-Time PCR yöntemi ile analiz edilen 50 olgunun 49'undan sonuç alınmıştır. Hasta DNA'ları cobas® EGFR mutasyon test kiti kullanılarak, cobas z 480 analiz sistemi ile ekzon 18, ekzon 19'daki delesyon, ekzon 20, ekzon 21'deki nokta mutasyonlar tespit edilmiştir. İncelenen 50 olgunun 7'sinde (% 14.2)(3 kadın-4 erkek) EGFR geni için ekzon 19'da delesyon, 1'inde (%2)(1kadın) ekzon 21'de nokta mutasyon ve 2'sinde (%4)(2erkek) ekzon 20' de mutasyon saptanmıştır. Ekzon 18 ait mutasyon gözlenmemiştir. Mutasyon analizi yapılan 50 olgunun 49'undan sonuç alınmıştır. Olguların bir kısmı sigara kullanıcısı olmakla birlikte ailede kanser öyküsü bulunan olgular da mevcut olup bu dağılımlar çizelgede ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerinin ulaşılamadığı hastalar çizelgede belirtilmemiştir.

Çizelge 4.2. Çalışma olgularının ekzon 18, ekzon 19'daki delesyon, ekzon 20, ekzon 21'deki nokta mutasyonlarının, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile öyküsü bilgilerine göre dağılımlar

Cobas® EGFR Mutasyon	Cinsiyet		Aile Öyküsü		Sigara	
	Kadın	Erkek	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Ekzon 18	-	-	-	-	-	-
Ekzon 19	3	4	4	-	1	-
Ekzon 20	-	2	-	-	2	-
Ekzon 21	1	-	-	-	1	-
Normal	3	43	13	8	20	2
Toplam(n=50)	7	43	17	8	24	2

Çizelge 4.3. Çalışma olgularına ait EGFR mutasyon analizi sonuçları

Cobas®EGFR Mutasyon	KADIN	ERKEK
Ekzon 18	-	-
Ekzon 19	3	4
Ekzon 20	-	2
Ekzon 21	1	-
Invalid (geçersiz)	-	1
Mutasyon yok	3	36
Toplam(n=50)	7	43

Araştırmamız, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurulu tarafından 3/4 karar numarasıyla kabul edilmiş ve Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından KOU KA EK 2014/46 no'lu proje ile desteklenmiştir.

5. TARTIŞMA

Kanser gelişimi oldukça karmaşık bir dönüşüm sürecidir. Bu dönüşüm sırasında kanser hücreleri bir takım genetik değişimler sergilerler. Bu genetik değişimlerin oluşmasında protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin rolü büyüktür. Bu genetik düzensizliklerden bazıları tümör hücrelerinin davranışını diğerlerine göre daha fazla etkiler ve prognostik belirteçler olarak kullanılabilir. Son yıllarda moleküler biyoloji ve sitogenetik alanlarındaki ilerlemeler prognozu araştırmak için yeni yöntemler ortaya koymuşlardır (Meert et al., 2002).

Mortalitede oldukça önde olan akciğer kanseri için ilk sistematik tedaviye 1970'lerde başlanmıştır ve 5 yıl öncesine kadar da iyileşmede çok büyük bir fark görülmemiştir. 1980'li yıllarda sisplatine dayalı tedaviler devreye girmiştir ve 1990'lara gelindiğinde 3. nesil ajanlar sistematik tedavide sisplatin ile beraber kullanılmıştır. 2000'li yıllara geldiğimizde ise mutasyonu hedefleyen ilaçlar geliştirilmeye başlanmış ve EGFR'nin tanımlanmasıyla Erlotinib geliştirilerek bu mutasyon hedeflenmiş ve bu sayede sağkalım süreleri 2-3 yıla kadar uzadığı bildirilmiştir (<http://www.medikalakademi.com.tr/>).

Son yıllarda hedefe yönelik ajanların kullanıma girmesiyle küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nin medikal tedavisi konvansiyonel tedaviden hedefe yönelik tedavilere doğru bir değişim göstermiştir. Bugüne kadar ileri evre KHDAK tedavisinde hedefe yönelik ajan (gefitinib, erlotinib) randomize çalışmalarda araştırılmıştır. Seçilmemiş hasta gruplarında EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKI) ile %10 dolayında yanıt oranı elde edilmiştir. Bu nedenle bu ajanlardan daha fazla yarar gören hasta grupları araştırılmış ve spesifik alt gruplarda gerek ilk sıra gerekse ikinci sıra tedavilerle daha yüksek yanıt oranı ve sağkalım süreleri elde edilmiştir (Öztop, 2009).

