

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

**A549 AKCİĞER EPİTELYAL KARSİNOMA HÜCRE DİZİSİNDE VE BEAS-
2B AKCİĞER BRONŞ EPİTELYAL NORMAL HÜCRE DİZİSİNDE
PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, KALRETİKULİN VE
MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON
AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

BÜŞRA KÖSE

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL - 2019

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

**A549 AKCİĞER EPİTELYAL KARSİNOMA HÜCRE DİZİSİNDE VE BEAS-
2B AKCİĞER BRONŞ EPİTELYAL NORMAL HÜCRE DİZİSİNDE
PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, KALRETİKULİN VE
MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON
AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

BÜŞRA KÖSE

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

İSTANBUL – 2019

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

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

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

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

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT
Danışman

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

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

İstinye Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT

İstinye Üniversitesi

Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU

İstanbul Üniversitesi

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “A549 akciğer epitelyal karsinoma hücre dizisinde ve BES-2B akciğer bronş epitelyal normal hücre dizisinde Prostaglandin endoperoksit sentaz-2, Kalretikulin ve Mage ailesi A3 üyesi genlerinin transkripsiyon aşamasındaki gen anlatımlarının karşılaştırmalı olarak incelenmesi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığımı ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Tarih:

Adı-Soyadı:

İmza:

ÖZET

A549 AKCİĞER EPİTELYAL KARSİNOMA HÜCRE DİZİSİNDE VE BEAS-2B AKCİĞER BRONŞ EPİTELYAL NORMAL HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, KALRETİKULİN VE MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

Ad-Soyad: Büşra KÖSE

Program: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Danışman: Süreyya BOZKURT

2019

Bu çalışmadaki amaç; akciğer adenokarsinomunu modelleyen A549 hücre dizisinde ve sağlıklı bronş epiteli BEAS-2B hücre dizisinde *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının karşılaştırmalı olarak incelenmesidir. Odaklanılan nokta, sağlıklı duruma göre kanserdeki değişimi aydınlatmaktır.

Çalışmada biyogüvenlik kabininde geleneksel hücre kültürü teknikleri, yarı manuel kit ile RNA izolasyonu, termal döngü cihazında sırasıyla cDNA sentezi ve eş zamanlı kantitatif PCR yöntemleri uygulanmıştır. Kültürlenmiş kanserli ve sağlıklı akciğer hücre hatları hasat edilerek total RNA'ları ayrıştırılıp enzimatik olarak tamamlayıcı DNA'lara dönüştürülmüştür. *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* genlerine özel olarak tasarlanmış olan primerler yardımıyla eş zamanlı PCR uygulanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı eş zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile A549 hücre hattında BEAS-2B hücre hattına kıyasla *PTGS2* geninin anlatımında 229,13 kat; *CALR* geninin anlatımında 4,03 kat; *MAGE-A3*

geninin ifadesinde ise 3,41 kat artış saptanmıştır. Bu üç genin kanserde hücre bölünmesi, apoptoz direnci, invazyon, anjiyogenez gibi olaylarda rol alabildiği bilinmektedir. Bu çalışma sonucunda, bu üç genin NF- κ B sinyal yolağında ortak bir etkisi olduğu ve bu üç gen için protein düzeyinde araştırma yapmanın faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, eş-zamanlı PCR, gen anlatımı, PTGS2, CALR, MAGE-A3

ABSTRACT

COMPERATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION ON TRANSCRIPTION STAGE OF THE PROSTAGLANDIN ENDOPEROXIDE SYNTHASE-2, CALRETICULIN AND MAGE FAMILY MEMBER-A3 IN A549 LUNG CANCER CELL LINE AND BEAS-2B HEALTHY LUNG EPITHELIAL CELL LINE.

Name - Surname: Busra KOSE

Program: Medical Biology and Genetics Master Program

Advisor: Sureyya BOZKURT

2019

The aim of this study was to investigate the expression levels of *PTGS2*, *CALR* and *MAGE-A3* genes in the A549 cell line which is modeling lung adenocarcinoma compared to the BEAS-2B cell line which is modeling healthy bronchial epithelium. The focal point is cancerous alteration compared to healthy.

In this study, conventional cell culture techniques in biosafety cabinet, total RNA isolation with semi-manual kit, both cDNA synthesis and real-time quantitative PCR in thermal cycler were applied. Cultured cancerous and healthy lung cell lines were harvested and their RNAs were separated. Total RNAs were enzymatically converted into cDNAs. The real-time PCR was performed with the specific primers have designed for *PTGS2*, *CALR* and *MAGE-A3* genes.

In the results of the study, the delta delta Ct calculation in A549 cell line compared with BEAS-2B cell line, 229,13 fold increase in *PTGS2* gene; 4,03 fold increase in *CALR* gene; 3,41 fold increase in *MAGE-A3* gene was observed. These three genes are known to play role in cancer cell division, apoptosis resistance,

invasion and angiogenesis. As a result of this study, these three genes are thought to have jointly effect on the NF- κ B signaling pathway. It may be beneficial to investigate on protein level for these three genes to illuminate at this point.

Keywords: Lung cancer, Real-time PCR, expression, PTGS2, CALR, MAGE-A3

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, deney aşamaları ve yazım sürecinde bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT'a, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bize destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Kendisine her ihtiyacımda yanımda olduğunu hissettiren, bana her zaman yoğun temposunun içerisinde muhakkak bir vakit ayırmaya çalışan değerli hocam Sağlık Bilimleri Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deneylelerimiz boyunca her şekilde yardım ve desteklerini esirgemeyip bize yoldaşlık eden bölüm arkadaşımız Okan Remzi AKAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda beraber çalıştığımız, tüm deney malzemelerini paylaştığımız, bu süreç boyunca zorlukları beraberce aştığımız değerli arkadaşlarım Hüma Tuğçe SEZGİN'e, Duygu KAYA'ya, Ceren AYNACI'ya, Eqzona QIPA'ya, Elif ÇINAR'a, Hacer KOTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni dünyaya getirip yetiştiren, maddi manevi desteklerini ve sevgilerini göstermeyi hiçbir zaman esirgemeyip her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

ONAY

ETİK BEYANI

ÖZET..... i

ABSTRACT..... ii

TEŞEKKÜR iii

İÇİNDEKİLER LİSTESİ..... iv

ŞEKİL LİSTESİ..... v

TABLO LİSTESİ..... vi

KISALTMALAR LİSTESİ..... vii

1. GİRİŞ..... 1

2. GENEL BİLGİLER..... 1

2.1. Akciğer Kanseri..... 1

2.1.1. Epidemiyoloji..... 2

2.1.5. KHDAK evreleri aşağıdaki gibi incelenebilmektedir 4

2.2. A549 ve BEAS-2B Hücre Hatları 5

2.3. PTGS2, CALR ve MAGE-A3 Genleri..... 6

3. MATERYAL VE METOD 8

3.1. Hücre Kültürü..... 8

3.1.1. Besiyeri hazırlanışı..... 8

3.1.2. Hücre hatlarının stoktan çıkartılması 8

3.1.3. Besiyeri değiştirme..... 2

3.1.4. Hücre kültürünün pasajlanması.....	2
3.1.5. Hücrelerin stoklanması.....	2
3.1.6. Hemositometre ile hücrelerin sayımı	3
3.2. Total RNA İzolasyonu.....	5
3.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	6
3.4. Kantitatif PCR	7
4. BULGULAR.....	10
4.1. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarının analizi.....	10
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	15
KAYNAKLAR	19
ÖZGEÇMİŞ.....	26

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1.: A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	1
Şekil 3.2.: BEAS-2B hücrelerinin mikroskopik görüntüsü	1
Şekil 3.3.: Thoma Lamı düzeni	4
Şekil 4.1.: <i>PTGS2</i> Geninin Ct ve Tm grafiği.....	11
Şekil 4.2.: <i>CALR</i> Geninin Ct ve Tm grafiği.....	12
Şekil 4.3.: <i>MAGE-A3</i> Geninin Ct ve Tm grafiği	13

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1.: İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri.....	6
Tablo 3.2.: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.....	7
Tablo 3.3.: cDNA sentez reaksiyon aşamaları	7
Tablo 3.4.: Tasarlanan primer dizilimleri.....	8
Tablo 3.5.: qPCR reaksiyon bileşenleri.....	9
Tablo 3.6.: qPCR döngü aşamaları.....	9
Tablo 4.1.: Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları	14

KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ATCC	: American Type Tissue Culture Collection
BCL2	: B-cell lymphoma-2
CALR	: Calreticulin
CD47	: Cyclin D47 signal / Siklin D47 sinyali
cDNA	: Complementary DNA
cm	: Santimetre
COX2	: Cyclooxygenase-2
CRT	: Calreticulin
Ct	: Cycle of Treshold
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: deoksi-Nucleoside triphosphate
DTT	:Dithiothreitol
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF2α	: Eukaryotic Initiation Factor-2-alpha
ER	: Endoplazmik retikulum
ERBB2	: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene
Homolog 2	
FBS	: Fetal Bovine Serum
g	: Gravite
GRCh38.p12	: Genome Reference Consortium Human Build
38 patch release 12	
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6

KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
M	: Molar
MAGE-A3	: Melanom-associated antigen-3
Mc	: Melting curve / Erime eğrisi
mL	: Mililitre
mRNA, siRNA	: Messenger RNA, small interfering RNA
MYC	: Myelocytomatosis viral oncogene family
NF-κB	: Nuclear Factor kappa B
ng	: Nanogram
OD	: Optic Density
P53	: Tümör baskılayıcı protein-53
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGE2	: Prostaglandin E Synthase-2
PTGS2	: Prostaglandin endoperoxide synthase-2
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAS	: Rat sarcomavirus oncogene family
rpm	: rounds per minute
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
RTE	: Reverse Transcription Enzyme
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
Tm	: Melting temperature / Erime sıcaklığı
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
Xq28	: X kromozomu q kolu 28. bant
ΔΔCt	: Delta Delta Cycle of Threshold

1. GİRİŞ

Akciğer kanserinde dolaylı yoldan karsinogenezi tetikleyen genlerdeki ifade değişimleri dikkat çekici bir konudur. Mutasyonların yanı sıra hücredeki bölünme, apoptoz, invazyon ve hücre göçleri üzerinde etkili olan genlerin ifade artışının saptanması, yeni inhibitör veya monoklonal antikor ilaçları geliştirme çalışmaları için önem arz etmektedir. Bu çalışmadaki amaç; etkili oldukları sinyal yolağı veya metabolik yollarda karsinogeneze etki ettiği bilinen *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* genlerinin sağlıklı ve kanserli akciğer hücre hatlarındaki transkripsiyon düzeyinde anlatımlarını araştırmaktır. Bu doğrultuda, satın alınmış olan ticari hücre hatlarından total RNA elde edilmiştir. Komplementer DNA'lara dönüştürülen RNA'lar ile söz konusu gen bölgelerine özel olarak tasarlanmış primerler yardımıyla uygulanan gerçek zamanlı PCR sonucunda, bu genlerin hücrelerdeki anlatım miktarları ortaya konmuştur. Sonuçlar literatür ile paralel olup, ileriki çalışmalarda bu genlerin ifadesinin protein düzeyinde incelenmesi gerektiği düşünölmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğer doku hücrelerinin mutasyon birikimi, gen anlatımı değişimi, epigenetik faktörler gibi çeşitli sebeplerle hücresel kontrol mekanizmalarının bozulup hücrelerin anormal düzeyde çoğalarak akciğerde bir kitle (tümör) oluşturması ile ortaya çıkan bir hastalıktır.

Akciğer kanseri, hücrelerin mikroskop altındaki görünümüne dayanarak genel olarak iki ana grupta sınıflandırılır: "küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)" ve "küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)". Küçük hücreli akciğer kanseri ile diğer gruba kıyasla daha az karşılaşılır, ancak bu grup çok daha hızlı gelişir ve metastaz, morbidite ve mortalitesi daha yüksektir. KHDAK, akciğer kanserlerinin %80'ini, küçük hücreli akciğer kanseri ise kalan %20'sini oluşturur (Yılmaz, 2018).

2.1.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, dünyada kansere bağlı ölümlerde ilk sıralarda yer alan bir kanser türüdür (World Cancer Reports, 2018). Dünya genelinde erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer alırken, kadınlarda bu kanser türüne bağlı ölümler ikinci sıradadır (Horeweg ve ark., 2012). Son yıllarda tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen, akciğer kanseri tanısı almış kişilerin neredeyse yarısında halen önemli ölçüde ilerleme sağlanamamıştır (Richards ve ark., 2014).

Dünya genelinde raporlanan verilere göre, cinsiyet ayrımı yapmaksızın değerlendirildiğinde, akciğer kanserinin yılda %0,5 oranında arttığı bilinmektedir (World Cancer Reports, 2018). Türkiye’de de akciğer kanseri en sık rastlanan kanser çeşitleri arasındadır. Sağlık Bakanlığı Kanser Kontrol ve İstatistiği Kurumu 1999’da akciğer kanseri insidansı erkeklerde 7,8/100.000; kadınlarda 1,2/100.000 olarak açıklanmıştır. Bu verilere göre, akciğer kanseri ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türü iken, kadınlarda 6. sırada yer almıştır. Bu rakamlar 2015’te ise yaşa bağlı olarak erkeklerde 60,4/100.000; kadınlarda ise 9,3/100.000 olarak bildirilmiştir (TÜİK, 1999; TÜİK, 2015).

2.1.2. Akciğer kanserinin patogenezinde moleküler düzeydeki etkiler

Epidermal büyüme faktörünün (EGF) yüksek ekspresyonu, KHDAK hastalarında bildirilmiş, fakat KHAK ile ilişkilendirilememiştir (Rachwal ve ark., 1995) Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) fazla eksprese edilmesinin de KHDAK’ta kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Dominant bir onkogen olan *RAS*, sinyal iletisinde ve hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. *RAS* proteinleri, hücre içi sinyal ağlarını basitçe “aç/kapa” yöntemiyle kontrol eden ikili moleküler anahtarlar olarak işlev görür. *RAS* proteinleri, hücre iskeleti bütünlüğü, çoğalması, farklılaşması, adhezyonu, göçü ve apoptoz gibi işlemleri kontrol eder. *RAS* proteinlerinin çalışma şeklinde, çoğu kanser çeşidinde invazyon ve metastazın artması, apoptozun sekteye uğraması gibi anormal tablolarla karşılaşılır (Strauss ve ark., 1997).

RAS mutasyonlarına KHAK’ta nadir olarak rastlanmaktadır, KHDAK vakalarının ise %15-20’sinde bu mutasyonlar mevcuttur. Bu mutasyonların %70’i sigara dumanı kökenli benzopiren dietiloksid ve nitrozamin gibi DNA’ya kovalent

bağlanan mutajenlerden kaynaklanan G-T bazlarındaki değişimleridir. Onkojenik RAS mutasyonlarının varlığında, guanozin trifosfat molekülü guanozin difosfata hidrolize edilemez olur ve böylece sürekli büyümeyi teşvik eden RAS-GTP aktif formu oluşur. Bu şekilde, yukarıda bahsedilen “aç/kapa” görevi artık bozulur ve sinyal yolağı sürekli “açık” yani sürekli aktif halde kalır. Bu durum, KHDAK'ta RAS mutasyonu ve sigara kullanımı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (Strauss ve ark., 1997).

MYC proto-onkogeni, heliks-sarmal-heliks yapısında, karboksi ucunda lösün fermuar motifi, amino ucunda ise trans- aktive edici kısmı bulunan nükleer bir fosfoproteindir. *MYC* proteinleri transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *MYC* genlerinin transkripsiyonel kontrolün kaybı nedeniyle aktive olması, insan akciğer kanseri patogenezinde önemli bir moleküler mekanizmadır. *MYC* gen aktivasyonu hem KHAK, hem de KHDAK'ta gözlenmektedir (Johnson ve ark., 1996).

BCL2 proto-onkogeni gösterdiği anti-apoptotik etki ile hücredeki apoptoz kontrolünün kilit noktalarından biridir. Bu genin ifadesi, tümör süpresör P53 proteini tarafından negatif olarak regüle edilmektedir. P53, eli üç kilo daltonluk, transkripsiyon faktörü olarak işlev gören, nükleer bir proteindir. Bu protein, hücre döngüsünü bloke edebilir ve apoptozu tetikleyebilir, DNA hasarı sırasında hücrenin akıbetinde rol oynar. *BCL2* geninin fazla ifade edilmesi apoptozun baskılanmasına sebep olur. İmmünohistokimyasal verilere göre *BCL2* gen anlatımı normale kıyasla KHAK'ta %75 ile %95 arasında, sküamoz hücreli karsinomlarda %25 ile %30 arasında, diğer adenokarsinomalarda ise yaklaşık %10 oranında daha fazla eksprese edilmektedir (Kaiser ve ark., 1996, Slebos ve ark., 1994).

Hepatosit büyüme faktörü de hücre büyüme ve farklılaşmasını uyararak epitel hücrelerinin morfogenezinde rol almaktadır. Bu faktör, KHAK'ta ifade edilmeyip KHDAK'ta ifade edilmektedir. Fakat hepatosit büyüme faktörü reseptörü proteini ise bir proto-onkogen ürünü olup hem KHAK hem de KHDAK tümörlerinde ifadesi mevcuttur (Siegfried ve ark., 1997).

Tümörün yayılması ve büyümesi için anjiyogenez yani yeni kan damarlarının oluşumu gerekmektedir. Endotelial hücre yapımını ve göçünü teşvik eden ve baskılayan birçok anjiyogenik faktör mevcuttur. Özellikle KHDAK'ta vasküler endotelial büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü ve platelet kaynaklı

endotelial hücre büyüme faktörünün doğrudan anjiyogenezi düzenlediği gösterilmiştir (Fontanini ve ark., 1997; Koukourakis ve ark., 1997).

