

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMANIN**  
**PATOGENEZİNDE AİLESEL YATKINLIĞIN GENETİK**  
**ANALİZİ**

**Dr. Muhittin AKARSU**

**Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2016**



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

MALİGN PLEVRAL MEZOTELYOMANIN  
PATOGENEZİNDE AİLESEL YATKINLIĞIN GENETİK  
ANALİZİ

Dr. Muhittin AKARSU

Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Doç. Dr. Gütülü AK

ESKİŞEHİR

2016

**TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Muhittin AKARSU' ya ait "Malign plevral mezotelyomanın patogenezinde ailesel yatkınlığın genetik analizi" isimli çalışma jürimiz tarafından Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: .. / .. / ....

Jüri Başkanı Prof. Dr. Muzaffer METİNTAŞ  
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Gaye ULUBAY  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Güntülü AK  
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun ...../...../.....  
Tarih ve ...../..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Alparslan BİRDANE  
Rektör Yardımcısı  
Dekan Vekili

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği olan, mesleki bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, öğrenmeyi ve öğretmeyi çok seven, dürüst, çalışkan, tanımdan onur duyduğum saygıdeğer hocalarım Doç.Dr. Güntülü AK'a ve Prof. Dr. Muzaffer METİNTAŞ'ateşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Akarsu, M.Malign plevral mezotelyomanın patogeneğinde ailesel yatkınlığın genetik analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2016.**Malign mezotelyoma (MM) %90'ı plevral kaynaklı olmak üzere plevra, periton ve perikardın seröz yüzeylerinden ve nadiren testiste tunika vajinalisten gelişen malign bir tümördür. Populasyonda nadir görülen bu tümörün günümüzde standart ve küratif bir tedavisi olmayıp prognozu tüm çabalara rağmen iyi değildir. MPM'nın etiolojisinde rol oynayan önemli ve etyolojik ilişkinin iyi tanımlandığı iki faktör; asbest ve erionittir. Mezotelyoma etiolojisinde tartışılan diğer faktörler radyasyon, SV 40 virüsü ve genetik yatkınlıktır. Mezotelyomada genetik yatkınlık, hastalığın endemik olduğu bölgelerde bazı ailelerde birden fazla aile bireyleri hastalıktan etkilenirken bazı ailelerin hiç etkilenmemesinden dolayı öne sürülmüştür. Genetik yatkınlık fikrinden yola çıkarak tarafımızca tanı konulan aile A'da iki, aile B'de dört, aile C'de iki ve aile D'de iki olmak üzere, toplamda on bireyden oluşan akraba mezotelyoma grubunun periferik kanlarından izole edilen DNA aracılığıyla tüm genom dizileme analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda on bireyde ortak 8622 varyant saptanmıştır. Biyoinformatik analiz kullanılarak on bireydeki ortak gen mutasyonları filtrelenmiştir. Bu filtrelemeden sonra geriye kalan varyantlardaki; populasyonda çok nadir görülen ve hasar verici gen mutasyonları seçilmiştir. Toplamda on beş kromozomda, otuz yedi gen üzerinde yüz yirmi varyant saptanmıştır. Bu genler arasında mezotelyoma gelişimi ile direk ilişkili PIK3/AKT yolağı üzerinde etkili PIK3R4 geni üzerinde bir adet kompleks mutasyon saptanmıştır. Bunun dışında diğer 36 genin kanser ile ilişkisi literatürde sorgulandığında çalışmamızda on iki gen daha dikkat çekmektedir. Bunlar; SLC25A5, ITGB6, PLK2, RAD17, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1, GRM, IL20RA, MAP3K7, RIPK2, MUC16'dir. Bulunan gen bölgelerinin hasta bireylerin sağlam birinci derece akrabalarında da taranması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler:Mezotelyoma, Tüm genom dizileme, Ailesel yatkınlık, genetik

Destekleyen kurumlar:ESOGÜ BAP, Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü Mineral Lifleriyle Çevresel Ve Mesleki Temasın Yol Açtığı Akciğer Patolojilerinin Yönetimine Yönelik İş Birliği Ağı Projesi

## ABSTRACT

**Akarsu, M. Genetic analysis of familial predisposition in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine Medical Specialty Thesis in Department of Pulmonology Medicine, Eskisehir 2016.**

Malignant mesothelioma which developed from pleura, peritoneum, pericardium serous surface and rarely the tunica vaginalis and testes, is a mortal malignant tumors. This tumor is rare in the normal population. Despite all efforts today the standard and curative therapy isn't found and the prognosis isn't good. The most important and best-identified role in the etiology of MPM is asbestos and erionite. Radiation, SV40 virus and a genetic predisposition are other etiologic factors. Mesothelioma genetic predisposition has been suggested that in the endemic regions in some families multiple family members are affected by the disease in contrast some families are not affected. Based on the genetic predisposition idea by us diagnosed and followed a total of ten individuals of relatives mesothelioma group created (two individuals from family A, four from family B, two from family C, two from family D). Then DNA isolated from peripheral blood and was made whole genome sequencing analysis. 8622 common variants have been identified in ten individuals with this analysis. Common gene mutations in ten individuals were filtered using bioinformatics. After this filter in the remaining variants; very rare in the population and damaging mutations are selected. In total one hundred twenty variants were found on thirty-seven genes in fifteen chromosomes. Our finding PIK3R4 gene is directly associated with mesothelioma development. In this gene which is effective on PIK3 / AKT pathway, one complex mutations are detected. Other Thirty-six genes have been questioned relations with cancer in the literature. Twelve genes, which are associated with cancer, were detected in literature. These genes are SLC25A5, ITGB6, PLK2, RAD17, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1, GRM, IL20RA, MAP3K7, RIPK2, and MUC16. Additional studies, which scanned in first-degree relatives of individual, are needed to found the specific gene region.

**Key Words:** Mesothelioma, Genome sequencing, Familial predisposition, Genetics

**Supported by:** ESOGU BAP, Directorate General for Health Research Mineral fibers of Occupational and Environmental contact Cooperation for the Management of Induced Lung Pathology Network Project

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Plevranın Embriyolojisi	4
2.2. Plevranın Histolojisi	4
2.3. Mezotel Hücre Histolojisi	5
2.4. Malign Mezotelyomanın Tanımı	5
2.5. Malign Mezotelyomanın Epidemiyoloji	6
2.6. Malign Mezotelyomanın Etyopatogenezi	10
2.6.1. Asbest	10
2.6.2. Erionit	15
2.6.3. Sv40	15
2.6.4. Radyasyon	16
2.6.5. Malign Mezotelyomada Genetik Değişiklikler	17
2.7. Malign Mezotelyomanın Seyri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25



	Sayfa
3.1. Materyal	25
3.1.1. Cihazlar	25
3.1.2. Kimyasallar	25
3.1.3. Dna İzolasyonu	26
3.2. Tüm Genom Dizileme Yöntemi	26
3.2.1. Tüm Genom Dizileme	26
3.2.2. Örnek Hazırlama Ve Kalite Kontrol	27
3.2.3. Kütüphane Hazırlama	29
3.2.4. Dizileme	34
3.2.5. Biyoinformatik Analiz	35
4. BULGULAR	41
4.1. Çalışmada Yer Alan Aileler	41
4.1.1. A Ailesi	41
4.1.2. B Ailesi	42
4.1.3. C Ailesi	43
4.1.4. D Ailesi	44
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenozin Difosfat
AKR1C2	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C2
AKNAD1	AKNA Domain Dcontaining 1
ALK	Activin Receptor-Like Kinase
AP-1	Adaptor Related Protein Complex 1
APOA2	Apolipoprotein A2
ARF	Alternatif Reading Frame
ATP	Adenozin Trifosfat
ASXL1	Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator
BAGE2	B Melanoma Antigen Family Member 2
BAP1	BRCA1 İlişkili Protein 1
BCL-2	B hücreli lenfoma 2
BCL X	B Hücreli Lenfoma x
BRCA1	Breast Cancer 1
BRD8	Bromodomain Containing 8
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1
BRAF35	BRCA2 Associated Factor 35
CA-125	Cancer Antigen 125
CCSR/FAM190A	Coiled-Coil Serine Rich Protein 1
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2B
CGH	Komparatif Genomik Hibridizasyon

cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate
c-MET	Mezenkimal-Epitel Transisyon Faktörü
COX-2	Siklooksijenaz 2
CUL1	Cullin 1
DAD 1	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein Glycotransferas 1
DAD 9	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide-Protein Glycotransferas 9
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DUSP7	Dual Specificity Phosphatase 7
EDNRA	Endothelin Receptor Type A
EMX2OS	Empty Spiracles Homeobox 2 Opposite Strand/Antisense RNA
ERK5	Ekstrasellüler Sinyal Regülatör Kinaz
FAM118A	Family With Sequence Similarity 118 Member A
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FHIT	Fragile Histidine Triad
Fra-1	Fos-Related Antigen 1
GRM1	Glutamate Receptor, Metabotropic 1
GDP	Guanozin Difosfat
GF	Growth Factor
GTP	Guanozin trifosfat
HCF-1	Host Cell Factor-1
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HM	Mezotel Hücresi

HRAS	Harvey Rat Sarcoma
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL 24	İnterlökin 24
INTS7	Integrator Complex Subunit 7
KDM6A	Lysine-Specific Demethylase 6A
KGFLP2	Keratinocyte Growth Factor-Like Protein 2
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like Reseptörü
K-RAS	Kirsten Rat Sarcoma
KRR1	Small Subunit Processome Component Homolog
LIG2	DNA Lıgase 2
LOC	Location
LINGO2	Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MAP3K7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7
MDA-7	Melanoma Differentiation Associated Gene
mGluR1	Metabotropik Glutmat Reseptörü 1
MM	Malign Mezotelyoma
MPM	Malign Plevral Mezotelyoma
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
MUC16	Mucin
NF2	Nörofibromatozis Tip 2
NF-kB	Nükleer Faktör Kapa B
NOS	Reaktif Nitrojen Çeşitleri
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGFRA	Platelet-derived Growth Factor Receptor, Alpha
PHF21A	PHD Finger Protein 21A
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic, Alpha
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase Catalytic Subunit Type3
PLK	Protein Like Kinase
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PTCH1	Patched Homolog 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
p53	Tümör Protein 53
PI3K	Fosfotidilinositol-3-Kinaz
pRb	Retinoblastoma Protein
PTPN11	Tyrosine-protein Phosphatase Non-receptor Type 11
RAD17	Checkpoint Clamp Loader Component
RAS	Rat Sarcoma
RASSF1A	Ras Association Domain Family Member
RBFOX1	RNA Binding Protein, Fox-1 Homolog 1
RIPK2	Reseptör İlişkili Protein Kinaz 2
ROS	Reaktif Oksijen Çeşitleri
RPL29	Ribosomal Protein L29
SETD2	Su(var) Enhancer of zeste Trithorax-domain containing 2
SF3B1	Subunit of The Splicing Factor 1
SLC25A5	Solute Carrier Family 25

SMACB1	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin Subfamily 1, Member 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPB	Surfactant Associated Protein
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
SV 40	Simian Virüs 40
TAK-1	Tumor Growth Faktör Beta Aktive Kinaz
TERT	Telomeraz Reverse Transkriptaz
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF-R1	Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TP53	Tumor Protein 53
WFDC8	Four-Disulfide Core Domain 8
Wtn	Ubiquitin Ligaz Yolu
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VHL	Von Hippel Lindau
ZNF713	Zinc Finger Protein 713
ZZZ3	Zinc Finger ZZ-Type Containing 3

**ŞEKİLLER**

	Sayfa
2.1. Asbest liflerinin sınıflandırılması	11
2.2. Asbest lifleri ve bölgemizdeki kullanım şekilleri	11
2.3. Asbest liflerinin plevraya ulaşması	12
2.4. Asbestin indüklediği mezotelyal karsinogenezin mekanizması	12
2.5. Asbest liflerine karşı başarısız fagositoz	14
2.6. Asbestin mezotelyoma patogenezindeki rolü	14
3.1. Son basamaktaki bir örneğin fragman boyu dağılımı grafiği	34
3.2. Örnek bir fastq verisi	35
3.3. Tek bireyde Trimmomatic uygulaması örneği	38
4.1. A ailesinin soy ağacı	41
4.2. B ailesinin soyağacı	43
4.3. C ailesinin soyağacı	44
4.4. D ailesinin soyağacı	44
4.5. Genlerde saptanan baz düzeyinde varyant çeşitleri ve hangi tip mutasyona yol açtığını gösteren grafik	52
4.6. Genlerde saptanan mutasyonların çeşidi	52
4.7. Kanseri gelişimi ve yolakları ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar ve mutasyon sonuçları	53
4.8. On bireyde gözlenen ortak gen mutasyon çeşitleri	53

**TABLolar**

	Sayfa
2.1 Gelişmiş ülkelerde yıllık insidans ve beklenen olgu sayısı	7
3.1. On bireyden elde edilen DNA’da Nanodrop Sonuçları	28
3.2. On bireyden elde edilen DNA’da Qubit Ölçüm Sonuçları	28
3.3. Covaris sonikatörü çalışma özellikleri	30
3.4. Normalizasyon basamağında örneklerin ölçüm sonuçları	34
3.5. Örneklerde gerçekleştirilen okuma sayıları	36
3.6. Phred skorunun denk geldiği durumlar ve açıklamaları	37
4.1. Çalışmada yer alan ailelerin demografik bilgileri	45
4.2. Filtreleme sonrasında tespit edilen varyantların ağırlıklı olarak bulunduğu genler	46
4.3. Saptanan varyantların listesi	47
4.4. Çalışma sonucunda kanser gelişim yolları ile ilişkili genler	58



## 1. GİRİŞ

Malign mezotelyoma (MM) %90'ı plevral kaynaklı olmak üzere plevra, periton ve perikardın seröz yüzeylerinden ve nadiren testiste tunika vajinalisten gelişen malign bir tümördür. Plevrayı döşeyen mezotel hücrelerinden köken alan malign plevral mezotelyoma (MPM), plevranın primer malign tümörüdür (1). Normal populasyonda nadir görülen bu tümörün günümüzde standart ve küratif bir tedavisi olmayıp prognozu tüm çabalara rağmen iyi değildir. Geniş olgu serilerinde yaşam süresi 7-17 ay arasında saptanmıştır (2-5). Multimodal tedavi uygulanabilen vakalarda ortalama yaşam süresi ancak 32 aya kadar uzayabilmektedir (6).

MPM'nin normal populasyondaki görülme sıklığı 1-2.2 / 1.000.000'dır. Önemli bir risk faktörü olan asbest ile teması olan populasyonlarda ise görülme sıklığının belirgin derecede arttığı görülmektedir. Görülme sıklığı mesleksi teması olanlarda ki çoğunluğu erkek hastalardan oluşan kohortlarda 19-122.4 / 100,000 iken çevresel teması olan erkeklerde 114.8 / 100,000 ve kadınlarda 159.8 / 100,000 civarındadır (7). Erionit teması olan populasyonlarda ise bu rakamların çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak kullanımı belirli bölgelerle sınırlı ve terk edilmekte olduğundan asbest kadar yaygın bir sorun oluşturmadığı söylenebilir.

MPM'nin etiyolojisinde rol oynayan en önemli ve etyolojik ilişkinin en iyi tanımlandığı iki faktörden ilk tespit edileni asbest diğeri ise erionittir. Mezotelyoma normal populasyonda oldukça nadir görülmesi karşın, özellikle gelişmiş ülkelerde 20. yüzyıl ortalarına kadar asbestin sanayide sık kullanılması nedeniyle asbest teması populasyonda önemli bir malign tümör haline gelmiştir. Günümüzde tehlikenin farkına varan birçok gelişmiş ülkede endüstriyel alanda asbest kullanımının yasaklandığı ancak gelişmekte olan ülkelere halen kullanıldığı görülmektedir. Ülkemizde asbest sorunu dünyadaki diğer birçok ülkeden farklı olarak çevresel temas şeklindedir. Daha doğrusu ülkemizde mesleksi temasın boyutu tam olarak bilinmemesine karşın, çevresel temas çok iyi tanımlanmıştır (7,8). Özellikle Eskişehir ve çevresindeki iller ve bu illerin kırsal alanlarında yaşamın bir parçası olarak "aktoprak, çorak toprak, höllük" olarak bilinen asbest ile kontamine toprak, evlerin içine ve dışına sıva ve badana malzemesi, çatılarda yalıtım malzemesi ve hatta pekmez toprağı, çocuk pudrası olarak kullanılmıştır. Yakın zamanda

tamamlanan Türkiye Mezotelyoma Asbest Kontrolü Stratejik Planının sonuçlarına göre ülkemizin birçok kesiminde, çalışma bölgemiz olan Eskişehir ve çevresindeki illerin kırsal alanları dahil olmak üzere asbest ile kontamine toprak kullanımının devam ettiği görülmektedir (8). Hem dünyada hem de ülkemizde asbest kullanımının seyri ve mezotelyomada belirtilen latent süre dikkate alındığında hastalığın daha uzun yıllar endemik bir problem olacağı söylenebilir (9).

Asbest lifleri etkisini paryetal plevraya ulaştıktan sonra, hidroksil radikalleri ve superoksit anyonlarının oluşumuna yol açarak mutajenik değişikliklere, DNA zincir kırıkları ve delesyonlara neden olarak gösterir (10–12). Asbeste bağlı DNA hasarı oluşan mezotel hücreleri ölüm yerine bölünmeye gider. Eğer kritik genetik değişiklikler birikirse mezotelyoma gelişir. Deneysel çalışmalar, asbest liflerinin normal insan mezotel hücrelerinde kromozom anormalliklerine neden olduğunu göstermiştir. Kromozomal bölge kayıpları, bölge kazanımlarından daha ağırlıklı olarak izlenmektedir. Kayıplar en sık 1p, 3p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q ve 22q bölgelerinde, kazançlar ise 1q, 5p, 7p, 8q ve 17q'dadır (13,14).

Asbest ve erionit temasının dışında mezotelyoma etyolojisinde tartışılan diğer faktörler arasında radyasyon, SV 40 virüsü ve genetik yatkınlık yer almaktadır. Mezotelyomada genetik yatkınlık, hastalığın endemik olduğu bölgelerde bazı ailelerde birden fazla aile bireyleri hastalıktan etkilenirken bazı ailelerin hiç etkilenmemesinin fark edilmesiyle ortaya çıkmış bir düşünce olup konuyla ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Mezotelyomada mutasyonlar daha çok tümör baskılayıcı genlerde görülmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesi, kontrol ettikleri büyümeyi ve proliferasyonu uyaran hücre içi sinyal ileti yollarının kontrolsüz şekilde aktive olmasına neden olmaktadır. Mutasyona uğrayan başlıca genler; siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A/Alternatif reading frame (CDKN2A/ARF), nörofibromatozis tip 2 (NF2), BAP1 ve telomeraz reverse transkriptaz (TERT)'dir (15–17).

Asbest teması olan populasyonun çok azında malign mezotelyoma gelişmesi ve özellikle bazı ailelerde sık görülmesi genetik yatkınlık açısından anlamlı olabilir. Yine asbest teması olmayıp mezotelyoma görülen akraba aile bireylerinin olması bu savı güçlendirmektedir. Nitekim son yıllarda literatürde bu konuyla ilgili tartışmalar

gittikçe artmaktadır. Kısıtlı tedavi seçenekleri olan ve kötü prognoza sahip bu hastalıkta varsa bir genetik yatkınlığın ortaya çıkarılması erken teşhis ve etkin tedavi ile sağkalımı uzatabilir. Ailesel yatkınlığı araştırmak üzere yapılan bu çalışmada amaç; 4 farklı aileden 10 akraba bireyin tüm genomunun yeni nesil sekanslama yöntemi ile haritalandırılarak malignite gelişimde etkili olabilecek yolaklardaki ortak varyasyonların saptanmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Plevranın Embriyolojisi

Plevra, periton ve perikart boşlukları çöломik kavite orjinli yapılardır ve gebeliğin 3. haftasında primitif mezodermden şekillenmeye başlarlar. Primitif mezoderm önce lateral ve medial yapraklara, lateral yapraklar iç katmanı oluşturan splanknoplevra ve dış katmanı oluşturan somatoplevraya ayrışır. Sağ ve solda gelişen bu iki boşluk 3. haftanın sonunda birleşerek çöломik kavite halini alır. Bu aşamada çöломik kavite mezotel hücre tabakası ile kaplanır. Mezotel hücreleri çöломik kaviteyi döşeyen kübik hücrelerin uzun yassı hücrelere farklılaşması sonucu mezodermden gelişmeye başlamaktadır. Çöломik kavite septum transversum ve plöroperitoneal membranlarla ikiye bölünerek primitif perikardial ve peritoneal kavite oluşur. Embriyolojik hayatın ilerleyen dönemlerinde her iki plöroperikardial membranların birleşmesi sonucu primitif perikardial kavite, plevral kavite (sağ ve sol) ve perikardial kavite olmak üzere üç ayrı boşluk haline dönüşür. Plevral boşluk genişleyerek perikardial ve peritoneal boşluktan ayrılır. Gebeliğin 5. haftasında akciğerler sağ ve sol plevral kanala doğru tomurcuklanarak büyümeye başlarlar. Akciğerlerin bu büyümesi ile, splanknik mezoderm, mezenkim ile paketlenmiş bronş ağacının üzerini örterek dışarı doğru itilir. Böylece, splanknik mezoderm, plevranın mezotelyal katını oluşturacak şekilde incelik ve mezenkimal doku, plevranın altındaki bağ dokusunu oluşturur. Splanknik mezoderm akciğer tomurcuğunu örterek visseral plevrayı, somatik mezoderm ise göğüs duvarını çevreleyerek parietal plevrayı oluşturur.

### 2.2. Plevranın Histolojisi

Plevranın her iki katmanı tek sıra mezotel hücreleri, bazal membran ve bağ dokudan oluşur. Mezotel hücreleri perikard ve peritondaki gibi tek kat halinde yan yana dizilerek çevrelediği yapılara kaygan, yapışmaz ve koruyucu bir yüzey sağlar. Histolojik olarak her iki plevra 5 adet katmandan oluşmuştur. Bunlar yüzeyden derine mezotel doku, submezotelyal bağ dokusu, yüzeyel fibroelastik tabaka, gevşek subplevral bağ dokusu, derin fibroelastik tabaka şeklindedir.

Plevra visseral ve parietal olmak üzere 2 katmandan oluşan seröz bir zarıdır. Visseral plevra akciğerlerin yüzeyini ve fissürleri örterken, parietal plevra göğüs duvarının iç yüzeyini, diafragma ve mediasteni örtmektedir. Visseral plevra hilustan başlayarak akciğer yüzeyini, intrelober fissürleri ve eğer varsa aksesuar lob fissürlerini örter. Akciğer parenkimine yapışık olup doğal ayrım planı yoktur. Pulmoner ligaman akciğer bazal kısımlarından diafragmaya uzanan bir yapı olup, visseral plevra ile parietal plevranın birleşmesiyle oluşur ve parietal plevra olarak devam eder. Parietal plevra, göğüs duvarının iç yüzünü, diafragma, mediasteni ve toraks girimini her iki tarafta da örter. Parietal plevranın diafragmatik bölümü ve mediastinal bölümünde doğal ayrım planı yoktur, diğer kısımları ise diseksiyona izin vermektedir.

### **2.3. Mezotel Hücre Histolojisi**

Mezotel hücreleri şekil olarak pleomorfiktir, bazal membran üzerine tek sıra halinde dizilmiş olarak bulunur ve alttaki bağ dokunun gerilme derecesine göre yassı, kuboid ya da kollumnar şekle dönüşebilmektedir. Mezotel hücrelerinin kalınlığı yaklaşık 1–4  $\mu\text{m}$ 'dir. Mezotel hücreleri mikrovilluslar içerirler. Mikrovillusların, metabolik fonksiyon için yüzey alanını artırmak ve akciğer hareketlerini kolaylaştırmak için kayganlık sağlamak amacıyla hyalüorik asitten zengin glikoprotein içermek gibi fonksiyonları vardır. Mezotel hücre fonksiyonları ise sıvı reabsorpsiyonu, yabancı madde fagositozu, kollajen elastin yapımı ve plazminojen aktivasyonu ve çeşitli biyokimyasal maddeler salgılayarak plevral onarıma yardım etmek olarak sayılabilir. Farklı kalınlıklarda olabilen submezotelyal bağ dokusu ve yüzeyel elastik tabakanın sınırları çok belirgin değildir. Gevşek bağ doku içinde sinir, damar ve lenfatikler bulunmaktadır. Derin fibroelastik tabaka ise akciğer parankimi, diyafragma, mediastinal organlar ve göğüs duvarına sıkıca yapışır.

### **2.4. Malign Mezotelyomanın Tanımı**

MM plevra, periton, perikard ve tunika vajinalisidöşeyen mezotel hücrelerinden köken alan malign karakterde bir tümördür. Köken aldığı mezotel hücrelerinin yerleşim yerine göre 4'e ayrılır:

- Plevral mezotelyoma: Bütün mezotelyoma olgularının yaklaşık olarak 3/4'ünü kapsamaktadır. Göğüs boşluğundan başlar.
- Peritoneal mezotelyoma: Geri kalan olguların çoğu bu gruptadır. Karın boşluğundan köken alır.
- Perikardiyal mezotelyoma: Kalbi saran perikarttan köken alır. Oldukça nadir görülür.
- Tunika vajinalisin mezotelyoması: Tunika vajinalisi döşeyen mezotel hücrelerinden köken alır. Oldukça nadir görülür.

MM histolojik olarak başlıca 3'e ayrılır:

- Epitelyal tip MM: Olguların yarısından fazlası (yaklaşık %60'ı) bu gruptadır. Beklenen yaşam süresi ve tedaviye yanıtı diğer histolojik tiplere göre daha iyidir.
- Sarkomatöz tip MM: Olguların yaklaşık %10'u bu gruptadır. Diğer histolojik gruplara göre daha agresif ve tedavi yanıtı daha düşüktür.
- Miks (bifazik) tip MM: Sarkomatöz ve epitelyal histolojiyi bir arada gösteren olgulardır. Geri kalan %20-30 olgu bu gruba dahildir.

## 2.5. Malign Mezotelyomanın Epidemiyoloji

İlk mezotelyoma vakası 1947'te, asbest teması ve mezotelyoma arasındaki ilişki ise ilk olarak Wagner ve ark. tarafından 1960'ta tanımlanmıştır. Asbest temasının başlaması ile tanı arasında geçen süre 20 ile 50 yıl (ortalama 30 yıl) arasındadır (1,18,19). Hastaların 2/3'ü 50 ile 70 yaş arasında olup, erkeklerde görülme sıklığı mesleki kohortlarda iş kolundaki asbest teması nedeniyle kadınlardan fazladır (18). Epidemiyolojik çalışmalar uzun süreli ve yoğun asbest maruziyeti olan bireylerin sadece %5'inde mezotelyoma geliştiğini, buna karşın mezotelyoma tanısı alan hastaların en az %80'inde asbest teması olduğunu saptamıştır (18).