Günümüzde 3 ayrı metod, tümör hücrelerinde EGFR statüsünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunlar; mutasyon analizi, gen kopya sayısının belirlenmesi ve EGFR ekspresyon düzeyidir. Özellikle ekzon 19 delesyonu tirozin kinaz inhibitorlerine duyarlılık ile ilişkilidir. Erlotinib (Tarceva) ve Gefitinib (Iressa) gibi tirozin kinaz inhibitörlerine (TKIs) yanıt verecek KHDAK kanser hastalarının seçilebilmesi için EGFR gen bölgesi amplifikasyonlarının ve anöploidilerinin (polizomi vb.) belirlenmesi önemlidir. Çalışmamızda 50 olguda, cobas z 480 (Roche Molecular Systems, Inc.) analiz sistemi kullanılarak EGFR geninde mutasyon analizi ve FISH yöntemi kullanılarak EGFR amplifikasyonlarının incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda 50 olgunun 4'ünde (%8) FISH yöntemi ile EGFR amplifikasyonu pozitif, 10'nun da (%20) EGFR mutasyonu

saptanmıştır. Literatürde, KHDAK hastalarda EGFR genine yönelik mutasyon ve amplifikasyon çalışmaları mevcuttur. Bunun yanı sıra çalışmalarda belirlenen hasta gruplarında tirozin kinaz inhibitörlerine cevapları değerlendirilerek aralarında ilişki incelenmiştir. Literatürdeki sonuçlar şu şekildedir;

Suzuki ve arkadaşları, 2005 yılında 181 KHOAK hastasında FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %23 oranında EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır. Aynı hasta grubunda %34 oranında EGFR protein ekspresyon artışı tespit etmişler ve her iki sonuç arasında %74 oranında anlamlı ilişki bulmuşlardır (Suzuki,2005).Bizim çalışmamızda amplifikasyon oranımız % 8.5 olarak tespit edilmiştir. Bu oran farkının hasta sayısı ve farklı toplumlarda amplifikasyon oranının değişiklik gösterdiğini düşünmekteyiz.

Cappuzzo ve arkadaşları, 2005 yılında,102 KHOAK hastasında FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada %33 oranında EGFR gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda EGFR amplifikasyonu bulunan hastaların gefitinib tedavisine olumlu sonuç verdikleri tespit edilmiş ve FISH yönteminin bu tedavinin kullanımı öncesinde önemli bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Cappuzzo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada gen amplifikasyonunun daha çok kadın ve sigara içmeyenlerde olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise amplifikasyonların hepsi erkek bireylerde saptanmıştır ve hepsinin sigara kullanımı mevcuttur. Sonuçlardaki farklılığın hasta sayımızın azlığından ve hastalarımızın çoğunluğunun erkek bireylerden oluşmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz (Cappuzzo et al., 2005).

Tsao ve arkadaşları, 2005 yılında 125 KHOAK hastada FISH yöntemi ile yaptıkları çalışmada % 47 EGFR gen amplifikasyonu saptamışlardır ve adenokarsinomlu hastalarda EGFR amplifikasyonun daha yüksek oranda bulunduğunu bildirilmişlerdir. Tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinibe, amplifikasyonu olan hastaların daha iyi yanıt verdiklerini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da adenokarsinomlu hastalarda amplifikasyon bulunmuştur. Hastaların hedefe yönelik tedavilerine verecekleri yanıt takip edilecektir (Tsao et al., 2005).

Al-Kuraya ve arkadaşları, 2006 yılında, 47 KHDAK hastada, FISH yöntemiyle yaptıkları çalışmada %15 oranında gen amplifikasyonu saptamışlardır. Aynı hasta grubunda DNA dizi analizi yöntemi ile EGFR ekzon 18 ve ekzon 21 mutasyonu araştırmışlar ve %3 mutasyon pozitif saptamışlardır. EGFR mutasyonlarının Suudi Arabistan toplumunda görülme sıklığının düşük olduğu sonucuna varmışlar. EGFR inhibitörlerine cevabı belirlemede mutasyon ve amplifikasyon sayısındaki değişikliklere yönelik çalışmalara yönelinmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Al-Kuraya et al.,