2.1.3. Akciğer kanserinin karsinogenezinde önemli genetik olaylar şöyle sıralanabilir (Fry ve ark., 1996) :

1. Onkogenlerin mutasyona uğrayarak çalışma prensiplerinin onkojenik hal alması (Özellikle *RAS* ve *MYC* gen aileleri)
2. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu (Özellikle *P53* geni)
3. Hücre döngüsünde rol oynayan genlerde ortaya çıkan anormallikler
4. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan anormallikler
5. Büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinde ortaya çıkan anormallikler (Özellikle *EGF* ve *EGFR*)

2.1.4. KHDAK dört alt gruba ayrılır:

1. Adenokarsinom: Akciğerlerin mukus üreten bezlerinde oluşur ve akciğerin merkezinden ziyade dış kısımlarına yakın bölgelerinde ortaya çıkmaktadır. KHDAK'ların %50'sini oluşturur, kadınlarda erkeklere kıyasla daha çok görülür.
2. Skuamöz hücreli karsinom veya epidermoid karsinom: Akciğerlerde sıklıkla merkeze daha yakın olan bronş duvarlarında ortaya çıkmaktadır. KHDAK'ların yaklaşık %30'unu oluşturur, erkeklerde kadınlara kıyasla daha çok görülmektedir.
3. Bronkoalveoler karsinom: Bu akciğer kanseri tipi, akciğerlerin hava keseciklerinin yanında oluşan, adenokarsinomun nadir görülen bir tipidir. KHDAK'ların yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır.
4. Farklılaşmamış büyük hücreli kanser: Hızlı ilerleyen bir kanser tipidir ve akciğerlerin herhangi bir noktasında gelişebilir. KHDAK'ların yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır.

2.1.5. KHDAK evreleri aşağıdaki gibi incelenebilmektedir:

Evre 1: Tümör, sadece akciğerin küçük bir bölümünde görülmektedir.

Evre 2: Kanserleşme, en yakındaki lenf bezelerine sıçramıştır.

Evre 3: Tümör, akciğeri saran zara ve/veya iki akciğer arasındaki boşluğa ve/veya buradaki bezelere yayılmıştır.

Evre 4: Kanserleşme karaciğer, kemik, böbrek üstü bezi gibi uzak organlara yayılmış durumudur.

Ülkemizde ne yazık ki hastaların %81'ine ancak 3 ve 4. evrelerde tanı konmaktadır (Goksel ve Akkoclu, 2001). Bu da tedaviden yanıt alınmasını güçleştirici bir durumdur. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2013 yılında 41.129 akciğer kanseri tanılı hasta sağlık kurumlarına başvurmuş ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) raporlarına göre 2013'te 22.158 akciğer kanseri hastası bu hastalıktan dolayı ölmüştür. Yeni vakalar, toplam vakanın 2/3'ü (%66) olup 2013 yılındaki tüm vakaların %44'ü ölüm ile sonuçlanmıştır (TÜİK, 2013).

2.2. A549 ve BEAS-2B Hücre Hatları

Bu çalışmada, KHDAK adenokarsinom hücre hattı A549 ve sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B kullanılmıştır. Hücreler, American Type Tissue Culture Collection (ATCC) firmasından satın alınmıştır.

A549 hücre hattı ilk olarak D. J. Giard ve ekibi tarafından 1972'de 58 yaşında, beyaz, erkek bir hastanın tümöründen elde edilerek oluşturulmuştur (LGC, CCL-185). Skuamöz A549 hücreleri, kültürde tek tabaka halinde, kültür zeminine yapışarak, sitoplazma çıkıntıları oluşturmuş yassı şekilli hücreler olarak büyümektedirler. Özellikle tip II pulmoner epitel hücre modeli olarak ilaç metabolizması araştırmaları ve transfeksiyon çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* olarak yaygın şekilde kullanılır (Cooper ve ark., 2018; Foster ve ark., 1998).

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).

2.3. *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* Genleri

PTGS2 veya *COX2* olarak kısaltılan prostaglandin endoperoksit sentaz-2 veya siklooksigenaz-2 geni, GRCh38.p12 (NCBI, Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release-12) konumunda ve enzim yapıda protein kodlayan bir genidir (NCBI, Gene ID: 5743). *PTGS2*, Prostaglandin biyosentezinde hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak görev yaparak araşidonik asidin son ürün olan Prostaglandin-E2 (PGE2)'ye dönüştürülmesinde anahtar enzimdir. *PTGS2* enzimi araşidonik asidin Prostaglandin-G2'ye, ardından Prostaglandin-H2'ye dönüşümünü katalizler. Daha sonra bu ürün izomeraz enzimleri tarafından Prostaglandin-E2'ye dönüştürülür. PGE2, hücresel hayatta kalımı aktive eden Nükleer Faktör-kappa B (NF-κB) sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini artırır. Aktive olmuş NF-κB sinyal yolağı ise BCL2 anti-apoptotik proteininin transkripsiyonunu artırarak apoptozun inhibe edilmesine yol açar. Bu şekilde, anormal düzeyde yükselen *PTGS2* ifadesi, PGE2 miktarını artırma yolu ile karsinogeneze dolaylı yoldan katkı sağlar (Park ve ark., 2006).

PTGS2 geninin insan vücudunda testis, plasenta, beyin ve böbrekte de ifadesi mevcuttur. En yüksek ifade düzeyi safra kesesi ve mesane dokularında olmakla birlikte, bazal durumda çoğu dokudaki protein düzeyi çok az ya da saptanamayacak düzeydedir. İfade düzeyi sağlıklı dokularda yalnızca yalnızca enflamasyon sırasında yükselmektedir (The Human Protein Atlas, *PTGS2*; Sobolowski ve ark., 2010). *PTGS2* geninin ifadesi ultraviyole ışık, *RAS* onkogeni, İnterlökin-1 (IL-1), epidermal büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü beta ve tümör nekroz faktörü alfa ile indüklenebilir. Deksametazon ilaçlar, antioksidanlar ve tümör baskılayıcı protein P53 ise *PTGS2* ifadesini baskılar (Zha ve ark., 2004).

CALR veya *CRT* olarak kısaltılan Kalretikulin geni, insan 19. kromozomunda lokalize olup, toplamda 9 ekzon içermektedir (NCBI, Gene ID: 811). *CALR*, 3 ayrı yapısal ve fonksiyonel zincir içeren 46 kilo Dalton ağırlığında bir proteindir. *CALR* proteini özellikle endoplazmik retikulumda (ER) lümeninde, sitoplazmada ve hücre zarının dış yüzeyinde bulunmaktadır. Fakat hücre dışı matrikste ve serumda da varlığı saptanmıştır. *CALR*, sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanmasında rol alan bir şaperon proteindir. Sadece protein işlenmesinde değil, taşınmasında da rol alır. Ayrıca kalsiyum bağlayıcı işlev göyerek, hücre içi kalsiyum iyon

konsantrasyonunun korunmasında rol oynamaktadır (UniProtKB, P27797; Gold ve ark., 2010).

CALR proteini aynı zamanda nükleusta da bulunur, bu da çeşitli hormonların işleyiş mekanizmaları için transkripsiyonun düzenlenmesinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Perrone ve ark., 1999).

CALR proteininin bir diğer nükleer aktivitesi ise bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B sinyal yolağı ile etkileşime girerek pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini artmasıdır. Ayrıca dentritik hücrelerin olgunlaşmasını indüklediği de gösterilmiştir. Hatta kanserde efektör hafıza T hücrelerinin aktivasyonunu ve dendritik matür hücre infiltrasyonunu tetikleyerek, kansere karşı adaptif immün yanıtı destek olduğu da gösterilmiştir (Bajor ve ark., 2011; Fucikova ve ark., 2016).

Melanom-ilişkili antijen gen ailesinin 3 numaralı üyesi olan *MAGE-A3* veya *MAGE-3* geni Xq28'de lokalizedir. Bu proteinler, küçük peptidlerden sentezlendikten sonra ER'ye taşınarak orada antijen olarak işlenip, immün sisteminin elemanlarını uyaracak bir forma gelirler. Normal koşullarda sağlıklı dokularda testis (sadece mRNA düzeyinde) haricinde ifadesi bulunmayıp, embriyonik dönemde özellikle plasentada işlevseldir. Erişkin hücrelerde ise herhangi bir işlevi olup olmadığı bilinmemektedir. *MAGE-A3*'ün tüm melanomlar, karaciğer, KHDAK ve hematolojik kanserler başta olmak üzere birçok tümörde varlığı tanımlanmıştır (NCBI, Gene ID: 4102). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, testis kanseri, baş ve boyun kanserleri, karaciğer kanseri ve melanomalarda vücutta immün yanıtı açan bir proteini kodladığı ve NF- κ B sinyal yolağı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (The Human Protein Atlas, MAGEA3; Lu ve ark., 2017). Testis dokusunda mRNA düzeyinde ifadesi mevcut iken, sağlıklı yumurtalık dokusunda ifadesi yoktur. Bununla beraber yumurtalık kanserinde protein düzeyinde anlatımı saptanmış, yumurtalık kanseri için erken tanı ve hatta hedefe özel tedavi yaklaşımlarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2010).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Besiyeri hazırlanışı

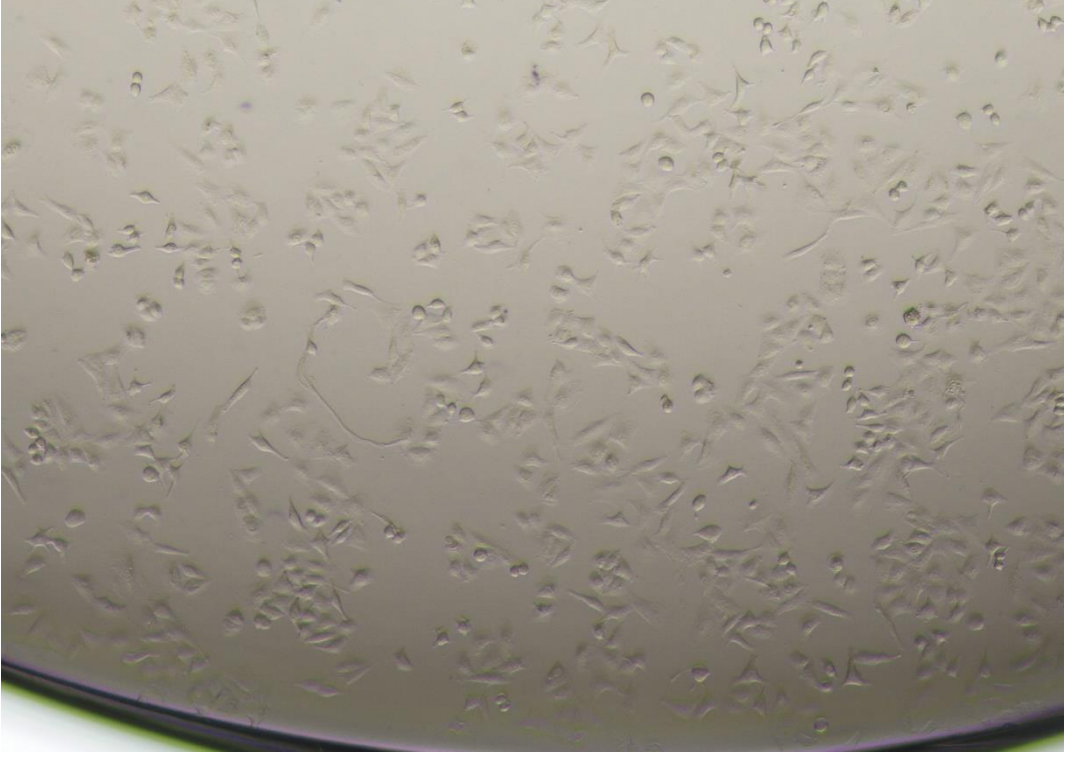
RPMI-1640 (Pan Biotech marka, P04-16500 katalog numaralı ürün) besiyeri içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS) (Pan Biotech marka, P30-1904 katalog numaralı ürün) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Pan Biotech marka, P06-07100 katalog numaralı ürün) olacak şekilde hücre ortamı hazırlanmıştır.

3.1.2. Hücre hatlarının stoktan çıkartılması

ATCC'den temin edilmiş kriyo tüpler içerisinde -80 °C'deki donuk hücreler (katalog numaraları; A549: CCL-185, BEAS-2B: CRL-9609) protokole uygun olarak, 50 °C'ye getirilmiş sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürülmüştür.

Hücre süspansiyonu, 15 mL'lik (mL) santrifüj tüpünde hazırlanan besiyeri içerisine alınarak 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan (süpernatant) kısım aspire edilip hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek hücrelerin konforlu hale gelmesi sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan 25 santimetre karelik (cm²) kültür flasklarına alınarak 37 °C %5 karbondioksit içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Her iki hücre hattı da kültürde tek tabaka halinde, kültür zeminine yapışarak, sitoplazma çıkıntıları oluşturmuş yassı şekilli hücreler olarak büyütülmüştür. (Hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri için Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'ye bakınız.)

Şekil 3.1.: A549 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü



Şekil 3.2.: BEAS-2B hücrelerinin mikroskopik görüntüsü



3.1.3. Besiyeri değiştirme

Kültür flaskı içerisindeki besiyeri aspire edilerek 1X konsantrasyonda 2 mL PBS (Fosfat tampon tuzlu çözeltisi) ilave edilerek hücrelerin yapıştığı yüzeyin bu tampon çözeltisi ile birkaç dakika hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra kültür flaskı içerisinde 5 mL taze besiyeri eklenmiştir.

3.1.4. Hücre kültürünün pasajlanması

Hücre dizileri, mikroskop altında inceleme sonucunda flask yüzeyini %60-70 oranında kapladıkları (konfluent, sıkışık duruma geçtiklerinde) tespit edilince flask içerisindeki besiyeri aspire edilmiştir.

Hücrelerin serumdan arındırılması için 1X konsantrasyonda 2 mL PBS ilave edilerek hücrelerin yapıştığı yüzeyin bu tampon çözeltisi ile birkaç dakika hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 mL %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmış ve hücreler 37 °C, %5 karbondioksit içeren ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. Hidrolitik bir enzim olan tripsin, hücrelerin flask yüzeyine yapışmak için hücre zarından flask zemimine doğru uzattığı integrinler gibi adezyon proteinleri hidrolize ederek hücreleri flask zemininden kaldırmak için kullanılmaktadır.

Mikroskopta incelenerek flask yüzeyinden ayrıldığı gözlenen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı besiyeri ilave edilmiştir. Böylece tripsinin, hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücrelerin membranına zarar vermeye başlaması engellenmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içinde besiyeri bulunan 15 mL'lik santrifüj tüpleri içerisinde alınıp 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildikten süpernatant kısım aspire edilmiştir. Elde edilen hücre peletine 1 mL'lik besiyeri eklendikten sonra hücre süspansiyonu 75 cm²'lik flaslara alınarak 37 °C, %5 karbondioksit içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene dek çoğalmaları sağlanmıştır.

3.1.5. Hücrelerin stoklanması

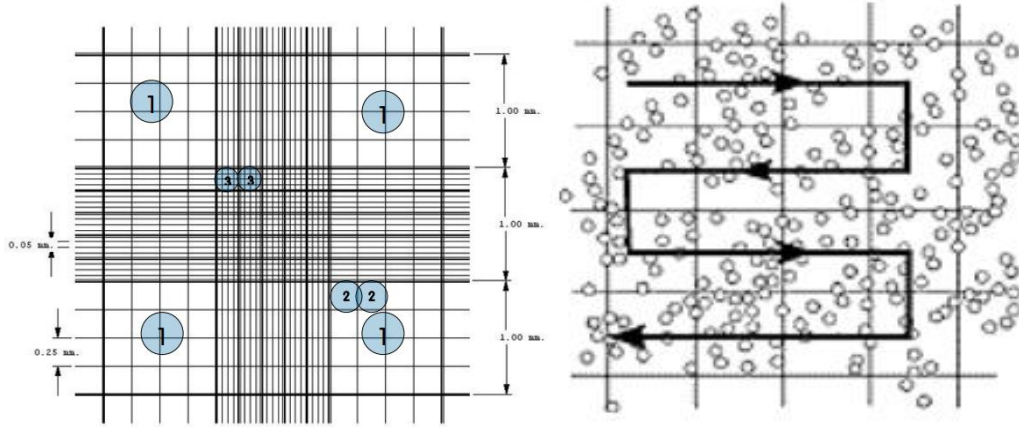
Mikroskop incelemesi sonucu, hücreler konfluent hale geldikleri tespit edilince flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X konsantrasyondaki 2 mL'lik PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek

uzaklaştırılmış ve hücrelerin yapışmış olduğu flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 37 °C, %5 karbondioksit içeren ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu 15 mL'lik santrifüj tüpe alınarak 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısım aspire edilmiştir. Pelletlerin alındığı kriyo tüpe 1,5 mL dondurucu medya (5 mL dimetil sülfoksit, "DMSO" (Neofroxx marka, 1264 katalog numaralı ürün) + 5 mL FBS (Pan Biotech marka, P30-1904 katalog numaralı ürün) + 40 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, "DMEM", Pan Biotech marka, P04-03590 katalog numaralı ürün) ile hazırlanmıştır.) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyo tüpler içerisine dağıtılıp hemen -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.1.6. Hemositometre ile hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için, tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 mikrolitresi (μL) 5 mL'lik santrifüj tûpüne alınıp üzerine % 0,5 olacak oranda tripan mavisi (Neofroxx marka, 1475 katalog numaralı ürün) eklenerek iyice karışmaları sağlanmıştır. Bu karışımdan 10 μL alınarak thoma lamına koyulmuş ve mikroskopta bu lam üzerindeki beş alanda hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 mL'lik besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.

Şekil 3.3.: Thoma Lamı düzeni



1 büyük karenin hacmi;

$$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$$

Bölmenin derinliği; $0,1 \text{ mm} = 0,01 \text{ cm}$

$$0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml} = 0,1 \mu\text{L}$$

$$\text{Konsantrasyon (hücre/mL)} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10.000}{\text{Sayılan alan} \times \text{Dilüsyon}}$$

Sulandırma katsayısı (dilüsyon); 1:10 dilüsyon için; 0,1

1:100 dilüsyon için; 0,01

Bu formülasyon ile her iki pasaj da sayılarak, her bir kriyotüpte 1×10^6 hücre, ileriki çalışmalar için ayrılmıştır.

3.2. Total RNA İzolasyonu

Kültürlenmiş 1×10^6 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanılmıştır.

Kit komponentlerinden olan trizol içerikli TRK solüsyonuna çeker ocakta 1 mL/20 μ L beta-merkaptotanol eklenerek işleme başlanmıştır. Beta-merkaptotanol indirgeyici bir kimyasal ajan olarak, disülfid bağlarını kırarak enzim işlevselliği için gereken üç boyutlu doğal konformasyonunu bozmaktadır. Böylece elde etmek istediğimiz nükleik asitleri yıkılmayacak olan enzimler (RNaz, DNaz gibi) geri dönüşümsüz olarak denatüre olmaktadır.

Ardından 1 mL besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 μ L TRK solüsyonu eklenerek, 21G ölçülü 5 mL'lik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapılmıştır. TRK solüsyonu içerisindeki trizol, biyolojik materyalleri çözüdüren ve proteinleri denatüre eden, fenol ve guanidinyum izotiyosiyanatın çözeltisidir. Bu kimyasallar nükleik asitlerin yapısına zarar vermeyerek, hücre bileşenlerini parçalayıp proteinleri denatüre ederek ortamdaki ayrıştırılmak istenen nükleik asitlerden proteinleri kurtarmaktadır.

500 μ L %70'lik etil alkol eklenip vortekslenen hücre lizatından 700 μ L, kit komponentlerinden olan spin kolonlu koleksiyon tüpüne aktarılmıştır. Lizat, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpüne inen sıvı boşaltılıp santrifüj tekrar edilmiştir.

Kit komponentlerinden olan RNA Wash Buffer I'den 500 μ L kolonlu tüpe eklenip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Tüpe inen sıvı boşaltılıp aynı santrifüj, bu kez %99'lük etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 μ L eklenerek tekrarlanmıştır. Bu işlem bir kez daha uygulanmıştır. Ardından herhangi ekleme yapılmaksızın yalnızca santrifüj tekrarlanıp yine tüpe inen sıvı boşaltılmıştır.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten ayrılıp kitte mevcut olan boş bir koleksiyon tüpüne oturtularak herhangi bir ekleme yapılmaksızın 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 60 μ L kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenip 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece RNA, su ile çözünüp kolondan ayrılarak serbest kalacaktır. Santrifüj sonunda tüpün dibindeki sıvı, elde etmek istediğimiz RNA'dır. Elde edilen

bu RNA, konsantrasyon ve optik dansitesi (OD) ölçüldükten sonra deney zamanına dek -80 °C'ye kaldırılmıştır.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için, “SPECTROstar Nano Absorbance Plate Reader” cihazı ve “LVis Plate” fonksiyonu kullanılmıştır. LVis Plate’teki örnek ölçüm noktalarına 2 µL RNA koyulmuştur. OD ve konsantrasyon ölçümü 1. Tablodaki gibidir.

Tablo 3.1.: İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

Blank: Su			
	Örnek	OD Ölçümü	Konsantrasyon (ng/mL)
1	A549	1,88	61,59
2	BEAS-2B	2,05	2,60

3.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA sentezi için bu çalışmada Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription Kit ürünü kullanılmıştır.

10 µL total RNA örnekleri, primerlerin RNA iplikleri üzerinde uygun yerlere bağlanması için 65 °C, 5 dakika inkübe edilerek işleme başlanmıştır. Hemen ardından, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.

5 µL 5X konsantrasyonlu reaksiyon tamponu, 2 µL deoksiniükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi, 5,25 µL randomize primerler, 0,5 M RNaz inhibitörü, 1,25 M da bir indirgeyici ajan olup RNA'nın ikincil yapısını oluşturan bağları kırarak RTE'nin daha kolay işlev görmesine yardımcı olan dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 M ters transkriptaz enzimi ve son olarak 10 µL RNA örnekleri eklenerek reaksiyon tüpü 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika ve son olarak 85 °C'de 5 dakika olmak üzere 75 dakikalık reaksiyona bırakılmış, reaksiyon sonunda ise tüpler 4 °C'de sabit tutulmuştur.

Tablo 3.2.: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
5X Reaksiyon tamponu	5 µL	1X
dNTP	2 µL	10 mM
Randomize primerler	5,25 µL	100 µM
RNaz inhibitörü	1 µL	0,5 mM
DTT	0,25 µL	1,25 mM
RTE (200 U/uL)	1,5 µL	1 M
RNA örnekleri	10 µL	3 M
Toplam hacim	25 µL	

Tablo 3.3.: cDNA sentez reaksiyon aşamaları

cDNA Sentez Döngü Aşamaları	
Primer bağlanması	65 °C’de 5 dakika, 4 °C’de 5 dakika
DNA polimerizasyonu	25 °C’de 10 dakika, 50 °C’de 60 dakika
Enzim deaktivasyonu	85 °C’de 5 dakika

3.4. Kantitatif PCR

Gerçek zamanlı veya eş zamanlı kantitatif PCR, biyolojik bir materyalden elde edilmiş total RNA’nın enzimatik olarak dönüştürüldüğü DNA’nın, polimeraz zincir reaksiyonu boyunca miktarının anlık olarak matematiksel tespit edilebildiği bir sistemdir.

qPCR’da nükleik asit çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçümüne dayanan ve gen ifadesinin değişimi hakkında bilgi veren “eşik döngüsü” (cycle of treshold, Ct) bulunmaktadır. Ct, floresan sinyal miktarının eşik çizgisini aştığı noktadaki döngü sayısıdır.

Bu uygulamada, floresans sinyalin artışı spesifik olmayan amplikonları da içerebilmektedir. Çünkü çift sarmal DNA’ya entegre olan Syber green molekülleri, ortamda hedef moleküller olmadığında primer dimerizasyonlarına da katılarak

floresans simyali oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin “erime eğrisi” (melting curve, Mc) analizi de yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA fragmenti, kendine özgü “erime sıcaklığı” (melting temperature, Tm: çift sarmal DNA’nın %50’sinin tek sarmal hale gelmesi için gereken sıcaklık noktası) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green molekülleri serbest kalmakta ve floresans miktarı aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun Tm derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir. qRT-PCR çalışmasına öncelikle ifade düzeyleri incelenecek olan genler için, aşağıdaki tablodaki gibi primerler tasarlanarak başlanmıştır.

Tablo 3.4.: Tasarlanan primer dizilimleri

Genin Adı	Primer	Primer Dizilimi
<i>PTGS2</i>	Forward	ATCATTCACCAGGCAAATTGC
<i>PTGS2</i>	Reverse	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG
<i>CALR</i>	Forward	AAGTTCTACGGTGACGAGGAG
<i>CALR</i>	Reverse	GTCGATGTTCTGCTCATGTTTC
<i>MAGE-A3</i>	Forward	AAGCCGGCCCAGGCTCGGT
<i>MAGE-A3</i>	Reverse	GCTGGGCAATGGAGACCCAC

Amplifikasyon, “Corbett Research Real-time PCR Thermal Cycler” cihazı kullanılarak, reaksiyon tüpüne 2X konsantrasyondaki Sybr Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün) içerikli reaksiyon karışımından 10 µL, reverse ve forward primerlerin her birinden 1,5 µL, 4 µL cDNA örneği ve son olarak 4 µL nükleazdan arındırılmış su eklenerek tamamlanmıştır. Reaksiyonun aşamaları Tablo 3.6.’daki gibidir.

Tablo 3.5.: qPCR reaksiyon bileşenleri

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µL	1X
Forward primer	1,5 µL	0,3 µM
Reverse primer	1,5 µL	0,3 µM
cDNA	4 µL	<500 ng
Su	4 µL	
Toplam hacim:	21 µL	

Tablo 3.6.: qPCR döngü aşamaları

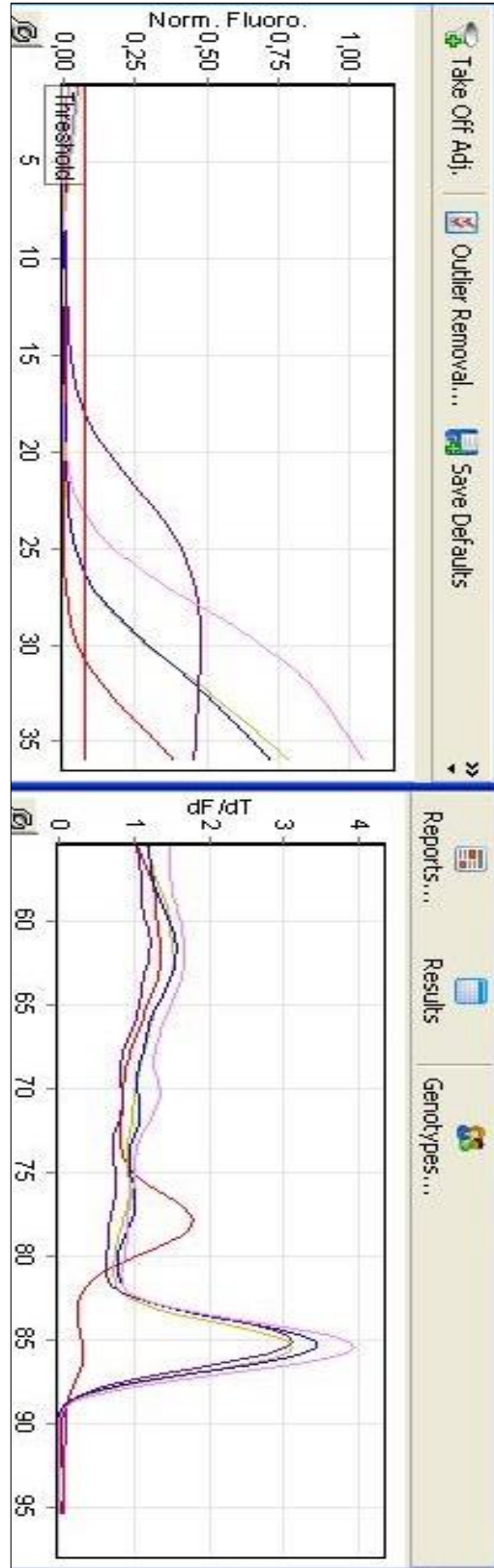
qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 °C'de 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 °C'de 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C'de 30 saniye
	3. Uzama	72 °C'de 30 saniye
Son uzama		72 °C'de 10 dakika
X 36 DÖNGÜ		

4. BULGULAR

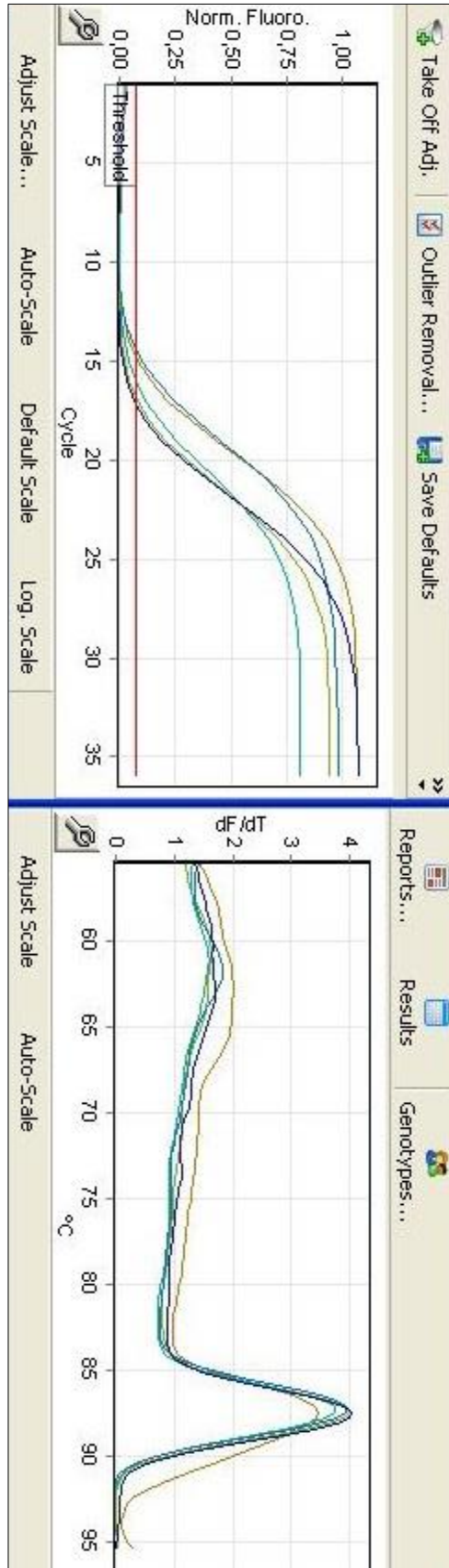
4.1. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarının analizi

Yapılan gerçek zamanlı PCR analizinde, *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* genleri ve referans olarak kullanılan β -*aktin* geninin Ct ve Tm değerlerini gösteren tablolar, aşağıdadır. İfade analizi, üç tekrarlı deney seti sonucundan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ile hesaplanmaktadır (Rao ve ark., 2013). Öncelikle araştırılmak istenen her bir genin Ct değeri, house-keeping denen ifade seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan genin Ct değerinden çıkartılır. Bu değere, “delta Ct” denmektedir. Sonrasında deney gurubunun delta Ct değerleri, kontrol gurubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak “delta delta Ct” değerleri bulunur. Bu değerler ise deney gurubunun kontrol gurubuna kıyasla, araştırılan genlerdeki house-keeping genine nazaran ifade seviyesindeki değişimi göstermektedir. Bu değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alınmaktadır.

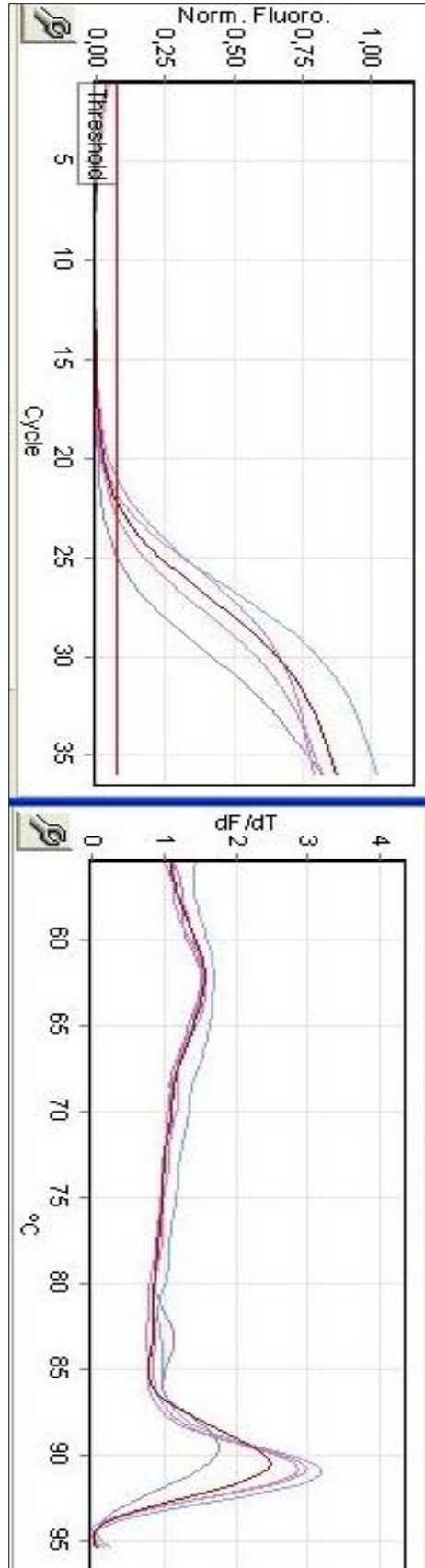
Şekil 4.1.: PTGS2 Geninin Ct ve Tm grafiği



Şekil 4.2: CALR Geninin Ct ve Tm grafiği



Şekil 4.3.: *MAGE-A3* Geninin Ct ve Tm grafiği



Tablo 4.1.: Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	A549	BEAS-2B (kontrol)	Delta Ct ΔCt (A549)	Delta Ct ΔCt (BEAS-2B)	Delta Delta Ct Hesaplaması $\Delta\Delta Ct$	Ekspresyon Değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Ortalama Ct değeri	Ortalama Ct değeri				
Beta-Actin (house-keeping gen)	31,25	31,62				
PTSG2	17,93	26,14	13,32	5,48	-7,84	229,13
CALR	14,37	16,75	16,88	14,87	-2,01	4,03
MAGE-A3	22,78	24,92	8,47	6,70	-1,77	3,41

Tablo 4.7.'de, housekeeping gen *Beta-aktin* olmak üzere, BEAS-2B hücre hattına göre A549 hücre hattında *PTGS2*, *CALR* ve *MAGE-A3* genlerinin ifade seviyeleri verilmiştir. Yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonuğlarına göre her üç genin ifade seviyesinde de artış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır. Çalışmanın sonuğlarına dair Ct (soldaki) ve Tm (sağdaki) grafikleri ve delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) hesaplaması ile genlerin ifade artış oranları A549 hücre hattı için, *PTGS2* geninde 229,13 kat; *CALR* geninde 4,03 kat; *MAGE-A3* geninde ise 3,41 kat olarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüksek PTGS2 ifadesi, PGE2 miktarını artırarak NF-κB yolağının aktivasyonunu artırır. Aktivasyonu artan NF-κB sinyal yolağı, BCL2 transkripsiyonunu tetikler ve hücrede apoptoz direnci meydana getirir (Park ve ark., 2006).

Daha önce yapılan çalışmalarda, *PTGS2* geninin diğer birçok kanser tipinde olduğu gibi, akciğer kanserindeki ifade artışı metastaz ve invazyon ile ilişkisi bulunmuştur (Hida ve ark., 1998; Wolff ve ark., 1998).

Literatürdeki çalışmalarda, *PTGS2* geninin birçok kanserli dokuda ifadesinin arttığı; dolaylı olarak anjiyogenez ve apoptoz direncinde rol oynadığı ve özellikle mesane kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (Daniel ve ark., 1999; Dempke ve ark., 2001).

Bu tez çalışmasında *PTGS2* geninin ifadesi, KHDAAK adenokarsinom hücre hattı A549 ve sağlıklı akciğer epitel hücre hattı BEAS-2B'de qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre, literatürdeki önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumu olarak KHDAAK A549 hücre hattında, sağlıklı akciğer epitel hücre hattı olan BEAS-2B'ye göre *PTGS2* geninin ifadesinde 229,13 kat artış tespit edilmiştir.

Benzer olarak Çin'de 2014 yılında Li ve ekibi, A549 hücre hattında *PTGS2* ifadesinin çok yüksek olduğunu tespit etmiştir. Çalışmada, Çin'de sekonder metabolitleri geleneksel tedavilerde kullanılan *Rhus verniciflua* ve *Butea monosperma* bitkilerinden elde edilen butein maddesi, *PTGS2* inhibitörü olarak kullanılmıştır. Butein muamelesinin *PTGS2* mRNA ve protein seviyesini azaltıp, hücreleri apoptoza teşvik ettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2014).