Mezotelyoma kontrolsüz asbest teması nedeniyle son 20-30 yılda gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı giderek artan bir malign tümördür (1,20,21). 19 ve 20. yüzyıl başlarında yoğun ve kontrolsüz asbest kullanımına ikincil olarak, tüm dünyada

MPM insidansı 20. yüzyıl ortasından bugüne artmaya devam etmektedir (21). Önümüzdeki 20–30 yılda sıklığın daha da artması beklenmektedir. Bu sorun öyle bir boyuta ulaşmıştır ki gelişmiş ülkelerde bir mezotelyoma endemisinden bahsetmek mümkündür (20). DSÖ'ne göre mezotelyomanın 1994 ve 2008 yılları arasında yaşa göre düzeltilmiş mortalite hızı milyonda 4.9, ölümden ortalama yaş 70 ve erkek / kadın oranı 3.6:1'dir (22). Gelişmiş ülkelerde vaka sayıları, yıllık insidans ve gelecek için projekte edilen olgu sayıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Gelişmiş ülkelerde yıllık insidans ve beklenen olgu sayısı.

Ülke	Yıl	Olgu	Yıllık insidans <sup>1</sup>	E/K	Tahmin edilen pik	Hesaplanan gelecekteki olgu sayısı	Hesaplanan periyod
Avustralya	2008	661	29	4:1	2014-2021	6.500	2004-2060
İngiltere	2009	2,6	29	4.9:1	2011-2015	65.000	2002-2050
ABD	2009	-	10	4.6:1	2000-2005	85.000	2008-2054
İtalya	2004	-	24	2.6:1	2015-2024	800/yıl	2012-2024
Japonya	2007	1,1	8	3.5:1	2027	66.000	2003-2050

<sup>1</sup>:milyonda yıllık insidans (23 nolu kaynaktan alınmıştır).

Mezotelyoma riskinin, asbest ile teması olmayan bir popülasyonda 2.2–4 / 1,000,000 kişi-yıl arasında olduğu bildirilmektedir (24,25). Asbest temasından bağımsız tüm dünya için belirlenen ortalama yıllık mezotelyoma riski erkekler için 1.3/100,000 kişi-yıl, kadınlar için 0.2/100,000 kişi-yıl olarak belirtilmiştir (25,26).

Endüstrileşmiş ülkelerde mezotelyoma riski, yirminci yüzyılın büyük kısmında (70–80 yıl) asbestin yaygın endüstriyel kullanımı nedeniyle ülkenin asbestle ilgili üretim ve kullanım aktivitesine bağlı olarak artar. Asbest ile doğrudan temaslı kişiler, yani asbest temaslı işçiler arasında mezotelyoma orantılı ölüm hızı % 3.9–6 arasında bildirilmiştir (26). Gelişmekte olan ülkelerde ise asbest teması, sanayinin gelişimine koşut olarak hızla artmaktadır. Gelişmekte olan ülkeler açısından en önemli sorun ise rapor edilmeyen olgulardır.

Mezotelyomada epidemiyojik verilerin esas alındığı asbest teması tipine göre üç dönem gösterilir:

- Birinci dönem kaba asbestin madenden çıkarılması ve işlenmesi sırasındaki temastır. Wittenoom işçileri bu gruba örnektir. Erkek işçilerin %4.7'sinin, kadın işçilerinin ise %3.1'inin ölümü mezotelyoma nedeniyledir (27).

- Hastalığın ikinci dönemi endüstride üretim hatlarında asbest ürünlerinin kullanıldığı dönemdir. Savunma sanayi, izolasyon maddeleri, tekstil, gemi inşaatı, fren balataları üretimi gibi iş kollarından temas verileri gelmiştir ve gelmeye devam etmektedir (28).

- Üçüncü dönem ise mesleki temasın yan ilişkileri veya üretilen asbest içerikli maddelerle yaşam sırasında temasın olduğu dönemdir. Bu temas şekli kısa dönem ve düşük doz olarak kendini göstermektedir. Sıklıkla mesleki olmayan bu temas asbest işçilerinin evlerinde, asbest endüstrisinin çevresindeki hava kirliliği alanlarında ya da asbest içeren binalarda olmaktadır.

Türkiye'de yakın zamanda Türkiye Mezotelyoma Çalışma Grubu tarafından sunulan Türkiye Asbest Kontrolü Stratejik Planının verilerine göre 2008 ile 2012 yılları arasında tüm Türkiye'de 5617 kişinin mezotelyoma tanısı aldığı tespit edilmiştir. Yine bu verilerden yola çıkılarak kaba insidans hızları ülke geneli için 1.53/100,000; erkekler için 1.75/100,000 ve kadınlar için 1.30/100,000 olarak hesaplanmıştır. Ortalama yıllık mezotelyoma insidans hızı ülke genelinde tüm vakalar için 3.79/100,000; erkekler için 2.28/100,000 ve kadınlar için 2.94/100,000'dir. Asbest teması devam eden bölgelerde kaba insidans hızı tüm vakalar için 73.42/100,000; erkekler için 79.94/100,000 ve kadınlar için 66.92/100,000 olarak hesaplanmıştır. Bu rakamlar asbest teması kesilmiş bölgelerde ise tüm vakalar için 26.94/100,000, erkekler için 32.98/100,000 ve kadınlar için 20.87/100,000 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma kapsamında 379 köyde asbest temasının devam ettiği, bu köylerde halen 158,068 kişinin asbest ile temasının devam ettiği, bu köylerin ağırlıklı olarak Eskişehir, Diyarbakır, Kütahya, Tokat, Yozgat, Çorum ve Elazığ'da bulunduğu tespit edilmiştir. Teması devam eden köylerin yanında 174 köyün de geçmişte temas ettiği ve bu köylerde de yaklaşık 286,510



kişinin geçmişte temaslı olduğu, tüm temaslı populasyon dikkate alındığında 2013 ile 2033 yılları arasında 17,961 yeni mezotelyoma vakası beklendiği rapor edilmiştir (8).

Dünya’da belirlenen en yüksek MPM insidans hızı, doğumdan itibaren erionite ile temas eden İsveç’te yaşayan Karain’li göçmenlere aittir. Bu kohortta MPM insidansı erkekler için 639/100,000, kadınlar için 1267/100,000 olarak belirlenmiştir. MPM nedenli orantılı ölüm hızı % 78 olarak tespit edilmiştir. İlgili hızlar, İsveç popülasyonuna göre erkeklerde 135,5 kat, kadınlarda 1336,3 kat yüksek olduğu, dünya ile kıyaslandığında da erkekler için 229,3 kat, kadınlar için 2004,5 kat yüksek olduğu belirlenmiştir (29).

Kırsal alanda oluşturulan kohortlarda yapılan anlık ölçümlerde havadaki asbest lif miktarı ev içi ortamda 0.009 – 0.28 lif/mL arasında, ev dışı ortamda 0.009-0.04 f/mL arasında bulunmuştur. Ortalama temas süresi 51 yıl olan bir kırsal alan yaşayanında ortalama toplam temas dozu 5.7 lif/mL, yaşam boyu temas dozu ise 0.19–14.80 lif-yıl/ml olarak hesaplanmıştır (30). Bu son rakamlara göre, aslında kırsal alanda yaşam boyu oluşan toplam temas miktarları “düşük değerler” olarak tanımlanamaz. İş yeri serilerine göre, kırsal alanda temaslı hastaların temas süreleri de oldukça dikkat çekici biçimde farklılık göstermektedir. Örneğin iş yeri serilerinde, asbest ile temas işe başlama ile başlamakta, işçi günde 8 saat, haftada 5 gün, yılda 46–48 hafta temas etmektedir. Böylece 20 yaşında işe başlayıp 30 yıl çalışan birisinin asbest ile temas süresi yaklaşık 60,000 saat olurken, 50 yaşındaki bir kırsal alan çalışanında asbest temas süresi yaklaşık 260,000 saat olmaktadır. Çünkü köy ortamında doğumla başlayan temas, değişen toz konsantrasyonlarında olsa da günün en az 16 saati ve köydeki bir yaşam boyu aralıksız devam etmektedir (31–33). Ayrıca yapılan ölçümler anlık ölçümlerdir, halbuki yağışlı hava sonrası toprak kurduğunda, rüzgarda, hayvan sürüsü geçerken, temizlik sırasında, aktoprak çıkarılırken, uygulanırken lif seviyeleri anlık ölçümlere göre çok yüksek olabilmektedir. Sonuç olarak, toplam temas ve akciğerdeki lif miktarı, kırsal alanda doğup 50 yıl yaşayan birinde, 20 yaşında işe başlayıp 30 yıl çalışan birine göre neredeyse eşit, belki de daha fazla miktardadır. Nitekim detaylı çalışmalar bu yargıyı doğrulayan akciğer asbest lif miktarları vermiştir (34).

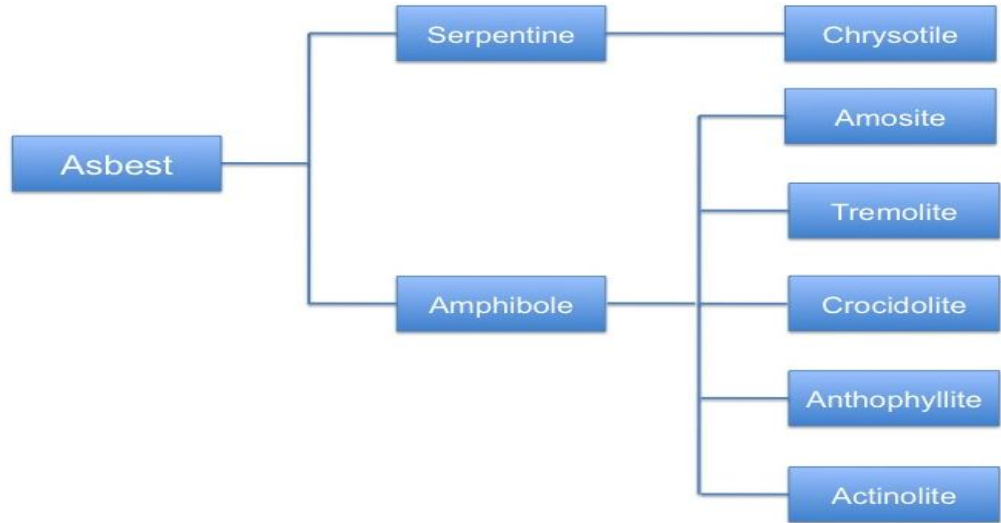
Mesleksel asbest teması nedenli mezotelyoma olgularında hastalık, ilk asbest temasından 35–40 yıl sonra ortaya çıkar. Bu süreye “latent süre” adı verilir (14). Temas işe girme ile başladığından mezotelyoma'nın genel olarak saptandığı yaş bu serilerde 60–65 yıl aralığındadır (35,36). Kırsal alanda ise asbest teması doğumla başlar. Bu durumda ‘latent süre’ hastalığın saptandığı yaş olmaktadır. Bu süre ülkemiz serilerinde 50–55 yaş civarındadır. Bu rakam latent süre olarak iş yeri serilerine göre daha uzun, ama kırsal alanda latent süre hastalığın ortaya çıktığı yaş ile aynı olduğundan, hastalığın saptandığı yaş olarak, dikkat çekecek şekilde daha kısadır (7,31–33,37).

## **2.6. Malign Mezotelyomanın Etyopatogenezi**

MPM'lı hastaların yaklaşık %80'inde hastalığın gelişmesinden asbest teması sorumludur. Ülkemizde asbest temasının mesleksel temas boyutu tam olarak belirlenemediğinden MPM'nın en önemli nedeni çevresel asbest teması olup, bu ilişki ilk kez Yazıcıoğlu ve ark. tarafından Diyarbakır yöresinde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (38). Benzer yıllarda artan tanı ve vaka sayısı nedeniyle Barış ve ark. da erionite bağlı MPM oluşumunu Ürgüp ve çevresinde yaptıkları çalışmalar ile göstermişlerdir (39). Etiyolojiye yönelik yapılan çalışmalarda suçlanan bir diğer faktör SV 40 virüs enfeksiyonu olup ülkemizde söz konusu kontamine polio aşılı kullanılmadığından bunu destekler bulgu gösterilememiştir. Yine sık karşılaşılacakla beraber başka hastalıklara yönelik alınan radyoterapi sonrası mezotelyoma gelişimi görülmüştür. Asbest temaslı bireylerin çok azında mezotelyoma gelişmesi ve bazı aile bireylerinde sık görülmesi genetik ve epigenetik yatkınlığın araştırılmasına ve tartışılmasına neden olmuştur. Aşağıda söz faktörlerin patogenezdaki rolü tartışılacaktır.

### **2.6.1. Asbest**

Asbest, amfibol ve serpantin diye iki ana gruba ayrılan lifsi yapıda doğal fibröz bir silikattır. Amfibol asbest tipleri olan tremolit, aktinolit, amozit, krokidolit ve antofilit lifleri, serpentin grubunda yer alan krizotil tip asbest liflerine göre daha uzun, daha sert ve biyolojik yıkıma daha dayanıklıdır (Şekil2.1) (40).



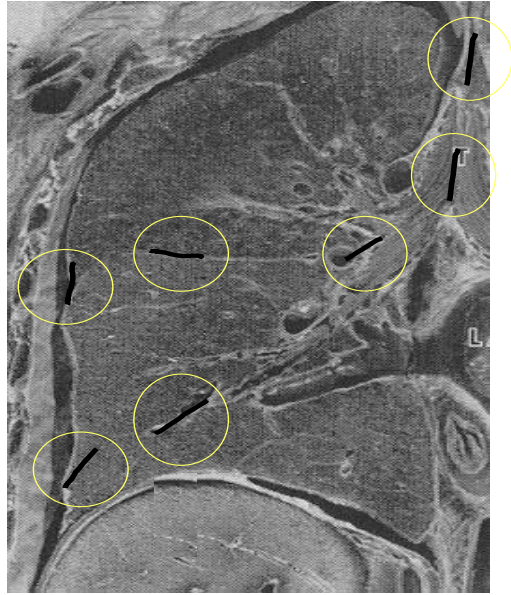
Şekil 2.1 Asbest liflerinin sınıflandırılması.

MM ile asbest arasındaki ilişkiyi gösteren ilk epidemiyolojik çalışmalardan biri Wagner ve ark. tarafından 1960'lı yıllarda Güney Afrika maden işçilerinde rapor edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla bu ilişki net bir şekilde ortaya konulmuştur. Ülkemizde de çevresel asbest teması ve etkileri tüm açıklığıyla ortaya konulmuştur (Şekil 2.2). MM'lı hastaların yaklaşık %80'inde etyolojide asbest teması rol oynar.



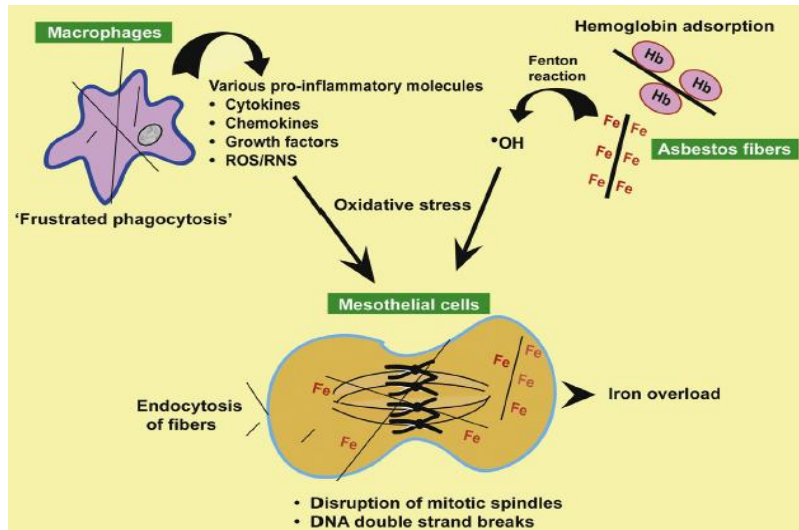
Şekil 2.2 Asbest lifleri ve bölgemizdeki kullanım şekilleri (8 numaralı kaynaktan alınmıştır).

Lifsi yapıda ve sert karakterde olan asbest lifleri inhalasyon yolu ile alındıklarında akciğer parankimini geçerek plevraya kadar ilerlemektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Asbest liflerinin plevraya ulaşması (19 numaralı kaynaktan alınmıştır).

Burada mezotel hüresinde oksidatif stresi artırarak, bir yandan hücre düzeyinde inflamasyon, apoptozis, histon asetilasyonu ve DNA metilasyonunda değişikliklere neden olurken diğer yandan hücrede bir takım zararlı mutasyonlara yol açarak mezotelyoma gelişimine yol açmaktadır (Şekil 2.4).

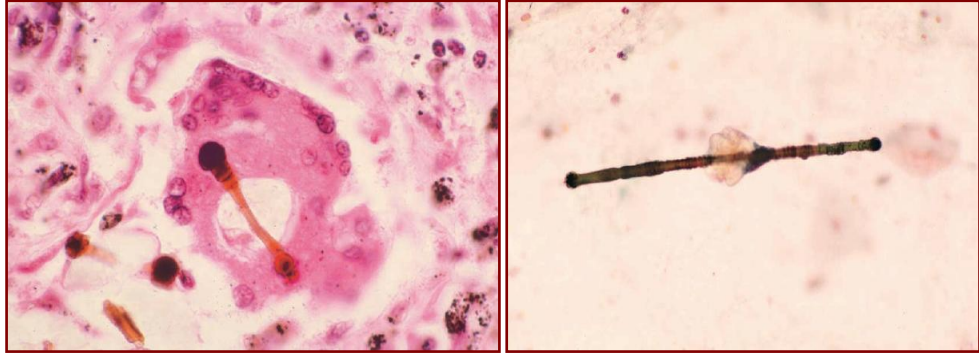


Şekil 2.4 Asbestin indüklediği mezotelyal karsinogenezin mekanizması (41 numaralı kaynaktan alınmıştır).

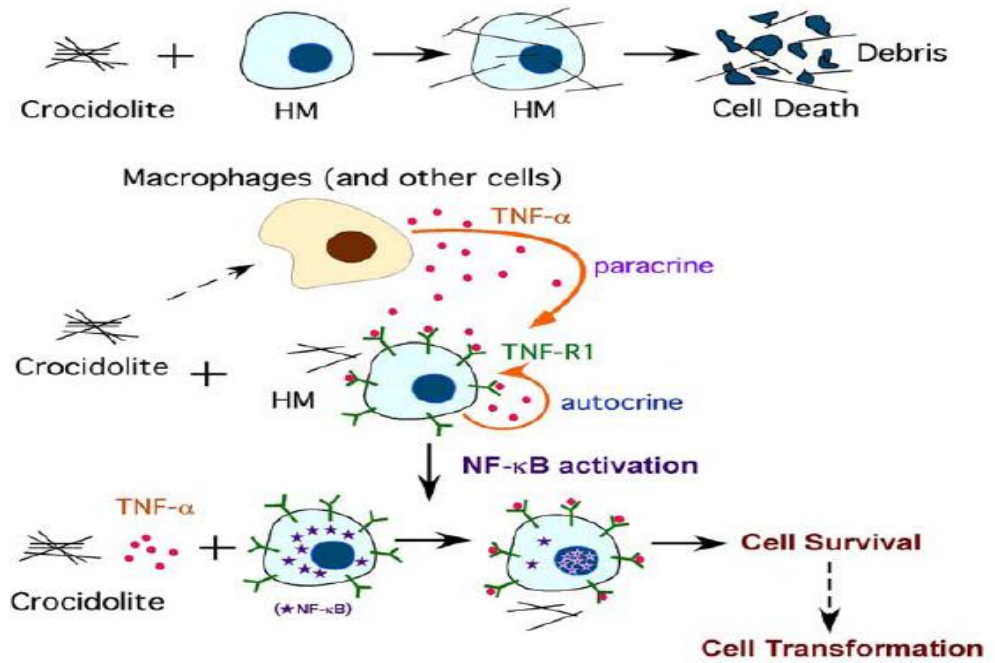
Asbestte maruziyetin süresi ve yoğunluğu malign mezotelyoma gelişiminde önemlidir. Yapılan çalışmalarda MPM gelişiminde akut ve yüksek düzey asbest maruziyetinden önce süregelen ve orta düzeyde maruziyetin daha etkili olduğu bulunmuştur (19,42). MPM gelişimi için gerekli asbest maruziyetinin toplam süresi tam olarak bilinmemektedir (42,43).

Asbestin tüm çeşitleri karsinojeniktir ve hepsi mezotelyoma gelişimi ile ilişkilidir (44, 45). Boy en oranı en fazla olan, yani uzun ve ince lifler ( $\geq 8 \mu\text{m}$  uzun,  $\leq 0.25 \mu\text{m}$  ince) en tehlikeli liflerdir. Bunlar plevra için daha uzun biyoresistansa sahiptirler. Bu lifler akciğerlere ve buradan plevraya penetre olarak tekrarlayan zararlara, lokal inflamasyona, doku fibrozisine ve mezotelyomaya yol açarlar.

Test edilen diğer hücre tipleri ile karşılaştırıldığında, insan mezotel hücreleri asbestin toksik etkisine çok duyarlıdır. Amfibol tip asbeste maruz kalan insan mezotel hücreleri, normal insan bronşial epiteli ve fibroblastik hücrelerine göre asbestin sitotoksik etkisine 10 ila 100 kat daha duyarlıdır. Asbest liflerinin toksisitesi doza bağlıdır. Doku kültürlerinde  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ve üstü dozlarda asbeste maruz kalan hücreler 1 haftadan kısa sürede ölmektedir (46). Yapılan çalışmalar asbeste insan mezotel hücrelerinin NF-kB ve TNF- $\alpha$  sinyal yolları ile tahmini cevabı ortaya konmuştur (47). *In vivo* çalışmalarda asbest teması sonrası geniş bir mononükleer patogenezin olduğu inflamatuvar süreçlerin etkinliği ortaya konmuştur (48). Bu süreçte kısaca diferansiye olmuş makrofajlar asbest liflerini fagosite ederler ve yanıt olarak TNF- $\alpha$  salgırlar. Aynı zamanda asbest mezotel hücrelerinin TNF- $\alpha$  reseptörü olan TNF-R1 ekspresyonunu ve TNF- $\alpha$  salınımı artırır (otokrin ve parakrin etki). TNF- $\alpha$  reseptörüne bağlanır ve NF-kB yolağını aktive eder. Bu yolla da asbest maruziyeti altında insan mezotel hücrelerinin yaşama oranı artar (47). İnsan mezotel hücreleri asbeste maruz kaldıkça DNA hasarları artar. Asbest demir katalizli serbest radikaller aracılığıyla DNA çift sarmalında kırıklara yola açar. Ek olarak memeli genomunda geniş bir yelpazede mutasyona yol açan reaktif oksijen çeşitleri (ROS) ile reaktif nitrojen çeşitleri (NOS)'nin salınımını artırır. Bu durumda baz silinmesi, eklenmesi, yer değiştirmesi, kromozal anormallikler ve kardeş kromozomlar arasında parça değişimine yol açarak genom toksisitesini artırır (49,50). TNF- $\alpha$  tarafından stimüle edilen NF-kB yolağı mezotel hücrelerini öldürmez ve yeterli spesifik genetik hasar oluşturursa mezotelyoma gelişimine yol açabilir (47). (Şekil 2.5 ve 2.6).



Şekil 2.5 Asbest liflerine karşı başarısız fagositoz (51 numaralı kaynaktan alınmıştır).



Şekil 2.6 Asbestin mezotelyoma patogenezindeki rolü (52 numaralı kaynaktan alınmıştır).

Diğer yandan asbest mezotelyoma gelişiminde aktif rol alan epidermal büyüme faktörünü tetikleyen yollarda aktivasyona yol açar (53). Bir çok mezotelyoma olgusunda aktif olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve bunun trozin kinaz reseptörü olan c-Met'in fazlası ile eksprese olduğu görülmüştür. Bu faktörler

özellikle SV 40 ile enfekte hücrelerde daha fazla ekspre edilmektedir. HGF aktivasyonu PI3K/ERK5/Fra-1 yolağını geri beslemektedir (54).Bu yolaklar da mezotel hücrelerinin mezotelyomaya dönüşümünde aktiftirler.

### **2.6.2. Erionit**

Erionit volkanik kayalar içinde bulunan doğal lifli bir zeolittir. Dünyada Antartika, Avrupa (Çek Cumhuriyeti, Avusturya, Almanya, İtalya, Fransa), Afrika (Kenya ve Tanzanya), Asya (Kore ve Japonya), Kuzey Amerika (ABD, Kanada), Gürcistan, Rusya, Yeni Zellanda, İskoçya ve iyi bilindiği gibi Türkiye’de bulunmaktadır (55,56).

Erionit temasının en iyi tanımlandığı bölgelerden biri Kapadokya’daki bazı köylerdir. Buradaki insanlar yaşadığı süre boyunca erionite maruz kalmışlardır. Amerika’da ise erionit insan yaşamının sürdürülmediği çöl bölgelerinde mevcuttur (57).

Diğer mineral lifler ile karşılaştırıldığında mezotelyoma gelişmesini en fazla indükleyen lif erionittir. Daha önce de belirttiğimiz gibi Dünya’da belirlenen en yüksek MPM insidans hızı, doğumdan itibaren erionite ile temas eden İsveç’te yaşayan Karain’li göçmenlere aittir (29).

### **2.6.3. SV 40**

SV 40 virüsü 1960’da maymunlarının böbreklerinden izole edilmiştir. Bu virüs maymunlarda kansere ve böbrek hastalıklarına yol açmaktadır. Yine bu virus tümör süpresör genleri baskılamakta ve hücre ölümünü ertelemektedir.

1958 ve 1963 yılları arasında Amerika’da kullanılan polio aşıları maymunlardan izole edildiğinden SV 40 ile kontamine olmuştur. Bu sürede 100 milyon kadar bireyin bu kontamine aşılarla aşılandığı düşünülmektedir.

SV 40 virüsünün insanlarda kanserlere yol açtığı tartışılan bir konudur. Yapılan yayınlarda SV 40 virüsünün insan hücrelerinde kansere yol açtığını destekleyen bir epidemiyolojik çalışmanın olmadığı öne sürülmektedir (58). 1997’de Michelle Corbone tarafından malign mezotelyoma tanısı alan olguların %54’ünde SV 40 virüsü izole edildiği bildirilmiştir (59).Mezotelyoma gelişmiş bireylerden

alınan biyopsilerde SV 40 virüsünün p53 ve pRb'yi inaktive ettiği, c-met, IGF-I ve diğer onkogenleri ise aktive ettiği gösterilmiştir. Bunun üzerine mezotelyoma ilgi grubu tarafından benzer çalışma birçok laboratuarda sürdürülmüş ve benzer bulgulara ulaşılmıştır (60). Fakat devam eden yıllarda yapılan çalışmalarda SV 40 virüsünün mezotelyoma olgularının %5-6'sında izole edildiği bildirilmiştir (46, 61–63). Bu durum da SV 40 virüsü ile mezotelyoma gelişimi arasındaki bağlantıyı şüphede bırakmıştır.