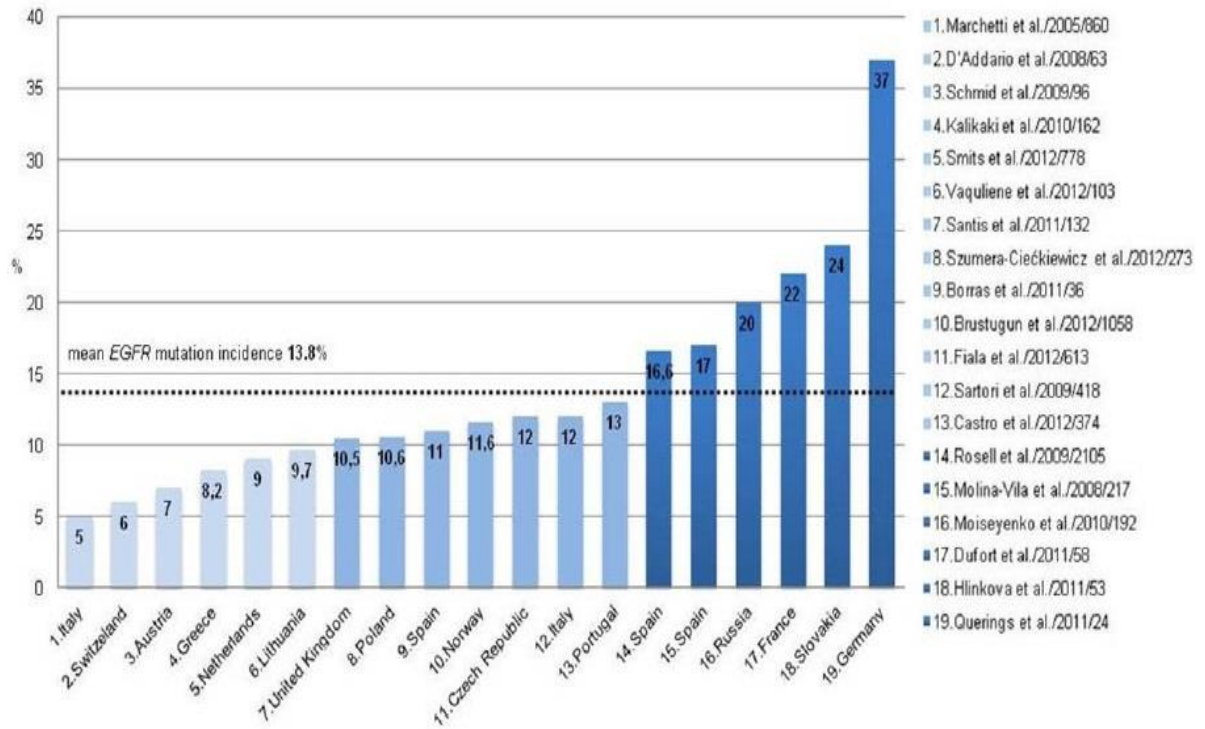
2006).Çalışmamızda, real-time PCR yöntemiyle ekzon 18-21 mutasyon analizi sonucunda % 20.4 mutasyon pozitif tespit ettik ve bu mutasyonların Türk toplumunda görülme sıklığının oldukça yüksek olduğunu düşünmekteyiz.

Takano ve arkadaşları, 2005 yılında, KHDAK lı hastalarda EGFR amplifikasyonu ve EGFR gen mutasyonlarını incelemişlerdir. Bu araştırmaları Japon toplumunda gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, olguların %44 ünde gen amplifikasyonu,%59 unda mutasyon tespit etmişlerdir. Mutasyon analizinde dizi analiz yöntemini, amplifikasyon tespiti içinde K-PZR yöntemini kullanmışlardır. Gefitinip tedavisi için önemli bir belirteç olan mutasyon ve amplikasyon analizleri sonuçlarına göre bu tedavinin daha iyi bir prognoz sergilediğini belirtmişlerdir (Takano et al., 2005). Ahn ve arkadaşlarıda, 2008 yılında KHDAK li Koreli hastalarda erlotinip ilacına karşı klinik progresyonu etkileyen moleküler prediktörleri araştırmışlardır. EGFR gen mutasyonları dizi analizi ile EGFR gen amplifikasyonları K-PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Mutasyon oranları %28, amplifikasyon oranları %41 bulunmuştur. Bunlardan erlotinip ile tedavi edilen Koreli hastalarda EGFR gen mutasyonlarının klinik progresyonu belirlemede en iyi parametre olduğu görülmüştür. Ayrıca araştırmacılar farklı etnik gruplarda bu moleküler markırların etkisinin araştırılmasını önermişlerdir (Ahn et al., 2008).Bizde çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre hedefe yönelik tedavide moleküler faktörlerin tespitinin önemli olduğunu belirtmek isteriz. Türk toplumunda moleküler belirteçlerinin etkisinin araştırılması için hasta sayısının artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Liang ve arkadaşları, 2010 yılında,133 KHDAK'li tanıli hasta grubunda EGFR gen amplifikasyonu, EGFR gen mutasyonu ve EGFR gen ekspresyonunu araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada bulunan hasta grubu Çin toplumunda gerçekleştirilmiştir. FISH yöntemiyle %42.1 oranında EGFR gen amplifikasyonu, İHK yöntemiyle %68.4 gen ekspresyonu ve %63.9 scorpion amplifikasyon mutasyon analizi yöntemiyle EGFR gen mutasyonu tespit etmişlerdir. EGFR gen amplifikasyonu, EGFR gen mutasyonu ve EGFR gen ekspresyonunun birbirleriyle yakından ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Hastanın hedefe yönelik tedavisi için standart yöntem ve kriterlerin araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir (Liang et al., 2010).

