

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PTCH1* GENİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİK
DEĞİŞİMLERİN MİDE KANSERLİ OLGULARDA
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Erce MATPAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Birsen ELİBOL

TEMMUZ 2022

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***PTCH1* GENİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİK
DEĞİŞİMLERİN MİDE KANSERLİ OLGULARDA
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Erce MATPAN
(195309001)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen ELİBOL
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adem AKÇAKAYA**

TEMMUZ 2022

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195309001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Erce MATPAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*PTCH1* GENİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN MİDE KANSERLİ OLGULARDA İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Doç. Dr. Birsen ELİBOL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Emrah YÜCESAN**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Sinem FIRTINA
İstinye Üniversitesi

Teslim Tarihi :29.07.2022
Savunma Tarihi : 04.07.2022



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan, yeni şeyler öğrenmeye imkan sağlayan ve deneyimleriyle hep yanımda olan çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Birsen ELİBOL'a, tez çalışmam için gerekli olan hasta grubunu temin edip, çalışmayı özveriyle takip eden Prof. Dr. Adem AKÇAKAYA'ya, tez çalışmam sürecinde manevi ve teknik bilgisi desteğiyle her an yanımda olan Arş. Gör. Ceyhun TORUNTAY'a, Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a, tezimde geçen çeşitli analizlerin gerçekleştirilmesinde büyük desteği olan Dr. Öğr. ÜYESİ Sinem FIRTINA'ya, Arş. Gör. Elif YAPRAK SARAÇ'a ve hayatım boyunca varlıklarını her an yanımda hissettiğim çok sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmama destek olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine de (Proje No:20200920) ayrıca teşekkür ederim.

Tarih: 03.06.2022

Erce MATPAN

(Moleküler Biyolog)

BEYAN

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

Erce MATPAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Epigenetik nedir?.....	2
2.4. Epigenetikte etkili olan önemli süreçler.....	6
2.5 Epigenetik Mekanizmalara Genel Bakış	7
2.5.1 Histon Yapıları	7
2.5.2 Histon Modifikasyonları	8
2.5.2.1 Histon Asetilasyon Mekanizması	9
2.5.2.2 Histon metilasyon mekanizması	10
2.5.2.3 Histon fosforilasyon mekanizması	11
2.5.2.4 Histon Übikitinasyon Mekanizması	12
2.5.2.5. S-Nitrasilasyon Mekanizması	12
2.5.2.6. Sumolasyon Mekanizması.....	13
2.5.3 DNA metilasyonu.....	13
2.5.4 Kodlamayan RNA’lar	15
2.6 Memelilerde epigenetik mekanizmalara genel bakış.....	17
2.6.1 X Kromozomu inaktivasyon mekanizması	17
2.5.2 Genomik damgalama mekanizması.....	17
2.7 Epigenetik modifikasyonlar ve kanser ilişkisi	18
2.8. Kanserdeki epigenetik düzenlemelere bakış	19
2.8.1. DNA Metilasyonu ve Epigenetik Modifikasyonlar	19
2.8.2. Histon modifikasyonları	21
2.8.3 Kodlamayan RNA’lar	22
2.9 Kanser ve Kanser Biyolojisine Genel Bakış	22
2.10 Kanser Genetiği	25
2.10.1. Kanser Genetiğinde Bilinmesi Gereken Temel Kavramlar	26
1. “Germline” Mutasyonlar:.....	26
2. Somatik Mutasyonlar	26
3.Proto-onkogenler	26
4. Tümör Süpressör Genler	26
5. Onkogeneiz Mekanizmaları:	27

2.10.2 Kanserde Onkogenik Aktivasyon.....	28
2.11 Kanserde Sinyal Yolakları	30
2.11.1. MAPK Sinyal Yolağı ve Kanser	31
2.11.2. PI3K Sinyal Yolağı ve Kanser	33
2.11.3. JAK/STAT Sinyal Yolağı ve Kanser	36
2.11.4. NF-κB Sinyal Yolağı ve Kanser.....	38
2.11.5 Hedgehog (Hh) Sinyal Yolağı.....	39
2.12. Hedgehog Sinyal Yolağı Modifikasyonları ve Kanser	41
2.13. Kanser Kök Hücreleri ve Hedgehog Sinyali Arasındaki Bağlantı	43
2.14 Kanser Çeşitleri.....	44
2.14.1. Mide Kanseri	44
2.14.1.1. Lokalizasyon.....	45
2.14.1.2 Prognoz.....	46
2.14.1.3 Patolojisi ve Çeşitleri	46
2.14.1.4 Evreleme Sistemi.....	49
2.15 Tedavi Yöntemlerine Genel Bakış	50
3.MATERYAL ve METOD.....	52
3.1 Kullanılacak Kitler	52
3.2 Cihazlar	52
3.3. Çalışma materyali	56
3.4. Dondurulmuş Dokudan DNA İzolasyonu	56
3.4.1 İzole Edilen DNA'ların Kontrolü.....	58
3.5 Bisülfid Dönüşümü	58
3.6 Primer Tasarımı	59
3.7. Real Time PCR (RT-qPCR)	60
3.8 ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	61
3.9 İstatistiksel Analiz.....	62
4.BULGULAR.....	63
4.1 Hastalara Ait Bulgular	63
4.2 DNA Kantitasyon Sonuçları	63
4.3. PTCH1 Genindeki Metilasyon Durumu	65
4.4 ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	70
5.TARTIŞMA	72
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKÇA	76
EKLER	88
ÖZGEÇMİŞ	91

KISALTMALAR

PTCH1: Protein Yamalı Homolog 1

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SHH: Sonik Kirpi Yolağı (Sonic Hedgehog Pathway)

DHH: Çöl Kirpi Yolağı (Desert Hedgehog Pathway)

HH: Kirpi Yolağı (Hedgehog Pathway)

IHH: Hintli Kirpi Yolağı (Indian Hedgehog Pathway)

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PI3K: Fosfatidilinositol 3-Kinaz

JAK/STAT: Janus Kinaz

NFkB: Nükleer Faktör Kappa B

ELİSA: Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Analizi

GLI: Glioma İlişkili Onkogen Homolog

SMO: Pürüzsüzleştirilmiş Onkogen (Smoothened Oncogene)

DNA: Deoksiribonükleik Asit

RNA: Reoksiribonükleik Asit

dH₂O: Distile Su

Xist: X-İnaktif Spesifik Transkript

Xi: İnaktive Olmuş X kromozomu

CpG: Guanin- Sitozin Dizileri

AJCC: Amerika Birleşik Kanser Komitesi

TNM: Tümörde Lenf Nodu Metastazı Değerlendirme Sistemi

Tsix: X-İnaktif Spesifik Transkript / Xist antisens molekül

PNET: Primitif Nöroektodermal Tümör

TSG: Tümör Süpressör Gen

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

AML: Akut Miyeloblastik Lösemi

KML: Kronik Miyeloblastik Lösemi

PDGF: Plateled-Derived Growth Factor (Trombosit kökenli büyüme faktörü)

Tm: Erime Sıcaklığı

HAT: Histon Asetil Transferaz

miRNA: MikroRNA

siRNA: Küçük Müdahaleci RNA

piRNA: piwi Etkileşimli RNA

RAS: Proto-onkogenik, G-protein Ailesi Üyesi

MAPK: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz

PTEN: Tirozin Fosfataz ve Tensin Homolog

MYC: Onkogenik Tirozin Kinaz Efektörü

G: Gravite

PRM: Dakikadaki Dönme Sayısı

µl : Mikrolitre

dk: Dakika

sn: Saniye

M: Metile

U: Anmetile

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çeşitli tümör süpressör genler ve hangi tip kanserlerde bulundukları (kalıtsal-sporadik) gösterilmektedir.....	27
Tablo 2.2: Kanser oluşum ve gelişiminde rolü olan çeşitli onkogenler, aktivasyon mekanizmaları, hangi kanser tipinde nasıl işlev gördükleri gösterilmek istenmiştir...	30
Tablo 2.3: Kanserde etkili olan çeşitli sinyal yolları, bu sinyal yollarındaki görevli olan çeşitli genler, bu genlerin görevleri ve hangi kanserlerde etkili oldukları gösterilmektedir.....	31
Tablo 2.4: Mide kanserinin oluşumunda ve gelişiminde etkili olan risk faktörleri....	45
Tablo 2.5: Mide kanserinin histolojik olarak alt tiplerinin bir kısmı.....	47
Tablo 2.6: Mide kanseri üzerinde AJCC'ye göre olan TNM evreleme sistemi genel ve alt birimleri sınıflara ayrılarak gösterilmektedir	49
Tablo 3.1: <i>PTCH1</i> Metile (M) ve Anmetile (U), Forward (F), Reverse (R) Primer bilgileri gösterilmektedir.....	60
Tablo 3.2: Revers Transkriptaz PCR bileşenleri	61
Tablo 3.3: Revers Transkriptaz PCR reaksiyon döngüsü.....	61
Tablo 4.1: Çalışmada yer alan hastalara ait olan ve bu hastaların DNA konsantrasyonları ve 260/280 nm'deki dalga boyları.....	63
Tablo 4.2: Hastalardaki <i>PTCH1</i> genine ait metile olan; tümör ve tümör uzak dokuların Tm (erime sıcaklığı) değerleri.....	66
Tablo 4.3: Hastalardaki <i>PTCH1</i> genine ait anmetile olan; tümör ve tümör uzak dokuların Tm (erime sıcaklığı) değerleri.....	67
Tablo 4.4: Parametrik olmayan dağılım göstermiş tümör ve tümör uzak dokulara ait Man Whitney U test sonuçları.....	70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Çevresel faktörler ve epigenetiğin sinerjistik olarak hastalık oluşumdaki mekanizması.....	3
Şekil 2.2: İkişer kopyadan oluşan ve ip üzerine dizili boncuklar gibi görünüm alan histon yapıları	8
Şekil 2.3: Histonların asetilasyon ve deasetilasyon mekanizması	9
Şekil 2.4: Histon asetilasyonu, HAT: Histon proteinlerinin N terminal ucundaki lizin rezidülerine asetil gurubu eklemesi	10
Şekil 2.5: DNA metilasyonu ve Histon metilasyon mekanizması.....	11
Şekil 2.6: Histonların fosforilasyon ile Ökromatin yapılarının heterokromatin yapıya dönüşümü	12
Şekil 2.7 : Histon proteinlerinin ubiquitinasyon aşamaları	12
Şekil 2.8: Metillenmiş sitozin ve DNA metilasyonu	14
Şekil 2.9: Kodlamayan RNA'ların (miRNA) işleyiş mekanizmaları.....	16
Şekil 2.10: Kansereleşme ve kanserin meydana getirdiği durumlar	23
Şekil 2.11: Genel olarak kanser oluşumundaki gerçekleşen mutasyon evreleri ve mekanizmalar	24
Şekil 2.12: Kolon kanserinde evreler arasındaki geçişte genlerdeki mutasyonlar ve metastaz aşamasına varıncaya kadar geçirilen aşamalar.....	28
Şekil 2.13: 9 ve 22. kromozomların birbirleri arasındaki translokasyon ile Philadelphia kromozomunun oluşumu.....	30
Şekil 2.14: MAPK sinyal yolağında yer alan modülleri ve bu modüllerin birbirlerine etkileri ve bağlantıları.....	32
Şekil 2.15: RAS aktivasyonu için gerekli olan; ERK, MAPK, JNK yolaklarının uyarıcı sinyaller ve bu yolaklardaki basamaklar	33
Şekil 2.16: PI3K yolağının genel hatları ve PI3K yolağının etki ettiği mekanizmalar (Hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve apoptoz), bu yolak üzerinde yer alan ve görevli olan ara yapılar	34

Şekil 2.17: PI3K yolağı ve PTEN yolaklarının katalizledikleri reaksiyonlar ve sinyalleşen moleküllerde meydana gelen değişimler	35
Şekil 2.18: MAPK sinyal yolağı ve PI3K sinyal yolağının MYC'in etki ettiği; hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkileri	36
Şekil 2.19: JAK/STAT yolağının, bu yolak için aktivatör özellikte olan IL-6 büyüme faktörleri aracılığıyla aktivasyonu	37
Şekil 2.20: NFkB yolaklarının iletişim mekanizmaları, bu yolakta görev alan ana yapılar ve ara moleküller, bu yolağa bağlı olan reseptör molekülleri ile birlikte; bu yolağın işleyiş mekanizması	39
Şekil 2.21: Hedgehog ligandının olması durumunda, Hedgehog yolağında gerçekleşen mekanizmaların basamakları ve görevli olan ara moleküller arasındaki mekanizma ve iletişimi, Hedgehog ligandının olmaması durumunda da aynı şekilde yolak içindeki mekanizmalar ve görevli olan yapıların mekanizma üzerindeki iletişimleri	41
Şekil 2.22 : İntestinal tip mide kanseri ve diffüz tip mide kanser mekanizmaları.....	48
Şekil 2.23: İntestinal tip mide kanserinde kanserin gelişme aşamaları ve kanserin çok basamaklı patogenezi.....	49
Şekil 3.1: Buz makinesi.....	52
Şekil 3.2: Örneklerin stabilitesini sağlamak için Etüv (inkübatör).....	53
Şekil 3.3: Örneklerin daha iyi karışma ve çözünbilmesi için vorteks.....	53
Şekil 3.4: ELISA okuyucu.....	54
Şekil 3.5: Örneklerin daha iyi karışabilme ve çözünbilmesi için karıştırıcı.....	54
Şekil 3.6: Örneklerin fazlarının ayrışmasının sağlanması için santrifüj.....	55
Şekil 3.7: Gerçek zamanlı PCR cihazı.....	55
Şekil 3.8: Konvansiyonel PCR cihazı	56
Şekil 4.1: <i>PTCH1</i> genine ait metile primer ile tüm erime sıcaklığı eğrileri.....	65
Şekil 4.2: <i>PTCH1</i> genine ait metile primer ile A) Tüm erime sıcaklığı eğrileri B) 74°C erime sıcaklığı eğrisi C) 73,5°C erime sıcaklığı eğrisi D) 73°C erime sıcaklığı eğrisi..	68
Şekil 4.3: <i>PTCH1</i> genine ait anmetile primer ile A) Tüm erime sıcaklığı eğrileri, B) 72°C erime sıcaklığı eğrisi C) 71,5°C erime sıcaklığı eğrisi.....	68
Şekil 4.4: Çalışılan hasta grubu için <i>PTCH1</i> proteinine ait ELİSA testi sonucu, ortalama konsantrasyon değerleri (Ort: Ortalama).....	69

Şekil 4.5: Parametrik olmayan dağılım göstermiş tümör ve tümör uzak dokulara ait
Man Whitney U test sonuçlarının dağılımının grafiksel gösterimi.....70



***PTCH1* GENİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN MİDE KANSERLİ OLGULARDA İNCELENMESİ**

ÖZET

Gastrik kanser (GC) dünyada teşhisi konulan dördüncü en sık kanser olmakla beraber, mortalitesi yüksek ve prognozu kötü bir malignitedir. Yapılan moleküler çalışmalarda, hedhehog sinyal yolağının bir proteini olan *PTCH1* reseptör regülasyonunun bozulmasının mide kanserine sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada cerrahi gastrektomi uygulanmış mide kanserli olgulardan rezekte edilen tümör dokularında, *PTCH1* geninin epigenetik değişimi ve buna bağlı olarak ortaya çıkan ekspresyonel farklılıkların incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, gastrik kanser tanılı, 50-70 yaş aralığında, 13 erkek ve 9 kadın hastadan cerrahi gastrektomi ile rezekte edilmiş tümör dokusu ve tümörden uzak bir bölgeden alınmış kontrol dokusu dahil edildi. Elde edilen dokulardan ticari izolasyon kiti yardımıyla DNA izole edildi. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları belirlendikten sonra uygun koşullarda bisülfıt dönüşümü yapıldı ve EpiTect Metil 2 PCR Sistemi yardımıyla metile ve metile olmayan primerler kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile *PTCH1* genindeki metilasyon profilindeki değişimler belirlendi. Protein düzeyindeki değişimler için homojenize doku örneklerinden ELISA yardımıyla *PTCH1* protein ekspresyonları ölçüldü. RT-PCR sonucunda metile primerlerin kullanıldığı düzenekte çoğunlukla tümör dokusundan elde edilen örneklerin erime sıcaklığı ile tümör uzak dokulardan elde edilen örneklerin erime sıcaklığı arasında yaklaşık 0.5 ± 0.25 derece değişimin olduğu ve bu nedenle tümörlü dokuların metilasyon profillerinin sağlıklı dokuya oranla değiştiği tespit edildi. Protein ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde *PTCH1* protein miktarının kanserli dokularda anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p < 0,05$). Elde edilen sonuçlar gastrik kanser oluşumunda etkisinin olabileceği düşünülen ve *PTCH1* genindeki metilasyon profilinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmediğinden *PTCH1* proteinindeki değişimin direk epigenetik değişimler ile ilişkili olmadığını

düşündürmektedir. Bu nedenle, bu sonuçlar çevresel etkiler sonucu oluşan epigenetik değişimlerin gastrik kanser oluşumunda etkisinin sınırlı olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gastrik kanser, *PTCH1* geni, epigenetik, RT-PCR.



EPIGENETIC ANALYSIS OF *PTCH1* GENE IN THE PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

SUMMARY

Gastric cancer is the fourth most common cancer diagnosed worldwide. It also has high mortality rates with poor prognosis for patients. In some molecular studies, it has been shown that the dysregulation of the *PTCH1* receptor, a protein in hedgehog signaling pathway, leads to the gastric cancer. Thus, the aim of the present study was to observe the epigenetic changes of the *PTCH1* gene and related expressional differences in the gastric tumoral tissues of the patients undergone surgical gastrectomy. Both tumoral tissues and tissues far from the tumor (control) that were collected from 13 male and 9 female patients (age range of 50-70 years) diagnosed with gastric cancer were included in the present study. DNA extraction procedures were performed on the included tissues with commercial extraction kit. After the determination of the concentrations of the isolated DNAs, bisulfite conversion was performed under appropriate conditions, and then quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), using methylated and non-methylated primers, was performed by EpiTect Methyl 2 PCR System in order to define the changes in the methylation profile of the *PTCH1* gene. Moreover, the expressions of the *PTCH1* protein were measured with ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) method in homogenized tissue samples in order to observe the changes in the *PTCH1* protein. According to the result of RT-PCR measurements, it was determined that 0.5 ± 0.25 degrees difference was observed in the melting temperature between tumor tissue and control tissue suggesting that methylation profiles of *PTCH1* gene in tumor tissues changed compared to that of the healthy tissues. Based on the evaluation of the protein expressions, it was found that the amount of the *PTCH1* protein was significantly increased in the tumoral tissues ($p < 0.05$). Depending on the data obtained from the study, *PTCH1* protein expression having an effect on gastric cancer progression while no statistically significant change was observed in the methylation profile of the

PTCH1 gene, it is thought that the increase in the PTCH1 protein is not directly associated with epigenetic changes.

Keywords: Gastric cancer, *PTCH1* gene, epigenetics, RT-PCR.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri (gastrik kanser (GC)) en sık teşhis edilen dördüncü malign kanserdir ve dünyadaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %8,8'ini oluşturmaktadır [1]. Her ne kadar kanser tedavisi son yıllarda önemli ölçüde iyileşmiş olsa da GC dünya genelinde kötü bir prognoz ve düşük sağkalım oranı göstermeye devam etmekte ve yılda 720.000'den fazla ölüm GC'ye atfedilmektedir [1]. Yüksek mortalitenin temel nedeni, başlangıçta ileri düzey GC tanısı konan çok sayıda hastanın ve GC hastaları için mevcut tedavinin iyileştirici etkilerinin; yan etkiler ve ilaç direnci nedeniyle hala sınırlı olmasıdır [2]. Bu nedenle, GC için yeni terapötik stratejilere acilen ihtiyaç vardır.

Hedgehog (HH) sinyal yolağı uzak metastaz, kötü prognoz ve GC'nin ilaç direncinde önemli bir rol oynamaktadır [3]. Bu yolak emgriyogenez, histolojik farklılaşma, kendini yenileme, homeostaz ve yetişkin kök hücre proliferasyonu sürecine, özellikle de sindirim sisteminde rol almaktadır. HH yolağının memelilerde üç ligandı vardır: Desert hedgehog (DHH), Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH). HH sinyal yolunda 12-transmembran Patched reseptörünün (PTCH) inaktivasyonu, bir G-bağlı reseptör benzeri protein olan Smoothed (SMO)'un aktive olmasına yol açmaktadır. SMO, GLI transkripsiyonel aktivatörlerinin aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Son olarak ise, GLI1, GLI2 ve GLI3 dahil olmak üzere GLI zinc-finger (çinko-parmak) transkripsiyon faktörleri çekirdeğe taşınmakta ve hücre büyümesini, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden HH hedef genlerinin düzenleyici ekspresyonunu indüklemektedir. Ayrıca PTCH1 proteini işlevini mTOR, KRas, TGF- β ve wnt gibi diğer kanser yolaklarında da göstermektedir. Bu nedenle, PTCH1 proteini üzerinden hücrenin hedgehog yolağını kullanarak kanserleşmeye gitmesini önlemek açısından tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır.

Bu çalışmada, cerrahi gastrektomi uygulanmış mide kanserli olgulardan rezekte edilen tümör dokularında *PTCH1* geninin epigenetik değişimi ve buna bağlı olarak ortaya çıkan ekspresyon farklılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik nedir?

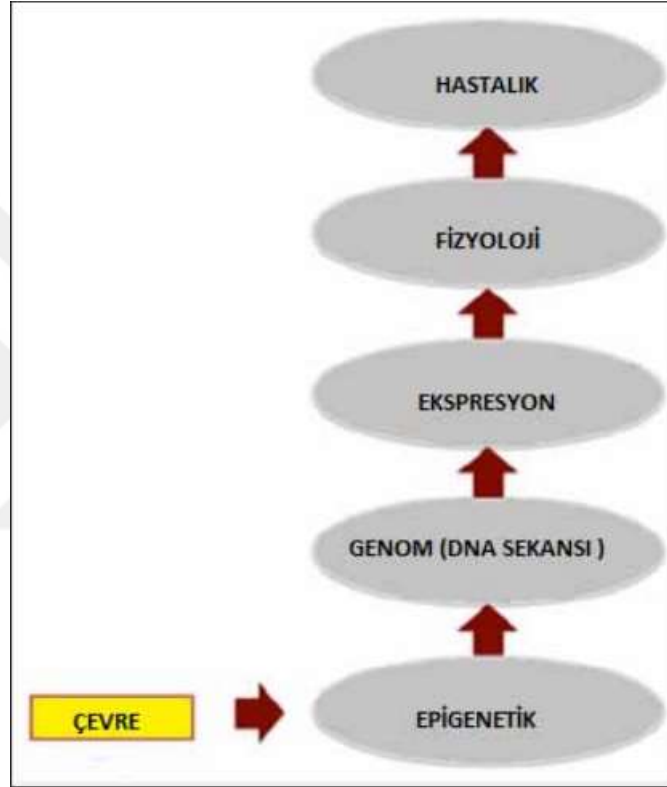
Vücut hücrelerinin genetik kimliğini DNA'lar oluşturmaktadır. Diğer bir deyişle, DNA materyali; genotip ve dolaylı bir yoldan ise fenotip oluşumunda etkili olmaktadır. Genotipi oluşturan genler yani DNA dizilimi hücrelerin, organizmaların çalışması için ihtiyaç duyduğu bir takım enzim ve proteinlerin sentezlenmesini yöneterek “fenotip” yani dış yapının ortaya çıkmasında belirleyici rol oynar. Gen ifadeleri kavramı aslında biyolojinin iki önemli sorununa değinmektedir; karmaşık çok hücreli bir organizma tek bir döllenmiş yumurtadan gelişirken nasıl farklılaşmakta ve hangi moleküler mekanizmalar fenotip kalıtımına katkıda bulunmaktadır [4] .

Epigenetik, genetik yapımızdaki (genotip) değişikliklerden kaynaklanmayan ancak genlerin ifadelerindeki değişiklikleri yani genlerin fenotipi oluşturma farklılıklarını inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik, gen dizilişleriyle değil, gen ifadesinin kalıtsal düzenlenmesi yoluyla fenotipi nasıl etkilediği ile ilgilenmektedir. Yunanca’da üstünde anlamına gelmekte olan “epi-” kısaca genetiğin üstünde yapılan değişimler manasına gelmektedir. Bu terim ilk olarak İngiliz embriyolog Waddington tarafından 1940 tarihli “Organizers and Genes” adlı kitabında türetilmiş; çevresel koşulların gen ifadesini etkileyebileceği ve dolayısıyla gelişimi değiştirebileceğinden söz edilmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında epigenetik teorisi organizmayı çevresel faktörler arasındaki reaksiyonun bir ürünü olarak tanımlarken, günümüzde “genlerin tek başına açıklayamadıkları ilgili kavramlar” olarak ifade edilmektedir [5].

Epigenetik modifikasyonlarla oluşan proteinler ve RNA'lar, DNA diziliminde değişime neden olmadan gen aktivitelerini düzenleyebilmektedir. Genlerin protein üretme kodlarını sağlaması gibi, epigenetik işaretler adı verilen çeşitli kimyasallar, komutlar vererek genlerin ne zaman ve nasıl çalışacağını belirlemekte, gen ifadelerini baskılamakta, sürdürmekte veya bazı genleri aktive edebilmektedir. Epigenetik mekanizmaların bir diğer özelliği; DNA dizisindeki mutasyonlara oranla daha düşük hata oranı ile baz çifti değişimleri görülmektedir. Bu da epigenetik bilginin hücrel farklılaşma sırasında dinamik olarak yeniden programlanabilir olduğunu

düşündürmektedir [4]. Çeşitli epigenetik mekanizmalar, DNA'nın paketlenmesini ortaklaşa kontrol etmekte, böylece hangi genlerin transkripsiyon için erişilebilir olduğunu belirlemektedir.

Şekil 2.1'e baktığımızda; Çevresel faktörlerin epigenetik üzerine etkileri ve bu etkiler sonucunda art arda gelişen mekanizmalar gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Çevresel faktörler ve epigenetiğin sinerjistik olarak hastalık oluşumdaki mekanizması [6].

Epigenetik, genetiği kromozom, DNA, genler ile sınırlamaktan öte çevresel faktörlerin de genetiği etkileyebildiğini, hangi genlerin açık hangilerinin kapalı olduğunu açıklayan bir çalışma alanıdır. Bu nedenle çevresel etmenler olumsuz sayılabilecek; sigara, alkol, kötü beslenme alışkanlıkları ile sınırlı kalmamakta, besin maddelerine erişim, bolluk veya kıtlık dönemleri hatta ebeveyn davranışları gibi psikolojik öğeler de insanlarda epigenetik değişimlere neden olmaktadır. Epigenetik konusunda ilginç olan nokta epigenetiğe sebep olan etmenlerin sonuçlarının sadece bu etmenlere maruz kalan bireylerde değil, nesiller boyunca kalıtılabilmesidir [7,9]. Avrupa'da bazı

göçmen grupları üzerinde yapılan bir çalışmada savaş veya başka bir gerekçeyle güvenli yerlere yerleşenlerin çocuklarında yani “ikinci nesil” göçmenlerde şizofreni vakalarında artışlar olduğu tespit edilmiştir [10]. Ayrıca yavru bakımı, evlat edinme veya zenginleştirilmiş ortamların doğum öncesi dönemde yaşanan stres kaynaklı olumsuz koşulların etkisini azalttığını gösteren bulguların ortaya çıkması epigenetik etkilerin tersine çevrilebileceğini de göstermektedir [17]. Epigenetik mekanizmaların miras alınabildiği veya ebeveynlerden çocuklarına beslenme veya davranış kalıpları ile geçebildiğinin bilimsel ispatı bireylerin diyet alışkanlıklarının ve ebeveyn davranışlarının yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Biyolojik kadercilik de denilen genetik determinizm yerine bedenin çevresel müdahaleye açık olduğunu ve bunların nesiller boyunca aktarılabilirdiği bilgisi toplumsal öğelerin nasıl şekillendirilmesi gerektiğini sorgulamaya neden olmaktadır.