İlerleyen çalışmalarda mezotelyoma gelişiminde asbest ve SV 40 virüsü birlikteliğinin süreci hızlandırdığı ortaya atılmıştır. Bocchetta ve ark. tarafından hücre kültüründe yapılan çalışmada SV 40 virüsü ve asbest teması olan hücrelerde sadece SV 40 virüsü ile enfekte hücrelere göre daha yüksek oranda mezotelyoma geliştiği ileri sürülmüştür (64). Kroczyńska ve ark.'nın rat üzerindeki deneylerinde asbestin ve SV 40 virüsünün ko-karsinojen olduğu gösterilmiştir (64). Yine de SV 40 virüsünün insanlar üzerindeki etkisi tartışmalıdır.

#### **2.6.4. Radyasyon**

Uzun yıllar asbest mezotelyoma gelişimi için ana sorumlu etken olarak görülürken zamanla hastalıkla ilişkili başka nedenlerin de olabileceği düşünölmeye başlanmıştır. Daha önce abdominal veya torakal radyoterapi alan hastalarda malign mezotelyoma gelişimi ile ilgili yayınlar mevcuttur. Rogglie ve ark.'nın 1997'de yaptığı yayında 62 mezotelyomalı kadın hastanın 6'sının öncesinde radyoterapi aldığı saptanmıştır (65). Malign mezotelyoma gelişimi ile radyoterapi alma arasında geçen ortanca süre 21 yıl olarak belirtilmiştir. Yine hayvan modellerinde mezotelyoma gelişimi ve radyasyon arasında ilişki gösterilmiştir.

Goodman ve ark. çeşitli iyonize radyasyon kaynaklarının mezotelyoma ile ilişkisi değerlendirmek için nükleer tesisler ve toraks çekimlerini kapsayan bir derleme yayınlamıştır. Derleme sonucunda iyonize radyasyon ve mezotelyoma güçlü şekilde ilişkilendirilmiştir (66). Yapılan çalışmalarda lenfoma nedeniyle radyoterapi alan hastalarda mezotelyoma dışında yumuşak doku ve kemik sarkomları, tiroid kanseri, meme kanseri ve mide kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Hodgkin lenfoma nedeniyle radyoterapi alan bireylerde mezotelyoma gelişiminin yüksek



olduğu, radyasyona bağlı mezotelyoma gelişen olguların daha genç yaşta oldukları ve ortanca yaşam sũrelerinin daha uzun olduğu saptanmıştır (66).

### **2.6.5. Malign Mezotelyomada Genetik Değişiklikler**

Mezotelyomada, diğer kanserlerde olduğu gibi, asbestin tetiklediği birçok somatik mutasyonu içeren tũmor gelişim sũreci sũz konusudur. Mezotelyomanın genetiğini anlamak erken tanı ile birlikte yeni tedavi seçeneklerini ve kişiye zel tedaviyi sağlayabilir.

### **Genom Dũzeyinde Mezotelyomanın Sitogenetik Karakteristikleri**

Malign plevral mezotelyoma asbest teması ile ilişkili birçok somatik gen mutasyonu içermektedir. Yukarda da anlatıldığı gibi asbestin tetiklediği DNA hasarı insan ve farelerde benzer kromozomal değişiklikler yapmaktadır (67). Mezotelyomanın genetiği altta yatan kompleks genetik anormallikler nedeniyle karışıktır. Tũm genom dũzeyinde kopya varyasyon sıklığı bazı çalışmalarda %55 olarak belirtilmiştir (68).Bu kopya varyasyon sıklığı spesmen başına 1 ile 8 arasında bir değişikliğe yol açmaktadır. Yũksek zũnũrlũklũ komparatif genomik hibridizasyon (CGH) ve spektral karyotipleme içeren bir tũm genom dizileme çalışmasında; 10 genom blgesinde 52 tekrarlayan ve 32 tekrarlamayan homozigot delesyon saptanmıştır (69).Yine bu çalışma sonunda mezotelyomada etkili olduğu dũřũnũlen tũmr supresr genler olan LINGO2, RBFOX1/A2BP1, RPL29, DUSP7 ve CCSR/FAM190A aydınlatılmıştır.

Malign plevral mezotelyomada genomik kayıp, gen kazancı ile benzer sıklıkta hatta daha fazladır (70,71). Bu durum 26 malign mezotelyoma spesmeninde CGH kullanılarak ortaya konulmuştur. Bu çalışmada birey başına kopya sayısı 0 ile 40 arasında idi. Bu durum kũek hũcreli dışı akciğer kanseri ile tersleşir. Kũek hũcreli akciğer kanserinde genom kazancının kaybına belirgin stũnlũđũ vardır (72).Bazı çalışmalarda ailesel mezotelyoma hastaları ile sporadik olgular arasında benzer kopya sayısı değişiklikleri ortaya konmuştur. Bu gen kayıpları tũmor supresr gen blgerini içeren 1p, 6q, 9p, 13q ve 14q alanlarında yoğunlaşmıştır (73).Gen kazançları ise 1q, 5p, 7p, 8q ve 17q alanlarındadır (14).

## **Erken Evre ve Farklı Histolojik Tipteki Mezotelyomada Kromozomal Anormallikler**

Mezotelyomanın farklı histolojik tiplerinde CGH ile saptanan genomik değişiklikler benzerdir. Sarkomatid tip mezotelyomada anöploidi sıklığı düşüktür fakat amplifikasyon sayısı ayırt edici şekilde 4 kat daha fazladır (74). Epitelyal tip malign mezotelyomada başlıca 3p14-21 kaybı görülürken, sarkomatoid ve bifazik mezotelyomada nadiren benzer sapmalar saptanmaktadır (74).

Kromozal dengesizlikler mezotelyoma gelişiminde erken dönemde görülmektedir. CGH kullanılarak araştırılan iki adet erken dönem epitelyal tip mezotelyoma olgusunda; 3p, 5q, 6q, 8p, 15q, 22q ve Y'de kayıp saptanmıştır (75). Bu değişiklikler geç dönem mezotelyomada saptanan kopya sayısı değişiklikleri ile koreledir ve erken dönem genomik instabilitenin mezotelyoma gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir (75).

## **Yaygın DNA Kayıpları ve Teröpatik Anlamlılığı**

### **Kromozom 9 Kaybı ve P16INKA/P14(ARF) Tümör Supresörleri**

En sık görülen DNA kaybı 9. kromozomun kısa kolundadır. CGH kullanılarak değerlendirilen 14 mezotelyoma olgusunda %57 ile en sık görülen kromozom kaybı 9p22-pter'dir (68,71,72). Bu çalışma bu genom bölgesinin tümör oluşumu için önemli olduğunu desteklemektedir (76). Daha önce yapılan morfolojik çalışmalarda 9p21 bölgesinin silinmesinin multinükleus ve hücrenin bölünmesinde aksaklık ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (77). Hücredeki 9p21 kaybı plevral sıvılarda mezotelyoma ve reaktif mezotelyal hücre ayırımına gidilmek için kullanılabilir (77). Asbest teması olan famiyal mezotelyoma olguları üzerinde yapılan bir çalışmada 9p delesyonu tüm mezotelyoma olgularında ve iki aile arasındaki tek ortak değişiklik olarak saptanmıştır (78).

### **3p21.1 kaybı – BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)( BAP1)**

BAP-1 geni, 3p21'de lokalize 729 aminoasitten oluşmaktadır. Bu genin ürünü protein ubiquitin c terminal hidrolaz ailesine aittir. Proteinlerden ubiquitin

ayrılması işlemine katılırlar. Bu enzim BRCA1 associated protein-1'e halka parmak alanı ile bağlanır ve tümör süpresör olarak görev alır. Hücresel süreçler, proliferasyon ve DNA tamir mekanizmasına katılır. Bu gendeki germline mutasyon tümör predispozan sendrom ile ilişkili olup bu sendrom artmış mezotelyoma, uveal melanom, renal hücreli karsinom ve kutanöz melanom riski ile ilişkilidir (79). Mezotelyoma tanılı daha önce erionit veya asbest teması olmayan iki farklı ailede CGH kullanılarak yapılan çalışmada BAP1'in lokalize olduğu 3p21.1'de genetik varyasyon saptanmıştır (17). Başka bir çalışmada 53 mezotelyoma olgusunda %23 oranında BAP-1 mutasyonu saptanmıştır (80).

### **Tümör Süpresör Genler**

Tümör süpresör genler hücre döngüsünde DNA hasarına ve diğer stres faktörlerine cevabı düzenlemektedirler. Tümör süpresör gen kaybı tümör gelişme sürecinde önemli bir basamaktır. Mezotelyoma genelde çok sayıda tümör süpresör gen kaybı ve/veya inaktivasyonu sonucu geliştiğinden heterozigotluğun kaybı mezotelyoma gelişimi için tutarlı görünmektedir (73). 1p, 3p, 6q, 9p, 13q, 15q, ve 22q, p16/CDKN2A, p15/CDKB2B ve 9p21'nin p14ARF'de, FHIT geninin 3p ve nörofibromatöz 2 (NF2) geninin 22q12 kromozom kollarındaki silinmeler tümör süpresör gen odaklarında sık görülmektedir (73,81–84). Epigenetik çalışmalar tümör süpresör gen inaktivasyonun gösterilmesine katkı sağlamaktadır. Mezotelyoma dokusunda ve hücre hattında p16/ CDKN2A promoter hipermetilasyonu gösterilmiştir. Yine 3p21'de lokalize RASSF1A bölgesindeki değişiklikler hücre hattında gösterilmeye adaydır (85,86).

En sık görülen tümör süpresör gen inaktivasyonu olan p53 ve Rb'nin mezotelyomada görülme sıklığı düşünülenin altındadır. Gene de p53 mutasyonu mezotelyoma hücre hatlarında görülmektedir (83, 87). Genel kanı p53 mutasyonunun mezotelyoma gelişimine katkısının düşük olduğu yönündedir (83, 88–90). Ancak p53'deki regülasyon bozukluğunun önemi net bilinmemektedir. p53 hasarlı DNA veya genomik bozukluk gelişirse hücre döngüsünün durdurulması için gereklidir. Velvet ve ark. tarafından oluşturulan modelde; heterozigot p53 sahibi farelerden, işlevsel p53 kaybı olan farelerde tek alel sahibi olanlara göre asbest ile temasta daha agresif ve hızlı mezotelyoma gelişimi saptanmıştır. Bu modelden yola çıkılarak p53

fonksiyonunun p53 yolunu düzenleyicilerde gelişen mutasyonlardan daha fazla etkilendiği söylenebilir (87,91). Bunlar arasında en çok bilinen mekanizmalardan biri p53'ü upregüle eden p14ARF inaktivasyonudur (92).p14ARF kaybı ile MDM2 inhibe edilmez. Bu durumda da MDM2 p53'ü inhibe eder ve apoptozis ve hücre döngüsünün durdurulması engellenir (92).

pRb fonksiyon kaybı p53 kaybı ile benzer özellikler gösterir. p16/CDKN2A pRb regülasyonundan sorumludur ve mutasyona uğrar. Homozigot p16/CDKN2A mutasyonu mezotelyoma olgularının %70'inden fazlasında görülür ve kötü prognoz ile ilişkilidir (15,93).SV 40 virüsünün geniş tümör antijen proteininin p53 ve pRb inaktive edebileceği ortaya atılmıştır.

Tümör hücreleri sadece büyüme odaklı olmayıp, hareketlenme ve yayılma özelliğine sahiptirler. Poulikakos ve ark. nörofibromatöz 2 geninin ürünü olan Merlin proteininin mezotelyoma hücrelerine bu özelliği kattığını öne sürmüştür. İki adet insan mezotelyoma hücre hattında Merlin reekspresyonu sağlandığında bu hücrelerinin anlamlı olarak invazyon ve hareketlilik özelliğinin azaldığı gözlemlenmiştir (94).

Tümör süpresör gen olan BAP1'in, bir çeşit enzim indirgeme özelliği nedeniyle hücre döngüsünü, transkripsiyonu, kromatin dinamiklerini, hücre hasarına cevabı ve hücre büyümesini düzenlemeye katıldığı düşünülmektedir (95). BAP1 genindeki sık mutasyonlar bir çok kanser türünde bildirilmiştir. Bunlar uveal melanom, renal kanser ve malign mezotelyomadır. Nasu ve ark. 22 mezotelyoma olgusunda %60'tan fazla oranda somatik BAP1 mutasyonu saptamıştır. Devamında 70 ek olgu ile bulgusunu doğrulamışlardır (96).On mezotelyoma olgusunun tüm ekzon dizilme çalışmasında BAP-1 gen mutasyon sıklığı %41 saptanmıştır (97).

### **Onkogenler**

Onkogenlerin aktivasyonu ile hücre büyümesi ve proliferasyonu tetiklenmiş olur. AP-1 ve  $\beta$ -catenin transkripsiyon faktörleri malign plevral mezotelyoma gelişiminde rol almaktadır. AP-1 transkripsiyon faktörlerinin çeşitli stimulanlara yanıt olarak aralarında apoptozis, proliferasyon ve transformasyonun da bulunduğu geniş bir sürece aracılık ettiği bilinmektedir (98).AP-1 transkripsiyon faktörü ailesinden

olan Fra-1 mezotelyoma patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Ramos-Nino ve arkadaşları tarafından mezotelyoma hücre hattında yapılan araştırmada; AP-1 DNA bağlayıcı aktivasyonunda ve Fra-1 proteini ekspirasyonunda belirgin artış saptanmıştır (99).

Transkripsiyon faktörü  $\beta$ -catenin ubiquitin ligaz yolu (Wtn) ile kontrol edilmektedir. Net açıklanamamakla beraber transkripsiyon faktörü  $\beta$ -catenin artışı mezotelyoma gelişimi ile ilişkili gibi gözükmetedir. Fakat  $\beta$ -catenin aktivasyonuna yönelik mutasyon saptanmamıştır (100). Buna yönelik  $\beta$ -catenin içinde bulunduğu yolun pozitif yönde düzenleyicisi olan proteinlerdeki mutasyonların bu yönde etkiye yol açabileceği belirtilmiştir. Wtn inhibitör faktör-1, Dickkopf-1, frizzle-ilişkili proteinlerin Wtn sinyal yolunu inhibe ederek benzer etki gösterdiği saptanmıştır (101–103).

### **Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri proliferasyon yollarını hücre membranındaki reseptörlerine bağlanarak stimule edebilir. Tümör invazyonu ve metastazda rol alıyor olabilirler. Liu ve Klominek tarafından mezotelyoma hücre hattında büyüme faktörlerinin kemokinetik ve/veya kemotaktik hareketi arttırdığı gösterilmiştir (104). İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1, Hepatosit Büyüme Faktörü, Fibroblast Büyüme Faktörü, TNF- $\alpha$ , VEGF, Platelet-Derived Büyüme Faktörü A ve B mezotelyoma gelişiminden ve progresyonundan sorumludur.

VEGF anjiogenik bir peptit olup, mezotelyomada bağımsız prognostik faktördür (105). Mezotelyomalı hastaların plevral sıvısındaki miktarı malignensi dışı plevral sıvı nedenlerinden fazla ölçülmektedir (106).İnvitro deneylerde mezotelyoma hücrelerinin büyümesine yol açtığı gösterilmiştir. VEGF ve VEGF-C üretimini inhibe eden antisense-oligonüklotitin mezotelyoma gelişimini yavaşlattığı görülmüştür (107).

Tümör gelişimi ve yayılmasında diğer önemli bir durum olan anjiogenez dolaylı olarak matrix metalloproteaz gen ailesi tarafından yürütülmektedir. Matrix metalloproteaz ailesi sayesinde tümör etrafındaki ekstrasellüler matrixi seyreltir. Bu

durum tümör invazyonu ve migrasyonu için olduğu kadar anjiogenez için de önemlidir (108).

Anjiogenez ve apoptozis direncinde rolü olduğu düşünülen COX-2 mezotelyoma için prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (109).

### **Apoptozis Genleri**

Malign plevral mezotelyoma gelişiminde iki çift intrasellüler apoptozis mediatörü olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki olan BCL-2'nin fazla ekspirasyonun hücreyi apoptozisten koruduğu öne sürülmüştür (89,92,109). İkinci olarak da telomerazın ektopik ekspresyonunun mezotelyoma hücrelerini apoptozisten koruduğu iddia edilmiştir(110).

### **Mezotelyomada Yaygın DNA Kazançları**

Gen kopya sayısı kazançları varsayılan onkogenleri içeren mutasyonlu bölgeleri gösterebilir. Onkojenik fonksiyon kazancı tipik olarak meloküler hedefleme ile tedavi içinde kullanılabilir. Mezotelyomada birçok tekrarlayan bölgede genom kazancı mevcuttur ve mevcut onkogenler ile tedavi hedefleri arasındaki potansiyel ilişki yeni yeni tespit edilmektedir.

En sık kromozom kazancı kopya varyant sayısı tespiti ile yapılan çalışmalarda birinci kromozomun uzun kolunda %33 oranında saptanmıştır. Diğer sık kazanç bölgeleri ise 5p, 6p, 8q, 15q, 17q ve 20'inci kromozomdadır (111).

Kırk iki mezotelyoma tanılı hastanın parafin bloğunda FISH ile yapılan çalışmada 5p15'de %48, 7p12'de %38, 8p24'de %45 oranlarında amplifikasyon saptanmıştır. Sarkomatöz mezotelyoma tanılı hastalarda genetik amplifikasyon varyasyonu eğilimi epitelyal tip mezotelyomaya göre daha sık saptanmıştır (112,113). Kromozom 5p13'de lokalize TERT geninin promoter mutasyonunun mezotelyomaya yol açabileceği gösterilmiştir. Bu gen bölgesi mutasyonu sarkomatöz mezotelyomada sık görülmekte ve CDKN2A geni inaktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (114). Kromozom 7 kazancı epitelyal tip mezotelyomada %19 oranında görülmekle beraber sarkomatöz tip mezotelyomada saptanmamıştır (113).

## **Mezotelyomada Önemli Yolaklar**

### **PI3K/AKT/mTOR Yolağı:**

Fosfatidilinositol3-kinaz (PIK3) yolağı hücrede; hayatta kalma, metabolizma, proliferasyon, apoptozis, büyüme ve hücre migrasyonu ve protein transferi gibi birçok sürece aracılık etmektedir. PI3-kinazlar (fosfoinositid 3-kinaz, PI3-KS) fosfoinositidlerde inositol halkasının 3'OH fosforile edebilen lipid kinazlar ailesidir. İkincil mesajcı olan PIP3 bu reaksiyonun bir ürünüdür. PIP3 AKT'nin plazma membranına translokasyonu ve PDK1 tarafından fosforile edilerek aktive edilmesi için gereklidir (115). Aktive edilmiş AKT hücrenin apoptozisten kurtulmasını ve hücre proliferasyonunu artırıcı sinyaller salar (116). Bu kaskat üzerinde bir düzensizlik geliştiğinde mRNA'sının translasyonu bozulmaktadır. Bu durumda yukarıda belirtilen durumları ve invazyon ile hücre matriksini aşmasını tetiklemektedir (117).

Bu yolak üzerindeki varyasyonlar kanser gibi daha agresif hastalıklara yol açmaktadır. Bu yolak birçok kanserin major hayatta kalma yoludur ve mezotelyoma hücre hatlarında aktif olduğu gösterilmiştir (118).

AKT'nin bu yolak için santral bir görevi mevcut olup; PTEN kaybı veya downregülasyonu ile, PI3K'nın RTK ile otokrin veya parankrin sitümüasyonu ile veya PI3K'nın katalitik veya regülatör subünitelerinin kaybıyla aktive olabilir (119–121).

PTEN PIP3'ü PIP2'ye defosforile ederek PI3K'nın dolaylı olarak da AKT'nin ana negatif regülatörü olarak görev yapmaktadır (122). Bazı çalışmalarda malign mezotelyomada PTEN homozigot delesyonu veya ifadesinde değişiklikler saptanmıştır (123).

### **Ras/Raf/MAPK/MEK Yolağı**

Gen ekspirasyonunu düzenleyen bu yolak hücre yüzeyinde reseptörler ve transkripsiyon faktörleri içermektedir. Bu yolak kanser gelişiminde en bilinen yollardan olup; hücre proliferasyonu, büyümesi ve yaşlanması gibi önemli fonksiyonları içerir (124). Bu gen ailesine yönelik mutasyon sıklığı tüm kanserler

düşünüldüğünde %30 civarındadır (125). Normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında fosforile MAPK ekspirasyonunun malign mezotelyoma hücrelerinde artığı saptanmıştır (126).

## 2.7. Malign Mezotelyomanın Seyri

MPM agresif yapısı ve kemoterapi direnci nedeniyle sınırlı ortanca yaşam süresine sahip olan, küratif tedavi şansı olmayan bir tümördür. MPM tanısı almış, cerrahi şansı olan vakalarda bile ortanca yaşam süresi tanı anından itibaren 14 ay civarındadır (127). Ancak cerrahi planlanacak hastaların genel olarak daha iyi klinik performans durumu ve erken dönem hastalığa ve epitelyal histolojiye sahip olması istenmektedir. Tüm hastalar dikkate alındığında ortanca sağkalım tanı anından itibaren 1 yılın altındadır (128).1990 ve 2006 yılları arasında plörektomi veya ekstraplevral pnömonektomi yapılan 663 hastanın ortanca yaşam süresi; evre 1 hastalıkta 38 ay, evre 2 hastalıkta 19 ay, evre 3 hastalıkta 11 ay ve evre 4 hastalıkta 7 ay olarak saptanmıştır (127).

Hastaların büyük bir çoğunluğu ileri evre tümör nedeniyle multimodal tedavi seçeneklerine uygun değildir. Bu nedenle bir çok hasta kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Kemoterapi alan hastalarda tek ajan ile tedavi gören bireylerde kombine tedavi gören bireylere göre belirgin sağ kalım farkı mevcuttur. Tek ajan ile kemoterapi gören bireylerde ortanca yaşam süresi 9 ay iken, kombine kemoterapi gören hastalarda ortanca yaşam süresi 11.8–12.4 ay arasındadır. Bu hastalarda evre 1–2’de kemoterapi ile destek tedavisi arasında belirgin fark saptanmamışken, evre 3-4 hastalarda anlamlı fark saptanmıştır (129,130).

Erken evre epitelyal histolojiye sahip komorbiditesi olmayan hastalarda multimodal tedavi planlanabilir. Multimodal tedavi kemoterapi – cerrahi ve radyoterapi kombinasyonunu kapsamaktadır. Multimodal tedavi alan evre 1 – 2 hastalarda ortanca yaşam süresi 33,8 ay iken, evre 3-4 hastalarda 10 aydır (131,132).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan malzeme, kimyasal ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

##### 3.1.1 Cihazlar

- HiSeq 2500 Next Generation Sequencing Platform (illumina)
- C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- T100 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Thermal Block (Biosan)
- Benchmixer BV1000 (Benchmark)
- Vortex FVL 2400N (Biosan)
- MN 090 Kabin (Nüve)
- Microplate SealerALPS 25 (Thermo Scientific)
- Qubit 3.0 Fluorometer (Qubit)
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
- Eppendorf Research Plus Pipette (2 µl, 10 µl, 100µl, 200 µl, 1000 µl) (Sigma Aldrich)

##### 3.1.2 Kimyasallar

- HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot (illumina)
- Illumina HiSeq SBS Kit v4 and HiSeq Cluster Kits v4 (illumina)
- TruSeq Nano DNA(illumina)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher)
- Agencourt AMPure XP PCR Purification Kit (Beckman Coulter)

### 3.1.3. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılacak kan numuneleri 5 mL'lik EDTA'lı tüplerde saklanmıştır. Kan numunelerinden DNA izolasyonu için ticari kitler kullanılmıştır. Bu amaçla, Genomic DNA Isolation Kit'i (Norgen, Cat. 24700) kullanılmıştır. Çalışma protokolü için üretici firma talimatları takip edilmiştir.

Bunun için, 150 µl kan örneği 1.5 ml mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. Hücre yıkımı için 300 µl Digestion Buffer çözeltisi eklenmiştir. Ardından 12 µl Proteinase K enzimi eklenmiştir. 1 saat boyunca 55 C<sup>0</sup>'de mixer üzerinde örnekler karıştırılmıştır. Süre sonunda 300 µl Buffer SK eklenmiştir. Karıştırma sonrasında 300 µl %70 EtOH eklenmiş ve vortex ile karıştırılmıştır. DNA örneklerini ayırmak amacıyla 600 µl'lik örnekler Spin Column'a yüklenmiş ve 5200 G'de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda toplanan sıvı atılmıştır. Kolonun yıkanması için 2 defa olmak üzere 300 µl Wash Buffer A, kolona yüklenmiştir. Sonrasında 5200 G'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Son basamakta kolonların üst kısımlarına 200 µl Elution Buffer eklenmiş ve bağlanması için oda sıcaklığında 3 dakika beklenmiştir. Sonrasında 14000 G'de santrifüj gerçekleştirilmiştir. Toplanan sıvı yeni 1.5 mL'lik mikrofüj tüplere aktarılmış ve sonraki basamaklar kullanılmıştır.

## 3.2. Tüm Genom Dizileme Yöntemi

### 3.2.1. Tüm Genom Dizileme

Tüm genom dizileme yöntemi, yakın zamanda kullanımı artan, biyolojik materyaller içindeki kalıtım materyallerinin (DNA, RNA) okunmasını sağlayan bir genetik analiz yöntemidir. Bireyin genetik özelliklerinin (varyantların, indel ve SNP'lerinin) tüm genom seviyesinde tespit edilmesine olanak tanımaktadır. Kullanılan teknolojiler gereği yüksek veri üretmekte ve klasik yöntemlere göre daha düşük hata oranı içermektedir. Aynı zamanda yüksek veri çıktısı sağladığı için büyük boyutlu hedeflerin (ökaryotik tüm genom) dizilenmesine olanak sağlamaktadır. Gerçekleştirilen yöntemde bu amaçla illumina HiSeq 2500 modeli yeni nesil dizileme platformu (illumina) kullanılmıştır. Bu platformlarda gerçekleştirilen çalışmalar temelde 4 basamakta gerçekleştirilmektedir.

- Örnek Hazırlama (Kalite Kontrol)
- Kütüphane Hazırlama
- Dizileme
- Biyoinformatik Analiz

### 3.2.2 Örnek Hazırlama ve Kalite Kontrol

Yeni nesil dizileme çalışmalarında, yüksek saflıkta ve fragmente olmamış DNA ile çalışılması büyük önem taşımaktadır. Numune kalitesindeki olası kimyasal kontaminasyonlar ve kullanılan DNA numunesinin yapısal bütünlüğü çalışma sonrasında elde edilecek sonuçların niteliğini ve veri miktarını değiştirmektedir. Bu sebeple çalışmada kullanılan DNA numuneleri farklı kalite kontrol basamaklarından geçirilmiştir. İlk basamakta, DNA numuneleri %5'lik jel elektroforezinde yürütülmüştür. Çalışma sonunda jel üzerinde, smear oranı düşük çıkmış, 10Kb+ bölgede tek yoğun bir bant tespit edilmiştir. Jel görüntüleri temel alınarak yapısal bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. Sonrasındaki basamakta, DNA'nın kimyasal/protein kontaminasyonunun tespiti için Nanodrop spektrofotometresi (Nanodrop 2000c) kullanılmıştır. Nanodrop spektrofotometresi, çok küçük hacimdeki numunelerdeki DNA'nın konsantrasyonunu ve protein/kimyasal kontaminasyonunun tespit edilmesini sağlar. Tespit işlemi, belli dalga boylarındaki ışık paketlerinin numune üzerine gönderilmesi ile gerçekleştirilir. Gönderilen ışık paketlerinin ne kadarının örnek tarafından soğurulduğu ile bağlantılı olarak örnekteki DNA konsantrasyonunun ölçümünü gerçekleştirir. Nanodrop DNA'ları tespit etmek için 260 nm dalga boyundaki ışığı kullanır. Protein, fenol bileşik ve RNA'ları tespit etmek için 230 nm ve 280 nm dalga boyundaki ışıkları kullanır. 260/280 ve 230/260 oranları örnekteki kontaminasyon oranını vermektedir. Bu çalışma sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu değerleri istenen seviyelerde (>50 ng/μl) ve kontaminasyonun göz ardı edilebilir seviyede olduğu (260/280= ~1.80, 260/280= ~2.00) görülmüştür.

Tablo 3.1 On bireyden elde edilen DNA’da Nanodrop Sonuçları.

Numune	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Kons.</b> <b>(ng/μl)</b>	156. 3	176. 2	155. 2	103. 2	198. 3	177. 7	161. 1	162. 1	198. 2	198. 2
<b>260/280</b>	1.77	1.90	1.88	1.80	1.81	1.70	1.70	1.78	1.67	1.88
<b>260/230</b>	1.90	1.80	1.91	1.92	1.89	1.87	1.80	1.87	1.88	1.78

Nanodrop sonrasındaki çalışmalarda dsDNA’ların gerçek konsantrasyonunun tespiti için Qubit Florometresi kullanılmıştır. Qubit florometresi fragmente olan nükleotitler yerine sadece dsDNA özellikteki DNA’ların konsantrasyonlarının tespiti için kullanılmaktadır. Bunun için sadece dsDNA özellikteki DNA’ya bağlanan özel florofor boyalar kullanılmaktadır. Bu boyalar DNA’ya bağlandığı durumda florofor özelliği kazanır ve floresans altında ışığa gerçekleştirir. Işıma miktarı ile DNA miktarının orantılı olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmalarda tüm numunelerin gerçek konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bu çalışma sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu değerlerinin istenen seviyelerde (>50 ng/μl) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.2 On bireyden elde edilen DNA’da Qubit Ölçüm Sonuçları.

Numune	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Kons.</b> <b>(ng/μl)</b>	71. 3	83. 3	72. 3	55. 2	78. 3	90. 2	81. 1	80. 0	81. 2	80. 9

Tüm örneklerin kalite kontrollerinden geçmesi sebebiyle, ek bir saflaştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmadan sonraki basamağa geçilmiştir.

### 3.2.3 Kütüphane Hazırlama

Kütüphane hazırlama basamağında, kullanılan örneklerin yeni nesil dizileme platformuna uygun hale getirilmesi gerçekleştirilmektedir. Çalışma kapsamında, kütüphane hazırlama basamağında “illumina TruSeq Nano DNA” kit kullanılmıştır. Bu aşamada sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmektedir.

- Fragmentasyon: Kromozomal yapıda olan büyük DNA fragmanlarının daha küçük parçalara (300-600 nt) getirilmesi.
- Saflaştırma: Parçalama sonrasındaki aşırı büyük ve aşırı küçük boyuttaki DNA fragmanlarının elenmesi. Aynı zamanda enzim ve diğer kimyasalların ortamdan uzaklaştırılması.
- Adaptör Eklenmesi: Dizileme sonrasında örneklerin birbirinden ayırt edilmesini sağlayacak DNA parçalarının (index) ve DNA örneklerinin dizileme çipine bağlanmasını sağlayacak DNA parçalarının eklenmesi.
- Saflaştırma: Bağlanmayan adaptörlerin ve enzimlerin ortamdan uzaklaştırılması.
- Normalizasyon: Örneklerin aynı konsantrasyona getirilmesi, kalite kontrollerinin gerçekleştirilmesi ve cihazda dizilemeye uygun hale getirilmesi.

#### Fragmentasyon

İzole edilmiş genomik DNA genellikle yeni nesil dizileme platformlarının okuma uzunluklarından (~500 bp) daha büyük fragmanlar halinde bulunur. Büyük DNA parçalarının daha kısa parçalara dönüştürülmesi için fragmentasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu işlem, enzimatik veya mekanik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Enzimatik yöntemlerde fragmentaz, endonükleaz veya transpozaz gibi oligonükleotit zincirinin kırılmasına neden olan enzimler kullanılmaktadır. Mekanik yöntemlerin başında ise sonikatör yer almaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan cihazlardan biri Covaris'tir. Covaris, tek bir noktaya yoğunlaştırılmış yüksek frekansta ses uygulayarak büyük DNA parçalarının daha küçük parçalara kırılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan illumina TruSeq Nano DNA kitinde fragmentasyon amacıyla mekanik kesim tercih

edilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada da bu sebeple Covaris sonikatörü kullanılmıştır.

Öncelikle genomik DNA örnekleri aynı konsantrasyona gelecek şekilde normalize edilmiştir. Bu normalizasyon basamaklarında gerçekleştirilen son Qubit ölçümleri esas alınmıştır. Başlangıç DNA miktarı olarak örnek başı 200 ng DNA 52.5 µl steril su içerisinde hazırlanmıştır. Örnekler hazırlandıktan sonra üretici firma tarafından sağlanan Covaris tüplerine aktarılmıştır ve aşağıdaki parametreler kullanılarak sonikasyon gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA'nın fragmentasyonu sonucunda 350 bp ile 500 bp uzunluk arasında DNA fragmanlarının oluşması beklenmiştir.

Tablo 3.3Covaris sonikatörü çalışma özellikleri.

Covaris Setting	M220	S220	S2	E210
Duty Factor (%)	20	5	10	
Intensity	-	-	2.0	
Peak/Displayed Power (W)	50	175	9	7
Cycles/Burst	200			
Duration (seconds)	45	25	45	
Mode	-	Frequency sweeping		
Temperature (°C)	20	5.5 – 6		

### **Safılaştırma**

Safılaştırma sonrasında, solüsyon içerisinde kalan çok küçük veya çok büyük DNA fragmanlarından ve enzim, tampon çözelti gibi kimyasallardan arındırmak amacıyla temizleme basamağı gerçekleştirilmiştir. Bu basamakta kit tarafından sağlanan manyetik boncuklar (Sample Purification Buffer) kullanılmaktadır. Bu amaçla her bir fragmente örneğe 80 µl SPB eklenerek karıştırılmıştır. Ardından örnekler manyetik plate üzerine yerleştirilerek DNA bağı boncukların çökmesi sağlanmıştır. Sonrasında boncuklar %70 EtOH çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır ve sonrasında kurumaya bırakılmıştır. Bu boncuklar özellikle belirli boyuttaki DNA'lara bağlanmaktadır. Yıkama sonrasında DNA bağı boncukların DNA'dan ayrılması için elüsyon tampon çözeltisi kullanılmıştır. Son solüsyon ile karıştırıldığında, DNA ile boncuklar bağlanmakta ve manyetik alan içerisinde çökelti oluşturmaktadır. Süpernatantın atılması ve takiben DNA'nın boncuklardan elüsyonu sonucunda enzim, kimyasal ve diğer kontaminantlardan safılaştırılmış DNA elde edilmiştir.

### **Adaptör Eklenmesi**

Dizileme basamağı öncesinde her bir numunenin cihaz tarafından tanınması ve cihaz içinde yer alan çipe (flowcell) bağlanması için fragmente durumdaki DNA'ların uç kısımlarına adaptör denilen oligonükleotitlerin takılması gereklidir. Bu oligonükleotitler, hem örneğe has barkod dizilerini içermekte hem de flowcell'de gömülü olarak bağı bulunan oligonükleotitlere bağlanacak DNA dizilerini içermektedir. Dizileme sırasında, tüm verilerden her bir numuneye ait verilerin ayrıştırılması (demultiplexing) bu barkod dizilerdeki farklılıklara göre gerçekleştirilir. Adaptör ekleme işlemlerinde, öncelikle fragmente durumdaki DNA'ların uç kısımlarının tamiri gerçekleştirilir. Bu tamir işleminde Taq polimeraz kullanılır. Tamir sonrasında, ligaz enzimi kullanılarak adaptör dizileri, fragmente DNA'lara eklenir. Çalışmada bu amaçla ERP2 solüsyonu kullanılmıştır. Uygulama sırasında, fragmente edilmiş ve safılaştırılmış tüm örneklere 60 µl ERP2 eklenmiştir. Karıştırma sonrasında, Thermal Block üzerinde, şu programa göre PCR işlemi gerçekleştirilmiştir: ilk olarak elde edilen karışımlar 30 °C'de 30 dk

bekletilmiştir, Heated Lid:On-100°C, 4°C’de sonlandırılmıştır. Çalışma sonrasında, elde edilen örnekler overnight boyunca +4°C’de bekletilmiştir.

### **Fragman Zenginleştirme**

Bu bağlanmayı gerçekleştiren fragmanları zenginleştirmek için PCR işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde, primerler adaptör bölgelere bağlanacak şekilde çoğaltma işlemi uygulanır. Bu işlemlerden sonra, ortamda kalan enzim ve diğer kontaminantları uzaklaştırmak için saflaştırma işlemi uygulanır. Saflaştırma işlemi için yine manyetik boncuklar (Sample Purification Buffer) kullanılmaktadır. Bu amaçla her bir adaptör eklenmiş fragmente örnek için 160 µl SPB eklenerek mixer ile karıştırılmıştır. Ardından örnekler manyetik plate üzerine yerleştirilerek DNA bağlı boncuklar çöktürülmüştür. Sonrasında boncuklar 200 µl’lik %80 EtOH çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır ve sonrasında 10 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Bu boncuklar özellikle belirli boyuttaki DNA’lara bağlanmaktadır. Yıkama sonrasında DNA bağlı boncukların DNA’dan ayrıştırılması için elüsyon tampon çözeltisi kullanılmıştır. Son solüsyon ile karıştırıldığında, DNA ile boncuklar bağlanmakta ve manyetik alan içerisinde çökelti oluşturmaktadır. Süpernatantın atılması ve takiben DNA’ın boncuklardan elüsyonu sonucunda saflaştırılmış DNA elde edilmiştir.

### **Adenilasyon**

Fragmente edilen DNA örneklerinin uç kısımlarına indexlerin eklenmesi için uç kısımlarına overhang şekilde duracak şekilde Adenin nükleotidi eklenmiştir. Bu amaçla ATL kimyasalı kullanılmıştır. Her bir örneğe 12.5 µl ATL eklenmiş ve takip eden thermal block programı kullanılmıştır: Heated lid: On-100°C, 37°C 30 dakika, 70°C 5 dakika, 4°C dakika programı ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **Adaptör Ligasyonu**

Adenilasyon işlemi sonrasında bu DNA fragmanlarına adaptörlerin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2.5 µl adaptör, 2.5 µl ligase (LIG2) ve 30 µl örnek karıştırılmıştır ve takip eden thermal block programı kullanılmıştır:



Heated lid: On-100°C, 30°C 10 dakika. Çalışma sonunda bağlanmayan adaptörlerin ortamdan uzaklaştırılması için pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **Saflaştırma**

Her bir örnek için 80 µl SPB eklenerek mixer ile karıştırılmıştır. Ardından örnekler manyetik plate üzerine yerleştirilerek çöktürülmüştür. Manyetik boncuklar 200 µl'lik %80 EtOH çözeltisi ile 3 defa yıkanmıştır ve sonrasında 15 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Son elüsyon solüsyonu ile karıştırıldığında, DNA ile boncuklar arasındaki bağ kopmakta ve manyetik boncuklardan ayrılıp çözeltilmeye geçmektedir. Süpernatantın alınması ve takiben DNA'nın boncukların atılması sonucunda saflaştırılmış DNA elde edilmiştir.

### **Zenginleştirme**

Bu basamakta, adaptör bağlanmış DNA fragmanlarının PCR ile zenginleştirilmesi seçici olarak gerçekleştirilmektedir. PCR ile zenginleştirilen DNA fragmanları sadece her iki yönünde de adaptöre bağlı olan örneklerdir. PCR çalışmasında, adaptörlere karşılık gelen dizilere sahip primer karışımı kullanılmaktadır. PCR'daki döngü sayısı için üretici protokolü temel alınmıştır. Kullanılan Thermal block programı şu şekildedir: 95°C dakika, 8 döngü boyunca: 98°C'te 20 saniye, 60°C'te saniye, 72°C'te 30 saniye, 72°C'te 5 dakika, 4°C son bekleme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

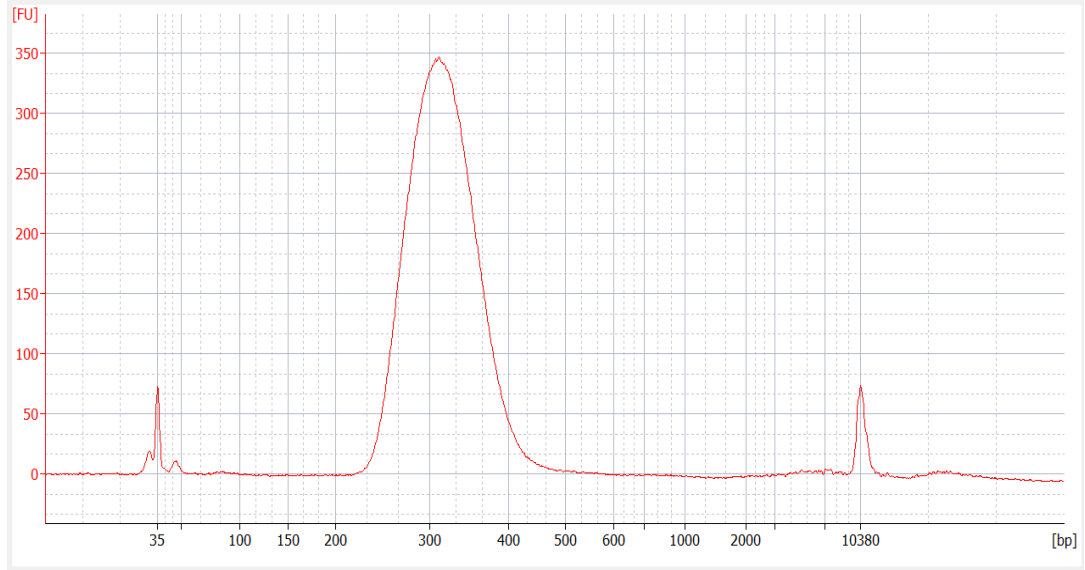
### **Normalizasyon**

Dizileme platformları, konsantrasyon açısından çok dar aralıktaki bir örnek grubu ile çalışılabilir. Gereğinden yüksek veya düşük konsantrasyondaki DNA'lar, veri kaybına neden olabilir. Ayrıca, numuneler arasında da konsantrasyon açısından bir eşitlik olması, sonuçların karşılaştırılabilirliği açısından önemlidir. DNA konsantrasyonlarının eşitlenmesi için Qubit florometresi kullanılmıştır. Qubit ile ölçülen her bir numune ardından 1.80 pM olacak şekilde seyreltilmiş, ardından tüm örnekler birleştirilmiştir. İlk yapılan ölçümler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.4. Normalizasyon basamağında örneklerin ölçüm sonuçları.

Numune	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kons. (ng/ $\mu$ l)	13.2	10. 4	11. 1	8.3	7.7	14. 0	11. 1	13. 0	11. 2	8.9

Elde edilen fragmanların boyut dağılımlarını belirlemek için örneklerin Bioanalyzer çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama, yüksek çözünürlüklü bir jel elektroforezine benzemektedir. Bu ölçümlerde, örnek içinde hangi boyuttaki DNA'dan ne oranda olduğu tespit edilebilmektedir. Çalışmada bu amaçla, Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer cihazı ile birlikte High Sensitivity DNA chip kullanılmıştır. Aşağıdaki grafikte son basamaktaki bir örneğin fragman boyu dağılımı görülmektedir.



Şekil 3.1 Son basamaktaki bir örneğin fragman boyu dağılımı grafiği.

### 3.2.4. Dizileme

Çalışmanın dizileme süreci, illumina HiSeq 2500 yeni nesil dizileme platformu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Illumina tarafından kullanılan Solexa

dizileme yönteminde, DNA fragmanları öncelikle flowcell adı verilen çipler üzerine yerleştirilmekte ve yerleştiği bölgede yüksek doğrulukta sinyal vermek için bölgesel olarak çoğaltılmaktadır (bridge-amplification) ve bunun sonucunda flowcell üzerinde milyonlarca fragman kümeleri (cluster) oluşmaktadır. Flowcell üzerinde oluşan fragman kümeleri, her bir döngüde 1 baz okunacak şekilde dizilenmektedir. Illumina tarafından geliştirilen “Sequencing-by-Synthesis” yöntemi ile her döngüde, DNA fragmanları 2 farklı boya ile işaretlenmiş 4 farklı dinükleotide maruz bırakılmaktadır. Her bir döngüde, uygun dinükleotitin bağlanmasını takiben floresans kamera ile o kümenin görseli alınmaktadır. Her bir kümeden gelen görseller birleştirilmekte ve sonuçta ilgili kümelerin ışımaya karakterlerinden nükleotit dizileri çıkarılmaktadır.

### 3.2.5. Biyoinformatik Analiz

#### Fastq Oluşturulması

Çalışma sonunda, HiSeq 2500 dizileme platformu okuma verileri, \*.bcl formatında oluşturulmaktadır. Bu dosyalar, DNA kümelerinin flow-cell üzerindeki konum ve ID'lerini, ışımaya parametrelerini içermektedir. Bu verilerden Bc12fastq v.2.1 (illumina) programı kullanılarak \*.fastq dosyaları elde edilmiştir. Fastq verileri, genellikle nükleotit olmak üzere biyolojik dizilerin kaydını ve bu kayıtlara ilişkin kalite parametrelerini içermektedir. Her bir dizi ve kalite verisi, ASCII formatındaki bir kod ile ilişkilendirilmiştir. Aşağıda örnek bir fastq verisi sunulmaktadır.

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCA
CAGTTT
+
!'*( ((( (**+)) %%%++) (%%%) .1***-
+*'' ) **55CCF>>>>>CCCCCCC65
```

Şekil 3.2 örnek bir fastq verisi.

Bu verinin ilk kısmında @ ile gösterilen kısmı ilgili okumanın adını ve ID bilgilerini içermektedir. Eğer çalışma paired-end bir çalışma ise bu kısımda okumanın eşinin bilgileri de yer alır. Hemen altında A, T, C ve G ile adlandırılan kısımlarda ise okunan bölgenin nükleotit karşılıkları yer almaktadır. Okunan bölgedeki dizi bilgisini vermektedir. Daha alt kısmında yer alan kodlar ise üst kısımda iletilen ve karşılığı olan dizilerin okunma kalitelerini iletmektedir. Her bir karakter bir kalite skoru ile eşleştirilmiştir.

Fastq verileri oluşturulduktan sonra bu veriler içerdiği index verilerine göre farklı örneklere ayrıştırılmıştır (Demultiplexing). Yeni nesil dizileme çalışmalarında, tüm örnekler kütüphane hazırlama çalışmalarından sonra tek bir tüpte cihaza verilmektedir. Aynı şekilde flow-cell üzerinde tüm örnekler aynı anda karışık olarak dizilenmektedir. Veriler üretilirken, farklı örnekler birbirlerinden ayrıştırılırken dizilerin uç kısmındaki index adı verilen 8 nükleotitten oluşan diziler kullanılmaktadır. Çalışma öncesinde hangi örneğe hangi index dizisinin ekleneceği belirlenir, çalışma sonrasında da veriler üzerinden ayıklama bu index dizileri üzerinden gerçekleştirilir. Çalışma sonunda tespit edilen okuma sayıları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.5 Örneklerde gerçekleştirilen okuma sayıları.

No :	Toplam Okuma	Toplam Veri (Mb)	Ortalama Okuma Derinliği	Referans Genoma Hizalanan Oran	% $\geq$ 30X Okuma Oranı
1	795 236 884	119 285	41.7	95.2	84.4
2	745 327 342	111 799	39.1	95.2	78.4
3	783 491 608	117 523	41.1	95.3	85.2
4	799 022 580	119 853	41.9	95.2	84.6
5	788 943 698	118 341	41.4	95.3	83.8
6	788 134 576	118 220	41.4	95.8	86.9
7	789 291 572	118 393	41.4	95.6	86.7
8	759 296 250	113 894	39.8	95.3	80.3
9	784 504 324	117 675	41.2	94.9	82.8
10	895 834 418	134 375	47.0	95.0	90.0

### Kalite Kontrol Basamakları

Kalite kontrol işlemleri, ham fastq verilerinin incelenerek dizileme çalışmasının etkinliğini ölçmede kullanılır. Okuma kalitelerinin ölçülmesinde Phred kalite skorlama, yeni nesil dizileme çalışmaları sonrasında standart olarak uygulanan bir yöntemdir. Skorlama ilk önce İnsan Genom Projesi kapsamında kullanılmaya başlanmıştır. Phred skorları, dizileme çalışmalarında her bir baza atanan bir kalite parametresidir. Phred skoru, okuma yapılırken hatalı veri çekme ihtimalinin (P) ters logaritmik olarak hesaplanması ile belirlenir. Hata ihtimali düştükçe Phred skoru artar. Aşağıda belirtilen formülle hesaplanır.

$$Q = - 10 \log_{10} P$$

Genel olarak Phred skorunun denk geldiği durumlar ve açıklamaları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Analiz çalışmalarında minimum Q30'un üzerindeki okumalar kullanılmaktadır.

Tablo 3.6 Phred skorunun denk geldiği durumlar ve açıklamaları.

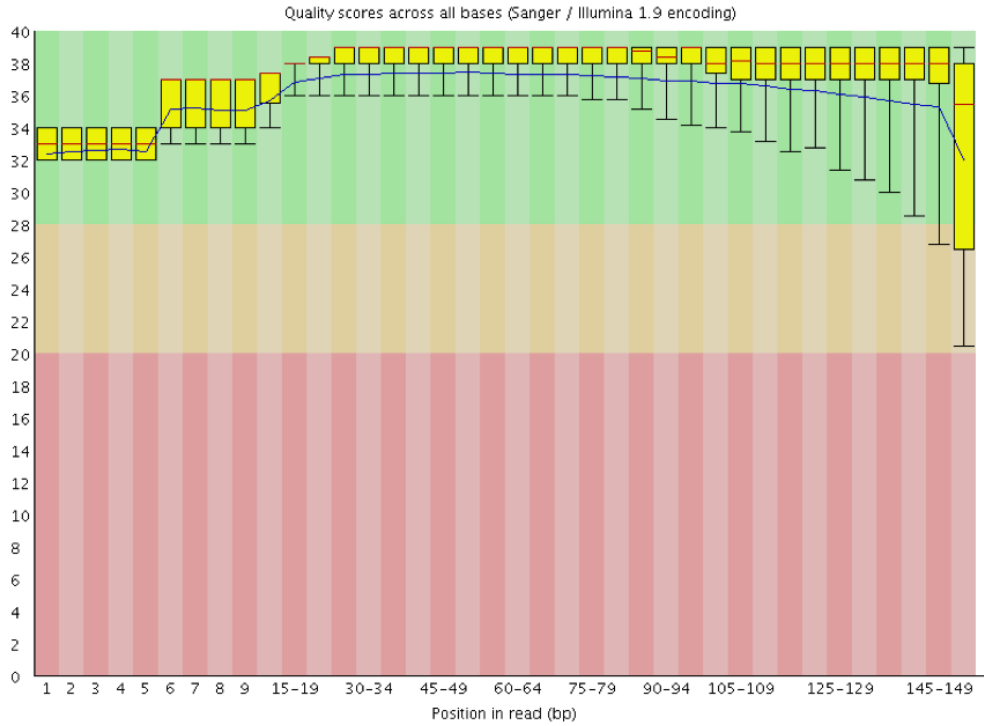
Phred Kalite Skoru	Yanlış Okuma Oranı	Okuma Doğruluğu
10	1 in 10	%90
20	1 in 100	%99
30	1 in 1000	%99.9
40	1 in 10,000	%99.99
50	1 in 100,000	%99.999
60	1 in 1,000,000	%99.9999

Elde edilen Phred (Q) skorları, çalışmada üretilen verilerin ne kadar güvenilir olduğunu göstermektedir. Böylelikle, çalışmada yaşanan herhangi bir sorun ve olası sebepleri hakkında bilgi edinilmiş olur. Çalışmada bu amaçla

FASTQC programı ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk)) kullanılmıştır. Aşağıdaki grafikte, FASTQC programının çıktısı yer almaktadır. Grafiğin sol kısmında kalite skorları, alt kısmında ise okunan nükleotitlerin okuma içindeki pozisyonları belirtilmektedir.

### Okuma Filtreleri & Trimming

Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki bazı okumaları, sonraki analiz basamaklarında yalancı pozitif sonuçlara neden olmaması için, okumalardan çıkarılmaktadır. Yeni nesil dizileme çalışmalarında, bazı durumlarda okumaların baş ve son kısımlarında düşük kalitede okumalar veya tekrarlı okumalar (GGGGG, AAAA...) yer alabilmektedir. Bu tür okumaların sonraki basamakları etkilememesi için, bu kısımların filtrelenmesi gerçekleştirilmiştir. Kalite filtreleri ve kesim işlemleri için Trimmomatic uygulaması (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanılmıştır. Bu uygulamada Phred skoru Q20'den az olan sıralı nükleotitler okumalardan kırılmıştır. Aynı zamanda okuma uzunluğu 50 nükleotitten kısa olan okumalar da verilerden çıkarılmıştır.



Şekil 3.3 Tek bireyde Trimmomatic uygulaması örneği.

## **Hizalama**

Çalışma kapsamında, her bir örnek için tüm genomdan toplamda 750 - 800 milyon okuma elde edilmiştir. Bu okumaların genom üzerinde hangi bölgelere denk geldiğinin belirlenmesi için hizalama (alignment) işlemi gerçekleştirilmiştir. Düzeltelen ham dizi verilerinin insan genomuna hizalanmasında Burrows-Wheeler Aligner (v.0.7.12) programı kullanılmıştır. Bu program, yeni nesil dizileme platformundan elde edilen yaklaşık 150 bp'lik okumaları insan genom referans dizisine hizalanmasında kullanılmıştır. Çalışmada referans genom olarak hg19, GRCh37 kullanılmıştır.

Sonrasında, insersiyon ve delesyon (indel) içeren bölgelerdeki hizalamaların uygun hale getirilmesi ve olası yalancı pozitif varyantların elenmesi için bölgesel-hizalama (local realignment) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bu amaçla GATK IndelRealigner v3.3.0 kullanılmıştır. Birleştirme ve hizalama sonrasında GATK (v3.3.0) uygulaması kullanılarak tekrarlı okumaların filtrelenmesiyle okuma sayısı optimizasyonu, baz kalite rekabibrasyonu gerçekleştirilmiştir.

## **Varyantların Belirlenmesi**

Hizalanmış verilerden, bireydeki mutasyonların tespit edilmesi için son basamakta, GATK (Unified Genotyper) kullanılmıştır. Bu uygulama, hizalanmış okumalarda tek nokta varyantlarının ve indellerin tespitini sağlamaktadır. Çalışmada referans dizi ile (hg19, GRCh37) olan farklılıklar çıkarılmıştır. Tüm genom çalışmalarında toplamda 3-4 milyon varyant ve indel tespit edilmiştir.

## **Varyantların Anotasyonu ve Filtrelenmesi**

Çalışmada tespit edilen mutasyonların anotasyonu (tanımlanması) amacıyla farklı uygulamalar kullanılmıştır. Bu amaçla Variant Studio (v.1.2, illumina), Variant Tools (v.3.24) ve CLC Genomics Workbench uygulamalarına yer verilmiştir. Bu uygulamalar sonucunda her bir varyanta ait şu bilgiler tanımlanmıştır:

Varyantın konumu, bulunduğu gen, gen içerisindeki konumu (ekzonik, intronik, UTR, intergenic), kodlayan bölge içindeki pozisyonu, hangi ekzon veya intron içinde yer aldığı, varyantın tipi (indel, snp), yol açtığı etki (missense, nonsense, frameshift, intronic, feature\_elongation), farklı popülasyonlarda ve projelerde (EUR, 1000G, ExAC) görülme sıklığı, klinik veritabanlarında (ClinVar, COSMIC, OMIM) kayıtları, in silico algoritmalarla birlikte varyantın vereceği olası hasarlar belirlenmiştir.

Varyantlar belirlendikten sonra aşağıdaki parametreler göz önüne alınarak ek filtrelemeler gerçekleştirilmiştir.

- Popülasyonda %1 ve altında görülenler (ve frekans verisi olmayanlar),
- Protein kodlayan genler içinde yer alanlar
- On bireyin onunda da görülme

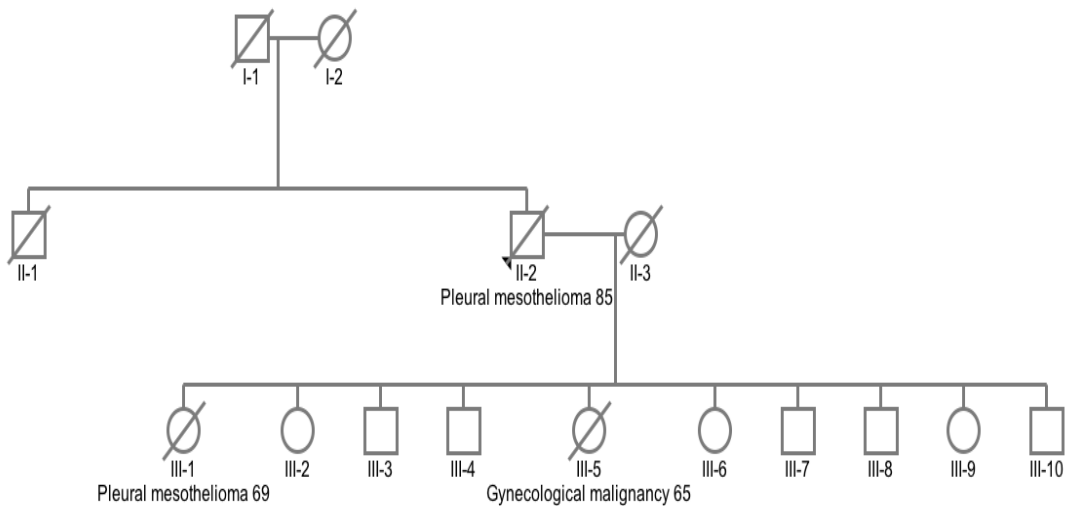


## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışmada Yer Alan Aileler

#### 4.1.1. A Ailesi

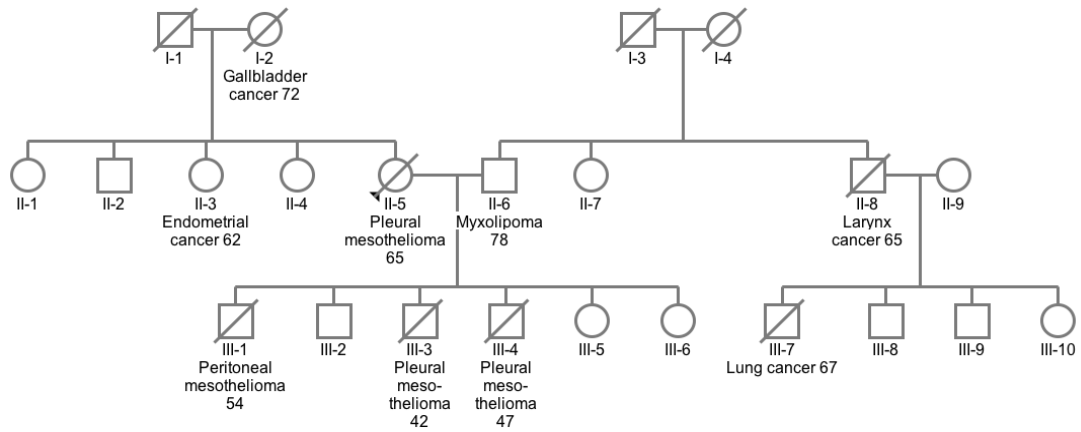
Bu aile Batı Anadolu'da Eskişehir'e bağlı Çifteler ilçesi Kadıkuyusu Köyü'nde yaşamaktadır. Bu ailenin 2 bireyi malign plevral mezotelyoma ve 1 bireyi jinekolojik maligniteye bağlı hayatını kaybetmiştir. İndeks vaka 84 yıl çevresel asbest temasına maruz kalmış olup, çiftçilik ve hayvancılıkla uğraşmıştır. 85 yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı alan hasta; ileri yaşı ve düşük performansı nedeniyle iyi destek tedavisine alınmış ve 8 ay yaşamıştır. İndeks vakanın annesi, babası ve erkek kardeşi doğal yollardan ölmüştür. Bu bireylerin indeks vaka gibi benzer çevresel asbest teması mevcuttur. İndeks vakanın 10 çocuğu olup en büyük kızının (III-1) 17 yıl çevresel asbest teması vardır. Altmış yedi yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı almıştır. Birinci basamak kemoterapi altında progresyon saptanan hasta tanıdan 4 ay sonra hayatını kaybetmiştir. Ortanca kızı (III-5) 65 yaşında jinekolojik malignite nedeniyle hayatını kaybetmiştir. İndeks vakanın diğer 8 çocuğu sağlıklı ve hayattadır.



Şekil 4.1 A ailesinin soy ağacı

#### 4.1.2. B Ailesi

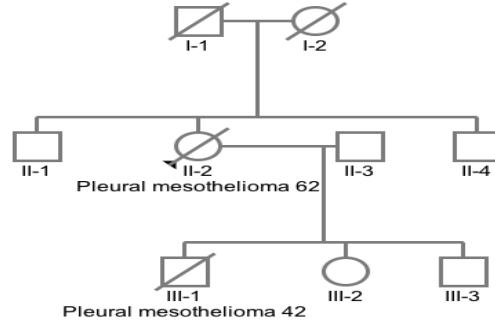
Bu aile İç Ege'de Kütahya'ya bağlı Çalca Köyü'nde yaşamaktadır. Bu ailenin 4 bireyinde malign plevral mezotelyoma, 1 bireyinde larenks kanseri, 1 bireyinde safra kesesi kanseri, 1 bireyinde akciğer kanseri ve 1 bireyinde ise mikslipoma gelişmiştir. İndeks vaka çiftçilik ve hayvancılık ile uğraşmış olup, 41 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. Malign mezotelyoma tanısı 65 yaşında konan vaka birinci ve ikinci basamak kemoterapiden yarar görmemiştir. Tanı anından itibaren 12 ay sonra 66 yaşında hayatını kaybetmiştir. İndeks vakanın babası 72 yaşında safra kesesi kanseri nedeniyle ölmüştür. Annesi doğal yollardan ölmüştür. Ortanca kız kardeşi endometrial kanser tanılı olup hayattadır. Diğer 3 kız ve 1 erkek kardeşi sağlıklı ve hayattadır. İndeks vakanın 3 erkek çocuğu (III-1, III-3, III-4) çevresel asbest teması sonrası sırası ile 52, 42 ve 47 yaşında ilki malign peritoneal 2. ve 3.'sü plevral mezotelyoma tanısı almıştır. III-1 çiftçilikle uğraşmış olup, 10 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. Bu hasta 31 ay yaşamış, 50 yaşında hayatını kaybetmiştir. III-3 memur olarak çalışmış olup 15 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. Trimodal tedavi altında 21 ay yaşayan hasta 44 yaşında hayatını kaybetmiştir. III-4 işçi olarak çalışmış olup, 5 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. Üç basamak kemoterapi alan hasta tanı anından itibaren 24 ay sonra 49 yaşında hayatını kaybetmiştir. Diğer erkek (III-2) ve iki kız (III-5 ve III-6) kardeş hayatta ve sağlıklıdırlar. İndeks vakanın eşi (II-6) 78 yaşında olup mikslipoma gelişmiştir ve cerrahi sonrası hayattadır. İndeks vakanın eşinin abisi (II-8) larenks kanseri nedeniyle 65 yaşında hayatını kaybetmiş olup, bu kişinin erkek çocuğu da 67 (III-7) yaşında akciğer kanseri nedeniyle kaybedilmiştir.



Şekil 4.2 B ailesinin soyağacı

#### 4.1.3. C Ailesi

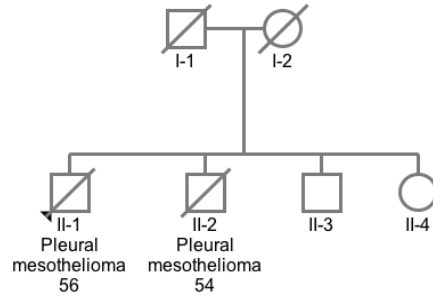
Bu aile İç Ege’de Kütahya’ya bağlı Göven köyünde yaşamaktadır. Bu ailenin iki bireyi malign plevral mezotelyoma nedeniyle ölmüştür. İndeks vaka yaşadığı köyde hayvancılık ve çiftçilik yapmıştır. Bu hastanın 50 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. 61 yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı alan hasta 1. basamak kemoterapi sonrası takibe alınmıştır. Takip sonrası progresyon saptanan hasta tanı anından itibaren 15 ay yaşamış ve 63 yaşında ölmüştür. İndeks vakanın annesi ve babası doğal yollardan ölmüştür. İki erkek kardeşi hayat olup sağlıklıdır. Bu bireylerin de yaşadıkları köylerinde çevresel asbest teması mevcuttur. İndeks vakanın eşi hayatta olup sağlıklıdır. İndeks vakanın ilk çocuğunun (III-3) 11 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. İşçi olarak çalışan hastanın iş yerinde asbest teması yoktur. Bu hasta 40 yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı alıp birinci basamak kemoterapi sonrası stabil hastalık olarak kabul edilmiştir. Takipte progresyon saptanan hastaya aynı rejim ile kemoterapi başlanmış olup yarar görmemiştir. Tanıdan 20 ay sonra 42 yaşında ölmüştür. İndeks vakanın sağlıklı bir kız çocuğu (III-2) ve bir erkek çocuğu daha bulunmaktadır (III-3).



Şekil 4.3 C ailesinin soyağacı.

#### 4.1.4. D Ailesi

Bu aile Marmara'da Bilecik-Bozüyük'e bağlı Seyitömer Köyünde yaşamaktadır. Bu ailenin 2 bireyi malign plevral mezotelyoma nedeniyle ölmüştür. İndeks vaka işçi olarak çalışmış olup 40 yıl çevresel asbest teması mevcuttur. Bu vaka 56 yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı almış ve trimodal tedavi uygulanmıştır. Takipte nüks saptanan hastaya ikinci basamak kemoterapi verilmiş ancak yanıt alınamamıştır. Hasta 16 ay sonra 58 yaşında ölmüştür. İndeks vakanın annesi ve babası doğal yollardan ölmüştür. İndeks vakanın abisi (II-2) kendisi gibi işçi olup, 20 yıl çevresel asbest temasına maruz kalmış, 54 yaşında malign plevral mezotelyoma tanısı almış, iki basamak kemoterapi verilmiş ve 24 ay sonra 56 yaşında iken ölmüştür. İndeks vakanın kardeşleri (II-3 ve II-4) hala hayatta olup sağlıklıdırlar. Bu bireylerin de ailenin geri kalanına benzer şekilde çevresel asbest teması mevcuttur.



Şekil 4.4 D ailesinin soyağacı.

Tablo 4.1. Çalışmada yer alan ailelerin demografik bilgileri

	Olgular	Cinsiyet	Tam Anındaki Yaşı(y)	Kanser	MM Histolojik Tip	Asbest teması süresi	Mesleği-yaşam süresi,
A ailesi	II-2	M	84	Plevral Mezotelyoma	Tipsiz	Çevresel / 84 y	Çiftçi / 8 ay
	III-1	F	69	Plevral Mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel/ 17 y	Çiftçi / 4 ay
	III-5	F	65	Jinekolojik malignensi	/	/	/
B ailesi	I-2	F	72	Safra Kesesi Kanseri	/	/	/
	II-3	F	62	Endometriyal Kanser	/	/	/
	II-5	F	65	Plevral Mezotelyoma	/	Çevresel / 41 y	Çiftçi
	II-6	M	78	Mikslipoma	/	/	/
	II-8	M	65	LarenksKanseri	/	/	/
	III-1	M	54	Peritoneal Mezotelyoma	/	Çevresel / 10 y	Çiftçi
	III-3	M	42	Plevral Mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel / 15 y	Memur
	III-4	M	47	Plevral mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel / 5y	Çiftçi
	III-7	M	67	Akciğer kanseri	/	/	/
C Ailesi	II-2	F	62	Plevral Mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel / 50 y	Çiftçi
	III-3	M	42	Plevral Mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel / 11 y	İşçi
D Ailesi	II-1	M	56	Plevral Mezotelyoma	Mixed	Çevresel / 40 y	İşçi
	II-2	M	54	Plevral Mezotelyoma	Epitelyal	Çevresel / 20 y	İşçi

**F, Kadın; M; Erkek; MM; Malign Mezotelyoma, y; Yıllar**

Filtreleme işlemlerinden sonra toplamda 8622 varyant elde edilmiştir. Bunların 6537 tanesi SNP özellikte; 1046 tanesi insersiyon özellikte, kalan 1027 tanesi delesyon özelliktedir.

Elde edilen sonuçlar 1000Genom ve dbSNP veritabanları kullanılarak on bireyde ortak olan gen mutasyonları filtrelendi. Bu filtreden sonra geriye kalan varyantlardaki populasyonda çok nadir görülen ve hasar verici gen mutasyonları seçildi. Toplamda on beş kromozomda, otuz yedi gen üzerinde yüz yirmi varyant saptandı.

Aşağıdaki tabloda filtreleme sonrasında tespit edilen varyantların ağırlıklı olarak hangi genlerde bulunduğu listelenmiştir.

Tablo 4.2.Filtreleme sonrasında tespit edilen varyantların ağırlıklı olarak bulunduğu genler.

<b>Gen</b>	<b>Varyant Sayısı</b>
RAD17	18
BRD8	18
GRM1	16
ITGB6	7
HLA-DRB1	5
INTS7	5

Kromozom 1’de üç gende on iki kompleks, bir gende üç insersiyon ve başka bir gende bir delesyon saptandı. Kromozom X’de 1 delesyon mevcuttu. Kromozom 2’de iki gende sekiz delesyon, diğer bir gende bir baz değişimi saptandı. Kromozom 3’de farklı iki gende bir insersiyon ve bir delesyon saptandı. Kromozom 5’de iki gende yedi delesyon, bir gende iki baz değişimi, bir gende 18 insersiyon ve bir gende on iki kompleks mutasyon saptandı. Kromozom 6’da üç gende sekiz baz değişimi, üç gende yirmi kompleks ve bir gende dört delesyon saptandı. Kromozom 7’de bir gende

iki baz değişimi saptandı. Kromozom 8’de farklı genlerde birer adet baz değişimi ve kompleks mutasyon saptandı. Kromozom 9’da bir gende iki baz değişimi mevcuttu. Kromozom 10’da farklı iki gende birer adet baz değişimi ve kompleks mutasyon saptandı. Kromozom 11’de bir gende delesyon ve bir gende 2 adet kompleks mutasyon saptandı. Kromozom 12’de 1 adet kompleks mutasyon saptandı. Kromozom 14’de farklı genlerde bir adet kompleks ve bir adet insersiyon mutasyon saptandı. Kromozom 19’da bir adet baz değişimi saptandı. Kromozom 20’de farklı genlerde birer adet baz değişimi ve delesyon saptandı. Kromozom 21’de bir adet delesyon saptandı. Kromozom 22’de bir gende 2 adet baz değişimi saptandı.

Tablo 4.3. Saptanan varyantların listesi.

Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Referans	Variant Aleli	Variant Tipi	Gen Bölgesi
chrX	118603961	118603962	CT	C	Deletion	SLC25A5
chr1	78034156	78034159	CAAA	CA	Complex	ZZZ3
chr1	78034156	78034159	CAAA	CA	Complex	ZZZ3
chr1	92944314	92944314	C	CAGAGAG	Insertion	GFI1
chr1	92944314	92944314	C	CAGAGAG	Insertion	GFI1
chr1	92944314	92944314	C	CAGAGAG	Insertion	GFI1
chr1	109377157	109377159	TAA	TA	Complex	AKNAD1
chr1	159897681	159897683	TAA	TA	Complex	IGSF9
chr1	159897681	159897683	TAA	TA	Complex	IGSF9
chr1	159897681	159897684	TAAA	TAA	Complex	IGSF9
chr1	159897681	159897684	TAAA	TAA	Complex	IGSF9
chr1	161192845	161192857	CCACACACA CACA	C	Deletion	APOA2
chr1	212142054	212142056	GAA	GA	Complex	INTS7
chr1	212142054	212142056	GAA	GA	Complex	INTS7

Tablo 4.3. ‘Devam’ Saptanan varyantların listesi.

Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Referans	Variant Aleli	Variant Tipi	Gen bölgesi
chr1	212142054	212142056	GAA	GA	Complex	INTS7
chr1	212142054	212142056	GAA	GA	Complex	INTS7
chr1	212142054	212142056	GAA	GA	Complex	INTS7
chr2	95511183	95511185	ACG	ACA	Substitution	ANKRD20A8P
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	160958349	160958351	GAA	G	Deletion	ITGB6
chr2	179616770	179616772	GAA	G	Deletion	TTN
chr3	111873902	111873902	T	TA	Insertion	SLC9C1
chr3	130447530	130447532	TAA	TAAA	Complex	PIK3R4
chr5	7868313	7868315	GAA	G	Deletion	FASTKD3
chr5	57754003	57754005	ACG	ACA	Substitution	PLK2
chr5	57754003	57754005	ACG	ACA	Substitution	PLK2
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17



Tablo 4.3. ‘Devam’ Saptanan varyantların listesi.

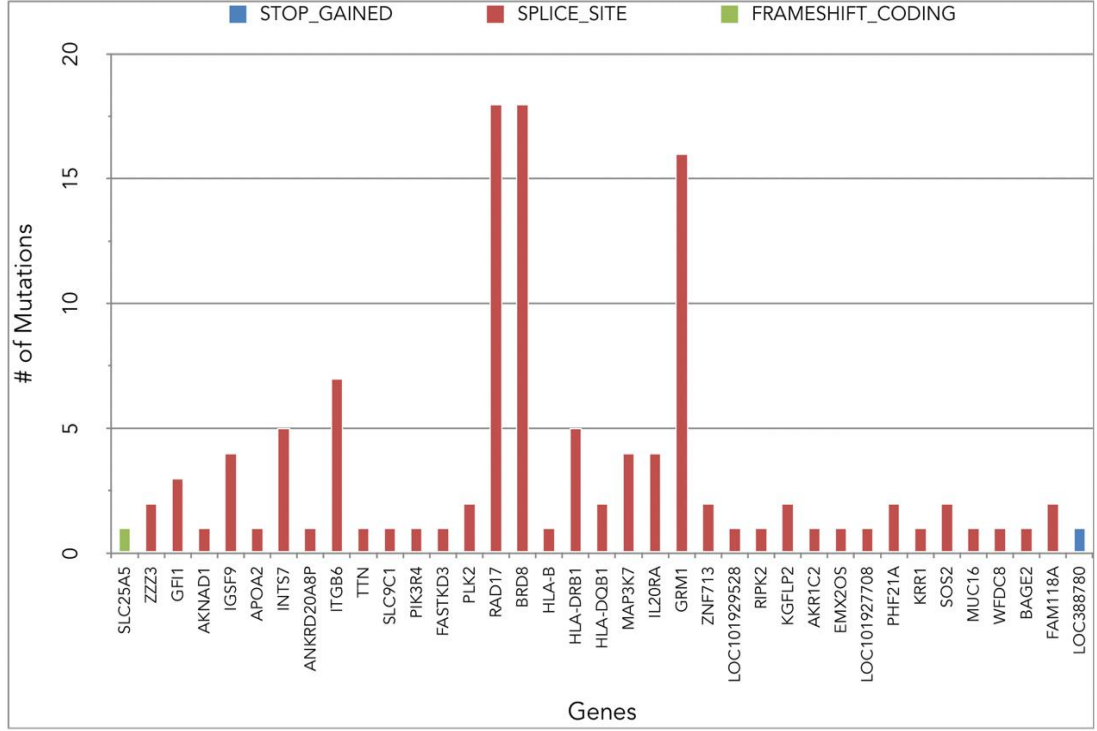
Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Referans	Variant Aleli	Variant Tipi	Gen bölgesi
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	68692375	68692375	T	TAA	Insertion	RAD17
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507107	TAAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	T	Deletion	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr5	137507104	137507106	TAA	TA	Complex	BRD8
chr6	31324741	31324743	GTG	GCC	Substitution	HLA-B
chr6	32548513	32548515	GGC	GAC	Substitution	HLA-DRB1
chr6	32548513	32548515	GGC	GAC	Substitution	HLA-DRB1
chr6	32551877	32551879	CAT	CGC	Substitution	HLA-DRB1
chr6	32551877	32551879	CAT	CGC	Substitution	HLA-DRB1

Tablo 4.3. ‘Devam’ Saptanan varyantların listesi.

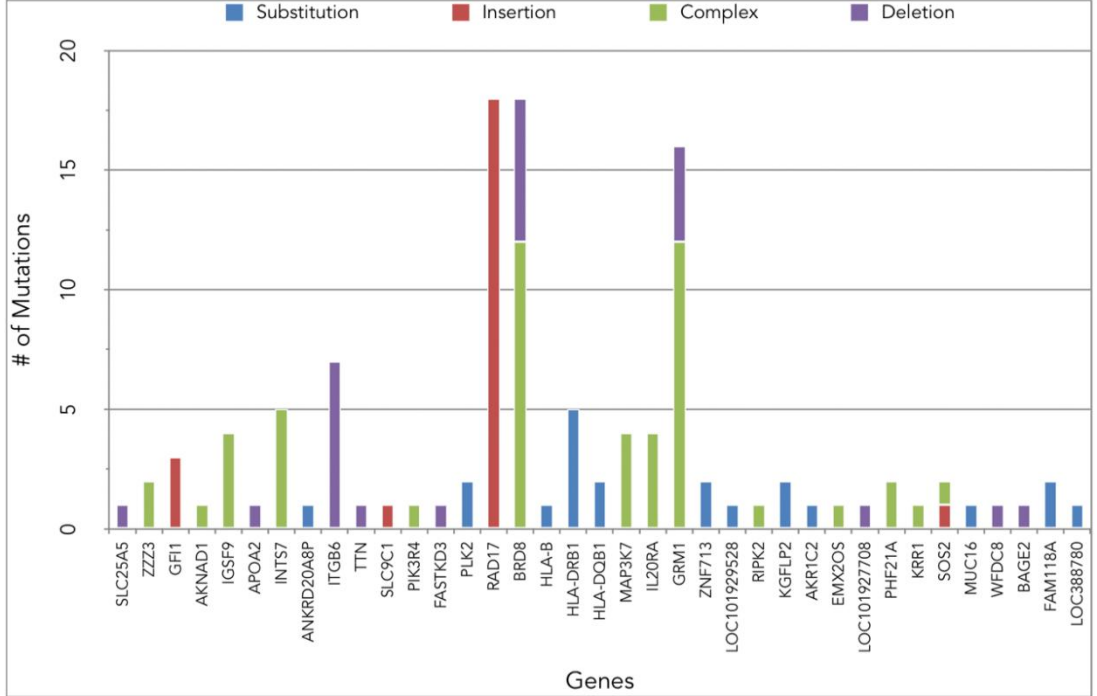
Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Referans	Variant Aleli	Variant Tipi	Gen bölgesi
chr6	32552132	32552132	T	A	Substitution	HLA-DRB1
chr6	32629238	32629240	AAG	AGA	Substitution	HLA-DQB1
chr6	32629238	32629240	AAG	AGA	Substitution	HLA-DQB1
chr6	91266349	91266350	TA	TAA	Complex	MAP3K7
chr6	91266349	91266350	TA	TAA	Complex	MAP3K7
chr6	91266349	91266350	TA	TAA	Complex	MAP3K7
chr6	91266349	91266350	TA	TAA	Complex	MAP3K7
chr6	137325901	137325904	TAAA	TA	Complex	IL20RA
chr6	137325901	137325904	TAAA	TA	Complex	IL20RA
chr6	137325901	137325904	TAAA	TA	Complex	IL20RA
chr6	137325901	137325904	TAAA	TA	Complex	IL20RA
chr6	146480740	146480748	TTCTCTCTC	TTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480748	TTCTCTCTC	TTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480748	TTCTCTCTC	TTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480748	TTCTCTCTC	TTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	T	Deletion	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	T	Deletion	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	T	Deletion	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	T	Deletion	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	TTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	TTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	TTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480744	TTCTC	TTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480750	TTCTCTCTCTC	TTCTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480750	TTCTCTCTCTC	TTCTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480750	TTCTCTCTCTC	TTCTCTCTC	Complex	GRM1
chr6	146480740	146480750	TTCTCTCTCTC	TTCTCTCTC	Complex	GRM1
chr7	55991291	55991293	TGT	TAC	Substitution	ZNF713
chr7	55991291	55991293	TGT	TAT	Substitution	ZNF713

Tablo 4.3. ‘Devam’ Saptanan varyantların listesi.

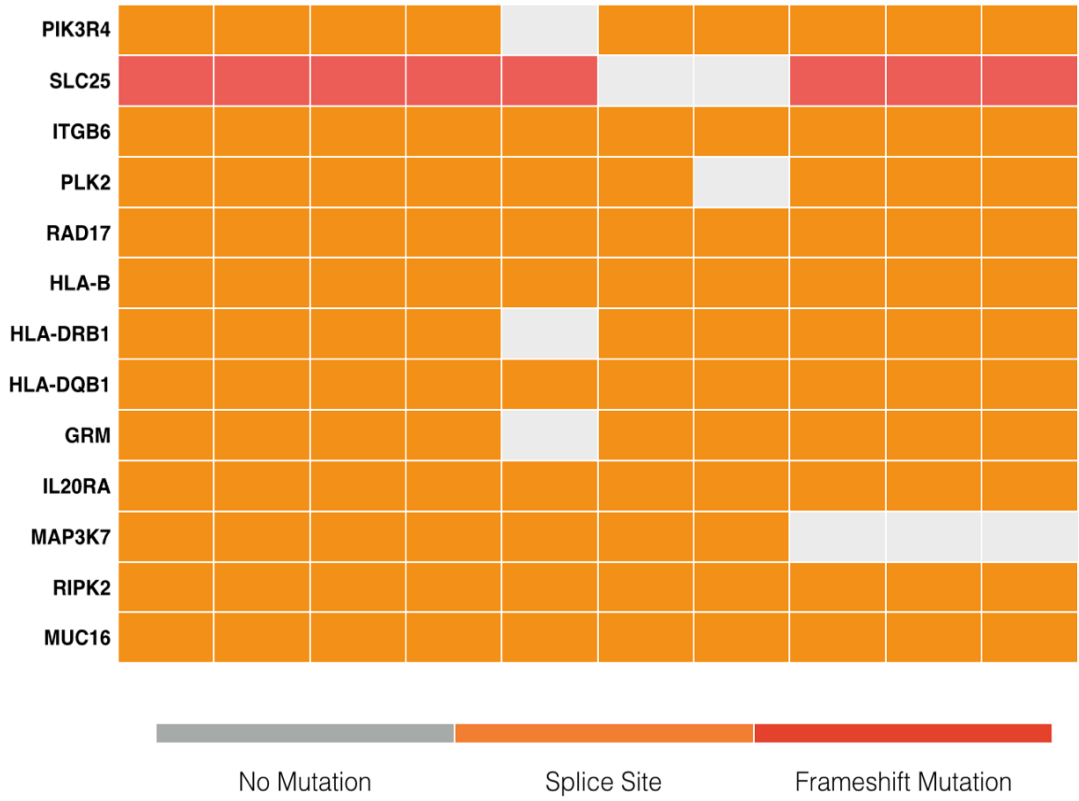
Kromozom	Başlangıç	Bitiş	Referans	Variant Aleli	Variant Tipi	Gen bölgesi
chr8	59173074	59173076	TTA	TTT	Substitution	LOC101929528
chr8	90796369	90796373	TAAAA	TA	Complex	RIPK2
chr9	41962752	41962757	TGAAAC	TAAAAC	Substitution	KGFLP2
chr9	41962752	41962756	TGAAA	TAAAA	Substitution	KGFLP2
chr10	5049593	5049595	ACG	AGG	Substitution	AKR1C2
chr10	119303891	119303893	TAA	TA	Complex	EMX2OS
chr11	3529633	3529636	TAAA	T	Deletion	LOC101927708
chr11	45957292	45957294	TAA	TA	Complex	PHF21A
chr11	45957292	45957294	TAA	TA	Complex	PHF21A
chr12	75900396	75900398	CAA	CA	Complex	KRR1
chr14	50585573	50585574	TC	TCA	Complex	SOS2
chr14	50585574	50585574	C	CAA	Insertion	SOS2
chr19	8999381	8999386	CAACTA	CAGCTG	Substitution	MUC16
chr20	44180256	44180259	CAAA	C	Deletion	WFDC8
chr21	11098676	11098696	CTCCTACC ACTCCAGC CGCCA	C	Deletion	BAGE
chr22	45723946	45723948	TAT	TGT	Substitution	FAM118A
chr22	45723946	45723948	TAT	TGT	Substitution	FAM118A
chr20	2187942	2187944	CGC	CTT	Substitution	LOC388780



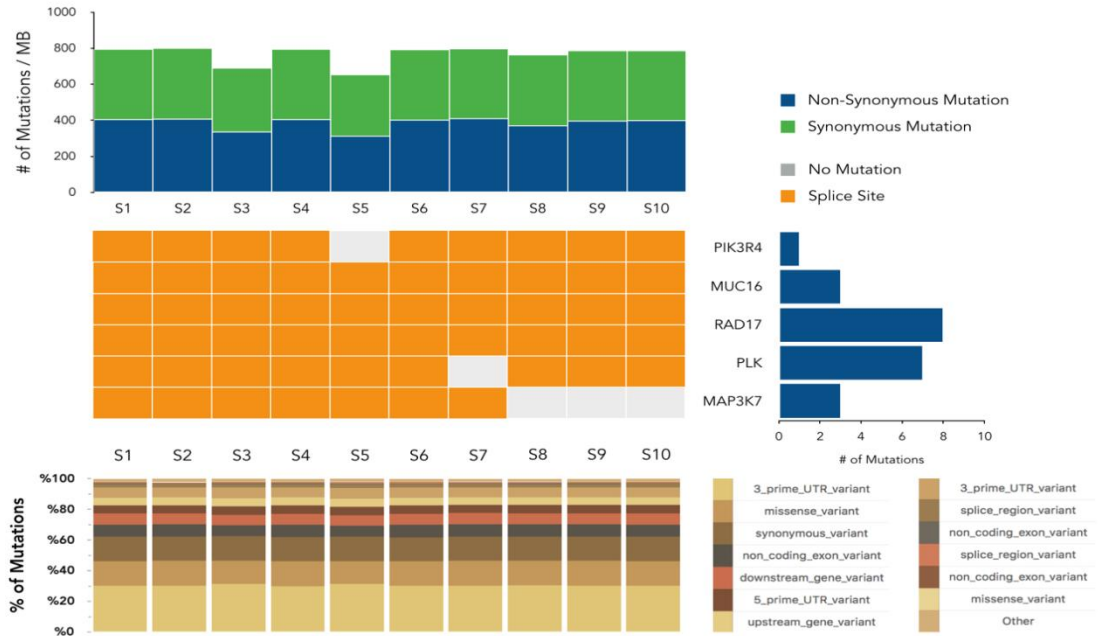
Şekil 4.5. Genlerde saptanan baz düzeyinde varyant çeşitleri ve hangi tip mutasyona yol açtığını gösteren grafik.



Şekil 4.6. Genlerde saptanan mutasyonların çeşidi.



Şekil 4.7. Kanser gelişimi ve yolları ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar ve mutasyon sonuçları



Şekil 4.8. On bireyde gözlenen ortak gen mutasyon çeşitleri.

Kromozom 1 üzerindeki on iki kompleks mutasyonun iki tanesi *ZZZ3* geni üzerinde saptandı. *ZZZ3* geninin ürünü olan protein ATAC kompleksinin bir parçasıdır. H3 ve H4 histon proteinleri üzerinde etkili histon asetiltransferaz kompleksle beraber çalışır. Kromatin düzenlenmesinde etkilidir ve kromatin bağlamaktan sorumludur (133, 134). Beş tane kompleks mutasyon ise *INTS7* geni üzerinde saptanmıştır. Bu gen integratör kompleksin subünitesini kodlar. İntegratör kompleks RNA polimeraz 2'nin C terminal ucu ile ilişkili olup, snRNA'nın U1-U2 3' sonlanım noktasına aracılık eder. Bu genin ürünü protein gen ifadesini ve RNA Polimeraz II Transkripsiyon başlatma - Promoter belirlemeyi düzenler (135, 136). Dört tane kompleks mutasyon *IGSF9* üzerinde saptanmıştır. Bu genin ürünü hücre hücre adhezyonunda etkin olup protein bağlanmasını düzenler. Özellikle dentritlerin büyümesinde ve sinaps maturasyonunda görev alır (136–138). Bir adet kompleks mutasyon ise *AKNAD1* geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü protein AT-hook-containing transcription factor içinde bulunan bir alan içerir (139). Üç adet insersiyon mutasyonu *GFI1* geninde saptanmıştır. Bu gen transkripsiyon regresör olarak görev yapan nükleer çinko parmak protein sentezler. Bu protein; hematoposis ve onkogenez de dahil olmak üzere çok çeşitli gelişimsel süreçlerde önemli bir rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar otozomal dominant ciddi konjenital nötropeniye ve yetişkinin dominant nonimmün kronik idiyopatik nötropenisine yol açar. bu hastalar lösemi ve infeksiyonlara yatkındırlar (140–142). Bir delesyon ise *APOA2* geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü protein hemodimerizasyonu ve lipid bağlanması ile ilişkilidir. PPAR sinyal yolağı ve lipoprotein metabolizmasında görev alır. Ailesel hiperkolesterolemi ve *aapoa2* amiloidozis bu gen mutasyonu ile ilişkilidir (143–145).

Kromozom X üzerinde bir adet delesyon *SLC25A5* geni üzerinde saptanmış olup bu mutasyon çerçeve kaymasına yol açmıştır. Bu gen ailesi soluble taşıyıcı protein ailesinin bir alt grubu olup, mitokondriyal taşıyıcı ailesine aittir. Bu genin ürünü ADP'nin hücre içinden mitokondriyal matrikse geçişine, ATP'nin ise tersi istikamette mitokondriyal matriksten hücre içine geçişine izin veren bir kapı görevi üstlenir. Bu genin baskılanmasının tümör büyümesini ve apoptozisin tetiklenmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ca sinyal yolağı ve cGMP-PKG sinyal yolağında etkin rol

oynamaktadır. Bu genin mutasyonu Sendromik olmayan zihinsel engellik ve Oksifilik adenoma ile ilişkilidir (146–149).

Kromozom 2’de 7 adet delesyon ITGB6 geni üzerinde saptanmıştır. Bu genin üyesi integrin süper ailesinin bir parçasıdır. Bu ailenin üyeleri ekstrasellüler matriksten hücre içine sinyal taşıyan adhezyon reseptörleridir. Mutasyonu Amelogenesis imperfecta tip 4’e yol açmaktadır. Pulmoner amfizem ve fibrozis ile ilişkilendirilmiştir (150–153). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde fazla ifade edildiği de bildirilmiştir (154). Bir delesyon ise TTN 1 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü titindir. Titin Z bandını M bandına bağlar. Aynı zamanda kromozomlar için yapısal bir proteindir. Mitoz sırasında kromozomal yoğunlaşma ve ayrılmada kritik görev alır. TTN’deki mutasyonlar dilate kardiyomiyopati, tip 1 ve hipertrofik kardiyomiyopati ile ilişkilidir (155–158). Bir adet baz değişimi ANKRD20A8P geninde saptanmıştır.

Kromozom 3’de bir adet insersiyon SLC9C1 geninde saptanmıştır. Bu gen Na-H exchanger ailesinin bir üyesidir. Erkek fertilitesi ve sperm hareketliliği için gereklidir (159). Bir kompleks mutasyon ise PIK3R4 geninde saptanmıştır. Bu gen otofaji düzenlenmesi ve PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkilidir. PI3-kinazlar (fosfoinositid 3-kinaz, PI3-KS) fosfoinositidlerde inositol halkasının 3 'OH fosforile edebilen lipid kinazlar ailesidir. Bu gen ailesi hücre çoğalması ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarının koordinasyonundan sorumludur (160).

Kromozom 5’te bir delesyon FASFKD3 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünlerinin bazıları apoptoziste rol alır. Bazıları ise mitokondriyal solunum ve translasyon bileşenleri ile etkileşim içindedir (161). Altı delesyon ve 12 kompleks mutasyon BRD8 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü tiroid hormon reseptörü ile ligand bağımlı şekilde etkileşim halindedir. Tiroid yanıt elemanlarının tiroit hormonuna bağlı aktivasyonunu artırır. Hormon-aktive nükleer reseptörler tarafından aktive edilmiş transkripsiyon sırasında ko-aktivatör olarak görev alıyor olabilir. İzofom 1 ve 2 NuA4 histon açıltransferaz kompleksinin bir bileşenidir. Bu kompleks nükleozomal histon H2A ve H4’ ü asetilleyerek seçili genin transkripsiyonel olarak aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Bu kompleks onkogen ve proto-onkogen aracılı büyüme indüksiyonu, tümör baskılayıcı kaynaklı büyüme

durması ve replikatif yaşlanma, apoptozi, ve DNA onarımı ile ilgili transkripsiyonel programların aktivasyonu için gereklidir (162,163). İki adet baz eklenmesi mutasyonu PLK2 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü serin/threonin protein kinaz polo ailesinin bir üyesidir ve normal hücre bölünmesinde rol alır. Testis, dalak ve fetal hücrelerde sık ifade edildiğinden hızlı hücre bölünmesinden sorumlu olduğu iddia edilmektedir (164). On sekiz adet insersiyon mutasyonu ise RAD17 geninde saptanmıştır. Bu gen hücre döngüsü kontrol genidir ve genin ürünü DNA'daki hasara yanıt olarak hücre döngüsünü durdurur ve DNA tamirine yönelir. Hücre büyümesinin sürdürülmesi için esas olup, kromazomal kararlılık ve DNA hasarında ATR-bağımlı kontrol noktası aktivasyonu sağlar. DNA replikasyonunun ilerlemesi için sensör görevi yapar. Homolog rekombinasyona katılır. Gen mutasyonlarının ataksi-telenjektazi ve seminoma yol açtığı gösterilmiştir (165–167).

Kromozom 6'da beş baz değişimi HLA-DRB1 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü HLA sınıf 2 beta zincirine aittir. Ekstrasellüler proteinlerden peptid derivelerini sunarak immün sistem için merkezi bir rol alır. Sınıf 2 moleküller antijen sunucu hücreler tarafından ifade edilir (168). Sarkoidoz, multiple skleroz, romatoid artrit yatıklılık artar (169–171). Bir baz değişimi HLA-B geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü HLA sınıf 1 ağır zincire aittir. Sınıf 1 moleküller endoplazmik retikulum lümeninden peptid derivelerini sunarak immün sistemde merkezi bir rol üstlenir (172). Bu gen hücre adezyon molekülleri ve allogreft rejeksiyon yollarında görev alır (173). Bu genin mutasyonları Behçet hastalığı, Takayasu artrit, spondiloartropati, karbamazepinin tetiklediği hipersensitivite sendromuna yol açabilir (174–176). İki baz değişimi ise HLA-DQB1 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü HLA-DRB1 ile benzer olarak HLA sınıf 2 beta zincirine aittir. Ekstrasellüler proteinlerden peptid derivelerini sunarak immün sistem için merkezi bir rol alır. Sınıf 2 moleküller antijen sunucu hücreler tarafından ifade edilir. Bu genin mutasyonu çölyak hastalığı, multiple skleroz ve creutzfeldt-jakob hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (177,178). On iki kompleks ve dört delesyon tipi mutasyon GRM1 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü metabotropik glutamat reseptörü olup fosfolipaz c'yi etkinleştirerek işlevlerini yerine getirir (179). L-glutamat santral sinir sistemindeki baskın eksitatör nörotransmitterdir. Hem inotropik hem de metabotropik glutamat reseptörlerini aktive eder. Endotelin-1/EDNRA sinyal yolağı ve kalsiyum sinyal



yolağı ile ilişkilidir (180). Bu gen mutasyonlarında spinoserebral ataksi ve kondromiksoid fibroma görülebilir (181,182). Dört kompleks mutasyon MAP3K7 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü serin/threonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Transkripsiyon regülasyonu ve apoptozis dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonların kontrolünde görev alır. Aynı zamanda çevresel streslere hücrel tepkinin düzenlenmesinde görev alır (183). Dört kompleks mutasyon ise IL20RA geninde saptandı. Bu genin ürünü tip 2 sitokin reseptör ailesinin bir parçasıdır. İnterlökin 20 reseptörünün subuniti olan bu protein, epidermal fonksiyonlara katılır. Bu yüzden ciltte fazla ifade edilir ve psöriaziste upregüle olur (184–186).

Kromozom 7'de iki baz değişimi ZNF713 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak alanları içermektedir. Gen ekspresyonu ile ilgili yollarda görev alır (187). Mutasyonu otistik bozukluk ile ilişkilendirilmiştir (188).

Kromozom 8'de bir baz değişimi LOC101929528 geninde saptanmış olup bu gen RNA genidir ve ncRNA gen sınıfına bağlanmıştır (187). Bir kompleks mutasyon ise RIPK2 geninde saptanmıştır. Bu gen, serin / treonin protein kinazların reseptör-etkileşimli protein (RIP) ailesinin bir üyesini kodlar. Doğal ve edinsel immunitede sinyal komplekslerinin bir bileşenidir. Çeşitli uyarılara cevap olarak NF-kappaB'nin güçlü bir uyarıcı ve apoptozis baskılayıcıdır (189).

Kromozom 9'da iki baz değişimi KGFLP2 geninde saptanmıştır.

Kromozom 10'da bir baz değişimi AKR1C2 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü kırktan fazla enzim ve protein içeren aldo/keto redüktaz süper ailesinin bir üyesidir (190). Bu enzimler aldehit ve ketonun uygun alkole dönüşmesini katalizler. Sitokrom p450 tarafından yürütülen ksenobiotik metabolizmasında ve steroid hormon biyosentezinde görev alır (191). Bir adet kompleks mutasyon EMX2OS geninde saptanmıştır. Bu genin bir çok endometriyal tümörde düşük ifade edildiği saptanmıştır (192).

Kromozom 11'de bir delesyon mutasyonu LOC101927708 geninde saptanmıştır. İki kompleks mutasyon PHF21A geninde saptanmıştır. Bu gen BHC80'ni kodlar. BHC80 ise BRAF35/histon deasetilaz kompleksin (BHC) bir komponentidir. BHC non-nöronal hücrelerde nöron spesifik gen transkripsiyonunu

baskılayan bir korepresör kompleksidir (193). Bu gen bölgesi Potocki-Shaffer sendromu ile ilişkilendirilmiştir (194).

Kromozom 12’de bir kompleks mutasyon KRR1’de saptanmıştır. Bu genin ürünü 40S ribozom sentezi için gereklidir. Pre-18S ribozomal RNA’nın nükleosdaki sürecine ve ribozoma montajına dahil olur (195).

Kromozom 14’de bir kompleks ve bir insersiyon mutasyonu SOS2 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü RAS üzerinde GTP’yi GDP’ye katalizler (196). Bu gendeki missens heterozigot mutasyonun Noonan sendrom-9’a yol açtığı belirtilmiştir (197).

Kromozom 19’da bir adet baz değişimi MUC16 geninde saptanmıştır. Bu genin ürününün mukozal yüzeylerde parçacıklar ve enfeksiyon ajanlarına karşı koruyucu ve kayganlaştırıcı bir yüzey oluşturduğu düşünülmektedir (198). Bu gen over kanserinde tümör markeri olarak kullanılan CA125’i kodlar (199).

Kromozom 20’de bir delesyon mutasyonu WFDC8 geninde saptanmıştır. Bu genin ürünü WFDC enzim ailesine üye olup proteaz inhibitör özelliği göstermektedir. Bu genin ürünü serin-tip endopeptidaz inhibitör aktivitesine ve peptidaz inhibitör aktivitesine sahiptir (200,201). Bir adet baz değişimi mutasyonu LOC388780 geninde saptanmıştır.

Kromozom 21’de bir delesyon tipi mutasyon BAGE2 geninde saptanmıştır. Tümör antijeni kodladığı düşünülmektedir.

Kromozom 22’de iki baz değişimi mutasyonu FAM118A geninde saptanmıştır. Bu genin nükleik asit bağlama ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (202).

Tablo 4.4. Çalışma sonucunda kanser gelişim yolları ile ilişkili genler.

1. PIK3R4	8. GRM
2. SLC25A5	9. IL20RA
3. ITGB6	10. MAP3K7
4. PLK2	11. RIPK2
5. RAD17	12. MUC16
6. HLA-B	13. HLA-DQB1
7. HLA-DRB1	

## 5. TARTIŞMA

PIK3/AKT yolağının birçok kanser türünde etkin olup; hücre proliferasyonunda, sağ kalımı ve hareketliliğinde önemli rol aldığı gösterilmiştir (203). Mikami ve ark. malign mezotelyoma hücre kültürlerinde yaptığı çalışmada PIK3/AKT yolağının belirgin aktif olduğu ve PIK3 inhibe edildiği durumlarda mezotelyoma hücrelerinin bölünmesinin G1 fazında duraksadığı gözlemlenmiştir (204). Bizim çalışmamızda ise bütün bireylerde PIK3R4 geninde 1 adet kompleks tip mutasyon saptanmıştır. PIK3R4 PIK3/AKT yolağının bir elemanıdır. Etkisini PIK3C3 bağlanarak gösterir. PIK3C3 dolaylı yolla PTEN üzerinden etki gösterir (203). PTEN PIK3/AKT yolağının ana supresördür. PTEN gelişim basamağındaki herhangi bir mutasyon yolak üzerindeki negatif feedbacki kaldırarak malignite ve dolayısıyla mezotelyomaya yatkınlığı artırabilir.

Sağlıklı hücreler enerjilerinin çoğunu oksidatif fosforilasyondan elde ederler. Kanser hüceleri ise birçok ürünü katabolize ederek enerji sağlarlar. Oksidatif fosforilasyon özelliği kazanmış tümör hücreleri hipoksiye adaptasyon sağlar. Bu durum tümör proliferasyonu ve büyümesini hızlandırır (205, 206). SLC25A5 geni ürünü ADP'nin hücre içinden mitokondriyal matrikse geçişine, ATP'nin ise tersi istikamette mitokondriyal matriksten hücre içine geçişine izin veren bir kapı görevi üstlenir. Bu sayede farklı doku ve hücre tipinde proliferasyon ve büyüme oranı ile uygun ekspresyon edilebilir (206). SLC25A5 geni bir çok tümörde fazla miktarda ekspresyon edildiği gösterilmiştir (207–209). Bizim çalışmamızda SLC25A5 geninde bir adet delesyon saptanmıştır. Bu durumda gen bölgesindeki değişikliklerle beraber bireylerin sağlıklı ve tümör dokularının oksidatif kapasitesi artmış olabilir. Bu durumda mezotelyoma ve diğer kanserlerin gelişime yol açmış olabilir. Mezotelyoma gelişiminde önemli bir basamak olan oksidatif stres artmış oksidatif kapasiteyi tetikleyebilir.

İntegrinler alfa ve beta subünitten oluşan heterodimerik transmembran reseptörlerdir. Sinyal üretimi ve hücre bağlanmasından sorumludurlar (210). Hücre iskeletini ekstrasellüler matrikse bağlayan bir çıkıntı görevine ek, adhezyon, migrasyon, polarite, bölünme gibi hayatsal görevleri düzenleyen hücre içinden dışarıya ve hücre dışından içeriye sinyalleri taşır (211). Defektif integrin sinyalleri

anormal hücrelerde adhezyon, bölünme ve migrasyonu tetikleyerek kanser veya metastazla sonuçlanacak durumlara yol açabilir (212). Yapılan çalışmalarda integrin beta 6'nın oral kavite, deri, meme, akciğer skuamöz hücreli kanserlerinde ve kolon, endometriyum ve mide kanserlerinde artmış üretiminin olduğu gösterilmiştir (213). Bizim çalışmamızda ilgili gen bölgesinde 8 adet delesyon saptanmıştır. Bu delesyonlar sonucu artacak integrin beta 6 aktivitesi malign süreçleri tetikleyebilir.

PLK iyi korunmuş bir grup serine/threonin protein kinaz ailesidir. Memelilerde beş tipi bulunmaktadır (PLK1, PLK2, PLK3, PLK4 VE PLK5) (214, 215). PLK2 diğer aile üyeleri gibi hücre döngüsü, proliferasyonunda, mitoziste, sitokineziste, DNA hasarına yanıtta görev alır. Özellikle hücre döngüsündeki görevi sentriollerin duplikasyonuna katılmaktır (216). p53'ün doğal transkripsiyon hedefi olup G2-M kontrol noktasının aktivatörüdür (217). Bizim çalışmamızda PLK2 gen bölgesinde 2 adet baz değişimi tipinde mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyon p53 üzerindeki etkileri azaltarak malign süreçleri tetikleyebilir.

RAD17 tam olamayan DNA duplikasyonuna ve DNA hasarına yanıtın en önemli anahtar düzenleyicisi olup, kontrol noktalarındaki sinyal yolağını düzenler (218, 219). Bu protein DNA replikasyon faktör C ile yüksek benzerlik göstermektedir ve beraber bir kompleks oluşturular. Bu protein kompleksi DNA hasarı öncesi kromatine bağlanır, DNA hasarı gelişirse ATR kontrol noktası kinazı tarafından fosforile edilir ve aktive edilir. DNA hasarı sonrası bu protein kromatin üstüne RAD1-RAD9-HUS1 kontrol noktası protein kompleksini toplar. Bu kompleks ile fosforile edildiği düşünülmektedir. Fosforile olarak aktiflenmiş bu protein kompleksi DNA hasarı gelişmiş hücrelerin G2 fazında durdurulması için önemlidir. Bu durumun DNA hasarı gelişmiş hücrelerin erken fark edilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir (220, 221). Baş ve boyun kanserlerinde (222), küçük dışı hücreli akciğer (223) kanserinde bir çok sporadik bu gen mutasyonu saptanmaktadır. Bizim çalışmamızda bu gen bölgesinde 18 adet insersiyon tipinde mutasyon saptanmış olup, bu bireylerde benzer mekanizmalarla malign plevral mezotelyoma gelişimine yatkınlık oluşturmuş olabilir.

HLA gen ailesi insan genomundaki en kompleks ve polimorfik gen bölgesidir. T lenfositlere ve naturel killer hücrelerine yabancı antijenleri düzenler ve

sunar. Böylelikle immun cevaptan sorumludurlar (224). Bazı çalışmalar HLA gen ailesindeki genetik mutasyonların tümör oluşumu ve gelişiminden sorumlu olduğunu idda etmektedir. Özellikle aktive T lenfositlerden ve NK hücrelerinden immunglobulin-like-reseptörs (KIR) exprese edilerek tümör hüceleri üzerindeki HLA ligandlarına bağlanmaktadır. Böylelikle antitümöral etkinlik oluşmaktadır (225). Kanser hücrelerindeki HLA mutasyonları T lenfosit ve NK aracılıklı immun yanıtından kaçmasına olanak vermektedir (226). HLA A-B-C-DRB1-DQB1'nin tiroit papiller kanseri gelişiminde risk faktörü oluşturduğu belirtilmiştir (227). Kore populasyonunda HLA-DRB1 ile gastrik karsinoma ve HLA-B51, DRB1\*09, DQB1\*03 ve B51-DRB1\*09-DQB1\*03 ile Non-hodgkin lenfoma arasında bağ gösterilmiştir (228). Bizim çalışmamızda biri HLA-B, beşi HLA-DRB1 ve ikisi HLA-DQB1'de olmak üzere sekiz adet baz değişimi mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlar benzer mekanizma ile mezotelyoma gelişimine yol açmış olabilir.

GRM1 gen ürünü metabotropik glutamat reseptörü olup fosfolipaz c' yi etkinleştirerek işlevlerini yerine getirir (170). Glutamat mGluR1 aracılığı ile santral sinir sistemi dışındaki hücrelerde hücre proliferasyonunu, differansiyasyonunu ve sağ kalımını düzenler (229). mGluR1 reseptörü G protein aracılıklı transmembran reseptör ailesine aittir. mGluR1 reseptörü ile kanser ilişkisi ilk defa farelerde transgenetik melanom geçişi ile ilgili bir çalışmada öne sürülmüştür (230). Devamında insan melanom hücre hatlarında yapılan çalışmalarda %60 örnekte ektopik mGluR1 artışı gözlemlendi (230, 231). Bu artmış reseptör aktivitesinin melanom hücrelerinde MAPK ve PI3k/AKT yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (232). Bu tarz anormal sinyal yollarının aktive olması çeşitli kanser tiplerine yol açabilir. Birçok kanserde yirmiden fazla somatik missense mutasyon mGluR1 ligant bağlanma yerinde veya hücre içi aktif bölgesinde saptanmıştır (233, 234). Bizim çalışmamızda ise on ikisi kompleks, dördü delesyon tipte olmak üzere on altı mutasyon ilgili gen bölgesinde saptanmıştır. Benzer şekilde artmış mGluR1 reseptör aktivitesi mezotel hücrelerinde anormal proliferasyonu ve diferansiyasyonu tetiklemiş ve mezotelyoma gelişimi tetiklemiş olabilir.

IL20RA geni interlokin 20 ve interlokin 24'ün tutunabileceği reseptörü kodlar (235). IL-24 (MDA-7) proapoptotik proteinleri (Bax ve Bak) up regüle edip, anti apoptotik proteinleri (Bcl-2 ve BCL- x1) down regüle ederek G<sub>2</sub>-M kontrol

noktasında hücre döngüsü durdurur ve apoptotik hücre ölümü indükler (236, 237). IL24 gen transferi Wtn/fosfatidilinositol 3-kinaz sinyal yolağını inhibe ederek akciğer ve meme kanseride dahil çok çeşitli kanser hücrelerini öldürmektedir (238). Bu nedenle IL20RA genin promotor hipermetilasyonu ile susturulması IL-24 aracılıklı hücre döngüsü durdurucu sinyalin ve apoptozis tetiklenmesinin inhibe edilmesine yol açarak tümör gelişimine yol açmaktadır. Tessema ve ark.on iki akciğer kanseri hücre hattı ve dört meme kanseri hücre hattında yaptıkları analizde IL20RA genin hipermetilasyon ile susuturulama sıklığını %26 bulmuşlardır (239). Swarts ve ark.on adet akciğer karsinoid kanserinde yaptıkları genetik analizde IL20RA genin downregüle olduğunu göstermişlerdir (240). Bizim çalışmamızda ise dört adet kompleks mutasyon IL20RA geninde saptanmış olup benzer mekanizmalarla mezotelyoma gelişimine yardımcı olmuş olabilir.

TGF- $\beta$ -aktive kinaz 1(TAK-1) olarak da bilinen MAP3K7 mitojen-aktive protein 3 kinaz(MAP3K) ailesine ait bir serin/threonin kinazdır. TGF- $\beta$  salınımı cevap olarak hızla aktive olur (241). MAP3K7 kanser gelişimi, hücre proliferasyonu, metabolizma, immun cevap ve hücre direncini kontrol eden Nükleer faktör-KB ve MAPK sinyal yollarını düzenler (242). MAP3K7 IKK kompleksini (I $\kappa$ B kinaz) fosforile ederek aktiveleştirir. Aktive olan IKK kompleksi NF-KB bağlı I $\kappa$ B $\alpha$  (kapa B proteini inhibitörü) ayrıştırarak NF-KB aktifler. NF-KB hücre çekirdeğine geçerek anti-apoptotik 150 kadar geni aktive eder. Bu nedenle NF-KB birçok kanserin gelişiminde kritik rol almaktadır (243). Melanom hücrelerinde NF-KB aktivasyonun hücre proliferasyonu, hücre sağkalımını, metastaz potansiyelini ve apoptozisten kaçmayı tetiklediği gösterilmiştir (244). Baş boyun skuamöz kanserleri hücre hatlarında ve meme kanseri hücre hatlarında MAP3K7 supresyonuNF-KB supresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (245, 246). Bu doğrultuda MAP3K7 aktivasyonu kanser gelişimi tetikleyebilir. Bizim çalışmamızda ilgili gen bölgesinde dört adet kompleks tipte mutasyon saptanmış olup mezotelyoma gelişimine katkıda bulunmuş olabilir.

RIPK2 geni serin / treonin protein kinazların reseptör-etkileşimli protein (RIP) ailesinin bir üyesi kodlar. Bu kinaz ailesi hücrel stressin esansiyel sensörü görevini üstlenir (247). DNA hasarı, hücrel proliferasyon programları, inflamasyon ve patojen infeksiyonu gibi durumlarda ortaya çıkan hücrel stres de NF-KB veya

MAPK gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek önemli rol alır (247, 248). Aktive olan NF-Kb anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırır ve tümör gelişimi indükler. Guirado ve ark. mesane kanserli hastalarda yaptıkları genetik çalışmada RIPK2 geninde polimorfizmin mesane kanseri riskini ve sağ kalımı etkilediğini göstermişlerdir (249). Wu ve ark. hepatoma tanılı hastalarda yaptığı çalışmada, hepatosit hücrelerinde RIPK2 genin NF-KB üzerinden hücre migrasyonu, karsinogenez ve hücre rejenerasyonu üzerinde önemli rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır (250). Asbest fagosite etmiş makrofaj tarafından salınan TNF-  $\alpha$  otokrin ve parakrin etki ile kendi salınımı tetikler devamında ise reseptörüne bağlanarak NF-kB yolağını aktifleştirir (47, 48). Aktive NF-kB mezotel hücrelerini yaşam süresini artırır ve apoptozisten kaçmasını sağlar. Mezotelyoma gelişiminde de kronik inflamasyon belirgin rol almaktadır (47, 48). Bizim çalışmamızda ilgili gen bölgesinde bir adet kompleks tipte mutasyon saptanmıştır. Kronik inflamasyon ve akut inflamasyonda etkili olan bu gen bölgesi benzer mekanizma ile mezotelyoma gelişimine yol açmış olabilir.

MUC16 Gen ürünü olan musin 16 musin glikoprotein ailesini bir üyesidir (251). MUC16 bir adet transmembran uzantısı olan bir membran ilişkili musindir (252). Aynı zamanda birçok kanserde seviyesi artan ve over kanserinde tümör markeri olarak kullanılan CA125 olarak adlandırılır (199). Oküler yüzey, solunum yolu ve kadın üreme organ yüzey epiteline katılır. Fazla glikolize olduğu için bulunduğu epitel hücre üstünde hidrofilik bir alan oluşturur, yabancı maddeler ve enfeksiyon ajanlarına karşı bariyer görevi görür (253). Bu bariyer görevi tümör hücrelerinin NK hücrelerinden kaçmasına olanak sağlamakta ve tümör gelişimine yardımcı olmaktadır. Yine fazla miktarda glikolizlenmiş çatısı ile güçlü bir immün sistem uyarını olan galaktin-1 bağlayarak tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçımasını sağlar (254). MUC16 hücre hücre etkileşimine dahil olarak tümör hücrelerinin metastazına yardımcı olduğu bunu da mezotel hücrelerince eksprese edilen mezotelin isimli glikoproteine selektif bağlanmasının sağladığı düşünülmektedir (255). Mezotelin over kanserine ek sükamöz hücreli kanser, mezotelyoma gibi bir çok tümörde fazla eksprese edilmektedir. Mezotelin ve MUC16 ilişkisinin metastaza kolaylık sağladığı düşünülmektedir (203). MUC16'nın sitoplazmik kuyruğunun tümör hücrelerinde büyümeyi tetiklediği, hareketlerini

arttırdığı ve invazyona aracı olduğu düşünülmektedir (256). Yine kanser hücrelerinde fazla eksprese edilen MUC16'nın cisplatin gibi sitotoksik ajanlara olan duyarlılığı azalttığı düşünülmektedir (257). Bizim çalışmamızda MUC16 geninde bir adet baz değişimi mutasyonu saptanmıştır. Özellikle mezotelin ile ilişkisi düşünüldüğünde mezotelyoma gelişimi ve yayılımı açısından bu gendeki mutasyonlar önemli olabilir.

Uğurluel ve ark. yedi plevral ve dört peritoneal mezotelyoma hastasının tümör dokusunda elde ettikleri DNA ile yaptıkları 236 onkolojik genin whole-exon sekanslama çalışmasında; 8 bireyde mevcut genlerde mutasyon saptanmış olup ortalama mutasyon sayısı 1.9 bulunmuştur. Sırası ile en sık mutasyon BAP1 (%36, p53/DNA tamir yolağı), CDKN2A/B (%27, hücre siklusu denetimi) ve NF2 (%27, PIK3-kinase-AKT yolağı) genlerinde saptanmıştır. SF3B1, PTCH1, MYD88, SETD2, MAP2K1, TP53, STK11, KDM6A, ASXL1, ve BRIP1 genleri ise diğer mutasyon saptanan onkogenler olarak belirtilmiştir (258).

Shukuya ve ark. Yaptıkları çalışmada yirmi bir bireye ait tümör dokusunda amplifikasyon ve amplifikasyon tabanlı paralel sekanslama yönetimi ile 48 tümör ilişkili gen taramışlardır. Bir hastada KRAS, üç hastada ise PIK3CA geninde amplifikasyon saptanmıştır. Sekanslama sonucunda toplamda dokuz hastada on altı mutasyon saptanmış olup sırası ile TP53 dört adet, APC üç adet, PIK3CA üç adet, VHL iki adet, ALK, FGFR3, KRAS, ve PTPN11 birer adet mutasyon saptanmıştır. APC genindeki iki mutasyon insersiyonken diğer mutasyonlar tek baz değişimi olarak bulunmuştur (259). Kısıtlı gen sayısına bakılan bu çalışmada bizim sonuçlarımız ile benzer olarak PIK3/AKT yolağı ile ilgili gen mutasyonu saptanmıştır.

Guo ve ark. yaptığı 22 bireye ait tümör hücrelerinden elde ettiği kan hücreleri ile karşılaştırdığı DNA bazlı whole exome sekanslama çalışmasında; beş yüz on yedi somatik mutasyonun dört yüz doksan gende saptandığı belirtilmiştir. Bu mutasyonlardan en az iki bireyde olan ve Mutsig hesaplamasına göre anlamlı kabul edilen dördü ön plana çıkarılmıştır. Bu genler; BAP1, NF2, CUL1 ve CDKN2A dır. CDKN2A mutasyonu yirmi iki bireyin onunda görülmüştür (102).



Iacano ve ark. 123 parafin bloktan elde ettikleri DNA üzerinden 52 kanser ile ilişkili gen içeren kit ile yaptıkları whole exon çalışmada; genetik varyasyonlarda iki küme elde edilmiştir. Bu yolaklardan ilki p53/DNA tamir mekanizmasıdır. En az 25 hastada ve %10 allelik frekasyonu sınırlaması ile mutasyon saptanan genler TP53, SMACB1 ve BAP1'dir. İkinci yolak olarak PIK3/AKT saptanmıştır. Bu yolakla ilişkili PDGFRA, KIT, KDR, HRAS, PIK3CA, STK11 ve NF2 genlerinde mutasyon saptanmıştır (260). Bizim çalışmamızda PIK3/AKT yolağında görevli PIK3R4 geninde mutasyon saptanmıştır.

Yukarıda yapılan çalışmalar tümör dokusundan elde edilen DNA ile yapılmıştır. Daha önce mezotelyomanın genetiği bölümünde açıkça belirttiğimiz gibi, asbest temaslı bireylerin ilgili dokularında oksidatif stres ve kronik inflamasyona bağlı birçok tümör dokusunda da görülebilecek hücre döngüsü kontrol genlerinde ve anti-apoptotik genlerde mutasyonlar birikmektedir. Bu genetik anormallikler teraziye kanser yönünde ağırlık kazanırsa mezotelyoma gelişebilir. Yalnız bu değişiklikler ailesel yatkınlıktan çok sporadik mutasyonlardır. Bu yüzden bizim çalışmamızda yukarıda bahsi geçen gen bölgeleri saptanmamış olabilir.

BAP1 ürünü BRCA1 ubiquitin karboksi-hidroksilaz enzimi ile deubiquitinaz aktivite gösteren çekirdekte yerleşmiş bir enzimdir (261). BAP1 ilişkili tümör supresyonu için hem deubiquitinaz aktivitesi hemde çekirdek yerleşimi gerekmektedir (261). BAP1 esansiyel bir hücre döngüsü düzenleyicisidir ve transkripsiyon regülasyonu ile ilişkilidir (261). BAP1 Transkripsiyon Host Cell Faktör-1(HCF-1)'e bağlanır ve deubiquitine eder. HCF-1 çeşitli histon komplekleri ile ilişkilidir (79, 264). Sporadik BAP1 mutasyonları uveal melanom, kütanöz melanom, renal hücreli karsinom ve diğer kanserler için tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda ortak sporadik BAP1 mutasyonlarının yanı sıra, germline BAP1 mutasyonu yüksek mezotelyoma insidansı görülen ailelerde tespit edilmiştir (80). Fakat yakın zamanda sporadik mezotelyoma olgularında yapılan çalışmalarda BAP1 mutasyon sıklığının düşük olduğu belirtilmektedir. Yoshikawa ve ark. 26 sporadik mezotelyoma olgusunda germline BAP1 mutasyonu araştırmış ve prevalansı %8 bulunmuştur (265). Yine Rusch ve ark. 78 sporadik mezotelyomalı olguda yaptığı çalışmada germline BAP1 mutasyonu saptanmamıştır (266). Tüm olgular ele alındığında germline BAP1 mutasyon sıklığını %1-2 olabileceği belirtilmektedir.

Bizim çalışmamızdaki on bireyde ise Rusch ve ark. çalışması ile benzer olarak BAP1 geninde mutasyon saptanmamıştır.

Siklin-bağımlı kinaz İnhibitor 2A (CDKN2A) geni kromozom 9 üzerinde p21.3 bandı üzerinde lokalizedir (267). Bu gen p16 ve p14arf isimli iki protein kodlar. Bu iki proteinde hücre döngüsünde tümörsüpresör olarak görev alır. p16 siklin bağımlı kinaz 4 ve 6'yı inhibe ederek retinablastom (Rb) ailesi proteinlerini aktifleştirir. Aktive Rb ise G1'den S fazına geçişi durdurur. p14arf ise p53 tümör supresör genini aktifler (268). Kanserlerdeki somatik mutasyonlara bakıldığında p53'den sonra en sık ikinci somatik mutasyon CDKN2A'da görülmektedir (269). Bu durumda yukarıdaki literatür bilgisine dayanarak sık saptandığı belirtilen CDKN2A mutasyonunun tümör dokularından elde edilen DNA çalışmalarında yüksek bulunması beklenen bir durumdur. Bizim çalışmamızda ilgili gen bölgesinde mutasyon saptanmamıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mezotelyoma mezotel hücrelerinden köken alan plevranın primer malign tümörüdür. Hastalığın gelişiminde asbest temasının yeri net olarak gösterilmiş olup temaslı popülasyonda 122/100000 görülmektedir. Fakat asbestle temas eden popülasyonun büyüklüğü düşünüldüğünde bu oran az görülmektedir. Bu açıdan mezotelyoma gelişimini tetikleyebilecek ek konak veya çevre faktörü aranmaktadır. Asbest temaslı bu popülasyonda bazı ailelerde mezotelyoma sıklığı genelden yüksektir. Bu ailelerde mezotelyoma gelişimini tetikleyecek genetik bir yatkınlık söz konusu olabilir mi hipotezinden yola çıkılarak bu tez konusu belirlenmiştir.

Tarafımızca mezotelyoma tanısı konmuş ve takip edilmiş dört aileden oluşan on akraba birey bu tez çalışması için seçilmiştir. Bu bireylerde varsa bir genetik yatkınlığın gösterilmesi planlanmıştır. İnsan genom projesi sonucu insan genomu haritalandırılmış ve olası varyasyonlar belirlenmiştir. Bu çalışma sırasında artan bilgi birikimi ve teknoloji gelişimi ile uzun ve pahalı bir yöntem olan genom dizileme işlemi hızlı, güvenilir ve ulaşılabilir hale gelmiştir. Tüm genom dizileme ile tüm DNA sıralanmakta ve varsa mutasyonlar saptanmakta, bireysel yatkınlıklar ilgili gen düzeyinde ortaya konmaktadır. Bu çalışmada bu gelişmelerin ışığında on bireyde tüm genom dizilime yapılmıştır. Bu dizileme sonucunda on bireyde ortak gen mutasyonları DNA bazı düzeyinde ortaya konmuştur. Dizileme sonucunda ortaya çıkan sonuç önce biyoinformatik analizden geçirilerek 8622 varyanta düşürülmüştür. Daha sonra ise tüm genom dizileme sonucu elde edilen verileri karşılaştırmak için oluşturulmuş veri tabanları olan 1000Genom-dbSNP ile karşılaştırılmıştır. Bu veri tabanlarında ortaya konan mutasyonlarla ortak gen mutasyonlarından protein kodlayanlar seçilmiştir. Bu işlem sonucunda toplamda 37 gende 121 ortak varyant saptanmıştır. Bu mutasyonlu genlerden on üçü daha önce kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu genler: SLC25A5, ITGB6, PLK2, RAD17, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1, GRM, IL20RA, MAP3K7, RIPK2, MUC16 ve PIK3R4 dir. Bu genlerden PIK3R4 geni özellikle mezotelyoma gelişimi ile direk ilişkili PIK3/AKT yolu üzerinde etkilidir.

Bu çalışmanın öncülü olabilecek ilgili çalışmalar tüm genom dizilemeden çok, tüm ekzom dizilime yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmalara konu olan DNA ise

tümör dokularından elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise daha kapsamlı olan tüm genom dizileme yöntemi -egzonik ve intronik bölgeyi kapsayacak şekilde kullanılmış olup bireylerin periferik yoldan alınan kanlarından elde edilen DNA kullanılmıştır. Bu durum germline mutasyonların gösterilmesi için daha elverişlidir. Çünkü bir dokuda kanser gelişmesi için onkogenlerde gelişen mutasyonlarla upregüle ve tümör supresör genlerde oluşan mutasyonlarla downregüle olması gerekmektedir. Mezotelyoma gibi kanser gelişimi asbest ile ilişkilendirilmiş ve asbestte bağlı oksidatif stres ve kronik inflamasyonun ortaya konduğu bir kanser türünde doku düzeyinde yapılan genetik çalışmalar genetik yatkınlıktan ziyade kanser gelişim yolağını gösterebilir. Kanser dokusundan yapılan bu çalışmalarda saptanan mutasyonlar onkogenler ve tümör supresör gen üzerindedir. Bu durum da bizim çalışmamızda önceki çalışmalardan farklı gen bölgelerinin saptanmasını açıklayabilir.

Genetik yapı toplumlar ve aileler hatta aynı aile içinde bireyler arasında farklı varyasyonlara sahip olabilir. Bu varyasyonlardan hangisinin hastalıkla ilişkili olabileceğini kestirmek zor olmakla beraber aynı varyasyonların çalışmaya dahil ettiğimiz ailelerin sağlıklı diğer bireylerinde çalışılması ve değerlendirilmesi önemlidir. Bu yüzden bu çalışmanın bir sonraki basamağında bu on bireyin sağlıklı aile grubunda tespit ettiğimiz varyasyonları içeren gen bölgelerinin çalışılması ve çıkan sonuçların mevcut sonuçlarla karşılaştırılması planlanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Robinson BWS, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; 366: 397–08.
2. Ak G, Metintas M, Metintas S, et al. Prognostic Factors According to the Treatment Schedule in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 1425–30.
3. Weder W, Stahel RA, Bernhard J, et al. Multicenter trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 2007; 18: 1196–202.
4. Rusch VW, Rosenzweig K, Venkatraman E, et al. A phase II trial of surgical resection and adjuvant high dose hemithoracic radiation for malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 788–95.
5. Batirel HF, Metintas M, Caglar HB, et al. Adoption of pleurectomy and decortication for malignant mesothelioma leads to similar survival as extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016;151:478–84.
6. Lang-Lazdunski L, Bille A, Papa S, et al. Pleurectomy/decortication, hyperthermic pleural lavage with povidone-iodine, prophylactic radiotherapy, and systemic chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma: a 10-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149:558–66.
7. Metintas S, Metintas M, Ucgun I, Oner U. Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos: follow-up of a Turkish cohort living in a rural area. *Chest* 2002; 122: 2224–98.
8. Turkey Asbestos Control Strategic Plan–Final Report. Turkish Mesothelioma Working Group, Public Health Institute of Turkey, Eskisehir Osmangazi University. *Turk Thorac J* 2015;16:S1–S26.
9. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis* 2013; 34: 1413–9.
10. Robledo R, Mossman B. Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *J Cell Physiol* 1999; 180: 158–66.

11. Tanaka S, Choe N, Hemenway DR, et al. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J Clin Invest* 1998; 102: 445–54.
12. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1666–80.
13. Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, et al. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136: 277–93.
14. Musti M, Kettunen E, Dragonieri S, et al. Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 9–15.
15. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2108–13.
16. Thurneysen C, Opitz I, Kurtz S, et al. Functional inactivation of NF2/merlin in human mesothelioma. *Lung Cancer* 2009;64: 140–7.
17. Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43:668–72.
18. Becklake MR, Bagatin E, Neder JA. Asbestos-related diseases of the lungs and pleura: uses, trends and management over the last century. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 356–69.
19. Carbone M, Kratzke RA, Testa JR. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002; 29:2–17.
20. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, et al. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999; 79: 666–72.
21. Robinson BM. Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann Cardiothorac Surg* 2012; 1: 491–6.

22. Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, et al. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ* 2011; 89: 716–24.
23. Malign Plevral Mezotelyoma Türkiye Standartlar Rehberi. Türkiye Mezotelyoma Çalışma Grubu. *Eurasian J Pulmonol* 2015; 17: S1 – S21.
24. Barış Yİ. Asbest ve yaptığı hastalıklar. Barış Yİ, Akay H, Emri S (ed). Türkiye’de asbest ve erionite ile ilgili hastalıklar. İç: Türkiye’de Asbest ve Erionite ile İlgili Hastalıklar. *Toraks Dergisi*, 2007;8 (Ek 1); 1–24.
25. Light RW. Tumors of the pleura. In: Murray JF, Nadel JA, eds. *Textbook of respiratory medicine*, vol 2. Philadelphia: Saunders, 1994: 2222–30.
26. Hillerdal G. Pleural plaques and risk for bronchial carcinoma and mesothelioma. *Chest* 1994;105:144–50.
27. Berry G, Reid A, Aboagye-Sarfo P, et al. Malignant mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom (Western Australia) after more than 50 years follow-up. *Br J Cancer* 2012; 106: 1016–20.
28. Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 2005; 353: 1591–603.
29. Metintas M, Hillerdal G, Metintaş S. Malignant mesothelioma due to environmental exposure to erionite: follow-up of a Turkish emigrant cohort. *Eur Respir J* 1999; 13: 523–6.
30. Metintas M, Metintas S, Ak G, et al. Epidemiology of pleural mesothelioma in a population with non-occupational asbestos exposure. *Respirology* 2008; 13: 117–21.
31. Metintaş M, Özdemir N, Hillerdal G, et al. Environmental asbestos exposure and malignant pleural mesothelioma. *Respir Med* 1999; 93: 349–55.
32. Selçuk ZT, Cöplü L, Emri S, et al. Malignant pleural mesothelioma due to environmental mineral fiber exposure in Turkey. Analysis of 135 cases. *Chest* 1992;102: 790–6.

33. Şenyiğit A, Babayiğit C, Gökırmak M, et al. Incidence of malignant pleural mesothelioma due to environmental asbestos exposure in the southeast of Turkey. *Respiration* 2000; 67: 610–4.
34. Dumortier P, Çöplü L, Maertelaer V de, et al. Assessment of environmental asbestos exposure in Turkey by bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1815–24.
35. Nishimura SL, Broaddus VC. Asbestos-induced pleural disease. *Clin Chest Med* 1998; 19: 311–29.
36. Boutin C, Schlessler M, Frenay C, Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1998;12: 972–81.
37. Hillerdal G. Mesothelioma: cases associated with non-occupational and low dose exposures. *Occup Environ Med* 1999; 56: 505–13.
38. Yazicioglu S, İlçayto R, Balci K, et al. Pleural calcification, pleural mesotheliomas, and bronchial cancers caused by tremolite dust. *Thorax* 1980; 35: 564–9.
39. Baris YI, Saracci R, Simonato L, et al. Malignant mesothelioma and radiological chest abnormalities in two villages in Central Turkey. An epidemiological and environmental investigation. *Lancet* 1981; 1: 984–7.
40. Aisner J. Current approach to malignant mesothelioma of the pleura. *Chest* 1995; 107: 332S–44S.
41. Chew S.H, Toyokuni S. Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: An update. *Free Radic Biol Med* 2015; 86: 166–78.
42. Sluis–Cremer GK. Asbestos disease at low exposures after long residence times. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 643: 182–93.
43. Lanphear BP, Buncher CR. Latent period for malignant mesothelioma of occupational origin. *J Occup Med* 1992; 34: 718–21.
44. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg* 2000; 44:565– 601.



45. Suzuki Y, Yuen SR, Ashley R; Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelioma: pathological evidence. *Int J Hyg Environ Health* 2005; 208:201–10.
46. Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, et al. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10214–9.
47. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced Oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10397–402.
48. Choe N, Tanaka S, Xia W, et al. Pleural macrophage recruitment and activation in asbestos-induced pleural injury. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1257–60.
49. Xu A, Zhou H, Yu DZ, et al. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1003–8.
50. Shukla A, Gulumian M, Hei TK, et al. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1117–29.
51. American Thoracic Society. Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 691–715.
52. Yang H, Testa JR, Carbone M. Mesothelioma Epidemiology, Carcinogenesis and Pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol* 2008; 9:147–57.
53. Zanella CL, Timblin CR, Cummins A, et al. Asbestos-induced phosphorylation of epidermal growth factor receptor is linked to c-fos and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 277: L684–L93.
54. Cacciotti P, Libener R, Betta P, et al. SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: A model for viral-related

- carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12032–7.
55. Ilgren EB, Ortega Breña M, Castro Larragoitiac J, et al. A Reconnaissance Study of a Potential Emerging Mexican Mesothelioma Epidemic due to Fibrous Zeolite Exposure. *Indoor Built Environ* 2008; 17: 496–515.
  56. Dogan AU, Dogan M. Re-evaluation and re-classification of erionite series minerals. *Environ Geochem Health* 2008; 30: 355–66.
  57. Dogan AU, Dogan M, Hoskins JA. Erionite series minerals: mineralogical and carcinogenic properties. *Environ Geochem Health* 2008; 30: 367–81.
  58. Institute of Medicine (US) Immunization Safety Review Committee; Stratton K, Alamario DA, McCormick MC. Immunization safety review SV40 contamination of polio vaccine and cancer. Washington, DC: The National Academies Press 2003.
  59. Carbone M, Pass HI, Rizzo P, et al. Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 1994;9:1781–90.
  60. Testa JR, Carbone M, Hirvonen A, et al. A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas. *Cancer Res* 1998; 58: 4505–9.
  61. Aoe K, Hiraki A, Murakami T, et al. Infrequent existence of simian virus 40 large T antigen DNA in malignant mesothelioma in Japan. *Cancer Sci* 2006; 97: 292–5.
  62. Lopez-Rios F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* 2004; 364: 1157–66.
  63. Ziegler A, Seemayer CA, Hinterberger M, et al. Low prevalence of SV40 in Swiss mesothelioma patients after elimination of false-positive PCR results. *Lung Cancer* 2007; 57: 282–91.

64. Kroczyńska B, Cutrone R, Bocchetta M, et al. Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:14128–33.
65. Roggli VL, Oury TD, Moffatt EJ. Malignant mesothelioma in women. *Anat Pathol* 1997; 2: 147–63.
66. Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: A risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 1237–54.
67. Jean D, Thomas E, Manie E. Syntenic relationships between genomic profiles of fiber-induced murine and human malignant mesothelioma. *Am j Pathol* 2011; 178:881–94.
68. Björkqvist AM, Tammilehto L, Anttila S, et al. Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 1997; 75:523–7.
69. Klorin G, Rozenblum E, Glebov O, et al. Integrated high-resolution array CGH and SKY analysis of homozygous deletions and other genomic alterations present in malignant mesothelioma cell lines. *Cancer Genet* 2013; 206:191–205.
70. Björkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, et al. Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br j Cncer* 1998; 77: 260–9.
71. Lindholm PM, Salmenkivi K, Vauhkonen H, et al. Gene copy number analysis in malignant pleural mesothelioma using oligonucleotide array CGH. *Cytogenet Genome Res* 2007; 119:46–52.
72. Pylkkänen L, Sainio M, Ollikainen T, et al. Concurrent LOH at multiple loci in human malignant mesothelioma with preferential loss of NF2 gene region. *Oncol Rep* 2002; 9: 955–9.
73. Ascoli V, Aalto Y, Varnovale-Scalzo C, et al. DNA copy number changes in familial malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 127: 80–82.

74. Krismann M, Muller KM, Jaworska M, Johnen G. Molecular cytogenetic differences between histological subtypes of malignant mesotheliomas: DNA cytometry and comparative genomic hybridization of 90 cases. *J Pathol* 2002;197: 363–71.
75. Simon F, Johnen G, Krismann M, Muller KM. Chromosomal alterations in early stages of malignant mesotheliomas. *Virchows Arch* 2005; 447: 762–7.
76. Knuutila S, Armengol G, Bjorkvist AM. et al. Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 25–30.
77. Matsumoto S, Nabeshima K, Kamei T, et al. Morphology of 9p21 homozygous deletion-positive pleural mesothelioma cells analyzed using fluorescence in situ hybridization and virtual microscope system in effusion cytology. *Cancer Cytopathol* 2013;121: 415–22.
78. Musti M, Cavone D, Aalto Y, et al. A cluster of familial malignant mesothelioma with del (9p) as the sole chromosomal anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 138: 73–6.
79. Murali R, Wiesner T, Scolyer RA. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology* 2013; 45: 116–26.
80. Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 1022–5.
81. Apostolou S, De Rienzo A, Murthy SS, et al. Absence of BCL10 mutations in human malignant mesothelioma. *Cell* 1999; 97: 684–6.
82. De Rienzo A, Jhanwar SC, Testa JR. Loss of heterozygosity analysis of 13q and 14q in human malignant mesothelioma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 337–41.
83. Lecomte C, Andujar P, Renier A, et al. Similar tumor suppressor gene alteration proWles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell Cycle* 2005; 4: 1862–9.

84. Murthy SS, Testa JR. Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. *J Cell Physiol* 1999; 180: 150–7.
85. Toyooka S, Carbone M, Toyooka KO, et al. Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 4340–4.
86. Wong L, Zhou J, Anderson D, Kratzke RA. Inactivation of p16INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation. *Lung Cancer* 2002; 38: 131–6.
87. Kumar K, Rahman Q, Schipper H, et al. Mutational analysis of 9 different tumour-associated genes in human malignant mesothelioma cell lines. *Oncol Rep* 2005; 14: 743–50.
88. Kitamura F, Araki S, Suzuki Y, et al. Assessment of the mutations of p53 suppressor gene and Ha- and Ki-ras oncogenes in malignant mesothelioma in relation to asbestos exposure: a study of 12 American patients. *Ind Health* 2002; 40: 175–81.
89. Ni Z, Liu Y, Keshava N, et al. Analysis of K-ras and p53 mutations in mesotheliomas from humans and rats exposed to asbestos. *Mutat Res* 2000; 468:87–92.
90. Papp T, Schipper H, Pemsel H, et al. Mutational analysis of N-ras, p53, p16INK4a, p14ARF and CDK4 genes in primary human malignant mesotheliomas. *Int J Oncol* 2001; 18: 425–33.
91. Whitson BA, Kratzke RA. Molecular pathways in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Lett* 2006; 239: 183–9.
92. Lee AY, Raz DJ, He B, Jablons DM. Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer* 2007; 109: 1454–61.
93. Lopez-Rios F, Chuai S, Flores R, et al. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* 2006; 66: 2970–9.

94. Poulidakos PI, Xiao GH, Gallagher R, et al. Re-expression of the tumor suppressor NF2/merlin inhibits invasiveness in mesothelioma cells and negatively regulates FAK. *Oncogene* 2006; 25: 5960–8.
95. Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 1998; 16:1097–112.
96. Nasu M, Emi M, Pastorino S, et al. High incidence of somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 565–76.
97. Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, et al. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 2015; 75: 264–9.
98. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E131–E6.
99. Ramos-Nino ME, Timblin CR, Mossman BT. Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression. *Cancer Res* 2002; 62: 6065–9.
100. Abutaily AS, Collins JE, Roche WR. Cadherins, catenins and APC in pleural malignant mesothelioma. *J Pathol* 2003; 201: 355–62.
101. Batra S, Shi Y, Kuchenbecker KM, et al. Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1228–32.
102. Lee AY, He B, You L, et al. Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 1246–50.
103. He B, Lee AY, Dadfarmay S, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 743–8.

104. Liu Z, Klominek J. Chemotaxis and chemokinesis of malignant mesothelioma cells to multiple growth factors. *Anticancer Res* 2004; 24: 1625–30.
105. Demirag F, Unsal E, Yilmaz A, Caglar A. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis, and mitotic activity index in malignant pleural mesothelioma. *Chest* 2005; 128: 3382–7.
106. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001; 193: 468–75.
107. Masood R, Kundra A, Zhu S, et al. Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops. *Int J Cancer* 2003;104: 603–10.
108. Edwards JG, McLaren J, Jones JL, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* 2003; 88: 1553–9.
109. Spugnini EP, Bosari S, Citro G, et al. Human malignant mesothelioma: molecular mechanisms of pathogenesis and progression. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2000–4.
110. Dhaene K, Wauters J, Weyn B, et al. Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma. *J Pathol* 2000; 190: 80–5.
111. Kivipensas P, Björkqvist AM, Karhu R. Gains and losses of DNA sequences in malignant mesothelioma by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 89: 7–13.
112. Takeda M, Kasai M, Enomoto Y, et al. Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by FISH analysis of paraffin-embedded tissues. *J Clin Pathol* 2012; 65: 77–82.
113. Schmidt SC, Weidemann H, Muller KM, et al. Low malignant epithelioid peritoneal mesothelioma: successful treatment with surgical therapy alone. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 366–70.

114. Tallet A, Nault JC, Renier A, et al. Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene* 2014; 33: 3748–52.
115. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 606–19.
116. Altomare DA, You H, Xiao GH, et al. Human and mouse mesotheliomas exhibit elevated AKT/PKB activity, which can be targeted pharmacologically to inhibit tumor cell growth. *Oncogene* 2005; 24: 6080–9.
117. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L et al. eIF4E—from translation to transformation. *Oncogene* 2004; 23: 3172–9.
118. Ramos-Nino ME, Vianale G, Sabo-Attwood T, et al. Human mesothelioma cells exhibit tumor cell-specific differences in phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activity that predict the efficacy of Onconase. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 835–42
119. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003; 22: 183–198.
120. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, et al. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 589–93.
121. Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, et al. AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2973–7.
122. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer." *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 127–50.
123. Cedres S, Montero MA, Martinez P, et al. Exploratory analysis of activation of PTEN–PI3K pathway and downstream proteins in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer* 2012; 77: 192–8.



124. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1263–84.
125. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 103–19.
126. de Melo M, Gerbase MW, Curran J, Pache JC. Phosphorylated extracellular signal-regulated kinases are significantly increased in malignant mesothelioma. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:855–61.
127. Flores RM, Pass HI, Seshan VE, et al. Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: Results in 663 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 620–6.
128. Bertino P, Carbone M, Pass H. Chemotherapy of malignant pleural mesothelioma. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10:99–107.
129. Ai J, Stevenson JP. Current Issues in Malignant Pleural Mesothelioma Evaluation and Management. *Oncologist* 2014; 19: 975–84.
130. Damhuis RA, Schroten C, Burgers JA. Population-based survival for malignant mesothelioma after introduction of novel chemotherapy. *Eur Respir J* 2012; 40: 185–9.
131. Sugarbaker DJ, Strauss GM, Lynch TJ, et al. Node status has prognostic significance in the multimodality therapy of diffuse, malignant mesothelioma. *J Clin Oncol* 1993;11:1172–8.
132. Van Schil PE, Baas P, Gaafar R, et al. Trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: Results from an EORTC phase II multicentre trial. *Eur Respir J* 2010;36:1362–9.
133. Gatta R, Mantovani R. NF-Y affects histone acetylation and H2A. Z deposition in cell cycle promoters. *Epigenetics* 2011; 6: 526–34.

- 134.** Wang YL, Faiola F, Xu M, et al. Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* 2008; 283: 33808–15.
- 135.** Egloff S, Szczepaniak SA, Deinstbier M, et al. The integrator complex recognizes a new double mark on the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 2010; 285: 20564–9.
- 136.** Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36: 40–5.
- 137.** Doudney K, Murdoch JN, Braybrook C, et al. Cloning and characterization of Igsf9 in mouse and human: a new member of the immunoglobulin superfamily expressed in the developing nervous system. *Genomics* 2002; 79: 663–70.
- 138.** Nagase T, Kikuno R, Ishikawa KI, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 2000; 7: 65–73.
- 139.** Grossmann A, Benlasfer N, Birth P, et al. Phospho-tyrosine dependent protein–protein interaction network. *Mol Syst Biol* 2015; 11: 794.
- 140.** Zweidler-McKay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4024–34.
- 141.** Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431: 1002–7.
- 142.** Person RE, Li FQ, Benson KF, et al. Mutations in proto-oncogene GF11 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 2003; 34: 308–12.
- 143.** Allayee H, Castellani LW, Cantor RM, et al. Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* 2003; 92: 1262–7.

- 144.** Takada D, Emi M, Ezura Y, et al. Interaction between the LDL-receptor gene bearing a novel mutation and a variant in the apolipoprotein A-II promoter: molecular study in a 1135-member familial hypercholesterolemia kindred. *J Hum Genet* 2002; 47: 656–64.
- 145.** Moore MN, Kao FT, Tsao YK, Chan L. Human apolipoprotein A-II: nucleotide sequence of a cloned cDNA, and localization of its structural gene on human chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 1–7.
- 146.** Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004; 427: 461–5.
- 147.** Jang JY, Choi Y, Jeon YK, Kim CW. Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R11.
- 148.** Jang JY, Choi Y, Jeon YK, et al. Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo. *BMC Cancer* 2008; 8: 160.
- 149.** Zamora M, Granell M, Mampel T, Vinas O. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett* 2004; 563: 155–60.
- 150.** Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al. The integrin  $\alpha 6$  binds and activates latent TGF  $\beta 1$ : a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96: 319–28.
- 151.** Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16899–903.
- 152.** Morris DG, Huang X, Kaminski N, et al. Loss of integrin  $\alpha \beta 6$ -mediated TGF- $\beta$  activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 2003; 422: 169–73.

- 153.** Poulter JA, Brookes SJ, Shore RC, et al. A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2189–97.
- 154.** Eberlein C, Rooney C, Ross SJ, et al. E-Cadherin and EpCAM expression by NSCLC tumour cells associate with normal fibroblast activation through a pathway initiated by integrin  $\alpha\beta6$  and maintained through TGF $\beta$  signalling. *Oncogene* 2015; 34: 704–16.
- 155.** Bang ML, Centner T, Fornoff F, et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual  $\approx$  700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 2001; 89: 1065–72.
- 156.** Gerull B, Gramlich M, Atherton J, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002; 30: 201–4.
- 157.** Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, et al. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 411–7.
- 158.** Hutchins JR, Toyoda Y, Hegemann B, et al. Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 2010; 328: 593–9.
- 159.** Wang D, King SM, Quill TA, et al. A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1117–22.
- 160.** Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150. PtdIns 3-kinase complex. *J Biol Chem* 1997; 272: 2477–85.
- 161.** Simarro M, Gimenez-Cassina A, Kedersha N, et al. Fast kinase domain-containing protein 3 is a mitochondrial protein essential for cellular respiration. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401: 440–6.

- 162.** Monden T, Wondisford FE, Hollenberg AN. Isolation and characterization of a novel ligand-dependent thyroid hormone receptor-coactivating protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 29834–41.
- 163.** Doyon Y, Selleck W, Lane WS, et al. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1884–96.
- 164.** Liby K, Wu H, Ouyang B, et al. Identification of the human homologue of the early-growth response gene *Snk*, encoding a serum-inducible kinase. *DNA Seq* 2001; 11: 527–33.
- 165.** Garg R, Callens S, Lim DS, et al. Chromatin Association of Rad17 Is Required for an Ataxia Telangiectasia and Rad-Related Kinase-Mediated S-Phase Checkpoint in Response to Low-Dose Ultraviolet Radiation. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 362–9.
- 166.** Von Deimling F, Scharf JM, Liehr T, et al. Human and mouse RAD17 genes: identification, localization, genomic structure and histological expression pattern in normal testis and seminoma. *Hum Genet* 1999; 105: 17–27.
- 167.** Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* 2003; 11: 329–40.
- 168.** Lundberg AS, McDevitt HO. Evolution of major histocompatibility complex class II allelic diversity: direct descent in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6545–9.
- 169.** Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, et al. Latitude and HLA-DRB1\* 04: 05 independently influence disease severity in Japanese multiple sclerosis: a cross-sectional study. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 239.
- 170.** Grunewald J, Kaiser Y, Ostadkarampour M, et al. T-cell receptor–HLA-DRB1 associations suggest specific antigens in pulmonary sarcoidosis. *E Respir J* 2016; 47: 898–909.

171. Ikari, K. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis. *Nihon Rinsho* 2016; 74: 897–901.
172. Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, et al. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 2004; 306: 1033–7.
173. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, et al. Bone marrow–allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med* 1990; 323: 1818–22.
174. Chung WH, Hung SI, Hong HS, et al. Medical genetics: a marker for Stevens–Johnson syndrome. *Nature* 2004; 428: 486.
175. Terao C, Yoshifuji H, Ohmura K, et al. Association of Takayasu arteritis with HLA-B\* 67: 01 and two amino acids in HLA-B protein. *Rheumatology* 2013; 52: 1769–74.
176. Pirim I, Atasoy M, Ikbal M, et al. HLA class I and class II genotyping in patients with Behcet's disease: a regional study of eastern part of Turkey. *Tissue Antigens* 2004; 64: 293–7.
177. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 2012; 19: 88.
178. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, et al. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 160–7.
179. Ganesh S, Amano K, Yamakawa K. Assignment 1 of the gene GRM1 coding for metabotropic glutamate receptor 1 to human chromosome band 6q24 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 314–5.
180. Ango F, Prezeau L, Muller T, et al. Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 2001; 411: 962–5.

- 181.** Sillevius Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, et al. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* 2000; 342: 21–7.
- 182.** Nord KH, Lilljebjorn H, Vezzi F, et al. GRM1 is upregulated through gene fusion and promoter swapping in chondromyxoid fibroma. *Nat Genet* 2014; 46: 474–7.
- 183.** Holtmann H, Enninga J, Kalble S, et al. The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 3508–16.
- 184.** Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; 425: 805–11.
- 185.** Wang F, Lee E, Lowes MA, et al. Prominent Production of IL-20 by CD68<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> Myeloid-Derived Cells in Psoriasis: Gene Regulation and Cellular Effects. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1590–9.
- 186.** Blumberg H, Conklin D, Xu WF, et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; 104: 9–19.
- 187.** Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16899–903.
- 188.** Metsu S, Rainger JK, Debacker K, et al. A CGG-Repeat Expansion Mutation in ZNF713 Causes FRA7A: Association with Autistic Spectrum Disorder in Two Families. *Hum Mutat* 2014; 35: 1295–300.
- 189.** McCarthy JV, Ni J, Dixit WM. RIP2 is a novel NF- $\kappa$ B-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 16968–75.
- 190.** Shiraishi H, Ishikura S, Matsuura K, et al. Sequence of the cDNA of a human dihydrodiol dehydrogenase isoform (AKR1C2) and tissue distribution of its mRNA. *Biochem J* 1998; 334: 399–405.

- 191.** Dufort I, Labrie F, Luu-The V. Human Types 1 and 3 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Differential Lability and Tissue Distribution 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 841–6.
- 192.** Noonan FC, Goodfellow PJ, Staloch LJ, et al. Antisense transcripts at the EMX2 locus in human and mouse. *Genomics* 2003; 81: 58–66.
- 193.** Iwase S, Januma A, Miyamoto K, et al. Characterization of BHC80 in BRAF–HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 601–8.
- 194.** Kim HG, Kim HT, Leach NT, et al. Translocations disrupting PHF21A in the Potocki-Shaffer-syndrome region are associated with intellectual disability and craniofacial anomalies. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 56–72.
- 195.** Sasaki T, Toh-E A, Kikuchi Y. Yeast Krr1p physically and functionally interacts with a novel essential Kri1p, and both proteins are required for 40S ribosome biogenesis in the nucleolus. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7971–9.
- 196.** Bowtell D, Fu P, Simon M, Senior P. Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6511–5.
- 197.** Yamamoto GL, Agüena M, Gos M, et al. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *J Med Genet* 2015; 52: 413–21.
- 198.** Thériault C, Pinard M, Comamala M, et al. MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 434–43.
- 199.** Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001; 276: 27371–5.
- 200.** Deloukas P, Matthews LH, Ashurst J, et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* 2001; 414: 865–71.
- 201.** Clauss A, Lilja H, Lundwall A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 383–9.



- 202.** Dunham I, Shimizu N, Roe BA, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 1999; 402: 489–95.
- 203.** Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005; 94: 29–86.
- 204.** Mikami I, Zhang F, Hirata T, et al. Inhibition of activated phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in malignant pleural mesothelioma leads to G1 cell cycle arrest. *Oncol Rep* 2010; 24: 1677–81.
- 205.** Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2007; 274: 1393–418.
- 206.** Stubbs M, Griffiths JR. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50: 44–55.
- 207.** Le Bras M, Borgne-Sanchez A, Touat Z, et al. Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res* 2006; 66: 9143–52.
- 208.** Chevrollier A, Loiseau D, Chabi B, et al. ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37: 307–17.
- 209.** Heddi A, Lestienne P, Wallace DC, Stepien G. Steady state levels of mitochondrial and nuclear oxidative phosphorylation transcripts in Kearns-Sayre syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 206–12.
- 210.** Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673–87.
- 211.** Barberis L, Wary KK, Fiucci G, et al. Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem* 2000; 275: 36532–40.
- 212.** Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028–33.
- 213.** Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995; 108: 2241–51.

- 214.** Garland LL, Taylor C, Pilkington DL, et al. A phase I pharmacokinetic study of HMN-214, a novel oral stilbene derivative with polo-like kinase-1–interacting properties, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5182–9.
- 215.** Santamaria A, Neef R, Eberspacher U, et al. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4024–36.
- 216.** Warnke S, Kemmler S, Hames RS, et al. Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 2004; 14: 1200–7.
- 217.** Burns TF, Fei P, Scata KA, et al. Silencing of the novel p53 target gene *Snk/Plk2* leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5556–71.
- 218.** Griffiths DJ, Barbet NC, McCready S, et al. Fission yeast *rad17*: a homologue of budding yeast *RAD24* that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J* 1995; 14: 5812–23.
- 219.** Parker AE, Van de Weyer I, Laus MC, et al. Identification of a human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe rad17+* checkpoint gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 18340–6.
- 220.** Lydall D, Weinert T. G2/M checkpoint genes of *Saccharomyces cerevisiae*: further evidence for roles in DNA replication and/or repair. *Mol Gen Genet* 1997; 256: 638–51.
- 221.** Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, et al. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 2001; 411: 969–74.
- 222.** Zhao M, Begum S, Ha PK, et al. Downregulation of *RAD17* in head and neck cancer. *Head Neck* 2008; 30: 35–42.
- 223.** Wang X, Wang L, Callister MD, et al. Human Rad17 is phosphorylated upon DNA damage and also overexpressed in primary non-small cell lung cancer tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7417–21.

- 224.** Robinson J, Halliwell, JA, McWilliam H, et al. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D1222 – D7.
- 225.** Passweg JR, Huard B, Tiercy JM, Roosnek E. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol* 2007; 28: 437–41.
- 226.** Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2007; 601: 123–31.
- 227.** Rigopoulou D, Martinez-Laso J, Martinez-Tello F, et al. Both class I and class II HLA antigens are thyroid cancer susceptibility factors. *Tissue Antigens* 1994; 43: 281–5.
- 228.** Ahn S, Choi HB, Kim TG. HLA and disease associations in Koreans. *Immune Netw* 2011; 11: 324–35.
- 229.** Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 174–81.
- 230.** Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet* 2003; 34: 108–12.
- 231.** Namkoong J, Shin SS, Lee HJ, et al. Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma. *Cancer Res* 2007; 67: 2298–305.
- 232.** Shin SS, Wall BA, Goydos JS, Chen S. AKT2 is a downstream target of metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1). *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 103–11.
- 233.** Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010; 466: 869–73.
- 234.** Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268–74.
- 235.** Chada S, Mhashilkar AM, Ramesh R, et al. Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism. *Mol Ther* 2004; 10: 1085–95.

- 236.** Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, et al. Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/interleukin-24, induces apoptosis in prostate cancer cells by promoting mitochondrial dysfunction and inducing reactive oxygen species. *Cancer Res* 2003; 63: 8138–44.
- 237.** Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, et al. The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 708–18.
- 238.** Chada S, Bocangel D, Ramesh R, et al. mda-7/IL24 kills pancreatic cancer cells by inhibition of the Wnt/PI3K signaling pathways: identification of IL-20 receptor-mediated bystander activity against pancreatic cancer. *Mol Ther* 2005; 11: 724–33.
- 239.** Tessema M, Willink R, Do K, et al. Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25. *Cancer Res* 2008; 68: 1707–14.
- 240.** Swarts DR, Van Neste L, Henfling ME, et al. An exploration of pathways involved in lung carcinoid progression using gene expression profiling. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2726–37.
- 241.** Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 1995; 270: 2008–11.
- 242.** Schonherr M, Bhattacharya A, Kottek T, et al. Genomewide RNAi screen identifies protein kinase C $\beta$  and new members of mitogen-activated protein kinase pathway as regulators of melanoma cell growth and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 418–30.
- 243.** Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431–6.
- 244.** Madonna G, Ullman CD, Gentilcore G, et al. NF- $\kappa$ B as potential target in the treatment of melanoma. *J Transl Med* 2012; 10: 53.
- 245.** Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, et al. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive

- NF- $\kappa$ B activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 1385–97.
- 246.** Safina A, Ren MQ, Vandette E, Bakin AV. TAK1 is required for TGF- $\beta$ 1-mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and metastasis. *Oncogene* 2008; 27: 1198–207.
- 247.** Meylan E, Tschopp J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 151–9.
- 248.** Adams S, Valchanova RS, Munz B. RIP2: a novel player in the regulation of keratinocyte proliferation and cutaneous wound repair? *Exp Cell Res* 2010; 316: 728–36.
- 249.** Guirado M, Gil H, Saenz-Lopez P, et al. Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer. *Hum Immunol* 2012; 73: 668–72.
- 250.** Wu S, Kanda T, Nakamoto S, et al. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 3775–83.
- 251.** Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene* 2006; 373: 28–34.
- 252.** Gipson IK. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4391–8.
- 253.** Perez BH, Gipson IK. Focus on molecules: human mucin MUC16. *Exp Eye Res* 2008; 87: 400–1.
- 254.** Seelenmeyer C, Wegehangel S, Lechner J, Nickel W. The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci* 2003; 116: 1305–18.
- 255.** Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem* 2004; 279: 9190–8.

- 256.** Boivin M, Lane D, Piche A, Rancourt C. CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis. *Gynecol Oncol* 2009; 115: 407–13.
- 257.** Gubbels JA, Belisle J, Onda M, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer* 2006; 5: 50.
- 258.** Ugurluer G, Chang K, Gamez ME, et al. Genome-based Mutational Analysis by Next Generation Sequencing in Patients with Malignant Pleural and Peritoneal Mesothelioma. *Anticancer Res* 2016; 36: 2331–8.
- 259.** Shukuya T, Serizawa M, Watanabe M, et al. Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 2014; 86: 35–40.
- 260.** Lo Iacono M, Monica V, Righi L, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 492–9.
- 261.** Ventii, Karen H., et al. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* 2008; 68: 6953–62.
- 262.** Kittler R, Pelletier L, Heninger AK, et al. Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1401–12.
- 263.** Yu H, Mashtalir N, Daou S, et al. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 5071–85.
- 264.** Machida YJ, Machida Y, Vashisht AA, et al. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *J Biol Chem* 2009; 284: 34179–88.
- 265.** Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci* 2012; 103: 868–74.

- 266.** Rusch A, Ziltener G, Nackaerts K, et al. Prevalence of BRCA-1 associated protein 1 germline mutation in sporadic malignant pleural mesothelioma cases. *Lung Cancer* 2015; 87: 77–9.
- 267.** CDKN2A. Genetics Home Reference. National Library of Medicine. January 2015. Retrieved April 14, 2015.
- 268.** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A. GeneCards. Weizmann Institute of Science. Retrieved April 14, 2015.
- 269.** Jiang DK, Wang WZ, Ren WH, et al. TP53 Arg72Pro polymorphism and skin cancer risk: a meta-analysis. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 220–8