Ciećkiewicz ve arkadaşları, 2013 yılında, 273 KHDAK'li tanıli hasta grubunda EGFR gen amplifikasyonu, EGFR gen mutasyonu analizini araştırmışlardır. Polonyalı toplumunda yapılan ilk EGFR mutasyon insidansı çalışmasıdır. Yaptıkları çalışmada %10.62 oranında ekzon18-21 mutasyonu ve %30 oranında FISH yöntemiyle EGFR

geninde amplifikasyon tespit etmişlerdir.



Şekil 5.1. Avrupa ülkeleri - KHDAK EGFR gen mutasyonlarının sıklığının [listed: first author/year of publication/number of tested cases; based on literature review].

Çalışmalarında hazırladıkları şekilden de anlaşılacağı üzere etnik farklılıkların, akciğer kanseri insidansı ve prognozunda önemli bir rolünün olduğunu düşünmektedirler. (Ciećkiewicz et al., 2013). Bizde yapılan bu çalışma sonuçları ile çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında farklı toplumlarda akciğer kanseri insidansının değişiklik gösterdiğini belirtmek isteriz.

Çizelge 5.1. Bazı avrupa ülkelerindeki EGFR mutasyon yüzdeleri

Araştırmacı İsmi	Yıl	Populasyon	Sayı	EGFR Mutasyon Analiz Metodu	EGFR Mutasyon %
Schuurbiers	2010	Hollanda	35	Direk sekanslama	7.4
Garcia-Olive	2010	İspanya	51	RT-PCR	8.57
Lozano	2011	İspanya	120	Direk sekanslama	17
van Eijk	2011	Hollanda	43	Allele-özgü QPCR	2.3
Bozzetti	2012	İtalya	39	Direk sekanslama	23
Smits	2012	Hollanda	34	HRMA-high resolution melting analysis	9.1
Ulivi	2012	İtalya	25	Pyrosequencing+	12
Brustugun	2012	Norveç	80	Direk sekanslama	11.3
Bizim Çalışmamız	2014	Türkiye (Kocaeli bölgesi)	49	RT-PCR	20.4

Çalışmamızda, 50 olgumuzun 47'sinde FISH yöntemi ile EGFR amplifikasyonu analizi ve 50 olgumuzun (aynı hastalar) 49'unda Real-time PCR yöntemiyle EGFR mutasyon analizi yaptık. Yaptığımız çalışmada, 4 olguda (%8.5) oranında EGFR gen amplifikasyonu pozitif, 10 olguda (%20.4) oranında EGFR mutasyonu saptanmıştır. EGFR mutasyonlarının 7'si ekzon 19'da (3 kadın, 4 erkek), 2'si ekzon 20'de (2 erkek) ve 1'i ekzon 21'de (1 kadın) olarak saptanmıştır. FISH yöntemiyle analiz edemediğimiz 3 olgumuzun deparafinizasyon işleminde yaşadığımız sorunlardan kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Deparafinizasyon işlemi FISH yönteminin uygulanmasında en önemli basamaktır ve tekniğin uygulanmasından daha zordur. Literatürde EGFR gen amplifikasyonu çok farklı oranlarda (%8.6-%47) belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz % 8.5 oranı literatüre yakın olduğu düşünülmektedir. Hasta sayımızın düşük olmasının oranı etkilediğini düşünmekteyiz. Çizelge 5.1' de belirtildiği üzere EGFR gen mutasyonu oranları da (%2.3-%23) belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz % 20.4 oranı literatürdeki oranlar arasında olduğu için literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Aynı hasta grubuna yaptığımız Real-Time PCR ve FISH yöntemleri analiz sonuçlarına göre 4 hastamızda, EGFR mutasyonu negatif olan hastalarda EGFR amplifikasyonu pozitif bulunmuştur. Bu bulgunun hedefe yönelik tedavi için önemli bir moleküler sonuç olduğunu ve her iki