2.2. Epigenetiğin tarihçesi

“Epigenetik” terimi ilk defa gelişimsel bir araştırmacı biyolog olan Conrad Waddington tarafından ortaya atılmıştır. Waddington’a göre epigenetik, gelişimsel olarak genotipin fenotipi oluşturan bir bilimdalı olduğunu söylemiştir [11,30]. 1970’lerde, Conrad’ın hipotezini açıklamak adına bir mekanizma ortaya atılmıştır, ilk olarak Holliday ve Pugh, sitozin-guanin dinükleotitlerinin (CpG) metilasyonunu barındıran kovalent kimyasal DNA modifikasyonları bu bilim insanları tarafından ortaya atılmıştır [12,30] Bunun ardından, memelilerde X inaktivasyonu ve genomik damgalama keşfedilmiş, epigenetik gen regülasyonu mekanizmalarının kalıtsal doğasını vurgulayan epigenetik oluşumlarla düzenlenmiştir. Buna göre 1990’larda epigenetik, DNA metilasyon modifikasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesini içeren, DNA sekansında değişiklikler oluşturmeyen; gen ekspresyonlarındaki kalıtsal değişiklikler çalışması olarak ortaya çıkmıştır [30].

Genom biliminin (genomik) ilerlemesi global bir araştırmanın artmasına neden olmuştur “daha yüksek düzeyde kromatin katlama düzeni ve çekirdeksel matrikse bağlama, nükleozomlar etrafındaki DNA paketlenmesi, histon kuyruklarının kovalent modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, vb.) ve DNA metilasyonu içeren kromatin etkileri”nin çalışması olarak ‘epigenomik’ terimi

türetilmiştir [24,30]. Bunun dışında epigenetik gen regülasyonları sonucu oluşan etkilerin gelecek nesillerde de görülmesi de değişimlerin kalıtsal olabileceğini göstermiştir [13,30].

2.3. Epigenetik ve hastalık ilişkisi

DNA metilasyonu ile kanserlerle ilgili genlerin ifadelerinde çeşitli değişiklikler meydana gelebilmektedir, kromozomların kararlılığını yitirmesiyle birlikte bu durum onkogenleri (kansere oluşturan genler) aktive edebilmektedir. Özellikle birçok kanserin epigenetik modifikasyonlardan kaynaklandığı belirlenmiştir [8], kanser genomiği, kanserin erken teşhisi, gelişim takibi ve epigenetik ilaçlar üzerine çalışmalara yer verilmiştir [5].

Epigenetik değişiklikler sadece kanser hastalığıyla da sınırlı değildir. Tip 2 diyabet, insülin direnci ve obezite gibi metabolik hastalıkların yanında psikoloji, depresyon, şizofreni ve otizm gibi yıkıcı nöropsikiyatrik bozukluklarla da yakından ilişkilidir [8,9,17]. Tüm bunlar beslenme alışkanlıkları ve çevresel etkenler ile hastalıklar arasındaki ilişkinin tahmin edilenden çok daha fazla olduğunu akla getirmektedir. Tek yumurta ikizi kardeşlerin birbirinden neden farklı olduğunu örneğin birinin kanser hastası iken diğersinin olmayışı, yaşlanmada etkili faktörler, zihinsel bozukluklar ve ayrıca otoimmün hastalıklarda da epigenetik mekanizmaların ilişkili olabileceği düşünülmektedir [4,8]. Sigara içen bireylerin DNA metilasyonunda iz bıraktığına, akciğer ve kardiyovasküler hastalıklar, sağlıklı sperm üretimi ve normal embriyo gelişimi üzerindeki doğrudan etkisine dair bulgulara rastlanmaktadır [16,18]. Hatta sigarayı bıraktıktan beş yıl sonra, ancak bazılarında ise 30 yıl sonra gen ifadelerindeki değişikliklerin olduğu bölgelerin normale döndüğü belirlenmiştir [19].

Sağlık ve hastalıkla ilgili araştırmalar beslenmenin genom aktivitesini ve beden fizyolojisini şekillendirebilmektedir [20]. Örneğin; obezite hastalarının kilo vermesinin başarısızlıkla sonuçlanan çalışmaları durumun ardındaki nedenin epigenetik olduğunu ortaya koymaktadır. Genetik olarak özdeş farelerin ağırlığına bakıldığında iki farklı fenotip tespit edilmiş olup obez hayvanlardaki gen ifadesinin daha düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir [21]. 1944-45 yıllarında 2. Dünya

savaşının soğuk kışında, yoğun bir açlık döneminde Alman hamile kadınlarının yetersiz beslenmesinin, bu kadınların torunlarını etkileyerek kardiyovasküler riskleri arttırdığı hatta normal miktarda yiyeceğe ulaştıklarında sağlıklı görünseler de yetişkinlik döneminde obezite, diyabet ve kalp hastalıklarını yaşadıkları belirlenmiştir [19,24].

Epigenetik mekanizmalarla ilgili çalışmalar çevresel koşulların üzerimizdeki etkisinin çok daha fazla olduğunu ve çevresel etkileşimin sadece biyolojik alanlarla da sınırlı olmadığını göstermektedir. Belirli ebeveyn davranışlarının yavrulardaki gen metilasyonların da belirgin etkiler bıraktığını gösteren çalışmalar bu etkileşimin biyososyal, kültürel hatta toplumsal travmalarda bile etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Fare yavruları üzerinde yapılan bir çalışma ebeveynlik davranışının (annenin yavrularını yalaması ve tımarlaması) glukokortikoid reseptör genindeki metilasyonu etkilemiş, böylece yüksek seviyede yalama ve tımar, yavrulardaki stres tepkileriyle baş etmelerini sağlamıştır veya belirli ebeveyn davranışlarının çocuklar üzerinde önemli etkileri olduğu, buna göre evde anne babası tarafından yetiştirilen çocukların yetimhane de büyüyen çocuklara göre daha geniş bir dizide metilasyon farklılaşmasının olduğu tespit edilmiştir [7]. Sosyo ekonomik koşulların embriyonik gelişim ve çocukluk dönemindeki etkilerinin yetişkinlik dönemi hastalıklarıyla yakından ilişkili olduğunu, bu nedenle hem biyolojik hemde sosyal süreçlerin gen ifadelerini etkilediğini anlatan çalışmalardan da söz edilmektedir. Çocuklukta dezavantajlı bir sosyo-ekonomik ortama maruz kalmanın, yetişkinlikte kardiyovasküler, solunum, psikiyatrik, bağışıklık mekanizması hastalıkları ve strese karşı gösterilen tepki gibi insan sağlığı ile ilgili konularla ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar vardır [14,15,17].

2.4. Epigenetikte etkili olan önemli süreçler

Epigenetik mekanizmalar üç başlık altında incelenmektedir. Bu mekanizmalar; DNA metilasyonları, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA regülasyonları olarak ayrılabilir. DNA'yı direkt olarak etkileyen; metil gruplarının DNA hedef dizilerine bağlanması sonucu gerçekleşen DNA metilasyonu bu mekanizmalar arasında en yaygın olanıdır. Genellikle düşük metilasyon seviyelerinin potansiyel

aktivite, yüksek seviyelerin ise hareketsizlikle (protein sentezinin durması) ilişkili olduğu ve bazı metilasyonların rastlantısal, diğer bir kısmının da belirli çevresel veya gelişimsel uyaranlara yanıt olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir [25]. Kısaca ifade edilmek istenirse, DNA'daki sitozin bazının bir hidrojen bir metil grubu ($-CH_3$), ile değiştirilir. Metil gruplarının gen bölgelerine bağlanması genlerin kendini ifade etmesini engeller, genler kapatılır ya da susturulur, bunun sonucunda bu gen bölgesinden protein üretimi yapılamamaktadır.

DNA ve nükleozomlarda bulunan histonlar kromatin yapısının temelini oluşturmaktadır. DNA'nın 147 baz çiftinden oluşan nükleozom yapısı, dört çekirdekten oluşan histon proteinli bir oktamer yapısı tarafından paketlenmiştir, bunlar; H2A, H2B, H3 ve H4. DNA'nın aksine, histon proteinleri metilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon ve fosforilasyonu içeren modifikasyonları geçirebilmektedir. Bu modifikasyonlar, modifikasyonun oluşumuna ve özel aminoasit modifikasyonlarına bağlı olarak hem gen susturulma hem de gen aktive edilmesiyle doğrudan ilişkilidir [23].

2.5 Epigenetik Mekanizmalara Genel Bakış

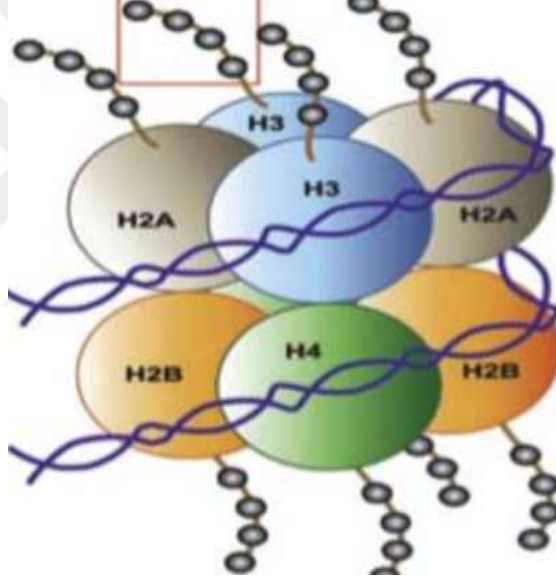
DNA, histon proteinleri çevresine sarılmaktadırlar. Protein-DNA kompleks yapıları birleşerek kıvrım oluşturarak, daha büyük yapıda olan kromozomları oluştururlar [23]. Kromatinlerin temel birimi, 147 DNA baz çiftinden oluşan nükleozom yapılarıdır. Daha önce bahsedildiği gibi her oktamer yapısında, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden iki kopya şeklinde bulunmaktadır [30,31].

Kromatinler, heterokromatin ve ökromatin olarak; transkripsiyon ve gen anlatımına izin veren ve vermeyen iki bölgeden oluşmaktadır. Özel genlerin etrafındaki kromatin bölgelerinin düzenlenmesi, “non-genic” bölgeler, histonların farklı post-translasyonel modifikasyon biçimleri, DNA'nın metilasyonu, kromatinin yeniden modellenmesini sağlayan geniş protein aileleri ve kodlama yapmayan RNA'ları da içeren kompleks biyokimyasal mekanizmalarla yönetilmektedir[31].

2.5.1 Histon Yapıları

Histonlar, DNA paketlenmesinden sorumlu protein yapılarıdır. Histon proteinleri, çoğunlukla pozitif yük içeren aminoasitleri (lizin ve arjinin) içerirler. Bu aminoasitler negatif yüklü DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanmaktadır. Histonların beş tipi bulunmaktadır. Histon proteinleri ökaryotik canlılar arasında oldukça fazla benzerlik göstermektedir. Elektron mikroskopuyla çekilen fotoğraflarda, histon proteinleri ip üzerine dizilmiş ancak katlanmış yapı oluşturmeyen boncuklar şeklinde görülmüştür [30].

Şekil 2.2'ye bakıldığında, ikişer kopyadan oluşan ve ip üzerine dizili boncuklar gibi görünüm alan histon yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.2: İkişer kopyadan oluşan ve ip üzerine dizili boncuklar gibi görünüm alan histon yapıları [31].

Bu yapı, hücre döngüsüne bozulmadan kalmaktadır. Histonlar, DNA'dan; DNA replikasyonu süresince geçici olarak ayrılırken transkripsiyon aşamasında tekrardan DNA ile birlikte kalmaktadırlar [31]

2.5.2 Histon Modifikasyonları

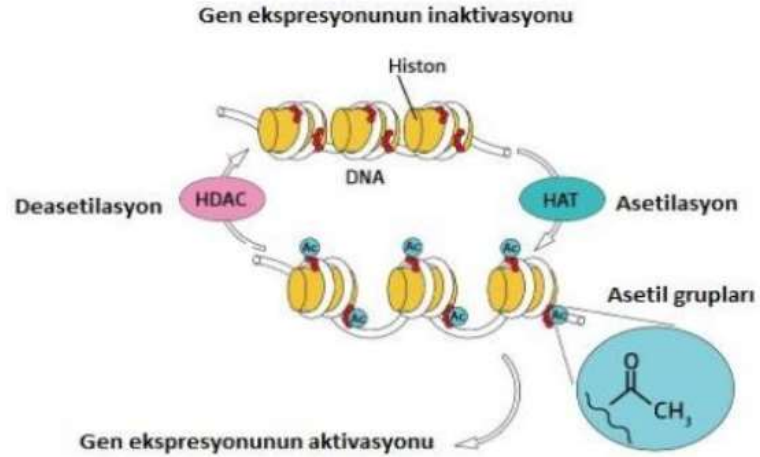
Evrimsel süreçte geçmişten günümüze korunmuş birçok histon modifikasyonu bulunmaktadır. Lizin ve arjinin yapılarının metilasyonu, lizin asetilasyonu, serin ve

treonin yapılarının fosforilasyonu, prolin izomerizasyonu bunlardan birkaçına örnek olarak verilebilmektedir [23].

Bu modifikasyonlar, kodlama yapmayan genomik dizilerinin yanında kodlama yapan dizileri de oluşturabilir. Bazı modifikasyonlar spesifik olurken, bazıları ise transkripsiyon bölgelerinde hem aktif hem de inaktif olarak bulunabilirler. Bu modifikasyonlar, hücre döngüsünün gelişimsel evresinde stres ve diğer çevresel faktörler tarafından etkilenmektedir [30].

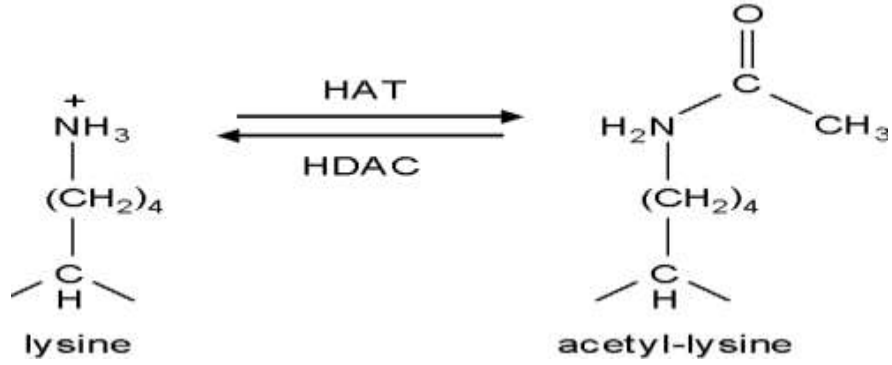
2.5.2.1 Histon Asetilasyon Mekanizması

Histon asetilasyonu, gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde doğrudan rol oynamaktadır. Histon asetilasyonu, histon proteinlerinin belirli bazı amino asitlerine asetil gruplarının ($-\text{COCH}_3$) bağlanması olayıdır. Deasetilasyonda ise, asetil grupları yapıdan uzaklaştırılır. Nükleozomların, histon yapılarının asetillenmesi durumunda, histonların DNA'ya olan bağlarının gevşemesi ve bağı kaybetmemek için farklı modifikasyonlar yaptıkları görülmüştür. Sonuç olarak, transkripsiyon proteinleri, histonların; asetillenmiş bölgelerine daha kolay bir şekilde girebilmektedirler [23,31].



Şekil 2.3: Histonların asetilasyon ve deasetilasyon mekanizması

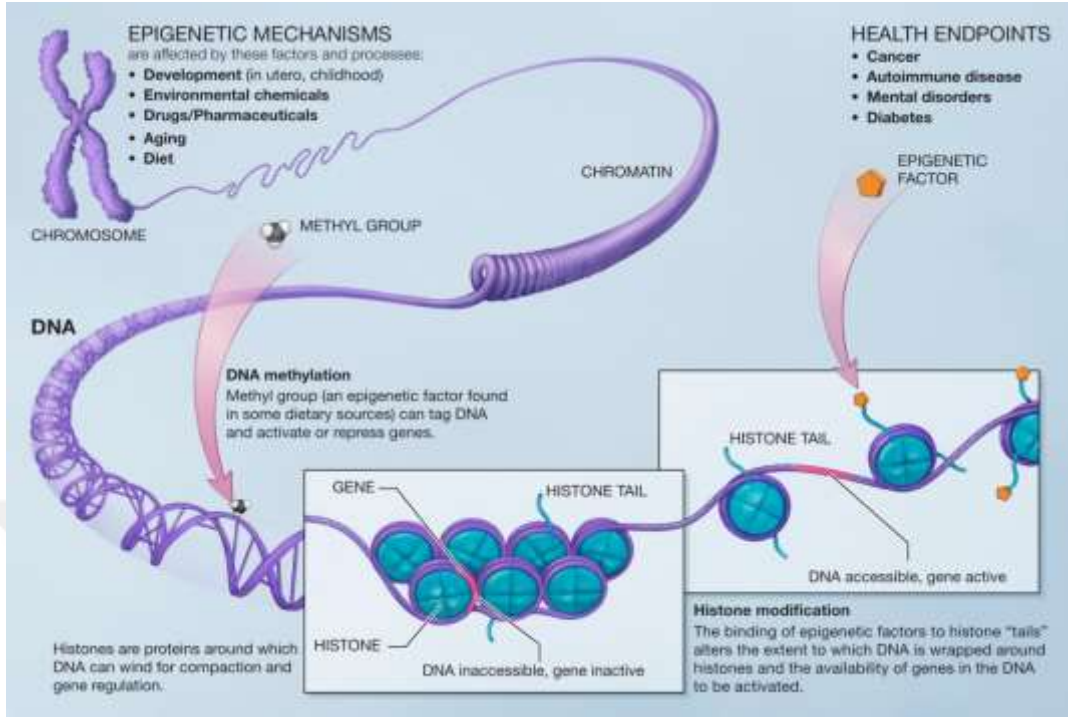
Şekil 2.3'te asetilasyon ve deasetilasyon mekanizmalarından bahsedilmekte ve Şekil 2.4'te ise moleküler simgeler ile bu gösterilmektedir.



Şekil 2.4: Histon asetilasyonu, HAT: Histon proteinlerinin N terminal ucundaki lizin rezidülerine asetil gurubu eklemesi

2.5.2.2 Histon metilasyon mekanizması

Histon metiltransferaz enzimleri tarafından, histon proteinlerinin aminoasitlere belirli sayıda metil grubunun eklenmesi olayıdır (1, 2 veya 3 metil). Bir genin ifade oluşturup; oluşturamayacağı o gende meydana gelen modifikasyonlardır. (Açık / Kapalı) Gen setleri bulundukları hücre çeşitlerine göre farklılık göstermektedirler. Histonun 3 numaralı kuyruk bölgesinde meydana gelen metilasyon; epigenetik düzenleme açısından önemli bir role sahip olmaktadır. Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu ökaryotlarda promotor bölgelerini belirlemektedir [32]. Şekil 2.5'te DNA metilasyon ve histon metilasyon mekanizmaları açıklanmıştır.

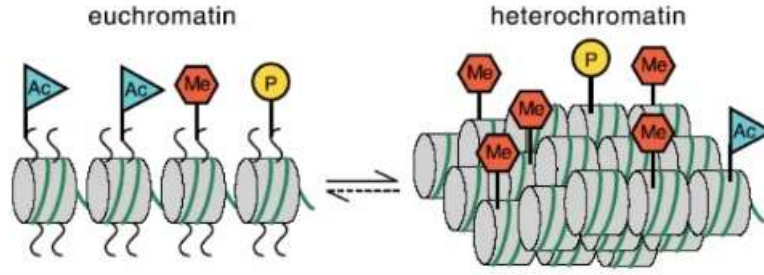


Şekil 2.5: Histon metilasyon mekanizması [32]

2.5.2.3 Histon fosforilasyon mekanizması

Histonların fosforilasyonları mitoz sinyali, ERK yolunda oluşan sinyal ağı gibi çeşitli transdüksiyon yollarında oluşmaktadır. Histon deasetilazlara geri dönüşümlü olacak şekilde fosfat gruplarının bağlanması olayıdır. Fosfatlar, histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin temel yapılarından bağlanmaktadır.

Fosforilasyon, proteinaz kinazlar (PK) ve protein fosforazlar (PP) tarafından gerçekleştirilmekte olan bir reaksiyondur [33]. Şekil 2.6’da histon fosforilasyonu ile kromatinde gerçekleşen yapısal değişiklik gösterilmektedir.

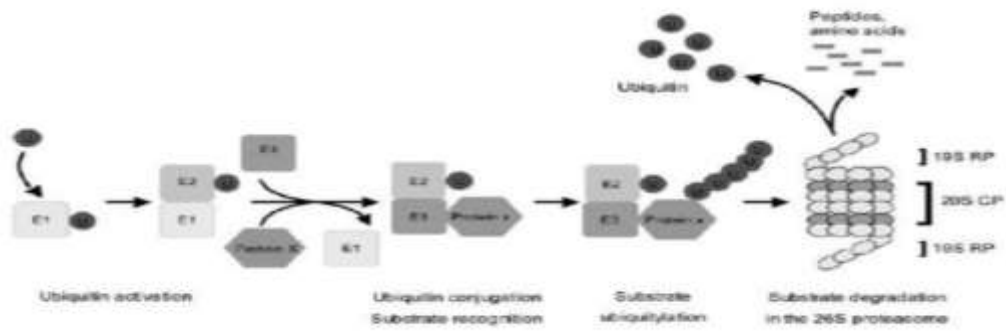


Şekil 2.6: Histonların fosforilasyon ile ökromatin yapılarının heterokromatin yapıya dönüşümü [33]

2.5.2.4 Histon Übikitinasyon Mekanizması

Histon übikitinasyonunun, kalıtsal genlerin susturulmasında ve X kromozom inaktivasyonunda yer aldığı belirlenmiştir [23]. Übikitin (Ub) lizin temel yapılarına bağlanabilen küçük protein yapılarıdır.

Üç aşamalı; enzimatik bir reaksiyon oluşmasına yol açmaktadırlar; bu reaksiyonlar; E1, E2, E3 adı verilen enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir ve sonucunda, proteinler proteozom reaksiyonuna girerek degrade olmaktadır [34]. Şekil 2.7'ye baktığımızda ise übikitinasyon basamaklarını gösterilmektedir.



Şekil 2.7: Histon proteinlerinin übikitinasyon aşamaları [34]

2.5.2.5. S-Nitrasilasyon Mekanizması

Histon deasetilazlara, sistein temel yapılarından, nitrosil (NO) grubunun eklenmesi olayıdır ve bu olay katalitik aktiviteyi etkilemekte, buna bağlı olarak da kromatinde yer alan ko-repressörlerin kopmasına neden olmaktadır [26].

2.5.2.6. Sumolasyon Mekanizması

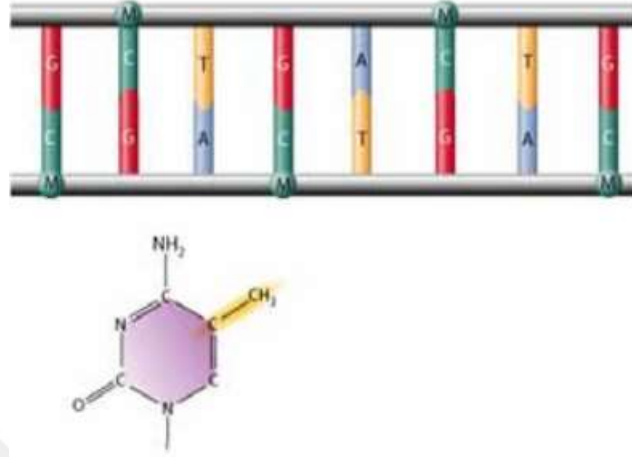
SUMO (small ubiquitin-like modifier) protein yapılarının (1,2 ve 3) ubiquitinler ile birleşmesi mekanizmasıdır. Ubikitine benzer yapıda olan, SUMO proteinleri lizin temel yapılarından proteinlere bağlanmakta ve bu olayla birlikte protein degradasyonunu engellemektedir [27].

2.5.3 DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA sentez aşamasının ardından DNA’da bulunan bazlara metil gruplarının (-CH₃) bağlanması olayıdır. Birçok hayvan ve bitkinin DNA’sı, çoğunlukla sitozin bazı olmak üzere, metillenmiş bazları içermektedir. Metillenmiş, ökaryot DNA’sında yer alan sitozin bazlarının yaklaşık olarak % 5’i metil gruplarına sahip olmaktadır [31]. İnaktif formda olan, memeli X kromozomlarındakine benzer şekilde, inaktif DNA, aktif formda transkripsiyon geçiren DNA ile kıyaslandığı zaman çeşitli istisnalar görülmesine rağmen genel anlamda, fazla miktar da metillenmiştir. Farklı dokularda yer alan aynı yapıdaki genlerin kıyaslanması, bu genlerin ifade edilmedikleri hücrelerde, genel anlamda daha yoğun bir metillenme gösterdikleri gözlenmiştir. İnaktif durumdaki bazı genlerin demetilasyonu (fazla olan metil gruplarının kesilip/kopararak uzaklaştırılması), inaktif olan genlerin aktivasyonunu sağlayabilmektedir [35].

Bir metil grubunun, DNA’nın bazlarından birine bağlanması şeklinde tanımlanan; DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz enzimleri tarafından katalizlenmekte ve metil vericisi olarak S-Adenozil metiyonin (SAM) enzimleri kullanılmaktadır. Ökaryotlarda, SAM kaynaklı bir metil grubunun, enzimatik bir reaksiyonla ve DNA metil transferaz enzimleri ile metiyonin genom üzerindeki CpG adacıklarında bulunan sitozinin primidin halkasının 5. karbonuna bağlanır ve böylece 5' metil-sitozin meydana gelir [36]. Şekil 2.8’e bakıldığında, metillenmiş sitozin ve DNA metilasyonu gösterilmektedir. Bunun yanında DNA metilasyonu DNA metil transferazlar

tarafından katalizlenmekte ve replikasyon sonrası işlemleri gerçekleştirmede görevlidirler [28].



Şekil 2.8: Metillenmiş sitozin ve DNA metilasyonu [36].

