BÜŞRA SARI ÇAĞILCI

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

H1299 METASTATİK VE A549 METASTATİK OLMAYAN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE VE BEAS- 2B NORMAL AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4) VE KALRETİKULİN (CALR) GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

BÜŞRA SARI ÇAĞILCI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL-2020

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ 2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

H1299 METASTATİK VE A549 METASTATİK OLMAYAN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE VE BEAS- 2B NORMAL AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4) VE KALRETİKULİN (CALR) GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

BÜŞRA SARI ÇAĞILCI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL-2020

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Süreyya Bozkurt
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Süreyya Bozkurt	İstinye Üniversitesi
Prof. Dr. Matem Tunçdemir	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "H1299 Metastatik ve A549 Metastatik Olmayan Küçük Hücreli Dişi Akciğer Kanser Hücrelerinde ve BEAS- 2B Normal Akciğer Epitel Hücrelerinde, Transmembran Serin Proteaz 4 (TMPRSS4) ve Kalretikulin (CALR) Genlerinin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Büşra Sarı Çağılcı

ÖZET

H1299 METASTATİK VE *A549* METASTATİK OLMAYAN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE VE *BEAS- 2B* NORMAL AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNDE, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (*TMPRSS4*) VE KALRETİKULİN (*CALR*) GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Büşra Sarı Çağılcı
Tibbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Süreyya Bozkurt

2020

Bu araştırmanın amacı, BEAS 2B normal akciğer epitel hücrelerinde, H1299 metastatik ve A549 metastatik olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde, TMPRSS4 ve CALR genlerinin transkripsiyon aşamasındaki gen ifadelerinin karşılaştırılarak genlerin metastatik biyobelirteç olma potansiyellerinin incelenmesidir. Araştırmanın amacı kapsamında BEAS 2B normal akciğer epitel hücre hatlarından ve H1299 metastatik ve A549 metastatik olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinden genomik DNA elde edilerek total RNA izolasyonu ve komplomenter DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili primerler kullanılarak, CALR ve TMPRSS4 genlerinin transkripsiyonel seviyede ifade düzeyleri eş-zamanlı PCR metodu ile kantitatif belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen eş zamanlı PCR sonuçlarının hesaplanması Delta delta Ct ile yapılmıştır. Araştırmada qPCR analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; H1299 metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, ΔΔCt hesaplaması ile TMPRSS4 geninin ifadesinde 1.56 kat azalış, CALR geninin ifadesinde ise 88,64 kat artış saptanmıştır. Değerlendirilen diğer hücre hattı

metastatik olmayan A549 küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattında ise aynı TMPRSS4 geninin ifadesinde 28 kat artış gözlemlenirken, CALR geninin ifadesinde 5.20 kat artış saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada, TMPRSS4 ifade seviyesinin metastatik akciğer kanseri hücre hattında azaldığı, metastatik olmayan A549 akciğer kanseri hücre hattında ise arttığı belirlenmiştir. Bu sonucumuz TMPRSS4 geninin, metaztas gelşiminden çok, akciğer kanseri oluşumunda rol oynayabileceği düşüncesini desteklemektedir. CALR gen ifadesi ise araştırılan her iki hücre hattında artmış bulunmuştur. Özellikle bu artış metastatic özelikte olan H1299 hücre hattında yüksek bulunmuştur. Buradan hareketle CALR geminin akciğer kanser hücrelerinde metaztaz gelişiminde rol alabileceği ve ileri araştırmaların yapılması gerektiği öne sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, TMPRSS4 geni, Kalretikulin geni

ABSTRACT

COMPARISON OF EXPRESSION LEVELS OF TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 4 (*TMPRSS4*) AND CALRETICULIN (*CALR*) GENES IN *H1299* METASTATIC AND *A549* NON-METASTATIC NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS AND *BEAS- 2B* NORMAL LUNG EPITHELIAL CELLS

Sarı Çağılcı, Büşra
Department of Medical Biology and Genetics
Advisor: Assist. Prof. Dr. Bozkurt, Süreyya

2020

The aim of this study is to compare the gene expressions of TMPRSS4 and CALR genes at the transcription stage in BEAS 2B normal lung epithelial cells, H1299 metastatic and A549 non-small cell lung cancer cells, and to examine the genes' potential to become metastatic biomarkers. Within the scope of the study, genomic DNA was obtained from BEAS 2B normal lung epithelial cell lines and H1299 metastatic and A549 non-small cell lung cancer cells, and total RNA isolation and plotter DNA (cDNA) synthesis were performed. Using the relevant primers, the expression levels of the CALR and TMPRSS4 genes at the transcriptional level were quantitatively determined by the simultaneous PCR method. Calculation of the simultaneous PCR results obtained in the study was made with Delta delta Ct. According to the results obtained from qPCR analysis in the research; In H1299 metastatic non-small cell lung cancer cell line, the expression of TMPRSS4 gene decreased 1.56 times and expression of CALR gene increased by 88.64 times by ΔΔCt calculation compared to BEAS-2B control cell line. In the non-metastatic

A549 non-small cell lung cancer cell line evaluated, a 28-fold increase in the expression of the same TMPRSS4 gene was observed, while a 5.20-fold increase in the expression of the CALR gene was found. In our study, it was determined that TMPRSS4 expression level decreased in metastatic lung cancer cell line and increased in nonmetastatic lung cancer cell line A549. This result supports the idea that the TMPRSS4 gene may play a role in the development of lung cancer rather than the development of metastasis. CALR gene expression was found to be increased in both cell lines studied. Especially, this increase was found to be high in the H1299 cell line, which is metastatic. Based on this, it can be suggested that the CALR vessel may play a role in the development of metastasis in lung cancer cells and further studies should be conducted.

Keywords: Non-small lung cancer, TMPRSS4 gene, Calreticulin gene

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme ve eşime manevi hiçbir yardımı esirgemeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Büşra SARI ÇAĞILCI

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY

ETİK BEYANI

ÖZET ..... **v**

ABSTRACT ..... **vi**

TEŞEKKÜR ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vv**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **vvii**

TABLO LİSTESİ ..... **ix**

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ ..... **x**

GİRİŞ **1**

1. GENEL BİLGİLER **2**

1.1. AKCİĞER KANSERİ **2**

1.1.1. Epidemoloji Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması **2**

1.1.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması **3**

1.1.3. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri **5**

1.1.4. Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizmaları **6**

1.2.A549 EPITEL AKCIĞER KARSINOMA HÜCRELERI, H1299 INSAN AKCIĞER KARSINOMU HÜCRE HATTI VE BEAS-2B HÜCRE HATTI **7**

1.3. TMPRSS4 VE CALR GENLERI **8**

2. MATERYAL VE METOD **11**

2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ **11**

2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU **12**

2.3. cDNA SENTEZİ **13**

2.4. KANTİTATİF PCR **14**

3. BULGULAR **16**

3.1. KANTİTATİF PCR SONUÇLARI **16**

4. TARTIŞMA VE SONUÇ **18**

KAYNAKLAR **24**

EKLER

A. ETİK KURUL ONAYI **27**

B. ÖZGEÇMİŞ **28**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: A549 epitel akciğer karsinoma hücreleri..... **7**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: A549 ve HI299 hücre hatlarının bazı özellikleri **8**
Tablo 2.1: cDNA reaksiyonuna eklenenler rxn bileşenleri vs **13**
Tablo 2.2: Primer dizimleri **14**
Tablo 2.3: qPCR reaksiyonu için eklenler bileşenler **14**
Tablo 2.4: qPCR döngüsü **14**
Tablo 3.1: H1299 hücre ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları **16**
Tablo 3.2: A549 hücre hattında ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları **16**