moleküler testinde araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Literatürde kadın, sigara içmeyen bireylerde mutasyon ve amplifikasyonun sıklıkla çıktığı belirtilmiştir. Çalışmamızda, EGFR amplifikasyon ve EGFR mutasyon analizi ile cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki saptanamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı almış 50 hasta yer almıştır. 50 olgumuzun 47'sinde FISH yöntemi ile EGFR amplifikasyonu analizi ve 50 olgumuzun (aynı hastalar) 49'unda Real-time PCR yöntemiyle EGFR mutasyon analizi yaptık. Yaptığımız çalışmada, %8.5 oranında EGFR gen amplifikasyonu pozitif, %20.4 oranında EGFR mutasyonu saptadık. EGFR mutasyonlarının 7'si ekzon 19'da (3 kadın, 4 erkek), 2'si ekzon 20'de (2 erkek) ve 1'i ekzon 21'de (1 kadın) olarak saptanmıştır. FISH yöntemiyle analiz edemediğimiz 3 olgumuzun deparafinizasyon işleminde yaşadığımız sorunlardan kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda karşılaştığımız sorunlar sonucunda, dokunun büyüklüğü, tümörün özelliği, tümörün miktarının, uygun DNA elde edebilmek ve FISH yöntemini sorunsuz uygulayabilmek için uygun fiksasyon ve doku takibinin oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz. Akciğer kanseri tedavisinde artık sitotoksik kemoterapinin verildiği tedavilerden hedefe ve bireye yönelik tedaviler devreye girmektedir. Yapılan çalışmalarda hedefe yönelik tedavide moleküler faktörlerin ve testlerin oldukça önem kazanması gerektiği vurgulanmıştır. Aynı zamanda bu tedavi ile hasta sağkalım sürelerinin oldukça uzadığı belirtilmiştir. Bu önemli bir gelişme sonrasında KHDAK' da klinik açıdan oldukça önemli olan EGFR onkogenine ilgi oldukça artmıştır. Ve EGFR onkogenin amplifikasyon ve mutasyon analizine yönelik çalışmalarda hız kazanmıştır. EGFR TK yolağını inhibe eden ajanların geliştirilmesi yönünde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin (erlotinib veya gefitinib) kullanılması veya kullanılmaması kararının, klinik ve moleküler prediktif faktörlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu ajanlara yanıtı predikte ettiren moleküler faktörler ise EGFR reseptöründe mutasyonun aktifleşmesi (ekzon 19 delesyonu, ekzon 21'de L858R), EGFR protein overekspresyonu ve EGFR gen amplifikasyonu olduğu ve en önemli prediktif faktörün EGFR mutasyonu olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak bu iki yöntemin kullanılmasıyla elde edilen bilgilerin küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavide bir gösterge olduğunu düşünmekteyiz. EGFR gibi mutasyon özelliklerinin ortaya konabilmesi artık KHDAK tedavisindeki stratejiyi etkilediğini düşünmekteyiz. Testlerden elde edilen başarının multidisipliner bir ekip çalışması ile yapılabileceğini vurgulamak isteriz. Yeterli doku alınması, tümör yükünün belirlenmesi, dokuların kısa sürede ulaşması, doğru ve kısa sürede analiz edilmesinin önemli olduğunu belirtmek isteriz. Çalışmamıza, hastaların sağ kalımları, tedavi protokolleri, hastalığın prognozu gibi verilerin eklenmesiyle ve hasta sayılarının artırılmasıyla genişletilmesinin gerektiği

düşüncesindeyiz. Elde edilen verilerin Türk popülasyonun da KHDAK'li hastalar ile ilgili gelecek çalışmalara faydalı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Ahn, MJ., Park, BB., Ahn, JS et al.(2008) Are there any ethnic differences in molecular predictors of erlotinib efficacy in advanced non-small cell lung cancer?. Clin Cancer Res, 14:3860-6

Al-Kuraya, K., Siraj, AK., Bavi, P., et al. (2006) High epidermal growth factor receptor amplification rate but low mutation frequency in Middle East lung cancer population. Hum Pathol ;37:453-7

Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, Peter; (2002), Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition.

Artan, S. (1996), FISH tekniğinde kullanılan probalar ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 14-25s

Artan, S. (1996), FISH tekniğinde hibridizasyon koşulları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran,N.; Etam, Eskişehir, 34-39s

Bozzetti, C., Tiseo, M., Lagrasta, C., Nizzoli, R., Guazzi, A., Graiani, G., Rindi, G., Ardizzoni, A.(2010) Is cytology reliable for epidermal growth factor receptor gene evaluation in non small cell lung cancer? J ThoracOncology, 5: 551-553

Brustugun, O.T., Helland, A., Fjellbirkeland, L., Kleinberg, L., Ariansen, S., Jebsen, P., Scott, H., Donem, T., Bremnes, R., Berg, T., Gronberg, B.H., Dai, H.Y., Wahl, S.G., Mangseth, K., Helgeland, L.,(2012) Mutation testing for non-small-cell lung cancer. TidsskrNorLaegeforen,132: 952-955

Bozzetti, C., Tiseo, M., Lagrasta, C., Nizzoli, R., Guazzi, A., Leonardi, F., Gasparro, D., Spiritelli, E., Rusca, M., Carbognani, P., Majori, M., Franciosi, V., Rindi, G., Ardizzoni, A. (2008), Comparison Between Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene Expression in Primary Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) and in Fine-Needle Aspirates from Distant Metastatic Sites, J Thorac Oncol.,3: 18–22

Bonanno, L., Schiavon, M., Gnardo, G., Bertorelle, R., Bonaldi, L., Galligioni, A., Indraccolo, S., Pasello, Rea, F.G., Favaretto, A. (2010), Prognostic And Predictive Implications Of EGFR Mutations, EGFR Copy Number And KRAS Mutations In Advanced Stage Lung Adenocarcinoma, *Anti cancer Research* 30: 5121-5128

Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G., L., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., Franklin, W., A., Crino, L., Gazdar, A., D., Bunn, Jr., P., A., Hirsch, F., R. (2005) Increased her2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor–positive non–small-cell lung cancer patients, *Journal Of Clinical Oncology*, 23, 5007-5018p

Cooper, G.M., Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2006) *Hücre Moleküler Yaklaşım*, Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi

Cappuzzo, F.(2008), EGFR FISH versus mutation: Different tests, different end-points, *Lung Cancer*, 60, 160-165

Davies, R.L., Grosse, V.A., Kucherlapati, R., Bothwell, M. Genetic Analysis Of Epidermal Growth Factor Action: Assignment Of Human Epidermal Growth Factor Receptor Gene To Chromosome 7, *Binding Assay/Cell Hybrids/Chromosome Analysis*

Daniele, L., Cassoni, P., Bacillo, E., Cappia, S., Righi, L., Volante, M., Tondat, F., Inghirami, G., Sapino, A., Scagliotti, G., Papotti, M., Novello, S.(2009), Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Primary Tumor and Metastatic Sites from Non-small Cell Lung Cancer, *J Thorac Oncol*. 4: 684–688

Davies, R.L., Grosse, V.A., Kucherlapati, R., Bothwell, M.(1980), Genetic analysis of epidermal growth factor action: Assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, No. 7, pp. 4188-4192

Dacic, S., Flanagan, M., Ciepły, K., Ramalingam, S., Luketich, J., Belani, C., Yousem, S.A.(2006), Significance of EGFR Protein Expression and Gene Amplification in Non–Small Cell Lung Carcinoma, *Am J Clin Pathol* ,125:860-865

Garcia-Olive, I., Monso, E., Andreo, F., Sanz-Santos, J., Taron, M., Molina-Vila, M.A., Llatjos, M., Castella, E., Moran, T., Bertran-Alamillo, J., Mayo-de-Las-Casas, C., Queralt, C., Rosell, R.(2009) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for identifying EGFR mutations. *EurRespir*, 35: 391-395

Geoffey, M., C., Hausman, E., R.(2006), *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, pp.592-640, İzmir

Grenle, R., T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P., A., 2000, Cancer statistics (2000), *CA, Cancer J.Clin.*, 50, 7-33 p

Goustin, A., S., Leof, E., B., Shipley, G., D., Moses, H., K., (1986), Growth factors and cancer, *Cancer Research*, 46: 4015-1029, 14 p

Hirsh, F., R., Varrella-Garcia, M., McCoy, J., West, H., Xavier, A., C., Gumerlock, P., Bunn, J., P., A., Franklin, W., A., Gandara, D., R. (2005) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefinitib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a southwest oncology group study, *Journal of Clinical Oncology*, 23, 28, 6838-6845p

Hu, Y., Zhang , O., Huang, Y., Liu, Y., Chen H. (2014), Comparison of Two Methods to Extract DNA from Formalin- Fixed, Paraffin-Embedded Tissues and their Impact on EGFR Mutation Detection in Non-small Cell Lung Carcinoma, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (6), 2733-2737

Janina, K., Anna-Maria, T., Pal, K., Nora, U., Aniko, K., Gaor, L., Zsuzsa, S. (2006), Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time pcr- a comparison with immunohistochemical and fish results, *Pathology Oncology Research*, 12:197-204

Kant Shukla, R., Kant, S., Mittal, B., Bhattacharya, S.(2013) Comparative Study Of GST Polymorphism In Relation To Age In COPD And Lung Cancer. *Tuberk Toraks*, 61(4): 275-282

Kızılbey, K., Akdeste Mustafaeva, Z.(2013) Melanoma Cancer. Sigma 31,555-569

Kirişoğlu, C.E., Öztürk, C., Köktürk, N. (2003), Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri, Solunum, 5:146-152, 6 s.

Krause, D.S.,Van Etten, R.A. (2005), Tyrosine Kinases as Target for Cancer Therapy, The New England Journal of Medicine, 353: 172-87, 15

Kumar, V.,Cotran, R.S., Robbins, S.L.(2003) Robbins Temel Patoloji, Nobel Tıp Kitabevi, pp172-195, İstanbul

Liang, Z., Zhang,J., Zeng,X., Gao,J., Wu,S., Liu,T.(2010), Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas

Lozano, M.D., Zulueta, J.J., Echeveste, J.I., Gurrpide, A., Seijo, L.M., Martin-Algarra, S., Del Barrio, A., Pio, R., Idoate, M.A., Labiano, T., Perez-Gracia, J.L.(2011) Assessment of epidermal growth factor receptorand K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small celllung cancer patients: correlation with clinical out comes. Oncologist, 16: 877-885

Li, Y.H., Wang, F., Shen, L., et al.(2011), *EGFR* Fluorescence *In situ* Hybridization Pattern of Chromosome 7 Disomy Predicts Resistance to Cetuximab in KRAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer Patients, Clin Cancer Res ,17:382-390

Liang, Z., Zhang, J., Zeng, X., Gao, J., Wu, S., Liu, T.(2010), Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas, BMC Cancer , 10:376