DNA metilasyonu, genomda yer alan sitozin ve guanin çiftlerinin birbiri ardı sıralanarak oluşturdukları CpG dizilerinin yoğun olarak bulunduğu bölgelerde görülmektedir. CpG adacıkları, 500 baz çiftinden büyük ve GC içeriğinin %55'den fazla olduğu bölgelerdir. Evrimsel süreçte korunmuş olan CpG adacıkları, çoğunlukla genlerin promotor bölgelerinde yer almaktadır ve organizmada sürekli olarak ifade edilmesi gereken *housekeeping* ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları, DNA metilasyonuna karşı dirençli olan bölgelerde yer almaktadırlar. Tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerindeki CpG dizilerinde, DNA metilasyonu yüksektir. Bu bölgelerin metillenmesi durumunda transkripsiyon baskılanmakta ve genom içi hareket engellenerek kromozomun kararlı yapısı korunmaktadır [26,30]. Metillenmiş olan DNA'ya bağlanan repressörler, histon deasetilazlar ile bir kompleks yapı oluşturarak çalışır ve DNA'nın metillenmesi, nükleozom yapısındaki değişimler ve histon asetilasyonu ile bağlantılıdır [36]. DNA metillenmesi hücre farklılaşması, imprinting ve X kromozomu aktivasyonunda rol almaktadır [23,31,35].

Metilasyon ile genler susturulabilmekte ve bu şekilde kromatin yapıları değişebilmektedir. DNA metillenmesi, omurgalılarda transkripsiyonun mekanizmasına bağlı olan kromatin yapısıyla bağlantılı bir mekanizmadır. DNA

metilasyonunun, gen ifadesi üzerindeki etkileri; gen ifadesini baskılama veya gen ifadesini arttırmaya yönelik çift yönlü çalışabilmektedir. DNA metilasyon analiz yöntemleri, DNA dizisindeki sitozinler ve 5-metil sitozinlerin ayırt edilmesine dayandırılmaktadır [29]. Metilasyon haritalama yöntemi ile; transkripsiyon başlangıç bölgelerinde, ekzon ve intronlarda, düzenleyici bölgelerde veya tekrar dizilerinde; DNA metilasyonunun hangi yönde olduğu tespit edilebilmektedir [48].

Çeşitli türlerde embriyonik gelişim aşamasında çeşitli genlerin uzun süreli inaktivasyonunun, DNA metilasyonu ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Fare ve Arabidopsis bitkisi gibi farklı iki organizmada, metilasyonu sağlayan enzimlerin bulunmaması ile DNA metilasyonunda yetersizliğin oluşması ve embriyonik gelişimde anormalliklere neden olabileceği tespit edilmiştir. Genlerde meydana gelen bir metilasyon genler bölünmeye devam ettikçe oluşan diğer genlerde de izlerini göstermektedir [31,35]. Metilasyon enzimleri, DNA zincirinin, metillenmiş olan DNA bölgeleri üzerinde çalışmakta, böylece DNA replikasyonunun her aşamasının ardından, kardeş zincir doğru bir şekilde metillenmektedir. Bu mekanizma ile, metilasyon kalıpları aktarılır ve özelleşmiş dokuları meydana getiren hücreler, embriyonik gelişim aşamasında oluşan yapıların kimyasal kimliklerini korur. Bu mekanizma ile korunan metilasyon kalıbı, memelilerdeki genomik damgalama mekanizması ile bağlantılı olduğu görülmüştür [23,30].

2.5.4 Kodlamayan RNA'lar

Epigenetik düzenlemeler, aynı zamanda protein kodlamayan RNA'lar yardımıyla da gerçekleşmektedir. Kodlamayan RNA'lar işlevsel bir proteine dönüşmez ancak çeşitli mekanizmalar açısından işlevsel moleküllerdir. Memeli genom dizilimi ve transkripsiyonel ürünlerde, proteinlere çevrilemeyen, ifade edilemeyen RNA'lar görülmüştür. Bu çeşit kodlama yapmayan RNA'ların, hücrede fonksiyonel olarak önemli düzenleyici rolleri olduğu gösterilmiştir [31,37]. Kodlama yapmayan RNA'lardan biri olan, uzun zincir yapılarından oluşan Xist ve HOTAIR örnek verilebilmektedir.

2.6 Memelilerde epigenetik mekanizmalara genel bakış

Memeli organizmalardaki epigenetik sistemler; totipotensi ile meydana gelebilmekte ve tüm hücreler aynı genetik yapılara sahip olmasına rağmen, belirli cinsten hücrelerdeki genlerin aktif forma geçmesi gerekmektedir [30].

Memelilerde yaygın olarak çalışılmış iki çeşit epigenetik olgu belirlenmiştir, bunlar; X kromozomu inaktivasyonu ve belirli bir geni taşıyan kromozomun kökeninin anaya veya babaya ait olmasına bağlı olarak fenotipik ifadenin değişmesi olarak açıklanan Genomik damgalama şeklinde ifade edilmektedir [31].

2.6.1 X Kromozomu inaktivasyon mekanizması

Genel anlamda ifade edilecek olursa X kromozomu inaktivasyonu embriyogenezin erken evresinde seçilen bir X kromozomunun seçilerek inaktive olması ve kalan diğer X kromozomunun aktivitesinin dozajının artması olarak tanımlanabilmekte ve bu olay dişilerde görülmektedir. X inaktivasyonu, özel transkript gen olan, *Xist* ve antisens geni *Tsix* (x-inaktif spesifik transkript) inaktivasyonunun kontrolüne yardımcı olmaktadır [30]. Xi'de *Xist* (X-inaktif spesifik transkript) RNA'sı *Tsix* ekspresyonunun baskılanması, aktif X üzerindeki *Tsix* RNA'sı, *Xist* RNA'sını durdurmaktadır. X kromozomu inaktivasyonu; DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu mekanizmaları aracılığıyla sürdürülmektedir.

Xist, aktif X üzerinde hipermetillenirken, Xi (inaktif X kromozomu) üzerinde metillenmez, bununla birlikte, Xi, CpG (sitozin-guanin dizileri) adacıklarında ve gen promotör bölgelerinde hipermetillenmektedir. Bu inaktivasyon mekanizması; H4 histonunun hipometilasyonunda açığa çıkabilmektedir. DNA metilasyonu, histon asetilasyonu ve histon metilasyon reaksiyonları bağlantılıdır ve *Xist* RNA'sı belirginleşmiş bir yapı olarak bu mekanizmalarda görülmektedir [40,41].

2.5.2 Genomik damgalama mekanizması

Genomik damgalama, soy kökenli, kademeli gen ekspresyonu ile gerçekleşen, epigenetik kromozom modifikasyonlarda yer alan bir gen düzenleme mekanizmasıdır. Damgalanmış genler, ilk olarak 1980'lerde Surani ve arkadaşları tarafından iki erkek

pronükleusundan diploit androjenlerin elde edilmesi ve uygunsuz bir biçimde gelişmiş iki dişi pronükleusundan diploit ovumlar elde edilmesiyle nükleer transplantasyon çalışmalarının ardından hipotez haline getirilmiştir. İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (Igf2) ve insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (Igf2r) tespit edilmesinin ardından, fare ve insanda 83 damgalanmış gen tespit edilmiştir ve bunların 29'u ise her iki türde ortak olduğu saptanmıştır [30,42,43].

Genomik damgalanmanın ilk keşfinden itibaren, fare ve insanda toplamda, 83 damgalanmış gen tespit edilmiş ve bunların 29'unun fare ve insanda ortak olduğu görülmüştür [31,42]. Damgalanmış gen mutasyonu; kanser duyarlılığını arttırmasının yanında, çocuklar da görülen ve genetik bir hastalık olan Prader-Willi sendromu, nörojenetik bir rahatsızlık olan Angelman sendromu ve aşırı büyüme sendromu olarak isimlendirilen Beckwith Wiedemann sendromu da dahil olmak üzere çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca damgalı Igf2 kaybının, barsak tümörlerinin gelişimine pozitif etki gösterdiği ve kolorektal kanserli hastaların normal mukozasında da bulunabileceği anlaşılmıştır [41,43].

2.7 Epigenetik modifikasyonlar ve kanser ilişkisi

DNA'nın yapısının anlaşılması ve fonksiyonlarının tespit edilmesi yeni bir çağın başlangıcı olmuştur. Genetik bilimi sayesinde hastalıklarda nedensel etkileri olan genlerin genom üzerindeki yerleri tespit edilebilmekte böylece potansiyel tedavi yöntemlerinin gelişmesinin önü açılmaktadır. Ancak DNA ile ilgili bu bilgiler, gen düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaları ve buna bağlı hastalık gelişim süreçlerini tamamen açıklamaya yetmemektedir. Bu bağlamda epigenetik olgu ortaya çıkmaktadır [44].

Gen düzenlenmesinin anlaşılması, hücrelerin farklılaşma ya da kanserojen hale gelme mekanizmalarının anlaşılmasında önemlidirler. Hücre farklılaşması ve farklı gen ifadesi oluşmasında epigenetik mekanizmaların büyük ölçüde önemi bulunmaktadır [46]. Hücrelerde gen aktivasyonunu etkileyen, çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin sonucunda farklı seleksiyonel fenotipler ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple, oluşan farklı fenotipler kanser oluşumunu tetikleyebilmektedir [47]. Hanahan

ve Weinberg (2000) yaptıkları bir çalışmada, kanser fenotipinin temel özelliklerini şu şekilde sıralamışlardır; çoğalmaya ve farklılaşmaya neden olan sinyallere duyarsızlık (hücre savunma mekanizmasında bulunan sinyaller), sürekli çoğalabilme, apoptozdan kaçabilme, doku invazyonu(yayılma) ve metastaz olarak belirlemişlerdir. Epigenetik mekanizmalar geri dönüşümlü, geçici veya dönüşümsüz olabilmektedir [44].

Epigenetik mekanizmalardaki bozulmalar gen ifadesinde aşırı artmaya veya aşırı baskılanmaya bağlı olarak başta kanser olmak üzere, birçok hastalıkla bağlantılı olabilmektedir [48,49].

Son yıllarda insan kanser türlerinde yapılan ekzom dizinleme çalışmalarında, dizilerde epigenomu kontrol eden genlerde çok sayıda mutasyon olduğu gözlenmiş, epigenomun gen kontrol mekanizmaları arasında en etkili olduğu düşünülürse, mutasyonların kanser fenotipini ortaya çıkaracak çok sayıda yolak üzerinde etkili olduğu ve oluşabilecek en küçük mutasyonun bile geniş çaplı, geri dönüştürülemez bir düzenlenmeye neden olabileceği düşünülebilmektedir [45]. Bu nedenle kanser hem genetik hem de epigenetik süreçlerdeki değişimlerden oluşan komplike bir hastalıktır. Onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi durumlar, kontrolsüz hücre büyümesi ve hücrel metastaz yapabilme yeteneğine sahip olan kanser hücrelerinin oluşmasına yol açabilmektedir [50]. Bu durumların DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve nükleozomların yeniden modellenmesini içeren kromatin yapıları ile kodlamayan RNA'lar tarafından düzenlenen bir epigenetik süreçten oluştuğu belirlenmiştir [50].

Kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta, epigenetik bir etiyoloji görülmesi, “epigenetik tedavi olarak” adlandırılabilir yeni terapötik kavramının gelişmesini teşvik etmiştir. Bundan yola çıkarak örnek verecek olursak; DNA üzerindeki metilasyon modellerini veya histonların modifikasyonunu değiştiren çeşitli terapötik ajanlar belirlenmiştir. Bu terapötiklerin çoğu klinikte test edilmektedir [48].

2.8. Kanserdeki epigenetik düzenlemelere bakış

2.8.1. DNA Metilasyonu ve Epigenetik Modifikasyonlar

Metilasyon, genomun düzenlenmesinde ve genomun gelişmesinde görevli, epigenetik mekanizmalar açısından iyi tanınmaktadır [52]. DNA metilasyonunun spesifik olarak iki görevi bulunmaktadır; gen ifadesinin baskılanması ve bununla birlikte genomun yapısal bütünlüğünün korunmasıdır. Son yıllarda kanserin erken teşhisi ve tedavisinde metilasyon mekanizmasından yararlanılmaktadır. Ayrıca kanser araştırmalarında DNA metilasyonunun önemi büyüktür [53]. DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişkiye, ilk kez 1983 yılında değinilmiştir. Kanserli hücre genomlarının normal hücre genomlarına göre hipometile bir yapı olduğu gösterilmiştir. DNA'nın hipometilasyonunun ise onkogenleri aktive etme ve transpozon hareketliliğini arttırma gibi görevleri bulunmaktadır. Bu süreçlerin genomik kararsızlığa neden olması kanser oluşumu ile sonuçlanmaktadır [54].

DNA'da bulunan CpG adacıklarının metilasyon düzeyindeki değişikliklerin kanser ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Örnek verilecek olursa; Costello ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada; çalışılan hücrenin DNA'sında bulunan CpG adacıklarının kanser hücrelerinde ileri derece *de novo* metilasyon veya anormal hipermetilasyona uğradığı gösterilmiştir. Ayrıca metilasyon durumunun ve gerçekleşme miktarının, tümör türlerine göre de farklılaştığı belirlenmiştir. Yaptıkları bu çalışmada, göğüs, kolon, baş, boyun, testis gibi primitif nöroektodermal tümör (PNET) tiplerini incelemişlerdir. Tümör tiplerindeki metilasyon seviyelerinde farklılıklar görülmüş ve farklı tümör tiplerinde CpG adacıklarında ileri derece görülen metilasyonun rastgele gerçekleşmediği düşünülmüştür. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde ise; meme, baş, boyun ve testis tümörlerinde metilasyon düzeyi düşük bulunmuştur, fakat yapılan istatistiksel analizlerde testiste bulunan metilasyon seviyesinin istatistiksel olarak önemsenmeyecek derecede olduğu belirlenmiştir. Kolon, glioma, akut miyeloid lösemi ve PNET'te ise metilasyon düzeyi istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. DNMT1'in insanda karakterize edilen ilk metiltransferaz enzimi olduğu bilinmektedir [55] ve kanser çalışmalarında, özellikle kolon kanserinde DNMT1'in ifadesinin arttığı buna bağlı olarak DNA metilasyon seviyesini değiştirdiği görülmüştür [59]. Sonuç olarak görülmüştür ki, DNA metilasyonu ile ilişkili bu enzim ve proteinlerin ekspresyonundaki değişimler kanser oluşumunu ve kanser gelişimini tetikleyebilmektedir.

2.8.2. Histon modifikasyonları

DNA molekülü, histon ve histon olmayan proteinlerle sarılı kromatin olarak adlandırılan bir nükleoprotein yapıdadır [56]. Histon modifikasyonları, genlerin translasyon sonrasında düzenlenmelerinde önemli rolleri bulunmaktadır, bu translasyon sonrası modifikasyonlar arasında asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, glikolizasyon, sumalasyon vb. sayılabilmektedir. Histon modifikasyonlarına bakıldığında; hücre bölünmesinde DNA onarımı ve replikasyonu, gen transkripsiyonu, heterokromatin oluşumu ve X kromozomu inaktivasyonu gibi epigenetik mekanizmalarda rolleri bulunmaktadır [57]. Bu modifikasyon değişimlerinin kanserle bağlantısı, kromatin immünopresipitasyon teknolojisi ile saptanmıştır [58]. Bunun yanında, modifikasyonlarda “yerine koyma” ve “uzaklaştırma” –dan sorumlu olan aynı zamanda epigenetik belirteç görevi olan birçok enzim tanımlanmıştır; bu enzimler arasında histon asetiltransferaz (HATs) ve deasetiltransferaz (DHACs) enzimleri görülmektedir. Histonların uç kısımlarına asetil grupları ve metil gruplarının eklenmesi ayrıca bu grupların uçlarından bu grupların uzaklaştırılmalarında görev almaktadırlar [60].

Kanser hücrelerindeki, histon modifikasyonlarını düzenleyen mekanizmalardaki hatalar sonucu, onkogenlerin istenmeyen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktive olmasına neden olmaktadır. Histon temel yapılarında meydana gelen modifikasyonlara baktığımız zaman, metilasyonlar genellikle histonların lizin ve arjinin temel yapılarında olduğu görülmüştür, ayrıca bu modifikasyonların kromatin düzeyini ve gen transkripsiyonunu etkilediği görülmüştür. Yapılan çalışmalarla, histon H4 proteininin 20. lizin temel yapısında meydana gelen asetilasyon ve 16. lizin temel yapısındaki asetilasyon kaybının kanser hücrelerinde gözlenen karakteristik bir durum olduğu saptanmıştır [58]. Bir diğer modifikasyon örneği verecek olursak, H4K20 (histon H4’ün 20. Lizin temel yapısındaki)’deki metilasyon; kromatin yapısının baskılanmasına neden olmaktadır. Tekrarlanan DNA dizinlerinde meydana gelen azalmaların, DNA metilasyonuna bağlı olduğu [62] ve histon asetilasyonunun; histon asetiltransferaz (HATs) ve histon deasetiltransferaz enzimleri tarafından kontrol edilen bir mekanizma olduğu belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışmada, HATs proteininin

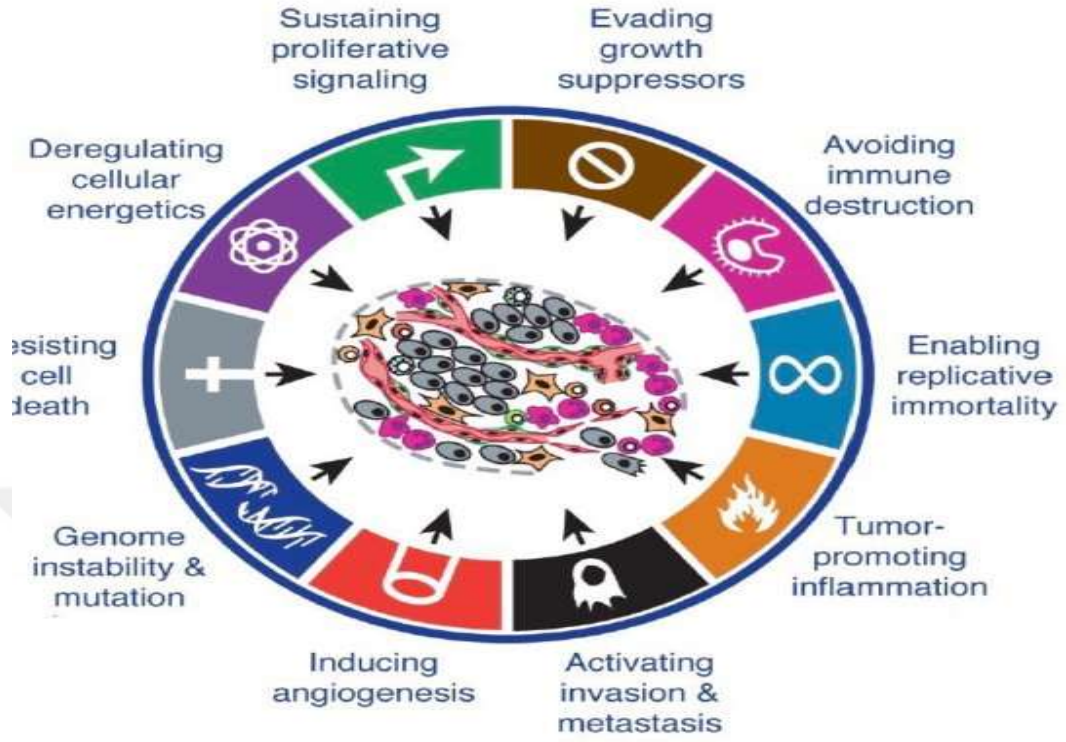
meme kanserinde ileri derece fonksiyonu bulunduğu gösterilmiştir. Bu proteinlere örnek olarak: p300/CBP ve NCOAs proteinleri, örnek verilebilir ve bu proteinler, H3K56 (H3 56. Lizin temel yapısı) proteinlerini asetile edebilmektedirler ve H3K56, kromatin toplanması ve DNA onarım mekanizmalarında yer alabilmektedir [63].

2.8.3 Kodlamayan RNA'lar

Hücre içinde sentezlenen RNA'lardan % 98'i proteine çevrilemez ve bu RNA moleküllerinin % 70'i intronlardan oluşmaktadır. miRNA'lar, onkogen ve tümör süpressör genlerin ekspresyonunda işlev görürler [64], miRNA'lara örnek vermek gerekirse; "miR-21", kötü huylu kanser tiplerinde (glioblastoma, meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri) fazla miktarda sentezleri tespit edilmiştir, başka bir örnek ise "miR-34a", delesyonunun, prostat kanserinin metastazının ilerlemesinde etkili olduğu görülmüştür [65]. Ayrıca miRNA dışında uzun kodlamayan RNA dizileri de (lncRNAs) bulunmakta, onkogenik ve tümör baskılayıcı genlerin sinyal yollarında rol alabilmektedirler. Bu RNA'lara örnek vermek gerekirse; onkogenik lncRNA; *lincR-NA-HOTAIR*'dır ve memeli *homebox C (HOXC)* geninin lokusunda yer almaktadırlar, bu lncRNA'lardan olan, *HOTAIR* birincil metastatik meme kanserinde ileri seviyede ifadeleri görülmüştür. Bu nedenle, *HOTAIR*'ın ekspresyon miktarı birincil meme kanseri tanısında önemli bir belirteç olarak düşünülmektedir [66].

2.9 Kanser ve Kanser Biyolojisine Genel Bakış

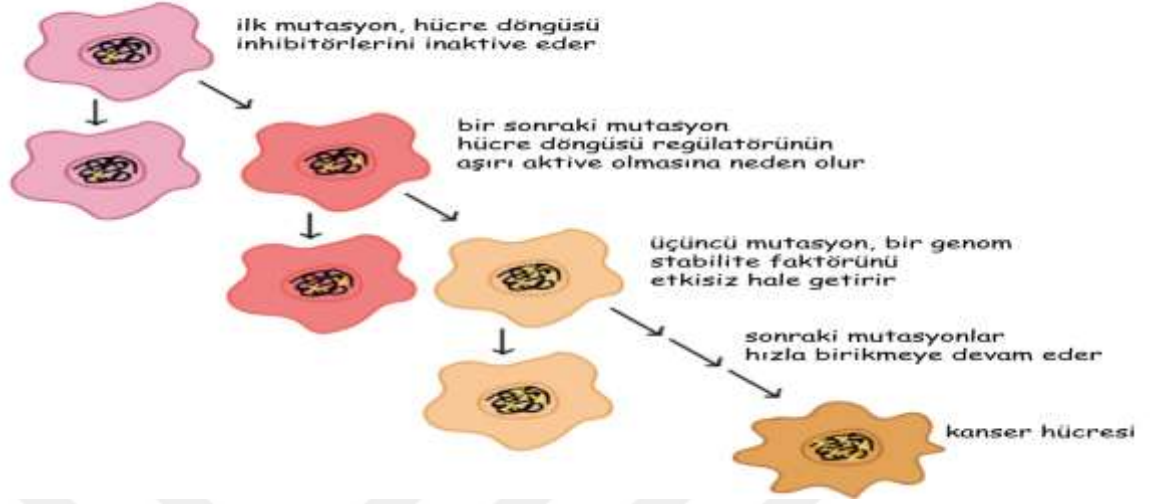
KontROLSÜZ büyüme gösteren hücrelerin sınırsız bir şekilde çoğalmasına kanserleşme, oluşan hücreye kanser hücresi denmektedir. Kanser hücreleri somatik veya genetik olabilmektedir [66]. Kanserler, DNA dizilerindeki birtakım anormallikler görülmesiyle oluşmaktadırlar. Kanserlerin % 10-15'inin, kalıtsal olduğu, kalan % 85-90'lık kısmının ise DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, DNA'daki progressif değişiklikler ve replikasyonlarla meydana gelen hatalar sonucu şekillendiği düşünülmektedir. Bu göstermektedir ki bu hücrelerinin sınırsız büyümesini ve kendisiyle aynı yapıda kanser klonlarının oluşmasını sağlamaktadır. Şekil 2.10'a bakıldığında kanser oluşumunun etkili olduğu faktörler gösterilmektedir.



Şekil 2.10: Kansereleşme ve kanserin meydana getirdiği durumlar [83]

Kanser; multifaktöriyel bir karaktere sahiptir ve birçok etken kanser oluşumunda görev almaktadır, bunlara örnek olarak; bakteriler, virüsler, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar örnek olarak verilebilmektedir [69-74]. Şekil 2.11'e bakıldığında kansereleşmenin basamakları ve hangi mutasyonların gerçekleştiği gösterilmektedir.

KANSERE YOL AÇAN VARSAYIMSAL MUTASYON DİZİSİ:



Şekil 2.11: Genel olarak kanser oluşumundaki gerçekleşen mutasyon evreleri ve mekanizmalar gösterilmektedir [83].

Kalıtım aracılığıyla kanser oluşma olasılığı çevresel faktörler ile kıyaslandığında çok daha az olmaktadır, bunun dışında; genlerin, çeşitli hastalıklara karşı yatkınlığa sebepleri hala araştırma konusudur. Tümör baskılayıcı genlerde oluşan bir mutasyon veya bozulma, kalıtsal bir şekilde aktarılabilme aynı zamanda sigara gibi çevresel bir karsinojen, kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Aynı zamanda çevresel etkenler kansere yatkınlığı da arttırabilmektedir. Çeşitli kanser türlerinde o kansere neden olabilecek genlerin kalıtsal olarak geçtiği tespit edilmiştir (meme kanseri ve yumurtalık kanseri). Lösemiler gibi ve çocuklukta ortaya çıkabilecek bazı tümörlerin (Wilms tümörü, retinablastoma) kalıtsal özellikte olabileceği görülmüştür.

Önceden de değindiğimiz gibi, çevresel olarak birçok kimyasal, kansere sebebiyet vermesinin yanında kanserli bir hücrenin derecesini ileriye çekebilmektedir. Bu faktörlere örnek vermek gerekirse; ilaçlar, yağlı yiyecekler, çeşitli küfler (alfatoksinler), iyottan fakir diyetler, kırmızı et açısından zengin diyetler, yanmış yağları içeren besinler, kansere sebebiyet veren ve onu ileri taşıyabilen önemli çevresel faktör örnekleri arasında yer almaktadırlar, Kimyasal faktörlere örnek verecek olursak; sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar, naftalin ve asbest, sayılabilmektedir.

Kanser oluşumunu tetikleyen fiziksel etkenler arasında; radyasyon (iyonize radyasyon), ısı, güneş ışığı, mekanik darbeler, yer almaktadır. Örneğin, iyonize radyasyon direkt olarak canlıya temas ettiğinde, biyolojik makromoleküllerden elektron kopartabilir veya pozitif yükleyebilir [74-76]. Bu yüklenmeler DNA’da tek ve çift zincir kırıkları oluşumuna veya organik bazlarda ya da şekerde modifikasyonlara neden olmakta ve böylece hücrelerin kanserleşmeye gitmesiyle sonuçlanmaktadır.

Kansere sebep olan faktör arasında serbest radikaller de yer almaktadır. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeriği bulundurduklarından yüksek reaktiviteye sahiptirler. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikal/reaktif olarak, reaktif oksijenler türleri (ROS) görülmektedir. ROS’un kanser oluşumunun farklı evrelerinde etkinliği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [73,77]. ROS sisteminin aşırı derecede yüklenmesi ve kritik seviyeye gelmesi sonucu hücre hasarı oluşturarak kanserleşmeye neden olabilmektedir [74].

Halliwell’e göre ROS’un temel iki mekanizması bulunmaktadır, bunlardan birincisi; hidroksil reaktifleri ile yapı oluşturup DNA’larda zincir kırıkları oluşturma, çeşitli baz modifikasyonlarına ve deoksiriboz şekerde fragmentasyonlara neden olabilme olarak açıklamıştır; ikincisi ise, oksidatif stres sonucu oluşan endonükleazların inaktive edilmesi ve böylece DNA fragmentasyonları oluşumuna neden olmasıdır [78]. Bunun dışında ROS çeşitli yollarda birçok genin inhibisyon ve aktivasyonunda etkili olması (inhibisyon, apoptoz) nedeniyle kansinomayı destekleyebilmektedir [78,79].

Sonuç olarak, kanser, hücrenin genetik yapısında çeşitli etmenlerle değişimin veya mutasyonun olmasıdır. Ayrıca kanserin çoklu, yani kompleks bir mekanizma olduğunu düşünürsek, sadece bir gen mutasyonu ile değil de birden fazla gen mutasyonunun birlikte görülmesi durumunda oluştuğunu söyleyebiliriz.

2.10 Kanser Genetiği

Kanser, genel anlamda hücrelerin kontrol mekanizmalarında ve çeşitli yollarında meydana gelen mutasyonlar veya modifikasyonlar sonucu sınırsız çoğalabilme yeteneği kazanma olayına denmektedir [80].

2.10.1. Kanser Genetiğinde Bilinmesi Gereken Temel Kavramlar

1. “Germline” Mutasyonlar: Ovaryum veya testislerde (Gonadlar) bulunan germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlardır, bu mutasyonu taşıyan bireyler, bu mutasyonları bir sonraki nesil olan çocuklarına geçirebilmektedirler. Fakat geçen bu mutasyonlar çocukların yalnızca germ hücrelerinde değil aynı zamanda somatik (vücut hücreleri) hücrelerinde de görüleceğinden kalıtsal olarak oluşan kanserlerin temelinde germline mutasyonlar bulunabilmektedir.

2. Somatik Mutasyonlar: Germ hücreleri dışında kalan ve vücutta bulunan diğer bütün hücrelerin tamamına somatik hücre denmektedir ve bu hücrelerde meydana gelen mutasyonlara somatik mutasyonlar denmektedir. Bu mutasyonlar sadece görüldükleri bireylerde etki göstermektedirler yani diğer nesile aktarılamamaktadırlar. Kısacası kalıtsal olmayan, sporadik gelişen kanserlerin temelinde somatik mutasyonlar bulunabilmektedir.

3. Proto-onkogenler: Onkogenik kapasitedeki genlerin çeşitli tetikleyici mutasyonlar ile onkogene dönüşmesi ve kanser hücrelerinin oluşumunda rol alması kanser oluşumunda bu genlerin yer aldığı çeşitli sinyal yollarında bozulmalarla ilişkilidir. Proto-onkogenlerin hücre içerisinde çeşitli işlevleri bulunmaktadır [81]. Bunlar:

- Transkripsiyon faktörlerini düzenleme,
- Büyüme faktörü ve büyüme faktör reseptörlerinin kontrolünde işlev sahibi olma,
- Apoptozun baskılanmasını yönetme,
- Kromatinin modifiye edilmesinde görevli olma,
- Hücre içi sinyal iletimini denetleme,
- Membranla ilişkili G proteinlerinin düzeni, olarak özetlenebilir.

Bu işlevleri sırasında bir proto-onkogen tetikleyici bir mutasyona uğraması sonucunda onkogen formuna geçebilmektedir.

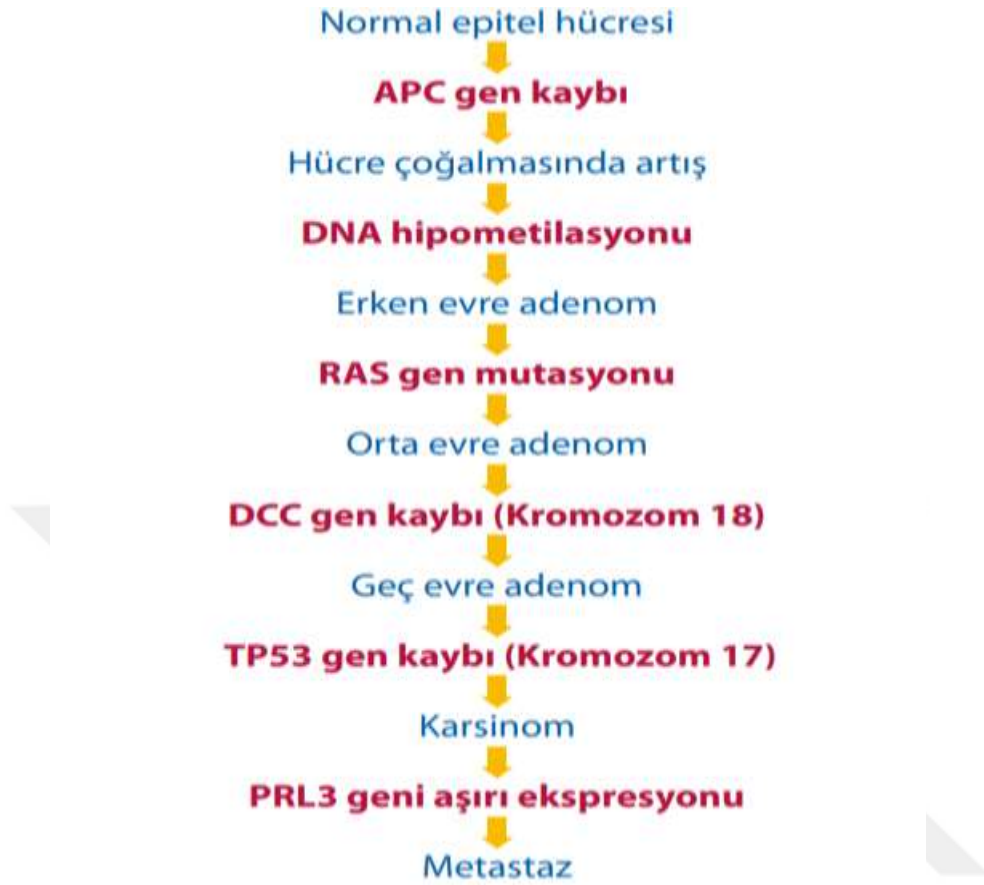
4. Tümör Süpressör Genler: Hücre çoğalmasını baskılayıcı yönde rol oynayan genler olarak bahsedilebilirler, hücre proliferasyonunun doğrudan baskılanmasında rolü olan genlere gatekeeper (bekçi) genler denmektedir ve bekçi hücreler hücre döngüsünü denetleyerek sorun olması durumunda hücreyi apoptoza yönlendirmekle

yükümlüdürler, örnek olarak *TP53* geni örnek verilebilmektedir [82]. Bu genler dışında dolaylı etki gösteren caretaker (bakıcı) hücrelerde bulunmaktadır ve bu genler genom bütünlüğünün korunmasında ve DNA tamir mekanizmalarında mutasyon engellemekle yükümlü genlerdir yani bu genler bir mutasyon olması sonucu DNA dizilerinde; onarımda aksamalar ve genom kırıkları ve baz kayıpları oluşabilmektedir. Tablo 2.1'e baktığımızda; Çeşitli tümör süpressör gen tipleri ve hangi kanserlerde görüldükleri ile ilgili bilgiler yer almaktadır.

Tablo 2.1: Çeşitli tümör süpressör genler ve hangi tip kanserlerde bulundukları (kalıtsal-sporadik) gösterilmektedir. TSG: Tümör Süpressör Gen.

Tümör süpresör genin tipi	Gen	Kalıtsal kanser	Sporadik kanser
Hücre bölünmesi kontrolü (Bekçi tipi TSG)	RB1	Retinoblastoma	Bir çok sporadik kanser
	VHL	Von Hippel Lindau hastalığı	Böbrek tümörü, merkezi sinir sistemi hemanjiyoblastoması
	NF1	Nörofibromatozis tip 1	Malin periferik sinir kılıfı tümörü
	NF2	Nörofibromatozis tip 2	Meningiom
	APC	Familyal adenomatöz polipozis	Kolorektal kanser
DNA tamir genleri (Bakıcı tipi TSG)	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Hereditör non-polipozis kolon kanseri	Kolon, mide, endometriyum kanseri
	BRCA1, BRCA2	Hereditör meme/over kanseri	Over ve meme kanseri
Apoptozis genleri	TP53	Li-Fraumeni sendromu	Bir çok sporadik kanser
	P16	Ailesel melanoma	Bir çok sporadik kanser

5. Onkogeneiz Mekanizmaları: Hücre kanserleşme aşamasına geçerken hücre içi çeşitli yollarda çeşitli mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu süreçteki mekanizmalarda görevli olan genler proto-onkogenik veya tümör süpressör rollerde olmaktadır. Ayrıca kanser olgusunu değerlendirecek olursak; kanser genellikle tek bir gen mutasyonuna bağlı değil, birçok gen mutasyonu sonucu oluşan multiple (kompleks) bir mekanizmadır [83]. Şekil 2.12'ye baktığımızda; Kolon kanserinin tek bir mutasyonla değil de birçok gen mutasyonunu birlikte olması nedeniyle ortaya çıktığı gösterilmiştir.



Şekil 2.12: Kolon kanserinde evreler arasındaki geçişte hangi genlerde hangi mutasyonların olduğu ve metastaz aşamasına varıncaya kadar hangi aşamalar geçirdiği gösterilmektedir [değiştirilerek alınmıştır, 83].

Bu süreçlerde oluşan mutasyonlar kendiliğinden veya diğer gen mutasyonlarına bağlı olarak da oluşabilmektedirler.

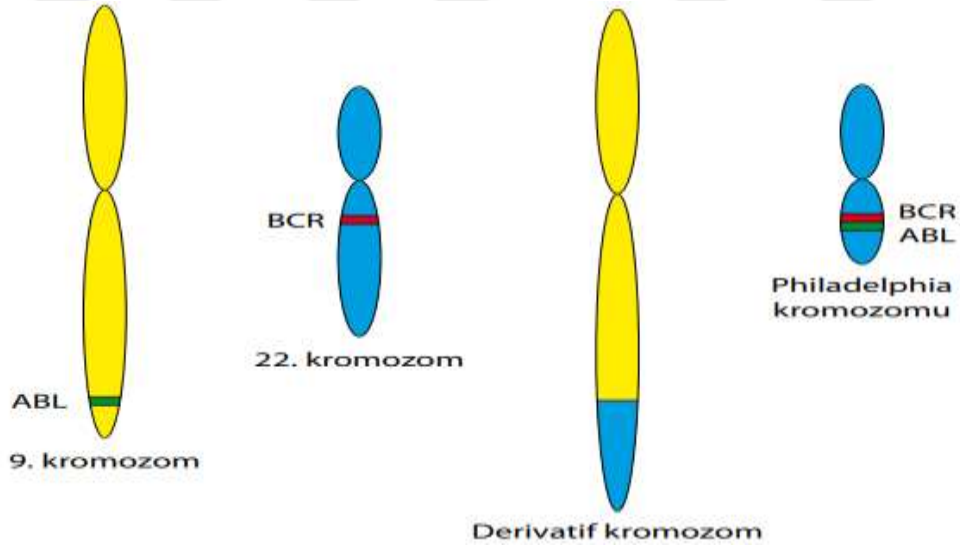
2.10.2 Kanserde Onkogenik Aktivasyon

Onkogenik aktivasyon mekanizmaları nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeleri ve gen amplifikasyon/fazla gen ekspresyonları şeklinde açıklanabilmektedir.

Örnek verecek olursak; *RAS* proto-onkogenleri hücre proliferasyonunda rol alan genlerdir ve p21 adlı proteinin kodlanmasında sorumludurlar, bu genlerde meydana gelen bir nokta mutasyon ile p21 olarak isimlendirdiğimiz proteinler sürekli aktif halde

kalırlar ve bu mutasyon sonucunda hücre kanserleşmeye gidebilmektedir (kolon, akciğer, pankreas kanseri gibi) [84].

Çeşitli translokasyonlar, bazı durumlarda proto-onkogenin, farklı kromozomlara taşınması ve ekspresyon düzeyinin değişmesine yol açabilmektedir ve bazı durumlarda bu gerçekleşen olayda çeşitli sendromlar ve hücrelerde kanserleşme görülebilmektedir. Örnek verecek olursak; kronik myelositler lösemide (KML) kromozom 9 ve 22 arasında gelişen ve Philadelphia kromozomu (Ph1) oluşumu ile sonuçlanan t(9;22) translokasyonda, tirozin kinaz aktivitesi olan ABL geni, kromozom 22q'da bulunan ve görevi tam olarak bilinmeyen “*breakpoint cluster region*” (BCR) genleriyle birleşmektedirler [85]. Oluşan kimerik gen yapısında, tirozin kinaz aktivitesi ile güçlü bir füzyon proteini sentezlenmektedir. Ancak KML gelişiminde asıl rolü, artan protein kinaz aktivitesi göstermektedir. Şekil 2.13'e bakıldığında; Bahsedilen Philadelphia kromozomu oluşum mekanizmasıyla 22. ve 9. kromozomlardaki değişimler gösterilmektedir.



Şekil 2.13: 9. ve 22. kromozomların birbirleri arasındaki translokazasyon ile Philadelphia kromozomunun oluşumu [85]

Onkogenez sürecinde bazı durumlarda çeşitli DNA segmentleri çoğalım gösterebilmektedir ve o segmentler de yar alan proto-onkogenlerin yüzlerce kopyası oluşmaktadır. Bu oluşan kopya genlerde genoma eklenerek hücrenin kanserleşmesine

neden olabilmektedir. Örneğin; *MYC*, *CCND1*, *EGFR* ve *RAS* gibi proto-onkogenler küçük hücreli karsinom, meme kanseri, özefagus kanseri, serviks kanseri ve over kanserleri gibi çeşitli kanserlerde amplifiye olmaktadır [81].

Ayrıca bu amplifiye olan segmentleri FISH (floresan in-situ hibridizasyon) tekniği ve çeşitli immünohistokimyasal teknikler ile boyayarak göstermek mümkündür. Tablo 2.2'ye baktığımızda; Çeşitli onkogenler, bu onkogenlerin hangi kanser tiplerinde ve hangi rolde işlev yaptıklarını anlatılmaktadır.

Tablo 2.2: Kanser oluşum ve gelişiminde rolü olan çeşitli onkogenler, aktivasyon mekanizmaları, hangi kanser tipinde nasıl işlev gördükleri gösterilmek istenmiştir.

Onkogen	Kanser tipi	Aktivasyon mekanizması	İşlev
N-MYC	Nöroblastoma, akciğer kanseri	DNA amplifikasyonu	Transkripsiyon faktörü
BCL-2	B hücreli lenfoma	Kromozomal translokasyon	Antiapoptotik etki
ALL1(MLL)	ALL veya AML	Kromozomal translokasyon	Kromatin modifikasyonu
V-SIS	Gliom/fibrosarkom	Aşırı ekspresyon	Büyüme faktörü (PDGF β alt ünitesi)
RET	Medüller tiroid kanseri	Nokta mutasyonu	Büyüme faktör reseptörü (membran tirozin kinazı)
ABL	KML	Kromozomal translokasyon	Sinyal iletimi (sitoplazmik protein kinaz)
K-RAS	AML, tiroid, kolon kanseri	Nokta mutasyonu	Membranla ilişkili G proteini (GTPaz aktivite)

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi; AML: Akut Miyeloblastik Lösemi; KML: Kronik Miyeloblastik Lösemi; PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (trombosit kökenli büyüme faktörü).

2.11 Kanserde Sinyal Yolakları

Hücre içinde sinyal iletiminden, hücre bölünmesinden vb. işlemlerden sorumlu olan çeşitli yollarda mutasyonlar ve modifikasyonlar olması durumunda kanserleşme olabilmektedirler ve bunun sonucunda çeşitli yapılar ortaya çıkabilmekte ve sinyal yolunda yer alan genlerde işlev değişikliği görülebilmektedir [86].

Kanserde görevli çeşitli sinyal yolları bulunmaktadır. MAPK sinyal yolağı, PI3k yolağı, NFkB sinyal yolağı, JAK/STAT yolağı ve Hedgehog yolları bunlara örnek verilebilmektedir. Tablo 2.3'e baktığımızda; kanserdeki çeşitli yollar, bu yolların hangi kanserlerde görevli olduğu, yollardaki onkogen, proto-onkogenler ve etkileri açıklanmaktadır.

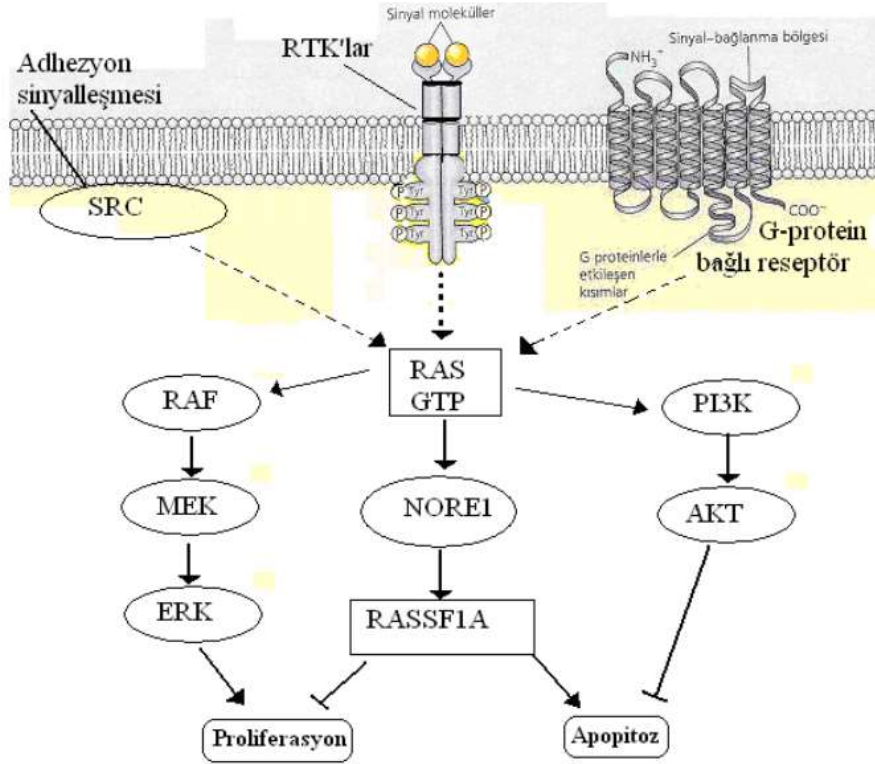
Tablo 2.3: Kanserde etkili olan çeşitli sinyal yolları, bu sinyal yollarındaki görevli olan çeşitli genler, bu genlerin görevleri ve hangi kanserlerde etkili oldukları gösterilmektedir.

Yolak veya Ağ	Görüldüğü Kanserler	Yolaktaki onkogen proteinler	Yolaktaki Tümör süpresörler	Açıklama
MAPK Yolağı (Standart)	Birçok	RAS,BRAF, (MYC)		Onkogenik reseptör tirozin kinazların efektörleridir
PI3K Yolağı	Birçok	PI3K, AKT	PTEN,CTMP	Onkogenik reseptör tirozin kinazların efektörleridir
TP53 ağı	Birçok	MDM2/HDM2	TP53,ATM,BAX	
RB1 ağı	Birçok	Cyclin D1,CDK4, (MYC)	RB1,p16 ^{INK4A} , p15 ^{INK4B} , p57 ^{KIP2}	
TGFβ Yolağı	Karsinomlar, bazı yumuşak doku kanserleri, bazı lösemiler		TGFβRII, SMAD2, SMAD4, RUNX	Karsinomda inaktive olmuş, yumuşak doku kanserinde aktive olmuştur.
JAK/STAT Yolağı	Bazı karsinomlar, birçok lösemi ve lenfomada	STAT3, STAT5(?)	STAT1(?), SOCS1	Onkogenik Sitokin Reseptörleri ve füzyon proteinlerinin efektörleridir
NFκB Yolağı	Bazı lösemiler, birçok karsinomlar	REL proteinleri	CYLD	Etki büyük oranda hücre tipi ve içeriğine bağlıdır.
WNT Yolağı	Kolon,karaciğer,meme ,mide ve diğer karsinomlarda	WNT1, β-Catenin	APC,AXIN	E-Kaderin ve SFRP'lerce modüle edilir
SHH Yolağı	Spesifik deri,beyin ve akciğer kanserleri	SHH(?),SMO, GLI1(?)	PTCH1,PTCH2 SUFU	
NOTCH Yolağı	T-hücre lenfomaları, karsinomlar	NOTCH1	NOTCH1	Etki büyük oranda hücre tipi, içeriği ve gen dozajına bağlıdır.

2.11.1. MAPK Sinyal Yolağı ve Kanser

MAPK sinyal yolağı hücre proliferasyonu için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerinden oluşan bir yoldur. Genel olarak bu yolak hücre büyümesi, hücre sinyal iletimi ve gen ekspresyonunda görevli bir sistemdir. Bu yolak çeşitli ekstrasellüler ve intrasellüler uyaranlar tarafından da aktive edilebilmesinin yanında genel olarak reseptör tirozin kinazlarca (RTK) aktive edilmektedir. Tümör

hücrelerinde, RTK'lar veya RAS'ın onkogenik aktivasyonu ile MAPK yolağında sinyalleşme artmaktadır. Aynı zamanda bu yolak altı benzer modülden oluşmaktadır ve bu modüllerin görevlerini birbirine benzetmekle birlikte; hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre farklılaşması, spesifik hücre fonksiyonlarının uyarılması gibi görevleri bulunmaktadır. Ancak bu yolaklarda bulunan bu modüller tek başlarına işlev gösterememektedirler, yani modüller yolak üzerinde birbirlerini ve başka segmentlerinde aracılığıyla işlevlerini gösterebilmektedirler. Şekil 2.14'e baktığımızda; MAPK sinyal yolağında yer alan modüllerin birlikte ve sinerjistik çalışmaları gösterilmektedir.

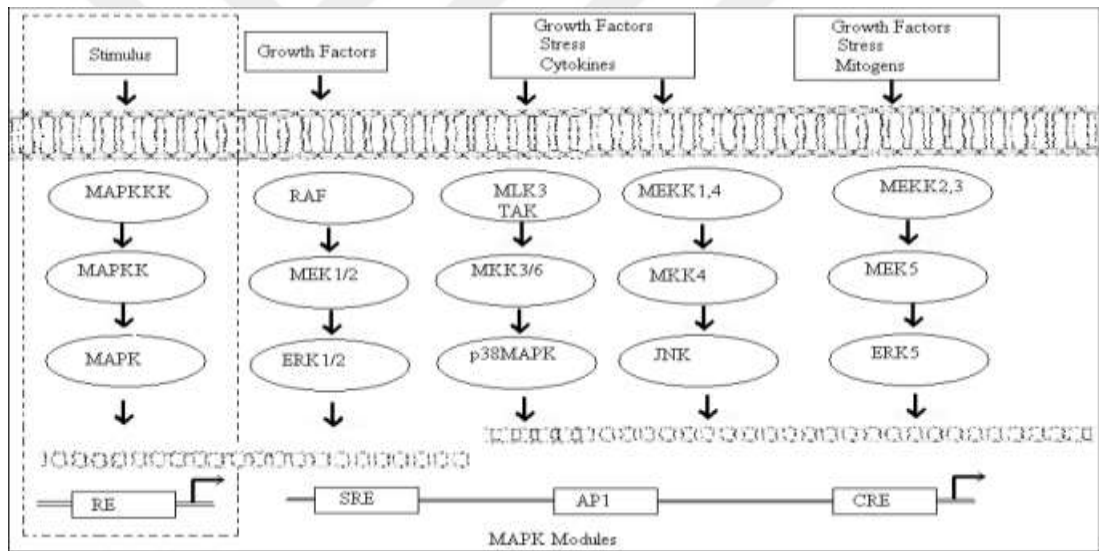


Şekil 2.14: MAPK sinyal yolağında yer alan modülleri ve bu modüllerin birbirlerine etkileri ve bağlantıları [86].

Yolağın aktivasyon mekanizması genel olarak; UV ışınları ile ısıma, strese bağlı ısı değişimi ve RAS proteinleri aracılığıyla aktive edilmektedir. Bunun yanında RAC

veya CDC42 gibi hücre adezyon molekülleri, çeşitli GTP-bağlayıcı proteinler ve MEKK 1,2 veya 3 gibi proteinler aracılığıyla da aktive edilebilmektedir. Bu yolak aktivasyonu ile genellikle oluşan durum hücre proliferasyonunun durdurulması yönünde gerçekleşmektedir. Bunun yanında apoptozun uyarılması ve tüm sistemin içinde örnek olarak; JNK yolağının azalan aktivasyonunun çeşitli kanser gelişimlerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu bilgilere ek olarak, ERK-MAPK yolağı tarafından JUN proteinleri transkripsiyonel olarak uyarılırken; JNK-MAPK yolağının aktivasyonu ile fosforile olurlar.

Şekil 2.15'e bakıldığında; RAS aktivasyonu için gerekli olan, ERK, MAPK, JNK yollarının hangi sinyaller ile uyarıldığı ve yolların basamakları gösterilmiştir.

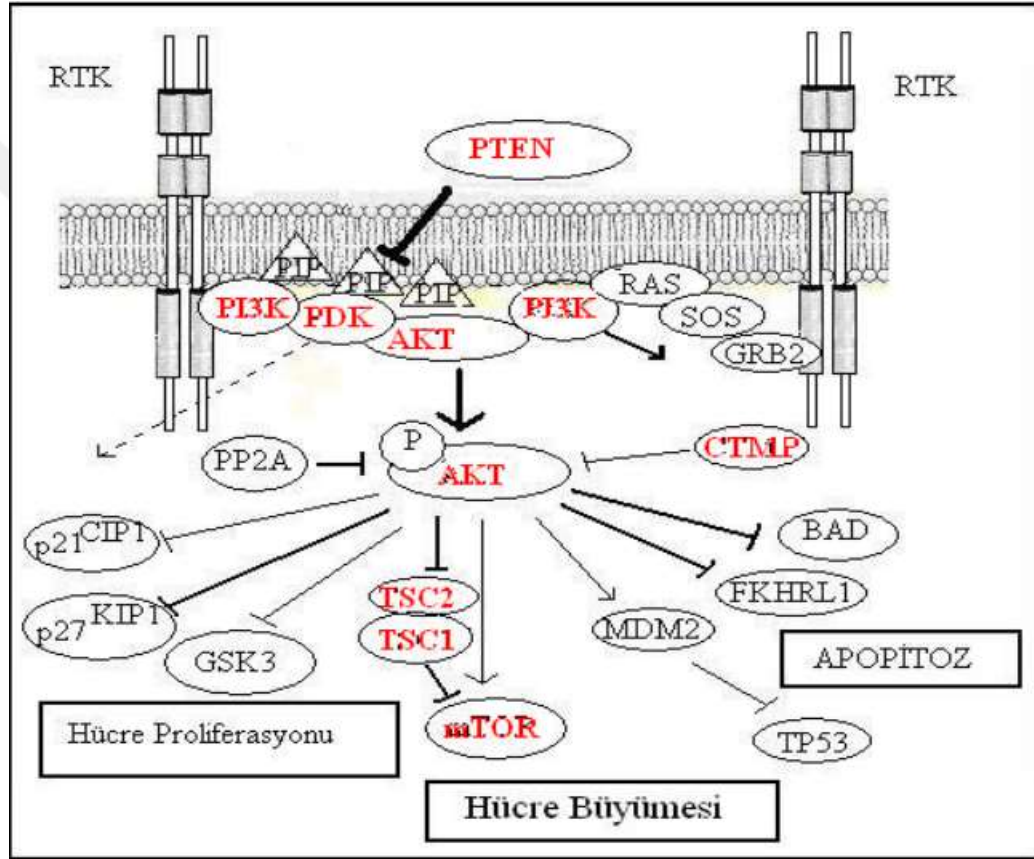


Şekil 2.15: RAS aktivasyonu için gerekli olan; ERK, MAPK, JNK yollarının hangi sinyaller ile uyarıldığı ve bu yollarındaki basamaklar [86].