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	**:** Santigrat Derece
µg	**:** Mikrogram
µL	**:** Mikrolitre
µM	**:** Mikromolar
A549	**:** Akciğer Kanseri Hücre Hattı
BEAS- 2B	**:** İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattı
CALR	**:** Kalretikulin
cDNA	**:** Complementary DNA
Ct	**:** Cycle of Treshold
DNA	**:** Deoksribo Nükleik Asit
dNTP	**:** Deoksi-Nucleoside Triphosphate
DTT	**:** Dikloro Difenil Trikloroethan
ECM	**:** Ekstrasellüler Matriks
EMT	**:** Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FBS	**:** Fetal Bovine Serum
H1299	**:** İnsan Akciğer Kanseri
M	**:** Molar
mRNA	**:** Messenger RNA
ng	**:** Nanogram
PI3K	**:** Phosphatidylinositol-3-Kinase
PCR	**:** Polymerase Chain Reaction
qPCR	**:** Quantitative Polymerase Chain Reaction
rpm	**:** Rounds per Minute
TMPRSS4	**:** Transmembran Serin Proteaz 4
TNM	**:** Tümör, Düğüm, Metastaz
ΔΔCt	**:** Delta Delta Cycle of Treshold

GİRİŞ

Akciğer kanseri, kanser türleri arasında dünya çapında en yüksek ölüm oranı görülen kanserlerden biridir. Akciğer kanserinin moleküler temeli kompleks ve heterojendir. Akciğer kanserinin altında yatan moleküler mekanizmalar kanserin başlaması, ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik epigenetik değişikliklerin kombinasyonlarının birikmesi sonucudur. Bu nedenle, birçok seviyede (Genetik, epigenetik) moleküler değişikliklerin anlaşılmasındaki gelişmeler ve bunların fonksiyonel önemi, akciğer kanseri teşhisi, prognozu ve tedavisini etkileme potansiyeline sahiptir. Bu bağlamdan yola çıkarak, BEAS 2B normal akciğer epitel hücrelerinde, H1299 metastatik ve A549 metastatik olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde, TMPRSS4 ve CALR genlerinin transkripsiyon aşamasındaki gen ifadeleri belirlenmiştir.Araştırma kapsamında sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B, insan akciğer karsinomu hücre hattı H1299 ve epitel akciğer karsinoma hücre hattı olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapılmış ve komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Sonrasında ilgili gen bölgelerine spesifik primerler ile kantitatif PCR (qPCR) ile genlerin anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın ortalarından itibaren, sigara kullanımının artmasıyla birlikte toplum sağlığını tehdit eden, önemli mortalite ve morbite nedeni olan bir hastalık haline gelmiştir. Dünyada yılda 1,8 milyon yeni olgu ile tüm kanserlerin yaklaşık olarak % 13' ünü oluşturan akciğer kanseri dünyada en sık görülen kanserlerden biridir (Ferlay ve ark., 2015).

1.1.1. Epidemoloji

Akciğer kanseri, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin % 26' sını ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 25' ini oluşturmaktadır ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri tanısı alan bireylerin tanıdan 5 yıl sonra sağkalım oranının %15 olduğu saptanmıştır (Siegel ve diğerleri, 2017).

Klinik semptomların ve etkili tarama programlarının olmaması nedeniyle, çoğu akciğer kanserine ileri evrede tanı konur. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların çoğu 65 yaş ve üzerindedir (Testa ve ark., 2018). Hastaların çok az bir kısmı 45 yaş ve altında tanı almaktadır.

Türkiyede erkeklerde görülen kanserler arasında ilk sırada akciğer kanseri gözlenmekte, kadınlarda ise meme, tiroid, ürogenital ve sindirim sistemi kanserlerinden sonra 5. sırada yer almaktadır. Ayrıca cinsiyete bakılmaksızın, tüm kanserler dikkate alındığında ilk sırayı akciğer kanseri almaktadır (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2018).

Tümör biyolojisi alanındaki son gelişmeler, bağışıklık sistemi ve tümör arasındaki karmaşık etkileşimi vurgulamış ve adaptif bağışıklık sisteminin tümör büyümesinin kontrolünde önemli rolünü ortaya koymuştur (Mittal, Gubin, Schreiber ve Smyth, 2014; Vesely, Kershaw, Schreiber ve Smyth, 2011). Tümör mikroçevresi, maligan, stromal ve bağışıklık hücrelerinden oluşan karmaşık bir ağdan oluşmaktadır. Tümör infiltratif bağışıklık hücrelerinin çoğu sert ve dayanıklı tümörde tanımlanmıştır (Fridman, Pages, Sautes-Fridman, Galon, 2012; Galon ve diğerleri, 2006). Bağışıklık bağlamı olarak tanımlanan tümör mikroçevresindeki bağışıklık hücrelerinin türü, yoğunluğu ve konumu, kanser hastalarının prognozunu güçlü bir şekilde etkilemektedir (Fialova ve diğerleri, 2013; Mlecnik ve diğerleri, 2011;

Sautes-Fridman ve diğerleri, 2011; Galon ve diğerleri, 2006). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, yüksek oranda bulunan olgun dendritik hücreler hastaların uzun süreli sağkalımı ile ilişkilidir (Dieu-Nosjean ve diğerleri, 2008) ve efektör-bellek fenotipinden önce baskın olan CD8þ T hücreleri tarafından güçlü bir infiltrasyon ile ilişkilidir (Goc ve diğerleri, 2014). Yüksek orandaki CD8þ T hücreleri olan bir grup hasta içinde, az sayıda olgun dendritik hücreler sahip olanlar, yüksek yoğunluklu olgun dendritik hücreler sahip olanlardan daha düşük genel sağkalımı göstermektedir. Bu durum tümör infiltratif CD8þ T hücrelerinin işlevsel olarak heterojen olabileceğini düşündürmektedir (Becht ve diğerleri, 2014; Goc ve diğerleri, 2014).

Kanser hücrelerinin immünojenitesi, antijenitelerinden (spesifik tümör antijenlerinin ekspresyonu) ve adjuvantisitelerinden (kanser tedavisi sonrası nüks riskini azaltıcı uygulamalar) kaynaklanmaktadır. Tümör mikroçevresine tedavi sonrası nüks etkisini azaltıcı uygulamalar, tümöre özgü bağışıklık tepkilerini uyaran işlevsel olarak kendine özgü bir apoptoz türü olan immunojenik hücre ölümüdür (Vacchelli ve diğerleri, 2013; Kroemer ve diğerleri, 2013; Garg, Dudek, Agostinis, 2013; Dudek ve diğerleri, 2013). Hücre ölümünün immünojenitesi en az üç bağımsız olguya bağlıdır. Bunlar; endoplazmik retikuluma, şaperon protein kalretiküline (CRT), preapoptotik maruziyeti (Fucikova ve diğerleri, 2011; Obeid ve diğerleri, 2007). Ayrıca hücre yüzeyinde HSP70 ve HSP90 (Spisek ve diğerleri, 2007) gibi diğer şaperon proteinlere, ATP'nin otofajiye bağlı aktif sekresyonuna ve (Garg ve diğerleri, 2014; Martins ve diğerleri, 2014; Fridman, Pages, Sautes-Fridman, Galon, 2012) ve histon olmayan kromozon proteini olan HMGB1 (High Mobility Group Box 1; Yüksek Mobilite Grup Kutusu 1) da etkilidir (Apetoh ve diğerleri, 2007; Scaffidi, Misteli ve Bianchi, 2002).

1.1.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'i küçük hücreli dışı akciğer kanseri, %50'si adenokarsinomlar ve %30'u ise skuamöz hücreli karsinomlar olarak sınıflandırılmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin erken teşhisinde cerrahi tedavi uygun bir seçenekken, ancak ilerleyen vakalarda tüm hastalarda standart olarak platinum bazlı kemoterapi tedavi olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında platinum ile birlikte pemetrekset ajanı ve bevacizumab anti-anjiyojenik antikor ile yapılan tedavilerde ise skuamöz hücreli

karsinomlar dışındaki akciğer kanseri tanısı almış hastalarda hastalığın tedavisindeki etkisinin artmasını sağladığı saptanmıştır (Novello ve diğerleri, 2016). Bu şekilde yapılan tedavilerde etki oranı %25-35 aralığında olup hastalardaki ortalama sağkalım süresi 8 ila 12 ay arasında olduğu belirtilmiştir (Reck ve Rabe, 2017).

Ekstrasellüler matriks (ECM) etkileşimlerindeki değişiklikler, metastaz gelişimi için önemlidir (Lambert, Pattabiraman ve Weinberg, 2017). Proteazların tümör hücrelerinin ve ECM özelliklerinin modifikasyonunda önemli bir rol oynadığı, proteaz aktivitesinin düzensizliğinin kanserin ayırt edici bir özelliği olarak kabul edilmesinin bir nedeni olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Akciğer Adenokarsinoma: Genellikle santral fibroz ve plevral büzülme ile periferik olarak yerleştirilmiş bir kitle oluşturur. Tanım olarak, akciğer adenokarsinoma, glandüler farklılaşma veya müsin üretimi ile malign bir epitelyal neoplazmdır. Bu gibi morfolojik özellikler tanındığında, tümör küçük biyopsi örneklerinde bile adenokarsinoma olarak tanımlanabilir. Akciğer adenokarsinoma hücreleri genellikle pnömositik belirteçleri eksprese eder (Gurda ve ark., 2015). Yakın yıllarda patolojik ve klinik korelasyona dayanarak adenokarsinoma sınıflamasında belirgin bir iyileşme olmuştur. Ana histolojik tipler, tümörün derecesine göre tanımlanmış prognostik öneme sahiptir. Adenokarsinomalarda, hastanın sağkalımını iyileştirmek için onaylanmış moleküler hedefli tedavi ile çoklu gen değişiklikleri olabilir (Zheng, 2016).

Skuamöz Hücre Karsinoma (SHK): SHK akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Son yıllarda sigara içme davranışındaki değişikliklerden dolayı görülme sıklığı azalmıştır. SHK genellikle akciğerin orta kısmında, ana hava yollarında meydana gelir ve büyük bir boyuta ulaştığında oyuklar oluşturabilir (Travis, 2012).

Küçük Hücreli Karsinoma: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarındaki ölüm oranları, yeni tedavi ve kemoterapi uygulamalarına rağmen oldukça yüksektir. Bu sorunun temel nedeni, hastalığın erken teşhis edilmemesi ve mevcut tedavilerin iyileşme sürecinde ya yetersiz olması ya da sadece sınırlı bir hasta grubunda etkili olması gösterilmektedir. Bu nedenle, küçük hücreli dışı akciğer

kanserinde hedefe yönelik yeni tedavi yöntemlerinin kullanıldığı araştırmalar oldukça önemlidir (de Aberasturi ve diğerleri, 2016).

1.1.3.Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Akciğer kanseri için en önemli risk faktörü sigara kullanımıdır. Küresel olarak, tüm akciğer kanseri vakalarının % 80' inden fazlasında sigara içilmesi sorumludur. Amerika'da, sigara içen erkekler için hiç sigara içmemiş erkeklere kıyasla, akciğer kanserine ait rölatif ölüm riskleri sırasıyla 1960, 1980 ve 2000' lerin kohortlarında 12,2, 23,8 ve 24,9 iken, sigara içen kadınlar için, hiç sigara içmemiş kadınlara kıyasla, akciğer kanserine ait rölatif ölüm riskleri 1960, 1980 ve 2000' lerin kohortlarında 2,7, 12,6 ve 25,6' dır. Erkekler ve kadınlar için göreceli risklerin yakınlaşması, 1960'lardan beri erkekler ve kadınlar arasında sigara içme biçimlerinin benzemesinden kaynaklanmaktadır (Thun ve ark., 2013).

Hava kirliliği, yakıt yakma, radon, asbest, krom, kadmiyum ve arsenik gibi bazı metaller ve bazı organik kimyasallara çevresel maruziyet gibi diğer faktörler akciğer kanseri gelişimine katkıda bulunur (Guo ve ark., 2016, Raaschou-Nielsen ve ark., 2013). Akciğer kanseri ve hava kirliliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki de gözlenmiştir. Özellikle, <10 μm çaplı bir partiküler madde seviyesi, akciğer adenokarsinomunun artmış riski ile ilişkilidir (Raaschou-Nielsen ve ark., 2013). Avrupa' da ve Çin' de yürütülen çalışmalar, partiküllü madde hava kirliliğinin akciğer kanseri insidansına katkıda bulunduğuna dair kanıt sağlamıştır (Guo ve ark., 2016, Raaschou-Nielsen ve ark., 2013). Bu risk faktörleri sigara bırakma ve temiz hava girişimleri ile önlenebilir olduğundan, akciğer kanseri insidansını ve ölüm oranını nüfus temelli uygun önleyici stratejilerle azaltmak mümkündür.

Genetik yatkınlık, özellikle genç yaşta (50 yaş altı) hastalığı geliştirenlerde ve hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanseri gelişme riskine katkıda bulunabilir (Matakidou ve ark., 2005). Bununla birlikte, akciğer kanserine genetik yatkınlığı olanlar için sigara kullanımı bu riski çok artırmaktadır. 2012' de yapılan bir çalışma, akciğer kanseri pozitif aile öyküsü olan bireylerin akciğer kanseri geliştirmeye yatkın hale geldiğini göstermiştir (Cote ve ark., 2012). Son bulgular, EGFR geninin germline ekzon 20 T790M mutasyonlarının ve HER2 geninin transmembran domainindeki mutasyonların onkogenik olabileceğini ve kalıtsal ve sporadik akciğer

adenokarsinomlarına neden olduğunu göstermektedir (Gazdar ve ark., 2014, Yamamoto ve ark., 2014).

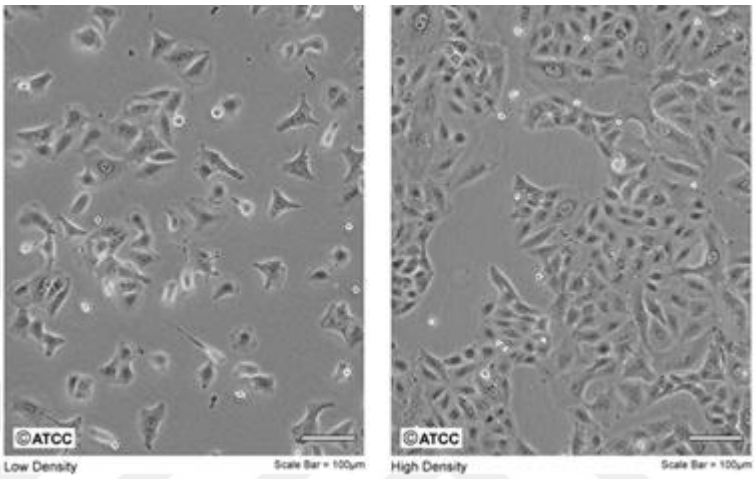
Örnek olarak postoperatif nüks, hastalığın seyri ve tedavisinde önemli bir sorundur ve hastaların küratif rezeksiyondan sonra aynı evrede olan hastaların tedavisinde geniş varyasyonlar sergilemektedir. Bu nedenle, hastaların mevcut TNM (Tümör, Düğüm, Metastaz) sisteminde sınırlara ulaşılmış olacağından bu sisteme ek olarak moleküler tekniklere dayanan biyobelirteçlerin klinik parametreler olarak nüks riskini öngören bağımsız faktörler olduğu kanıtlanmıştır (Chikaishi ve diğerleri, 2016).

1.1.4. Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizmaları

Akciğer kanserinin başlaması ve ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik epigenetik değişikliklerin yanı sıra nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme ve/veya amplifikasyonlar dahil olmak üzere kalıcı genetik değişiklikler kombinasyonunun birikmesinin bir sonucudur. Epigenetik değişiklikler, replikasyon, onarım, rekombinasyon ve transkripsiyon gibi tüm DNA-bağımlı işlemleri etkileyen kromatinin kalıtımsal değişikliklerinin toplamını ifade eder. Kromatin aracılı transkripsiyonel düzenlenme, DNA metilasyonunu, histon modifikasyonlarını, nükleozom yeniden düzenlemesini ve küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar yoluyla düzenlenmeyi içerir. Epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ile ilişkili bir gen alt kümesinin, DNA metilasyonundan sonra KHDAK'de önemli ölçüde baskılandığı ve gen artışına özgü DNA metilasyonunun EMT ile korele olduğu gösterilmiştir. EMT, hücre adezyonu kaybı ve artan hücre hareketliliği ile karakterize edilen temel ve korunan bir süreçtir. EMT, mezoderm oluşumu, nöral tüp oluşumu ve yara iyileşmesi de dahil olmak üzere sayısız gelişimsel süreç için esastır. Bununla birlikte, metastazın başlatılması, hücre-hücre yapışması kaybı, hücre mobilitesinde artış ve invazyon da dahil olmak üzere, EMT ile birçok yönden fenotipik benzerliğe sahiptir (Mehta ve ark., 2015). Birçok kanser türünde olduğu gibi akciğer kanserlerine de etki eden çok sayıda mutasyona uğramış, işlevi bozulmuş proteinler vardır.

1.2. A549 EPITEL AKCIĞER KARSINOMA HÜCRELERI, H1299 INSAN AKCIĞER KARSINOMU HÜCRE HATTI VE BEAS-2B HÜCRE HATTI

A549 hücre hattı, 1973 yılında sürekli hücre hatları oluşturmak için yapılan çalışmada 200 farklı tümörden, bir akciğer adenokarsinomadan izole edilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. A549 epitel akciğer karsinoma hücreleri (https://www.atcc.org/~/ps/CCL-185.ashx)

A549 hücrelerinin kullanım alanlarının içinde Kanser araştırması, hava yolu fonksiyonu, hastalık ve viroloji çalışmaları için distal akciğerin epitelyal modellerinin üretilmesi sayılabilir (Cooper, 2012).

A549 ve H1299 hücre dizileri, insan akciğer adenokarsinomu hücre dizileridir. A549 ve HI299 hücre hatlarının bazı özellikleri Tablo 1.1'de verilmiştir (Xiaobo ve diğerleri, 2016; Cowley ve diğerleri, 2014; Kovacevic ve diğerleri, 2011; Amann ve diğerleri, 2005).

Tablo 1.1: A549 ve HI299 hücre hatlarının bazı özellikleri

	Hücre Hatları	
Özellik	**A549**	**HI 299**
Histolojik Tip	Adenokarsinom	Büyük hücreli karsinom
İkiye Katlanma Süresi (Doubling Time)	22 saat	30 saat
SGK-1 Ekspresvonu	Var	Bilinmemekte
NDRG1 Ekspresyonu	Var	Var (zayıf ekspresyon)
EGFR Ekspresyonu	Yabanıl tip	Yabanıl tip
PTEN Ekspresyonu	Yabanıl tip, güçlü ekspresyon	Yabanıl tip, zayıf ekspresyon

BEAS-2B hücre hattı ise ilk olarak 1989'da R. R. Reddel ve ekibi tarafından immortalize edilmiştir (LGC, CRL-9609). Bronş epiteli kökenli olup, serumlu ortamda kültürlendiğinde skuamöz farklılaşma yeteneğini korur. Skuamöz A549 hücreleri, kültürde tek tabaka halinde, kültür zeminine yapışarak, sitoplazma çıkıntıları oluşturmuş yassı şekilli hücreler olarak büyümektedirler. Farklılaşmayı ve karsinogenezi indüklemek için yahut herhangi bir ajanın farklılaşma ve karsinogenez üzerine etkilerini incelemek için sıklıkla kullanılır (Kacar ve ark., 2019).

1.3. TMPRSS4 VE CALR GENLERI

TMPRSS4 enzimi, kısa bir N-terminal sitoplazmik uç , bir transmembran alan ve katalitik aktivitesini içeren büyük bir hücre dışı alandan oluşmaktadır (de Aberasturi ve Calvo, 2015). Proteaz enzim ailesinin bir üyesi olan TMPRSS4 enziminin; pankreas, kolon, akciğer, yumurtalık, meme, servikal karsinom ve tiroid kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. (de Aberasturi ve Calvo, 2015; Cheng, Liang, Li, 2013; Ohler ve Becker-Pauly, 2012).

İnsan TMPRSS4 geninin klonlanmasından itibaren yapılan araştırmalarda; Northern blot analizleri, mikrodizin çalışmaları ve RT-PCR ile pankreas, kolorektal ve tiroid kanserlerinde transkripsiyonel olarak yüksek düzeyde TMPRSS4 ekspresyonu saptanmıştır (Nguyen ve diğerleri, 2012).

TMPRSS4'ün aşırı ifadesi birkaç kanser türünde hücre büyümesine ve metastaza neden olan membrana bağlı bir serin proteazdır (Wang ve diğerleri, 2019;

de Aberasturi ve Calvo, 2015). Yapılan araştırmalarda TMPRSS4 seviyelerinin skuamöz küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında kötü prognoz ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu saptanmıştır (Villalba ve diğerleri, 2014). Yapılan in vitro ve in vivo deneyler sonucunda, TMPRSS4''ün tümör hücrelerinin büyümesini ve metastazını arttırdığını belirlenmişdir (de Aberasturi ve diğerleri, 2016).

Proteolitik enzimlerin, kanser hücrelerinin çoğalmasında enzimin reseptörüne bağlanan pro-ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünü (pro-uPA) parçaladığı saptanmıştır (Min, Lee, Lee ve Kim, 2014). Hepatoselüler karsinomda ise, TMPRSS4'ün ekspresyon seviyesinin artmasının RECK ile anjiyogenezinin arttırdığı saptanmıştır (Wang ve diğerleri, 2015). Ayrıca hepatoselüler karsinomda radyosyonun TMPRSS4'ün EMT'ye katkıda bulunması sonucunda kanser hücrelerinin metastaz geliştirmesine neden olduğu belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2011). Akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir araştırmada, TMPRSS4'ün kanser kök hücre özellikleri, tümör dokusundaki gen ifadesini engelleyerek dokudaki ALDH+ hücrelerinin azalmasını sağladığı belirlenmiştir (de Aberasturi ve diğerleri, 2016). Elde edilen sonuçların TMPRSS4'ün kanser hücrelerinde terapötik hedef olacağı yönünde umut veren gelişmelerdir. Buna ek olarak yapılan translasyonel çalışmalarda kanser türlerindeki mRNA ve protein düzeylerindeki yüksek TMPRSS4'ün hastalığın seyri ve hastanın iyileşme durumu ile ters orantılı olduğu belirlendiğinden TMPRSS4'ün bir biyobelirteç olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (de Aberasturi ve Calvo, 2015). TMPRSS4'ün akciğer kanserinde promotör bölgenin DNA hipometilasyonunun yukarı yönlü regülasyonunda aracı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, DNA metilasyon durumunun da hastalığın seyri ve hastanın iyileşme durumunda önemli olduğu ve nüks olmadan hastaların sağkalımlarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği gözlemlenmektedir (Exposito ve diğerleri, 2019; Villalba ve diğerleri, 2014).

Kalretikulin (CALR) geni 19. kromozom üzerinde 19p13.2'de yerleşik, 9 ekzondan oluşan bir gendir ve uzunluğu 4.2 kb'dır (Guglielmelli ve diğerleri, 2014a). CALR proteini 46 kDa büyüklüğünde bir proteindir ve N-terminal domain, C-domain, P-domain olarak adlandırılan 3 farklı yapısal domainden oluşur (Guglielmelli ve diğerleri, 2014b). CALR proteininin en iyi bilinen fonksiyonu

endoplazmik retikulumda (ER) kalsiyum (Ca^{+2}) bağlayıcı şaperon olarak fonsiyon göstermesidir (Gold ve diğerleri, 2010).

Prolinden zengin P-domaini kalsiyum için yüksek afiniteli, düşük kapasiteli bağlanma bölgesi sağlar. N-terminal domain endoplazmik retikulumu tanıyan sinyal sekansından oluşur ve lektini bağlar. C-terminal domain ise düşük afiniteli, yüksek kapasiteli kalsiyum bağlanma bölgesidir ve hücresel kalsiyum dengesinden esas sorumlu bölgedir. Defektif CALR mutasyonu olan hücrelerin kalsiyum depolama kapasiteleri azalır. CALR'nin fazla ifadelenmesi ise Ca^{+2} retansiyonunu arttırır (Guglielmelli ve diğerleri, 2014b).

CALR, diğer şaperon proteinlerle birlikte uygun protein ve glikoprotein katlanmasında rol oynar. Calneksin ile yapısal olarak homologtur ve proteinlerin doğru katlanması, degradasyonu gibi fonksiyonlarda calneksin/calreticulin siklusunda beraber görev alır (Guglielmelli ve diğerleri, 2014a). CALR'nin ER'daki esas görevi olan Ca^{+2} dengesi ile ilişkili görevleri yanında; moleküler şaperonlama, oksidatif streslere yanıt, immun sistem yanıtı, hücre çoğalması ve ölümü, fibrozis gibi birçok farklı mekanizmalarda görev aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Michalak ve diğerleri 1999; Jethmalani ve Henle,1998).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Besiyeri, RPMI-1640 içerisinde %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penicilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

Hücre Hatlarının Stoktan Elde Edilmesi: Hücreleri arttırmak amacıyla 80ºC den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınarak falkon, 21ºC 800 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25 cm^2'lik flasklara alınarak 37ºC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

Besiyeri Değiştirme: Flask içerisinde bulunan besiyer ortamı uzaklaştırılarak 1X PBS 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 4 ml ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edildikten sonra 25 cm^2'lik flask içerisine 5ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklendi.

Hücre Hatlarının Pasajlanması: Hücre hatları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS ilave edildi, ardından hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması gerçekleştirildi. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO^2'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskop altında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına hasar vermesi önlenmiş olundu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 21 ºC 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve kazanılan hücre peleti 1ml besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37ºC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmış oldu.

Hücre Soylarının Stoklanması: Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37^{o}C'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 21 ^{o}C 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı ve sonra süpernatant kısım aspire edildi. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO +5 ml FBS +40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtıldı ve hemen -80^{o}C'ye kaldırıldı.

Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı: Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda kazanılan hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak iyice karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

RNA İzolasyonu: Kültürlenmiş 1 x 10^6 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanıldı.

Kit içeriklerinden olan trizol TRK solüsyonuna çeker ocakta 1 mililitre/20 mikrolitre beta-merkaptoetanol ilave edilerek işleme başlandı. Ardından 1 mililitre besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 mikrolitre TRK solüsyonu eklendi ve 21G ölçülü 5 mililitrelik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapıldı.

500 mikrolitre %70'lik etil alkol ilave edilerek vortekslenen hücre lizatından 700 mikrolitresi, kit komponentlerinden olan spin kolonlu koleksiyon tüpüne aktarıldı. Örnek, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve koleksiyon tüpüne inen sıvı boşaltılıp santifüj tekrar yapıldı.

Kit içeriğinde olan RNA Yıkama Tamponu I'den 500 mikrolitre kolonlu tüpe eklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Tüpe inen sıvı boşaltılıp aynı santrifüj, bu kez %99'luk etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500

mikrolitre eklendi ve tekrarlandı. Bu işlem bir kez daha yapıldı. Herhangi ekleme yapılmadan sadece santrifüj tekrarlanarak tüpe inen sıvı boşaltıldı.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten ayrılıp kitte mevcut olan yeni bir koleksiyon tüpüne oturtuldu ve bir ekleme yapılmadan 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mililitrelik santrifüj tüpüne alındı ve 60 mikrolitre kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenerek 10.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. RNA, -80 °C kaldırıldı.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için,"Nanodrop" cihazı kullanıldı. Örnekten 1 mikrolitre alınarak OD ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.Sonuç tablo 2.1'de verilmiştir.

2.3. cDNA SENTEZİ

cDNA Sentezi: cDNA sentezi için Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription Kit ürünü kullanıldı. 10 mikrolitre RNA örnekleri, 65 °C 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 5 dakika yaklaşık olarak 4 °C buzda bekletildi.

5 mikrolitre 5X konsantrasyonlu reaksiyon tamponu, 2 mikrolitre deoksinükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi, 5,25 mikrolitre randomize primerler, 0,5 Molar RNaz inhibitörü, RNA'nın ikincil yapısını oluşturan bağları kırmak için 1,25 Molar dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 Molar ters transkriptaz (reverse transcriptase, RTE) enzimi ve 10 mikrolitre RNA örnekleri eklenere reaksiyon tüpü 25 °C 10 dakika, 50 °C 60 dakika ve 85 °C 5 dakika olacak şekilde işlem gerçekleştirildi. Reaksiyon bitiminde ise cihaz tüpleri 4 °C soğutmaya ayarlandı.

Tablo 2.1: cDNA reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
5X Reaksiyon Tamponu	5 µl	1X
dNTP	2 µl	100 mM
Randomize Primerler	5,25 µl	100 µm
RNase İnhibitörü	0,5 M	0,5 mM
DTT	1,25 M	1,25 mM
RTE	1 M	1 M
RNA Örnekleri	10 µl	3 M
Toplam Hacim	25 µl	25 µl

2.4. KANTİTATİF PCR

qPCR yapılması amacıyla ilgili genlerin ifade düzeylerini saptamak için Tablo 2.2'deki primerler tasarlandı.

Tablo 2.2: Primer dizimleri

Genin Adı	Primer Dizilimi	
GAPDH	Forward	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA
	Reverse	TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
TMPRSS4	Forward	CCTGGCGAGTATCATCATTGTG
	Reverse	GATCGGTCCTTGGAGAGGCG
CALR	Forward	AAGTTCTACGGTGACGAGGAG
	Reverse	GTCGATGTTCTGCTCATGTTTC

Amplifikasyon için, "Corbett Research Real-time PCR Thermal Cycler" cihazı kullanıldı ve reaksiyon tüpüne 2X konsantrasyondaki Sybr Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün) içerikli karışımından 12 mikrolitre eklendi, reverse ve forward primerlerin her birinden 0,5 mikrolitre eklendi, 3 mikrolitre cDNA örneği ve 4 mikrolite nükleazdan arındırılmış su eklendi (Tablo 2.3) Reaksiyonun aşamaları Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3: qPCR reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	12µl	1 X
Forward Primer	0,5 µl	0,3 µm
Reverse Primer	0,5 µl	0,3 µm
cDNA	3 µl	<500 ng
Su	4 µl	
Toplam Hacim	20 µl	

Tablo 2.4: qPCR döngüsü

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		**94 °C 4 dakika**
Çoğalma	**1. Denatürasyon**	95 °C 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C 30 saniye
	3. Uzama	72 °C 30 saniye, Floresan okuma
Sonlanma		72 °C 10 dakika
		X 36 DÖNGÜ

3. BULGULAR

3.1. KANTİTATİF PCR SONUÇLARI

Yapılan kantitatif PCR analizinde; farklı iki hücre hattında gerçekleştirilen TMPRSS4 ve CALR genlerinin anlatım düzeyleri GAPDH genine göre normalize edilerek çalışılmıştır. İlgili genlerin Ct değerleri Tablo 3.1 ve Tablo 3.2‘ de verilmiştir.

Tablo 3.1: H1299 hücre ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları

	Ortalama Ct Değeri (BEAS-2B)	**Ortalama Ct Değeri (h1299)**	**ΔCt (BEAS-2B)**	**ΔCt (h1299)**	**İfade Değişimi (Kat)** $2^{-\Delta\Delta Ct}$
TMPRSS4	32,99	33,17	-12,85	-13,48	0,64
CALR	33,26	34,24	-13,12	-6,65	88,64
GAPDH	20,14	27,56			

Tablo 3.2: A549 hücre hattında ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları

	Ortalama Ct Değeri (BEAS-2B)	**Ortalama Ct Değeri (A549)**	**ΔCt (BEAS-2B)**	**ΔCt (A549)**	**İfade Değişimi (Kat)** $2^{-\Delta\Delta Ct}$
TMPRSS4	32,99	35,6	-12,85	-8,04	28,05
CALR	33,26	38,3	-13,12	-10,74	5,20
GAPDH	20,14	27,56			

H1299 ve A549 hücre hatları, deney grubu olarak kullanılırken BEAS-2B hücre hattı ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir gene ait hesaplamalar bağımsız 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve gen ifadeleri analiz edilirken bu üç deneyin ortalaması kullanılmıştır. Gen anlatımlarının normalize edilmesi için GAPDH geni referans gen olarak alınmıştır

Yapılan qPCR analizlerini değerlendirdiğimizde, H1299 metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattında, BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, ΔΔCt hesaplaması ile TMPRSS4 geninin ifadesinde 1,56 kat azalış, CALR geninin ifadesinde ise 88.64 kat artış saptanmıştır. Metastatik olmayan A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında ise TMPRSS4 geninin ifadesinde 28 kat artış gözlemlenirken, CALR geninin ifadesinde 5.20 kat artış saptanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında cinsiyet farkı gözetmeksizin en ölümcül kanser türüdür. Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, günümüzde her iki cinsiyette de kanserden ölümlerinin başında yer almaktadır. Dünya genelinde sigara içme alışkanlıklarındaki değişmeye bağlı olarak akciğer kanserinin histolojik alttiplerinin oranında değişiklik yaşanmıştır. Tarihsel olarak çoğunlukla erkeklerde görülen bu kanser türü, zaman içinde kadınların sigara kullanımının artmasıyla kadınlarda meme kanseri, yumurtalık ve yumurtalık tüpü kanserleri toplamından daha yaygın bir hal kazanmıştır (Köktürk, ve diğerleri, 2004). Vücudun hemen hemen her bölgesine metastaz yapabilme özelliği nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşürmekte, ömür uzunluğunu da önemli ölçüde azaltmaktadır (Sher ve diğerleri, 2008).

Kanser potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği onkogen içermesidir yani bulunduğu dokudan tamamen farklı yeni bir hücre olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır. Karsinogenezisin meydana gelmesinde sürekli değişime uğrayan 100'ün üzerinde gen tanımlanmıştır. Fakat keşfedilmeyi bekleyen daha pek çok sayıda gen vardır (Alberts ve diğerleri, 2002). Tümörogenezdeki rolünün anlaşılması açısından normal ve kanserli dokularda birçok genin ifadesi gen ekspresyon belirleme yöntemiyle karşılaştırılabilir. Bu sayede hastalığın tanı ve tedavisini kolaylaştıran moleküler belirteçlerin olabileceği düşünülebilir.

Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğu karsinomdur; epitel hücrelerinden köken almaktadır. Akciğer karsinomları, histolojik kriterler temel alındığında küçük hücreli dışı ve küçük hücreli olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomları; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç sınıfta toplanır (Travis ve diğerleri, 1995). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının alttiplerin hücreleri boyut, şekil ve kimyasal yapı olarak birbirlerinden tamamen farklıdır. Ancak, tedavi ve prognoz yaklaşımları sıklıkla çok benzer olduğundan birlikte gruplandırılır.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, agresif seyreden ve sağkalım oranı yüksek olmayan, tanı anında çoğunlukla yaygın hastalık evresinde olan, uzak organ metastazı ve bölgesel lenf bezi tutulumu yapabilen sistemik bir hastalıktır. Hastalığın

genetik ve moleküler özelliklerini araştıran çalışmalar her geçen gün artsa da, sınırlı hastalık evresinde uygulanan kemoterapi standardı uzun yıllardır değişmemiştir. Yaygın hastalıkta, yeni tedavi arayışları ise sürmektedir.

Son yıllarda hücre yaşamı, migrasyonu ve invazyonunu düzenleyen mekanizmaların açığa kavuşmaya başlamasıyla kanser tedavisinde hücre bağlanma molekülleri (özellikle integrinlerle) ilgili yeni terapötikler geliştirilmeye başlanmıştır (Jin ve Varner, 2004). Hücre dışı matriks (ESM) proteolitik olarak bozulduğunda ya da mekanik olarak deforme olduğunda, hücreler fizyolojik ve patolojik olayları etkileyen çeşitli değişikliklere uğrarlar (Seguin ve ark., 2014). İntegrinler, bu değişiklikleri algılar ve hücre adezyonunu, göçünü, hücrenin hayatta kalması ve farklılaşmasını etkilerler. Hücresel tepkileri, çift yönlü entegrasyonu sağlamak için hücre içi ve dışı arasında fiziksel bir bağlantı oluşturulmasıyla bir dizi integrin sinyali ile sonuçlanmaktadır. (Anderson, 2014; Seguin ve ark., 2014). α ve β alt birimlerden oluşan ve non-kovalent bağlanan integrinler heterodimer transmembran proteinlerdir. Integrin-ESM bağlantısı ile birçok hücrede sinyal iletim mekanizmasını da uyarırlar. İntegrin inaktivasyonun tersinir formları bir takım kimyasal faktörleri teşvik eder, bu da kanser tedavisi için antiproliferatif ajanlara potansiyel kaynak sağlamaktadır (Mizejewski, 1999).

TMPRSS4'ün, çeşitli kanserlerde metaztaz gelişiminde rol oynadığını ileri süren çalışmalar bulunmaktadır. Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PI3K veya Src enzimlerinin inhibe edilmesinin, TMPRSS4'ün etkili olduğu kanser hücrelerinin yayılımını ve aktin mikrofilamentlerin regülasyonunu azalttığını gösterilmiştir (Kim ve diğerleri, 2010). Bir diğer çalışmada TMPRSS4'ün, epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) etkili olduğu ve kolon kanseri hücrelerinde metastaz oluşturduğu saptanmıştır (Jung ve diğerleri, 2008). Kalluri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise alveollerdeki epitel hücrelerinin birbirine bağlanmasını sağlayan E-kaderin gibi proteinlerin ifadelerinin azalmasının, kanser hücrelerinin metastaz yeteneği kazanmasında rol oynadığı belirtilmektedir (Kalluri, 2009). TMPRSS4'ün, adezyon moleküllerinden integrin α5β1'in yukarı yönlü regülasyonun sağlayarak ve sinyal yolaklarında görevli olan Fak, Src, Rac1, ERK1/2 ve AKT gibi proteinlerin ise aşağı yönlü regülasyonunu sağlayarak EMT'de rol aldığı belirlenmiştir (Kim ve Lee, 2014). Yapılan bir diğer araştırmada ise mikroarray analizi ile mır-205

(MIR205HG)'in TMPRSS4 aşağı yönlü regülasyonunda gen expresyonunda oldukça önemli olduğu saptanmıştır. Yüksek mır-205 seviyesi, yüksek e-cadherin ve düşük fibronektin seviyelerindeki bir epitel hücresine etki ederek metastazı inhibe ettiği saptanmıştır (Larzabal ve diğerleri, 2014).

Yaptığım çalışmada TMPRSS4'ün transkripsiyonel seviyede ifadesinin, metastatik, H1299 küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde 1,56 kat azaldığı belirlenmiştir. Bunun aksine metastatik olmayan A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında ise TMPRSS4'ün ifadesinin 28 kat arttığı belirlenmiştir. TMPRSS4 geninin akciğer kanseri gelişiminde ve metastaz sürecindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Literatürdeki çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Literatürde TMPRSS4'ün, epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) etkili olabileceğini ve kanser hücrelerine metastatik özellik kazandırabileceğini ileri süren az sayıda çalışmanın aksine, yaptığım çalışmada, TMPRSS4 ifade seviyesinin metastatik akciğer kanseri hücre hattında azaldığı, metastatik olmayanA549 akciğer kanseri hücre hattında ise arttığı belirlenmiştir.

Yapılan son araştırmalarda TMPRSS4 genin susturulması sonucunda kanser hücrelerinin çoğalmasının azaldığı belirlenmiştir ve bunun aksine TMPRSS4'ün aşırı ekspresyonun uyarımı sonucunda da kanser hücre hatlarındaki hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunun arttığı saptanmıştır (Chikaishi ve ark., 2016; Kim ve ark., 2014; Wu ve ark., 2014; Cheng ve ark., 2013; Liang ve ark., 2013). Benim de çalışmamda, metastatik olmayan A549 akciğer kanser hücre hattında TMPRSS4 geninin ifadesinde 28 kat artış tespit edilmiştir. Bu sonuç literatür ile uyumlu olup, TMPRSS4 geninin akciğer kanseri oluşumunda rol oynayabileceği düşüncesini desteklemektedir.

Yapılan bazı araştırmalarda TMPRSS4 gen ekspresyonunun aşağı yönlü regülasyonunun uyarımında, yukarı yönlü regülasyonun uyarımına kıyasla, aşağı yönlü regülasyonda TMPRSS4 vektörünün transfekte edilmesi sonucunda hücre çoğalmasının inhibe edilmesinde etkili biyobelirteç olduğu belirlenmiştir. (Fan ve ark., 2018; Huang ve ark., 201 .4; Lee ve ark., 2016; Jung ve ark., 2008).

Araştırmamda çalışılan bir diğer gen ise Kalretikulin (CALR) idi. Kalretikulin proteini başta endoplazmik retikulum olmak üzere sitoplazma ve hücre

membranının dış yüzünde bulunan çok fonksiyonlu bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Bu fonksiyonu sayesinde hücre büyümesi ve bölünmesi, hareket, hücrelerin birbirine bağlanması ve programlanmış hücrenin düzenlenmesi kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca CRT hücre içi kalsiyum homeostazisi ve endoplazmik retikulumdaki proteinlerin katlanmasında önemli rol oynar (Stoll ve diğerleri, 2016). Dendritik hücrelerin yüzeyindeki CRT, CD91'e bağlanarak apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar (Gardai ve diğerleri, 2005). CRT'nin dendiritik hücre yüzeyinden ayrılması veya blokajı sonucunda ise hücre ölümünün immünojenitesini ortadan kaldırmaktır (Garg ve diğerleri, 2012; Panaretakis ve diğerleri, 2009). Bu bulgular, özellikle dendritik hücrelerdeki apoptotik hücre ölümlerinde bağışıklık sisteminin tepkisini azaltarak uyarabileceğini göstermektedir.

Yaptığım çalışmada, qPCR analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; H1299 metastatik küçük-hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında, BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, CALR geninin ifadesinde 88.64 kat artış tespit edilmiştir. Aynı şekilde, metastatik olmayan A549 küçük-hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında da CALR geninin ifadesinde ise 5.20 kat artış saptanmıştır. Literatür araştırıldığında CALR geni ile ilgili olarak küçük-hücreli dışı akciğer kanseri ile ilgili çalışmaların yok denecek kadar az olduğu görülmektedir. 207 yılında Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında, CALR proteinin, dokuya komşuluğu olan normal akciğer dokusuna göre yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırıcılar ayrıca CALR ifadesinin küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında prognostic bir biyobelirteç olmaya aday olduğunu belirtmektedirler.

CALR gen ifadesi araştırılan her iki hücre hattında artmış bulunmuştur. Özellikle bu artış metastatik özelikte olan H1299 hücre hattında yüksektir. Buradan hareketle CALR geninin akciğer kanser hücrelerinde metaztaz gelişiminde rol alabileceği ve ileri araştırmaların yapılması gerektiği öne sürülebilir.

Araştırmanın sonuçlarına göre, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında anlatımı artan TMRPSS4 ve CALR genlerinin akciğer kanseri karsinogeneziyle direkt ya da dolaylı olarak ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Büyük sayıda hasta gruplarında TMRPSS4 ve CALR genlerinin ifadelerinin araştırılmasının, bu genlerin hastalık patogenezindeki olası rollerinin ortaya konması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Patogenezde rol oynayan gen ve proteinlere yönelik bilgilerin birikiminin, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hedefe yönelik yeni tedavi yöntemlerinin kullanılmasına yönelik araştırmalar için önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Extracellular control of cell division, cell growth, and apoptosis. In Molecular Biology of the Cell (4th Edition). Garland Science.

Amann, J., Kalyankrishna, S., Massion, P. P., Ohm, J. E., Girard, L., Shigematsu, H., ... & Kim, Y. H. (2005). Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Research*, 65(1), 226-235.

Anderson, L. R., Owens, T. W., Naylor, M. J. (2014). Integrins in development and cancer. *Biophysical Reviews*, 6(2), 191–202.

Antalis, T. M., Buzza, M. S., Hodge, K. M., Hooper, J. D., & Netzel-Arnett, S. (2010). The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. *Biochemical Journal*, 428(3), 325-346.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., ... & Yang, H. (2007). Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, 13(9), 1050-1059.

Becht, E., Goc, J., Germain, C., Giraldo, N. A., Dieu-Nosjean, M. C., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W. H. (2014). Shaping of an effective immune microenvironment to and by cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(10), 991-997.

Bugge, T. H., Antalis, T. M., & Wu, Q. (2009). Type II transmembrane serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23177-23181.

Cheng, D., Liang, B., & Li, Y. (2013). High TMPRSS4 expression is a predictor of poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiology, 37(6), 993-997.

Chikaishi, Y., Uramoto, H., Koyanagi, Y., Yamada, S., Yano, S., & Tanaka, F. (2016). TMPRSS4 expression as a marker of recurrence in patients with lung cancer. *Anticancer Research*, 36(1), 121-127.

Clegg, A., Scott. D.A., Hewitson, P., Sidhu, M., Waugh, N. (2002). Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax*, 57 (1), 20-28.

Cooper, J. (2012). Cell line profile A549. *Public Health England*. 5.

Coté, M. L., Liu, M., Bonassi, S., Neri, M., Schwartz, A. G., Christiani, D. C., ... & Andrew, A. S. (2012). Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *European Journal Of Cancer*, 48(13), 1957-1968.

Cowley, G. S., Weir, B. A., Vazquez, F., Tamayo, P., Scott, J. A., Rusin, S., ... & Lizotte, P. H. (2014). Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Scientific Data*, 1(1), 1-12.

De Aberasturi, A. L., & Calvo, A. (2015). TMPRSS4: an emerging potential therapeutic target in cancer. *British Journal Of Cancer*, 112(1), 4-8.

Stoll, G., Iribarren, K., Michels, J., Leary, A., Zitvogel, L., Cremer, I., & Kroemer, G. (2016). Calreticulin expression: Interaction with the immune infiltrate and impact on survival in patients with ovarian and non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 5(7), e1177692.

T.C. Sağlık Bakanlığı, TürkiyeHalk Sağlığı Kurumu (2018). Türkiye kanser istatistikleri. Ankara. https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/

Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Lung cancers: molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. *Cancers*, 10(8), 248.

Thun, M. J., Carter, B. D., Feskanich, D., Freedman, N. D., Prentice, R., Lopez, A. D., ... & Gapstur, S. M. (2013). 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N engl J med*, 368, 351-364.

Travis, W. D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*, 25, 18-30.

Travis, W.D., Travis, L.B., Devesa, S.S. (1995). Lung cancer. *Cancer*, 75 (1), 191-202.

Tsuboi, M., Ohira, T., Saji, H., Miyajima, K., Kajiwara, N., Uchida, O., Usuda, J., Kato, H. (2007). The present status of postoperative adjuvant chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 13 (2), 73-77.

Vacchelli, E., Aranda, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., ... & Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*, 3(3), e27878.

Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual Review Of Immunology*, 29, 235-271.

Villalba, M., Diaz-Lagares, A., Redrado, M., de Aberasturi, A. L., Segura, V., Bodegas, M. E., ... & Montuenga, L. M. (2016). Epigenetic alterations leading to TMPRSS4 promoter hypomethylation and protein overexpression predict poor prognosis in squamous lung cancer patients. *Oncotarget*, 7(16), 22752.

Villalba, M., Diaz-Lagares, A., Redrado, M., de Aberasturi, A. L., Segura, V., Bodegas, M. E., ... & Montuenga, L. M. (2016). Epigenetic alterations leading to TMPRSS4 promoter hypomethylation and protein overexpression predict poor prognosis in squamous lung cancer patients. *Oncotarget*, 7(16), 22752.

Villalba, M., Redin, E., Exposito, F., Pajares, M. J., Sainz, C., Hervas, D., ... & Valencia, K. (2019). Identification of a novel synthetic lethal vulnerability in non-small cell lung cancer by co-targeting TMPRSS4 and DDR1. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.

Wang, C. H., Guo, Z. Y., Chen, Z. T., Zhi, X. T., Li, D. K., Dong, Z. R., ... & Li, T. (2015). TMPRSS4 facilitates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma and is a predictive marker for poor prognosis of patients after curative resection. *Scientific Reports*, 5, 12366.

Wang, C. H., Guo, Z. Y., Chen, Z. T., Zhi, X. T., Li, D. K., Dong, Z. R., ... & Li, T. (2015). TMPRSS4 facilitates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma and is a predictive marker for poor prognosis of patients after curative resection. *Scientific Reports*, 5, 12366.

Xiaobo, Y., Qiang, L., Xiong, Q., Zheng, R., Jianhua, Z., Zhifeng, L., ... & Zheng, J. (2016). Serum and glucocorticoid kinase 1 promoted the growth and migration of non-small cell lung cancer cells. *Gene*, 576(1), 339-346.

Yamamoto, R., Nishikori, M., Tashima, M., Sakai, T., Ichinohe, T., Takaori-Kondo, A., ... & Uchiyama, T. (2009). B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Science*, 100(11), 2093-2100.

Zheng, M. (2016). Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25(3), 447-468.

EKLER

A. ETİK KURUL ONAYI

B. ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Trabzon'da doğdum. Ilkokul, ortaokul ve liseyi Trabzon'da okudum. 2016 yılında Avrasya Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden yüksek şeref ile mezun oldum. 2018 yılında İstinye Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.