Lopez-Rios, F., Angulo, B., Gomez, B., Mair, D., Martinez, R., Conde, E., Shieh,3 F., Tsai, J., Vaks, J., Current, R., Lawrence, H.J., Gonzalez de Castro, D.(2012), Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer, J Clin Pathol, 66:381-385

Meert, AP., Martin, B., Delmotte, P.(2002) The role of EGFR expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. Eur Respir J, 20:975-81

Miller, V.A., Riely, G.J., Zakowski, M.F., Li, A.R., Patel, J.D., Heelan, R.T., Kris, M.G., Sandler, A.B., Carbone, D.P., Tsao, A., Herbst, R.S., Heller, G., Ladanyi, M., Pao, W., Johnson, D.H.(2008), Molecular Characteristics of Bronchioloalveolar Carcinoma and Adenocarcinoma, Bronchioloalveolar Carcinoma Subtype, Predict Response to Erlotinib, J Clin Oncol, 26:1472-1478

Nair, P., (2005), Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression, Current Science, 88: 890-898p

Nussbaum, R., L., McInnes, R., R., Willard, H., F., Thompson & Thompson Tibbi Genetik, (2005), Güneş Kitabevi, 312-313p

Öztop, İ.(2009) Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, Number: 3 Cilt/ Volume: 19 Yıl

Ruiz, M.G., Floor, K., Vos, W., Grünberg, K., Meijer, G.A., Rodriguez, J.A., Giaccone, G.(2007), Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number detection in non-small-cell lung cancer; a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization, Histopathology, 51, 631–637.

Szumera-Ciećkiewicz, A., Olszewski, W., Tysarowski, A, Kowalski, D.M., Głogowski, M., Krzakowski, M., Siedlecki, J.A., Wągrodzki, M., Prochorec-Sobieszek, M. (2013) *EGFR* mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: a Polish, single institution study and systematic review of European incidence . Int J Clin Exp Pathol, 6(12):2800-2812

Suzuki, S., Dobashi, Y., Sakurai, H., Nishikawa, K., Hanawa, M., Ooi, A.(2005) Protein Overexpression and Gene Amplification Of Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Carcinomas, American cancer society, 103,1265-1273p

Schuurbiers, O.C., Looijen-Salamon M.G., Ligtenberg M.J., Van Der Heijden HF.(2010) A Brief retrospective report On The feasibility Of Epidermal growth factor receptor and KRAS

Mutation analysis in Transesophageal ultrasound- and endobronchial ultrasound-guided fine needle cytological aspirates. *J Thorac Oncol*, 5(10):1664-7

Smouse, J.H., Cibas, E.S., Janne, P.A., Joshi, V.A., Zou, K.H., Lindeman, N.I. (2009) EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of non-small cell lung cancer. *Cancer*, 117: 67-72

Smits, A.J., Kummer, J.A., Hinrichs, J.W., Herder, G.J., Scheidel-Jacobse, K.C., Jiwa, N.M., Ruijter, T.E., Nooijen, P.T., Looijen-Salamon, M.G., Ligtenberg, M.J., Thunnissen, F.B., Heideman, D.A., De Weger, R.A., Vink, A. (2012) EGFR and KRAS mutations in lung carcinomas in the Dutch population: increased EGFR mutation frequency in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Cell Oncol (Dordr)*, 35: 189-196

Sequist, L.V., Bell, D.W., Lynch, T.J., Hainsworth, D.A. (2007), Molecular Predictors of Response to Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in Non-Small-Cell Lung Cancer, *J Clin Oncol* 25:587-595

Sholl, L.M., Iafrate, A.J., Chou, Y., Wu, M., Goan, Y., Su, L., Huang, Y., Christiani, D.C., Chirieac, L.R. (2007), Validation of chromogenic in situ hybridization for detection of EGFR copy number amplification in non-small cell lung carcinoma, *Modern Pathology*, 20, 1028–1035

Sone, T., Kasahara, K., Kimura, H., Nishio, K., Mizuguchi, M., Nakatsumi, Y., Shibata, K., Waseda, Y., Fujimura, M., Nakao, S. (2007), Comparative Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations and Gene Amplification as Predictors of Gefitinib Efficacy in Japanese Patients With Non-small Cell Lung Cancer, American Cancer Society, DOI 10.1002/cncr.22593

Takano, T., Ohe, Y., Sakamoto, H., et al. (2005) Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 23: 6829-37

Tsao, M.S., Sakurada, A., Cutz, J.C. et al. (2005) Erlotinib in Lung Cancer Molecular and Clinical Predictors of Outcome, *The New England Journal of Medicine*, 353, 133-144p

Ulivi, P., Romagnoli, M., Chiadini, E., Casoni, G.L., Capelli, L., Gurioli, C., Zoli, W., Saragoni, L., Dubini, A., Tesei, A., Amadori, D., Poletti, V.(2012) Assessment of EGFR and K-ras mutations in fixed and fresh specimens from transesophageal ultrasound-guided fine needle aspiration in non-small cell lung cancer patients. *Int J Oncol*, 41: 147-152