PTGS2 proteini, normal kolon ve meme dokularında hiç tespit edilmemektedir. 2001'de Dannenberg ve ekibi, kolon ve meme kanserlerinde bu genin ifadesinde sırasıyla %85 ve %40 oranlarında artış meydana geldiğini göstermiştir. Bununla beraber skuamöz hücreli adenokarsinom, mesane kanseri, kolorektal kanserler, mide, karaciğer özofagus ve cilt kanserinde de *PTGS2* gen ifadesinin yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Dannenberg ve ark., 2001; Fosslien ve ark., 2001; Hosomi ve ark., 2000).

Yine Çin'de 2018 yılında Zhang ve ekibi, meme kanseri hastalarından alınmış serum örneklerinde bulunan tümör hücreleri ile yaptıkları çalışmada, *PTGS2* ifadesinin RNA düzeyinde artmış olduğunu göstermiş ve *PTGS2* mRNA'larında

siRNA ile moleküler sessizleştirme yöntemini uygulayarak kanserde gerileme kaydettiklerini öne sürmüşlerdir (Zhang ve ark., 2018).

Chung ve arkadaşlarının Tayvan'da 2012 yılında yaptığı çalışmada ise *PTGS2* ifadesinin akciğer kanserinde, kanserin ilerleme hızına ve ilaç direncine katkı sağladığı gözlemlenmiştir (Chung ve ark., 2012).

2014'te Polonya'da yayınlanmış Pastuszak-Lewandoska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da yine *PTGS2* yüksek ifadesinin KHDAK'ın histopatolojik özellikleri ile uyumlu olduğu ortaya konmuştur (Pastuszak-Lewandoska ve ark., 2014).

Dave ve arkadaşlarının 2017'de ABD'de yaptığı çalışmada ise akciğer fibroblastlarında *PTGS2* geni ifadesinin değişimi enflamasyon ve onkogeneze proteomik düzeyde incelenmiştir. Her iki durumda da *PTGS2* enzim miktarının yükseldiği ve hücrel göçü tetiklediği bulunmuştur (Dave ve ark., 2017). Gerek akciğer kanseri gerekse diğer solid tümörlerde *PTGS2* geni ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, *PTGS2* geninin yüksek oranda ifade edildiği ve kanserin gelişimine ve yayılımına katkı sağladığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, KHDAK adenokarsinom hücre hattı olan A549'da ifade düzeyi yüksek bulunan diğer gen ise *CALR* genidir. *CALR* geninin ifadesi, sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B'ye göre 4,03 kat artmış olarak bulunmuştur. *CALR* proteininin işlevi ile alakalı olarak, hem immün yanıtta anti-kanser rol oynadığı, hem de kanserli hücrelerdeki ifade artışının hücrelere apoptoz direnci kazandırdığına dair çalışma sonuçları mevcuttur.

Fucikova ve arkadaşlarının 2016'da yaptığı çalışmada, KHDAK'de immünolojik yanıtta ilk değişimlerden birinin, ER'den hücrenin dış yüzeyine *CALR* translokasyonu olduğu gösterilmiştir (Fucikova ve ark., 2016). Hücrenin dış yüzeyindeki *CALR*, fagositoz yapan immün hücreler için bir çeşit "beni ye" sinyaldir ve kanser hücrelerinin yok edilmesi sürecinde rol oynamaktadır. Fakat kanserli hücrelerin çoğunun yok edilememesinin sebebi, *CALR* proteinini bloke eden, CD47 proteindir. CD47 proteini, normal sağlıklı hücrelerin yüzeyinde bulunur ve makrofajların normal hücreleri fagosite etmelerini önler. Kanser hücreleri ise daha yoğun oranda CD47 ifade ederek, *CALR*'nin fagositik hücreleri uyarmasını engeller. Dolayısı ile KHDAK'ta *CALR* geninin ifadesinin artması, tümöre karşı verilen immün yanıtı destekler nitelikte görünmektedir.

CALR proteininin immün yanıt, yara iyileşmesi, hücre büyümesi ve bölünmesi, hücre göçü, hücre adezyonu ve apoptozun kontrolünde rol oynadığı öne sürülen çalışmalar mevcuttur (Klampfl ve ark., 2013;). 2012'de Çin'de yapılan bir çalışmada CALR monoklonal antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal deney dizisi sonucu, CALR'nin akciğer kanseri için bir biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Lu ve ark., 2015).

2007'de Clark ve Smith'in Nature'da yayınlanmış olan derlemesinde, CALR proteininin immün yanıtı harekete geçiren anti-enflamatuar ve anti-kanser yanıt başlattığından, hatta çevresindeki kanserleşmekte olan hücreler için bir çeşit hücre-dışı şaperon işlevi gördüğü bildirilmiştir (Clarke ve ark., 2007). Anti-enflamatuar yanıtta rol almasına örnek olarak, NF-κB sinyal yolağı ile etkileşime girerek pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca CALR, şaperon protein görevini NF-κB sinyal yolağı vasıtasıyla yapmaktadır (Bajor ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında bulunan sonucun aksine; Bergner ve ekibi tarafından 2009'da Almanya'da yayınlanmış olan çalışmada, *CALR* ifadesinin akciğer kanseri ve hepatosellüler kanserde, sağlıklı akciğer epitel hücrelerine kıyasla azaldığını ve normal akciğer epitel hücreleri ile kanserli akciğer hücreleri arasında Kalsiyum homeostazının çok farklı olduğu ortaya konmuştur. Akciğer kanserinde, Kalsiyum iyonlarını bağlayan CALR proteininin ifadesi artarken, kalsiyum iyonlarını ER lümenine pompalayan proteinin ifadesinin azalmasından dolayı ER'deki Kalsiyum oranının, sağlıklı akciğer epitel hücrelerindeki kıyasla çok daha düşük olduğu ortaya konmuştur. Böylece hücre içi Kalsiyum iyon dengesinin bozulması yeni tanıs ve tedavi yaklaşımları oluşturabileceği öne sürülmüştür. (Bergner ve ark., 2009).

Stoll ve arkadaşlarının 2016'da yaptığı çalışmada ise yumurtalık kanseri ve KHDAK'ta *CALR* ifadesinin yükseldiği ortaya konmuştur. Yazarlar, sonuçları muhtemelen *CALR* geninin ifadesi eğer çok daha fazla artacak olursa, hücrelerin bu "beni ye" sinyali ile kansere karşı koyma gücünün artacağı şeklinde yorumlamıştır (Stoll ve ark., 2016).

NF-κB, immün yanıtta sitokin üretimi ve hücre hayatta kalımı ile doğrudan ilişkili bir transkripsiyon faktörü, bir nükleer sinyaldir. İmmünite, hücresel çoğalma, enflamasyon ve apoptoz gibi yaşamsal fonksiyonlarda birincil rol oynar. İşlev bozukluğu ise enflamasyon, otoimmün hastalıklar ve kanser ile doğrudan ilişkilidir.

MAGE-A3 geninin ifadesi, bu sinyal yolağının sürekli açık kalmasını sağlayarak, hücreyi ölümsüzlüğe götürmektedir.

2016 yılında Singapur'da Xie ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile promotör bölgesinden metilasyon ile epigenetik olarak düzenlenen *MAGE-A3* antijeni, gen anlatımı aktif ve inaktif iken hücreler üzerindeki etkileri bakımından incelenmiştir. Mide kanserinde hücre bölünmesini tetiklediği ve kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Xie ve ark., 2016).

2016 yılında Thongprasert ve arkadaşlarının Tayvan'da yayınladığı çalışmada, Doğu ve Güneydoğu Asyalı KHDAK hastalarından alınmış 377 örneğin %26'sında *MAGE-A3* ifadesi saptanmıştır (Thongprasert ve ark., 2016). Chen ve arkadaşlarının yine 2016'da ABD'de yaptığı çalışmada ise yine KHDAK'ta *MAGE-A3* ifadesinin prognozu ile ilgili olduğunu gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2016).

MAGE-A3 proteini, “akciğer kanseri antijeni” olarak bilinmektedir. Akciğer kanseri tedavi geliştirme çalışmaları adına, 2004'te “*MAGE-A3* aşısı” uygulaması yapılmıştır. Teşhiste *MAGE-A3* yüksek ifadesi görülen ve erken evrelerde olan 122 KHDAK hastasında uygulanan klinik araştırmada, %33 başarılı yanıt alınmıştır (Raez ve ark., 2005)

2013 yılında Belçika'da yapılan klinik araştırmada ise 182 KHDAK hastası üzerinde 27 aylık 13 dozlu bir *MAGE-A3* immünoterapisi uygulanmıştır. Yüksek *MAGE-A3* ifadesi saptanmış olan hastalarda, cerrahi yaklaşım sonrasındaki süreçte uygulanan bu yöntem ile %35 oranında kanserde gerileme tespit edilmiş ve bu uygulamanın minimum toksisite düzeyinde olup, üçüncü faz çalışmalarına geçilebileceği öne sürülmüştür (Vansteenkiste ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında da, literatürdeki çalışmalarla paralel olarak *MAGE-A3* geninin ifadesinde A549 KHDAK hücre hattında, normal akciğer epitel hücrelerini modelleyen BEAS-2B hücre hattına kıyasla 3,41 kat artış gözlemlenmiştir.

Tüm bu bilgilerden yola çıkılarak, özellikle KHDAK için tedavi yaklaşımlarında, karsinogenezi doğrudan veya dolaylı yoldan, başlatan veya indükleyen/destekleyen PTGS2, CALR ve *MAGE-A3* proteinleri için selektif inhibitörler veya monoklonal antikör çalışmalarının önem arz ettiği vurgulanmaktadır. İleriki çalışmalarda, bu üç gen için protein düzeyinde araştırmalar yapılarak, bu üç protein miktarının artışı ile NF-κB sinyal yolağının karsinogenezdeki rolünün bir tür ortak ilişkide olabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

ATCC. A549 cell line: CCI-185. Ürün açıklama: “<https://www.lgcstandards-atcc.org/>” 23 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

ATCC. BEAS-2B cell line: CRL-9609 Ürün açıklama “https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx?geo_country=tr” 23 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

Bajor, A., Tischer, S., Figueiredo, C., Wittmann, M., Immenschuh, S., Blasczyk, R. ve ark. (2011). Modulatory role of calreticulin as chaperokine for dendritic cell-based immunotherapy. *Clinical & Experimental Immunology*. 220-234.

Bergner, A., Kellner, J., Tufman, A. & Huber, R. (2009). Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 28.1-25.

Chen, X., Wang, L., Liu, J., Huang, L., Yang, L., Gao, Q. Ve ark. (2017). Expression and prognostic relevance of MAGE-A3 and MAGE-C2 in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*. 1609-1618.

Chung, L. Y., Tang, S. J., Sun, G. H., Chou, T. Y., Yeh, T. S., Yu, S. L., ve ark. (2012). Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*, 18(15), 4037-4047.

Clarke, C., & Smyth, M. J. (2007). Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity. *Nature biotechnology*, 25(2), 192.

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

Daniel, T. O., Liu, H., Morrow, J. D., Crews, B. C., & Marnett, L. J. (1999). Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer research*, 59(18), 4574-4577.

Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. ve ark. (2001). Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *The lancet oncology*, 2(9), 544-551.

Dave, M., Islam, A. B., Jensen, R. V., Rostagno, A., Ghiso, J., & Amin, A. R. (2017). Proteomic Analysis Shows Constitutive Secretion of MIF and p53-associated Activity of COX-2^{-/-} Lung Fibroblasts. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(6), 339-351.

Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., & Schmolli, H. J. (2001). Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 127(7), 411-417.

Fontanini, G., Vignati, S., Boldrini, L., Chine, S., Silvestri, V., Lucchi, M. Ve ark. (1997). Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research*, 3(6), 861-865.

Fosslien, E. (2000). Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(1), 3-21.

Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.

Fry, W. A., Menck, H. R., & Winchester, D. P. (1996). The national cancer data base report on lung cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(9), 1947-1955.

Fucikova, J., Becht, E., Iribarren, K., Goc, J., Remark, R., Damotte, D. ve ark. (2016). Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer research*, 76(7), 1746-1756.

Pentel, P., Malin, D., van Beurden, W. J. C., Dekhuijzen, P. N. R., Harff, G. A., Smeenk, F. ve ark. (2002). Pattern of lung cancer in Turkey, 1994–1998. *Respiration*, 69(3), 207-210.

Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S. M. ve ark. (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, 24(3), 665-683.

Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K. I., Nakamura, S. ve ark. (1998). Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer research*, 58(17), 3761-3764.

Horeweg, N., van Klaveren, R. J., Groen, H. J. M., Lammers, J. W., Weenink, C., Nackaerts, K. ve ark. (2012). Blinded and uniform cause of death verification in a lung cancer CT screening trial. *Lung Cancer*, 77(3), 522-525.

Hosomi, Y., Yokose, T., Hirose, Y., Nakajima, R., Nagai, K., Nishiwaki, Y. ve ark. (2000). Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung cancer*, 30(2), 73-81.

Johnson, B. E., Russell, E., Simmons, A. M., Phelps, R., Steinberg, S. M., Ihde, D. C. ve ark. (1996). MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 63(S24), 210-217.

Kacar, S., Sahinturk, V., & Kutlu, H. M. (2019). Effect of acrylamide on BEAS-2B normal human lung cells: Cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis. *Acta histochemica*, 121(5), 595-603.

Kaiser, U., Schilli, M., Haag, U., Neumann, K., Kreipe, H., Kogan, E. ve ark. (1996). Expression of bcl-2—protein in small cell lung cancer. *Lung cancer*, 15(1), 31-40.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A. S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic ve ark. (2013). Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 369(25), 2379-2390.

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., O'byrne, K. J., Comley, M., Whitehouse, R. M., Talbot ve ark. (1997). Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in non-small-cell lung cancer. *British journal of cancer*, 75(4), 477.

Li, Y., Ma, C., Qian, M., Wen, Z., Jing, H., & Qian, D. (2014). Butein induces cell apoptosis and inhibition of cyclooxygenase- 2 expression in A549 lung cancer cells. *Molecular medicine reports*, 9(2), 763-767.

Liu, R., Gong, J., Chen, J., Li, Q., Song, C., Zhang, J. ve ark. (2012). Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(6), 855-864.

Lu, Y. C., Parker, L. L., Lu, T., Zheng, Z., Toomey, M. A., White, D. E. ve ark. (2017). Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(29), 3322-3329.

Lu, Y. C., Weng, W. C., & Lee, H. (2015). Functional roles of calreticulin in cancer biology. *BioMed research international*, 2015.

NCBI. CALR calreticulin. [Homo sapiens (human)] "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/811>" Gene ID: 811, Son güncelleme tarihi: 7-Haziran-2019

NCBI. MAGE family member A3. [Homo sapiens (human)] "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4102>" Gene ID: 4102, Son güncelleme tarihi: 17-Temmuz-2019

NCBI. PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2. [Homo sapiens (human)] "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5743>" Gene ID: 5743, Son güncelleme tarihi: 17-Haziran-2019

Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology*, 119(3), 229-240.

Pastuszak-Lewandoska, D., Domańska, D., Czarnecka, K. H., Kordiak, J., Migdalska-Sęk, M., Nawrot, E. ve ark. (2014). Expression of STAT5, COX-2 and PIAS3 in correlation with NSCLC histopathological features. *PloS one*, 9(8), e104265.

Perrone, L., Tell, G., & Di Lauro, R. (1999). Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor-1 by binding to its homeodomain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4640-4645.

Rachwal, W. J., Bongiorno, P. F., Orringer, M. B., Whyte, R. I., Ethier, S. P., & Beer, D. G. (1995). Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *British journal of cancer*, 72(1), 56.

Raez, L. E., Fein, S., & Podack, E. R. (2005). Lung cancer immunotherapy. *Clinical medicine & research*, 3(4), 221-228.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71.

Richards, T. B., White, M. C., & Caraballo, R. S. (2014). Lung cancer screening with low-dose computed tomography for primary care providers. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 41(2), 307-330.

Siegfried, J. M., Weissfeld, L. A., Singh-Kaw, P., Weyant, R. J., Testa, J. R., & Landreneau, R. J. (1997). Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 57(3), 433-439.

Slebos, R. J., Lee, M. H., Plunkett, B. S., Kessis, T. D., Williams, B. O., Jacks, T. ve ark. (1994). p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5320-5324.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., & Diederich, M. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology*, 2010.

Stoll, G., Iribarren, K., Michels, J., Leary, A., Zitvogel, L., Cremer, I. ve ark. (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.

Strauss, G. M. (1997). Measuring effectiveness of lung cancer screening: from consensus to controversy and back. *Chest*, 112(4), 216S-228S.

The Human Protein Atlas. Calreticulin, CALR. “<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000179218-CALR/tissue>” 24 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

The Human Protein Atlas. MAGE family member A3. “<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000221867-MAGEA3/pathology>” 24 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

The Human Protein Atlas. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2. “<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000073756-PTGS2/tissue>” 24 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

Thongprasert, S., Yang, P. C., Lee, J. S., Soo, R., Gruselle, O., Myo, A. ve ark. (2016). The prevalence of expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens in East and South East Asian non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 101, 137-144.

Vansteenkiste, J., Zielinski, M., Linder, A., Dahabreh, J., Gonzalez, E. E., Malinowski, W. ve ark. (2013). Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non–small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *Journal of Clinical Oncology*, 31(19), 2396-2403.

Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., & Ristimäki, A. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer research*, 58(22), 4997-5001.

Xie, C., Subhash, V. V., Datta, A., Liem, N., Tan, S. H., Yeo, M. S. ve ark. (2016). Melanoma associated antigen (MAGE)-A3 promotes cell proliferation and chemotherapeutic drug resistance in gastric cancer. *Cellular Oncology*, 39(2), 175-186.

Yılmaz, U. (2018). Akciğer Kanserlerinde Tedavi Yaklaşımları. *Nuclear Medicine Seminary*, 4:32-38.

Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., & De Marzo, A. M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer letters*, 215(1), 1-20.

Zhang, S., Zhou, X., Yu, H., & Yu, Y. (2010). Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines. *BMC cancer*, 10(1), 163.

Zhang, X., Yang, L., Chien, S., & Lv, Y. (2018). Suspension state promotes metastasis of breast cancer cells by up-regulating cyclooxygenase-2. *Theranostics*, 8(14), 3722.