RAS proteinleri, reseptör tirozin kinazlara sinyal iletiminde aracılık etmenin yanında, serpentin reseptörü aracılı G-proteinleri aracılığıyla sitokinlere ve hormonal sinyallere cevap vermede de görev almaktadırlar. Bu bilgilere de bakarak MAPK sinyal yolağı; PI3K sinyal yolağı ve daha birçok kanser yolağının da aktivitesini, RAS'ta dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla da düzenleyebilmektedir.

2.11.2. PI3K Sinyal Yolağı ve Kanser

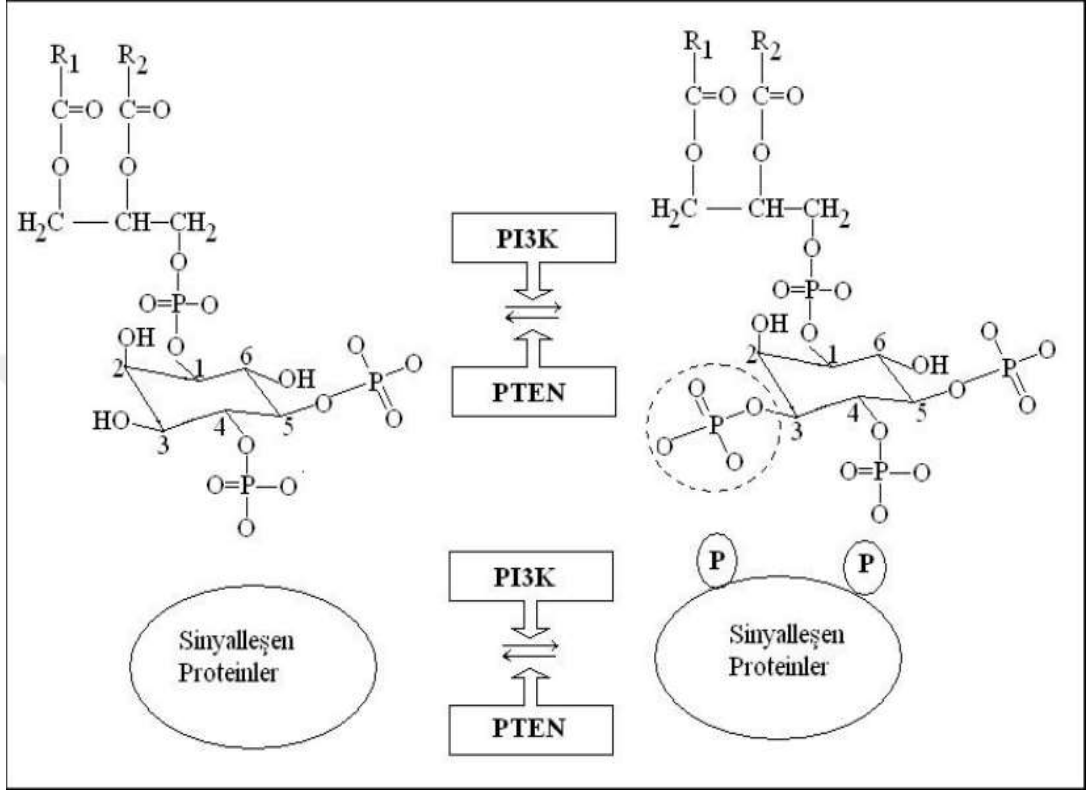
PI3K yolağının genel manada, hücrel metabolizmanın kontrolünde; glukoz transportasyonu ve kullanım aşamalarında, hücre büyümesinde, protein biyosentezi ve apoptoz mekanizmasını önlemede fonksiyon göstermektedir. Bu yolak, RAS proteinleri ve aktif olan reseptör tirozin kinazlar tarafından uyarılmaktadır. Şekil 2.16'ya bakıldığında; PI3K yolağının etki ettiği mekanizmaları ve bu yolak üzerinde yer alan ve görevli olan ara yapılar gösterilmektedir.



Şekil 2.16: PI3K yolağının genel hatları ve PI3K yolağının etki ettiği mekanizmalar (Hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve apoptoz), bu yolak üzerinde yer alan ve görevli olan ara yapılar [86].

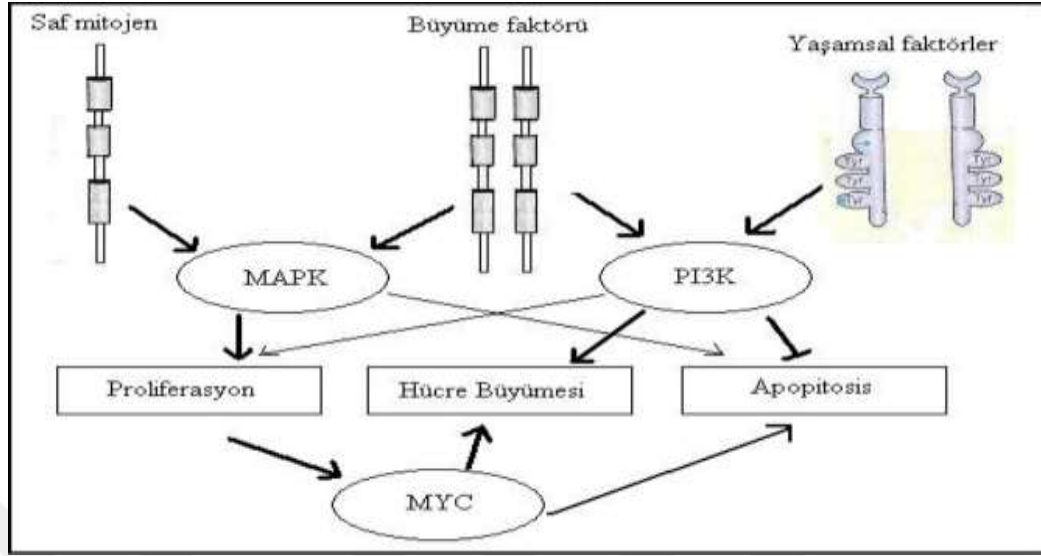
Bu yolakta görevli olan PTEN tümör süpressör yapıdaki temel bir inhibitör bileşeni olarak görev almaktadır. Bunun haricinde TSC1 ve TSC2 olarak adlandırılan sendrom etkili iki protein yapısı yolağın ara basamaklarında işlev görmektedirler. Bu yolağın ana molekülü olan PI3K, çeşitli kanserlerde amplifiye olduğu için onkogenik bir

protein olarak belirlenmiştir. Şekil 2.17'ye baktığımızda; PI3K yolağı ve PTEN yolaklarının katalizledikleri reaksiyonlar gösterilmektedir.



Şekil 2.17: PI3K yolağı ve PTEN yolaklarının katalizledikleri reaksiyonlar ve sinyalleşen molekülde meydana gelen değişimler [86].

Bu mekanizmalara ek olarak, Cyclin D1 ve MYC yapılarını fosforile ederek inhibisyonuna neden olur ve böylece hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Şekil 2.18'e baktığımızda; MAPK sinyal yolağı ve PI3K sinyal yolağının MYC 'in etki ettiği; hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmalarına etkileri gösterilmektedir.



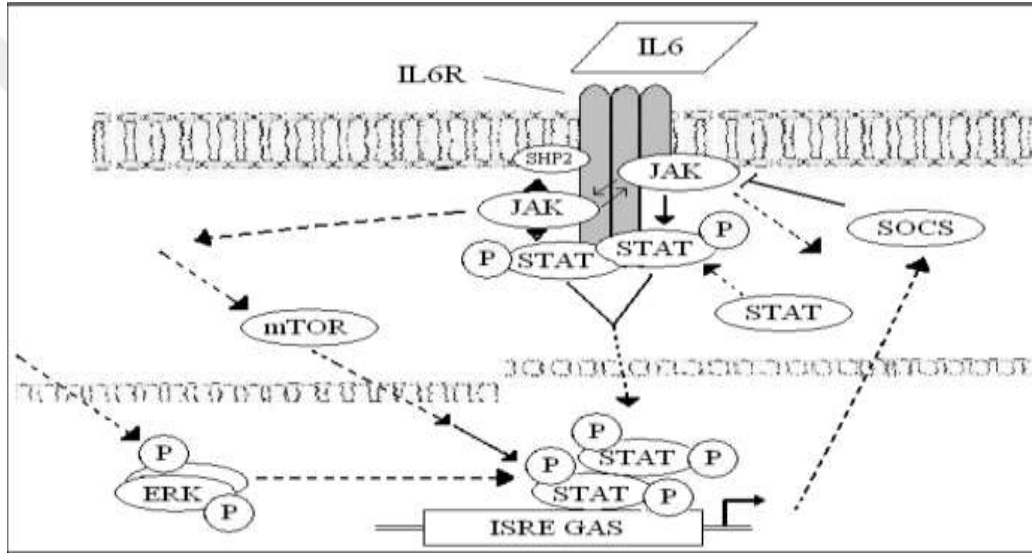
Şekil 2.18: MAPK sinyal yolağı ve PI3K sinyal yolağının MYC ‘in etki ettiği; hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkileri [86].

MAPK sinyal yolağı hücre proliferasyonunu uyaramaktadır ancak bu işlemi yapmak için PI3K yolağında olduğu gibi çeşitli yardımcı sinyallere ihtiyaç duymaktadır. Bu proliferasyonun uyarılmasında MAPK ve PI3K yolağının birbirleri ile koordineli ve sinerjistik olarak çalışmaları gerekmektedir. Örneğin, PI3K yolağında görevli olan insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF1 ve IGF2 gibi) bu yolağı uyarmakta ve aktifleşen bu yolak MAPK yolağında yer alan gerekli predominant büyüme faktörlerinin aktifleşmesini sağlamakta ve birlikte çalışarak hücre proliferasyonda yer almaktadırlar. Bu iki yolağın birlikte çalışması sonucu temel inhibitör bileşeni olan PTEN’in fonksiyonel yapısı bozulabilmektedir.

2.11.3. JAK/STAT Sinyal Yolağı ve Kanser

JAK/STAT yolağı çeşitli insan kanserinde istemeyen sonuçların çıkmasına neden olmaktadır. Bu yolağın işlevlerinden bazıları hematopoetik hücre sistemlerinde STAT sinyal yolunu uyarma, interlökinler ve çeşitli hücre tiplerine spesifik olan büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinleri uyarmaktır (Örn; GM-CSF ve ertiropoietine cevap olarak hücre proliferasyonunun uyarılması verilebilir). JAK/STAT yolağı; epitelyal hücrelerden salınan SRC, ABL kinazlar tarafından salınan sinyaller ve EGF, sitokin IL-6 gibi faktörlerin aktiviteleri ile aktive olmaktadır. Aynı zamanda hematolojik

kanserlerde JAK/STAT yolağının yapısal aktivasyonu bulunmaktadır. Örneğin; baş ve boyun kanserinde, EGFR'nin aşırı ekspresyonu neticesinde JAK/STAT yolağının aktive olduğu belirlenmiştir, ayrıca bu yolak içindeki en aktif molekül olarak STAT3 belirlenmiştir. Çeşitli kanserlerde, JAK/STAT yolağının interferonların inhibisyonu ile baskılandığı görülmüş ve bu baskılamada yolakta bulunan STAT1'in bağlantısı tespit edilmiştir. Şekil 2.19'a baktığımızda; JAK/STAT yolağının, bu yolak için aktivatör özellikte olan IL-6 molekülleri (büyüme faktörleri) aracılığıyla aktivasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.19: JAK/STAT yolağının, bu yolak için aktivatör özellikte olan IL-6 büyüme faktörleri aracılığıyla aktivasyonu [86].

JAK/STAT yolağında bulunan STAT sinyalleri, hücre membranında fosforile edilmekte ve transkripsiyon faktörleri olarak görev alabilmektedirler, ayrıca bu STAT'lar çeşitli fosfotirozinler (JAK1 ve JAK2) tarafından SH2 domainleri için bağlanma bölgesi olarak görev alabilmektedirler. Fakat bu yolağın asıl aktifleşme mekanizması adının da olduğu gibi STAT sinyal mekanizmalarının JAK reseptörüne bağlanması ile aktifleşen bir sistemden oluşmaktadır. Aktifleşen STAT'lar hücre çekirdeğine homodimer veya heterodimer formda geçerek, hedef gen promotör bölgesindeki spesifik olan tanıma bölgelerine bağlanarak işlev göstermektedirler.

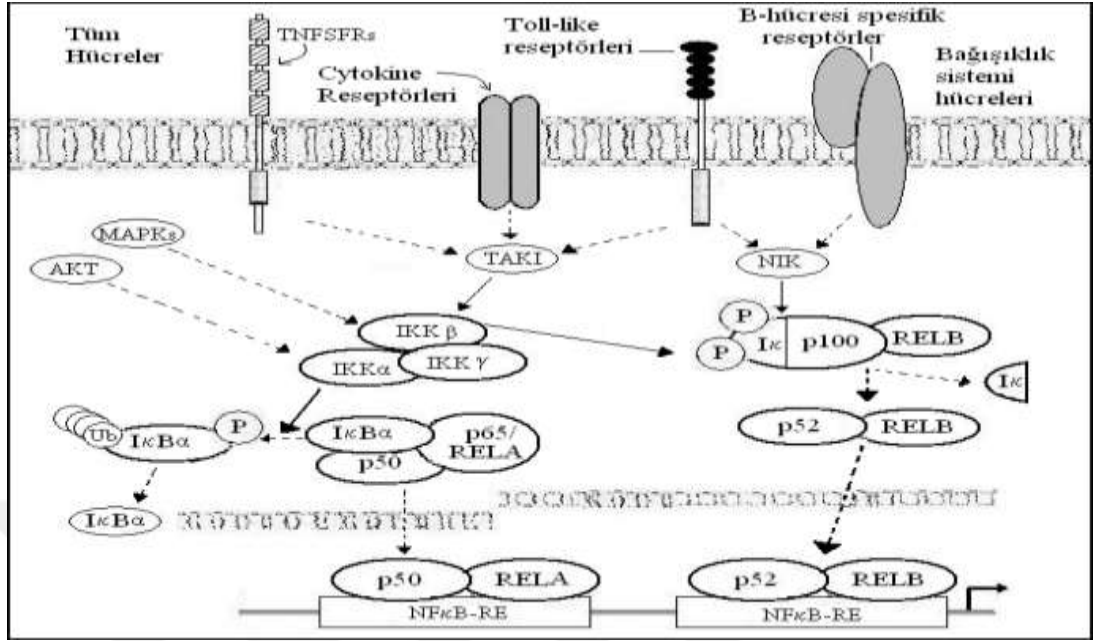
Bunların yanında STAT aktivitesi; MAPK ve PI3K yolaklarında bulunan kinazlarca çapraz regülasyona maruz bırakılabilmektedirler [86,87].

Farklı hematolojik karsinomlarda, JAK/STAT yolağının aktifleşmesi farklı yollarla olabilmektedir. Örn: bazı kanserlerde (lösemi veya kemik iliği kanseri), STAT faktörleri, BCR-ABL gibi füzyon proteinleri tarafından direk olarak uyarılması ile, JAK/STAT sinyal yolu aktifleşmiş olmaktadır.

2.11.4. NF- κ B Sinyal Yolağı ve Kanser

NF- κ B yolağının aktifleşmesi tek başına kanser oluşumunu ve gelişimini uyaramamaktadır, bu yolağın öncelikli fonksiyonu lenfoid hücrelerin; inflamasyonunun aktivasyonu ve apoptozlarının aktivasyonu olarak saptanmıştır, fakat bazı hücre çeşitlerinde; sitokinelere özel yanıtta proliferasyonun düzenlenmesinde etkili olabilmektedirler.

NF- κ B biri büyük (REL) diğerleri ise daha küçük olacak şekilde (p50, p52) alt ünitelerden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Alt ünitelerinden büyük olanının üç çeşidi bulunmaktadır; RELA, RELB ve C-REL. Bunlar arasında en yaygın olarak görüleni RELA, diğer bir adıyla p65 olarak belirlenmiştir. Bunların yanında bu transkripsiyon faktörleri en etkili faktörler olarak belirlenmişlerdir. Ayrıca, RELA ve C-REL birleşerek oluşturduğu heterodimer yapılar; bir inhibitör protein olan IKB'ler tarafından sitoplazma da tutulmaktadır. Şekil 2.20'ye baktığımızda; NF κ B yolaklarının iletişim mekanizmaları, bu yolakta görev alan ana yapılar (yolakta görevli reseptörler) ve bu yolağın işleyiş mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.20: NFκB yollarının iletişim mekanizmaları, bu yolda görev alan ana yapılar ve ara moleküller, bu yolağa bağlı olan reseptör molekülleri ile birlikte; bu yolağın işleyiş mekanizması [86].

Birçok hücre tipinde NF-κB yolağının aktivasyonu; apoptozu düzenleyen, TNFRSF reseptörleri tarafından sağlanmakta ve bu aktivasyon STAT faktörlerine ilave olarak NF-κB faktörlerinin ve MAPK yolağının birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir. NF-κB faktörlerinin hedef genleri dört grupta incelenebilmektedir: *MYC*, *CCND1*, *BCL-XL* ve *FLIP*.

Bu yolağın aktivasyonu, inflamasyon ve kronik inflamasyon için gereklidir. Bununla birlikte NFκB, kanser metastazında proliferasyonu etkileyebilmektedir. NFκB yolağının aktivasyonunu, TNFα gibi sitokinler aracılığıyla, TNF alt ünitesini de-ubikitine ederek düzenlemektedir.

2.11.5 Hedgehog (Hh) Sinyal Yolağı

Hh sinyal yolağı, Hh ligandının hedef hücre üzerinde bulunan Patched'e bağlanmasıyla aktifleşen bir mekanizmadır, PTCH yokluğunda ise hücre membran çıkıntılarında bulunan silyum adı verilen yapılar tarafından fiziksel ve kimyasal olarak bu aktifleşme işlemi sağlanmaktadır [88-90]. Bu mekanizmada, PTCH reseptör molekülleri, onkogenik bir protein olan, Smoothened (Smo) tarafından baskılanmaktadır, ancak PTCH reseptörü, mekanizmanın kanserleşmeye gitmemesi için Smo'yu baskılamaktadır, eğer PTCH reseptör proteinleri Smo onkogenik proteinlerini baskılayamaması durumunda hücrenin kanserleşme mekanizması devreye girmektedir. Smo'nun üç alt birimi bulunmaktadır; inaktif SmoA, inaktif SmoB ve silyum bağlı SmoB olmak üzere adlandırılmaktadırlar [91-93]. Hh sinyali GLI (çinko parmak proteinleri) transkripsiyon faktörlerinin aktivatör ve inhibitör formları arasındaki iletişimle sisteme iletilmektedir ve bu sinyal iletiminde SuFu (Suppressor of fused) adı verilen bir protein kompleksinin önemli bir görevi bulunmaktadır, bu görev onkogenik olan GLI ile bağlanarak sistemin kanserleşmeye gitmesini engellemek olarak tanımlanabilmektedir. Bunun dışında bahsettiğimiz GLI proteinlerinin 3 alt ünitesi bulunmaktadır; GLI 1, GLI2 ve GLI 3 olarak adlandırılmaktadırlar, GLI1 ekspresyonu ile hedgehog sinyali arasında kuvvetli bir bağ bulunduğundan bu yolaktaki en etkili faktör olarak GLI1 gösterilebilmektedir [67,94].

Paralog hedgehog ligandı yokluğunda PTCH yapıları Smo aktivitesini bloke ederek, GLI protein komplekslerinin parçalanmasına neden olur ve böylece reseptör GLI yapılarının oluşmasını sağlamaktadır. Bu mekanizma ile hedgehog hedef genleri baskılanmaktadır. Bunun yanında hedgehog sinyalinin PTCH'e bağlanması durumunda PTCH inhibisyonuna ve böylece PTCH'nin Smo'yu baskılama mekanizması ortadan kalkmaktadır. Bunun ardından kanserleşme sistemini baskılamakla görevli SuFu ve GLI kompleksi birbirinden ayrılır ve GLI'lar aktifleşir. GLI aktivasyonunda düzenlenmesinde çeşitli yapılar görevlidir; Dyrk1, RAS ve AKT gibi aktive edici yapıların oluşturduğu kompleks tarafından düzenlenmektedir [69,97].

Aktif forma geçen GLI'lar hücre çekirdeğine bağlanarak hedgehog'a cevap vermesi gereken hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadırlar [95,99-104]. Şekil 2.21'e

Hedgehog sinyal yolağının anormal bir şekilde aktivasyonunun kanser oluşumu üzerinde etkili olduğu son yıllarda yapılan klinik çalışmalar ile tespit edilmiştir, bunun yanında kanser oluşum ve gelişimi açısından hedgehog sinyal yolağı ile ilgili üç model öne çıkmaktadır:

1. Tip 1 Hedgehog Sinyali: Ligandla İlişkisiz, Mutasyona Bağlı Gerçekleşme

Gorlin sendromunda, *PTCH1* geninde meydana gelen mutasyonlar gözlenmiştir, incelenen olgularda hayatları boyunca çok sayıda bazal hücreli karsinoma geliştiği görülmüştür, buna bağlı olarak medullablastoma ve rabdomiyosarkoma gibi çeşitli kanserlerin gelişim riskinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca sporadik bazal hücreli karsinomların %85'inde *PTCH*'yi inaktive edici mutasyonlar olduğu, %10'da ise onkogenik Smo'yu aktifleştirmeye yönelik olduğu saptanmıştır [105-107].

Sporadik medullablastomaların %33'ünde, rabdomiyosarkomlarda genellikle *PTCH* mutasyonları görülürken, bunun yanında SuFu mutasyonları ve artmış hedgehog sinyali de belirlenmiştir [108,109].

Hedgehog sinyalinin bozulması, artmış hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini desteklemektedir, ancak hedgehog inhibitörleri bu kanserleşme ve proliferasyon mekanizmalarında; Smo ve diğer onkogenik yapıları baskılamada büyük rol oynamaktadırlar.

2. Tip 2 Hedgehog Sinyali: Otokrin, Liganda Bağımlı Gerçekleşme

Paralog hedgehog yolağının sınırsız aktivitesi çeşitli kanserlerde belirlenmiştir, bunlara örnek verilecek olursa; akciğer kanseri, mide kanseri, özafagus kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, meme kanseri, karaciğer ve beyin kanserleri bunlar arasında gösterilmektedir [110-115].

Bu şekilde oluşan tümörlerde bazal hücreli kanserlerden ve medullablastomlardan farklı olarak hedgehog sinyal yolağında herhangi bir somatik mutasyon bulunmamaktadır. bu tümörlerdeki genel mekanizmada hedgehog sinyal yolağında anormal aktivasyon görülmekte, artmış hedgehog ligand seviyeleri; *PTCH1* ve *GLI* genlerindeki seviyeleri belirlemektedir. Bu tümörlerin gelişiminin engellenmesinde;

hedghehog antikorları veya Smo antagonistleri tarafından gerçekleştirilebilmektedir [92].

3.Tip 3 Hedghehog Sinyali: Parakrin, Liganda Bağımlı Gerçekleşme

Parakrin mekanizmalarla da kanserleşmeye neden olan hedghehog sinyali olduğu belirlenmiş, hedghehog sinyalinin tümör mikroçevresini etkileyerek onu uyurabileceği görülmüştür.

Parakrin mekanizmalarla oluşan hedghehog sinyali çeşitli hücrel mekanizmalarda klit rol oynamaktadırlar. Buna enbriyogenez aşamasında barsak benzeri epitel yapıların gelişim ve korunması örnek verilebilmektedir. Bu mekanizmayı inceleyecek olursak; epitelyumdan salınan hedghehog ligandı mezenkimal stroma aracılığıyla alınmakta ve bu şekilde mezenkimal epitele bildirim sağlayacak yapıları oluşturmaktadır. Bunun yanında ters parakrin sinyalleri; stromal hücrelerin, kanser oluşumu ve kanser gelişimi için gerekli olan sinyallerin gönderildiği tümörler olarak ifade edilmektedirler [116-121].

2.13. Kanser Kök Hücreleri ve Hedghehog Sinyali Arasındaki Bağlantı

Kanser kök hücreleri sınırsız sayıda kopya hücre üretme özelliğine sahip olan ve ölümsüz olarak tabir edilen hücrelerdir. Ayrıca kanser kök hücreleri etkilerini belirli sinyal yolları üzerinde de gösterebilmektedirler. Örneğin; hedghehog sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, Notch sinyal yolağı ve BMP yolları gibi yolların düzenlenme mekanizmasında mutasyonlar oluşturduğuna ve mekanizmalarda bozulmalar meydana getirdiklerine dair çalışmalar bilinmektedir [121,122].

Çeşitli kanser türlerinde, örnek vermek gerekirse; meme kanseri, glioma ve multiple miyeloma gibi kanserlerde kanser kök hücrelerinin kendilerini yenilemelerini hedghehog sinyalini düzenleyerek sağladıkları, başka bir örnekte ise; kronik miyeloid kanserde ise, kanser kök hücrelerinin yaşam sürmek için hedghehog sinyalini kullandıkları belirlenmiştir. Kanser kök hücrelerinin, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması ve tümör dokularının bu tedavilerle yıkılsa bile kanserin tekrar nüks edebilme durumunu bu bahsettiğimiz kanser kök hücrelerinin neden olduğu

düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerinde hedgehog sinyali aktif formda bulunmaktadır ve klinik tedavilerde kanser kök hücreleri için bu bulunan aktif formun inhibisyon mekanizmaları önemli hedefler olarak görülmektedirler [103,123,124]; bu inhibisyon mekanizmalarına örnek verecek olursak; onkogenik *Smo* geninin susturulması, tümör süpresör olan *PTCH1* genin aktive edilmesi ve hedgehog sinyalinin iletiminin kökten engellenmesi (yolak aktive edilmesinin engellenmesi) örnek verilebilmektedir.

2.14 Kanser Çeşitleri

Meme kanseri, rahim ağzı kanseri, testis kanseri, rahim iç zar kanseri, kalın barsak ve rektum kanseri, idrar yolu kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, ağız kanseri, prostat kanseri, gırtlak kanseri, cilt kanseri, mide kanseri örnek olarak verilebilmektedir. Kanser çeşitleri davranışlarına göre ikiye ayrılmaktadır; malign (kötü huylu) kanser olarak adlandırılır ve bu kanser türlerinde kanser bulunduğu bölgeden metastaz ile farklı dokulara göç ederek farklı dokularda kanserleşmeye neden olmaktadır. Diğerisi ise benign (iyi huylu) dediğimiz kanser çeşididir ve bu kanser türleri bulundukları bölgede kanserleşmeye neden olurlar ancak hiçbir zaman bulundukları bölge dışında kanserleşmeye neden olmaz.

En Sık Görülen Kanser Çeşitlerine Bakış:

Meme kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, kalın barsak kanseri, prostat kanseri, rahim ağzı kanserleri birçok araştırmaya göre günümüzde en sık görülen kanser çeşitleri olarak saptanmışlardır[154,155,156,157].

2.14.1. Mide Kanseri

Mide kanseri, Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) kanserlerde görülme sıklığı sıralamasında, 14. sırada yer alır, A.B.D’de 1999 yılında 22600 mide kanseri olgusu bildirilmiş ve hastaların 13700’ü mide kanseri nedeni dolayısıyla kaybedilmiştir. 1900’lü yıllarda mide kanseri A.B.D’de kanser ölümlerinin başında yer almıştır [125]. Ancak epidemiyolojik verilere bakıldığında; 1930-1970 yılları arasında mide kanseri insidansının azaldığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında; 1930’lu yıllara gelindiğinde

mide kanser insidansının 100.000' de 35 ten, 1970'li yıllara gelindiğinde ise 100.000' de 3'e gerilediği görülmüştür [126]. 1930-1970 yılları arasındaki bu insidans azalmasına bakıldığında daha çok mide kanserinin intestinal cinsinde olduğu görülmüştür, sebebi tam olarak bilinemesi de intestinal cinsin; intestinal metaplazi ve *Helikobakter pilori* (HP) ile ilişkili olması nedeniyle ve tedavilerinin başarılı olması nedeniyle bu yıllar arasındaki insidans azalması açıklanabilmektedir [127,128], fakat diğer tipi olan gastro-özafageal mide kanserinin insidansının ise arttığı tespit edilmiş ve bu insidans artışına neden olarak distal özafageal, mide kanseri ayrımının yapılamamış olması gösterilmiştir, tedavilere değinecek olursak bu iki tip mide kanserinin de tedavileri günümüzde birbirine benzemektedirler.

Mide kanseri erkeklerde daha sık görülmekle birlikte (E/K: 1.7/1.0), insidansı fazla olarak, 6. ve 7. dekatta (60-70'li yaşlar) pik yaptığı görülmüştür ancak mide kanserlerinin iki cinsiyette ve her yaşta olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Yapılan son çalışmalar incelendiğinde erkeklerde mide kanseri görülme dekatlarının yaklaşık olarak 1,5 kat gerilediği görülmüştür.

Mide kanserinin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, ancak mide kanseri gelişiminde etkili olan çeşitli risk faktörleri Tablo 2.4'te tanımlanmıştır [129-131].

Tablo 2.4: Mide kanser oluşumunda ve gelişiminde etkili olan risk faktörleri tabloda örneklenmiştir.

Helikobakter pilori	Pernisiyöz anemi
İleri yaş	Sigara
Erkek cinsiyet	Menetrier hastalığı
Diyet	Ailesel polipozis
Atrofik gastrit	

2.14.1.1. Lokalizasyon

Mide kanseri incelendiğinde, sıklıkla midenin; antrum ve distal 1/3 bölgesinde olmak üzere proksimal mide kanseri insidansı da dahil lokalizasyonun görüldüğü saptanmıştır. Son 10 yıla bakıldığında, mide kanseri lokalizasyonlarının sıklığında

değişiklikler tespit edilmiştir [132]. Ayrıca, distal mide kanseri insidansı azalırken gastro-özofageal kanser insidansında artış olması verilebilmektedir.

2.14.1.2 Prognoz

Mide kanserinde önemli olan prognostik veriler arasında tümörün mide duvarındaki invazyon seviyeleri, bölgesel lenf nod tutulma oranları/seviyeleri ve uzak metastaz varlığı gösterilebilmektedir [133,134], tabi ki bunların yanında tümörün derecesinin/seviyesinin prognozda önemini unutmamak gerekmektedir [135].

Genel olarak mide kanseri cerrahisinden bahsedecek olursak kanser tedavi kürleri %50 olmakla birlikte hastalığın derecesi % 20'nin üstündeki ve buna yakın olan hastalardan bu kür cerrahiden sonra uygulanabilirken, kanseri %80 ve üstü olan hastalarda ise palyatif bakıma başvurulmaktadır. Ayrıca değinmek gerekirse bölgesel mide kanserlerinde uygulanan kemoterapi ile sağkalım oranı doğru orantı gösterirken, metastaz yapan mide kanserlerinde ise bu tedaviler etki göstermemektedirler. Bu nedenle mide kanserleri kötü prognoz grubu arasında belirtilmiştir ve sağkalım oranları metastatik ve bölgesel olanda kıyaslandığında, metastatik olanda sağkalım % 10-15'iken bölgeselde % 50 olarak belirlenmiştir.

2.14.1.3 Patolojisi ve Çeşitleri

Mide kanserlerinin %90-95'inin adeno karsinomdan oluştuğu gözlenmiştir [136,137]. Tablo 2.5'e baktığımızda; Mide kanserlerinin patolojik olarak sınıflandırılması gösterilmektedir.

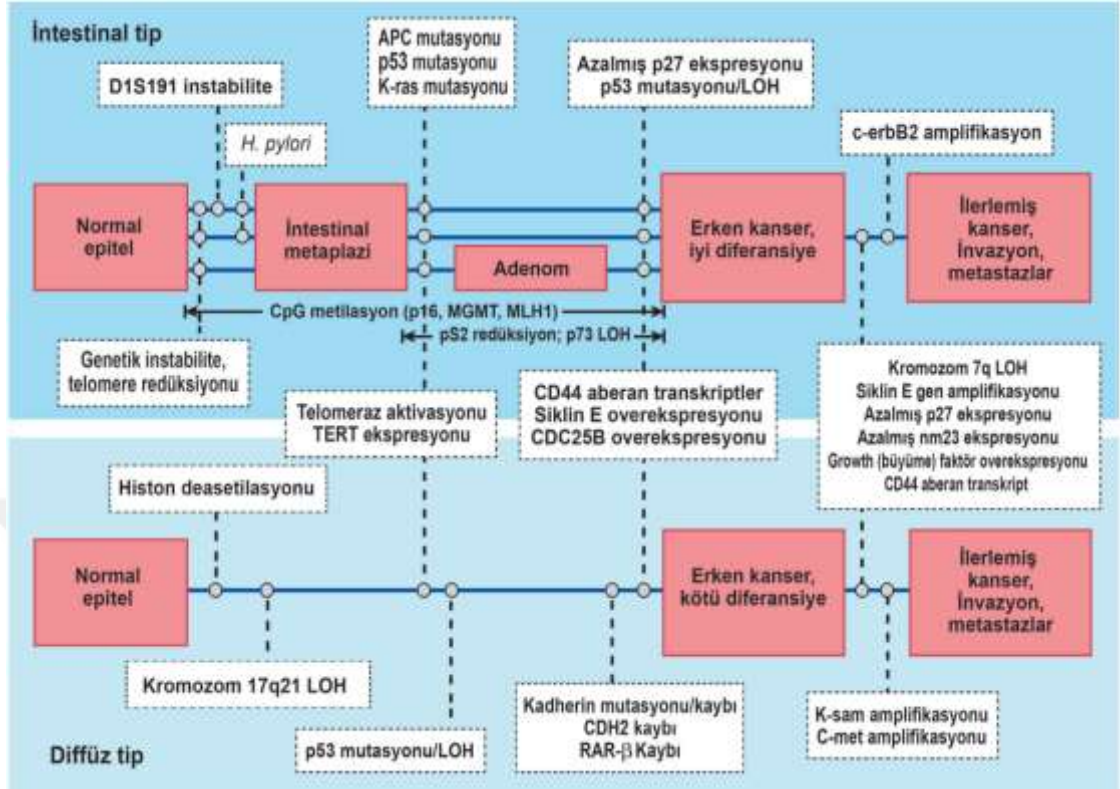
Tablo 2.5: Mide kanserinin histolojik olarak alt tiplerinin bir kısmı gösterilmektedir.

MAKROSKOBİK
Polipoid
Ülseratif
Superfisiyal yayılan
Diffüz yayılan (linitis plastica).
MİKROSKOBİK
İntestinal
Pilorokardiyal (veya antral)
Taşlı yüzük hücreli
Anaplastik (undifferansiye)
DİĞER HİSTOLOJİK TİPLER
Papiller
Musinöz
Adenoskuamoz
Skuamoz
Mix (adenokarsinom ve koryokarsinom)

Gen ekspresyon çalışmaları incelendiğinde, iki farklı moleküler tipte mide kanseri söz konusu olmaktadır [138]. Bunlar incelendiğinde birincisi: Diffüz tip (differansiye olmayan) mide kanseri diğeri ise İntestinal tip (iyi differansiye) mide kanseri olarak incelenmiştir. Diffüz karsinomada asıl neden genetik olaylardan kaynaklanmakta olup, bunlar arasında en önemlisi E-cadherin, intersellüler bağlantıları sağlamada ve epitelyal dokuların organizasyonunda, anahtar protein rolünü oynamaktadır. İntestinal tip mide kanseri, genellikle *H.pilori* ile ilişkilidir ve prognoza bakıldığında diffüz tip mide kanserine göre daha olumludur.

1. Diffüze Mide Kanseri: Metastatik açıdan kuvvetli özelliğe sahip kanser olmakla birlikte, hızlı progresyon gösteren ayrıca kötü prognoza sahip kanser türlerindendir. Mide duvarında, distal özafagus ve duodenuma, invaze olmaktadır.

Bunun yanında intestinal tip mide kanserlerindeki malign tümör riski diffüz tip mide kanserlerinde gözlenmemektedir. Şekil 2.22'ye baktığımızda; İntestinal tip mide kanseri ve diffüz tip mide kanser mekanizmalarında gerçekleşmekte olan olaylar ve mekanizmalarda gerçekleşen olgular gösterilmektedir.



Şekil 2.22 : İntestinal tip mide kanseri ve diffüz tip mide kanser mekanizmaları [138]

2.İntestinal Tip Mide Kanseri: Mide kanser riskini fazla taşıyan toplumlarda daha sık görülürken bu riskin az olduğu toplumlarda görülme oranı daha azdır, bu kanserin biyolojik yapısı genel olarak sporadiktir; heredite, diyetlerin içeriği, sigara alışkanlıkları ve alkol kullanımı gibi çeşitli çevresel faktörler ile etkilenmektedir ve belirlenen dekadlarda görülme sıklığının azaldığı tespit edilmiştir, invazivleşme basamakları komplikedir. Şekil 2.23'e baktığımızda; intestinal tip mide kanserinin ilerleme basamakları ve patogenezi şematize edilmiştir.



Şekil 2.23: İntestinal tip mide kanserinde kanserin gelişme aşamaları ve kanserin çok basamaklı patogenezi [değiştirilerek alınmıştır, 138]

2.14.1.4 Evreleme Sistemi

Mide kanserlerinin evreleme basamaklarında; Amerika Birleşik Kanser Komitesi'ne (AJCC) bağlı TNM sistemi (Tümörde Lenf Nodu Metastaz, değerlendirme sistemi) kullanılmaktadır (Stomach İn: American Joint Committee on Cancer 2002), [139,140]. AJCC' in de yer alan TNM sisteminin mide kanseri üzerindeki evreleme sisteminin genel ve sınıflandırılmış olarak Tablo 2.6'da gösterilmektedir.

Tablo 2.6: Mide kanseri üzerinde AJCC'ye göre olan TNM evreleme sistemi genel ve alt birimleri sınıflara ayrılarak gösterilmektedir

Evre 0 Tis, N0, M0	Evre IIIA T2a, N2, M0
Evre IA T1, N0, M0	T2b, N2, M0
Evre IB T1, N1, M0	T3, N1, M0
T2a, N0, M0	T4, N0, M0
T2b, N0, M0	Evre IIIB T3, N2, M0
Evre II T1, N2, M0	Evre IV T4, N1, M0
T2a, N1, M0	T4, N2, M0
T2b, N1, M0	T4, N3, M0
T3, N0, M0	T1, N3, M0
	T2, N3, M0
	T3, N3, M0
	Any T, any N, M1

Primer Tümör (T) Verileri:TX: Primer tümör değerlendirmesi yapılmamış grup, T0: Primer tümör bulunmayan grup, Tis: İn situ karsinoma: intraepitelyal tümör, T1: Tümör lamina propria veya submukoza' ya invaze etme evresi, T2: Tümör muskularis propria veya subserosa'ya invaze etme evresi, T2a: Tümör muskularis propria'ya invaze etme evresi, T2b: Tümör subserosa'ya invaze etme evresi, T3: Tümör serozal (viseral periton) aşım bulunması durumu (komşu organ invazyonu yok) oluşan evre, T4: Tümörün komşu organlara invaze ettiği ileri seviye evre, olarak belirtilmektedirler.

Bölgesel Lenf Nod (N) Verileri:

Bölgesel lenf nodları genel anlamda; büyük kurvatur ve küçük kurvatur çevresi, sol gastrik, ana hepatik, splenik ve çölyak arter çevrelerinde kodlanmaktadır / bulunmaktadır, ancak bu bölgeler dışında bulunan lenf nodları metastatik olarak belirlenmektedir. Bir operasyonun verimli olabilmesi için en az 15 lenf nodu çıkarılması hedeflenmektedir.

NX: Bölgesel lenf nodu değerlendirmesi yapılmayan hasta grubu, N0: Bölgesel lenf nodu metastazı bulunmayan grup, N1: 1-6 bölgesel lenf nodu metastazı görülen grup, N2: 7-15 bölgesel lenf nodu metastazı görülen grup, N3: 15'ten fazla bölgesel lenf nodu metastazı görülen grup.

İleri Metastaz (M) Verileri:

MX: İleri metastaz değerlendirmesi yapılmayan hasta grubu, M0: İleri metastaz bulunmayan hasta grubu, M1: İleri metastaz bulunan hasta grubu.

2.15 Tedavi Yöntemlerine Genel Bakış

Mide kanserinin primer küratif tedavisi cerrahidir [141-143]. Cerrahi işlem, lenf nod diseksiyonuyla birlikte parsiyel gastrektomi şeklinde uygulanmaktadır. Bu kür amaçlı cerrahi sonrası, lokal ve risk yükü fazla olan yüksek riskli hastalarda adjuvant kemoterapi uygulanırken; metastatik olan hasta gruplarında ise palyatif tedavi uygulanmaktadır ve bu aşamada önerilen tedavi yöntemi olarak kemoterapi

düşünülmektedir. Bunların yanında ise daha nadir olarak uygulanan yöntemler ise radyoterapi ve çeşitli farklı cerrahiler olarak belirtilmektedir. Genel anlamda tedaviler:

+Cerrahi Tedavi,

+Neo-Adjuvant Tedavi,

+Adjuvant Tedavi,

+Metastatik Hastalık Tedavileri,

olarak ayrılabilirler.

3.MATERYAL ve METOD

3.1 Kullanılacak Kitler

- **DNA izolasyonu için:** Thermo Scientific DNA izolasyon Kiti
- **Bisülfid Dönüşümleri için:** Thermo Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kiti
- **RT-qPCR için/ Real Time PCR:** Thermo Scientific Syber Green PCR Kiti
- **ELİSA için:** Human Protein Patched Homolog 1, *PTCH1* ELISA Kit kullandık.

3.2 Cihazlar

- **Buz Makinesi (Scotsman):** -80 °C’ den çıkardığımız örneklerden parça alımında örneklerin bozulmaması için buz kullanmasında



Şekil 3.1: Buz Makinesi

- **İnkübatör (Etüv):** Çalışmamızdaki kullandığımız örneklerin inkübasyon işlemlerini gerçekleştirmek için.



Şekil 3.2: Örneklerin stabilitesini sağlamak için Etüv (inkübatör)

- **Vorteks:** Hazırladığımız çözeltilerin daha iyi karışmasını sağlamak için.



Şekil 3.3: Örneklerin daha iyi karışma ve çözünbilmesi için Vorteks.

- **ELISA Okuyucu:** DNA izolasyonu sonucu elde edilen dokularda 260/280 dalga boylarını incelemek için.



Şekil 3.4: ELISA Okuyucu

- **Shaker:** Kullandığımız örnekleri karıştırdığımız solüsyonlar ile daha iyi çözünebilmesini ve karışmasını sağlamak için.



Şekil 3.5: Örneklerin daha iyi karışabilme ve çözünebilmesi için, karıştırıcı.

- **Santrifüj:** DNA izolasyon aşamasındaki çöktürme ve çözelti içindeki ayrımları sağlamak için.



Şekil 3.6: Çeşitli döndürme hızlarıyla ve belirlenen sürelerde örneklerin fazlarının ayrışmasının sağlanması için santrifüj

- **Real Time PCR:** Amplifikasyona bağlı DNA artışlarını ölçmek için.



Şekil 3.7: Real Time PCR cihazı

- **Konvansiyonel PCR:** Hedef genlerin çoğaltılması için.



Şekil 3.8: Konvansiyonel PCR cihazı

3.3. Çalışma materyali

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Kurulu'ndan onay alınarak (28.07.2021- E 24891) tez çalışması kapsamında kullanılacak mide kanseri dokuları temin edilmiştir.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik değerlendirme ve teşhis konulmuş, mide kanseri bulunan ve gerekli taramalar yapılarak çalışma grubumuza uygun 22 mide kanserli hastadan -80°C dondurulmuş; tümör ve tümör uzak dokuları kullanılmıştır. Çalışmada, 20 mg'dan küçük olacak şekilde ve 1 cm³ hacimde, hastaların tümör ve tümör uzak bölgelerinden alınan doku örnekleri kullanılmıştır.

3.4. Dondurulmuş Dokudan DNA İzolasyonu

- İlk aşama olarak hastalardan elde edilen 20 mg dokulardan olacak 1cm³ şekilde neşter yardımıyla doku örnekleri parçalara ayrılmıştır.
- Alınan doku parçaları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
- Üzerlerine 180 µl digestion solüsyonu eklenmiştir.

- Bu karışım üzerine 20 µl Proteinase K solüsyonu eklenmiştir.
- Vortex yardımıyla bu solüsyon ile örneklerin karışması sağlanmıştır.
- Ardından etüv de 56 °C' de dokular tamamen parçalanarak kalıntı kalmayacak şekilde 90 dk olacak şekilde inkübasyona tabi tutulmuştur.
- İnkübasyon aşamasının ardından karışım üzerine 20 µl olacak şekilde RNAaz A solüsyonu eklenmiştir.
- Vorteks yardımıyla solüsyon ile örneklerin karışımı sağlanmıştır.
- 10 dk olacak şekilde oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 10 dk'lık inkübasyonun ardından karışım üzerine 200 µl olacak şekilde lizis solüsyonu eklenmiştir.
- Vorteks yardımıyla 15'er sn olacak şekilde örnekler karıştırılmıştır.
- Bu aşamanın ardından üzerine 400 µl olacak şekilde %50 etanol eklenmiştir.
- Pipetaj ve vorteks yardımıyla karışması sağlanmıştır.
- Bu işlemin ardından hazırlanan lizat genomik DNA saflaştırma kolonlarına aktarılmıştır.
- 1 dk 6000 g olacak şekilde santrifüje tabi tutulmuştur.
- Ardından saflaştırma kolonlarının altında yer alan koleksiyon tüplerinde oluşan sıvı-kalıntı uzaklaştırılmıştır.
- Saflaştırma kolonu yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.
- Ardından kolon üzerine 500 µl olacak şekilde etanol eklenmiş Wash Buffer I (yıkama tamponu) eklenmiştir.
- 1 dk 8000 g olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Koleksiyon tüpünde oluşan sıvı-kalıntıyı uzaklaştırılmıştır.
- Saflaştırma kolonu yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılmıştır.
- Bu işlemin ardından lizat üzerine etanol eklenmiş Wash Buffer II (yıkama tamponu) eklenmiştir.
- 3 dk 12000 g olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Ardından koleksiyon tüpünde oluşan sıvı-atık uzaklaştırılmıştır.
- Saflaştırma kolonunu yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Bu işlemin ardından üzerine 50-100 µl olacak şekilde Elution Buffer (elüsyon tamponu) eklenmiştir.

- Oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu işlemin ardından 1 dk 8000 g olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Ardından oluşan DNA örnekleri 4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.4.1 İzole Edilen DNA'ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Ölçümleri gerçekleştirilen DNA'larla ilgili hesaplamalar yapılmıştır.

3.5 Bisülfid Dönüşümü

- İlk aşama olarak önceden elde edilen 200-500 ng saflaştırılmış DNA örneği içeren 20 µl DNA örneklerini PCR tüplerine aktarılmıştır.
- Hazırlanan 20 µl'lik DNA örneklerine 120 µl olacak şekilde Modification Reagent Solution (modifikasyon reaktif solüsyonu) eklenmiştir.
- Pipetaj ile tüpün dibine doğru yerleştirilmiştir.
- Hazırlanan PCR tüplerini thermal cycler (termal döngüleyici) yerleştirilmiştir.
- Fazla verim alabilmek için (% 99-98) DNA denatürasyon ve bisülfid dönüşümü için Protokol A kullanılmıştır.
- 98 °C / 10 dk, 60 °C / 150 dk olacak şekilde ardından cihazdan alınan örnekler DNA saflaştırma mikro tüplerine alınmıştır.
- 400 µl olacak şekilde Binding Buffer (bağlama tamponu) eklenmiştir.
- İlk iki aşama sonucu dönüştürülen DNA, bağlama tamponu ile pipet yardımıyla tamamen karıştırılmıştır.
- Toplama tüpüne yerleştirilen mikro kolonu 12000 rpm'de 30 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpünde oluşan sıvı-atık uzaklaştırılmıştır.
- Mikro santrifüj kolonuna etonal ilave edilmiş Wash Buffer (yıkama tamponu) eklenmiştir.
- 12000 rpm'de 30 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Ardından toplama tüpünde oluşan sıvı-atığı uzaklaştırılmıştır.

- Mikro kolona etanol ilave edilmiş Desulfonation Buffer (desulfonat tamponu) eklenmiştir.
- 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu işlemin ardından 12000 rpm’ de 30 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpünde oluşan sıvı-atık uzaklaştırılmıştır.
- Ardından etanol ilave edilmiş Wash Buffer (yıkama tamponu) 200 µl olacak şekilde mikro kolona ilave edilmiştir.
- 12000 rpm’de 30 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpünde oluşan sıvı-atığı uzaklaştırılmıştır.
- Sonrasında etanol ilaveli yıkama tamponundan 200 µl olacak şekilde tekrardan mikro tüpe ilave edilmiştir.
- 12000 rpm’de 60 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Bu işlemin ardından mikro santrifüj kolonunu 1,5 ml’lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Mikro santrifüj kolonuna 10 µl Elution Buffer (elüsyon tamponu) eklenmiştir.
- 12000 rpm’de 60 sn olacak şekilde santrifüj edilmiştir.
- Bu işlemde sonra elüte edilerek dönüştürülen DNA *downstream* analizi için hazır hale getirilmiş forma gelmiştir.
- Bu işlemlerden sonra DNA -20 °C de saklamaya kaldırılmıştır.

3.6 Primer Tasarımı

- *PTCH1* geninde ait promotör bölgelerine özgü primerler tasarlanmıştır.
- Methprimer dizayn programı adlı programdan reverse ve forward primerler tasarlanmıştır.
- Her bir primer çifti için metile ve anmetile primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: *PTCH1* Metile (M) ve anmetile (U), Forward (F), Reverse (R) primer bilgileri gösterilmektedir.

Primer	Dizi Bilgisi	Sıcaklık	%GC
<i>PTCH1</i> MF	AGGTCGTTTGGTATAGGACG	56.7	50.0
<i>PTCH1</i> MR	GAATTCGTATCGATCCCTCG	59.5	50.0
<i>PTCH1</i> UF	GGTTGTTTGGTATAGGATGG	54.4	45.0
<i>PTCH1</i> UR	CAAATTCATATCAATCCCTCAA	57.33	33

- Primerler metile ve unmetile olarak methprimer ile tasarlanmasının ardından Medsantek firmasından alınmıştır.
- Gelen primerlerin ana stoğu 100 ul olmakla birlikte 10 um olacak şekilde ara stoklar hazırlanarak çalışma boyunca kullanılmıştır.

3.7. Real Time PCR (RT-qPCR)

Bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilen örneklerde; mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan hassas bir metottur. İki basamaktan oluşmaktadır bu basamaklar RT reaksiyonu ve PCR amplifikasyonu olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada elimizdeki örnekler PCR işlemini gerçekleştirirken Thermo Syber Green kullanılmıştır, bu şekilde amplifikasyona bağlı DNA artışı belirledik.

Real Time PCR işlemi için gerekli olan bileşenler Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.2: Revers Transkriptaz PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
Maxima 2X qPCR Master Mix	10 ul
F Primer	1 ul
R Primer	1 ul
DNA	1 ul
dH2O	7 ul

Real Time PCR aşamasında gerçekleştirdiğimiz döngüler Tablo 3.3’de gösterilmiştir. PCR reaksiyon döngüleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Revers Transkriptaz PCR reaksiyon döngüsü

Reaksiyon Aşamaları	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	95°C	10 dk
Denatürasyon	95°C	15 sn
Bağlanma	55°C	30 sn
Uzama	72°C	30 sn
Döngü Sayısı	40 Döngü	

3.8 ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- Test için elde bulunan örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Elde bulunan örnekler kitte yazan talimatları gerçekleştirerek sağlanmıştır.
- Test için gerekli olan stripler ayarlanmıştır.
- Standart olan kuyucuklara 50 ul standart çözeltisi eklenmiştir.
- Örnek kuyucuklarına 40 ul örnek eklenmiştir.
- Üzerlerine 10 ul olacak şekilde PTCH1 insan antikoru eklenmiştir.
- Ardından örnek kuyuları ve standart kuyusuna 50 ul olacak şekilde Streptavidin-HRP eklenmiş ve karıştırılmıştır.

- İşlemin ardından 37 °C de 60 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır.
- Bu işlemin ardından kuyuları 5 kez yıkama aşamasından geçirilmiştir.
- Her kuyucuk 300 ul yıkama tamponu ile 30-60 sn arasında maruz bırakılmıştır.
- Bu işlemin ardından her kuyucuğa 50 ul olacak şekilde solüsyon A eklenmiştir.
- Her kuyucuğa 50 ul olacak şekilde solüsyon B eklenmiştir.
- Ardından Karanlık ortamda 37 °C olacak şekilde 10 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır.
- Sonrasında her kuyucuğa 50 ul olacak şekilde durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Mavi olan renklerin sarıya dönüp dönmediğini gözlemlenmiştir.
- Son olarak durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Sonrasında 10 dk içerisinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu ile her kuyucuğun optik yoğunluğu belirlenmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada Real Time PCR işleminin ardından gerçekleştirilen ELISA metodunda ortaya çıkan tümörlü ve tümör uzak dokulardaki protein seviyeleri incelenmiştir. İstatistiksel verileri analiz etmek için **Medcalc version 18.2.1** istatistiksel programı kullanıldı ve İstatistiksel analiz yöntemi olarak; Shapiro Wilk ve Mann Whitney U testi kullanıldı; $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

4.BULGULAR

4.1 Hastalara Ait Bulgular

Bu çalışmada; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından patolojik değerlendirme ve teşhis konulmuş, mide kanseri bulunan ve gerekli taramalar yapılarak çalışma grubumuza uygun 22 mide kanserli hastadan alınan; sağlıklı ve tümörlü dokuları ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil ettiğimiz hasta grupları 13 erkek (% 59,09), 9 kadın (% 40,91) hastadan oluşmaktadır.

4.2 DNA Kantitasyon Sonuçları

Mide kanserli hastaların buza saklanmış tümörlü ve tümör uzak doku örneklerinden toplam 22 genomik DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldüğünde 158,13 ng/ul ve tümörlü DNA konsantrasyon ortalaması 124,23 ng/ul olarak tespit edilmiştir. 260/280 deki dalga boyları incelendiğinde ise tümör uzak dokuların ortalaması 1,76 ve tümör dokularına bakıldığında ise 1,75 olarak bulunmuştur. Tablo 4.1'ine baktığımız zaman DNA metilasyon işlemi, A 260/280'deki dalga boyları.

Tablo 4.1: Çalışmada yer alan hastalara ait olan ve bu hastaların DNA konsantrasyonları ve A 260/280 nm'deki dalga boyları gösterilmektedir.

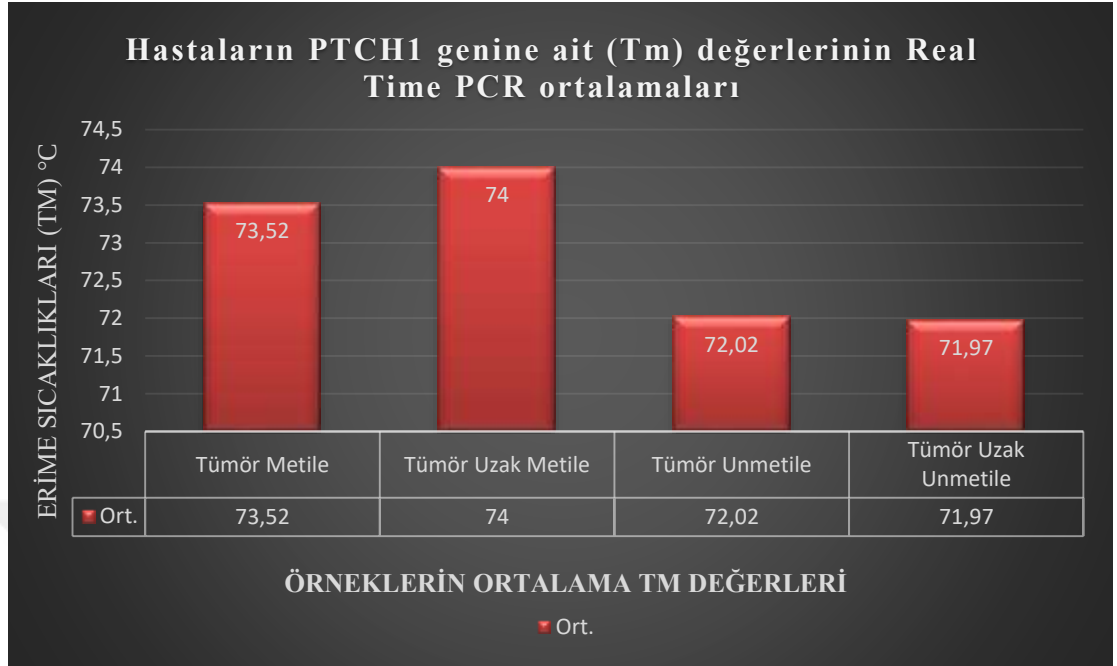
Hasta Grubu	Cinsiyet	Tanı	Dokuların Alındığı Bölge	DNA konsantrasyonları (ng/ul)	A 260/280 (nm)
Hasta 1	Kadın	Mide Adenokarsinomu	-	Tümör= 100 Tümör Uzak= 139	Tümör=1,73 Tümör Uzak= 1,79
Hasta 2	Kadın	Mide Adenokarsinomu	-	Tümör=131 Tümör Uzak= 48,8	Tümör=1,74 Tümör Uzak=1,85

Hasta 3	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=70,6 Tümör Uzak=227	Tümör=1,75 Tümör Uzak=1,79
Hasta 4	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=114 Tümör Uzak=75,6	Tümör=1,78 Tümör Uzak=1,69
Hasta 5	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=188 Tümör Uzak=193	Tümör=1,81 Tümör Uzak=1,76
Hasta 6	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=134 Tümör Uzak=86,2	Tümör=1,76 Tümör Uzak=1,73
Hasta 7	Erkek	Mide Adenokarsi nomu /Büyük kurvaturda tümör	Total 3 Bölge	Tümör=58,1 Tümör Uzak=156	Tümör=1,75 Tümör Uzak=1,73
Hasta 8	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=84,7 Tümör Uzak=80,5	Tümör=1,81 Tümör Uzak=1,73
Hasta 9	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=52,6 Tümör Uzak=59,9	Tümör=1,73 Tümör Uzak=2,06
Hasta 10	Erkek	Mide Adenokarsi nomu/Kardi a Antrumda Tümör	Total 3 Bölge	Tümör=64 Tümör Uzak=176	Tümör=1,63 Tümör Uzak=1,78
Hasta 11	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=141 Tümör Uzak=143	Tümör=1,74 Tümör Uzak=1,66
Hasta 12	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=177 Tümör Uzak=176	Tümör=1,75 Tümör Uzak=1,75
Hasta 13	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	-	Tümör=116 Tümör Uzak=83,8	Tümör=1,70 Tümör Uzak=1,70
Hasta 14	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	Subtotal 3 Bölge	Tümör=322 Tümör Uzak=539	Tümör=1,8 Tümör Uzak=1,7
Hasta 15	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=54,3 Tümör Uzak=180	Tümör=1,84 Tümör Uzak=1,79

Hasta 16	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Subtota l 3 Bölge	Tümör=109 Tümör Uzak=216	Tümör=1,7 Tümör Uzak=1,8
Hasta 17	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=266 Tümör Uzak=230	Tümör=1,75 Tümör Uzak=1,79
Hasta 18	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=290 Tümör Uzak=228	Tümör=1,79 Tümör Uzak=1,78
Hasta 19	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	Subtota l 3 Bölge	Tümör=242 Tümör Uzak=124	Tümör=1,76 Tümör Uzak=1,70
Hasta 20	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=105 Tümör Uzak=178	Tümör=1,77 Tümör Uzak=1,8
Hasta 21	Erkek	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=233 Tümör Uzak=60	Tümör=1,76 Tümör Uzak=1,7
Hasta 22	Kadın	Mide Adenokarsi nomu	Total 3 Bölge	Tümör=61 Tümör Uzak=79,1	Tümör=1,72 Tümör Uzak=1,74

4.3. *PTCH1* Genindeki Metilasyon Durumu

Çalışmada kullandığımız *PTCH1* genini içeren; metile primerler ve anmetile primerlerine baktığımız zaman; metile primerler de tümör dokusuna ait olanlarda erime sıcaklığı ortalaması (73,52) iken tümör uzak dokularda bu değer (74) olarak görülmektedir aynı zamanda anmetile primerlerde ise tümör dokuları ve tümör uzak dokularda ortalama (72) ancak metile olan primerlerde tümör dokuları ile tümör olmayan dokular arasında yaklaşık olarak $0,5 \pm 0,25$ derece olacak şekilde erime sıcaklığında farklılık görülmektedir.



Şekil 4.1: Hastalardaki *PTCH1* genine ait metile ve anmetile olan; tümör ve tümör uzak dokuların Tm (erime sıcaklığı) ortalamaları.

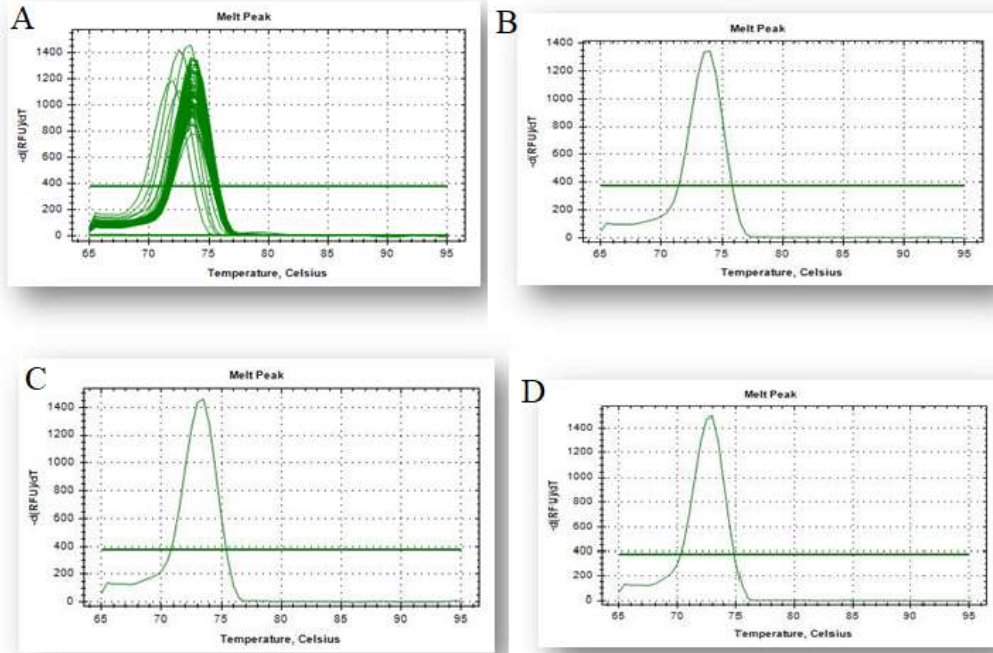
Tablo 4.2: Hastalardaki *PTCH1* genine ait metile olan; tümör ve tümör uzak dokuların Tm (erime sıcaklığı) değerleri

	Metile Primer					
	Tumor			Tumor Uzak		
	Tm1	Tm2	Ort.	Tm1	Tm2	Ort.
61	73,00	73,50	73,25	74,00	74,00	74,00
B1	73,50	73,50	73,50	74,00	74,00	74,00
52	73,50	73,50	73,50	74,00	73,50	73,75
B5	73,50	74,00	73,75	74,00	74,00	74,00
46	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50
51	73,50	73,50	73,50	74,00	None	74,00
67	74,00	74,00	74,00	72,50	72,50	72,50
X	72,50	72,50	72,50	73,50	73,50	73,50
62	73,50	73,50	73,50	None	None	None
63	73,50	74,00	73,75	73,50	73,50	73,50
68	73,50	74,00	73,75	74,00	74,00	74,00
44	73,50	73,50	73,50	73,50	None	73,50
71	74,00	73,50	73,75	73,50	74,00	73,75
56	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50
47	73,50	73,50	73,50	73,50	None	73,50
B7	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50	73,50
57	74,00	73,50	73,75	73,50	None	73,50
39	74,00	74,00	74,00	74,00	74,00	74,00
59	73,50	73,50	73,50	74,00	74,00	74,00
31	73,50	72,00	72,75	72,50	73,00	72,75
40	74,00	73,50	73,75	73,50	73,50	73,50
66	73,50	73,50	73,50	74,00	None	74,00

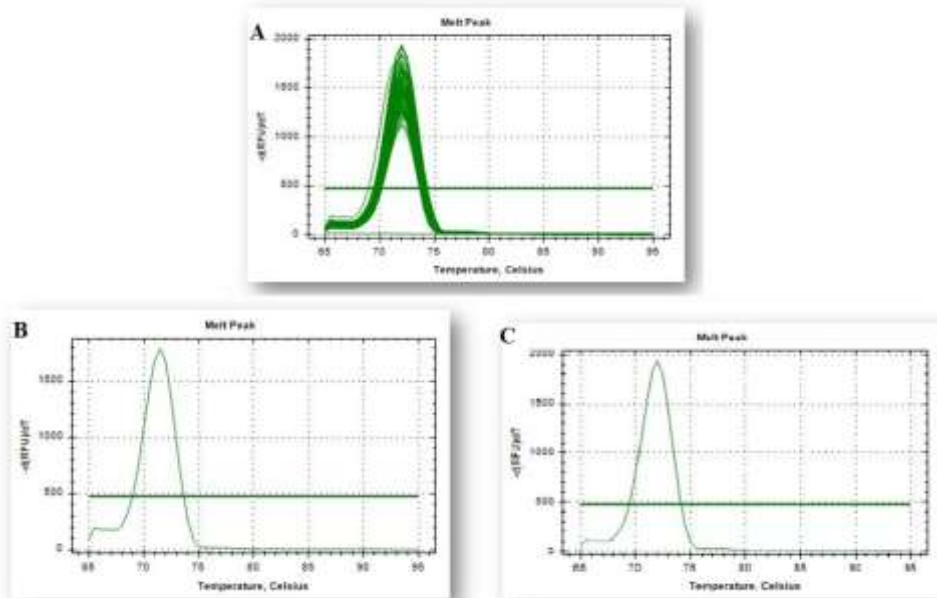
Tablo 4.3: Hastalardaki *PTCH1* genine ait unmetile olan; tümör ve tümör uzak dokuların Tm (erime sıcaklığı) değerleri.

Örnek No	Unmetile Primer					
	Tumor			Tumor Uzak		
	Tm1	Tm2	Ort.	Tm1	Tm2	Ort.
61	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
B1	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
52	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
B5	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
46	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
51	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
67	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
X	72,00	72,00	72,00	72,00	71,50	71,75
62	72,00	72,00	72,00	71,50	72,00	71,75
63	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
68	72,50	72,50	72,50	72,00	72,00	72,00
44	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
71	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
56	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
47	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
B7	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
57	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
39	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
59	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
31	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
40	72,00	72,00	72,00	72,00	71,50	71,75
66	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00

PTCH1 genine ait metile ve an metile primer ile tüm erime sıcaklığı eğrileri ve sırasıyla bazı örneklerdeki örnek erime eğrileri sırasıyla Şekil 4.2’de ve Şekil 4.3’te gösterilmektedir.



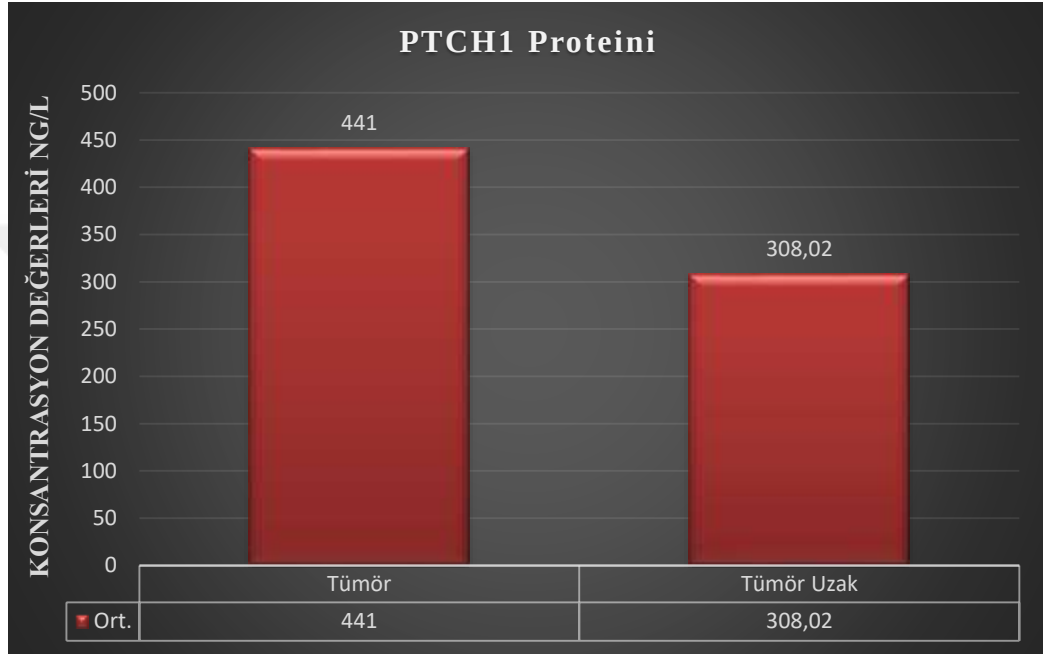
Şekil 4.2: *PTCH1* genine ait metile primer ile A) tüm erime sıcaklığı eğrileri, B) 74°C erime sıcaklığı eğrisi, C) 73,5°C erime sıcaklığı eğrisi, D) 73°C erime sıcaklığı eğrisi



Şekil 4.3: *PTCH1* Genine Ait Unmetile Primer ile A) Tm Erime Sıcaklığı Eğrileri, B) 72°C Erime Sıcaklığı Eğrisi, C) 71,5°C Erime Sıcaklığı Eğrisi

4.4 ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

ELİSA verilerimize baktığımız zaman tümörlü dokularda, tümör olmayan dokulara göre PTCH1 protein ifadesi ve protein miktarında anlamlı derecede ($p<0,05$) artma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4: Çalışılan hasta grubu için PTCH1 proteinine ait ELİSA testi sonucu, ortalama konsantrasyon değerleri (Ort: Ortalama)

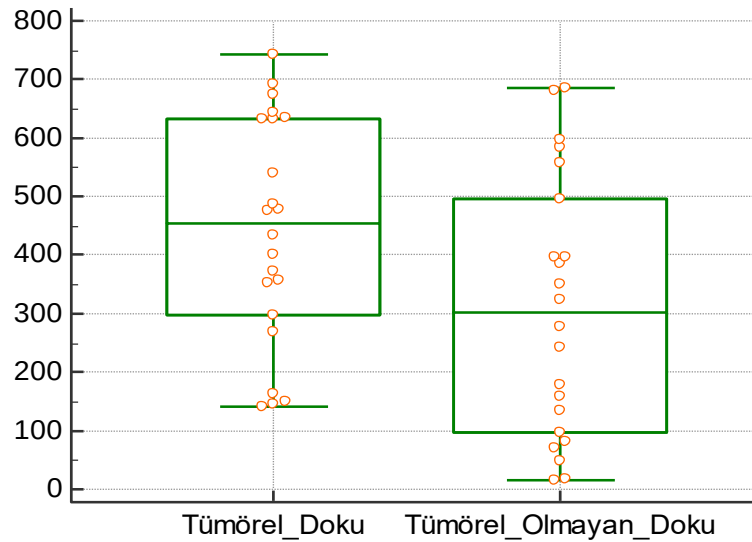
ELISA metodunun ardından tümörlü metile ve unmetile olan; tümör uzak metile ve unmetile olan dokularda bulunan PTCH1 protein miktarlarının arasındaki farkın anlamlı mı yoksa anlamsız mı olduğuna **Medcalc Version 18.2.1 İstatistik Programı** ile bakılmıştır. Bu programda ilk önce bu grupların normal dağılım yapıp yapmadığına bakılmıştır. Sonuç olarak normal dağılım yapmadığı görülmüştür. Bu örnek grupları için Man Whitney U testi kullanılmıştır. $p=0,0389$ olarak bulunmuş ve tümörlü dokulardaki PTCH1 protein seviyesinin sağlıklı dokulara göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür.

Tablo 4.2'ye bakıldığı non-parametrik dağılım gösteren örneklerin Man Whitney U test verileri görülmektedir.

Tablo 4.4: Non-parametrik dağılım göstermiş tümör ve tümör uzak dokulara ait Man Whitney U test sonuçları.

Mann-Whitney test (dependent samples)		
Sample 1		
Variable	Tümörel_Doku__Ort__	
Sample 2		
Variable	Tümörel_Olmayan_Doku__Ort__	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	22	22
Lowest value	142,0000	15,0000
Highest value	742,0000	686,5000
Median	454,5000	301,5000
95% CI for the median	350,4289 to 632,0467	131,7470 to 401,1514
Interquartile range	298,0000 to 633,0000	96,0000 to 496,0000
Hodges-Lehmann median difference		-132,5000
95% Confidence interval		-283,0000 to -5,0000
Mann-Whitney test (independent samples)		
Average rank of first group	26,5000	
Average rank of second group	18,5000	
Mann-Whitney U	154,00	
Large sample test statistic Z	2,066	
Two-tailed probability	P = 0,0389	

Ayrıca bu verilerin dağılımları da Şekil 4.5' e bakıldığında grafikte gösterilmektedir.



Şekil 4.5: Parametrik olmayan dağılım göstermiş tümör ve tümör uzak dokulara ait Man Whitney U test sonuçlarının dağılımının grafiksel gösterimi

5.TARTIŞMA

Kanser yolakları kanser gelişiminde genetik veya epigenetik mutasyonla aktive ya da inaktive olan hücresel kontrol sistemlerinden oluşmaktadır. Hedgehog sinyal yolağı gelişimsel kontrol sistemlerinden biri olarak özellikle akciğer ve bazal hücre karsinomu gibi bir çok kanserin odağında yer almaktadır. Bu yolakta hedgehog faktörleri, SMO gibi smoothened reseptörlere bağlanırlar ve son olarak GLI transkripsiyonel aktivatörlerin aktivasyonuna yol açarak kendi intraselüler sinyalleşme yolaklarını başlatıp hücre proliferasyonunda artışlara sebep olmaktadır. Bu yolakta SMO'nun aktivasyonu PTCH1 tarafından engellenmektedir [149]. Bu yolakta yer alan bir tümör baskılayıcı gen olan *PTCH1* mutasyonlarının ve ekspresyonundaki değişimlerin mide kanserinin moleküler patolojisinde yer aldığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [150,151]. Bu nedenle biz de bu çalışmada çevresel etkenlerin *PTCH1* geninde epigenetik bir değişim oluşturup oluşturmadığı ve bu değişimle gastrik kanser arasında bir bağlantının olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

İlk olarak tümörlü dokularla aynı kişiye ait sağlıklı dokuların *PTCH1* genindeki metillenmenin değişimi analiz edildiğinde, erime sıcaklığı değerlendirilen örneklerde sadece 0,5 derecelik bir değişimin olduğu tespit edildi. 1 derecenin altındaki farklılıkların epigenetik değişimlerden kaynaklanmadığı düşünüldüğünden kanser örneklerimizde *PTCH1* genindeki epigenetik bir değişimin olmadığı metillenme profiliin değişmediği ve bu nedenle PTCH1 proteinin de herhangi bir azalmanın beklenmediği görülmektedir. Diğer taraftan Ma X, Sheng T (2006) ve arkadaşları ayrıca Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmalarda insanda mide kanseri hücre hattında yapılan DNA metilasyon analizlerinde *PTCH1* geninin metilasyon seviyelerinin tümörlü dokuda daha yüksek olduğu gösterilmiştir [144,145]. Peng Du, Hai-Rong Ye ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan ve 170 hasta örneği kullanılan bir diğer çalışmada ise, metil-spesifik PCR ile gerçekleştirdikleri analizde mide kanserinde *PTCH1* geninin transkripsiyonel regülasyon bölgelerinde *PTCH1* gen metilasyonunu hastaların %32'sinde görüldüğü ama diğer kısımda metilasyonun değişmediği tespit edilmiştir [146]. Yapılan bu çalışmada hastalara ait olan dokular ve klinik bulgular değerlendirilmiş ve transkripsiyonel regülasyon bölgeleri ile *PTCH1* geni arasında mide kanserinin erken

oluşum evrelerinde korelasyon olduğu tespit edilmiştir [146]. Yun Zuo, Yu Song, Min Zhang, Zhen Xuve Xiaolan Qian(2013), tarafından 20 mide kanserli hasta dokusu üzerinde metile ve anmetile primerlerle yapılan başka bir çalışmada kanserli dokulardaki qPCR verilerine bakıldığında metile *PTCH1*’lerde $0,93 \pm 0,71$ ve anmetile *PTCH1*’lerde $2,58 \pm 1,52$ derece artış tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *PTCH1* ekspresyon seviyesi ile metillenme arasında negatif korelasyon görmüşlerdir. Mide kanserinde *PTCH1* geninin hipermetilasyon gösterdiği sonucuna varmışlardır [147]. Yun Zuove Yu Song (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada *PTCH1* gen ekspresyonunun ileri mide kanserli dokularda azaldığı ancak 5-Aza-dc adı verilen bir tedavi ardından *PTCH1* ekspresyon seviyesinin arttığını kaydetmişlerdir [147]. Ayrıca CpG adacıklarında *PTCH1* gen metilasyonunun yüksek düzeyde olması durumunun mide kanseriyle ilişkili olabileceğini görmüşlerdir [148]. Bu bilgilere bakarak mide kanseri tedavisinde *PTCH1* geninden yararlanılabileceği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda ise metillenme profilinde değişim görülmezken ve buna paralel olarak kanserli dokuların *PTCH1* protein ekspresyonunda anlamlı bir artış tespit edildi. Literatürün aksine tespit edilen bu artış kanserden korunma mekanizması veya telafi edilme mekanizması olarak tümör baskılayıcı genin artışı şeklinde değerlendirilebilmektedir [152]. Daha önce de bahsedildiği gibi SHh sinyal yolağında Hh sinyalinin etkilerine GLI gen ailesi SMO transmembran proteini üzerinden etki etmektedir. SMO proteini PTCH proteini ile inhibe edilerek büyüme kontrolü sağlanmaktadır. PTCH proteini, Hh üzerine negatif düzenleyici etkidir ve dinlenme halinde PTCH1, SMO’yu baskılayarak aşırı proliferasyonu düzenlemektedir. Ancak sistem aktifleştigi zaman hücre sistemin kanserleşmeye gitmesini engellemek amacıyla tümör süpressör olan *PTCH1* gen ekspresyonunu arttıracak için *PTCH1* gen konstrasyonun tümörlü dokuda artması ile tümörlü doku oluşumu arasında anlamlı bağlantı görülmektedir bunun nedeninin ise sistem tümörleşmeye giderken yolağın bunu engellemek amacıyla PTCH1 protein miktarını arttırması ile bağlantılı olduğu görülmektedir [153].

Literatürde yapılan çalışmalarda hedgehog sinyal yolağının mide kanserinin teşvik edilmesinde, başlamasında ve ilerlemesinde hayati bir rol oynadığı ve hedgehog sinyal yolağının mide kanseri tedavileri bulunması açısından önemli bir kaynak olabileceğini

gösterilmiştir [1]. Bu çalışmalara bakıldığında Hedgehog yolağında yer alan ve bir tümör süpressör olan *PTCH1* geninin mide kanserinin tanı, teşhis ve tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılabilmektedir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bakıldığında *PTCH1* genindeki metillenme profili açısından yapılan incelemelerde epigenetik açıdan *PTCH1* geninde kanser ile ilişkili herhangi bir epigenetik etki gözlenmemiştir. Diğer taraftan ise kanserli dokularda *PTCH1* protein miktarının anlamlı bir şekilde artmasının nedeninin ise hedgehog yolağının tümörü engellemek amacıyla bir telafi mekanizması olarak tümör baskılayıcı protein miktarını arttırma eğilimi gösterdiğini düşündürmektedir. Elde edilen bu sonuçlara göre *PTCH1* protein miktarının DNA hipermetillenmesi ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Literatürdeki hipermetillenmenin tersi bir sonuç bulunmasının nedeni örnek sayısının azlığı olabilir bu nedenle bu çalışmanın ilerleyen aşamalarında daha çok örnek ile metillenme profilindeki değişimlerin incelenmesi gerekmektedir.

Bu bağlamda elde edilen sonuçlar gastrik kanser oluşumunda etkisinin olabileceği düşünülen ve bir tümör baskılayıcı olan *PTCH1* protein ekspresyonunun artmasının; *PTCH1* genindeki metilasyon profilindeki değişim açısından epigenetik etkilerle ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Çalışmaya ait bu sonuçlar çevresel etkiler sonucu oluşan epigenetik değişimlerin ve uygulanan epigenetik tedavilerin gastrik kanser prognozundaki etkisinin sınırlı olduğuna işaret etmektedir [71]. Taze alınmış dokular ve daha çok hasta örneği ile çalışmak çalışma açısından daha kesin ve etkili sonuçlar alınmasını mümkün kılacaktır. Ayrıca mide karsinomunda etkili olan yolaklardan spesifik olarak birinin ve bu yolaktaki spesifik bir gen üzerine çalışmalar yapılması da homojen bir dağılım sağlayacağı için daha doğru sonuçlar elde edilmesine imkan tanıyacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] **Siegel RL, Miller KD, Jemal A.** (2016). *Cancer statistics. CA Cancer, J Clin*; 66:7-30.
- [2] **Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al.** (2014). *Treatment of gastric cancer. World J Gastroenterol*;20(7):1635-1649.
- [3] **Yan R, Peng X, Yuan X, et al.** (2013). *Supression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. Cell Oncol (Dordr)*;36(5):421-435.
- [4] **Bock & Lengauer,** (2008). *Computational epigenetic. Bioinformatics.* ;1;24(1):1-10. doi:10.1093/bioinformatics/btm546.
- [5] **Pickersgill et al.,** (2013). *New Genetics and Society. Vol. 32, No. 4, 429 –447.*
- [6] **Skinner, MK., Manikkam, M., Bosagna, CG.** (2009). *Epigenetic transgerenational actions of environmental factors in disease etiology. NIH Public Access, 21 (4): 214-222.*
- [7] **Bloomfield, M. & Hanson, C.** (2015). *'Beyond the gene: epigenetic science in twenty-first century culture', Textual Practice, 29:3, 405-413.*
- [8] **Hillman, S. C., & Dale, J.** (2018). *Epigenetics. InnovAiT, 11(12), 689-692.*
- [9] **Kang, Daines, Warren & Cowan,** (2019). *Volume 20, Number 3, DOI: Journal of Microbiology & Biology Education.*
- [10] **Corcoran, C., Perrin, M., Harlap, S., Deutsch, L., Fennig, S., Manor, O., Nahon, D., Kimhy, D., Malaspina, D. and Susser, E.** (2009). *Incidence of schizophrenia among second-generation immigrants in the Jerusalem perinatal cohort. Schizophrenia bulletin, 35(3), 596-602.*
- [11] **Waddington, C.** (1940). *Organisers and genes. UK Cambridge University Press, Cambridge.*
- [12] **Holliday, R., Pugh, J.** (1975). *DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science, 187: 226-232.*
- [13] **Morgan, HD., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W.** (2005). *Epigenetic reprogramming in mammals. Hum. Mol. Genet., 14 (1): 47-58.*
- [14] **Barker, DJ.** (1990). *The fetal and infant origins of adult disease. BMJ 301: 1111.*

- [15] **Borghol N, Suderman M, McArdle W, et al.** (2012). Associations with early-life socio-economic position in adult DNA methylation. *International Journal of Epidemiology* 41: 62–74. DOI: 10.1093/ije/dyr147.
- [16] **Kuehner, J. N., Bruggeman, E. C., Wen, Z., & Yao, B.** (2019). Epigenetic regulations in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in genetics*, 10, 268
- [17] **Viltart, O. & Vanbesien-Mailliot, C. C.** (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *TheScientificWorldJOURNAL*, 7.
- [18] **Marczylo, Amoako, Konje, Gant & Marczylo,** (2012). Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: A potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics*, 7, 432–439.
- [19] **Joehanes R, Just AC, Marioni RE, Pilling LC, Reynolds LM, Mandaviya PR, Guan W, Xu T, Elks CE, Aslibekyan S, Moreno-Macias H, Smith JA, Brody JA, et al.** (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet.* 9:436–47.
- [20] **Landecker and Panofsky,** (2013). *From Social Structure to Gene Regulation, and Back: A Critical Introduction to Environmental Epigenetics for Sociology* Vol. 39(1):333-357.
- [21] **Dalgaard K, Landgraf K, Heyne S, Lempradl A, Longinotto J, et al.** (2016). Trim 28 haploinsufficiency triggers bi-stable epigenetic obesity. *Cell* 164(3):353–64.
- [22] **Roseboom, T., S. de Rooij, and R. Painter.** (2006). “The Dutch Famine and its Long-Term Consequences for Adult Health.” *Early Human Development* 82 (8): 485 – 491.
- [23] **Zhang, M.,** (2007). Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19: 266-272.
- [24] **Karaçay, B.,** (2009). Kalıtımın yeni boyutu: epigenetik. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 505: 32-37.
- [25] **Jablonka, E., & Lamb, M. J.** (1998). Epigenetic inheritance in evolution. *Journal of evolutionary biology*, 11(2), 159-183.
- [26] **Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A.** (2008). S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature*; 455(7211):411-415.
- [27] **Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV, et al.** (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol*; 9(11):1253-1262.

- [28] **Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. ve Anant, S.** (2014). *DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. Frontiers In Oncology*, 4(80), 1-13.
- [29] **Plass C.** (2002). *Cancer epigenomics. Human Molecular Genetics*, 11(20), 2479-2488.
- [30] **Dolinoy, DC., Weidman, JR., Jirtle, RL.** (2007). *Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. Reprod. Toxicol.*, 23: 297-307.
- [31] **Nestler, EJ.** (2014). *Epigenetic mechanisms of drug addiction. Neuropsychopharmacology*, 76: 259-268.
- [32] **Martin and Zhang,** (2007). *Mechanisms of epigenetic inheritance, Current Opinion in Cell Biology* , 19:266–272.
- [33] **Ford J, Ahmed S, Allison S, Jiang M, Milner J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P.** (2007). *Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. EMBO J*; 26(7):1913-1923.
- [34] **Hershko A, Ciechanover A.** (1998). *The ubiquitin system. Annu Rev Biochem* ; 67:425-479.
- [35] **Herceg, Z., Vissiere, T., Sawan, C.** (2008). *Epigenetic interplay between histon modifications and DNA methylation in Gene Silencing. Mutat. Res.-Rev. Mutat.*, 659: 40-48.
- [36] **Aslan, A.** (2008). *DNA Metilasyonu. Doktora Semineri, Fırat Üniversitesi*, 25 s.
- [37] **Sweatt, JD., Guzman-Karlsson, MC., Rahn, EJ.** (2013). *Cellular, molecular and epigenetic mechanisms in non-associative conditioning: implications for pain and memory. Neurobiol. Learn. Mem.*, 105: 133-150.
- [38] **Yang JS., Lai EC.** (2011). *Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. Molecular Cell*, 43, 892-903.
- [39] **Bateson, P., Parker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D’Udine, B., Foley, RA.** (2004). *Developmental Plasticity and Human Health. Nature*, 430: 419-421.
- [40] **Petronis, A.** (2004). *The origin of schizophrenia: Genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. Biol. Psychiat.*, 55 (10): 965-970.

- [41] **Skinner, MK., Manikkam, M., Bosagna, CG.** (2009). *Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. NIH Public Access*, 21 (4): 214-222.
- [42] **Morgan, H., Sutherland, H., Martin, D., Whitelaw, E.** (1999). *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. Nat. Genet.*, 23: 314-318.
- [43] **Reik, W., Dean, W., Walter, J.** (2001). *Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science*, 293: 1089-1093.
- [44] **Seo, J. Y., Park, Y. J., Yi, Y. A., Hwang, J. Y., Lee, I. B., Cho, B. H., Son, H. H. ve Seo, D. G.** (2015). *Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. Restorative Dentistry ve Endodontics*, 40(1), 14-22.
- [45] **Gürel Ç. ve ark.** (2016). *Epigenetik ve Kanser. Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*. 2(1).
- [46] **Yokus B.** (2013). *Epigenom ve EpigenetikDicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2):5-13.
- [47] **Ponder, B. A. J.** (2001). *Cancer genetics. Nature*, 411, 336-341.
- [48] **Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. ve Jones, A. P.** (2004). *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature*, 429, 457-463.
- [49] **Sawan, C., Vaissiere, T., Murr, R. ve Herceg, Z.** (2008). *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. Mutation Research*, 642, 1-13.
- [50] **You, J. S. ve Jones, P. A.** (2012). *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin. Cancer Cell*, 22, 9-20.
- [51] **Kanwal, R. ve Gupta, S.** (2012). *Epigenetic modifications in cancer. Clinical Genetics*, 81, 303-311.
- [52] **Mann, M. R. W. ve Bartolomei, M. S.** (2007). *Epigenetic reprogramming by maternal behaviour and pharmacological intervention nature versus nurture; let's the whole thing off, Epigenetics*, 2, 22-8.
- [53] **Kosova, B., Özel, R. ve Aktan, Ç.** (2011). *Prostat kanseri tanısında DNA metilasyonunun yeri var mı?, Üroonkoloji Bülteni*, 2, 33-40.
- [54] **Robertson, K. D.** (2005). *DNA methylation and human disease. Nature Reviews Genetics*, 6, 597-610.

- [55] **Robertson, K. D.** (2002). *DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web.* *Oncogene*, 21, 5361–5379.
- [56] **Cohen, I., Poreba, E., Kamieniarz, K., ve Schneider, R.** (2011). *Histone modifiers in cancer: friends or foes?* *Genes Cancer* 2(6), 631–647.
- [57] **Gürel, Ç., Nursal, A. F. ve Yiğit, S.** (2016). *Epigenetik ve kanser.* *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*, 2(1), 45-51.
- [58] **Seligson, D. B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M., ve Kurdistani, S. K.** (2005). *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence.* *Nature*, 435(7046), 1262.
- [59] **Özbayer ve ark.** (2017). *Evaluation of Plasma DNA Methyltransferases and Methy-CpG Binding Protein Levels in Patients with Lung Cancer, Dicle Tıp Dergisi / Dicle Medical Journal* 44 (1) : 57 – 64, DOI: 10.5798/dicletip.298604.
- [60] **Chervona, Y., ve Costa, M.** (2012). *Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis?.* *American journal of cancer research*, 2(5), 589.
- [61] **Füllgrabe J., Kavanagh E. and Joseph B.** (2011). *Histone onco-modifications.* *Oncogene* 30, 3391–3403.
- [62] **Kovalchuk, O., Tryndyak, V. P., Montgomery, B., Boyko, A., Kutanzi, K., Zemp, F., ve Pogribny, I. P.** (2007). *Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications, and aberrant microRNA expression.* *Cell Cycle*, 6(16), 2010-2018.
- [63] **Muthu K. ve et. al.** (2018). *Role of novel histone modifications in cancer,* *Oncotarget*, 9(13): 11414-11426.
- [64] **Huang T. ve et al.** (2013). *Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells.* *Chin J Cancer*. 32(11): 582–593.
- [65] **Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y. Y.** (2007). *miR-21-mediated tumor growth.* *Oncogene*, 26(19), 2799.
- [66] **Gupta R.A. ve et. al.** (2010). *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis.* *Nature*, 464(7291), 1071-6.
- [67] **Futreal PA. Kasprzyk A. Birney E. Mullikin JC. Wooster R. Stratton M.** (2001). *Cancer and genomics.* *Nature* 6822: 850-2.
- [68] **Williams GM.** (2001). *Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment.* *Toxicology*; 14:166 (1- 2):3-10.

- [69] **Williams GM.** (1979). *Review of in vitro test systems using DNA damage and repair for screening of chemical carcinogens.* *J. Assoc. Official Anal. Chemists* 62: 857–63.
- [70] **Williams GM.** (1985). *Genotoxic and epigenetic carcinogens.* In: Homburger F, ed. *Safety Evaluation and Regulation of Chemicals 2. Impact of Regulations-Improvement of Methods.* Basel: Karger. 251–6.
- [71] **Williams GM.** (1987). *DNA reactive and epigenetic carcinogens.* In: Barrett JC, ed. *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis, Vol 1: Role of Genetic and Epigenetic Changes.* Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 113–27.
- [72] **Williams GM.** (1987). *Definition of a human cancer hazard.* In: *Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis.* New York: Banbury Report 25, Cold Spring Harbor Laboratory. 367–80.
- [73] **Williams GM.** (1992). *DNA reactive and epigenetic carcinogens.* *Experimental and Toxicologic Pathology.* 44: 457– 64.
- [74] **Yokuş B. Çakır DÜ.** (2002). *İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine.* *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.*5: 535-43.
- [75] **Sahu SC.** (1990). *Onkogenes, onkogenesis and oxygen radicals.* *Biomed Environ Sci* 2: 183-201.
- [76] **Heynick L.N. Johnston S.A. Mason P.A.** (2003). *Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis, and Genotoxicity.* *Bioelectromagnetics* S6: 74-100.
- [77] **Yokus B, Akdag M.Z. Dasdag S. Cakir D.U, Kizil M.** (2008). *Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Cause Oxidative DNA Damage in Rats.* *International Journal of Radiation Biology,* 8 (10), 789-795.
- [78] **Halliwell B, Aruoma OI.** (1991). *DNA damage by oxygen-derived species; Its mechanism and measurement in mammalian systems.* *FEBS letters* 281: 9-19.
- [79] **Deshpande SS, Irani K.** (2002). *Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary.* *Hum Exp Toxicol* 2: 63- 4.
- [80] **Weaver RF, Hedrick PhW.** (1997). *Genetics,* ,482-502.Third Ed.
- [81] **Croce CM.** (2008). *Oncogenes and cancer.* *N Engl J Med;* 385:503- 511.

- [82] **Online Mendelian Inheritance in Man**, (2009). *OMIM (TM)*. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: { 191170}; World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- [83] **Fearon ER, Vogelstein B.** (1990). *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell*; 61: 759-767.
- [84] **Beaupre DM, Kurzrock R.** (1999). *RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. J Clin Oncol*; 17:1071-1079.
- [85] **Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E.** (1985). *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. Nature*;315:550-554.
- [86] **WA Schulz.** (2007). *Molecular Biology of Human Cancers. The Netherlands: Springer.*
- [87] **Weber GF.** (2007). *Molecular Mechanisms of Cancer. The Netherlands: Springer.*
- [88] **Goetz SC, Anderson KV.** (2010). *The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nat Rev Genet*;11:331-44.
- [89] **Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN.** (2008). *Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. Cancer Res*;68:2058-61.
- [90] **Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP.** (2007). *Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. Science*;317:372-6.
- [91] **Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A.** (2010). *Modulators of the hedgehog signaling pathway. Bioorg Med Chem*;18:6613-24.
- [92] **Gupta S, Takebe N, LoRusso P.** (2010). *Targeting the hedgehog pathway in cancer. Ther Adv Med Oncol*;2:237-50.
- [93] **Taipale J, Beachy, PA.** (2001). *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. Nature*;411:349-54.
- [94] **Corbit KC, Aanstad P, Singla V, et al.** (2005). *Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. Nature*;437:1018-21.
- [95] **Huangfu D, Anderson KV.** (2005). *Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. Proc Natl Acad Sci*;102:11325-30.
- [96] **Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, et al.** (2003). *Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature*;426:83-7.

- [97] **Varjosalo M, Taipale J.** (2008). *Hedgehog: functions and mechanisms.* *Genes Dev*;22:2454-72.
- [98] **Ferretti E, De Smaele E, Di Marcotullio L, et al.** (2005). *Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm.* *Trends Mol Med*;11:537-45.
- [99] **Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN.** (2008). *Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer.* *Cancer Res*;68:2058-61.
- [100] **Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, et al.** (2009). *Hedgehog signal transduction beyond Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process.* *Proc Natl Acad Sci*;106:3196-201.
- [101] **Kim J, Kato M, Beachy PA.** (2009). *Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus.* *Proc Natl Acad Sci*;106:21666-71.
- [102] **Zhao Y, Tong C, Jiang J.** (2007). *Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch.* *Nature*;450:252-8.
- [103] **Scales SJ, de Sauvage FJ.** (2009). *Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy.* *Trends Pharmacol Sci*;30:303-12.
- [104] **Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al.** (1996). *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome.* *Cell*;85:841-51.
- [105] **Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al.** (1996). *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome.* *Science*;272:1668-71.
- [106] **Xie J, Murone M, Luoh SM, et al.** (1992). *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma.* *Nature*;391:90-2.
- [107] **Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, et al.** (2006). *Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development.* *J Pathol*;208:17-25.
- [108] **Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al.** (2002). *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma.* *Nat Genet*;31:306-10.
- [109] **Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al.** (2007). *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity.* *Curr Biol*;17:165-72.

- [110] **Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, et al.** (2006). *Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis*;27:748-57.
- [111] **Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al.** (2004). *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. Nature*;431:707-12.
- [112] **Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, et al.** (2002). *Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. Science*;297:1559-61.
- [113] **Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al.** (2003). *Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature*;425:851-6.
- [114] **Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al.** (2003). *Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. Nature*;422:313-7.
- [115] **Fan L, Pepicelli CV, Dibble CC, et al.** (2004). *Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. Endocrinology*;145:3961-70.
- [116] **Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, et al.** (2009). *GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. Genes Dev*;23:24-36.
- [117] **Theunissen JW, de Sauvage FJ.** (2009). *Paracrine Hedgehog signaling in cancer. Cancer Res*;69:6007-10.
- [118] **Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, et al.** (2009). *Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci*;106:4254-9.
- [119] **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al.** (2001). *Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature*;414:105-11.
- [120] **Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al.** (2008). *A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. Nature*;455:406-10.
- [121] **Rubin LL de Sauvage FJ.** (2006). *Targeting the Hedgehog pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov*;5:1026-33.
- [122] **Al-Hajj M, Clarke MF.** (2004). *Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene*;23:7274-82.
- [123] **Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM.** (2004). *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. Nature*;432:324-31.

- [124] **Binns W, James LF, Keeler RF, et al.** (1968). *Effects of teratogenic agents in range plants. Cancer Res*;28:2323-6.
- [125] **Gunderson LL, Donohue JH, Burch PA.** (1995). *Stomach*, in Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, et al: *Clinical Oncology*. New York, NY, Chuschild Livingstone, pp:1209-1241.
- [126] **Green Lee RT, Murray T, Bolden S, et al.** (2000). *Cancer Statistics. CA Cancer J Clin* 50:7-33.
- [127] **Wu-Williams AH, Yu MC, Mack TM.** (1990). *Life style, work, place, and stomach cancer by subsite in young men of Los Angeles County. Cancer Res* 50:2569-2576.
- [128] **Macdonald JS, Hill MC, Roberts IM.** (1992). *Gastric cancer: Epidemiology, pathology, detection and staging*, in Ahlgren JD, Macdonald JS (eds): *Gastrointestinal Oncology*. Philadelphia, PA, J.B Lippincott, pp:151-158.
- [129] **Kurtz RC, Sherlock P.** (1985). *The diagnosis of gastric cancer. Semin Oncol* 12 (1): 11-8.
- [130] **Scheiman JM, Cutler AF.** (1999). *Helicobacter pylori and gastric cancer. Am J Med* 106 (2): 222-6.
- [131] **Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Belli J, et al.** (1996). *Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. Semin Oncol* 23 (3): 292-306.
- [132] **Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, et al.** (1991). *Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. JAMA* 265 (10): 1287-9.
- [133] **Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, et al.** (1998). *Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. Ann Surg* 228 (4): 449-61.
- [134] **Nakamura K, Ueyama T, Yao T, et al.** (1992). *Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. Cancer* 70 (5): 1030-7.
- [135] **Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, et al.** (2000). *Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. Cancer* 89 (7): 1418-24.
- [136] **Fine G, Chan K: Alimentary tract. In: Kissane JM.** (1985). *ed. Anderson's Pathology. Vol 2. 8th ed. Saint Louis, Mo: CV Mosby, pp 1055-1095.*

- [137] **Maehara Y, Sakaguchi Y, Moriguchi S, et al.** (1992). *Signet ring cell carcinoma of the stomach.* *Cancer* 69 (7): 1645-50.
- [138] **Chung HW, Lim JB.** (2014). *Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma.* *World J Gastroenterol* Feb 21;20(7):1667-80. doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1667.
- [139] **Roder JD, Böttcher K, Busch R, et al.** (1998). *Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma.* *German Gastric Cancer Study Group.* *Cancer* 82 (4): 621-31.
- [140] **Ichikura T, Tomimatsu S, Uefuji K, et al.** (1999). *Evaluation of the New American Joint Committee on Cancer/International Union against cancer classification of lymph node metastasis from gastric carcinoma in comparison with the Japanese classification.* *Cancer* 86 (4): 553-8.
- [141] **Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M.** (1999). *Extended lymph-node dissection for gastric cancer.* *N Engl J Med*, 340:908-914.
- [142] **Kodama Y, Sugimachi K, soejima K et al.** (1981). *Evaluation of extensive lymph node dissection for carcinoma of the stomach.* *World J Surg* 5:241-248.
- [143] **Vezerdis MP, Wanebo HJ.** (1992). *Gastric cancer Surgical approach.* In *Gastrointestinal Oncology*, eds Ahlgren JD ve Macdonald JS. Lippincott, Philadelphia, PA 159-170.
- [144] **Ma X, Sheng T, Zhang Y, et al.** (2006). *Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers.* *Int J Cancer* 118: 139-148.
- [145] **Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, et al.** (2007). *Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer.* *J Pathol* 213: 131-139.
- [146] **Peng Du, Hai-Rong Ye, Jun Gao, Wei Chen, Zhong-Chuan Wang, Hong-Hua Jiang, Ji Xu, Ji-We Zhang, Jian-Cheng Zhang, Long Cui.** (2009). *World J Gastroenterol* August 14; 15(30): 3799-3806 *World Journal of Gastroenterology* ISSN 1007-9327.
- [147] **Yun Zuo, Yu Song, Min Zhang, Zhen Xu and Xiaolan Qian** (2014). *Department of Oncology, The First Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, P.R. China Received September 25, 2013; Accepted April 24.*
- [148] **Yun Zuo and Yu Song** (2013). *Department of Oncology, Zhangjiagang First Hospital, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, P.R. China Received June 4, 2013; Accepted October 1, 2013.*

- [149] **Pazarbaşı A. , Kasap M. , Kasap H.** (2011). *Kanser Yolakları. aktd;* 20(4): 187-229.
- [150] **Tajima Y, Murakami T, Saito T, Hiromoto T, Akazawa Y, Sasahara N, Mitomi H, Yao T, Watanabe S.** (2017). *Distinct Involvement of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Gastric Adenocarcinoma of Fundic Gland Type and Conventional Gastric Adenocarcinoma. Digestion;*96(2):81-91. doi: 10.1159/000478999.
- [151] **Wu J, Wang X, Lu W.** (2018). *Identification and validation of a Hedgehog pathway-based 3-gene prognostic signature for gastric cancers. Oncol Lett.* Aug;16(2):2263-2270. doi: 10.3892/ol.2018.8945.
- [152] **Lee SJ, Do IG, Lee J, Kim KM, Jang J, Sohn I, Kang WK.** (2013). *Gastric cancer (GC) patients with hedgehog pathway activation: PTCH1 and GLI2 as independent prognostic factors. Target Oncol. Dec;*8(4):271-80. doi: 10.1007/s11523-013-0253-1.
- [153] **Selda Pelin Kartal, Dilek Bayramgürler** (2016). *BAZAL HÜCRELİ KANSER PATOGENEZİ PATHOGENESIS OF BASAL CELL CARCINOMA Güncel Dermatoloji Dergisi Sayfa: 18-23, Ağustos, Cilt: 1, Sayı: 1.*
- [154] **Bülent Karabulut, Erdem Göker** (2004). *GASTRIC CANCER, SSK İzmir Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of İzmir Hospital) 10(1): 1-8.*
- [155] **Ayla Bayık** (1989). *KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ, Ege üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi 5 : 3.*
- [156] **Süleyman Alıcı, Mustafa İzmirli, Ekrem Doğan** (2006). *Epidemiologic evaluation of the patients admitted to Department of Medical Oncology, Yüzüncü Yıl University, Medical Faculty, Türk Onkoloji Dergisi;*21(2):87-97.
- [157] **Mustafa Özdoğan** (2020). <https://www.drozdogan.com/dunya-kanser-istatistikleri-2020-her-5-kisiden-biri-kanserle-karsilasiyor>

EKLER

Ek A: Etik Kurul Onay Formu

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Formu

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 28.07.2021-E.24891				
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		PTCH1 geninde meydana gelen epigenetik değişimlerin mide kanserli olgularda incelenmesi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
07.07.2021				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULU/N ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan Caddesi 34093 Fatih/İstanbul		
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 3238		
	FAKS	(0212) 533 23 26		
	E-POSTA :	etikkurulu@bezmialem.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Birsen Elibol		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Temel Tıp Bilimleri		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-		
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Dr.Öğr.Üyesi Birsen Elibol		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Güvenli ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma	☒			
Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Sayfa 1 / 3				
Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Özcan KARAMAN		önemli değişiklik-başlık değişikliği		
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması: https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSC44MN43Z&eS=24891 adresinden yapılabilir.				

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAşTIRMANIN AÇIK ADI	PTCH1 geninde meydana gelen epigenetik değişimlerin mide kanserli olgularda incelenmesi
VARSA ARAşTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	ARAşTIRMA BROőÜRÜ		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEğERLENDİRİLEN DİğER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SİGORTA	☐	
	ARAşTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİğER:	☒	-Yüksek lisans tezi olan çalışmada gen ile ilgili yaşanan problemlerden dolayı genin değiştirilmesi ve buna bağlı olarak tez başlığının değiştirilmesine ilişkin önemli değişiklik başvurusu -Önemli değişiklik başvuru formu 17.06.2021 imza tarihli.
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 11/17	Tarih: 07.07.2021	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler; araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAşTIRMANIN AÇIK ADI	PTCH1 geninde meydana gelen epigenetik değişimlerin mide kanserli olgularda incelenmesi
VARSA ARAşTIRMANIN PROTOKÖL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIşMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAşKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Selahattin TUĞRUL	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu şAKUL	Tıbbi Farmakoloji	Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof. Dr. Emel TORUN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ali Akçahan GEPĐİREMEN	Tıbbi Farmakoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ümmihan İşOĞLU	Fizyoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Meltem BAKKAL	Pedodonti	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diř Hekimliği Fakóltesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Alper YENİGÜN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakóltesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Tulin KUZU	Sivil Üye	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Avukat şevkiye KARAHAAN	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: ☒ Onaylandı ☐ Reddedildi

Sayfa 3 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Özcan KARAMAN**önemli değişiklik-başlık değişikliği**Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSC44MN43Z&eS=24891> adresinden yapılabilir.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Erce MATPAN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2019, Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Gevher Nesibe, 9. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi 2022/ 9th INTERNATIONAL GEVHER NESIBE HEALTH SCIENCES CONFERENCE 2022 (online sunum)**