Uramoto, H., Mitsudomi, T.(2007), Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer? *British Journal of Cancer*, 96, 857 – 863

Vert, V., Kenneth, W. K. (2004), Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10:789-799, 10p

VanEijk, R., Licht, J., Schrupf, M., TalebianYazdi, M., Ruano, D., Forte, G.I., Nederlof, P.M., Veselic, M., Rabe, K.F., Annema, J.T., Smit, V., Morreau, H., VanWezel, T.(2011) Rapid KRAS, EGFR, BRAF and PIK3CA mutation analysis of fine needle aspirates from non-small-cell lung cancer using allele-specific qPCR. *PLoSOne*, 6: 17791.

Yılmaz, E., Ozalevli, S., Ersoz, H., Yeğin, A., Önen, S., Akkoçlu, A.(2013) Comparison Of Health-Related Quality Of Life And Exercise Capacity According To Stages In Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Tuberk Toraks*, 61(2): 131-139

Walker, A. Rosemary, (1998), The erbB/HER Type 1 Tyrosine Kinase Receptor Family, *Journal of Pathology* 185, 234-235p.

William, S., K., Cummings, M., R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p.

<http://www.medikalakademi.com.tr/>

<http://www.who.int/cancer/en/> ,WHO “ World Cancer Report” (2003), Genova.

<http://cancergrace.org/lung/2010/09/20/lung-cancer-faq-what-is-egfr-andwhat-are-the-molecular-tests-related-to-it/>

<http://www.turkcancer.org>

<http://www.toraks.org.tr>

<http://www.saglik.gov.tr>

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Buket DOĞRUOĞLU
- Doğum Yeri ve Tarihi: 26.12.1984-Gölcük
- Uyuşu : TC
- Medeni Durumu: Evli
- Çalıştığı Kurum: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.
- İletişim Adresi ve Telefonu: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Tıbbi Genetik A.D. 41380 İzmit-KOCAELİ Tel: 0(262) 303 88 51

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

EĞİTİM DURUMU

2004- 2008 : Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü

1998-2002 : Atatürk Anadolu Lisesi (Değirmendere)

STAJLAR

06 /2007- 08/2007 : Özel Tıp Merkezi

YABANCI DİL

İngilizce

3. Ünvanları

2008- : Biyolog

4. Mesleki Deneyimi

-Periferik lenfosit kültürü

-Kemik iliği kültürü

-Amniyon sıvısı kültürü

-Postnatal-prenatal kromozom analizi

-FISH(Floresan in situ hibridizasyon)(doku/periferik kan)

-FISH(Floresan in situ hibridizasyon) analizi

5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

6. Bilimsel Etkinlikler

- **B Enguzel**, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z Ilkay, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Comparison of a-CGH and conventional cytogenetics in a primary amenorrhea case.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- **B Enguzel**, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z Ilkay, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. *Diagnostic value of a-CGH method for recurrent miscarriage and implantation failures.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- N Cine, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, **B Enguzel**, S Eren, Z Ilkay, D Yavuz, R Akkoyunlu, H Savli. *High-throughput FISH analyses (HTFA): A new sensitive approach to screen hematological malignancies.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- D Yavuz, N Cine, Z Ilkay, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, **B Enguzel**, S Eren, R Akkoyunlu, H Savli. *Mutations frequency of the thrombosis risk factor genes in habituel abortus patients in the region of Kocaeli.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- Z Ilkay, N Cine, D Yavuz, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, **B Enguzel**, S Eren, RU Akkoyunlu, H Savli. *Detection of MEFV gene mutation frequency patients Familial Mediterreanean Fever (FMF) in Kocaeli region.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, S Eren, **B Enguzel**, R Akkoyunlu, Z Ilkay, N Cine. *Yüksek Çıktılı FISH Paneli (High – Throughput Fish Analysis) Analizleri: Hematolojik Malignite Analizinde Hassas Yeni Bir Tarama Seçeneği.* (Poster Sunum) 36. Ulusal Hematoloji Kongresi-2010-Antalya
- N Cine, RU Akkoyunlu, E Gumuslu, D Sunnetci, N Uzulmez, **B Enguzel**, S Eren, D Yavuz, Z Ilkay, H Savli. *Value of array CGH in the evaluation of microdeletion syndromes.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- E Gumuslu, N Cine, B Kara, D Sunnetci, N Uzulmez, **B Enguzel**, S Eren, R Akkoyunlu, Z Ilkay, D Yavuz, H Savli. *Application of array CGH method in two 18q21.31-q23 deletion patients.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi- 2010- İstanbul
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, Z Ilkay, N Cine. *Diagnostic use of targeted array CGH platforms: 2009-2010 Kocaeli University experience.* (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul